

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 099**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2014 PCT/US2014/049834**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15021080**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2014 E 14834665 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3030682**

54 Título: **Genotecas sintetizadas de novo**

30 Prioridad:

**05.08.2013 US 201361862445 P**  
**05.08.2013 US 201361862457 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.03.2021**

73 Titular/es:

**TWIST BIOSCIENCE CORPORATION (100.0%)**  
**455 Mission Bay Blvd. South, Suite 545**  
**San Francisco, CA 94158, US**

72 Inventor/es:

**BANYAI, WILLIAM;**  
**PECK, BILL JAMES;**  
**FERNANDEZ, ANDRES;**  
**CHEN, SIYUAN y**  
**INDERMUHLE, PIERRE**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E**  
**INVENCIONES, SLP**

**ES 2 815 099 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Genotecas sintetizadas de novo

5 **Antecedentes de la invención**

La síntesis química de genes de alta eficacia con elevada fidelidad y bajo coste tiene un papel fundamental en la biotecnología y la medicina, y en la investigación biomédica básica.

- 10 La síntesis génica de novo es una herramienta poderosa para la investigación biológica básica y las aplicaciones biotecnológicas. Aunque se conocen diversos métodos para la síntesis de fragmentos relativamente cortos a pequeña escala, estas técnicas adolecen de problemas de escalabilidad, automatización, velocidad, precisión y coste. Existe la necesidad de dispositivos para métodos sencillos, reproducibles, escalables, con menos propensión a errores y económicos que garanticen la síntesis satisfactoria de genes deseados y sea susceptible de automatización. Leproust et al (2010) Nucleic Acids Research, vol. 38, páginas 2522-2540, desvela la síntesis de oligonucleótidos de 150 unidades de alta calidad mediante despurinación limitante usando una reacción de destrilación alternativa.

**Sumario de la invención**

- 20 De acuerdo con la presente invención se proporciona un método para sintetizar oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato, que comprende:

- (a) proporcionar un sustrato con loci individuales resueltos en forma de microestructuras que están funcionalizadas con un resto químico adecuado para el acoplamiento de nucleótidos; y
- 25 (b) acoplar al menos dos bloques de construcción nucleotídicos a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas individuales en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci individuales resueltos a una velocidad de al menos 10 nucleótidos por hora de acuerdo con una secuencia predeterminada con especificidad de locus, sintetizándose de esta manera una pluralidad de oligonucleótidos que tienen n pares de bases de longitud, y en donde la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de secuencias predeterminadas con especificidad
- 30 de locus respectivas a una tasa de error menor de 1/1000 pb, en donde los bloques de construcción comprenden un nucleótido, un dinucleótido o un trinucleótido y
- (c) escindir los oligonucleótidos sintetizados del sustrato,

en donde n es al menos 100, tal como se define en la reivindicación 1 adjunta a este documento.

35 En las reivindicaciones dependientes se proporcionan realizaciones preferidas de la presente invención.

Tal como se ha indicado anteriormente, existe una urgente necesidad de métodos, dispositivos y sistemas que puedan sintetizar rápidamente genotecas grandes o fragmentos de oligonucleótidos relativamente más largos de manera eficaz y con menos errores. De manera similar, también existe la necesidad de métodos que puedan dividir y mezclar reactivos líquidos en una escala microfluídica para grandes cantidades de reacciones direccionables individualmente en paralelo. La presente divulgación satisface estas necesidades y proporciona también ventajas relacionadas.

45 En un aspecto, la presente divulgación proporciona una genoteca como se describe en el presente documento. La genoteca comprende una colección de genes. En algunos ejemplos, la colección comprende al menos 100 genes sintéticos preseleccionados diferentes que pueden ser de al menos 0,5 kb de longitud con una tasa de error menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona una genoteca que comprende una colección de genes. La colección puede comprender al menos 100 genes sintéticos preseleccionados diferentes que pueden ser, cada uno, de al menos 0,5

50 kb de longitud. Al menos el 90 % de los genes sintéticos preseleccionados puede comprender una tasa de error menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. Las secuencias predeterminadas deseadas pueden suministrarse por cualquier método, normalmente por un usuario, por ejemplo, un usuario que introduce datos utilizando un sistema computarizado. En diversos ejemplos, los ácidos nucleicos sintetizados se comparan con estas secuencias predeterminadas, en algunos casos mediante secuenciación de al

55 menos una porción de los ácidos nucleicos sintetizados, por ejemplo, utilizando métodos de secuenciación de nueva generación. En algunos ejemplos relacionados con cualquiera de las genotecas descritas en el presente documento, al menos el 90 % de los genes sintéticos preseleccionados comprenden una tasa de error menor de 1 en 5000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. En algunos ejemplos, al menos el 0,05 % de los genes sintéticos preseleccionados están libres de error. En algunos ejemplos, al menos el 0,5 % de los genes sintéticos preseleccionados están libres de error. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes sintéticos preseleccionados comprenden una tasa de error menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes sintéticos preseleccionados están libres de error o sustancialmente libres de error. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados comprenden una tasa de delección menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados comprenden una tasa de inserción menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que

comprenden los genes. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados comprenden una tasa de sustitución menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende al menos 10 copias de cada gen sintético. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende al menos 100 copias de cada gen sintético. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende al menos 1000 copias de cada gen sintético. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende al menos 1000000 copias de cada gen sintético. En algunos ejemplos, la colección de genes tal como se describe en el presente documento comprende al menos 500 genes. En algunos ejemplos, la colección comprende al menos 5000 genes. En algunos ejemplos, la colección comprende al menos 10000 genes. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados son de al menos 1 kb. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados son de al menos 2 kb. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados son de al menos 3 kb. En algunos ejemplos, las secuencias predeterminadas comprenden menos de 20 pb más que los genes sintéticos preseleccionados. En algunos ejemplos, las secuencias predeterminadas comprenden menos de 15 pb más que los genes sintéticos preseleccionados. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes sintéticos difiere de cualquier otro gen sintético al menos en un 0,1 %. En algunos ejemplos, cada uno de los genes sintéticos difiere de cualquier otro gen sintético al menos en un 0,1 %. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes sintéticos difiere de cualquier otro gen sintético al menos en un 10 %. En algunos ejemplos, cada uno de los genes sintéticos difiere de cualquier otro gen sintético al menos en un 10 %. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes sintéticos difiere de cualquier otro gen sintético al menos en 2 pares de bases. En algunos ejemplos, cada uno de los genes sintéticos difiere de cualquier otro gen sintético al menos en 2 pares de bases. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende además genes sintéticos que son menores de 2 kb con una tasa de error menor de 1 en 20000 pb en comparación con secuencias preseleccionadas de los genes. En algunos ejemplos, un subconjunto de los genes suministrables están unidos covalentemente entre sí. En algunos ejemplos, un primer subconjunto de la colección de genes codifica componentes de una primera ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende además seleccionar dichos uno o más productos metabólicos finales, construyéndose de esta manera la colección de genes. En algunos ejemplos, dichos uno o más productos metabólicos finales comprenden un biocombustible. En algunos ejemplos, un segundo subconjunto de la colección de genes codifica componentes de una segunda ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, la genoteca está en un espacio que es menor de 100 m<sup>3</sup>. En algunos ejemplos, la genoteca está en un espacio que es menor de 1 m<sup>3</sup>. En algunos ejemplos, la genoteca está en un espacio que es menor de 1 m<sup>3</sup>.

En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método de construcción de una genoteca. El método comprende las etapas de: introducir, antes de un primer punto de tiempo, en un medio no transitorio legible por ordenador, al menos una primera lista de genes y una segunda lista de genes, en donde los genes son de al menos 500 pb y, cuando se recopilan en una lista conjunta, la lista conjunta comprende al menos 100 genes; sintetizar más del 90 % de los genes en la lista conjunta antes de un segundo punto de tiempo, construyéndose de esta manera una genoteca con genes suministrables. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de un mes desde el primer punto de tiempo.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de construcción de una genoteca proporcionados en el presente documento, el método como se describe en el presente documento comprende suministrar al menos un gen en un segundo punto de tiempo. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables están libres de error. En algunos ejemplos, los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1/3000 que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista conjunta de genes. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1 en 3000 pb que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista conjunta de genes. En algunos ejemplos, los genes en un subconjunto de los genes suministrables están unidos covalentemente entre sí. En algunos ejemplos, un primer subconjunto de la lista conjunta de genes codifica componentes de una primera ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, cualquiera de los métodos de construcción de una genoteca tal como se describe en el presente documento comprende además seleccionar dichos uno o más productos metabólicos finales, construyéndose de esta manera la primera, la segunda o la lista conjunta de genes. En algunos ejemplos, dichos uno o más productos metabólicos finales comprenden un biocombustible. En algunos ejemplos, un segundo subconjunto de la lista conjunta de genes codifica componentes de una segunda ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, la lista conjunta de genes comprende al menos 500 genes. En algunos ejemplos, la lista conjunta de genes comprende al menos 5000 genes. En algunos ejemplos, la lista conjunta de genes comprende al menos 10000 genes. En algunos ejemplos, los genes pueden ser de al menos 1 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 2 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 3 kb. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 25 días desde el primer punto de tiempo. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 5 días desde el primer punto de tiempo. En algunos

ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 2 días desde el primer punto de tiempo. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

5 En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método de construcción de una genoteca. El método comprende las etapas de: introducir en un primer punto de tiempo, en un medio no transitorio legible por ordenador, una lista de genes; sintetizar más del 90 % de la lista de genes, construyéndose de esta manera una genoteca con genes suministrables; y suministrar los genes suministrables en un segundo punto de tiempo. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 100 genes y los genes pueden ser de al menos 500 pb. En algunos ejemplos adicionales, 10 el segundo punto de tiempo es menor de un mes desde el primer punto de tiempo.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de construcción de una genoteca proporcionados en el presente documento, en algunos ejemplos, el método como se describe en el presente documento comprende suministrar al menos un gen en un segundo punto de tiempo. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables están libres de error. En algunos ejemplos, los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1/3000 que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista de genes. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1 en 3000 pb que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista de genes. En algunos ejemplos, los genes en un subconjunto de los genes suministrables están unidos covalentemente entre sí. En algunos ejemplos, un primer subconjunto de la lista de genes codifica componentes de una primera ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, el método de construcción de una genoteca comprende además seleccionar dichos uno o más productos metabólicos finales, construyéndose de esta manera la lista de genes. En algunos ejemplos, dichos uno o más productos metabólicos finales comprenden un biocombustible. En algunos ejemplos, un segundo subconjunto de la lista de genes codifica componentes de una segunda ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

35 En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de construcción de una genoteca proporcionados en el presente documento, en algunos ejemplos, la lista de genes comprende al menos 500 genes. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 5000 genes. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 10000 genes. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 1 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 2 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 3 kb. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo tal como se describe en los métodos de construcción de una genoteca es menor de 25 días desde el primer punto de tiempo. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 5 días desde el primer punto de tiempo. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 2 días desde el primer punto de tiempo. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

45 En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método para sintetizar oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato. El método comprende a) proporcionar un sustrato con loci resueltos que están funcionalizados con un resto químico adecuado para el acoplamiento de nucleótidos; y b) acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 12 nucleótidos por hora de acuerdo con una secuencia predeterminada con especificidad de locus, sintetizándose de esta manera una pluralidad de oligonucleótidos que tienen n pares de bases de longitud. En el presente documento se describen diversos ejemplos relacionados con el método de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato.

55 En cualquiera de los métodos de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se proporciona en el presente documento, en algunos ejemplos, los métodos comprenden además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 15 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, el método comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 20 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, el método comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 25 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de n unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de 1/500 pb. En algunos ejemplos, al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de n unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de 1/1000 pb. En algunos ejemplos,

al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de  $n$  unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de  $1/2000$  pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de  $1/500$  pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de  $1/1000$  pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de  $1/2000$  pb.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de síntesis de oligonucleótidos de  $n$  unidades sobre un sustrato tal como se proporciona en el presente documento, en algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un grupo adenina, guanina, timina, citosina o uridina, o un nucleótido modificado. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un nucleótido modificado. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden dinucleótidos o trinucleótidos. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden fosforamidita. En algunos ejemplos,  $n$  es en los oligonucleótidos de  $n$  unidades es al menos 100. En algunos ejemplos,  $n$  es al menos 200. En algunos ejemplos,  $n$  es al menos 300. En algunos ejemplos,  $n$  es al menos 400. En algunos ejemplos, la superficie comprende al menos 100.000 loci resueltos y al menos dos de la pluralidad de oligonucleótidos en crecimiento pueden ser diferentes entre sí.

En algunos ejemplos, el método de síntesis de oligonucleótidos de  $n$  unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento comprende además secar al vacío el sustrato antes del acoplamiento. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un grupo bloqueante. En algunos ejemplos, el grupo bloqueante comprende DMT lábil en medio ácido. En algunos ejemplos, el DMT lábil en medio ácido comprende 4,4'-dimetoxitritilo. En algunos ejemplos, el método de síntesis de oligonucleótidos de  $n$  unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento comprende además oxidación o sulfurización. En algunos ejemplos, el método de síntesis de oligonucleótidos de  $n$  unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento comprende además tapar químicamente cadenas de oligonucleótidos no acopladas. En algunos ejemplos, el método de síntesis de oligonucleótidos de  $n$  unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento comprende además retirar el grupo bloqueante, desbloqueándose de esta manera la cadena de oligonucleótido en crecimiento. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la etapa de acoplamiento está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de secado al vacío. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la etapa de acoplamiento está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de oxidación. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la etapa de acoplamiento está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de tapado. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la etapa de acoplamiento está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de desbloqueo. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 10.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 100.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 1.000.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto de la presente divulgación, en el presente documento se proporciona un sistema para conducir un conjunto de reacciones paralelas. El sistema comprende: una primera superficie con una pluralidad de loci resueltos; un elemento de tapado con una pluralidad de tapas de reactor resueltas. En algunos ejemplos, el sistema alinea la pluralidad de tapas de reactor resueltas con la pluralidad de loci resueltos en la primera superficie formando un sellado temporal entre la primera superficie y el elemento de tapado, dividiéndose físicamente de esta manera los loci en la primera superficie en grupos de al menos dos loci en un reactor asociado con cada tapa de reactor. En algunos ejemplos, cada reactor alberga un primer conjunto de reactivos.

En algunos ejemplos relacionados con cualquiera de los sistemas para realizar un conjunto de reacciones paralelas tal como se describe en el presente documento, tras la liberación desde la primera superficie, las tapas de reactor conservan al menos una porción del primer conjunto de reactivos. En algunos ejemplos, la porción es aproximadamente el 30 %. En algunos ejemplos, la porción es aproximadamente el 90 %. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos reside en microestructuras fabricadas en una superficie de soporte. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 1 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 10 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 100 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, las microestructuras comprenden al menos dos canales en comunicación fluida entre sí. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente anchura. En algunos ejemplos, al menos dos canales comprenden dos canales con diferente longitud. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más largo que 100  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más corto que 1000  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más ancho que 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más estrecho que 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, el sistema comprende además una segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos a una densidad de al menos 0,1 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, el sistema comprende además una segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos a una densidad de al menos 1 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, el sistema comprende además una segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos a una densidad de al menos 10 por  $\text{mm}^2$ .

En algunos ejemplos relacionados con cualquiera de los sistemas para realizar un conjunto de reacciones paralelas tal como se describe en el presente documento, los loci resueltos de la primera superficie comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, los loci resueltos de la segunda superficie comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente a la primera o segunda superficie. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, los loci resueltos en la pluralidad de loci resueltos comprenden una longitud nominal de arco del perímetro a una densidad de al menos  $0,001 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, los loci resueltos en la pluralidad de loci resueltos comprenden una longitud nominal de arco del perímetro a una densidad de al menos  $0,01 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, los loci resueltos en la pluralidad de loci resueltos comprenden una superficie de alta energía. En algunos ejemplos, la primera y la segunda superficies comprenden una tensión de superficie diferente con un líquido determinado. En algunos ejemplos, la alta energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos está localizada en un sustrato sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliácridamidas, PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, los elementos de tapado comprenden un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliácridamidas, PDMS y vidrio. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto más, la presente divulgación también proporciona una matriz de recintos. La matriz de recintos comprende: una pluralidad de reactores resueltos que comprenden un primer sustrato y un segundo sustrato que comprenden tapas de reactor; con al menos 2 loci resueltos en cada reactor. En algunos casos, los reactores resueltos están separados por un sellado liberable. En algunos casos, las tapas de reactor conservan al menos parte del contenido de los reactores tras la liberación del segundo sustrato del primer sustrato. En algunos ejemplos, las tapas de reactor en el segundo sustrato tienen una densidad de al menos  $0,1$  por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, las tapas de reactor en el segundo sustrato tienen una densidad de al menos  $1$  por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, las tapas de reactor en el segundo sustrato tienen una densidad de al menos  $10$  por  $\text{mm}^2$ .

En algunos ejemplos relacionados con la matriz de recintos tal como se proporciona en el presente documento, las tapas de reactor conservan al menos el 30 % de los contenidos de los reactores. En algunos ejemplos, las tapas de reactor conservan al menos el 90 % de los contenidos de los reactores. En algunos ejemplos, los loci resueltos tienen una densidad de al menos  $2/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, los loci resueltos tienen una densidad de al menos  $100/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la matriz de recintos comprende además al menos 5 loci resueltos en cada reactor. En algunos ejemplos, la matriz de recintos tal como se describe en el presente documento comprende además al menos 20 loci resueltos en cada reactor. En algunos ejemplos, la matriz de recintos tal como se describe en el presente documento comprende además al menos 50 loci resueltos en cada reactor. En algunos ejemplos, la matriz de recintos tal como se describe en el presente documento comprende además al menos 100 loci resueltos en cada reactor.

En algunos ejemplos relacionados con la matriz de recintos tal como se describe en el presente documento, los loci resueltos residen en microestructuras fabricadas en una superficie de soporte. En algunos ejemplos, las microestructuras comprenden al menos dos canales en comunicación fluidica entre sí. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente anchura. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente longitud. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más largo que  $100 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más corto que  $1000 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más ancho que  $50 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más estrecho que  $100 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, las microestructuras comprenden una longitud nominal de arco del perímetro de dichos al menos dos canales que tiene una densidad de al menos  $0,01 \mu\text{m}/\mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, las microestructuras comprenden una longitud nominal de arco del perímetro de dichos al menos dos canales que tiene una densidad de al menos  $0,001 \mu\text{m}/\mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, los reactores resueltos están separados por un sellado liberable. En algunos ejemplos, el sellado comprende una válvula de expansión capilar.

En algunos ejemplos relacionados con la matriz de recintos tal como se describe en el presente documento, la pluralidad de loci resueltos del primer sustrato comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos del segundo sustrato comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente a la primera o segunda superficie. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos del primer sustrato comprenden una superficie de alta energía. En algunos ejemplos, el primer y el segundo sustratos comprenden una tensión de superficie diferente

con un líquido determinado. En algunos ejemplos, la energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos o las tapas de reactor están localizadas en un sustrato sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliacrilamidas, PDMS y vidrio. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto adicional más, la presente divulgación también proporciona un método para realizar un conjunto de reacciones paralelas. El método comprende: (a) proporcionar una primera superficie con una pluralidad de loci resueltos; (b) proporcionar un elemento de tapado con una pluralidad de tapas de reactor resueltas; (c) alinear la pluralidad de tapas de reactor resueltas con la pluralidad de loci resueltos en la primera superficie y formar un sellado temporal entre la primera superficie y el elemento de tapado, dividiéndose físicamente de esta manera los loci en la primera superficie en grupos de al menos dos loci; (d) realizar una primera reacción, formando de esta manera un primer conjunto de reactivos; y (e) liberar el elemento de tapado de la primera superficie, en donde cada tapa de reactor conserva al menos una porción del primer conjunto de reactivos en un primer volumen de reacción. En algunos ejemplos, la porción es aproximadamente el 30 %. En algunos ejemplos, la porción es aproximadamente el 90 %.

En algunos ejemplos, el método para realizar un conjunto de reacciones paralelas como se describe en el presente documento, comprende además las etapas de: (f) proporcionar una segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos; (g) alinear la pluralidad de tapas de reactor resueltas con la pluralidad de loci resueltos en la segunda superficie y formar un sellado temporal entre la segunda superficie y el elemento de tapado, dividiéndose físicamente de esta manera los loci en la segunda superficie; (h) realizar una segunda reacción usando la porción del primer conjunto de reactivos, formando de esta manera un segundo conjunto de reactivos; y (i) liberar el elemento de tapado de la segunda superficie, en donde cada tapa de reactor puede conservar al menos una porción del segundo conjunto de reactivos en un segundo volumen de reacción. En algunos ejemplos, la porción es aproximadamente el 30 %. En algunos ejemplos, la porción es aproximadamente el 90 %.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos para realizar un conjunto de reacciones paralelas tal como se describe en el presente documento, la pluralidad de loci resueltos puede tener una densidad de al menos 1 por  $\text{mm}^2$  en la primera superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 10 por  $\text{mm}^2$  en la primera superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 100 por  $\text{mm}^2$  en la primera superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor resueltas tiene una densidad de al menos 0,1 por  $\text{mm}^2$  en el elemento de tapado. En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor resueltas tiene una densidad de al menos 1 por  $\text{mm}^2$  en el elemento de tapado. En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor resueltas tiene una densidad de al menos 10 por  $\text{mm}^2$  en el elemento de tapado. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de más de 0,1 por  $\text{mm}^2$  en la segunda superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de más de 1 por  $\text{mm}^2$  en la segunda superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de más de 10 por  $\text{mm}^2$  en la segunda superficie.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos para realizar un conjunto de reacciones paralelas tal como se describe en el presente documento, la liberación de los elementos de tapado de las etapas de superficie tales como las etapas de liberación en (e) e (i) tal como se describe en el presente documento, puede realizarse a una velocidad diferente. En algunos ejemplos, los loci resueltos de la primera superficie comprenden un recubrimiento de reactivos para la primera reacción. En algunos ejemplos, los loci resueltos de la segunda superficie comprenden un recubrimiento de reactivos para la segunda reacción. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente a la primera o segunda superficie. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, los oligonucleótidos son de al menos 25 pb. En algunos ejemplos, los oligonucleótidos son de al menos 200 pb. En algunos ejemplos, los oligonucleótidos son de al menos 300 pb. En algunos ejemplos, los loci resueltos de la primera superficie comprenden una superficie de alta energía. En algunos ejemplos, la primera y la segunda superficies comprenden una tensión de superficie diferente con un líquido determinado. En algunos ejemplos, la energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados.

En algunos ejemplos relacionados con el método para realizar un conjunto de reacciones paralelas tal como se describe en el presente documento, la pluralidad de loci resueltos o las tapas de reactor resueltas están localizadas en un sustrato sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliacrilamidas, PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, el primer y el segundo volúmenes de reacción son diferentes. En algunos ejemplos, la primera o segunda reacción comprende ensamblaje cíclico por polimerasa. En algunos ejemplos, la primera o segunda reacción comprende síntesis enzimática de genes, reacción de templado y ligamiento, síntesis simultánea de dos genes a través de un gen híbrido, ligamiento shotgun y coligamiento, síntesis génica de inserción, síntesis génica mediante una cadena de ADN, ligamiento dirigido por molde, reacción en cadena de la ligasa, síntesis génica mediada por micromatriz, ensamblaje en fase sólida, tecnología de bloques de construcción de Sloning o síntesis génica mediada por ligamiento de ARN. En algunos ejemplos, los

métodos para realizar un conjunto de reacciones paralelas como se describe en el presente documento, comprende además enfriar el elemento de tapado. En algunos ejemplos, el método para realizar un conjunto de reacciones paralelas como se describe en el presente documento, comprende además enfriar la primera superficie. En algunos ejemplos, el método para realizar un conjunto de reacciones paralelas como se describe en el presente documento, comprende además enfriar la segunda superficie. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un sustrato que tiene una superficie funcionalizada. El sustrato que tiene una superficie funcionalizada puede comprender un soporte sólido que tiene una pluralidad de loci resueltos. En algunos ejemplos, los loci resueltos están funcionalizados con un resto que aumenta la energía de superficie del soporte sólido. En algunos ejemplos, los loci resueltos están localizados en microcanales.

En algunos ejemplos relacionados con el sustrato que tiene una superficie funcionalizada como se describe en el presente documento, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden un volumen menor de 1 nl. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de  $0,036 \mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, los loci resueltos en la pluralidad de loci resueltos comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente al sustrato. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, al menos uno de los microcanales es más largo que  $100 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los microcanales es más corto que  $1000 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los microcanales es más ancho que  $50 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, al menos uno de los microcanales es más estrecho que  $100 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, la energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de  $20$  grados. En algunos ejemplos, el soporte sólido comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliácridamidas, PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos  $1/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos  $100/\text{mm}^2$ . Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada. El método comprende:  
 (a) aplicar a través de al menos una bomba de inyección de tinta al menos una gota de un primer reactivo en un primer locus de una pluralidad de loci; (b) aplicar presión negativa al sustrato; y (c) aplicar a través de al menos una bomba de inyección de tinta al menos una gota de un segundo reactivo al primer locus.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento, el primer y segundo reactivos pueden ser diferentes. En algunos ejemplos, el primer locus está funcionalizado con un resto que aumenta su energía de superficie. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci reside en microestructuras fabricadas en la superficie del sustrato. En algunos ejemplos, las microestructuras comprenden al menos dos canales en comunicación fluidica entre sí. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente anchura. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente longitud. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más largo que  $100 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más corto que  $1000 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más ancho que  $50 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más estrecho que  $100 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, la superficie del sustrato comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliácridamidas, PDMS y vidrio.

En algunos ejemplos relacionados con los métodos para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento, el volumen de la gota del primer y/o segundo reactivos es al menos  $2 \text{ pl}$ . En algunos ejemplos, el volumen de la gota es aproximadamente  $40 \text{ pl}$ . En algunos ejemplos, el volumen de la gota es como máximo  $100 \text{ pl}$ . En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,01 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,001 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, la presión alrededor del sustrato se reduce a menos de  $1 \text{ mTorr}$ . Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con

cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además acoplar al menos un primer bloque de construcción procedente de la primera gota a una cadena de oligonucleótido en crecimiento en el primer locus. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un grupo bloqueante. En algunos ejemplos, el grupo bloqueante comprende DMT lábil en medio ácido. En algunos ejemplos, el DMT lábil en medio ácido comprende 4,4'-dimetoxitritilo. En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además oxidación o sulfurización. En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además tapar químicamente cadenas de oligonucleótidos no acopladas. En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además retirar el grupo bloqueante, desbloqueándose de esta manera la cadena de oligonucleótido en crecimiento. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la aplicación de presión negativa está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de acoplamiento. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la aplicación de presión negativa está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de oxidación. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la aplicación de presión negativa está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de tapado. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la aplicación de presión negativa está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de desbloqueo. En algunos ejemplos, el primer locus reside en una microestructura fabricada en la superficie del sustrato. En algunos ejemplos, al menos un reactivo para la etapa de oxidación se proporciona inundando la microestructura con una solución que comprende dicho al menos un reactivo. En algunos ejemplos, al menos un reactivo para la etapa de tapado se proporciona inundando la microestructura con una solución que comprende dicho al menos un reactivo. En algunos ejemplos, el primer locus reside en una microestructura fabricada en la superficie del sustrato y al menos un reactivo para la etapa de desbloqueo puede proporcionarse inundando la microestructura con una solución que comprende dicho al menos un reactivo. En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además encerrar el sustrato dentro de una cámara sellada. En algunos ejemplos, la cámara sellada permite purgar líquidos del primer locus. En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además drenar un líquido a través de un drenaje que está unido operativamente al primer locus. En algunos ejemplos, después de aplicar la presión negativa al sustrato, el contenido de humedad en el sustrato es menor de 1 ppm. En algunos ejemplos, la energía de superficie se aumenta correspondiendo a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para depositar reactivos en una pluralidad de loci resueltos. El método comprende aplicar a través de una bomba de inyección de tinta al menos una gota de un primer reactivo en un primer locus de una pluralidad de loci; aplicar a través de una bomba de inyección de tinta al menos una gota de un segundo reactivo en un segundo locus de la pluralidad de loci resueltos. En algunos ejemplos, el segundo locus es adyacente al primer locus. En algunos ejemplos más, el primer y segundo reactivos son diferentes. En algunos ejemplos adicionales, el primer y segundo loci residen en microestructuras fabricadas en una superficie de soporte. En algunos ejemplos más, las microestructuras comprenden al menos un canal que tiene más de 100  $\mu\text{m}$  de profundidad.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos para depositar reactivos en una pluralidad de loci resueltos tal como se describe en el presente documento, en algunos ejemplos, las microestructuras comprenden al menos dos canales en comunicación fluidica entre sí. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente anchura. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente longitud. En algunos ejemplos, el primer locus recibe menos del 0,1 % del segundo reactivo y el segundo locus recibe menos del 0,1 % del primer reactivo. En algunos ejemplos, los loci comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos 0,01  $\mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, los loci comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos 0,001  $\mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, el primer y el segundo loci comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente al sustrato. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más largo que 100  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más corto que 1000  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más ancho que 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más estrecho que 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, la superficie de soporte comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poli(acrilamidas), PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 1/mm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 100/mm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, el volumen de la gota es al menos 2 pl. En algunos ejemplos, el volumen de la gota es aproximadamente 40 pl. En algunos ejemplos, el volumen de la gota es como máximo 100 pl. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto adicional más, la presente divulgación proporciona un sistema microfluídico. El sistema microfluídico comprende una primera superficie con una pluralidad de micropocillos a una densidad de al menos 10 por  $\text{mm}^2$ ; y una gotícula dentro de uno de la pluralidad de micropocillos. En algunos ejemplos, la gotícula dentro de uno de la pluralidad de micropocillos tiene un número de Reynolds en un intervalo de aproximadamente 1-1000. En algunos ejemplos, la pluralidad de micropocillos tiene una densidad de al menos 1 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de micropocillos tiene una densidad de al menos 10 por  $\text{mm}^2$ .

En algunos ejemplos relacionados con el sistema microfluídico tal como se proporciona en el presente documento, el sistema microfluídico comprende además una bomba de inyección de tinta. En algunos ejemplos, la gotícula se deposita por la bomba de inyección de tinta. En algunos ejemplos, la gotícula se mueve en la mitad inferior de una primera dimensión del micropocillo. En algunos ejemplos, la gotícula se mueve en el tercio central de una primera dimensión del micropocillo. En algunos ejemplos, la pluralidad de micropocillos tiene una densidad de al menos 100 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la primera dimensión del micropocillo es mayor que la gotícula. En algunos ejemplos, el micropocillo es más largo que 100  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, el micropocillo es más corto que 1000  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, el micropocillo es más ancho que 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, el micropocillo es más estrecho que 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, el volumen de la gotícula es al menos 2 pl. En algunos ejemplos, el volumen de la gotícula es aproximadamente 40 pl. En algunos ejemplos, el volumen de la gotícula es como máximo 100 pl. En algunos ejemplos, cada uno de la pluralidad de micropocillos está conectado fluidicamente con al menos un microcanal. En algunos ejemplos, dicho al menos un microcanal está recubierto con un resto que aumenta su energía de superficie. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, la energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, los micropocillos se forman en un soporte sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliácridamidas, PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos 0,01  $\mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de 0,001  $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos 1  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos 1,25  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos 1,45  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación. En algunos ejemplos, la gotícula comprende un reactivo que permite la síntesis de oligonucleótidos. En algunos ejemplos, el reactivo es un nucleótido o análogo de nucleótido.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para depositar gotículas en una pluralidad de micropocillos. El método comprende aplicar a través de una bomba de inyección de tinta al menos una gotícula a un primer micropocillo de la pluralidad de micropocillos. En algunos casos, la gotícula dentro de uno de la pluralidad de micropocillos tiene un número de Reynolds en un intervalo de aproximadamente 1-1000. En algunos ejemplos, la pluralidad de micropocillos tiene una densidad de al menos 1/ $\text{mm}^2$ . En algunos casos más, la pluralidad de micropocillos tiene una densidad de al menos 10/ $\text{mm}^2$ .

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos para depositar gotículas en una pluralidad de micropocillos tal como se proporciona en el presente documento, la pluralidad de micropocillos puede tener una densidad de al menos 100/ $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, el micropocillo es más largo que 100  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, el micropocillo es más corto que 1000  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, el micropocillo es más ancho que 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, el micropocillo es más estrecho que 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, la gotícula se aplica a una velocidad de al menos 2 m/seg. En algunos ejemplos, el volumen de la gotícula es al menos 2 pl. En algunos ejemplos, el volumen de la gotícula es aproximadamente 40 pl. En algunos ejemplos, el volumen de la gotícula es como máximo 100 pl. En algunos ejemplos, cada uno de la pluralidad de micropocillos está conectado fluidicamente con al menos un microcanal. En algunos ejemplos, dicho al menos un micropocillo está recubierto con un resto que aumenta su energía de superficie. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, la energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, los micropocillos se forman en un soporte sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliácridamidas, PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos 0,01  $\mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos 0,001  $\mu\text{m}^2\text{m} / \mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos 1  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos 1,25  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos 1,45  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, una gotícula dentro de un micropocillo se desplaza en el tercio central del micropocillo. En algunos ejemplos, una gotícula dentro de un micropocillo se desplaza en la mitad inferior del micropocillo. En algunos ejemplos, la gotícula comprende un reactivo que permite la síntesis de oligonucleótidos. En algunos ejemplos, el reactivo es un nucleótido o análogo de nucleótido. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los

ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

5 En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método de división. El método de división comprende poner en contacto una primera superficie que comprende un líquido en una primera pluralidad de loci resueltos con una segunda superficie que comprende una segunda pluralidad de loci resueltos; determinar una velocidad de liberación tal que una fracción deseada del líquido pueda transferirse desde la primera pluralidad de loci resueltos a la segunda pluralidad de loci resueltos; y separar la segunda superficie de la primera superficie a dicha velocidad. En algunos ejemplos, la primera superficie comprende una primera tensión de superficie con el líquido y la segunda superficie puede comprender una segunda tensión de superficie con el líquido.

15 En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de división proporcionados en el presente documento, una porción de la primera superficie puede recubrirse con un resto que aumenta la tensión de superficie. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, la tensión de superficie de la primera superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, la tensión de superficie de la segunda superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua mayor de 90 grados. En algunos ejemplos, la primera superficie comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliácridamidas, PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos comprende una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,01 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos comprende una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,001 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la primera pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos  $1/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la primera pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos  $100/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la primera o la segunda superficie comprenden microcanales que albergan al menos una porción del líquido. En algunos ejemplos, la primera o la segunda superficie comprenden nanorreactores que albergan al menos una porción del líquido. En algunos ejemplos, el método de división tal como se describe en el presente documento comprende poner en contacto una tercera superficie con una tercera pluralidad de loci resueltos. En algunos ejemplos, el líquido comprende un ácido nucleico. En algunos ejemplos, la fracción deseada es mayor del 30 %. En algunos ejemplos, la fracción deseada es mayor del 90 %. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

35 En otro aspecto más, la presente divulgación también proporciona un método de mezcla tal como se describe en el presente documento. El método comprende: (a) proporcionar un primer sustrato que comprende una pluralidad de microestructuras fabricadas en el mismo; (b) proporcionar un segundo sustrato que comprende una pluralidad de tapas de reactor resueltas; (c) alinear el primer y el segundo sustratos de tal manera que una primera tapa de reactor de la pluralidad pueda configurarse para recibir líquido procedente de n microestructuras en el primer sustrato; y (d) liberar líquido procedente de las n microestructuras en la primera tapa de reactor, mezclándose así el líquido de las n microestructuras formando una mezcla.

45 En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de mezcla tal como se describen en el presente documento, la pluralidad de tapas de reactor resueltas puede tener una densidad de al menos  $0,1/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor resueltas tiene una densidad de al menos  $1/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor resueltas tiene una densidad de al menos  $10/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, cada una de la pluralidad de microestructuras puede comprender al menos dos canales de diferente anchura. En algunos ejemplos, dicho al menos uno de los canales es más largo que  $100 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, dicho al menos uno de los canales es más ancho que  $50 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, dicho al menos uno de los canales es más estrecho que  $100 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, dicho al menos uno de los canales está recubierto con un resto que aumenta su energía de superficie. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, las microestructuras se forman en un soporte sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliácridamidas, PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,01 \mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,001 \mu\text{m} / \mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de microestructuras comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente a la primera superficie. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, las microestructuras tienen una densidad de al menos  $1/\text{mm}^2$ . En

algunos ejemplos, las microestructuras tienen una densidad de al menos 100/mm<sup>2</sup>.

En algunos ejemplos relacionados con los métodos de mezcla tal como se describe en el presente documento, después de la etapa (c), que es el alineamiento del primer y el segundo sustratos de tal manera que una primera tapa de reactor de la pluralidad pueda configurarse para recibir líquido procedente de n microestructuras en el primer sustrato, hay un hueco de menos de 100 µm entre el primer y el segundo sustratos. En algunos ejemplos, después de la etapa (c), hay un hueco de menos de 50 µm entre el primer y el segundo sustratos. En algunos ejemplos, después de la etapa (c), hay un hueco de menos de 20 µm entre el primer y el segundo sustratos. En algunos ejemplos, después de la etapa (c), hay un hueco de menos de 10 µm entre el primer y el segundo sustratos. En algunos ejemplos, la mezcla se extiende parcialmente al interior del hueco. En algunos ejemplos, el método de mezcla comprende además sellar el hueco juntando el primer y el segundo sustrato entre sí. En algunos ejemplos, uno de los dos canales está recubierto con un resto que aumenta la energía de superficie que corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, la liberación se realiza por presión. En algunos ejemplos, el volumen de la mezcla es mayor que el volumen de la tapa de reactor. En algunos ejemplos, el líquido comprende un ácido nucleico. En algunos ejemplos, n es al menos 10. En algunos ejemplos, n es al menos 25. En algunos ejemplos, n, el número de microestructuras desde las cuales se mezcla el líquido formando una mezcla, puede ser al menos 50. En algunos ejemplos, n es al menos 75. En algunos ejemplos, n es al menos 100. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto más, la presente divulgación también proporciona un método para sintetizar oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento. El método comprende: proporcionar un sustrato con loci resueltos que están funcionalizados con un resto químico adecuado para el acoplamiento de nucleótidos; y acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos de acuerdo con una secuencia predeterminada específica de locus, sin transportar el sustrato entre los acoplamientos de dichos al menos dos bloques de construcción, sintetizándose de esta manera una pluralidad de oligonucleótidos que tienen n pares de bases de longitud.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento, el método puede comprender además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos, a una velocidad de al menos 12 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, el método comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 15 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, el método comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 20 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, el método comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 25 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de n unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de 1/500 pb. En algunos ejemplos, al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de n unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de 1/1000 pb. En algunos ejemplos, al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de n unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de 1/2000 pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de 1/500 pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de 1/1000 pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de 1/2000 pb.

En algunos ejemplos relacionados con el método de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento, los bloques de construcción comprenden un grupo adenina, guanina, timina, citosina o uridina, o un nucleótido modificado. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un nucleótido modificado. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden dinucleótidos. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden fosforamidita. En algunos ejemplos, n es al menos 100. En algunos ejemplos, en donde n es al menos 200. En algunos ejemplos, n es al menos 300. En algunos ejemplos, n es al menos 400. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 100.000 loci resueltos y al menos dos de la pluralidad de oligonucleótidos en crecimiento son diferentes entre sí. En algunos ejemplos, el método comprende además secar al vacío el sustrato antes del acoplamiento. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un grupo bloqueante. En algunos ejemplos, el grupo bloqueante comprende DMT lábil en medio ácido. En algunos ejemplos, el DMT lábil en medio ácido comprende 4,4'-dimetoxitritilo. En algunos ejemplos, el método comprende además oxidación o sulfurización. En algunos ejemplos, el método comprende además tapar químicamente cadenas de oligonucleótidos no acopladas. En algunos ejemplos, el método comprende además eliminar el grupo de bloqueo, desbloqueándose de esta manera la cadena de oligonucleótido en crecimiento. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 10.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y

una segunda superficie del sustrato. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 100.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 1.000.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto más, la presente divulgación también proporciona un método de construcción de una genoteca tal como se describe en el presente documento. El método comprende: introducir en un primer punto de tiempo, en un medio no transitorio legible por ordenador, una lista de genes, en donde la lista comprende al menos 100 genes y en donde los genes son de al menos 500 pb; sintetizar más del 90 % de la lista de genes, construyéndose de esta manera una genoteca con genes suministrables; preparar una biblioteca de secuenciación que representa la genoteca; obtener información de la secuencia; seleccionar al menos un subconjunto de los genes suministrables basándose en la información de la secuencia; y suministrar los genes suministrables seleccionados en un segundo punto de tiempo, en donde el segundo punto de tiempo es menor de un mes desde el primer punto de tiempo.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de construcción de una genoteca tal como se describe en el presente documento, la información de la secuencia puede obtenerse mediante secuenciación de última generación. La información de la secuencia puede obtenerse mediante secuenciación de Sanger. En algunos ejemplos, el método como comprende además suministrar al menos un gen en un segundo punto de tiempo. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables están libres de error. En algunos ejemplos, los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1/3000 que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista de genes. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1 en 3000 pb que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista de genes. En algunos ejemplos, un subconjunto de los genes suministrables están unidos covalentemente entre sí. En algunos ejemplos, un primer subconjunto de la lista de genes codifica componentes de una primera ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, el método comprende además seleccionar dichos uno o más productos metabólicos finales, construyéndose de esta manera la lista de genes. En algunos ejemplos, dichos uno o más productos metabólicos finales comprenden un biocombustible. En algunos ejemplos, un segundo subconjunto de la lista de genes codifica componentes de una segunda ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 500 genes. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 5000 genes. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 10000 genes. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 1 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 2 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 3 kb. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 25 días desde el primer punto de tiempo. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 5 días desde el primer punto de tiempo. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 2 días desde el primer punto de tiempo. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

Se proporciona en el presente documento, en algunos ejemplos, un dispositivo microfluídico para la síntesis de ácidos nucleicos, que comprende una porción de sustrato sustancialmente plana que comprende  $n$  agrupamientos de  $m$  conexiones microfluídicas entre superficies opuestas, en donde cada una de las  $n*m$  conexiones microfluídicas comprende un primer canal y un segundo canal, y en donde el primer canal dentro de cada uno de los  $n$  agrupamientos es común a las  $m$  conexiones microfluídicas, en donde la pluralidad de conexiones microfluídicas abarcan la porción de sustrato sustancialmente plana a lo largo de la dimensión más pequeña del sustrato, y en donde  $n$  y  $m$  son al menos 2. En algunos ejemplos, el segundo canal está funcionalizado con un recubrimiento que es capaz de facilitar la unión de un oligonucleótido al dispositivo. En algunos ejemplos, el dispositivo comprende además un primer oligonucleótido que está unido a los segundos canales en  $k$  de los  $n$  agrupamientos. En algunos ejemplos,  $k$  es 1. En algunos ejemplos, el dispositivo comprende además un segundo oligonucleótido que está unido a 1 de los  $n$  agrupamientos. En algunos ejemplos,  $l$  es 1. En algunos ejemplos, ninguno de los agrupamientos en los  $l$  agrupamientos están en los  $k$  agrupamientos.

En algunos ejemplos, el oligonucleótido es de al menos 10 nucleótidos, 25 nucleótidos, 50 nucleótidos, 75 nucleótidos, 100 nucleótidos, 125 nucleótidos, 150 nucleótidos o 200 nucleótidos de longitud.

En algunos ejemplos, el primer y el segundo oligonucleótidos difieren al menos en 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos o 10 nucleótidos.

En algunos ejemplos, las  $n*m$  conexiones microfluídicas son como máximo de 5 mm, 1,5 mm, 1,0 mm o 0,5 mm de

longitud. En algunos ejemplos, el primer canal dentro de cada uno de los n agrupamientos es como máximo de 5 mm, 1,5 mm, 1,0 mm o 0,5 mm de longitud. En algunos ejemplos, el primer canal dentro de cada uno de los n agrupamientos es al menos de 0,05 mm, 0,75 mm, 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm o 0,4 mm de longitud. En algunos ejemplos, el segundo canal en cada una de las n\*m conexiones microfluídicas es como máximo de 0,2 mm, 0,1 mm, 0,05 mm, 0,04 mm o 0,03 mm de longitud. En algunos ejemplos, el segundo canal en cada una de las n\*m conexiones microfluídicas es al menos de 0,001 mm, 0,005 mm, 0,01 mm, 0,02 mm o 0,03 mm de longitud. En algunos ejemplos, la sección transversal del primer canal dentro de cada uno de los n agrupamientos es al menos de 0,01 mm, 0,025 mm, 0,05 mm o 0,075 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal del primer canal dentro de cada uno de los n agrupamientos es como máximo de 1 mm, 0,5 mm, 0,25 mm, 0,1 mm o 0,075 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal del segundo canal en cada una de las n\*m conexiones microfluídicas es al menos de 0,001 mm, 0,05 mm, 0,01 mm, 0,015 mm o 0,02 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal del segundo canal en cada una de las n\*m conexiones microfluídicas es como máximo de 0,25 mm, 0,125 mm, 0,050 mm, 0,025 mm, 0,02 mm. En algunos ejemplos, la desviación típica en la sección transversal del segundo canal en cada una de las n\*m conexiones microfluídicas es menor del 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o 1 % de la media de la sección transversal. En algunos ejemplos, la variación en la sección transversal dentro de al menos el 90 % de los segundos canales de las n\*m conexiones microfluídicas es como máximo del 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o 1 %.

En algunos ejemplos, n es al menos 10, 25, 50, 100, 1000 o 10000. En algunos ejemplos, m es al menos 3, 4 o 5.

En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos el 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de silicio.

En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los segundos canales de las n\*m conexiones microfluídicas está funcionalizado con un resto que aumenta la energía de superficie. En algunos ejemplos, la energía de superficie se aumenta a un nivel que corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 75, 50, 30 o 20 grados.

En algunos ejemplos, la relación de aspecto para al menos el 90 % de los segundos canales de las n\*m conexiones microfluídicas es menor de 1, 0,5 o 0,3. En algunos ejemplos, la relación de aspecto para al menos el 90 % de los primeros canales de los n agrupamientos es menor de 0,5, 0,3 o 0,2.

En algunos ejemplos, la longitud total de al menos el 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 % o 95 % de las n\*m conexiones microfluídicas está dentro del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 % o 1000 % de la dimensión más pequeña del sustrato sustancialmente plano.

En algunos ejemplos, la porción sustancialmente plana del dispositivo se fabrica a partir de una oblea de SOI.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de amplificación de ácido nucleico, que comprende: (a) proporcionar una muestra que comprende n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados, comprendiendo cada uno una secuencia diana diferente; (b) proporcionar un primer adaptador que es hibridable con al menos una secuencia de hibridación de adaptador en m de los n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados; (c) proporcionar condiciones adecuadas para extender el primer adaptador usando los m ácidos nucleicos monocatenarios circularizados como molde, generándose de esta manera m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios, en donde cada uno de los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios comprende una pluralidad de réplicas de la secuencia diana procedente de su molde; (d) proporcionar un primer oligonucleótido auxiliar que es hibridable con el primer adaptador; y (e) proporcionar un primer agente en condiciones adecuadas para que el primer agente corte los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios en una pluralidad de sitios de corte, generándose así una pluralidad de réplicas monocatenarias de las secuencias diana en los m ácidos nucleicos monocatenarios circularizados. En algunos ejemplos, n o m es al menos 2. En algunos ejemplos, n o m es al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 o 500. En algunos ejemplos, m es menor que n. En algunos ejemplos, la muestra que comprende los n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados se forma proporcionando al menos n ácidos nucleicos monocatenarios lineales, comprendiendo cada uno de ellos una de las diferentes secuencias diana y circularizando los n ácidos nucleicos monocatenarios lineales, generándose de esta manera los n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados. En algunos ejemplos, el primer adaptador es hibridable con los dos extremos de los n ácidos nucleicos monocatenarios lineales al mismo tiempo. En algunos ejemplos, las diferentes secuencias diana en los n ácidos nucleicos monocatenarios lineales están flanqueadas por una primera y una segunda secuencias de hibridación de adaptador. En algunos ejemplos, dichos al menos n ácidos nucleicos monocatenarios lineales se generan por síntesis de oligonucleótidos de novo. En algunos ejemplos, la primera secuencia de hibridación de adaptador en cada uno de los n ácidos nucleicos monocatenarios lineales difiere en no más de dos bases nucleotídicas. En algunos ejemplos, la primera o la segunda secuencia de hibridación de adaptador es de al menos 5 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos, la primera o la segunda secuencia de hibridación de adaptador es como máximo de 75, 50, 45, 40, 35, 30 o 25 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos, los extremos de los n ácidos nucleicos monocatenarios lineales se emparejan con bases adyacentes en el primer adaptador cuando el primer adaptador hibrida con los dos extremos del ácido nucleico monocatenario lineal al mismo tiempo. En algunos ejemplos, las localizaciones de la pluralidad de sitios de corte son tales que la secuencia de hibridación de adaptador se corta a partir de al menos el 5 % de la porción de secuencia restante de las m réplicas de ácido nucleico monocatenario circularizado. En algunos ejemplos, permanece sin cortar al menos el 5 % de la secuencia de las m réplicas de ácido nucleico monocatenario circularizado distintas de dicha al menos una secuencia de hibridación de adaptador. En algunos ejemplos, las localizaciones de la pluralidad

de sitios de corte están fuera de dicha al menos una secuencia de hibridación de adaptador. En algunos ejemplos, las localizaciones de la pluralidad de sitios de corte son independientes de las secuencias diana. En algunos ejemplos, las localizaciones de la pluralidad de sitios de corte se determinan por al menos un elemento de secuencia dentro de las secuencia del primer adaptador o el primer oligonucleótido auxiliar. En algunos ejemplos, el elemento de secuencia comprende un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción. En algunos ejemplos, el primer oligonucleótido auxiliar o el primer oligonucleótido adaptador comprende un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción de Tipo IIS. En algunos ejemplos, los sitios de reconocimiento están separados por al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de los sitios de corte. En algunos ejemplos, la pluralidad de sitios de corte están en uniones de ácidos nucleicos mono y bicatenarios. En algunos ejemplos, los ácidos nucleicos bicatenarios comprenden el primer adaptador y el primer oligonucleótido auxiliar. En algunos ejemplos, los ácidos nucleicos monocatenarios consisten esencialmente en las m secuencias diana diferentes. En algunos ejemplos, las m secuencias diana diferentes tienen como máximo el 95 % de similitud por pares. En algunos ejemplos, las m secuencias diana diferentes tienen como máximo el 90 % de similitud por pares. En algunos ejemplos, las m secuencias diana diferentes tienen como máximo el 80 % de similitud por pares. En algunos ejemplos, las m secuencias diana diferentes tienen como máximo el 50 % de similitud por pares. En algunos ejemplos, la generación de los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios comprende amplificación con desplazamiento de cadena. En algunos ejemplos, el primer oligonucleótido auxiliar comprende una etiqueta de afinidad. En algunos ejemplos, la etiqueta de afinidad comprende biotina o un derivado de biotina. En algunos ejemplos, el método comprende además aislar ácidos nucleicos bicatenarios de la muestra. En algunos ejemplos, el aislamiento comprende purificación por afinidad, cromatografía o purificación en gel. En algunos ejemplos, el primer agente comprende una endonucleasa de restricción. En algunos ejemplos, el primer agente comprende al menos dos endonucleasas de restricción. En algunos ejemplos, el primer agente comprende una endonucleasa de restricción de Tipo IIS. En algunos ejemplos, el primer agente comprende una endonucleasa de mellado (nicking). En algunos ejemplos, el primer agente comprende al menos dos endonucleasas de mellado (nicking). En algunos ejemplos, el primer agente comprende al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en MlyI, SclI, AlwI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PflI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BsiFI, BsoMAI, Bst71I, FagI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjiI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, Mn1I, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MbolI, AculI, BciVI, Bmrl, Bpml, BpuEI, BseRI, BsgI, Bsml, BsrDI, BtsI, EciI, Mmel, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, Bmul, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, Tsal, UbaF1 1I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI y Nt.BspQI, y variantes de las mismas. En algunos ejemplos, el primer agente comprende esencialmente la misma función, reconoce la misma o esencialmente la misma secuencia de reconocimiento, o corta el mismo o esencialmente el mismo sitio de corte, que cualquiera de los primeros agentes indicados o variantes. En algunos ejemplos, dichas al menos dos enzimas de restricción comprenden MlyI y BciVI o BfuCI y MlyI. En algunos ejemplos, el método comprende además (a) dividir la muestra en una pluralidad de fracciones; (b) proporcionar al menos una fracción con un segundo adaptador que es hibridable con al menos una secuencia de hibridación de adaptador en k de los n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados diferentes; (c) proporcionar condiciones adecuadas para extender el segundo adaptador usando los k ácidos nucleicos monocatenarios circularizados como molde, generándose de esta manera k ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios, en donde el segundo ácido nucleico de amplicón monocatenario comprende una pluralidad de réplicas de la secuencia diana procedente de su molde; (d) proporcionar un segundo oligonucleótido auxiliar que es hibridable con el segundo adaptador; y (e) proporcionar un segundo agente en condiciones adecuadas para que el agente corte los k ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios en una segunda pluralidad de sitios de corte, generándose así una pluralidad de réplicas monocatenarias de las secuencias diana en los k ácidos nucleicos monocatenarios circularizados. En algunos ejemplos, el primer y el segundo adaptadores son iguales. En algunos ejemplos, el primer y el segundo oligonucleótidos auxiliares son iguales. En algunos ejemplos, el primer y el segundo agentes son iguales. En algunos ejemplos,  $k + m$  es menor que  $n$ . En algunos ejemplos,  $k$  es al menos 2. En algunos ejemplos, la muestra que comprende los n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados se forma por amplificación de ácidos nucleicos monocatenarios. En algunos ejemplos, la amplificación de ácidos nucleicos monocatenarios comprende: (a) proporcionar una muestra que comprende al menos m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados; (b) proporcionar un primer adaptador precursor que es hibridable con los m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados; (c) proporcionar condiciones adecuadas para extender el primer adaptador precursor usando los m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados como molde, generándose de esta manera m ácidos nucleicos de amplicón precursores monocatenarios, en donde el ácido nucleico de amplicón monocatenario comprende una pluralidad de réplicas de los m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados; (d) proporcionar un primer oligonucleótido auxiliar precursor que es hibridable con el primer adaptador precursor; y (e) proporcionar un primer agente precursor en condiciones adecuadas para que el primer agente precursor corte el primer ácido nucleico de amplicón precursor monocatenario en una pluralidad de sitios de corte, generándose de esta manera los m ácidos nucleicos precursores lineales. En algunos ejemplos, el método comprende además circularizar los m ácidos nucleicos precursores lineales, formando de esta manera réplicas de los m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados. En algunos ejemplos, los m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados se amplifican al menos 10, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 10000 veces, o más en réplicas monocatenarias. En algunos ejemplos, al menos uno de los m ácidos nucleicos monocatenarios circularizados está a una concentración de aproximadamente o como máximo de aproximadamente 100 nM, 10 nM, 1 nM, 50 pM, 1 pM, 100 fM, 10 fM, 1fM o menor. En algunos ejemplos, la circularización comprende ligamiento. En

algunos ejemplos, el ligamiento comprende el uso de una ligasa seleccionada del grupo que consiste en la ADN ligasa de T4, ADN ligasa de T3, ADN ligasa de T7, ADN ligasa de E. coli, ADN ligasa Taq y ADN ligasa 9N.

5 En un aspecto adicional más, la divulgación, en diversos ejemplos se refiere a un kit que comprende: (a) un primer adaptador; (d) un primer oligonucleótido auxiliar que es hibridable con el adaptador; (c) una ligasa; y (d) un primer agente de escisión, que comprende al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en MlyI, SclI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, Hgal, PfuI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FagI, AclII, BbvII, BveI, LglI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, Ajnl, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, Mn1I, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MbolI, Acul, BciVI, Bmrl, Bpml, BpuEI, BseRI, BsgI, Bsml, BsrDI, BtsI, EciI, Mmel, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, Bmul, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, Tsul, UbaF11I, Unbl, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI y Nt. BspQI, y variantes de las mismas. En algunos ejemplos, el primer agente comprende esencialmente la misma función, reconoce la misma o esencialmente la misma secuencia de reconocimiento, o corta en el mismo o esencialmente el mismo sitio de corte que cualquiera de los primeros agentes indicados y variantes. En algunos ejemplos, el kit comprende además un segundo agente de escisión. En algunos ejemplos, el segundo agente de escisión comprende una enzima seleccionada del grupo que consiste en MlyI, SclI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, Hgal, PfuI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FagI, AclII, BbvII, BveI, LglI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, Ajnl, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, Mn1I, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MbolI, Acul, BciVI, Bmrl, Bpml, BpuEI, BseRI, BsgI, Bsml, BsrDI, BtsI, EciI, Mmel, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, Bmul, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, HinIII, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, Tsul, UbaF11I, Unbl, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI y Nt.BspQI, y variantes de las mismas. En algunos ejemplos, el segundo agente comprende esencialmente la misma función, reconoce la misma o esencialmente la misma secuencia de reconocimiento, o corta en el mismo o esencialmente el mismo sitio de corte que cualquiera de los segundos agentes indicados y variantes. En algunos ejemplos, el primer agente de escisión comprende MlyI. En algunos ejemplos, el segundo agente de escisión comprende BciVI o BfuCI.

30 En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método de amplificación de ácido nucleico, que comprende: (a) proporcionar una muestra que comprende n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados, comprendiendo cada uno una secuencia diana diferente; (b) proporcionar un primer adaptador que es hibridable con al menos una secuencia de hibridación de adaptador en m de los n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados; (c) proporcionar condiciones adecuadas para extender el primer adaptador usando los m ácidos nucleicos monocatenarios circularizados como molde, generándose de esta manera m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios, en donde cada uno de los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios comprende una pluralidad de réplicas de la secuencia diana procedente de su molde; (d) generar sitios de reconocimiento bicatenarios para un primer agente en los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios; y (e) proporcionar el primer agente en condiciones adecuadas para que el primer agente corte los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios en una pluralidad de sitios de corte, generándose así una pluralidad de réplicas monocatenarias de las secuencias diana en los m ácidos nucleicos monocatenarios circularizados. En algunos ejemplos, los sitios de reconocimiento bicatenarios comprenden una primera porción del primer adaptador en una primera cadena de los sitios de reconocimiento bicatenarios y una segunda cadena del primer adaptador en la segunda cadena de los sitios de reconocimiento bicatenarios. En algunos ejemplos, el adaptador comprende una secuencia palindrómica. En algunos ejemplos, los sitios de reconocimiento bicatenarios se generan por hibridación de la primera y la segunda porciones del primer adaptador entre sí. En algunos ejemplos, los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios comprenden una pluralidad de regiones autohibridadas bicatenarias.

50 En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método para generar una molécula larga de ácido nucleico, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos inmovilizados en una superficie, en donde dicha pluralidad de ácidos nucleicos comprende ácidos nucleicos que tienen secuencias complementarias solapantes; (b) liberar dicha pluralidad de ácidos nucleicos en una solución; y (c) proporcionar condiciones que promuevan: i) la hibridación de dichas secuencias complementarias solapantes para formar una pluralidad de ácidos nucleicos hibridados; y ii) la extensión o ligamiento de dichos ácidos nucleicos hibridados para sintetizar la molécula larga de ácido nucleico.

60 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un sistema automático capaz de procesar uno o más sustratos, que comprende: un cabezal de impresión de inyección de tinta para pulverizar una microgotícula que comprende una especie química sobre un sustrato; un transporte de exploración para explorar el sustrato adyacente al cabezal de impresión para depositar selectivamente la microgotícula en sitios especificados; una celda de flujo para tratar el sustrato sobre el que se deposita la microgotícula mediante la exposición del sustrato a uno o más fluidos seleccionados; una unidad de alineamiento para alinear el sustrato correctamente con respecto al cabezal de impresión cada vez cuando el sustrato se posiciona adyacente al cabezal de impresión para la deposición; y que no comprende un transporte de tratamiento para mover el sustrato entre el cabezal de impresión y la celda de flujo para el tratamiento en la celda de flujo, en donde dicho transporte de tratamiento y dicho transporte de exploración son elementos diferentes.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un sistema automático para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato, siendo dicho sistema automático capaz de procesar uno o más sustratos, que comprende: un cabezal de impresión de inyección de tinta para pulverizar una solución que comprende un nucleósido o nucleósido activado sobre un sustrato; un transporte de exploración para explorar el sustrato adyacente al cabezal de impresión para depositar selectivamente el nucleósido en sitios especificados; una celda de flujo para tratar el sustrato sobre el que se deposita el monómero mediante la exposición del sustrato a uno o más fluidos seleccionados; una unidad de alineamiento para alinear el sustrato correctamente con respecto al cabezal de impresión cada vez cuando el sustrato se posiciona adyacente al cabezal de impresión para la deposición; y que no comprende un transporte de tratamiento para mover el sustrato entre el cabezal de impresión y la celda de flujo para el tratamiento en la celda de flujo, en donde dicho transporte de tratamiento y dicho transporte de exploración son elementos diferentes.

En un aspecto adicional más, la divulgación se refiere a un sistema automático que comprende: un cabezal de impresión de inyección de tinta para pulverizar una microgotícula que comprende una especie química sobre un sustrato; un transporte de exploración para explorar el sustrato adyacente al cabezal de impresión para depositar selectivamente la microgotícula en sitios especificados; una celda de flujo para tratar el sustrato sobre el que se deposita la microgotícula mediante la exposición del sustrato a uno o más fluidos seleccionados; y una unidad de alineamiento para alinear el sustrato correctamente con respecto al cabezal de impresión cada vez cuando el sustrato se posiciona adyacente al cabezal de impresión para la deposición; y en donde el sistema NO comprende un transporte de tratamiento para mover el sustrato entre el cabezal de impresión y la celda de flujo para el tratamiento en la celda de flujo.

#### Breve descripción de los dibujos

Las nuevas características de la divulgación se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente divulgación haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone ejemplos ilustrativos, en la que se utilizan los principios de la divulgación y los dibujos adjuntos de los cuales:

la figura 1 demuestra un proceso de ejemplo que explica en términos generales la síntesis génica y tecnologías de nanorreactor. La figura 1A ilustra un proceso de ejemplo para la síntesis de oligonucleótidos sobre un sustrato usando una impresora de inyección de tinta; la figura 1B ilustra un proceso de ejemplo para la amplificación de genes en un recinto resuelto, o un nanorreactor. La figura 1C ilustra un ejemplo del uso de una pluralidad de obleas que asocian reacciones microfluídicas para la síntesis de oligonucleótidos y el ensamblaje de genes en paralelo.

Las figuras 2A-C son diagramas de bloque que demuestran flujos de proceso empresariales. Se puede ignorar la clonación de los genes sintetizados (figura 2B). En la figura 2C, los genes sintetizados se clonan antes del transporte (figura 2C).

La figura 3 demuestra una descripción en términos generales de un sistema para la síntesis de oligonucleótidos, que incluye una impresora, por ejemplo, una impresora de inyección de tinta, para la deposición de reactivo, un sustrato (oblea), esquemas que describen en términos generales el alineamiento de los elementos del sistema en múltiples direcciones y configuraciones ejemplares para el flujo de reactivos.

La figura 4 ilustra un ejemplo del diseño de microestructuras construidas en un sustrato (reactor de oblea de oligonucleótidos).

La figura 5 es un diagrama que demuestra un proceso ejemplar para la deposición de reactivo en las microestructuras ilustradas en la figura 4. El área seleccionada para la funcionalización de superficies permite la propagación del reactivo al interior de pocillos funcionalizados más pequeños en condiciones de humedad.

La figura 6A son ilustraciones que ejemplifican adicionalmente las microestructuras ilustradas en la figura 4. La figura 6B son ilustraciones de diversos diseños alternativos para las microestructuras. La figura 6C ilustra un diseño de trazado para las microestructuras en el sustrato (oblea).

La figura 7 ilustra un diseño de trazado ejemplar de tapas de reactor en un elemento de tapado.

La figura 8 es un diagrama que demuestra un flujo de trabajo de proceso ejemplar para la síntesis génica hasta el envío.

La figura 9A muestra ilustraciones de una celda de flujo ejemplar con la tapa abierta o cerrada. La figura 9B ilustra una vista en sección transversal de una celda de flujo ejemplar y conjunto colector de residuos. La figura 9C ilustra una vista en sección transversal ampliada de una celda de flujo ejemplar y conjunto colector de residuos.

La figura 10A ilustra un ejemplo de un mandril de vacío de una sola ranura con una sola ranura de 1-5 mm, de 198 mm de diámetro. La figura 10B ilustra un inserto de metal sinterizado entre un sustrato (oblea) y el mandril de vacío y un elemento de control térmico opcional incorporado en el elemento de recepción. La figura 10C ilustra una vista en sección transversal del mandril de vacío de una sola ranura ejemplificado en la figura 10A.

La figura 11 ilustra la aplicación ejemplar de la química de la fosforamidita convencional para la síntesis de oligonucleótidos.

La figura 12 ilustra una aplicación ejemplar del ensamblaje de cadenas por polimerasa (PCA).

La figura 13 son diagramas que demuestran la ventaja de usar oligonucleótidos más largos (por ejemplo, de aproximadamente 300 pb) frente a oligonucleótidos más cortos (por ejemplo, de aproximadamente 50 kb). Los oligonucleótidos más largos pueden usarse en el ensamblaje de productos génicos con error reducido.

La figura 14 son diagramas que demuestran una aplicación combinada ejemplar de PCA y métodos de Gibson

para el ensamblaje de oligonucleótidos en productos génicos.

La figura 15 es un diagrama que demuestra un método de corrección de errores adecuado especialmente para la aplicación a productos de síntesis génica con mayores tasas de error.

5 La figura 16 es un diagrama que demuestra un método de corrección de errores adecuado especialmente para la aplicación a productos de síntesis génica con menores tasas de error.

La figura 17 es un diagrama que demuestra el uso de sondas tipo padlock para la generación de bibliotecas de secuenciación identificadas por código de barras molecular y procesos de control de calidad (QC) que comprenden secuenciación de última generación (NGS).

10 La figura 18 ilustra un ejemplo de un conjunto de inyección de tinta, con 10 cabezales de inyección de tinta que tienen placas de silicio con orificios con 256 boquillas en centros de 254  $\mu\text{m}$  y altura de vuelo de 100  $\mu\text{m}$ .

La figura 19 ilustra un ejemplo de un sistema informático que puede usarse en relación con ejemplos ilustrativos de la presente divulgación.

La figura 20 es un diagrama de bloques que ilustra una primera arquitectura de ejemplo de un sistema informático 2000 que puede usarse en relación con ejemplos ilustrativos de la presente divulgación.

15 La figura 21 es un diagrama que demuestra una red 2100 configurada para incorporar una pluralidad de sistemas informáticos, una pluralidad de teléfonos móviles y asistentes de datos personales, y almacenamiento conectado a la red (NAS) que se pueden utilizar en relación con ejemplos ilustrativos de la presente divulgación.

20 La figura 22 es un diagrama de bloques de un sistema informático multiprocesador 2200 que usa un espacio de memoria de dirección virtual compartida que puede usarse en relación con ejemplos ilustrativos de la presente divulgación.

La figura 23 es un diagrama que demuestra etapas ejemplares que constituyen el procesamiento de extremo frontal para la fabricación de microestructuras en un sustrato (por ejemplo, oblea de silicio).

25 La figura 24 es un diagrama que demuestra etapas ejemplares que constituyen el procesamiento de extremo posterior para la funcionalización de las superficies de microestructuras en un sustrato (por ejemplo, oblea de silicio).

Las figuras 25A-C representan diferentes vistas de un grupo que comprende una alta densidad de agrupamientos.

30 Las figuras 25D-E representan diferentes vistas de un diagrama de un dispositivo microfluídico que comprende una porción de sustrato sustancialmente plana. La figura 25F representa la vista de dispositivo de un diagrama de un dispositivo microfluídico que comprende una porción de sustrato sustancialmente plana que tiene 108 pocillos de reacción y un área diseñada para un marcador. La figura 25G representa la vista de dispositivo de un grupo que comprende 109 agrupamientos.

35 La figura 26A representa una vista en sección transversal de un diagrama de un nanorreactor, en donde la vista muestra una fila del nanorreactor que comprende 11 pocillos. La figura 26B representa una vista de dispositivo de un diagrama de un nanorreactor que comprende 108 pocillos elevados. El detalle F representa una vista detallada de un pocillo del nanorreactor. La figura 26C representa una vista de dispositivo inclinada del diagrama de nanorreactor mostrado en la figura 26B. La figura 26D representa una vista de soporte de un diagrama de un nanorreactor. El detalle H muestra una vista detallada de una marca de referencia en el lado de soporte del nanorreactor. La figura 26E representa una vista de dispositivo de un diagrama de nanorreactor que comprende 108 pocillos y un marcador.

40 La Figura 27 ilustra en detalle las características de diseño de un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos ejemplar que está funcionalizado diferencialmente.

La figura 28 ilustra un flujo de trabajo para el proceso de fabricación frontal para el dispositivo ejemplar de la figura 15.

45 La figura 29 ilustra un flujo de proceso inicial ejemplar para la fabricación en la parte posterior del dispositivo de síntesis de oligonucleótidos de la figura 15 para una funcionalización diferencial.

La figura 30 ilustra una superficie funcionalizada con densidad controlada de grupos activos para la síntesis de ácidos nucleicos.

50 La figura 31 muestra una imagen de un dispositivo fabricado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

La figura 32 ilustra los detalles de diseño de un dispositivo nanorreactor ejemplar.

La figura 33 ilustra un flujo de proceso inicial ejemplar para la fabricación frontal del dispositivo ejemplar descrito en la figura 20.

La figura 34 ilustra un flujo de proceso inicial ejemplar para la fabricación en la parte posterior del dispositivo nanorreactor ejemplar de la figura 20 para la funcionalización.

55 La figura 35 ilustra los nanopocillos en un dispositivo nanorreactor fabricado como se describe en el presente documento. La figura 35B ilustra una vista de cerca de los nanopocillos ilustrados en la figura 35A.

Las figuras 36A-F ilustran diversas configuraciones para la funcionalización diferencial. En cada figura, la línea sombreada clara indica una superficie activa, mientras que una línea oscura indica una superficie pasiva.

60 La figura 36A ilustra una superficie funcionalizada de manera uniforme. La figura 36B-F ilustra superficies funcionalizadas de manera diferencial en diversas configuraciones.

Las figuras 37A-F ilustran un flujo de proceso para la funcionalización del dispositivo.

La figura 38 representa una ilustración ejemplar de aplicación de protector, en la que se deposita protector en pequeñas estructuras y se detiene por bordes afilados.

65 Las figuras 39A-B ilustran el uso de estructuras subyacentes para detener o absorber la aplicación de protector en un ejemplo ilustrativo.

Las figuras 40A-C ilustran patrones de protector post-litográficos en una configuración de funcionalización

diferencial ejemplar. La figura 40A ilustra una vista de campo brillante de un patrón de protector post-litográfico. La figura 40B ilustra una vista de campo oscuro de un patrón de protector post-litográfico. La figura 40C ilustra una vista esquemática en sección transversal de un patrón de protector post-litográfico

5 Las figuras 41A-C ilustran patrones de protector post-litográficos en otra configuración de funcionalización diferencial ejemplar. La figura 41A ilustra una vista de campo brillante de un patrón de protector post-litográfico. La figura 41B ilustra una vista de campo oscuro de un patrón de protector post-litográfico. La figura 41C ilustra una vista en sección transversal de un patrón de protector post-litográfico.

10 Las figuras 42A-C ilustran un decapado posterior al protector después de la funcionalización con un fluorosilano. La figura 42A ilustra una vista de campo brillante. La figura 42B ilustra una vista de campo oscuro. La figura 42C ilustra una vista esquemática en sección transversal.

15 Las figuras 43A-C ilustran un dispositivo ejemplar de síntesis de oligonucleótidos ("chip Keratin"), cargado completamente con DMSO. La figura 43A ilustra una vista de campo brillante del chip Keratin completamente cargado con DMSO. Están indicadas las regiones hidrófobas e hidrófilas. La figura 43B ilustra una vista de campo oscuro del chip Keratin completamente cargado con DMSO. La figura 43C ilustra una vista esquemática en sección transversal del chip Keratin completamente cargado con DMSO, que indica la humectación espontánea de los revólveres.

Las figuras 44A-F describen de forma general un flujo de proceso ejemplar para la configuración 6 ilustrada en la figura 36.

20 Las figuras 45A-B indican una configuración de muestreo de puntos de un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos (A) y los datos correspondientes del BioAnalyzer (B) para cada uno de los cinco puntos de la figura 45A.

La figura 46 indica los datos del BioAnalyzer de oligonucleótidos de 100 unidades extraídos de la superficie sintetizados en un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos de silicio.

25 La figura 47 indica los datos del BioAnalyzer de oligonucleótidos de 100 unidades extraídos de la superficie sintetizados en un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos de silicio después de la amplificación por PCR.

La figura 48 representa un alineamiento de secuencia para las muestras tomadas del punto 8, donde "x" denota una delección de una sola base, "asterisco" denota una mutación de una sola base y "+" denota manchas de baja calidad según la secuenciación de Sanger.

30 La figura 49 representa un alineamiento de secuencia para las muestras tomadas del punto 7, donde "x" denota una delección de una sola base, "asterisco" denota una mutación de una sola base y "+" denota manchas de baja calidad según la secuenciación de Sanger.

Las figuras 50A-B proporcionan los resultados del BioAnalyzer para un oligonucleótido de 100 unidades en un dispositivo de oligonucleótidos tridimensional después de la extracción (A) y después de la amplificación por PCR (B).

35 La figura 51 representa un mapa de alineamiento de secuencia para una muestra amplificada por PCR de un oligonucleótido de 100 unidades que se sintetizó en un dispositivo de oligonucleótidos 3D.

La figura 52 representa resultados de corrección mediante la aplicación de dos rondas de corrección de errores usando CorrectASE.

40 Las figuras 53A-C ilustran un patrón de funcionalización de superficie en una configuración de funcionalización diferencial ejemplar después de la funcionalización. La figura 53A ilustra una vista de campo brillante. La figura 53B ilustra una vista de campo oscuro. La figura 53C ilustra una vista esquemática en sección transversal del patrón de funcionalización de la superficie y un fluido acuoso que sobresale evitando las regiones hidrófobas.

La figura 54 representa un flujo de trabajo ejemplar para la funcionalización de un dispositivo nanorreactor. La limpieza se continúa por la deposición de protector, funcionalización y finalmente eliminación del protector.

45 La figura 55 representa resultados del BioAnalyzer para varios oligonucleótidos transferidos a pocillos individuales de un nanorreactor desde un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos después de un método de transferencia.

Las figuras 56A-B representan diseños alternativos de celdas de flujo.

La figura 56A representa un diseño de fuente de línea/drenaje de línea para una celda de flujo.

La figura 56B representa un diseño de fuente de punto/drenaje de punto para una celda de flujo.

50 La figura 57 ilustra un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos y un dispositivo nanorreactor montado en una configuración que tiene un hueco de 50  $\mu\text{m}$ . En un ejemplo ilustrativo, los dispositivos se mantienen en esta configuración durante 10 minutos.

Las figuras 58A-B muestran la redistribución de oligos a lo largo del tiempo, sin desear quedar ligado a teoría alguna, por difusión, desde un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos a un dispositivo nanorreactor.

55 La figura 58A muestra oligos concentrados en un líquido en los canales de los revólveres y pocos o ningún nucleótido en una cámara de nanorreactor. La figura 58B esquematiza oligonucleótidos distribuidos de manera uniforme mediante líquido en cámaras de revólver y en una cámara de nanorreactor en un punto de tiempo posterior con respecto a la figura 58A.

La figura 59 muestra vistas de una matriz de pocillos de nanorreactor usada para el ensamblaje de genes antes y después de una reacción de PCA.

60 Las figuras 60A-C representan los resultados del ensamblaje de un gen en diversos pocillos de un dispositivo nanorreactor. La figura 60A representa un dispositivo en el que se sintetizaron oligos. Los pocillos 1-10 están marcados. La figura 60B representa el análisis de los genes ensamblados en los pocillos de la figura 60A. Los picos correspondientes al gen en cada pocillo están marcados con el número de pocillo. La figura 60C representa la electroforesis de los oligos analizados en la figura 60B.

65 Las figuras 61A-B presentan vistas de bloque de un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos de alta capacidad

de acuerdo con la divulgación del presente documento. La figura 61A presenta una vista completa inclinada de un bloque como se desvela en el presente documento. La figura 61B presenta una vista inclinada de un corte transversal a través de un bloque como se desvela en el presente documento.

La figura 62 representa y una vista de bloque de otro dispositivo de síntesis de oligonucleótidos de alta capacidad de acuerdo con la divulgación del presente documento, que tiene una matriz de postes en su superficie, con una mayor área de superficie.

La figura 63 representa la electroforesis de ácidos nucleicos monocatenarios amplificados usando amplificación de círculo rodante, en donde el producto de amplificación se corta con diversas combinaciones de agentes de escisión.

Las figuras 64A-F representan un método para la amplificación de ácidos nucleicos monocatenarios.

Las figuras 65A-F representan métodos para la amplificación de ácidos nucleicos monocatenarios, que pueden acoplarse el método ilustrado en la figura 64.

### Descripción detallada de la invención

A lo largo de la presente divulgación, diversos aspectos de esta invención pueden presentarse en un formato de intervalo. Ha de comprenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la divulgación. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los subintervalos posibles así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha desvelado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como valores individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 1, 2, 2,3, 5 y 5,9. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo. Los límites superior e inferior de estos intervalos intermedios pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están englobados dentro de la divulgación, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, también se incluyen en la divulgación intervalos que excluyen alguno de esos límites incluidos o ambos, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una genoteca como se describe en el presente documento. La genoteca comprende una colección de genes. En algunos ejemplos, la colección comprende al menos 100 genes sintéticos preseleccionados diferentes que pueden ser de al menos 0,5 kb de longitud con una tasa de error menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona una genoteca que comprende una colección de genes. La colección puede comprender al menos 100 genes sintéticos preseleccionados diferentes que pueden ser, cada uno, de al menos 0,5 kb de longitud. Al menos el 90 % de los genes sintéticos preseleccionados puede comprender una tasa de error menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. Las secuencias predeterminadas deseadas pueden suministrarse por cualquier método, normalmente por un usuario, por ejemplo, un usuario que introduce datos utilizando un sistema computarizado. En diversos ejemplos, los ácidos nucleicos sintetizados se comparan con estas secuencias predeterminadas, en algunos casos mediante secuenciación de al menos una porción de los ácidos nucleicos sintetizados, por ejemplo, utilizando métodos de secuenciación de nueva generación. En algunos ejemplos relacionados con cualquiera de las genotecas descritas en el presente documento, al menos el 90 % de los genes sintéticos preseleccionados comprenden una tasa de error menor de 1 en 5000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. En algunos ejemplos, al menos el 0,05 % de los genes sintéticos preseleccionados están libres de error. En algunos ejemplos, al menos el 0,5 % de los genes sintéticos preseleccionados están libres de error. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes sintéticos preseleccionados comprenden una tasa de error menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes sintéticos preseleccionados están libres de error o sustancialmente libres de error. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados comprenden una tasa de delección menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados comprenden una tasa de inserción menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados comprenden una tasa de sustitución menor de 1 en 3000 pb en comparación con secuencias predeterminadas que comprenden los genes. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende al menos 10 copias de cada gen sintético. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende al menos 100 copias de cada gen sintético. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende al menos 1000 copias de cada gen sintético. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende al menos 1000000 copias de cada gen sintético. En algunos ejemplos, la colección de genes tal como se describe en el presente documento comprende al menos 500 genes. En algunos ejemplos, la colección comprende al menos 5000 genes. En algunos ejemplos, la colección comprende al menos 10000 genes. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados son de al menos 1 kb. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados son de al menos 2 kb. En algunos ejemplos, los genes sintéticos preseleccionados son de al menos 3 kb. En algunos ejemplos, las secuencias predeterminadas comprenden menos de 20 pb más que los genes sintéticos preseleccionados. En algunos ejemplos, las secuencias predeterminadas comprenden menos de 15 pb más que los genes sintéticos preseleccionados. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes sintéticos difiere de cualquier otro gen sintético al menos en un 0,1 %. En algunos ejemplos, cada uno de los genes sintéticos difiere

de cualquier otro gen sintético al menos en un 0,1 %. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes sintéticos difiere de cualquier otro gen sintético al menos en un 10 %. En algunos ejemplos, cada uno de los genes sintéticos difiere de cualquier otro gen sintético al menos en un 10 %. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes sintéticos difiere de cualquier otro gen sintético al menos en 2 pares de bases. En algunos ejemplos, cada uno de los genes sintéticos difiere de cualquier otro gen sintético al menos en 2 pares de bases. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende además genes sintéticos que son menores de 2 kb con una tasa de error menor de 1 en 20000 pb en comparación con secuencias preseleccionadas de los genes. En algunos ejemplos, un subconjunto de los genes suministrables están unidos covalentemente entre sí. En algunos ejemplos, un primer subconjunto de la colección de genes codifica componentes de una primera ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, la genoteca tal como se describe en el presente documento comprende además seleccionar dichos uno o más productos metabólicos finales, construyéndose de esta manera la colección de genes. En algunos ejemplos, dichos uno o más productos metabólicos finales comprenden un biocombustible. En algunos ejemplos, un segundo subconjunto de la colección de genes codifica componentes de una segunda ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, la genoteca está en un espacio que es menor de 100 m<sup>3</sup>. En algunos ejemplos, la genoteca está en un espacio que es menor de 1 m<sup>3</sup>. En algunos ejemplos, la genoteca está en un espacio que es menor de 1 m<sup>3</sup>.

En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método de construcción de una genoteca. El método comprende las etapas de: introducir, antes de un primer punto de tiempo, en un medio no transitorio legible por ordenador, al menos una primera lista de genes y una segunda lista de genes, en donde los genes son de al menos 500 pb y, cuando se recopilan en una lista conjunta, la lista conjunta comprende al menos 100 genes; sintetizar más del 90 % de los genes en la lista conjunta antes de un segundo punto de tiempo, construyéndose de esta manera una genoteca con genes suministrables. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de un mes desde el primer punto de tiempo.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de construcción de una genoteca proporcionados en el presente documento, el método como se describe en el presente documento comprende suministrar al menos un gen en un segundo punto de tiempo. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables están libres de error. En algunos ejemplos, los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1/3000 que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista conjunta de genes. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1 en 3000 pb que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista conjunta de genes. En algunos ejemplos, los genes en un subconjunto de los genes suministrables están unidos covalentemente entre sí. En algunos ejemplos, un primer subconjunto de la lista conjunta de genes codifica componentes de una primera ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, cualquiera de los métodos de construcción de una genoteca tal como se describe en el presente documento comprende además seleccionar dichos uno o más productos metabólicos finales, construyéndose de esta manera la primera, la segunda o la lista conjunta de genes. En algunos ejemplos, dichos uno o más productos metabólicos finales comprenden un biocombustible. En algunos ejemplos, un segundo subconjunto de la lista conjunta de genes codifica componentes de una segunda ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, la lista conjunta de genes comprende al menos 500 genes. En algunos ejemplos, la lista conjunta de genes comprende al menos 5000 genes. En algunos ejemplos, la lista conjunta de genes comprende al menos 10000 genes. En algunos ejemplos, los genes pueden ser de al menos 1 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 2 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 3 kb. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 25 días desde el primer punto de tiempo. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 5 días desde el primer punto de tiempo. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 2 días desde el primer punto de tiempo. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método de construcción de una genoteca. El método comprende las etapas de: introducir en un primer punto de tiempo, en un medio no transitorio legible por ordenador, una lista de genes; sintetizar más del 90 % de la lista de genes, construyéndose de esta manera una genoteca con genes suministrables; y suministrar los genes suministrables en un segundo punto de tiempo. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 100 genes y los genes pueden ser de al menos 500 pb. En algunos ejemplos adicionales, el segundo punto de tiempo es menor de un mes desde el primer punto de tiempo.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de construcción de una genoteca proporcionados en el presente documento, en algunos ejemplos, el método como se describe en el presente documento comprende suministrar al menos un gen en un segundo punto de tiempo. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro

- gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables están libres de error. En algunos ejemplos, los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1/3000 que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista de genes. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1 en 3000 pb que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista de genes. En algunos ejemplos, los genes en un subconjunto de los genes suministrables están unidos covalentemente entre sí. En algunos ejemplos, un primer subconjunto de la lista de genes codifica componentes de una primera ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, el método de construcción de una genoteca comprende además seleccionar dichos uno o más productos metabólicos finales, construyéndose de esta manera la lista de genes. En algunos ejemplos, dichos uno o más productos metabólicos finales comprenden un biocombustible. En algunos ejemplos, un segundo subconjunto de la lista de genes codifica componentes de una segunda ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.
- En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de construcción de una genoteca proporcionados en el presente documento, en algunos ejemplos, la lista de genes comprende al menos 500 genes. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 5000 genes. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 10000 genes. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 1 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 2 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 3 kb. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo tal como se describe en los métodos de construcción de una genoteca es menor de 25 días desde el primer punto de tiempo. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 5 días desde el primer punto de tiempo. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 2 días desde el primer punto de tiempo. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.
- En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método para sintetizar oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato. El método comprende a) proporcionar un sustrato con loci resueltos que están funcionalizados con un resto químico adecuado para el acoplamiento de nucleótidos; y b) acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 12 nucleótidos por hora de acuerdo con una secuencia predeterminada con especificidad de locus, sintetizándose de esta manera una pluralidad de oligonucleótidos que tienen n pares de bases de longitud. En el presente documento se describen diversos ejemplos relacionados con el método de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato.
- En cualquiera de los métodos de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se proporciona en el presente documento, en algunos ejemplos, los métodos comprenden además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 15 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, el método comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 20 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, el método comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 25 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de n unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de 1/500 pb. En algunos ejemplos, al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de n unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de 1/1000 pb. En algunos ejemplos, al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de n unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de 1/2000 pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de 1/500 pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de 1/1000 pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de 1/2000 pb.
- En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se proporciona en el presente documento, en algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un grupo adenina, guanina, timina, citosina o uridina, o un nucleótido modificado. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un nucleótido modificado. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden dinucleótidos o trinucleótidos. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden fosforamida. En algunos ejemplos, n en los oligonucleótidos de n unidades es al menos 100. En algunos ejemplos, n es al menos 200. En algunos ejemplos, n es al menos 300. En algunos ejemplos, n es al menos 400. En algunos ejemplos, la superficie

comprende al menos 100.000 loci resueltos y al menos dos de la pluralidad de oligonucleótidos en crecimiento pueden ser diferentes entre sí.

5 En algunos ejemplos, el método de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento comprende además secar al vacío el sustrato antes del acoplamiento. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un grupo bloqueante. En algunos ejemplos, el grupo bloqueante comprende DMT lábil en medio ácido. En algunos ejemplos, el DMT lábil en medio ácido comprende 4,4'-dimetoxitritilo. En algunos ejemplos, el método de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento comprende además oxidación o sulfurización. En algunos ejemplos, el método de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento comprende además tapar químicamente cadenas de oligonucleótidos no acopladas. En algunos ejemplos, el método de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento comprende además retirar el grupo bloqueante, desbloqueándose de esta manera la cadena de oligonucleótido en crecimiento. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la etapa de acoplamiento está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de secado al vacío. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la etapa de acoplamiento está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de oxidación. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la etapa de acoplamiento está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de tapado. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la etapa de acoplamiento está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de desbloqueo. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 10.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 100.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 1.000.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

30 En otro aspecto de la presente divulgación, en el presente documento se proporciona un sistema para conducir un conjunto de reacciones paralelas. El sistema comprende: una primera superficie con una pluralidad de loci resueltos; un elemento de tapado con una pluralidad de tapas de reactor resueltas. En algunos ejemplos, el sistema alinea la pluralidad de tapas de reactor resueltas con la pluralidad de loci resueltos en la primera superficie formando un sellado temporal entre la primera superficie y el elemento de tapado, dividiéndose físicamente de esta manera los loci en la primera superficie en grupos de al menos dos loci en un reactor asociado con cada tapa de reactor. En algunos ejemplos, cada reactor alberga un primer conjunto de reactivos.

35 En algunos ejemplos relacionados con cualquiera de los sistemas para realizar un conjunto de reacciones paralelas tal como se describe en el presente documento, tras la liberación desde la primera superficie, las tapas de reactor conservan al menos una porción del primer conjunto de reactivos. En algunos ejemplos, la porción es aproximadamente el 30 %. En algunos ejemplos, la porción es aproximadamente el 90 %. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos reside en microestructuras fabricadas en una superficie de soporte. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 1 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 10 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 100 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, las microestructuras comprenden al menos dos canales en comunicación fluidica entre sí. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente anchura. En algunos ejemplos, al menos dos canales comprenden dos canales con diferente longitud. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más largo que 100  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más corto que 1000  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más ancho que 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más estrecho que 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, el sistema comprende además una segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos a una densidad de al menos 0,1 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, el sistema comprende además una segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos a una densidad de al menos 1 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, el sistema comprende además una segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos a una densidad de al menos 10 por  $\text{mm}^2$ .

55 En algunos ejemplos relacionados con cualquiera de los sistemas para realizar un conjunto de reacciones paralelas tal como se describe en el presente documento, los loci resueltos de la primera superficie comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, los loci resueltos de la segunda superficie comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente a la primera o segunda superficie. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos 1,45  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos 1,25  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos 1  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, los loci resueltos en la pluralidad de loci resueltos comprenden una longitud nominal de arco del perímetro a una densidad de al menos 0,001  $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, los loci resueltos en la pluralidad de loci resueltos comprenden una longitud nominal de arco del perímetro a una densidad de al menos 0,01  $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, los loci resueltos en la pluralidad de loci resueltos de la primera superficie comprenden una superficie de alta energía. En algunos ejemplos, la primera y la segunda superficies comprenden una tensión de superficie diferente con un líquido determinado. En algunos ejemplos,

la alta energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos está localizada en un sustrato sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poli(acrilamidas), PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, los elementos de tapado comprenden un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poli(acrilamidas), PDMS y vidrio. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto más, la presente divulgación también proporciona una matriz de recintos. La matriz de recintos comprende: una pluralidad de reactores resueltos que comprenden un primer sustrato y un segundo sustrato que comprenden tapas de reactor; con al menos 2 loci resueltos en cada reactor. En algunos casos, los reactores resueltos están separados por un sellado liberable. En algunos casos, las tapas de reactor conservan al menos parte del contenido de los reactores tras la liberación del segundo sustrato del primer sustrato. En algunos ejemplos, las tapas de reactor en el segundo sustrato tienen una densidad de al menos 0,1 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, las tapas de reactor en el segundo sustrato tienen una densidad de al menos 1 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, las tapas de reactor en el segundo sustrato tienen una densidad de al menos 10 por  $\text{mm}^2$ .

En algunos ejemplos relacionados con la matriz de recintos tal como se proporciona en el presente documento, las tapas de reactor conservan al menos el 30 % de los contenidos de los reactores. En algunos ejemplos, las tapas de reactor conservan al menos el 90 % de los contenidos de los reactores. En algunos ejemplos, los loci resueltos tienen una densidad de al menos 2/ $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, los loci resueltos tienen una densidad de al menos 100/ $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la matriz de recintos comprende además al menos 5 loci resueltos en cada reactor. En algunos ejemplos, la matriz de recintos tal como se describe en el presente documento comprende además al menos 20 loci resueltos en cada reactor. En algunos ejemplos, la matriz de recintos tal como se describe en el presente documento comprende además al menos 50 loci resueltos en cada reactor. En algunos ejemplos, la matriz de recintos tal como se describe en el presente documento comprende además al menos 100 loci resueltos en cada reactor.

En algunos ejemplos relacionados con la matriz de recintos tal como se describe en el presente documento, los loci resueltos residen en microestructuras fabricadas en una superficie de soporte. En algunos ejemplos, las microestructuras comprenden al menos dos canales en comunicación fluidica entre sí. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente anchura. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente longitud. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más largo que 100  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más corto que 1000  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más ancho que 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más estrecho que 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, las microestructuras comprenden una longitud nominal de arco del perímetro de dichos al menos dos canales que tiene una densidad de al menos 0,01  $\mu\text{m}/\mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, las microestructuras comprenden una longitud nominal de arco del perímetro de dichos al menos dos canales que tiene una densidad de al menos 0,001  $\mu\text{m}/\mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, los reactores resueltos están separados por un sellado liberable. En algunos ejemplos, el sellado comprende una válvula de expansión capilar.

En algunos ejemplos relacionados con la matriz de recintos tal como se describe en el presente documento, la pluralidad de loci resueltos del primer sustrato comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos del segundo sustrato comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente a la primera o segunda superficie. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos 1  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos 1,25  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos 1,45  $\mu\text{m}^2$  por 1,0  $\mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos del primer sustrato comprenden una superficie de alta energía. En algunos ejemplos, el primer y el segundo sustratos comprenden una tensión de superficie diferente con un líquido determinado. En algunos ejemplos, la energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos o las tapas de reactor están localizadas en un sustrato sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poli(acrilamidas), PDMS y vidrio. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto adicional más, la presente divulgación también proporciona un método para realizar un conjunto de reacciones paralelas. El método comprende: (a) proporcionar una primera superficie con una pluralidad de loci resueltos; (b) proporcionar un elemento de tapado con una pluralidad de tapas de reactor resueltas; (c) alinear la pluralidad de tapas de reactor resueltas con la pluralidad de loci resueltos en la primera superficie y formar un sellado temporal entre la primera superficie y el elemento de tapado, dividiéndose físicamente de esta manera los loci en la primera superficie en grupos de al menos dos loci; (d) realizar una primera reacción, formando de esta manera un primer conjunto de reactivos; y (e) liberar el elemento de tapado de la primera superficie, en donde cada tapa de reactor conserva al menos una porción del primer conjunto de reactivos en un primer volumen de reacción. En algunos

ejemplos, la porción es aproximadamente el 30 %. En algunos ejemplos, la porción es aproximadamente el 90 %.

En algunos ejemplos, el método para realizar un conjunto de reacciones paralelas como se describe en el presente documento, comprende además las etapas de: (f) proporcionar una segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos; (g) alinear la pluralidad de tapas de reactor resueltas con la pluralidad de loci resueltos en la segunda superficie y formar un sellado temporal entre la segunda superficie y el elemento de tapado, dividiéndose físicamente de esta manera los loci en la segunda superficie; (h) realizar una segunda reacción usando la porción del primer conjunto de reactivos, formando de esta manera un segundo conjunto de reactivos; y (i) liberar el elemento de tapado de la segunda superficie, en donde cada tapa de reactor puede conservar al menos una porción del segundo conjunto de reactivos en un segundo volumen de reacción. En algunos ejemplos, la porción es aproximadamente el 30 %. En algunos ejemplos, la porción es aproximadamente el 90 %.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos para realizar un conjunto de reacciones paralelas tal como se describe en el presente documento, la pluralidad de loci resueltos puede tener una densidad de al menos 1 por  $\text{mm}^2$  en la primera superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 10 por  $\text{mm}^2$  en la primera superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 100 por  $\text{mm}^2$  en la primera superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor resueltas tiene una densidad de al menos 0,1 por  $\text{mm}^2$  en el elemento de tapado. En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor resueltas tiene una densidad de al menos 1 por  $\text{mm}^2$  en el elemento de tapado. En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor resueltas tiene una densidad de al menos 10 por  $\text{mm}^2$  en el elemento de tapado. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de más de 0,1 por  $\text{mm}^2$  en la segunda superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de más de 1 por  $\text{mm}^2$  en la segunda superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de más de 10 por  $\text{mm}^2$  en la segunda superficie.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos para realizar un conjunto de reacciones paralelas tal como se describe en el presente documento, la liberación de los elementos de tapado de las etapas de superficie tales como las etapas de liberación en (e) e (i) tal como se describe en el presente documento, puede realizarse a una velocidad diferente. En algunos ejemplos, los loci resueltos de la primera superficie comprenden un recubrimiento de reactivos para la primera reacción. En algunos ejemplos, los loci resueltos de la segunda superficie comprenden un recubrimiento de reactivos para la segunda reacción. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente a la primera o segunda superficie. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos tiene un área de superficie de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana. En algunos ejemplos, los oligonucleótidos son de al menos 25 pb. En algunos ejemplos, los oligonucleótidos son de al menos 200 pb. En algunos ejemplos, los oligonucleótidos son de al menos 300 pb. En algunos ejemplos, los loci resueltos de la primera superficie comprenden una superficie de alta energía. En algunos ejemplos, la primera y la segunda superficies comprenden una tensión de superficie diferente con un líquido determinado. En algunos ejemplos, la energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados.

En algunos ejemplos relacionados con el método para realizar un conjunto de reacciones paralelas tal como se describe en el presente documento, la pluralidad de loci resueltos o las tapas de reactor resueltas están localizadas en un sustrato sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliacrilamidas, PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, el primer y el segundo volúmenes de reacción son diferentes. En algunos ejemplos, la primera o segunda reacción comprende ensamblaje cíclico por polimerasa. En algunos ejemplos, la primera o segunda reacción comprende síntesis enzimática de genes, reacción de templado y ligamiento, síntesis simultánea de dos genes a través de un gen híbrido, ligamiento shotgun y coligamiento, síntesis génica de inserción, síntesis génica mediante una cadena de ADN, ligamiento dirigido por molde, reacción en cadena de la ligasa, síntesis génica mediada por micromatriz, ensamblaje en fase sólida, tecnología de bloques de construcción de Sloning o síntesis génica mediada por ligamiento de ARN. En algunos ejemplos, los métodos para realizar un conjunto de reacciones paralelas como se describe en el presente documento, comprende además enfriar el elemento de tapado. En algunos ejemplos, el método para realizar un conjunto de reacciones paralelas como se describe en el presente documento, comprende además enfriar la primera superficie. En algunos ejemplos, el método para realizar un conjunto de reacciones paralelas como se describe en el presente documento, comprende además enfriar la segunda superficie. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un sustrato que tiene una superficie funcionalizada. El sustrato que tiene una superficie funcionalizada puede comprender un soporte sólido que tiene una pluralidad de loci resueltos. En algunos ejemplos, los loci resueltos están funcionalizados con un resto que aumenta la energía de superficie del soporte sólido. En algunos ejemplos, los loci resueltos están localizados en microcanales.

En algunos ejemplos relacionados con el sustrato que tiene una superficie funcionalizada como se describe en el presente documento, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden

- un volumen menor de 1 nl. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de  $0,036 \mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, los loci resueltos en la pluralidad de loci resueltos comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente al sustrato. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, al menos uno de los microcanales es más largo que  $100 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los microcanales es más corto que  $1000 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los microcanales es más ancho que  $50 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, al menos uno de los microcanales es más estrecho que  $100 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, la energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de  $20$  grados. En algunos ejemplos, el soporte sólido comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poli(acrilamidas, PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos  $1/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos  $100/\text{mm}^2$ . Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.
- En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada. El método comprende: (a) aplicar a través de al menos una bomba de inyección de tinta al menos una gota de un primer reactivo en un primer locus de una pluralidad de loci; (b) aplicar presión negativa al sustrato; y (c) aplicar a través de al menos una bomba de inyección de tinta al menos una gota de un segundo reactivo al primer locus.
- En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento, el primer y segundo reactivos pueden ser diferentes. En algunos ejemplos, el primer locus está funcionalizado con un resto que aumenta su energía de superficie. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci reside en microestructuras fabricadas en la superficie del sustrato. En algunos ejemplos, las microestructuras comprenden al menos dos canales en comunicación fluidica entre sí. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente anchura. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente longitud. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más largo que  $100 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más corto que  $1000 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más ancho que  $50 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más estrecho que  $100 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, la superficie del sustrato comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poli(acrilamidas, PDMS y vidrio.
- En algunos ejemplos relacionados con los métodos para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento, el volumen de la gota del primer y/o segundo reactivos es al menos  $2 \text{ pl}$ . En algunos ejemplos, el volumen de la gota es como máximo  $100 \text{ pl}$ . En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,01 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,001 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, la superficie funcionalizada comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana del sustrato. En algunos ejemplos, la presión alrededor del sustrato se reduce a menos de  $1 \text{ mTorr}$ . Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.
- En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además acoplar al menos un primer bloque de construcción procedente de la primera gota a una cadena de oligonucleótido en crecimiento en el primer locus. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un grupo bloqueante. En algunos ejemplos, el grupo bloqueante comprende DMT lábil en medio ácido. En algunos ejemplos, el DMT lábil en medio ácido comprende  $4,4'$ -dimetoxitritilo. En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además oxidación o sulfurización. En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además tapar químicamente cadenas de oligonucleótidos no acopladas. En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además retirar el grupo bloqueante, desbloqueándose de esta manera la cadena de oligonucleótido en crecimiento. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la aplicación de presión negativa está dentro de  $10 \text{ cm}$  de la posición del sustrato durante la etapa de acoplamiento. En

algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la aplicación de presión negativa está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de oxidación. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la aplicación de presión negativa está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de tapado. En algunos ejemplos, la posición del sustrato durante la aplicación de presión negativa está dentro de 10 cm de la posición del sustrato durante la etapa de desbloqueo. En algunos ejemplos, el primer locus reside en una microestructura fabricada en la superficie del sustrato. En algunos ejemplos, al menos un reactivo para la etapa de oxidación se proporciona inundando la microestructura con una solución que comprende dicho al menos un reactivo. En algunos ejemplos, al menos un reactivo para la etapa de tapado se proporciona inundando la microestructura con una solución que comprende dicho al menos un reactivo. En algunos ejemplos, el primer locus reside en una microestructura fabricada en la superficie del sustrato y al menos un reactivo para la etapa de desbloqueo puede proporcionarse inundando la microestructura con una solución que comprende dicho al menos un reactivo. En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además encerrar el sustrato dentro de una cámara sellada. En algunos ejemplos, la cámara sellada permite purgar líquidos del primer locus. En algunos ejemplos, el método para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato que tiene una superficie funcionalizada tal como se describe en el presente documento comprende además drenar un líquido a través de un drenaje que está unido operativamente al primer locus. En algunos ejemplos, después de aplicar la presión negativa al sustrato, el contenido de humedad en el sustrato es menor de 1 ppm. En algunos ejemplos, la energía de superficie se aumenta correspondiendo a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para depositar reactivos en una pluralidad de loci resueltos. El método comprende aplicar a través de una bomba de inyección de tinta al menos una gota de un primer reactivo en un primer locus de una pluralidad de loci; aplicar a través de una bomba de inyección de tinta al menos una gota de un segundo reactivo en un segundo locus de la pluralidad de loci resueltos. En algunos ejemplos, el segundo locus es adyacente al primer locus. En algunos ejemplos más, el primer y segundo reactivos son diferentes. En algunos ejemplos adicionales, el primer y segundo loci residen en microestructuras fabricadas en una superficie de soporte. En algunos ejemplos más, las microestructuras comprenden al menos un canal que tiene más de 100  $\mu\text{m}$  de profundidad.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos para depositar reactivos en una pluralidad de loci resueltos tal como se describe en el presente documento, en algunos ejemplos, las microestructuras comprenden al menos dos canales en comunicación fluidica entre sí. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente anchura. En algunos ejemplos, dichos al menos dos canales comprenden dos canales con diferente longitud. En algunos ejemplos, el primer locus recibe menos del 0,1 % del segundo reactivo y el segundo locus recibe menos del 0,1 % del primer reactivo. En algunos ejemplos, los loci comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos 0,01  $\mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, los loci comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos 0,001  $\mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, el primer y el segundo loci comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente al sustrato. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más largo que 100  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más corto que 1000  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más ancho que 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, al menos uno de los canales es más estrecho que 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, la superficie de soporte comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poli(acrilamidas), PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 1/mm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos 100/mm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, el volumen de la gota es al menos 2 pl. En algunos ejemplos, el volumen de la gota es aproximadamente 40 pl. En algunos ejemplos, el volumen de la gota es como máximo 100 pl. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto adicional más, la presente divulgación proporciona un sistema microfluídico. El sistema microfluídico comprende una primera superficie con una pluralidad de micropocillos a una densidad de al menos 10 por mm<sup>2</sup>; y una gotícula dentro de uno de la pluralidad de micropocillos. En algunos ejemplos, la gotícula dentro de uno de la pluralidad de micropocillos tiene un número de Reynolds en un intervalo de aproximadamente 1-1000. En algunos ejemplos, la pluralidad de micropocillos tiene una densidad de al menos 1 por mm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, la pluralidad de micropocillos tiene una densidad de al menos 10 por mm<sup>2</sup>.

En algunos ejemplos relacionados con el sistema microfluídico tal como se proporciona en el presente documento, el sistema microfluídico comprende además una bomba de inyección de tinta. En algunos ejemplos, la gotícula se deposita por la bomba de inyección de tinta. En algunos ejemplos, la gotícula se mueve en la mitad inferior de una primera dimensión del micropocillo. En algunos ejemplos, la gotícula se mueve en el tercio central de una primera dimensión del micropocillo. En algunos ejemplos, la pluralidad de micropocillos tiene una densidad de al menos 100 por mm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, la primera dimensión del micropocillo es mayor que la gotícula. En algunos ejemplos, el micropocillo es más largo que 100  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, el micropocillo es más corto que 1000  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, el micropocillo es más ancho que 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, el micropocillo es más estrecho

que 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, el volumen de la gotícula es al menos 2 pl. En algunos ejemplos, el volumen de la gotícula es aproximadamente 40 pl. En algunos ejemplos, el volumen de la gotícula es como máximo 100 pl. En algunos ejemplos, cada uno de la pluralidad de micropocillos está conectado fluidicamente con al menos un microcanal. En algunos ejemplos, dicho al menos un microcanal está recubierto con un resto que aumenta su energía de superficie. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, la energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, los micropocillos se forman en un soporte sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliacrilamidas, PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,01 \mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de  $0,001 \mu\text{m}^2 / \mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación. En algunos ejemplos, la gotícula comprende un reactivo que permite la síntesis de oligonucleótidos. En algunos ejemplos, el reactivo es un nucleótido o análogo de nucleótido.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para depositar gotículas en una pluralidad de micropocillos. El método comprende aplicar a través de una bomba de inyección de tinta al menos una gotícula a un primer micropocillo de la pluralidad de micropocillos. En algunos casos, la gotícula dentro de uno de la pluralidad de micropocillos tiene un número de Reynolds en un intervalo de aproximadamente 1-1000. En algunos ejemplos, la pluralidad de micropocillos tiene una densidad de al menos  $1/\text{mm}^2$ . En algunos casos más, la pluralidad de micropocillos tiene una densidad de al menos  $10/\text{mm}^2$ .

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos para depositar gotículas en una pluralidad de micropocillos tal como se proporciona en el presente documento, la pluralidad de micropocillos puede tener una densidad de al menos  $100/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, el micropocillo es más largo que  $100 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, el micropocillo es más corto que  $1000 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, el micropocillo es más ancho que  $50 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, el micropocillo es más estrecho que  $100 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, la gotícula se aplica a una velocidad de al menos 2 m/seg. En algunos ejemplos, el volumen de la gotícula es al menos 2 pl. En algunos ejemplos, el volumen de la gotícula es como máximo 100 pl. En algunos ejemplos, cada uno de la pluralidad de micropocillos está conectado fluidicamente con al menos un microcanal. En algunos ejemplos, dicho al menos un micropocillo está recubierto con un resto que aumenta su energía de superficie. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, la energía de superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, los micropocillos se forman en un soporte sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poliacrilamidas, PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,01 \mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,001 \mu\text{m}^2 / \mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, una gotícula dentro de un micropocillo se desplaza en el tercio central del micropocillo. En algunos ejemplos, una gotícula dentro de un micropocillo se desplaza en la mitad inferior del micropocillo. En algunos ejemplos, la gotícula comprende un reactivo que permite la síntesis de oligonucleótidos. En algunos ejemplos, el reactivo es un nucleótido o análogo de nucleótido. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método de división. El método de división comprende poner en contacto una primera superficie que comprende un líquido en una primera pluralidad de loci resueltos con una segunda superficie que comprende una segunda pluralidad de loci resueltos; determinar una velocidad de liberación tal que una fracción deseada del líquido pueda transferirse desde la primera pluralidad de loci resueltos a la segunda pluralidad de loci resueltos; y separar la segunda superficie de la primera superficie a dicha velocidad. En algunos ejemplos, la primera superficie comprende una primera tensión de superficie con el líquido y la segunda superficie puede comprender una segunda tensión de superficie con el líquido.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de división proporcionados en el presente documento, una porción de la primera superficie puede recubrirse con un resto que aumenta la tensión de superficie. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, la tensión de superficie de la primera superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, la tensión de

superficie de la segunda superficie corresponde a un ángulo de contacto con el agua mayor de 90 grados. En algunos ejemplos, la primera superficie comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poli(acrilamidas), PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos comprende una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,01 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos comprende una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,001 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la primera pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos  $1/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la primera pluralidad de loci resueltos tiene una densidad de al menos  $100/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la primera o la segunda superficie comprenden microcanales que albergan al menos una porción del líquido. En algunos ejemplos, la primera o la segunda superficie comprenden nanorreactores que albergan al menos una porción del líquido. En algunos ejemplos, el método de división tal como se describe en el presente documento comprende poner en contacto una tercera superficie con una tercera pluralidad de loci resueltos. En algunos ejemplos, el líquido comprende un ácido nucleico. En algunos ejemplos, la fracción deseada es mayor del 30 %. En algunos ejemplos, la fracción deseada es mayor del 90 %. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto más, la presente divulgación también proporciona un método de mezcla tal como se describe en el presente documento. El método comprende: (a) proporcionar un primer sustrato que comprende una pluralidad de microestructuras fabricadas en el mismo; (b) proporcionar un segundo sustrato que comprende una pluralidad de tapas de reactor resueltas; (c) alinear el primer y el segundo sustratos de tal manera que una primera tapa de reactor de la pluralidad pueda configurarse para recibir líquido procedente de  $n$  microestructuras en el primer sustrato; y (d) liberar líquido procedente de las  $n$  microestructuras en la primera tapa de reactor, mezclándose así el líquido de las  $n$  microestructuras formando una mezcla.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de mezcla tal como se describen en el presente documento, la pluralidad de tapas de reactor resueltas puede tener una densidad de al menos  $0,1/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor resueltas tiene una densidad de al menos  $1/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor resueltas tiene una densidad de al menos  $10/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, cada una de la pluralidad de microestructuras puede comprender al menos dos canales de diferente anchura. En algunos ejemplos, dicho al menos uno de los canales es más largo que  $100 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, dicho al menos uno de los canales es más corto que  $1000 \mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, dicho al menos uno de los canales es más ancho que  $50 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, dicho al menos uno de los canales es más estrecho que  $100 \mu\text{m}$  de diámetro. En algunos ejemplos, dicho al menos uno de los canales está recubierto con un resto que aumenta su energía de superficie. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, las microestructuras se forman en un soporte sólido que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poli(acrilamidas), PDMS y vidrio. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,01 \mu\text{m} / \mu\text{m}$  al cuadrado. En algunos ejemplos, los microcanales comprenden una densidad de la longitud nominal de arco del perímetro de al menos  $0,001 \mu\text{m} / \mu\text{m}^2$ . En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,25 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la superficie recubierta con el resto comprende un área de superficie nominal de al menos  $1,45 \mu\text{m}^2$  por  $1,0 \mu\text{m}^2$  de área de superficie plana de la primera superficie. En algunos ejemplos, la pluralidad de microestructuras comprenden un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos está unido covalentemente a la primera superficie. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos comprende oligonucleótidos. En algunos ejemplos, las microestructuras tienen una densidad de al menos  $1/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, las microestructuras tienen una densidad de al menos  $100/\text{mm}^2$ .

En algunos ejemplos relacionados con los métodos de mezcla tal como se describe en el presente documento, después de la etapa (c), que es el alineamiento del primer y el segundo sustratos de tal manera que una primera tapa de reactor de la pluralidad pueda configurarse para recibir líquido procedente de  $n$  microestructuras en el primer sustrato, hay un hueco de menos de  $100 \mu\text{m}$  entre el primer y el segundo sustratos. En algunos ejemplos, después de la etapa (c), hay un hueco de menos de  $50 \mu\text{m}$  entre el primer y el segundo sustratos. En algunos ejemplos, después de la etapa (c), hay un hueco de menos de  $20 \mu\text{m}$  entre el primer y el segundo sustratos. En algunos ejemplos, después de la etapa (c), hay un hueco de menos de  $10 \mu\text{m}$  entre el primer y el segundo sustratos. En algunos ejemplos, la mezcla se extiende parcialmente al interior del hueco. En algunos ejemplos, el método de mezcla comprende además sellar el hueco juntando el primer y el segundo sustrato entre sí. En algunos ejemplos, uno de los dos canales está recubierto con un resto que aumenta la energía de superficie que corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 20 grados. En algunos ejemplos, el resto es un resto químicamente inerte. En algunos ejemplos, la liberación se realiza por presión. En algunos ejemplos, el volumen de la mezcla es mayor que el volumen de la tapa de reactor. En algunos ejemplos, el líquido comprende un ácido nucleico. En algunos ejemplos,  $n$  es al menos 10. En algunos

ejemplos, n es al menos 25. En algunos ejemplos, n, el número de microestructuras desde las cuales se mezcla el líquido formando una mezcla, puede ser al menos 50. En algunos ejemplos, n es al menos 75. En algunos ejemplos, n es al menos 100. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto más, la presente divulgación también proporciona un método para sintetizar oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento. El método comprende: proporcionar un sustrato con loci resueltos que están funcionalizados con un resto químico adecuado para el acoplamiento de nucleótidos; y acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos de acuerdo con una secuencia predeterminada específica de locus, sin transportar el sustrato entre los acoplamientos de dichos al menos dos bloques de construcción, sintetizándose de esta manera una pluralidad de oligonucleótidos que tienen n pares de bases de longitud.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento, el método puede comprender además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos, a una velocidad de al menos 12 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, el método comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 15 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, el método comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 20 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, el método comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 25 nucleótidos por hora. En algunos ejemplos, al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de n unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de 1/500 pb. En algunos ejemplos, al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de n unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de 1/1000 pb. En algunos ejemplos, al menos un locus resuelto comprende oligonucleótidos de n unidades que se desvían de la secuencia predeterminada con especificidad de locus con una tasa de error menor de 1/2000 pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de 1/500 pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de 1/1000 pb. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de las secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de 1/2000 pb.

En algunos ejemplos relacionados con el método de síntesis de oligonucleótidos de n unidades sobre un sustrato tal como se describe en el presente documento, los bloques de construcción comprenden un grupo adenina, guanina, timina, citosina o uridina, o un nucleótido modificado. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un nucleótido modificado. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden dinucleótidos. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden fosforamídita. En algunos ejemplos, n es al menos 100. En algunos ejemplos, en donde n es al menos 200. En algunos ejemplos, n es al menos 300. En algunos ejemplos, n es al menos 400. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 100.000 loci resueltos y al menos dos de la pluralidad de oligonucleótidos en crecimiento son diferentes entre sí. En algunos ejemplos, el método comprende además secar al vacío el sustrato antes del acoplamiento. En algunos ejemplos, los bloques de construcción comprenden un grupo bloqueante. En algunos ejemplos, el grupo bloqueante comprende DMT lábil en medio ácido. En algunos ejemplos, el DMT lábil en medio ácido comprende 4,4'-dimetoxitritilo. En algunos ejemplos, el método comprende además oxidación o sulfurización. En algunos ejemplos, el método comprende además tapar químicamente cadenas de oligonucleótidos no acopladas. En algunos ejemplos, el método comprende además eliminar el grupo de bloqueo, desbloqueándose de esta manera la cadena de oligonucleótido en crecimiento. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 10.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 100.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos 1.000.000 vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

En otro aspecto más, la presente divulgación también proporciona un método de construcción de una genoteca tal como se describe en el presente documento. El método comprende: introducir en un primer punto de tiempo, en un medio no transitorio legible por ordenador, una lista de genes, en donde la lista comprende al menos 100 genes y en donde los genes son de al menos 500 pb; sintetizar más del 90 % de la lista de genes, construyéndose de esta manera una genoteca con genes suministrables; preparar una biblioteca de secuenciación que representa la genoteca; obtener información de la secuencia; seleccionar al menos un subconjunto de los genes suministrables basándose en la información de la secuencia; y suministrar los genes suministrables seleccionados en un segundo punto de tiempo, en donde el segundo punto de tiempo es menor de un mes desde el primer punto de tiempo.

En la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de construcción de una genoteca tal como se describe en el presente documento, la información de la secuencia puede obtenerse mediante secuenciación de última generación. La información de la secuencia puede obtenerse mediante secuenciación de Sanger. En algunos ejemplos, el método como comprende además suministrar al menos un gen en un segundo punto de tiempo. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 0,1 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en un 10 % en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, cada uno de los genes difiere de cualquier otro gen al menos en 2 pares de bases en la genoteca. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables están libres de error. En algunos ejemplos, los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1/3000 que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista de genes. En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los genes suministrables comprenden una tasa de error menor de 1 en 3000 pb que ocasiona la generación de una secuencia que se desvía de la secuencia de un gen en la lista de genes. En algunos ejemplos, un subconjunto de los genes suministrables están unidos covalentemente entre sí. En algunos ejemplos, un primer subconjunto de la lista de genes codifica componentes de una primera ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, el método comprende además seleccionar dichos uno o más productos metabólicos finales, construyéndose de esta manera la lista de genes. En algunos ejemplos, dichos uno o más productos metabólicos finales comprenden un biocombustible. En algunos ejemplos, un segundo subconjunto de la lista de genes codifica componentes de una segunda ruta metabólica con uno o más productos metabólicos finales. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 500 genes. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 5000 genes. En algunos ejemplos, la lista comprende al menos 10000 genes. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 1 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 2 kb. En algunos ejemplos, los genes son de al menos 3 kb. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 25 días desde el primer punto de tiempo. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 5 días desde el primer punto de tiempo. En algunos ejemplos, el segundo punto de tiempo es menor de 2 días desde el primer punto de tiempo. Debe tenerse en cuenta que cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento puede combinarse con cualquiera de los métodos, dispositivos, matrices, sustratos o sistemas proporcionados en la presente divulgación.

Se proporciona en el presente documento, en algunos ejemplos, un dispositivo microfluídico para la síntesis de ácidos nucleicos, que comprende una porción de sustrato sustancialmente plana que comprende  $n$  agrupamientos de  $m$  conexiones microfluídicas entre superficies opuestas, en donde cada una de las  $n \cdot m$  conexiones microfluídicas comprende un primer canal y un segundo canal, y en donde el primer canal dentro de cada uno de los  $n$  agrupamientos es común a las  $m$  conexiones microfluídicas, en donde la pluralidad de conexiones microfluídicas abarcan la porción de sustrato sustancialmente plana a lo largo de la dimensión más pequeña del sustrato, y en donde  $n$  y  $m$  son al menos 2. En algunos ejemplos, el segundo canal está funcionalizado con un recubrimiento que es capaz de facilitar la unión de un oligonucleótido al dispositivo. En algunos ejemplos, el dispositivo comprende además un primer oligonucleótido que está unido a los segundos canales en  $k$  de los  $n$  agrupamientos. En algunos ejemplos,  $k$  es 1. En algunos ejemplos, el dispositivo comprende además un segundo oligonucleótido que está unido a 1 de los  $n$  agrupamientos. En algunos ejemplos,  $l$  es 1. En algunos ejemplos, ninguno de los agrupamientos en los  $l$  agrupamientos están en los  $k$  agrupamientos.

En algunos ejemplos, el oligonucleótido es de al menos 10 nucleótidos, 25 nucleótidos, 50 nucleótidos, 75 nucleótidos, 100 nucleótidos, 125 nucleótidos, 150 nucleótidos o 200 nucleótidos de longitud.

En algunos ejemplos, el primer y el segundo oligonucleótidos difieren al menos en 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos o 10 nucleótidos.

En algunos ejemplos, las  $n \cdot m$  conexiones microfluídicas son como máximo de 5 mm, 1,5 mm, 1,0 mm o 0,5 mm de longitud. En algunos ejemplos, el primer canal dentro de cada uno de los  $n$  agrupamientos es como máximo de 5 mm, 1,5 mm, 1,0 mm o 0,5 mm de longitud. En algunos ejemplos, el primer canal dentro de cada uno de los  $n$  agrupamientos es al menos de 0,05 mm, 0,75 mm, 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm o 0,4 mm de longitud. En algunos ejemplos, el segundo canal en cada una de las  $n \cdot m$  conexiones microfluídicas es como máximo de 0,2 mm, 0,1 mm, 0,05 mm, 0,04 mm o 0,03 mm de longitud. En algunos ejemplos, el segundo canal en cada una de las  $n \cdot m$  conexiones microfluídicas es al menos de 0,001 mm, 0,005 mm, 0,01 mm, 0,02 mm o 0,03 mm de longitud. En algunos ejemplos, la sección transversal del primer canal dentro de cada uno de los  $n$  agrupamientos es al menos de 0,01 mm, 0,025 mm, 0,05 mm o 0,075 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal del primer canal dentro de cada uno de los  $n$  agrupamientos es como máximo de 1 mm, 0,5 mm, 0,25 mm, 0,1 mm o 0,075 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal del segundo canal en cada una de las  $n \cdot m$  conexiones microfluídicas es al menos de 0,001 mm, 0,05 mm, 0,01 mm, 0,015 mm o 0,02 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal del segundo canal en cada una de las  $n \cdot m$  conexiones microfluídicas es como máximo de 0,25 mm, 0,125 mm, 0,050 mm, 0,025 mm, 0,02 mm. En algunos ejemplos, la desviación típica en la sección transversal del segundo canal en cada una de las  $n \cdot m$  conexiones microfluídicas es menor del 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o 1 % de la media de la sección transversal. En algunos ejemplos, la variación en la sección transversal dentro de al menos el 90 % de los segundos canales de las  $n \cdot m$

conexiones microfluídicas es como máximo del 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o 1 %.

En algunos ejemplos,  $n$  es al menos 10, 25, 50, 100, 1000 o 10000. En algunos ejemplos,  $m$  es al menos 3, 4 o 5.

5 En algunos ejemplos, el sustrato comprende al menos el 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de silicio.

En algunos ejemplos, al menos el 90 % de los segundos canales de las  $n \times m$  conexiones microfluídicas está funcionalizado con un resto que aumenta la energía de superficie. En algunos ejemplos, la energía de superficie se aumenta a un nivel que corresponde a un ángulo de contacto con el agua menor de 75, 50, 30 o 20 grados.

10 En algunos ejemplos, la relación de aspecto para al menos el 90 % de los segundos canales de las  $n \times m$  conexiones microfluídicas es menor de 1, 0,5 o 0,3. En algunos ejemplos, la relación de aspecto para al menos el 90 % de los primeros canales de los  $n$  agrupamientos es menor de 0,5, 0,3 o 0,2.

15 En algunos ejemplos, la longitud total de al menos el 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 % o 95 % de las  $n \times m$  conexiones microfluídicas está dentro del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 % o 1000 % de la dimensión más pequeña del sustrato sustancialmente plano.

20 En algunos ejemplos, la porción sustancialmente plana del dispositivo se fabrica a partir de una oblea de SOI.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de amplificación de ácido nucleico, que comprende: (a) proporcionar una muestra que comprende  $n$  ácidos nucleicos monocatenarios circularizados, comprendiendo cada uno una secuencia diana diferente; (b) proporcionar un primer adaptador que es hibridable con al menos una secuencia de hibridación de adaptador en  $m$  de los  $n$  ácidos nucleicos monocatenarios circularizados; (c) proporcionar condiciones adecuadas para extender el primer adaptador usando los  $m$  ácidos nucleicos monocatenarios circularizados como molde, generándose de esta manera  $m$  ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios, en donde cada uno de los  $m$  ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios comprende una pluralidad de réplicas de la secuencia diana procedente de su molde; (d) proporcionar un primer oligonucleótido auxiliar que es hibridable con el primer adaptador; y (e) proporcionar un primer agente en condiciones adecuadas para que el primer agente corte los  $m$  ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios en una pluralidad de sitios de corte, generándose así una pluralidad de réplicas monocatenarias de las secuencias diana en los  $m$  ácidos nucleicos monocatenarios circularizados. En algunos ejemplos,  $n$  o  $m$  es al menos 2. En algunos ejemplos,  $n$  o  $m$  es al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 o 500. En algunos ejemplos,  $m$  es menor que  $n$ . En algunos ejemplos, la muestra que comprende los  $n$  ácidos nucleicos monocatenarios circularizados se forma proporcionando al menos  $n$  ácidos nucleicos monocatenarios lineales, comprendiendo cada uno de ellos una de las diferentes secuencias diana y circularizando los  $n$  ácidos nucleicos monocatenarios lineales, generándose de esta manera los  $n$  ácidos nucleicos monocatenarios circularizados. En algunos ejemplos, el primer adaptador es hibridable con los dos extremos de los  $n$  ácidos nucleicos monocatenarios lineales al mismo tiempo. En algunos ejemplos, las diferentes secuencias diana en los  $n$  ácidos nucleicos monocatenarios lineales están flanqueadas por una primera y una segunda secuencias de hibridación de adaptador. En algunos ejemplos, dichos al menos  $n$  ácidos nucleicos monocatenarios lineales se generan por síntesis de oligonucleótidos de novo. En algunos ejemplos, la primera secuencia de hibridación de adaptador en cada uno de los  $n$  ácidos nucleicos monocatenarios lineales difiere en no más de dos bases nucleotídicas. En algunos ejemplos, la primera o la segunda secuencia de hibridación de adaptador es de al menos 5 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos, la primera o la segunda secuencia de hibridación de adaptador es como máximo de 75, 50, 45, 40, 35, 30 o 25 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos, los extremos de los  $n$  ácidos nucleicos monocatenarios lineales se emparejan con bases adyacentes en el primer adaptador cuando el primer adaptador hibrida con los dos extremos del ácido nucleico monocatenario lineal al mismo tiempo. En algunos ejemplos, las localizaciones de la pluralidad de sitios de corte son tales que la secuencia de hibridación de adaptador se corta a partir de al menos el 5 % de la porción de secuencia restante de las  $m$  réplicas de ácido nucleico monocatenario circularizado. En algunos ejemplos, permanece sin cortar al menos el 5 % de la secuencia de las  $m$  réplicas de ácido nucleico monocatenario circularizado distintas de dicha al menos una secuencia de hibridación de adaptador. En algunos ejemplos, las localizaciones de la pluralidad de sitios de corte están fuera de dicha al menos una secuencia de hibridación de adaptador. En algunos ejemplos, las localizaciones de la pluralidad de sitios de corte son independientes de las secuencias diana. En algunos ejemplos, las localizaciones de la pluralidad de sitios de corte se determinan por al menos un elemento de secuencia dentro de las secuencia del primer adaptador o el primer oligonucleótido auxiliar. En algunos ejemplos, el elemento de secuencia comprende un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción. En algunos ejemplos, el primer oligonucleótido auxiliar o el primer oligonucleótido adaptador comprende un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción de Tipo IIS. En algunos ejemplos, los sitios de reconocimiento están separados por al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de los sitios de corte. En algunos ejemplos, la pluralidad de sitios de corte están en uniones de ácidos nucleicos mono y bicatenarios. En algunos ejemplos, los ácidos nucleicos bicatenarios comprenden el primer adaptador y el primer oligonucleótido auxiliar. En algunos ejemplos, los ácidos nucleicos monocatenarios consisten esencialmente en las  $m$  secuencias diana diferentes. En algunos ejemplos, las  $m$  secuencias diana diferentes tienen como máximo el 95 % de similitud por pares. En algunos ejemplos, las  $m$  secuencias diana diferentes tienen como máximo el 90 % de similitud por pares. En algunos ejemplos, las  $m$  secuencias diana diferentes tienen como máximo el 80 % de similitud por pares. En algunos ejemplos, las  $m$  secuencias diana diferentes tienen como máximo el 50 % de similitud por pares. En algunos ejemplos, la generación

de los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios comprende amplificación con desplazamiento de cadena. En algunos ejemplos, el primer oligonucleótido auxiliar comprende una etiqueta de afinidad. En algunos ejemplos, la etiqueta de afinidad comprende biotina o un derivado de biotina. En algunos ejemplos, el método comprende además aislar ácidos nucleicos bicatenarios de la muestra. En algunos ejemplos, el aislamiento comprende purificación por afinidad, cromatografía o purificación en gel. En algunos ejemplos, el primer agente comprende una endonucleasa de restricción. En algunos ejemplos, el primer agente comprende al menos dos endonucleasas de restricción. En algunos ejemplos, el primer agente comprende una endonucleasa de restricción de Tipo IIS. En algunos ejemplos, el primer agente comprende una endonucleasa de mellado (nicking). En algunos ejemplos, el primer agente comprende al menos dos endonucleasas de mellado (nicking). En algunos ejemplos, el primer agente comprende al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en MlyI, SclI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PfiI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FagI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, Ajnl, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MbolI, Acul, BciVI, Bmrl, Bpml, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, Mmel, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, Bmul, Bsbl, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, Tail, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, Tsul, UbaF1 1I, Unbl, Vpak1 1AI, BspGI, DrdII, Pfl1 1081, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI y Nt.BspQI, y variantes de las mismas. En algunos ejemplos, el primer agente comprende esencialmente la misma función, reconoce la misma o esencialmente la misma secuencia de reconocimiento, o corta el mismo o esencialmente el mismo sitio de corte, que cualquiera de los primeros agentes indicados o variantes. En algunos ejemplos, dichas al menos dos enzimas de restricción comprenden MlyI y BciVI o BfuCI y MlyI. En algunos ejemplos, el método comprende además (a) dividir la muestra en una pluralidad de fracciones; (b) proporcionar al menos una fracción con un segundo adaptador que es hibridable con al menos una secuencia de hibridación de adaptador en k de los n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados diferentes; (c) proporcionar condiciones adecuadas para extender el segundo adaptador usando los k ácidos nucleicos monocatenarios circularizados como molde, generándose de esta manera k ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios, en donde el segundo ácido nucleico de amplicón monocatenario comprende una pluralidad de réplicas de la secuencia diana procedente de su molde; (d) proporcionar un segundo oligonucleótido auxiliar que es hibridable con el segundo adaptador; y (e) proporcionar un segundo agente en condiciones adecuadas para que el agente corte los k ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios en una segunda pluralidad de sitios de corte, generándose así una pluralidad de réplicas monocatenarias de las secuencias diana en los k ácidos nucleicos monocatenarios circularizados. En algunos ejemplos, el primer y el segundo adaptadores son iguales. En algunos ejemplos, el primer y el segundo oligonucleótidos auxiliares son iguales. En algunos ejemplos, el primer y el segundo agentes son iguales. En algunos ejemplos, k + m es menor que n. En algunos ejemplos, k es al menos 2. En algunos ejemplos, la muestra que comprende los n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados se forma por amplificación de ácidos nucleicos monocatenarios. En algunos ejemplos, la amplificación de ácidos nucleicos monocatenarios comprende: (a) proporcionar una muestra que comprende al menos m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados; (b) proporcionar un primer adaptador precursor que es hibridable con los m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados; (c) proporcionar condiciones adecuadas para extender el primer adaptador precursor usando los m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados como molde, generándose de esta manera m ácidos nucleicos de amplicón precursores monocatenarios, en donde el ácido nucleico de amplicón monocatenario comprende una pluralidad de réplicas de los m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados; (d) proporcionar un primer oligonucleótido auxiliar precursor que es hibridable con el primer adaptador precursor; y (e) proporcionar un primer agente precursor en condiciones adecuadas para que el primer agente precursor corte el primer ácido nucleico de amplicón precursor monocatenario en una pluralidad de sitios de corte, generándose de esta manera los m ácidos nucleicos precursores lineales. En algunos ejemplos, el método comprende además circularizar los m ácidos nucleicos precursores lineales, formando de esta manera réplicas de los m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados. En algunos ejemplos, los m ácidos nucleicos precursores monocatenarios circularizados se amplifican al menos 10, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 10000 veces, o más en réplicas monocatenarias. En algunos ejemplos, al menos uno de los m ácidos nucleicos monocatenarios circularizados está a una concentración de aproximadamente o como máximo de aproximadamente 100 nM, 10 nM, 1 nM, 50 pM, 1 pM, 100 fM, 10 fM, 1 fM o menor. En algunos ejemplos, la circularización comprende ligamiento. En algunos ejemplos, el ligamiento comprende el uso de una ligasa seleccionada del grupo que consiste en la ADN ligasa de T4, ADN ligasa de T3, ADN ligasa de T7, ADN ligasa de E. coli, ADN ligasa Taq y ADN ligasa 9N.

En un aspecto adicional más, la divulgación, en diversos ejemplos se refiere a un kit que comprende: (a) un primer adaptador; (d) un primer oligonucleótido auxiliar que es hibridable con el adaptador; (c) una ligasa; y (d) un primer agente de escisión, que comprende al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en MlyI, SclI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PfiI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FagI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, Ajnl, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MbolI, Acul, BciVI, Bmrl, Bpml, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, Mmel, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, Bmul, Bsbl, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, Tail, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, Tsul, UbaF1 1I, Unbl, Vpak1 1AI, BspGI, DrdII, Pfl1 1081, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI y Nt.BspQI, y variantes de las mismas. En algunos ejemplos, el primer agente comprende esencialmente la misma función, reconoce la misma o esencialmente la misma secuencia de reconocimiento, o corta en el mismo o esencialmente el mismo sitio de corte que cualquiera de los

5 primeros agentes indicados y variantes. En algunos ejemplos, el kit comprende además un segundo agente de escisión. En algunos ejemplos, el segundo agente de escisión comprende una enzima seleccionada del grupo que consiste en MlyI, SchI, AlwI, Bccl, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, Hgal, PfiI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BsfFI, BsoMAI, Bst71I, FagI, AclII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjiI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MbolI, AclI, BciVI, Bmrl, Bpml, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, Bmul, Bsbl, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, Tsul, UbaF1 1I, Unbl, Vpak1 1AI, BspGI, DrdII, Pfl1 1081, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI y Nt.BspQI, y variantes de las mismas. En algunos ejemplos, el segundo agente comprende esencialmente la misma función, reconoce la misma o esencialmente la misma secuencia de reconocimiento, o corta en el mismo o esencialmente el mismo sitio de corte que cualquiera de los segundos agentes indicados y variantes. En algunos ejemplos, el primer agente de escisión comprende MlyI. En algunos ejemplos, el segundo agente de escisión comprende BciVI o BfuCI.

15 En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método de amplificación de ácido nucleico, que comprende: (a) proporcionar una muestra que comprende n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados, comprendiendo cada uno una secuencia diana diferente; (b) proporcionar un primer adaptador que es hibridable con al menos una secuencia de hibridación de adaptador en m de los n ácidos nucleicos monocatenarios circularizados; (c) proporcionar condiciones adecuadas para extender el primer adaptador usando los m ácidos nucleicos monocatenarios circularizados como molde, generándose de esta manera m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios, en donde cada uno de los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios comprende una pluralidad de réplicas de la secuencia diana procedente de su molde; (d) generar sitios de reconocimiento bicatenarios para un primer agente en los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios; y (e) proporcionar el primer agente en condiciones adecuadas para que el primer agente corte los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios en una pluralidad de sitios de corte, generándose así una pluralidad de réplicas monocatenarias de las secuencias diana en los m ácidos nucleicos monocatenarios circularizados. En algunos ejemplos, los sitios de reconocimiento bicatenarios comprenden una primera porción del primer adaptador en una primera cadena de los sitios de reconocimiento bicatenarios y una segunda cadena del primer adaptador en la segunda cadena de los sitios de reconocimiento bicatenarios. En algunos ejemplos, el adaptador comprende una secuencia palindrómica. En algunos ejemplos, los sitios de reconocimiento bicatenarios se generan por hibridación de la primera y la segunda porciones del primer adaptador entre sí. En algunos ejemplos, los m ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios comprenden una pluralidad de regiones autohibridadas bicatenarias.

35 En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método para generar una molécula larga de ácido nucleico, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos inmovilizados en una superficie, en donde dicha pluralidad de ácidos nucleicos comprende ácidos nucleicos que tienen secuencias complementarias solapantes; (b) liberar dicha pluralidad de ácidos nucleicos en una solución; y (c) proporcionar condiciones que promuevan: i) la hibridación de dichas secuencias complementarias solapantes para formar una pluralidad de ácidos nucleicos hibridados; y ii) la extensión o ligamiento de dichos ácidos nucleicos hibridados para sintetizar la molécula larga de ácido nucleico.

45 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un sistema automático capaz de procesar uno o más sustratos, que comprende: un cabezal de impresión de inyección de tinta para pulverizar una microgotícula que comprende una especie química sobre un sustrato; un transporte de exploración para explorar el sustrato adyacente al cabezal de impresión para depositar selectivamente la microgotícula en sitios especificados; una celda de flujo para tratar el sustrato sobre el que se deposita la microgotícula mediante la exposición del sustrato a uno o más fluidos seleccionados; una unidad de alineamiento para alinear el sustrato correctamente con respecto al cabezal de impresión cada vez cuando el sustrato se posiciona adyacente al cabezal de impresión para la deposición; y que no comprende un transporte de tratamiento para mover el sustrato entre el cabezal de impresión y la celda de flujo para el tratamiento en la celda de flujo, en donde dicho transporte de tratamiento y dicho transporte de exploración son elementos diferentes.

55 En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un sistema automático para sintetizar oligonucleótidos en un sustrato, siendo dicho sistema automático capaz de procesar uno o más sustratos, que comprende: un cabezal de impresión de inyección de tinta para pulverizar una solución que comprende un nucleósido o nucleósido activado sobre un sustrato; un transporte de exploración para explorar el sustrato adyacente al cabezal de impresión para depositar selectivamente el nucleósido en sitios especificados; una celda de flujo para tratar el sustrato sobre el que se deposita el monómero mediante la exposición del sustrato a uno o más fluidos seleccionados; una unidad de alineamiento para alinear el sustrato correctamente con respecto al cabezal de impresión cada vez cuando el sustrato se posiciona adyacente al cabezal de impresión para la deposición; y que no comprende un transporte de tratamiento para mover el sustrato entre el cabezal de impresión y la celda de flujo para el tratamiento en la celda de flujo, en donde dicho transporte de tratamiento y dicho transporte de exploración son elementos diferentes.

65 En un aspecto adicional más, la divulgación se refiere a un sistema automático que comprende: un cabezal de impresión de inyección de tinta para pulverizar una microgotícula que comprende una especie química sobre un sustrato; un transporte de exploración para explorar el sustrato adyacente al cabezal de impresión para depositar

selectivamente la microgotícula en sitios especificados; una celda de flujo para tratar el sustrato sobre el que se deposita la microgotícula mediante la exposición del sustrato a uno o más fluidos seleccionados; y una unidad de alineamiento para alinear el sustrato correctamente con respecto al cabezal de impresión cada vez cuando el sustrato se posiciona adyacente al cabezal de impresión para la deposición; y en donde el sistema NO comprende un trasporte de tratamiento para mover el sustrato entre el cabezal de impresión y la celda de flujo para el tratamiento en la celda de flujo.

Teniendo en cuenta lo anterior, se hace referencia más específicamente a los dibujos que, para los propósitos ilustrativos, muestran la presente divulgación incorporada en composiciones, sistemas y métodos en las figuras 1-2. Se apreciará que los métodos, sistemas y composiciones pueden variar en configuración y en los detalles de las partes individuales en diversos ejemplos de la divulgación. Además, los métodos pueden variar en detalle y en el orden de los acontecimientos o actos. En diversos ejemplos, la divulgación se describe principalmente en términos de uso con ácidos nucleicos, en particular, oligómeros de ADN y polinucleótidos. Debería entenderse, sin embargo, que la divulgación puede usarse con una diversidad de tipos diferentes de moléculas, incluyendo ARN u otros ácidos nucleicos, péptidos, proteínas u otras moléculas de interés. En la técnica se conocen bloques de construcción adecuados para cada una de estas moléculas más grandes de interés.

La presente divulgación proporciona composiciones, sistemas y métodos útiles en la preparación y la síntesis de bibliotecas de moléculas de interés, incluidos ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y combinaciones de los mismos. En diversos ejemplos, la divulgación contempla el uso de obleas estáticas y dinámicas, por ejemplo, las que se fabrican a partir de sustratos de silicio, para realizar reacciones a escala de micro-, nano- o picolitros en paralelo. Además, se puede aplicar lo mismo a la manipulación a escala de micro-, nano- o picolitros de fluidos en paralelo para permitir la asociación de una pluralidad de reacciones en volúmenes resueltos. La manipulación de fluidos puede comprender flujo, combinación, mezcla, fraccionamiento, generación de gotas, calentamiento, condensación, evaporación, sellado, estratificación, presurización, secado o cualquier otra manipulación de líquidos conocida en la técnica. En diversos ejemplos, las obleas proporcionan arquitecturas para la manipulación de fluidos que están construidas en la superficie. Pueden crearse arquitecturas caracterizadas por formas y tamaños variables dentro o a través de un sustrato de oblea. Los métodos y composiciones de la divulgación, en diversos ejemplos, hacen uso de dispositivos con arquitecturas específicas ejemplificados con más detalle en el presente documento, para la síntesis de moléculas biológicas. En particular, la divulgación proporciona la síntesis de novo de bibliotecas grandes, de alta densidad, que comprenden oligonucleótidos y polinucleótidos grandes de alta calidad, por ejemplo, usando la química de la fosforamidita y técnicas de ensamblaje de genes adecuadas, mediante el control preciso de condiciones de reacción tales como el tiempo, la dosificación y la temperatura.

Haciendo referencia ahora a la figura 1C, la divulgación en diversos ejemplos contempla el uso de una o más obleas estáticas o dinámicas para la manipulación de fluidos. Las obleas pueden construirse a partir de varios materiales adecuados como se describe adicionalmente en el presente documento, por ejemplo, silicio. Las obleas de nanorreactor pueden configurarse para recibir y albergar líquidos en una pluralidad de características. Otras obleas, por ejemplo, las que se usan para reacciones de síntesis in situ, pueden ponerse en contacto con obleas de nanorreactor para recoger y/o mezclar líquidos. Los nanorreactores pueden recoger líquidos de una pluralidad de obleas adicionales. Normalmente, los nanorreactores se alinean con uno o más loci resueltos en otras obleas cuando entra en contacto la oblea de nanorreactor. Dentro del nanorreactor pueden proporcionarse reactivos y disolventes antes del contacto. Como alternativa, los nanorreactores pueden estar vacíos antes del contacto con una oblea adicional. En algunos ejemplos, los nanorreactores recogen oligonucleótidos sintetizados en uno o más loci resueltos de una oblea de síntesis de ADN. Estos oligonucleótidos pueden ensamblarse en un gen de mayor tamaño dentro del nanorreactor. Los nanorreactores pueden sellarse tras el alineamiento y el contacto de una oblea adicional por cualquier medio adecuado, por ejemplo, válvulas de expansión capilar, presión, adhesivos, o cualquier otro medio de sellado conocido en la técnica. El sellado puede ser liberable. Las reacciones dentro de la oblea de nanorreactor pueden realizarse en volúmenes sellados y pueden comprender ciclos de temperatura, por ejemplo, como los aplicados en PCR o PCA. También Están dentro de los límites de la divulgación las reacciones isotérmicas, tales como amplificación isotérmica. Las obleas de síntesis de ADN pueden configurarse para realizar la síntesis in situ de oligonucleótidos en loci resueltos en o dentro de la superficie con un control preciso. Puede utilizarse un cabezal de impresión de inyección de tinta para liberar gotas de reactivos para la síntesis, por ejemplo, la síntesis convencional con fosforamidita sobre los loci resueltos de la oblea de síntesis. Otros reactivos que son comunes para una pluralidad de loci resueltos pueden pasarse a su través en masa. En algunos ejemplos, Las obleas de síntesis de ADN se reemplazan con obleas de síntesis para la síntesis in situ de moléculas distintas de oligonucleótidos de ADN como se describe adicionalmente en otras partes del presente documento. Por lo tanto, la divulgación contempla la síntesis rápida de bibliotecas grandes de oligonucleótidos y genes grandes con alta calidad mediante el control preciso de las condiciones de reacción en una pluralidad de volúmenes pequeños. Otro beneficio de la divulgación es un uso reducido de reactivos en comparación con los métodos de síntesis tradicionales conocidos en la técnica.

Se contemplan diversos métodos para la síntesis de novo de genotecas con bajas tasas de error. La figura 2 ilustra aplicaciones ejemplares de los métodos y composiciones de la divulgación para la síntesis de genotecas grandes, de alta densidad, con secuencias largas en paralelo. En diversos ejemplos, las obleas estáticas y dinámicas permiten una pluralidad de reacciones en un flujo de proceso. Por ejemplo, la síntesis de oligonucleótidos típicamente in situ en una oblea de síntesis de ADN, puede seguirse por una reacción de ensamblaje de genes, tal como ensamblaje cíclico por

polimerasa (PCA), de los oligonucleótidos sintetizados para obtener secuencias más largas. Las secuencias ensambladas pueden amplificarse, por ejemplo, mediante PCR. Pueden usarse reacciones de corrección de errores descritas en el presente documento o conocidas en la técnica para minimizar el número de secuencias ensambladas que se desvían de una secuencia diana. Pueden construirse bibliotecas de secuenciación y una fracción del producto puede dividirse en alícuotas para la secuenciación, tal como secuenciación de última generación (NGS).

Los procesos de síntesis génica ejemplificados en la figura 2 pueden ajustarse de acuerdo con las necesidades de un solicitante. De acuerdo con los resultados obtenidos de una etapa de secuenciación inicial, por ejemplo, NGS, los genes ensamblados con tasas de error aceptables pueden enviarse, por ejemplo, en una placa, a un solicitante (figura 2B). Los métodos y composiciones de la divulgación permiten conseguir fácilmente tasas de error menores de aproximadamente 1/10 kb, aunque pueden establecerse umbrales de error alternativos como se describe con más detalle en otras partes del presente documento. Para conseguir mayores grados de pureza, las secuencias sintetizadas de novo/ensambladas pueden purificarse por clonación a partir de colonias individuales. La identidad de una secuencia deseada correcta puede ensayarse mediante secuenciación, por ejemplo, NGS. Opcionalmente, puede obtenerse una mayor confianza con respecto a la precisión de la información de la secuencia, por ejemplo, mediante otro método de secuenciación tal como secuenciación de Sanger. Las secuencias verificadas pueden enviarse, por ejemplo, en una placa, a un solicitante (figura 2C) En otras partes del presente documento se describen con más detalle métodos para la generación de bibliotecas de secuenciación.

## 20 **Sustratos/Obleas**

En un aspecto, en el presente documento se describe un sustrato que tiene una superficie funcionalizada fabricado por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento y métodos de síntesis de oligonucleótidos en el sustrato que tiene una superficie funcionalizada. El sustrato puede comprender un soporte sólido que tiene una pluralidad de loci resueltos. La pluralidad de loci resueltos puede tener cualquier geometría, orientación u organización. Los loci resueltos pueden estar a cualquier escala (por ejemplo, escala micrométrica o nanométrica), o contener microestructuras fabricadas en la superficie del sustrato. Los loci resueltos pueden localizarse en microcanales con al menos una dimensión. Los loci resueltos individuales de un sustrato pueden estar desconectados fluidicamente entre sí, por ejemplo, un primer locus resuelto para la síntesis de un primer oligonucleótido puede estar en una primera vía entre las dos superficies de un sustrato y un segundo locus resuelto para la síntesis de un segundo oligonucleótido puede estar en una segunda vía entre las dos superficies de un sustrato, sin que la primera y la segunda vías estén conectadas fluidicamente dentro del sustrato, pero comenzando y terminando a partir de las mismas dos superficies del sustrato. En algunos casos, la microestructura de loci resueltos puede ser microcanales o micropocillos en 2-D o 3-D. Un microcanal "3-D" significa que la cavidad del microcanal puede estar interconectada o extenderse dentro del soporte sólido. Dentro de los microcanales o micropocillos, puede haber microestructuras secundarias o características con cualquier geometría, orientación u organización. La superficie de las características secundarias puede funcionalizarse con un resto que puede reducir la energía de superficie de la superficie de las características secundarias. Pueden depositarse gotículas de reactivos para sintetizar oligonucleótidos en los microcanales o micropocillos. Un micropocillo, como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura de escala microfluídica que puede albergar un líquido. En diversos ejemplos, los micropocillos permiten el flujo de líquido entre un extremo superior y uno inferior, a través de una abertura fluídica en cada extremo, actuando de esta manera como un microcanal. En estos contextos, los términos micropocillo y microcanal se usan indistintamente a lo largo de toda la memoria descriptiva.

La figura 3 ilustra un ejemplo del sistema para la síntesis de oligonucleótidos que comprende un primer sustrato y, opcionalmente, un segundo sustrato tal como se describe en el presente documento. Los cabezales de impresión de la impresora de inyección de tinta pueden moverse en dirección X-Y hasta la localización del primer sustrato. Un segundo sustrato puede moverse en la dirección Z para formar un sellado con el primer sustrato, formando un reactor resuelto. Los oligonucleótidos sintetizados pueden suministrarse del primer sustrato al segundo sustrato. En otro aspecto, la presente divulgación también se refiere a un sistema para el ensamblaje de oligonucleótidos. El sistema para el ensamblaje de oligonucleótidos puede comprender un sistema para la manipulación de la oblea. La figura 4 ilustra un ejemplo para el diseño de trazado de un sustrato, de acuerdo con diversos ejemplos de la divulgación. El sustrato puede comprender una pluralidad de micropocillos y los micropocillos pueden disponerse en serie en un campo uniforme, por ejemplo, un campo de 1,5 mm. Como alternativa, pueden seleccionarse múltiples campos en diferentes direcciones del trazado, por ejemplo, pueden definirse filas de microestructuras por un primer campo y, dentro de cada fila, las microestructuras pueden estar separadas por un segundo campo. El campo puede comprender cualquier tamaño adecuado, por ejemplo, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,75, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 mm. El micropocillo puede diseñarse de manera que tenga cualquier dimensión adecuada, por ejemplo, un diámetro de 80  $\mu\text{m}$  como se ejemplifica en la figura 4, o cualquier diámetro adecuado, incluyendo 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400 o 500  $\mu\text{m}$ , y los micropocillos pueden estar conectados a una pluralidad de micropocillos más pequeños. La superficie de los micropocillos más pequeños puede estar funcionalizada en regiones seleccionadas facilitando que el líquido de los reactivos fluya al interior, por ejemplo, mediante una funcionalización de superficie de alta energía. Tal como se ilustra en la Figura 4, el diámetro de los micropocillos más pequeños puede ser de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , o cualquier diámetro adecuado, incluyendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80  $\mu\text{m}$ . la figura 5 ilustra

un caso en el que una gotícula de reactivo se deposita en un micropocillo mediante una impresora de inyección de tinta. La gota de líquido puede extenderse y rellenar los micropocillos más pequeños, lo cual se facilita en algunos casos por la modificación de superficie de alta energía de la superficie de los micropocillos en comparación con superficies adyacentes.

5 Puede ser deseable tener una alta densidad de loci resueltos en el sustrato que tienen una superficie funcionalizada para tener un dispositivo pequeño y/o sintetizar un gran número de moléculas con un dispositivo pequeño y/o sintetizar un gran número de moléculas diferentes. La superficie funcionalizada del sustrato puede comprender cualquier densidad adecuada de loci resueltos (por ejemplo, una densidad adecuada para sintetizar oligonucleótidos con un número dado de oligonucleótidos diferentes totales a sintetizar, un periodo dado de tiempo para el proceso de síntesis, o un coste dado por oligonucleótido, gen o biblioteca). En algunos ejemplos, la superficie tiene una densidad de loci resueltos de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000, aproximadamente 5000, aproximadamente 6000, aproximadamente 7000, aproximadamente 8000, aproximadamente 9000, aproximadamente 10000, aproximadamente 20000, aproximadamente 40000, aproximadamente 60000, aproximadamente 80000, aproximadamente 100000, o aproximadamente 500000 sitios por 1 mm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, la superficie tiene una densidad de loci resueltos de al menos aproximadamente 50, al menos 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 1500, al menos aproximadamente 2000, al menos aproximadamente 3000, al menos aproximadamente 4000, al menos aproximadamente 5000, al menos aproximadamente 6000, al menos aproximadamente 7000, al menos aproximadamente 8000, al menos aproximadamente 9000, al menos aproximadamente 10000, al menos aproximadamente 20000, al menos aproximadamente 40000, al menos aproximadamente 60000, al menos aproximadamente 80000, al menos aproximadamente 100000, o al menos aproximadamente 500000 sitios por 1 mm<sup>2</sup>. Los loci resueltos en el sustrato pueden tener cualquier organización diferente. Por ejemplo, sin limitación, los loci resueltos pueden agruparse quedando muy próximos entre sí para formar una o más regiones circulares, regiones rectangulares, regiones elípticas, regiones irregulares y similares. En un aspecto, los loci resueltos están muy empaquetados y tienen una cantidad baja o nula de contaminación cruzada (por ejemplo, las gotículas de reactivos que se depositan en un locus resuelto no se mezclan sustancialmente con las gotículas de reactivos que se depositan en el locus resuelto más cercano). La organización de los loci resueltos en el sustrato puede diseñarse de tal manera que permita que cada subregión o la región entera a cubrir conjuntamente cree una cavidad sellada con humedad, presión o contenido de gas controlados en la cavidad sellada, de manera que cada subregión o la región entera puedan tener la misma humedad, presión o contenido de gas, o una humedad, presión o contenido de gas sustancialmente similar, permitidos en condiciones de conexión fluidica. En la figura 6 se ilustran algunos ejemplos de diseños diferentes para los loci resueltos en el sustrato. Por ejemplo, La figura 6Bb es un diseño de un trazado denominado Matriz de Agujeros; La figura 6Bc es un diseño de un trazado denominado Flores; La figura 6Bd es un diseño de un trazado denominado Mirilla; y la figura 6Be es un diseño de un trazado denominado Flor Radial. La figura 6C ejemplifica un diseño del sustrato cubierto con una serie de micropocillos en una plantilla de 97,765 µm. Los micropocillos ejemplificados en la figura 6C están agrupados en islas. Los micropocillos pueden rellenarse con reactivos del cabezal de inyección de tinta.

Cada uno de los loci resueltos en el sustrato puede tener cualquier forma conocida en la técnica, o las formas que pueden obtenerse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada uno de los loci resueltos puede tener un área que tiene forma circular, forma rectangular, forma elíptica o forma irregular. En algunos ejemplos, los loci resueltos pueden estar en una forma que permita que el líquido fluya fácilmente a su través sin crear burbujas de aire. En algunos ejemplos, los loci resueltos pueden tener forma circular, con un diámetro que puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente, o menos de aproximadamente 1 micrómetro (µm), 2 µm, 3 µm, 4 µm, 5 µm, 6 µm, 7 µm, 8 µm, 9 µm, 10 µm, 11 µm, 12 µm, 13 µm, 14 µm, 15 µm, 16 µm, 17 µm, 18 µm, 19 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 35 µm, 40 µm, 45 µm, 50 µm, 55 µm, 60 µm, 65 µm, 70 µm, 75 µm, 80 µm, 85 µm, 90 µm, 95 µm, 100 µm, 110 µm, 120 µm, 130 µm, 140 µm, 150 µm, 160 µm, 170 µm, 180 µm, 190 µm, 200 µm, 250 µm, 300 µm, 350 µm, 400 µm, 450 µm, 500 µm, 550 µm, 600 µm, 650 µm, 700 µm o 750 µm. Los loci resueltos pueden tener una distribución de tamaños monodispersa, es decir, todas las microestructuras pueden tener aproximadamente la misma anchura, altura y/o longitud. Como alternativa, los loci resueltos pueden tener un número limitado de formas y/o tamaños, por ejemplo, los loci resueltos pueden estar representados en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 o más formas distintas, teniendo cada una un tamaño monodisperso. En algunos ejemplos, la misma forma se puede repetir en múltiples distribuciones de tamaño monodispersas, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 o más distribuciones de tamaño monodispersas. Una distribución monodispersa puede reflejarse en una distribución unimodular con una desviación típica de menos del 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,001 % del modo, o menor.

Un sustrato que tiene una alta densidad de loci resueltos típicamente da como resultado un locus resuelto dentro de

un área pequeña. Por consiguiente, puede dar como resultado un microcanal pequeño. Los microcanales pueden contener gotículas depositadas de reactivos en diferentes volúmenes. Los microcanales pueden tener cualquier dimensión adecuada que permita áreas de superficie y/o volúmenes suficientemente grandes para los diversos ejemplos de la divulgación. En un aspecto, el volumen del microcanal es convenientemente grande de manera que un reactivo en una gotícula que se deposita en el microcanal no se agota completamente durante la síntesis de oligonucleótidos. En estos aspectos, entre otros, el volumen de una estructura de pocillo puede guiar el periodo de tiempo o densidad con la que pueden sintetizarse los oligonucleótidos.

Cada uno de los loci resueltos puede tener cualquier área adecuada para realizar las reacciones de acuerdo con diversos ejemplos de la divulgación descrita en el presente documento. En algunos casos, la pluralidad de loci resueltos puede ocupar cualquier porcentaje adecuado del área de superficie total del sustrato. En algunos casos, el área de los loci resueltos puede ser el área de sección transversal de microcanales o micropocillos construidos en un sustrato. En algunos ejemplos, la pluralidad de las microestructuras o loci resueltos puede ocupar directamente aproximadamente, al menos aproximadamente, o menos de aproximadamente el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la superficie del sustrato. En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos puede ocupar aproximadamente, al menos aproximadamente o menos de aproximadamente 10 mm<sup>2</sup>, 11 mm<sup>2</sup>, 12 mm<sup>2</sup>, 13 mm<sup>2</sup>, 14 mm<sup>2</sup>, 15 mm<sup>2</sup>, 16 mm<sup>2</sup>, 17 mm<sup>2</sup>, 18 mm<sup>2</sup>, 19 mm<sup>2</sup>, 20 mm<sup>2</sup>, 25 mm<sup>2</sup>, 30 mm<sup>2</sup>, 35 mm<sup>2</sup>, 40 mm<sup>2</sup>, 50 mm<sup>2</sup>, 75 mm<sup>2</sup>, 100 mm<sup>2</sup>, 200 mm<sup>2</sup>, 300 mm<sup>2</sup>, 400 mm<sup>2</sup>, 500 mm<sup>2</sup>, 600 mm<sup>2</sup>, 700 mm<sup>2</sup>, 800 mm<sup>2</sup>, 900 mm<sup>2</sup>, 1000 mm<sup>2</sup>, 1500 mm<sup>2</sup>, 2000 mm<sup>2</sup>, 3000 mm<sup>2</sup>, 4000 mm<sup>2</sup>, 5000 mm<sup>2</sup>, 7500 mm<sup>2</sup>, 10000 mm<sup>2</sup>, 15000 mm<sup>2</sup>, 20000 mm<sup>2</sup>, 25000 mm<sup>2</sup>, 30000 mm<sup>2</sup>, 35000 mm<sup>2</sup>, 40000 mm<sup>2</sup>, 50000 mm<sup>2</sup>, 60000 mm<sup>2</sup>, 70000 mm<sup>2</sup>, 80000 mm<sup>2</sup>, 90000 mm<sup>2</sup>, 100000 mm<sup>2</sup>, 200000 mm<sup>2</sup>, 300000 mm<sup>2</sup>, o más del área total.

Las microestructuras construidas en un sustrato pueden comprender microcanales o micropocillos, en donde las microestructuras parten de una superficie superior o inferior del sustrato y, en algunos casos, están conectadas fluidicamente con una superficie típicamente opuesta (por ejemplo, inferior o superior). Los términos "superior" e "inferior" no se refieren necesariamente a la posición del sustrato con respecto a la gravedad en cualquier tiempo dado, pero se usan generalmente por comodidad y claridad. Los microcanales o micropocillos pueden tener cualquier profundidad o longitud adecuada. En algunos casos, la profundidad o longitud del microcanal o micropocillo se mide desde la superficie del sustrato (y/o fondo del soporte sólido) hasta la parte superior del soporte sólido. En algunos casos, la profundidad o longitud del microcanal o micropocillo es aproximadamente igual al espesor del soporte sólido. En algunos ejemplos, los microcanales o micropocillos son de aproximadamente, menores de aproximadamente o mayores de aproximadamente 1 micrómetro (µm), 2 µm, 3 µm, 4 µm, 5 µm, 6 µm, 7 µm, 8 µm, 9 µm, 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 35 µm, 40 µm, 45 µm, 50 µm, 55 µm, 60 µm, 65 µm, 70 µm, 75 µm, 80 µm, 85 µm, 90 µm, 95 µm, 100 µm, 125 µm, 150 µm, 175 µm, 200 µm, 300 µm, 400 µm o 500 µm de profundidad o longitud. Los microcanales o micropocillos pueden tener cualquier longitud de perímetro que sea adecuada para los ejemplos de la divulgación descritos en el presente documento. En algunos casos, el perímetro del microcanal o micropocillo se mide como el perímetro de un área de sección transversal, por ejemplo, un área de sección transversal que es perpendicular a la dirección del flujo de fluido a través de dicho microcanal o micropocillo. En algunos ejemplos, los microcanales o micropocillos tienen aproximadamente, menos de aproximadamente, o al menos aproximadamente 1 micrómetro (µm), 2 µm, 3 µm, 4 µm, 5 µm, 6 µm, 7 µm, 8 µm, 9 µm, 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 31 µm, 35 µm, 40 µm, 45 µm, 50 µm, 55 µm, 60 µm, 65 µm, 70 µm, 75 µm, 80 µm, 85 µm, 90 µm, 95 µm, 100 µm, 125 µm, 150 µm, 175 µm, 200 µm, 300 µm, 400 µm o 500 µm de perímetro. En algunos ejemplos, la densidad de longitud nominal de arco de los microcanales o micropocillos puede tener cualquier longitud de arco adecuada por µm<sup>2</sup> del área de sustrato plana. Como se describe en el presente documento, la densidad de longitud de arco se refiere a la longitud de los perímetros de las secciones transversales de los microcanales o micropocillos por área de superficie del sustrato plano. Por ejemplo, sin limitación, la densidad de longitud nominal de arco de los microcanales o micropocillos puede ser de al menos 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1 µm/µm<sup>2</sup>, o más. En algunos ejemplos, la densidad de longitud nominal de arco de los microcanales o micropocillos puede ser 0,036 µm / µm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, la densidad de longitud nominal de arco de los microcanales o micropocillos puede ser al menos 0,001 µm / µm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, la densidad de longitud nominal de arco de los microcanales o micropocillos puede ser al menos 0,01 µm / µm<sup>2</sup>. Además, el área de superficie nominal de los microcanales o micropocillos que es adecuada para las reacciones descritas en el presente documento, por ejemplo, mediante recubrimiento de superficie con un resto adecuado, se puede maximizar. El área de superficie de los microcanales o micropocillos que se recubre con restos adecuados tal como se describe en el presente documento puede facilitar la unión de oligonucleótidos a la superficie. En algunos ejemplos, el área de superficie nominal de los microcanales o micropocillos adecuados para las reacciones descritas en el presente documento, tales como la síntesis de oligonucleótidos, es al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,05, 1,1, 1,15, 1,2, 1,25, 1,3, 1,35, 1,4, 1,45, 1,5, 1,55, 1,6, 1,65, 1,7, 1,75, 1,8, 1,85, 1,9, 1,95, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 µm<sup>2</sup> del área de superficie plana.

Los microcanales o micropocillos pueden tener cualquier volumen que sea adecuado para los métodos y composiciones descritas en el presente documento. En algunos ejemplos, los microcanales o micropocillos tienen un volumen que es menor de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 o 950 picolitros (pl), menor de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 990 nanolitros (nl), menor de aproximadamente 0,5 microlitros ( $\mu\text{l}$ ), menor de aproximadamente 1  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 1,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 2  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 2,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 3  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 3,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 4  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 4,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 5,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 6  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 6,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 7  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 7,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 8  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 8,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 9  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 9,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 10  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 11  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 12  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 13  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 14  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 15  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 16  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 17  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 18  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 19  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 20  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 25  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 30  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 35  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 40  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 45  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 50  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 55  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 60  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 65  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 70  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 75  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 80  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 85  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 90  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 95  $\mu\text{l}$  o menor de aproximadamente 100  $\mu\text{l}$ . En algunos ejemplos, los microcanales o micropocillos tienen un volumen que es igual o mayor de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 o 950 picolitros (pl), igual o mayor de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 990 nanolitros (nl), igual o mayor de aproximadamente 0,5 microlitros ( $\mu\text{l}$ ), aproximadamente 1  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 1.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 2  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 2.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 3  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 3.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 4  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 4.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 5.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 6  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 6.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 7  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 7.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 8  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 8.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 9  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 9.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 11  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 12  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 13  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 14  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 15  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 16  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 17  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 18  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 19  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 20  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 25  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 30  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 35  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 40  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 45  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 50  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 55  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 60  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 65  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 70  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 75  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 80  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 85  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 90  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 95  $\mu\text{l}$  o aproximadamente 100  $\mu\text{l}$ .

Los microcanales pueden tener una relación de aspecto menor que 1. Como se usa en el presente documento, la expresión "relación de aspecto", se refiere a la relación de la anchura de un canal con respecto a la profundidad del canal. Por lo tanto, un canal que tiene una relación de aspecto menor que 1, es más profundo que ancho, mientras que un canal que tiene una relación de aspecto mayor que 1 es más ancho que profundo. En algunos aspectos, la relación de aspecto de los microcanales o micropocillos puede ser menor o igual a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,05 o menor. En algunos ejemplos, la relación de aspecto de los microcanales o micropocillos puede ser de aproximadamente 0,1. En algunos ejemplos, la relación de aspecto de los microcanales o canales puede ser de aproximadamente 0,05. Las microestructuras descritas en el presente documento, por ejemplo, microcanales o micropocillos que tienen relaciones de aspecto menores que 1, 0,1 o 0,05, pueden incluir canales que tienen una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más esquinas, giros y similares. Las microestructuras descritas en el presente documento pueden incluir las relaciones de aspecto descritas, por ejemplo, menores de 1, 0,1 o 0,05, con respecto a todos los microcanales o micropocillos contenidos dentro de un locus resuelto particular, por ejemplo, uno o más canales con intersecciones, algunos de estos canales, un solo canal e incluso una porción o porciones de uno o más microcanales o micropocillos. En la Patente de Estados Unidos N.º 5.842.787 se describen otros diseños y métodos de fabricación de los microcanales con bajas relaciones de aspecto.

Las microestructuras tales como microcanales o micropocillos en un sustrato que tiene una pluralidad de loci resueltos pueden fabricarse por cualquier método descrito en el presente documento o conocido en la técnica (por ejemplo, procesos de microfabricación). Los procesos de microfabricación que pueden usarse para fabricar el sustrato desvelado en el presente documento incluyen, entre otros, litografía; técnicas de grabado tales como grabado químico en húmedo, en seco y eliminación de fotoprotector; técnicas microelectromecánicas (MEMS) entre las que se incluyen técnicas de microfluídica/lab-on-a-chip, MEMS ópticas (también denominadas MOEMS), RF MEMS, PowerMEMS, y BioMEMS y grabado iónico reactivo profundo(DRIE); técnicas nanoelectromecánicas (NEMS); oxidación térmica de silicio; revestimiento electrolítico y no electrolítico; procesos de difusión tales como difusión de boro, fósforo, arsénico y antimonio; implantación iónica; deposición de película tal como evaporación (filamento, haz de electrones, destello y sombreado y cobertura por etapas), pulverización por bombardeo, deposición química en fase de vapor (CVD), epitaxia (fase de vapor, fase líquida y haz molecular), revestimiento electrolítico, serigrafía y laminación. Véase, en general, Jaeger, *Introduction to Microelectronic Fabrication* (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988); Runyan, *et al.*, *Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology* (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990); *Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998*; Rai-Choudhury, ed., *Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication* (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997).

En un aspecto, un sustrato que tiene una pluralidad de loci resueltos puede fabricarse usando cualquier método conocido en la técnica. En algunos ejemplos, el material del sustrato que tiene una pluralidad de loci resueltos puede ser un sustrato semiconductor tal como dióxido de silicio. Los materiales del sustrato también pueden ser otro material compuesto III-V o II-VI, tal como arseniuro de galio (GaAs), un semiconductor producido mediante el proceso de Czochochalski (Grovenor, C. (1989). *Microelectronic Materials*. CRC Press. págs. 113-123). El material puede presentar una superficie plana dura que muestra un recubrimiento uniforme de grupos de óxido reactivo (-OH) en una solución en contacto con su superficie. Estos grupos de óxido pueden ser los puntos de unión para procesos de silanización posteriores. Como alternativa, puede depositarse un material de superficie lipófila e hidrófoba que imita las características de grabado del óxido de silicio. También pueden utilizarse superficies de nitruro de silicio y carburo de silicio para la fabricación de sustratos adecuados de acuerdo con los diversos ejemplos de la divulgación.

En algunos ejemplos, puede depositarse sobre el sustrato una capa de pasivación, que puede tener o no grupos de óxido reactivo. La capa de pasivación puede comprender nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) o polimida. En algunos casos, puede usarse una etapa fotolitográfica para definir regiones en las que se forman loci resueltos sobre la capa de pasivación.

El método para producir un sustrato que tiene una pluralidad de loci resueltos puede comenzar con un sustrato. El sustrato (por ejemplo, silicio) puede tener cualquier número de capas dispuestas sobre el, incluyendo, pero sin limitación, una capa conductora tal como un metal. La capa conductora puede ser aluminio en algunas circunstancias. En algunos casos, el sustrato puede tener una capa protectora (por ejemplo, nitruro de titanio). En algunos casos, el sustrato puede tener una capa química con una alta energía de superficie. Las capas pueden depositarse con la ayuda de diversas técnicas de deposición, tales como, por ejemplo, deposición química en fase de vapor (CVD), deposición de capa atómica (ALD), CVD intensificada por plasma (PECVD), ALD intensificada por plasma (PEALD), CVD metal-orgánica (MOCVD), CVD de alambre caliente (HWCVD), CVD iniciada (iCVD), CVD modificada (MCVD), deposición axial de vapor (VAD), deposición de vapor exterior (OVD) y deposición física de vapor (por ejemplo, deposición catódica, deposición evaporativa).

En algunos casos, se deposita sobre el sustrato una capa de óxido. En algunos casos, la capa de óxido puede comprender dióxido de silicio. El dióxido de silicio puede depositarse usando tetraetil ortosilicato (TEOS), plasma de alta densidad (HDP) o cualquier combinación de los mismos.

En algunos casos, el dióxido de silicio puede depositarse usando una técnica de baja temperatura. En algunos casos, el proceso es deposición química en fase de vapor a baja temperatura de óxido de silicio. La temperatura generalmente es suficientemente baja para que no se dañe el metal preexistente en el chip. La temperatura de deposición puede ser de aproximadamente 50 °C, aproximadamente 100 °C, aproximadamente 150 °C, aproximadamente 200 °C, aproximadamente 250 °C, aproximadamente 300 °C, aproximadamente 350 °C y similares. En algunos ejemplos, la temperatura de deposición está por debajo de aproximadamente 50 °C, por debajo de aproximadamente 100 °C, por debajo de aproximadamente 150 °C, por debajo de aproximadamente 200 °C, por debajo de aproximadamente 250 °C, por debajo de aproximadamente 300 °C, por debajo de aproximadamente 350 °C, y similares. La deposición puede realizarse a cualquier presión adecuada. En algunos casos, el proceso de deposición usa energía de plasma RF.

En algunos casos, el óxido se deposita mediante un procedimiento de óxido desarrollado térmicamente en seco (por ejemplo, los que pueden usar temperaturas cercanas o superiores a 1.000 °C). En algunos casos, el óxido de silicio se produce por un proceso de vapor en húmedo.

El dióxido de silicio puede depositarse con un espesor adecuado para la fabricación de microestructuras adecuadas descritas con más detalle en otras partes del presente documento.

El dióxido de silicio puede depositarse a cualquier espesor adecuado. En algunos ejemplos, la capa de dióxido de silicio puede tener un espesor de al menos o al menos aproximadamente 1 nm, 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 125 nm, 150 nm, 175 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm o 500 nm, 1  $\mu\text{m}$ , 1,1  $\mu\text{m}$ , 1,2  $\mu\text{m}$ , 1,3  $\mu\text{m}$ , 1,4  $\mu\text{m}$ , 1,5  $\mu\text{m}$ , 1,6  $\mu\text{m}$ , 1,7  $\mu\text{m}$ , 1,8  $\mu\text{m}$ , 1,9  $\mu\text{m}$ , 2,0  $\mu\text{m}$  o más. La capa de dióxido de silicio puede tener un espesor de como máximo o como máximo aproximadamente 2,0  $\mu\text{m}$ , 1,9  $\mu\text{m}$ , 1,8  $\mu\text{m}$ , 1,7  $\mu\text{m}$ , 1,6  $\mu\text{m}$ , 1,5  $\mu\text{m}$ , 1,4  $\mu\text{m}$ , 1,3  $\mu\text{m}$ , 1,2  $\mu\text{m}$ , 1,1  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$ , 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm, 50 nm, 45 nm, 40 nm, 35 nm, 30 nm, 25 nm, 20 nm, 15 nm, 10 nm, 9 nm, 8 nm, 7 nm, 6 nm, 5 nm, 4 nm, 3 nm, 2 nm, 1 nm o menos. La capa de dióxido de silicio puede tener un espesor que está entre 1,0 nm-2,0  $\mu\text{m}$ , 1,1-1,9  $\mu\text{m}$ , 1,2-1,8 nm, 1,3-1,7  $\mu\text{m}$ , 1,4-1,6  $\mu\text{m}$ . Los expertos en la materia apreciarán que la capa de dióxido de silicio puede tener un espesor que está dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo (1,5-1,9  $\mu\text{m}$ ). El dióxido de silicio puede tener un espesor que está dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo. Los loci resueltos (por ejemplo, microcanales o micropocillos) pueden crearse en un sustrato de dióxido de silicio usando diversas técnicas de fabricación que se conocen en este campo. Estas técnicas pueden incluir técnicas de fabricación de semiconductores. En algunos casos, los loci resueltos se crean usando técnicas fotolitográficas tales como las usadas en la industria de los semiconductores. Por ejemplo, puede aplicarse un recubrimiento de material fotoprotector (por ejemplo, un material que cambia las propiedades cuando se expone a la radiación electromagnética)

sobre el dióxido de silicio (por ejemplo, por recubrimiento por centrifugado de una oblea) con cualquier espesor adecuado. Los sustratos que incluyen el fotoprotector pueden exponerse a una fuente de radiación electromagnética. Puede usarse una máscara para proteger de la radiación a porciones del fotoprotector con intención de definir el área de los loci resueltos. El fotoprotector puede ser un protector negativo o un protector positivo (por ejemplo, el área de los loci resueltos puede exponerse a la radiación electromagnética o las áreas distintas de los loci resueltos  $c_{an}$   $b_e$  puede exponerse a la radiación electromagnética según se define por la máscara). El área que recubre la localización en la que se van a crear los loci resueltos se expone a radiación electromagnética para definir un patrón que corresponda a la localización y distribución de los loci resueltos en la capa de dióxido de silicio. El fotoprotector puede exponerse a la radiación electromagnética a través de una máscara que define un patrón que corresponde a los loci resueltos. A continuación, la parte expuesta del fotoprotector puede retirarse, tal como, por ejemplo, con la ayuda de una operación de lavado (por ejemplo, agua desionizada). La parte retirada de la máscara después puede exponerse a un agente químico de grabado para grabar el sustrato y transferir el patrón de loci resueltos a la capa de dióxido de silicio. El agente de grabado puede incluir un ácido, tal como, por ejemplo, ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). La capa de dióxido de silicio puede grabarse de una manera anisotrópica. Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden aplicarse métodos de fabricación de alta anisotropía, tales como DRIE, para fabricar microestructuras, tales como micropocillos o microcanales que comprenden loci de síntesis, sobre o dentro de un sustrato con paredes laterales que se desvían menos de aproximadamente  $\pm 3^\circ$ ,  $2^\circ$ ,  $1^\circ$ ,  $0,5^\circ$ ,  $0,1^\circ$ , o menos desde la vertical con respecto a la superficie del sustrato. Pueden conseguirse valores reducidos de menos de aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1  $\mu m$  o menores que dan como resultado microestructuras altamente uniformes.

Pueden usarse diversos procedimientos de grabado para grabar el dióxido de silicio en el área en el que se van a formar los loci resueltos. El grabado puede ser un grabado isotrópico (es decir, la tasa de grabado solo en una dirección es sustancialmente igual o igual a la tasa de grabado a lo largo de una dirección ortogonal), o un grabado anisotrópico (es decir, la tasa de grabado a lo largo de una dirección es menor que la tasa de grabado solo en una dirección ortogonal), o variantes de los mismos. Las técnicas de grabado pueden ser grabados en húmedo de silicio tales como KOH, TMAH, EDP y similares, y grabado seco con plasma (por ejemplo DRIE). Pueden usarse ambos para grabar obleas con microestructuras a través de interconexiones.

En algunos casos, un grabado anisotrópico elimina la mayor parte del volumen de los loci resueltos. Puede eliminarse cualquier porcentaje adecuado del volumen de los loci resueltos, incluyendo aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 95 %. En algunos casos, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 % del material se elimina en un grabado anisotrópico. En algunos casos, como máximo aproximadamente el 60 %, como máximo aproximadamente el 70 %, como máximo aproximadamente el 80 %, como máximo aproximadamente el 90 % o como máximo aproximadamente el 95 % del material se elimina en un grabado anisotrópico. En algunos ejemplos, el grabado anisotrópico no elimina todo el material de dióxido de silicio a través del sustrato. Se usa un grabado isotrópico para eliminar todo el material a través de un sustrato creando un agujero, de acuerdo con algunos ejemplos.

En algunos casos, los pocillos se graban usando una etapa fotolitográfica para definir los loci resueltos seguida de un grabado híbrido seco-húmedo. La etapa fotolitográfica puede comprender aplicar un recubrimiento de dióxido de silicio con un fotoprotector y exponer el fotoprotector a radiación electromagnética a través de una máscara (o retícula) que tiene un patrón que define los loci resueltos. En algunos casos, el grabado híbrido seco-húmedo comprende: (a) grabado en seco para eliminar la mayor parte del dióxido de silicio en las regiones de los loci resueltos definidas en el fotoprotector por la etapa fotolitográfica; (b) limpieza del sustrato; y (c) grabado en húmedo para eliminar el dióxido de silicio restante del sustrato en las regiones de los loci resueltos.

El sustrato puede limpiarse con la ayuda de una química de grabado con plasma o por exposición a un agente oxidante, tal como, por ejemplo,  $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,  $O_3$ ,  $H_2SO_4$ , o una combinación de los mismos, tal como una combinación de  $H_2O_2$  y  $H_2SO_4$ . La limpieza puede comprender la eliminación del polímero residual, la eliminación de material que pueda bloquear el grabado en húmedo, o una combinación de las mismas. En algunos casos, la limpieza es limpieza con plasma. La etapa de limpieza puede proceder durante cualquier periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, de 15 a 20 segundos). En un ejemplo, la limpieza puede realizarse durante 20 segundos con una máquina eMAX-CT de Applied Materials con parámetros de 100 mT, 200 W, 20 G, 20  $O_2$ .

El grabado en seco puede ser un grabado anisotrópico que graba sustancialmente de forma vertical (por ejemplo, hacia el sustrato) pero no de forma lateral o sustancialmente de forma lateral (por ejemplo, paralelo al sustrato). En algunos casos, el grabado en seco comprende grabado con un agente de grabado basado en flúor tal como  $CF_4$ ,  $CHF_3$ ,  $C_2F_6$ ,  $C_3F_8$  o cualquier combinación de los mismos. En un caso, el grabado se realiza durante 400 segundos con una máquina eMAX-CT de Applied Materials que tiene parámetros de 100 mT, 1000 W, 20 G y 50  $CF_4$ . Los sustratos descritos en el presente documento pueden grabarse por grabado iónico reactivo profundo (DRIE). El DRIE es un proceso de grabado altamente anisotrópico usado para crear agujeros y fosas de paredes escalonadas y profundos en obleas/sustratos, normalmente con altas relaciones de aspecto. Los sustratos pueden grabarse usando dos tecnologías principales en el caso del DRIE de alta velocidad: criogénica y Bosch. Se describen métodos de aplicación de DRIE en la Patente de Estados Unidos N.º 5501893.

El grabado en húmedo puede ser un grabado isotrópico que elimina el material en todas las direcciones. En algunos casos, el grabado en húmedo deteriora el fotoprotector. El deterioro del fotoprotector puede hacer que el fotoprotector pueda eliminarse más fácilmente en una etapa posterior (por ejemplo, desprendimiento del fotoprotector). En un ejemplo, el grabado en húmedo es grabado con óxido tamponado (BOE). En algunos casos, los grabados en húmedo con óxido se realizan a temperatura ambiente con una base de ácido fluorhídrico que puede tamponarse (por ejemplo, con fluoruro amónico) para ralentizar la velocidad de grabado. La velocidad de grabado puede depender de la película que está grabada y de las concentraciones específicas de HF y/o NH<sub>4</sub>F. El tiempo de grabado necesario para eliminar completamente una capa de óxido se determina normalmente de forma empírica. En un ejemplo, el grabado se realiza a 22 °C con 15:1 BOE (grabado con óxido tamponado).

La capa de dióxido de silicio puede grabarse en una capa de material subyacente. Por ejemplo, la capa de dióxido de silicio puede grabarse hasta una capa de nitruro de titanio.

En un aspecto, un método para preparar un sustrato que tiene una pluralidad de loci resueltos comprende grabar los loci resueltos tales como micropocillos o microcanales en un sustrato, tal como un sustrato de silicio que comprende una capa de dióxido de silicio como un recubrimiento de la misma usando (a) una etapa fotolitográfica para definir los loci resueltos; (a) grabado en seco para eliminar la mayor parte del dióxido de silicio en las regiones de los loci resueltos definidas por la etapa fotolitográfica; y (c) grabado en húmedo para eliminar el dióxido de silicio restante del sustrato en las regiones de los loci resueltos. En algunos casos, el método puede comprender la eliminación del polímero residual, la eliminación de material que pueda bloquear el grabado en húmedo, o una combinación de las mismas. El método puede incluir una etapa de limpieza con plasma.

En algunos ejemplos, el fotoprotector no se elimina del dióxido de silicio después de la etapa fotolitográfica o el grabado híbrido en húmedo-seco en algunos casos. Puede dejarse el fotoprotector para dirigir el metal selectivamente a los loci resueltos y no sobre la superficie superior de la capa de dióxido de silicio en etapas posteriores. En algunos casos, el sustrato se recubre con un metal (por ejemplo, aluminio) y el grabado en húmedo no elimina ciertos componentes en el metal, por ejemplo, los que protegen el metal de la corrosión (por ejemplo, nitruro de titanio (TiN)). En algunos casos, sin embargo, la capa de fotoprotector puede retirarse, tal como con la ayuda de planarización mecánica química (CMP).

### **Funcionalización diferencial de sustratos**

Como se describe en el presente documento, la funcionalización de una superficie, por ejemplo, la superficie de una oblea de silicio, puede referirse a cualquier proceso mediante el cual las propiedades de superficie de un material se modifican por la deposición de una especie química en la superficie. Un método común para conseguir la funcionalización es la deposición de una molécula de organosilano por deposición química en fase de vapor. También puede realizarse en un proceso de silanización en húmedo.

La funcionalización diferencial, también denominada comúnmente "deposición selectiva de área" o "funcionalización selectiva de área", se puede referir a cualquier proceso que produzca dos o más áreas distintas en una estructura monolítica donde al menos un área tiene diferentes propiedades de superficie o químicas que otras áreas de la misma estructura. Las propiedades incluyen, pero sin limitación, energía de superficie, terminación química, concentración de un resto químico en la superficie, etc. Las diferentes áreas pueden ser contiguas.

La funcionalización activa puede referirse a la funcionalización de superficies que formarán parte de una etapa de producción posterior tal como la síntesis de ADN o la unión de ADN o proteínas. Por lo tanto, se selecciona un método de funcionalización adecuado como se describe en otra parte de este documento o conocido de otro modo en la técnica para permitir que la etapa de producción posterior particular tenga lugar en la superficie.

La funcionalización pasiva puede referirse a la funcionalización de superficies que harán que esas áreas sean ineficaces en la función principal de las áreas activas. Por ejemplo, si la funcionalización activa se diseña para unirse al ADN, las áreas funcionalizadas pasivas no se unirán al ADN.

Fotoprotector normalmente se refiere a un material sensible a la luz usado comúnmente en procesos industriales convencionales, tales como fotolitografía, para formar recubrimientos con patrones. Se aplica en forma líquida, pero solidifica sobre el sustrato según se evaporan los disolventes volátiles en la mezcla. Puede aplicarse en un proceso de recubrimiento por centrifugación como una película fina (1 um a 100 um) en un sustrato plano. El patrón puede crearse mediante su exposición a luz a través de una máscara o retícula, cambiando su tasa de disolución en un revelador. Puede ser "positivo" (la exposición a la luz aumenta la disolución) o "negativo" (la exposición a la luz disminuye la disolución). Puede usarse como una capa de sacrificio que sirve como capa de bloqueo para las etapas posteriores que modifican el sustrato subyacente (tal como el grabado). Una vez que se ha completado la modificación, se retira el protector.

Fotolitografía puede referirse a un proceso para crear un patrón en sustratos. Un proceso básico común comprende 1) aplicar un fotoprotector a un sustrato, 2) exponer el protector a la luz a través de una máscara binaria que es opaca en algunas áreas y transparente en otras áreas, y después 3) revelar el protector, lo cual da como resultado la creación

de un patrón del protector según las áreas que estén expuestas. Después del revelado, el protector con el patrón sirve como máscara para etapas de procesamiento posteriores, tales como grabado, implantación iónica o deposición. Después de las etapas de procesamiento, normalmente se elimina el protector, por ejemplo, mediante extracción por plasma o eliminación química húmeda.

5 En diversos ejemplos, se emplean métodos que utilizan fotoprotector en los que el fotoprotector facilita la fabricación de sustratos con funcionalización diferencial.

10 Una serie de etapas de fabricación pueden formar el inicio de un proceso de funcionalización diferencial, en donde las etapas individuales pueden modificarse, eliminarse o suplementarse con etapas adicionales para conseguir el patrón de funcionalización deseado en una superficie, de acuerdo con los diversos ejemplos de la divulgación. En primer lugar, puede conseguirse una preparación inicial de la superficie diana, por ejemplo, mediante una limpieza química y puede incluir una funcionalización inicial de superficie activa o pasiva.

15 En segundo lugar, la aplicación de fotoprotector se puede lograr mediante una diversidad de técnicas diferentes. En diversos ejemplos, el flujo de protector en diferentes partes de la estructura está controlado por el diseño de la estructura, por ejemplo, aprovechando las propiedades intrínsecas de fijación de los fluidos en diversos puntos de la estructura, tal como en los bordes afilados de los escalones. El fotoprotector deja una película sólida una vez que se evaporan los disolventes transportadores del protector.

20 En tercer lugar, se puede usar opcionalmente fotolitografía para eliminar el protector en ciertas regiones específicas del sustrato de modo que esas regiones se puedan modificar adicionalmente.

25 En cuarto lugar, se puede utilizar la eliminación de residuos con plasma (plasma descum), normalmente, una etapa corta de limpieza con plasma que usa, por ejemplo, un plasma de oxígeno, para facilitar la eliminación de cualquier contaminante orgánico residual en las áreas limpiadas del protector.

30 En quinto lugar, la superficie puede funcionalizarse mientras que las áreas cubiertas con protector están protegidas frente a cualquier funcionalización activa o pasiva. Puede usarse cualquier proceso adecuado que cambie las propiedades químicas de la superficie descrita en el presente documento o conocido en la técnica para funcionalizar la superficie, por ejemplo, deposición química en fase de vapor de un organosilano. Normalmente, esto da como resultado la deposición de una monocapa autoensamblada (SAM) de la especie de funcionalización.

35 En sexto lugar, el protector se puede quitar y eliminar, por ejemplo, disolviéndolo en disolventes orgánicos adecuados, grabado con plasma, exposición y revelado, etc., exponiendo así las áreas del sustrato que se habían cubierto por el protector. En algunos ejemplos, se selecciona un método que no eliminará los grupos de funcionalización ni dañará de otro modo las superficies funcionalizadas para quitar el protector.

40 En séptimo lugar, opcionalmente se puede realizar una segunda etapa de funcionalización que implica funcionalización activa o pasiva. En algunos ejemplos, las áreas funcionalizadas por la primera etapa de funcionalización bloquean la deposición de los grupos funcionales usados en la segunda etapa de funcionalización.

45 En diversos ejemplos, la funcionalización diferencial facilita el control espacial de las regiones del chip donde se sintetiza el ADN. En algunos ejemplos, la funcionalización diferencial proporciona una flexibilidad mejorada para controlar las propiedades fluidicas del chip. En algunos ejemplos, el proceso mediante el cual los oligos se transfieren de un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos a un dispositivo de nanopocillos se mejora por tanto mediante funcionalización diferencial. En algunos ejemplos, la funcionalización diferencial prevé la fabricación de dispositivos, por ejemplo, dispositivos de síntesis de oligonucleótidos o nanorreactores, donde las paredes de los pocillos o canales son relativamente hidrófilas, como se describe en otras partes del presente documento, y las superficies externas son relativamente hidrófobas, como se describe en otras partes del presente documento.

50 La figura 36 ilustra aplicaciones ejemplares de funcionalización diferencial en los dispositivos microfluídicos de acuerdo con los diversos ejemplos de la divulgación. Las áreas de funcionalización activa y pasiva están sombreadas de manera diferente según se indica. En particular, en estos ejemplos se utilizan primeros canales (vías) y segundos canales que se conectan a los mismos formando un denominado patrón de revólver para ilustrar la funcionalización diferencial en tres dimensiones. El trazado específico de las características tridimensionales dentro de estos sustratos ejemplares es en gran medida poco importante para el proceso de funcionalización, con la excepción de algunas pautas que ayudan a controlar la aplicación del protector.

60 La figura 37 ilustra un flujo de trabajo ejemplar para la generación de patrones de funcionalización diferencial ilustrados en las figuras 37B-D. Por consiguiente, el sustrato primero puede limpiarse, por ejemplo, usando una solución piraña, seguido de exposición a plasma con O<sub>2</sub> (figura 37A). Se puede aplicar fotoprotector a la capa del dispositivo que incluye los segundos canales (también conocidos como revólveres; figura 37B). Puede usarse una fotolitografía y/o una etapa de eliminación de residuos con plasma para generar un patrón deseado de fotoprotector sobre el sustrato, utilizando una máscara adecuada para el patrón (figura 37C). El patrón de la máscara se puede variar para controlar dónde permanece el fotoprotector y dónde se elimina. Puede realizarse una etapa de funcionalización, por ejemplo

con un fluorosilano, un silano de hidrocarburo o cualquier grupo que forme una capa orgánica que pueda pasivar la superficie, para definir las áreas funcionalizadas pasivamente en el dispositivo (figura 37D). El protector se puede quitar usando un método adecuado descrito en otras partes del presente documento o conocido de otro modo en la técnica (figura 37E). Una vez eliminado el protector, las áreas expuestas pueden estar sujetas a funcionalización activa dejando el patrón de funcionalización deseado (figura 37F).

En diversos ejemplos, los métodos y composiciones descritos en el presente documento se refieren a la aplicación de fotoprotector para la generación de propiedades de superficie modificadas en áreas selectivas, en donde la aplicación del fotoprotector se basa en las propiedades fluidicas de los sustratos que definen la distribución espacial del fotoprotector. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los efectos de tensión de superficie relacionados con el fluido aplicado pueden definir el flujo del fotoprotector. Por ejemplo, la tensión de superficie y/o los efectos de la acción capilar pueden facilitar la extracción del fotoprotector en estructuras pequeñas de forma controlada antes de que se evaporen los disolventes del protector (figura 38). En un ejemplo, los puntos de contacto del protector quedan retenidos por bordes afilados, controlando de esta manera el avance del fluido. Las estructuras subyacentes pueden diseñarse basándose en los patrones de flujo deseados que se utilizan para aplicar fotoprotector durante los procesos de fabricación y funcionalización. Puede usarse una capa orgánica sólida que queda después de que se evaporen los disolventes para continuar con las etapas posteriores del proceso de fabricación.

Los sustratos pueden diseñarse para controlar el flujo de fluidos facilitando o inhibiendo los efectos de absorción hacia rutas fluidicas vecinas. Por ejemplo, la Figura 39A ilustra un diseño que evita la superposición entre los bordes superior e inferior, lo que facilita el mantenimiento del fluido en estructuras superiores permitiendo una disposición particular del protector. Por el contrario, la figura 39B ilustra un diseño alternativo, en donde los bordes superior e inferior se superponen, conduciendo a la absorción del fluido aplicado en las estructuras del fondo. Los diseños apropiados pueden seleccionarse en consecuencia, dependiendo de la aplicación deseada del protector.

La figura 40 ilustra imágenes de campo brillante (A) y campo oscuro (B) de un dispositivo que se somete a protector según el patrón de fotoprotector de disco pequeño ilustrado en la figura 40C después de la fotolitografía.

La Figura 41 ilustra imágenes de campo brillante (A) y campo oscuro (B) de un dispositivo que se somete a protector según el patrón de fotoprotector de disco completo ilustrado en la figura 41C después de la fotolitografía.

La figura 42 ilustra imágenes de campo brillante (A) y campo oscuro (B) de un dispositivo que está funcionalizado de acuerdo con el patrón de la figura 42C después de la funcionalización pasiva y la eliminación del protector.

La figura 43 ilustra las diferentes propiedades fluidicas de las superficies funcionalizadas diferencialmente en imágenes de campo brillante (A) y campo oscuro (B) de acuerdo con el patrón de la figura 43C usando dimetilsulfóxido (DMSO) como fluido. La humectación espontánea de los revólveres se consiguió utilizando las superficies hidrófilas dentro de los revólveres rodeadas por las áreas hidrófobas.

La figura 44 ilustra otro flujo de trabajo ejemplar para la generación de patrones de funcionalización diferencial ilustrados en la figura 36F. Por consiguiente, el sustrato primero puede limpiarse, por ejemplo, usando una solución piraña, seguido de exposición a plasma con O<sub>2</sub> (figura 44A). Puede realizarse una etapa de funcionalización, por ejemplo con un fluorosilano, un silano de hidrocarburo o cualquier grupo que pueda formar una capa orgánica que pueda pasivar la superficie, para definir las áreas funcionalizadas pasivamente en el dispositivo (figura 44B). Se puede aplicar fotoprotector a la capa del dispositivo que incluye los segundos canales (también conocidos como revólveres; figura 44C). Se puede usar una fotolitografía y/o una etapa de grabado para generar un patrón deseado de fotoprotector en el sustrato, utilizando una máscara adecuada para el patrón (figura 44D). El patrón de la máscara se puede variar para controlar dónde permanece el fotoprotector y dónde se elimina. El protector se puede quitar usando un método adecuado descrito en otras partes del presente documento o conocido de otro modo en la técnica (figura 44E). Una vez eliminado el protector, las áreas expuestas pueden estar sujetas a funcionalización activa dejando el patrón de funcionalización diferencial deseado (figura 44F).

En otro ejemplo, el flujo de trabajo de funcionalización se diseña de manera que el protector se aplique desde el lado de la vía (inferior) y entre en las vías y los revólveres. Las áreas expuestas en las superficies exteriores pueden estar sujetas a funcionalización. El protector se puede eliminar, por ejemplo, del lado posterior (inferior) del dispositivo mediante litografía o grabado, permitiendo la funcionalización activa en las áreas expuestas que conducen al patrón descrito en la figura 36E.

En otro ejemplo más, se puede elegir un diseño de superposición entre las vías y los bordes del canal del revólver, como se muestra en la figura 39B. El protector se puede aplicar desde el lado frontal (superior) absorbiendo el fluido al interior de las vías. La funcionalización pasiva, retirada del protector, seguida de la funcionalización activa conduciría a la fabricación del patrón ilustrado en la figura 36E.

En la figura 25D se muestra un dispositivo microfluídico ejemplar que comprende una porción de sustrato sustancialmente plana. En la Figura 25E se muestra una sección transversal del diagrama. El sustrato comprende una pluralidad de grupos, en donde cada grupo comprende una pluralidad de agrupamientos de conexiones fluidicas. Cada

agrupamiento comprende una pluralidad de segundos canales que se extienden desde un primer canal. La figura 25A es una vista de dispositivo de un grupo que comprende una alta densidad de agrupamientos. La figura 25C es una vista de soporte del grupo de la figura 25A. La figura 25B es una vista en sección de la figura 25A.

- 5 Un grupo de agrupamientos puede disponerse en cualquier número de conformaciones. En la figura 25A, los agrupamientos están dispuestos en filas desplazadas para formar un grupo en un patrón de tipo circular. La figura 25C representa la disposición de una pluralidad de tales grupos en un dispositivo microfluídico ejemplar. En algunos ejemplos, los grupos individuales están contenidos dentro de regiones de grupos individuales cuyo interior forma una configuración convexa. En algunos ejemplos, las regiones de grupos individuales no se superponen entre sí. Las
- 10 regiones de grupos individuales pueden ser un círculo o cualquier otro polígono adecuado, por ejemplo, un triángulo, un cuadrado, un rectángulo, a, un paralelogramo, un hexágono, etc. Representada por 2503, una distancia ejemplar entre tres filas de agrupamientos puede ser de aproximadamente 0,05 mm a aproximadamente 1,25 mm, medido desde el centro de cada agrupamiento. La distancia entre 2, 3, 4, 5 o más filas de agrupamientos puede ser de aproximadamente o al menos de aproximadamente 0,05 mm, 0,1 mm, 0,15 mm, 0,2 mm, 0,25 mm, 0,3 mm, 0,35 mm,
- 15 0,4 mm, 0,45 mm, 0,5 mm, 0,55 mm, 0,6 mm, 0,65 mm, 0,7 mm, 0,75 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,1 mm, 1,2 mm, 1,2 mm o 1,3 mm. La distancia entre 2, 3, 4, 5 o más filas de agrupamientos puede ser aproximadamente o como máximo aproximadamente 1,3 mm, 1,2 mm, 1,1 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,75 mm, 0,65 mm, 0,6 mm, 0,55 mm, 0,5 mm, 0,45 mm, 0,4 mm, 0,35 mm, 0,3 mm, 0,25 mm, 0,2 mm, 0,15 mm, 0,1 mm, 0,05 mm o menos. La distancia entre 2, 3, 4, 5 o más filas de agrupamientos puede variar entre 0,05-1,3 mm, 0,1-1,2 mm, 0,15-1,1 mm, 0,2-1 mm, 0,25-0,9 mm, 0,3-0,8 mm, 0,35-0,8 mm, 0,4-0,7 mm, 0,45-0,75 mm, 0,5-0,6 mm, 0,55-0,65 mm o 0,6-0,65 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,05 mm-0,8 mm. Como se muestra en 2506, una distancia ejemplar entre dos agrupamientos en una fila de agrupamientos puede ser de aproximadamente 0,02 mm a aproximadamente 0,5 mm, medido desde el centro de cada agrupamiento. La distancia entre dos agrupamientos en una fila de agrupamientos puede ser de aproximadamente o al menos de aproximadamente 0,02 mm, 0,04 mm, 0,06 mm, 0,08 mm, 0,1 mm, 0,12 mm, 0,14 mm, 0,16 mm, 0,18 mm, 0,2 mm, 0,22 mm, 0,24 mm, 0,26 mm, 0,28 mm, 0,3 mm, 0,32 mm, 0,34 mm, 0,36 mm, 0,38 mm, 0,4 mm, 0,42 mm, 0,44 mm, 0,46 mm, 0,48 mm o 0,5 mm. La distancia entre dos agrupamientos en una fila de agrupamientos puede ser de aproximadamente o como máximo de aproximadamente 0,5 mm, 0,48 mm, 0,46 mm, 0,44 mm, 0,42 mm, 0,4 mm, 0,38 mm, 0,36 mm, 0,34 mm, 0,32 mm, 0,3 mm, 0,28 mm, 0,26 mm, 0,24 mm,
- 20 0,22 mm, 0,2 mm, 0,18 mm, 0,16 mm, 0,14 mm, 0,12 mm, 0,1 mm, 0,08 mm, 0,06 mm, 0,04 mm o 0,2 mm o menos. La distancia entre dos agrupamientos puede variar entre 0,02-0,5 mm, 0,04-0,4 mm, 0,06-0,3 mm o 0,08-0,2 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,04 mm-0,2 mm.
- 25 La longitud y la anchura del primer y segundo canales de cada agrupamiento se pueden optimizar de acuerdo con las condiciones experimentales. En algunos ejemplos, la sección transversal de un primer canal en un agrupamiento, representado por 2504, es de aproximadamente o al menos de aproximadamente 0,01 mm, 0,015 mm, 0,02 mm, 0,025 mm, 0,03 mm, 0,035 mm, 0,04 mm, 0,045 mm, 0,05 mm, 0,055 mm, 0,06 mm, 0,065 mm, 0,07 mm, 0,075 mm, 0,08 mm, 0,085 mm, 0,09 mm, 0,1 mm, 0,15 mm, 0,2 mm, 0,25 mm, 0,3 mm, 0,35 mm, 0,4 mm, 0,45 mm o 0,5 mm.
- 30 En algunos ejemplos, la sección transversal de un primer canal en un agrupamiento es de aproximadamente o como máximo de aproximadamente 0,5 mm, 0,45 mm, 0,4 mm, 0,35 mm, 0,3 mm, 0,25 mm, 0,2 mm, 0,15 mm, 0,1 mm, 0,09 mm, 0,085 mm, 0,08 mm, 0,075 mm, 0,07 mm, 0,065 mm, 0,06 mm, 0,055 mm, 0,05 mm, 0,045 mm, 0,04 mm, 0,035 mm, 0,03 mm, 0,025 mm, 0,02 mm, 0,015 mm o 0,01 mm o menos. La sección transversal de un primer canal en un agrupamiento puede variar entre 0,01-0,5 mm, 0,02-0,45 mm, 0,03-0,4 mm, 0,04-0,35 mm, 0,05-0,3 mm, 0,06-0,25 o 0,07-0,2 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,04 mm-0,2 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal de un segundo canal en un agrupamiento, representado por 2505, es de aproximadamente o al menos de aproximadamente 0,001 mm, 0,002 mm, 0,004 mm, 0,006 mm, 0,008 mm, 0,01 mm, 0,012 mm, 0,014 mm, 0,016 mm, 0,018 mm, 0,02 mm, 0,025 mm, 0,03 mm, 0,035 mm, 0,04 mm, 0,045 mm, 0,05 mm, 0,055 mm, 0,06 mm, 0,065 mm,
- 35 0,07 mm, 0,075 mm o 0,08 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal de un segundo canal en un agrupamiento, es de aproximadamente o como máximo de aproximadamente 0,08 mm, 0,075 mm, 0,07 mm, 0,065 mm, 0,06 mm, 0,055 mm, 0,05 mm, 0,045 mm, 0,04 mm, 0,035 mm, 0,03 mm, 0,025 mm, 0,02 mm, 0,018 mm, 0,016 mm, 0,014 mm, 0,012 mm, 0,01 mm, 0,008 mm, 0,006 mm, 0,004 mm, 0,002 mm, 0,001 mm o menos. La sección transversal de un segundo canal en un grupo puede variar entre 0,001-0,08 mm, 0,004-0,07 mm, 0,008-0,06 mm, 0,01-0,05 mm, 0,015-0,04 mm, 0,018-0,03 mm o 0,02-0,025 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,008 mm-0,04 mm. La figura 25B representa una sección transversal ejemplar de un grupo que comprende una fila de 11 agrupamientos. En algunos ejemplos, la altura del segundo canal en cada agrupamiento es de aproximadamente o al menos de aproximadamente 0,005 mm, 0,008 mm, 0,01 mm, 0,015 mm, 0,02 mm, 0,025 mm, 0,03 mm, 0,04 mm, 0,05 mm, 0,06 mm, 0,07 mm,
- 40 0,08 mm, 0,1 mm, 0,12 mm, 0,14 mm, 0,16 mm, 0,18 mm o 0,2 mm de longitud. En algunos ejemplos, la altura del segundo canal, mostrado como 2501, en cada agrupamiento es de aproximadamente o como máximo de aproximadamente 0,2 mm, 0,18 mm, 0,16 mm, 0,14 mm, 0,12 mm, 0,1 mm, 0,08 mm, 0,07 mm, 0,06 mm, 0,05 mm, 0,04 mm, 0,03 mm, 0,025 mm, 0,02 mm, 0,015 mm, 0,01 mm, 0,008 mm o 0,005 mm de longitud. La altura del segundo canal en cada agrupamiento puede variar entre 0,005-0,2 mm, 0,008-0,18 mm, 0,01-0,16 mm, 0,015-0,1 mm,
- 45 0,02-0,08 mm o 0,025-0,04 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,01 mm-0,04 mm. En algunos ejemplos, la altura del

5 primer canal dentro de cada agrupamiento, mostrado como 2502, es de aproximadamente o como máximo de aproximadamente 5 mm, 4,5 mm, 4 mm, 3,5 mm, 3 mm, 2,5 mm, 2 mm, 1,5 mm, 1,0 mm, 0,8 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,375 mm, 0,35 mm, 0,3 mm, 0,275 mm, 0,25 mm, 0,225 mm, 0,2 mm, 0,175 mm, 0,15 mm, 0,125 mm, 0,1 mm, 0,075 mm o 0,05 mm. En algunos ejemplos, la altura del primer canal dentro de cada agrupamiento, mostrado como 2502, es de aproximadamente o al menos de aproximadamente 0,05 mm, 0,075 mm, 0,1 mm, 0,125 mm, 0,15 mm, 0,175 mm, 0,2 mm, 0,225 mm, 0,25 mm, 0,275 mm, 0,3 mm, 0,325 mm, 0,35 mm, 0,375 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,8 mm, 1,0 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm, 3 mm, 3,5 mm, 4 mm, 4,5 mm o 5 mm. La altura del primer canal dentro de cada agrupamiento puede variar entre 0,05-5 mm, 0,075-4 mm, 0,1-3 mm, 0,15-2 mm, 0,2-1 mm o 0,3-0,8 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,1 mm-1 mm.

15 El grupo de agrupamientos puede disponerse en una conformación adecuada para su colocación en un solo pocillo de reacción de la porción de sustrato sustancialmente plana de un dispositivo microfluídico, como se muestra en la figura 25D. La figura 25D es un diagrama de una porción de sustrato sustancialmente plana de un dispositivo microfluídico que comprende 108 pocillos de reacción, donde cada pocillo de reacción comprende una pluralidad de agrupamientos. Un sustrato puede comprender cualquier número de pocillos, incluyendo, pero sin limitación, cualquier número entre aproximadamente 2 y aproximadamente 250. En algunos ejemplos, el número de pocillos incluye de aproximadamente 2 a aproximadamente 225 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 175 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 150 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 125 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 75 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 pocillos, de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 75 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 100 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 125 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 175 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 200 a aproximadamente 250 pocillos, o de aproximadamente 225 a aproximadamente 250 pocillos. Los expertos en la materia apreciarán que el número de pocillos puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 25-125. Además, cada pocillo puede comprender un grupo de cualquier número de agrupamientos, incluyendo, pero sin limitación, cualquier número entre aproximadamente 2 y aproximadamente 250 agrupamientos. En algunos ejemplos, un grupo comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 225 agrupamientos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 agrupamientos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 175 agrupamientos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 150 agrupamientos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 125 agrupamientos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 agrupamientos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 75 agrupamientos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 agrupamientos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 agrupamientos, de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 agrupamientos, de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 agrupamientos, de aproximadamente 75 a aproximadamente 250 agrupamientos, de aproximadamente 100 a aproximadamente 250 agrupamientos, de aproximadamente 125 a aproximadamente 250 agrupamientos, de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 agrupamientos, de aproximadamente 175 a aproximadamente 250 agrupamientos, de aproximadamente 200 a aproximadamente 250 agrupamientos, o de aproximadamente 225 a aproximadamente 250 agrupamientos. Los expertos en la materia apreciarán que el número de agrupamientos puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 25-125. A modo de ejemplo, cada uno de los 108 pocillos del sustrato que se muestra en la figura 25D, puede comprender un grupo de 109 agrupamientos que se muestran en la figura 25A, dando como resultado 11.772 agrupamientos presentes en la porción de sustrato sustancialmente plana del dispositivo microfluídico.

La figura 25D incluye un origen de referencia indicado por un eje 0,0 (X,Y), en donde se representa en diagrama la esquina inferior izquierda de una porción de sustrato sustancialmente plana ejemplar de un dispositivo microfluídico. En algunos ejemplos, la anchura del sustrato sustancialmente plano, representado como 2508, es de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 150 mm a lo largo de una dimensión, medida desde el origen. En algunos ejemplos, la anchura de un sustrato sustancialmente plano, representado como 2519, es de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 150 mm a lo largo de otra dimensión, medida desde el origen. En algunos ejemplos, la anchura de un sustrato en cualquier dimensión es de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 125 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 100 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 75 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 50 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 25 mm, de aproximadamente 25 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 50 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 75 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 100 mm a aproximadamente 150 mm, o de aproximadamente 125 mm a aproximadamente 150 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la anchura puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 25 - 100 mm. La porción de sustrato sustancialmente plana mostrada en la figura 25D comprende 108 grupos de agrupamientos. Los grupos pueden disponerse en cualquier configuración. En la figura 25D, los grupos están dispuestos en filas formando un cuadrado. Independientemente de la disposición, los grupos pueden comenzar a una distancia de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 149 mm desde el origen, medido en el eje X o Y. Las longitudes 2518 y 2509 representan las distancias más lejanas del centro de un grupo en los ejes X e Y, respectivamente. Las longitudes 2517 y 2512 representan las distancias más cercanas del centro de un grupo en los ejes X e Y, respectivamente. En algunos ejemplos, los grupos están dispuestos de modo que exista una distancia repetida entre dos grupos. Como se muestra

5 en 2507 y 2522, la distancia entre dos grupos puede ser de aproximadamente 0,3 mm a aproximadamente 9 mm. En algunos ejemplos, la distancia entre dos grupos es de aproximadamente o al menos de aproximadamente 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,4 mm, 1,6 mm, 1,8 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,4 mm, 2,6 mm, 2,8 mm, 3 mm, 3,2 mm, 3,4 mm, 3,6 mm, 3,8 mm, 4 mm, 4,2 mm, 4,4 mm, 4,6 mm, 4,8 mm, 5 mm, 5,2 mm, 5,4 mm, 5,6 mm, 5,8 mm, 6 mm, 6,2 mm, 6,4 mm, 6,6 mm, 6,8 mm, 7 mm, 7,2 mm, 7,4 mm, 7,6 mm, 7,8 mm, 8 mm, 8,2 mm, 8,4 mm, 8,6 mm, 8,8 mm o 9 mm. En algunos ejemplos, la distancia entre dos grupos es de aproximadamente o como máximo de aproximadamente 9 mm, 8,8 mm, 8,6 mm, 8,4 mm, 8,2 mm, 8 mm, 7,8 mm, 7,6 mm, 7,4 mm, 7,2 mm, 7 mm, 6,8 mm, 6,6 mm, 6,4 mm, 6,2 mm, 6 mm, 5,8 mm, 5,6 mm, 5,4 mm, 5,2 mm, 5 mm, 4,8 mm, 4,6 mm, 4,4 mm, 4,2 mm, 4 mm, 3,8 mm, 3,6 mm, 3,4 mm, 3,2 mm, 3 mm, 2,8 mm, 2,6 mm, 2,4 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,8 mm, 10 1,6 mm, 1,4 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm o 0,3 mm. La distancia entre dos grupos puede variar entre 0,3-9 mm, 0,4-8 mm, 0,5-7 mm, 0,6-6 mm, 0,7-5 mm, 0,7-4 mm, 0,8-3 mm o 0,9-2 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,8 mm - 2 mm.

15 Pueden colocarse marcas de referencia en los dispositivos microfluídicos descritos en el presente documento para facilitar el alineamiento de dichos dispositivos con otros componentes de un sistema. Los dispositivos microfluídicos de la divulgación pueden tener una o más marcas de referencia, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más marcas de referencia. La porción de sustrato sustancialmente plana de un dispositivo microfluídico ejemplar mostrado en la figura 25D comprende tres marcas de referencia útiles para alinear el dispositivo con otros componentes de un sistema.

20 Una marca de referencia puede localizarse en cualquier posición dentro de la porción de sustrato sustancialmente plana del dispositivo microfluídico. Como se muestra en 2513 y 2516, una marca de referencia puede localizarse cerca del origen, donde la marca de referencia está más cerca del origen que cualquier grupo. En algunos ejemplos, una marca de referencia se localiza cerca de un borde de la parte del sustrato, como se muestra en 2511 y 2521, donde la distancia desde el borde está indicada por 2510 y 2520, respectivamente. La marca de referencia se puede localizar a una distancia de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm desde el borde de la porción del sustrato.

25 En algunos ejemplos, la marca de referencia se localiza a una distancia de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,4 mm, 1,6 mm, 1,8 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,4 mm, 2,6 mm, 2,8 mm, 3 mm, 3,2 mm, 3,4 mm, 3,6 mm, 3,8 mm, 4 mm, 4,2 mm, 4,4 mm, 4,6 mm, 4,8 mm, 5 mm, 5,2 mm, 5,4 mm, 5,6 mm, 5,8 mm, 6 mm, 6,2 mm, 6,4 mm, 6,6 mm, 6,8 mm, 7 mm, 7,2 mm, 7,4 mm, 7,6 mm, 7,8 mm, 8 mm, 8,2 mm, 8,4 mm, 8,6 mm, 8,8 mm, 9 mm o 10 mm desde el borde de la porción del sustrato. En algunos ejemplos, la marca de referencia se localiza aproximadamente o como máximo aproximadamente a una distancia de 10 mm, 9 mm, 8,8 mm, 8,6 mm, 8,4 mm, 8,2 mm, 8 mm, 7,8 mm, 7,6 mm, 7,4 mm, 7,2 mm, 7 mm, 6,8 mm, 6,6 mm, 6,4 mm, 6,2 mm, 6 mm, 5,8 mm, 5,6 mm, 5,4 mm, 5,2 mm, 5 mm, 4,8 mm, 4,6 mm, 4,4 mm, 4,2 mm, 4 mm, 3,8 mm, 3,6 mm, 3,4 mm, 3,2 mm, 3 mm, 2,8 mm, 2,6 mm, 2,4 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,8 mm, 1,6 mm, 1,4 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm o 0,1 mm de la porción del sustrato. La marca de referencia puede localizarse entre 0,1-10 mm, 0,2-9 mm, 0,3-8 mm, 0,4-7 mm, 0,5-6 mm, 0,1-6 mm, 0,2-5 mm, 0,3-4 mm, 0,4-3 mm, o 0,5-2 mm desde el borde del sustrato. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,1 mm - 5 mm. La marca de referencia puede localizarse cerca de un grupo, donde las distancias ejemplares de los ejes X e Y están indicadas por 2515 y 2514, respectivamente. En algunos ejemplos, una distancia entre un grupo y una marca de referencia es de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,001 mm, 0,005 mm, 0,01 mm, 0,02 mm, 0,03 mm, 0,04 mm, 0,05 mm, 0,06 mm, 0,07 mm, 0,08 mm, 0,09 mm, 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,5 mm, 2,7 mm, 3 mm, 3,5 mm, 4 mm, 4,5 mm, 5 mm, 5,5 mm, 6 mm, 6,5 mm u 8 mm. En algunos ejemplos, una distancia entre un grupo y una marca de referencia es de aproximadamente o como máximo de aproximadamente 8 mm, 6,5 mm, 6 mm, 45 5,5 mm, 5 mm, 4,5 mm, 4 mm, 3,5 mm, 3 mm, 2,7 mm, 2,5 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,7 mm, 1,5 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm, 0,1 mm, 0,09 mm, 0,08 mm, 0,07 mm, 0,06 mm, 0,05 mm, 0,04 mm, 0,03 mm, 0,02 mm, 0,01 mm, 0,005 mm o 0,001 mm. La distancia entre un grupo y una marca de referencia puede estar en un intervalo entre 0,001-8 mm, 0,01-7 mm, 0,05-6 mm, 0,1-5 mm, 0,5-4 mm, 0,6-3 mm, 0,7-2 mm o 0,8-1,7 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,5-2 mm.

La figura 25E representa una sección transversal de la porción de sustrato sustancialmente plana de un dispositivo microfluídico ejemplar mostrado en la figura 25D. La sección muestra una fila de 11 agrupamientos, comprendiendo cada uno un grupo de agrupamientos, en donde cada agrupamiento comprende una pluralidad de segundos canales que se extienden desde un primer canal. Como se ejemplifica en 2523, la longitud total de un agrupamiento puede ser de aproximadamente 0,05 mm a aproximadamente 5 mm de longitud. En algunos ejemplos, la longitud total de un agrupamiento es aproximadamente o al menos aproximadamente 0,05 mm, 0,06 mm, 0,07 mm, 0,08 mm, 0,09 mm, 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,5 mm, 1,7 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,5 mm, 2,7 mm, 3 mm, 3,2 mm, 3,5 mm, 3,7 mm, 4 mm, 4,2 mm, 4,5 mm, 4,7 mm o 5 mm. En algunos ejemplos, la longitud total de un agrupamiento es de aproximadamente o como máximo de aproximadamente 5 mm, 4,7 mm, 4,5 mm, 4,2 mm, 4 mm, 3,7 mm, 3,5 mm, 3,2 mm, 3 mm, 2,7 mm, 2,5 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,7 mm, 1,5 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm, 0,1 mm, 0,09 mm, 0,08 mm, 0,07 mm, 0,06 mm o 0,05 mm o menos. La longitud total de un agrupamiento puede estar en un intervalo entre 0,05-5 mm, 0,06-4 mm, 0,07-3 mm, 0,08-2 mm, 0,09-1 mm, 0,1-0,9 mm, 0,2-0,8 mm o 0,3-0,7 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores,

por ejemplo 0,1-0,7 mm. En algunos ejemplos, el dispositivo microfluidoico puede tener una ubicaci3n para una etiqueta o una etiqueta de serie, como se ejemplifica en la figura 25F que representa un trazado ejemplar de grupos en un dispositivo microfluidoico. La etiqueta puede localizarse cerca de un borde del sustrato, ejemplificado por la distancia 2603. En algunos ejemplos, la etiqueta se localiza a una distancia de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm desde el borde del sustrato. En algunos ejemplos, la etiqueta se localiza a una distancia de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,4 mm, 1,6 mm, 1,8 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,4 mm, 2,6 mm, 2,8 mm, 3 mm, 3,2 mm, 3,4 mm, 3,6 mm, 3,8 mm, 4 mm, 4,2 mm, 4,4 mm, 4,6 mm, 4,8 mm, 5 mm, 5,2 mm, 5,4 mm, 5,6 mm, 5,8 mm, 6 mm, 6,2 mm, 6,4 mm, 6,6 mm, 6,8 mm, 7 mm, 7,2 mm, 7,4 mm, 7,6 mm, 7,8 mm, 8 mm, 8,2 mm, 8,4 mm, 8,6 mm, 8,8 mm, 9 mm o 10 mm desde el borde de un sustrato. En algunos ejemplos, la etiqueta se localiza a una distancia de aproximadamente o como m3ximo aproximadamente 10 mm, 9 mm, 8,8 mm, 8,6 mm, 8,4 mm, 8,2 mm, 8 mm, 7,8 mm, 7,6 mm, 7,4 mm, 7,2 mm, 7 mm, 6,8 mm, 6,6 mm, 6,4 mm, 6,2 mm, 6 mm, 5,8 mm, 5,6 mm, 5,4 mm, 5,2 mm, 5 mm, 4,8 mm, 4,6 mm, 4,4 mm, 4,2 mm, 4 mm, 3,8 mm, 3,6 mm, 3,4 mm, 3,2 mm, 3 mm, 2,8 mm, 2,6 mm, 2,4 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,8 mm, 1,6 mm, 1,4 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm o 0,1 mm desde el borde de un sustrato. La distancia puede estar en un intervalo entre 0,1-10 mm, 0,2-9 mm, 0,3-8 mm, 0,4-7 mm, 0,5-6 mm, 0,6-5 mm, 0,7-4 mm, 0,8-3 mm, 0,9-2 mm o 1,5 mm. Los expertos en la materia apreciar3n que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,5-2 mm. La etiqueta puede comenzar en una posici3n de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 20 mm desde el origen como se ejemplifica en 2602. La etiqueta puede tener una longitud de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 32 mm, como se ejemplifica en 2601.

### Obleas con v3as de gran tama1o para s3ntesis de oligonucle3tidos de alta masa

En algunos ejemplos, la divulgaci3n proporciona m3todos y sistemas para flujo controlado y rutas de transferencia de masa para la s3ntesis de oligonucle3tidos en una superficie. Las ventajas de los sistemas y m3todos proporcionados en el presente documento permiten niveles mejorados de estructura para la distribuci3n controlada y uniforme de las rutas de transferencia de masa, tiempos de exposici3n qu3mica y eficacia de lavado durante la s3ntesis de oligonucle3tidos. Adem3s, los m3todos y sistemas descritos en el presente documento permiten una mayor eficacia de barrido, por ejemplo, proporcionando un volumen suficiente para un oligonucle3tido en crecimiento, de modo que el volumen excluido por el oligonucle3tido en crecimiento no sea m3s del 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % o menos del volumen inicialmente disponible que est3 disponible o es adecuado para los oligonucle3tidos en crecimiento. Adem3s, Los m3todos y sistemas descritos en el presente documento permiten una estructura suficiente para el crecimiento de olig3meros de m3s de 80 unidades a 100, 120, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 unidades o m3s.

Por consiguiente, los m3todos y sistemas descritos en el presente documento proporcionan soluciones para conseguir estas ventajas, tales como colecciones de peque1os conductos paralelos. Se pueden utilizar estructuras, tales como peque1as v3as, para el suministro a estructuras m3s peque1as, tales como las que se encuentran en el "patr3n de rev3lver" (fig. 56B). Las estructuras que tienen una superficie de baja energ3a de superficie en la superficie interior pueden hacer que quede gas en las paredes. Las burbujas de gas pueden afectar negativamente a la velocidad de flujo y la uniformidad del flujo durante los ciclos de s3ntesis de oligonucle3tidos o las etapas acuosas posteriores utilizadas para el ensamblaje de genes. Por consiguiente, las estructuras que est3n adaptadas para la s3ntesis de oligonucle3tidos pueden comprender una superficie con energ3a de superficie aumentada como se describe en otras partes del presente documento.

En algunos ejemplos, los m3todos y sistemas de la divulgaci3n aprovechan procesos de obleas de silicio para fabricar sustratos para la s3ntesis de oligonucle3tidos. Dichos sustratos pueden tener una serie de sitios accesibles para la deposici3n de material a trav3s de un dispositivo de deposici3n tal como una inyecci3n de tinta. Los sustratos fabricados de acuerdo con los diversos ejemplos de la divulgaci3n pueden soportar etapas de qu3mica de inundaci3n que se comparten entre una pluralidad de tales sitios a trav3s de su plano. En diversos ejemplos, los dispositivos permiten inyectar y agrupar los reactivos acuosos en un gran relieve (figura 61).

En diversos ejemplos, tales dispositivos de s3ntesis de oligonucle3tidos con v3as grandes se crean en una oblea de silicio convencional de silicio sobre aislante (SOI). El dispositivo de s3ntesis de oligonucle3tidos puede tener una anchura total de al menos o al menos aproximadamente 10 micr3metros ( $\mu\text{m}$ ), 11  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 16  $\mu\text{m}$ , 17  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$ , 19  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 95  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 110  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{m}$ , 130  $\mu\text{m}$ , 140  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 170  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$ , 190  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 450  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 550  $\mu\text{m}$ , 600  $\mu\text{m}$ , 650  $\mu\text{m}$ , 700  $\mu\text{m}$ , 750  $\mu\text{m}$ , 800  $\mu\text{m}$ , 850  $\mu\text{m}$ , 900  $\mu\text{m}$ , 950  $\mu\text{m}$ , 1000  $\mu\text{m}$  o m3s. El dispositivo de s3ntesis de oligonucle3tidos puede tener una anchura total de como m3ximo o como m3ximo aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ , 900  $\mu\text{m}$ , 850  $\mu\text{m}$ , 750  $\mu\text{m}$ , 700  $\mu\text{m}$ , 650  $\mu\text{m}$ , 600  $\mu\text{m}$ , 550  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 450  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 190  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$ , 170  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 140  $\mu\text{m}$ , 130  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{m}$ , 110  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 95  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 19  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$ , 17  $\mu\text{m}$ , 16  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 11  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  o menos. El dispositivo de s3ntesis de oligonucle3tidos puede tener una anchura total de entre 10-1000  $\mu\text{m}$ , 11-950  $\mu\text{m}$ , 12-900  $\mu\text{m}$ , 13-850  $\mu\text{m}$ , 14-800  $\mu\text{m}$ , 15-750  $\mu\text{m}$ , 16-700  $\mu\text{m}$ , 17-650  $\mu\text{m}$ , 18-600  $\mu\text{m}$ , 19-550  $\mu\text{m}$ , 20-500  $\mu\text{m}$ , 25-450  $\mu\text{m}$ , 30-400  $\mu\text{m}$ , 35-350  $\mu\text{m}$ , 40-300  $\mu\text{m}$ , 45-250  $\mu\text{m}$ , 50-200  $\mu\text{m}$ , 55-150  $\mu\text{m}$ , 60-140  $\mu\text{m}$ , 65-130  $\mu\text{m}$ , 70-120  $\mu\text{m}$ ,

- 75-110  $\mu\text{m}$ , 70-100  $\mu\text{m}$ , 75-80  $\mu\text{m}$ , 85-90  $\mu\text{m}$  o 90-95  $\mu\text{m}$ . Los expertos en la materia apreciarán que la anchura total del dispositivo de síntesis de oligonucleótidos puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 20-80  $\mu\text{m}$ . la anchura total del dispositivo de oligonucleótidos puede estar dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo. Puede subdividirse en una capa de soporte y una capa de dispositivo. Todo el dispositivo o porciones del mismo se pueden cubrir con una capa de dióxido de silicio. La capa de dióxido de silicio puede tener un espesor de al menos o al menos aproximadamente 1 nm, 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 125 nm, 150 nm, 175 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, 1  $\mu\text{m}$ , 1,1  $\mu\text{m}$ , 1,2  $\mu\text{m}$ , 1,3  $\mu\text{m}$ , 1,4  $\mu\text{m}$ , 1,5  $\mu\text{m}$ , 1,6  $\mu\text{m}$ , 1,7  $\mu\text{m}$ , 1,8  $\mu\text{m}$ , 1,9  $\mu\text{m}$ , 2,0  $\mu\text{m}$  o más. La capa de dióxido de silicio puede tener un espesor de como máximo o como máximo aproximadamente 2,0  $\mu\text{m}$ , 1,9  $\mu\text{m}$ , 1,8  $\mu\text{m}$ , 1,7  $\mu\text{m}$ , 1,6  $\mu\text{m}$ , 1,5  $\mu\text{m}$ , 1,4  $\mu\text{m}$ , 1,3  $\mu\text{m}$ , 1,2  $\mu\text{m}$ , 1,1  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$ , 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm, 50 nm, 45 nm, 40 nm, 35 nm, 30 nm, 25 nm, 20 nm, 15 nm, 10 nm, 9 nm, 8 nm, 7 nm, 6 nm, 5 nm, 4 nm, 3 nm, 2 nm, 1 nm o menos. La capa de dióxido de silicio puede tener un espesor que está entre 1,0 nm -2,0  $\mu\text{m}$ , 1,1-1,9  $\mu\text{m}$ , 1,2-1,8 nm, 1,3-1,7  $\mu\text{m}$ , 1,4-1,6  $\mu\text{m}$ . Los expertos en la materia apreciarán que la capa de dióxido de silicio puede tener un espesor que está dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo (1,5-1,9  $\mu\text{m}$ ). El dióxido de silicio puede tener un espesor que está dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo.
- La capa de dispositivo puede comprender una pluralidad de estructuras adecuadas para el crecimiento de oligonucleótidos, como se describe en otras partes del presente documento, tales como una pluralidad de pequeños agujeros (figura 61). La capa de dispositivo puede tener un espesor de al menos o al menos aproximadamente 1 micrómetro ( $\mu\text{m}$ ), 2  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$ , 7  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$ , 9  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 11  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 16  $\mu\text{m}$ , 17  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$ , 19  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 95  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$  o más. La capa de dispositivo puede tener un espesor de como máximo o como máximo aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 95  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 19  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$ , 17  $\mu\text{m}$ , 16  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 11  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 9  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$ , 7  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  o menos. La capa del dispositivo puede tener un espesor de entre 1-100  $\mu\text{m}$ , 2-95  $\mu\text{m}$ , 3-90  $\mu\text{m}$ , 4-85  $\mu\text{m}$ , 5-80  $\mu\text{m}$ , 6-75  $\mu\text{m}$ , 7-70  $\mu\text{m}$ , 8-65  $\mu\text{m}$ , 9-60  $\mu\text{m}$ , 10-55  $\mu\text{m}$ , 11-50  $\mu\text{m}$ , 12-45  $\mu\text{m}$ , 13-40  $\mu\text{m}$ , 14-35  $\mu\text{m}$ , 15-30  $\mu\text{m}$ , 16-25  $\mu\text{m}$ , 17-20  $\mu\text{m}$ , 18-19  $\mu\text{m}$ . Los expertos en la materia apreciarán que el espesor de la capa de dispositivo puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo (20-60  $\mu\text{m}$ ). El espesor de la capa de dispositivo puede estar dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo. La capa de soporte y/o dispositivo pueden comprender características profundas. Tales características profundas pueden fabricarse utilizando una técnica MEMS adecuada, tal como el grabado iónico reactivo profundo. Para construir la geometría del dispositivo deseada puede usarse una serie de grabados. Se puede permitir que uno de los grabados dure más y penetre en la capa aislante. Por consiguiente, se pueden construir conductos que abarquen toda la anchura del dispositivo. Dichos conductos pueden usarse para hacer pasar fluido desde una superficie de un sustrato, tal como un sustrato sustancialmente plano, a otra.
- En algunos ejemplos, la capa de dispositivo tiene al menos dos y hasta 500 sitios, de al menos 2 a aproximadamente 250 sitios, de al menos 2 a aproximadamente 200 sitios, de al menos 2 a aproximadamente 175 sitios, de al menos 2 a aproximadamente 150 sitios, de al menos 2 a aproximadamente 125 sitios, de al menos 2 a aproximadamente 100 sitios, de al menos 2 a aproximadamente 75 sitios, de al menos 2 a aproximadamente 50 sitios, de al menos 2 a aproximadamente 25 sitios, o de al menos 2 a aproximadamente 250 sitios que atraviesan la capa de dispositivo. En algunos ejemplos, la capa del dispositivo tiene al menos o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500 o más sitios. Los expertos en la materia apreciarán que el número de sitios que atraviesan la capa de dispositivo puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 75-150 sitios. La capa de dispositivo puede tener al menos o al menos aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$ , 7  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$ , 9  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 11  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 16  $\mu\text{m}$ , 17  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$ , 19  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 95  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  de espesor o más. La capa de dispositivo puede ser como máximo o como máximo aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , 95  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 19  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$ , 17  $\mu\text{m}$ , 16  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 11  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 9  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$ , 7  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , de espesor, o menos. La capa de dispositivo puede tener cualquier espesor comprendido entre 1-100  $\mu\text{m}$ , 2-95  $\mu\text{m}$ , 3-90  $\mu\text{m}$ , 4-85  $\mu\text{m}$ , 5-80  $\mu\text{m}$ , 6-75  $\mu\text{m}$ , 7-70  $\mu\text{m}$ , 8-65  $\mu\text{m}$ , 9-60  $\mu\text{m}$ , 10-55  $\mu\text{m}$ , 11-50  $\mu\text{m}$ , 12-45  $\mu\text{m}$ , 13-40  $\mu\text{m}$ , 14-35  $\mu\text{m}$ , 15-30  $\mu\text{m}$ , 16-25  $\mu\text{m}$ , 17-20  $\mu\text{m}$ , 18-19  $\mu\text{m}$ . Los expertos en la materia apreciarán que la capa de dispositivo puede tener cualquier espesor que pueda estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores limitados por cualquiera de estos valores, por ejemplo, 4-100  $\mu\text{m}$ .
- El espesor de la capa de dispositivo puede estar dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo. La capa de soporte puede tener un área más grande grabada en la oblea que se encuentra junto a las características de la capa del dispositivo. La capa del soporte puede tener un espesor de al menos o al menos aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , 11  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 16  $\mu\text{m}$ , 17  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$ , 19  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 95  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 110  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{m}$ , 130  $\mu\text{m}$ , 140  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 170  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$ , 190  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 350

5  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 450  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 550  $\mu\text{m}$ , 600  $\mu\text{m}$ , 650  $\mu\text{m}$ , 700  $\mu\text{m}$ , 750  $\mu\text{m}$ , 800  $\mu\text{m}$ , 850  $\mu\text{m}$ , 900  $\mu\text{m}$ , 950  $\mu\text{m}$ , 1000  $\mu\text{m}$  o más. La capa de soporte puede tener un espesor de como máximo o como máximo aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ , 950  $\mu\text{m}$ , 900  $\mu\text{m}$ , 850  $\mu\text{m}$ , 800  $\mu\text{m}$ , 750  $\mu\text{m}$ , 700  $\mu\text{m}$ , 650  $\mu\text{m}$ , 600  $\mu\text{m}$ , 550  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 450  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 95  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 19  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$ , 17  $\mu\text{m}$ , 16  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 11  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 9  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$ , 7  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  o menos. La capa de soporte puede tener cualquier espesor que esté entre 10-1000  $\mu\text{m}$ , 11-950  $\mu\text{m}$ , 12-900  $\mu\text{m}$ , 13-850  $\mu\text{m}$ , 14-800  $\mu\text{m}$ , 15-750  $\mu\text{m}$ , 16-700  $\mu\text{m}$ , 17-650  $\mu\text{m}$ , 18-600  $\mu\text{m}$ , 19-550  $\mu\text{m}$ , 20-500  $\mu\text{m}$ , 25-450  $\mu\text{m}$ , 30-400  $\mu\text{m}$ , 35-350  $\mu\text{m}$ , 40-300  $\mu\text{m}$ , 45-250  $\mu\text{m}$ , 50-200  $\mu\text{m}$ , 55-150  $\mu\text{m}$ , 60-140  $\mu\text{m}$ , 65-130  $\mu\text{m}$ , 70-120  $\mu\text{m}$ , 75-110  $\mu\text{m}$ , 70-100  $\mu\text{m}$ , 75-80  $\mu\text{m}$ , 85-90  $\mu\text{m}$  o 90-95  $\mu\text{m}$ . Los expertos en la materia apreciarán que la capa de soporte puede tener un espesor que esté dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 20-350  $\mu\text{m}$ . El espesor de la capa de soporte está dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo

15 Las regiones grabadas en la capa de soporte pueden formar estructuras parecidas a pocillos incluidas en el sustrato. En algunos ejemplos, las regiones grabadas dentro de la capa de soporte pueden tener un espesor de al menos o aproximadamente al menos 100  $\mu\text{m}$ , 101  $\mu\text{m}$ , 102  $\mu\text{m}$ , 103  $\mu\text{m}$ , 104  $\mu\text{m}$ , 105  $\mu\text{m}$ , 106  $\mu\text{m}$ , 107  $\mu\text{m}$ , 108  $\mu\text{m}$ , 109  $\mu\text{m}$ , 110  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{m}$ , 130  $\mu\text{m}$ , 140  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 170  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$ , 190  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 450  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 550  $\mu\text{m}$ , 600  $\mu\text{m}$ , 650  $\mu\text{m}$ , 700  $\mu\text{m}$ , 750  $\mu\text{m}$ , 800  $\mu\text{m}$ , 850  $\mu\text{m}$ , 900  $\mu\text{m}$ , 950  $\mu\text{m}$  o 1000  $\mu\text{m}$ , o más. La región grabada dentro de la capa de soporte puede tener cualquier espesor de como máximo o aproximadamente como máximo 1000  $\mu\text{m}$ , 950  $\mu\text{m}$ , 900  $\mu\text{m}$ , 850  $\mu\text{m}$ , 800  $\mu\text{m}$ , 750  $\mu\text{m}$ , 700  $\mu\text{m}$ , 650  $\mu\text{m}$ , 600  $\mu\text{m}$ , 550  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 450  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 190  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$ , 170  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 140  $\mu\text{m}$ , 130  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{m}$ , 110  $\mu\text{m}$ , 109  $\mu\text{m}$ , 108  $\mu\text{m}$ , 107  $\mu\text{m}$ , 106  $\mu\text{m}$ , 105  $\mu\text{m}$ , 104  $\mu\text{m}$ , 103  $\mu\text{m}$ , 102  $\mu\text{m}$ , 101  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  o menos. La región grabada dentro de la capa de soporte puede tener cualquier espesor que esté entre 100-1000  $\mu\text{m}$ , 101-950  $\mu\text{m}$ , 102-900  $\mu\text{m}$ , 103-850  $\mu\text{m}$ , 104-800  $\mu\text{m}$ , 105-750  $\mu\text{m}$ , 106-700  $\mu\text{m}$ , 105-650  $\mu\text{m}$ , 106-600  $\mu\text{m}$ , 107-550  $\mu\text{m}$ , 108-500  $\mu\text{m}$ , 109-450  $\mu\text{m}$ , 110-400  $\mu\text{m}$ , 120-350  $\mu\text{m}$ , 130-300  $\mu\text{m}$ , 140-250  $\mu\text{m}$ , 150-200  $\mu\text{m}$ , 160-190  $\mu\text{m}$ , 170-180  $\mu\text{m}$ . Los expertos en la materia apreciarán que la capa de soporte puede tener un espesor que esté dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 200-300  $\mu\text{m}$ .

30 La forma de las regiones grabadas dentro de la capa de soporte puede ser rectangular o curvilínea.

En algunos ejemplos, las grandes regiones grabadas dentro de la capa de soporte permiten una fácil transición de una fase gaseosa a una fase líquida durante el ciclo de síntesis de oligonucleótidos y/o durante la liberación de oligonucleótidos, tal como la liberación de oligonucleótidos en fase gaseosa.

### 35 **Sustratos con sitios de síntesis de alta área de superficie**

En diversos ejemplos, los métodos y sistemas descritos en el presente documento se refieren a dispositivos de síntesis de oligonucleótidos para la síntesis de grandes masas de oligonucleótidos. La síntesis puede realizarse en paralelo. Por ejemplo, pueden sintetizarse en paralelo al menos o aproximadamente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 1000, 10000, 50000, 100000 o más oligonucleótidos. El número total de oligonucleótidos que se pueden sintetizar en paralelo puede estar entre 2-100000, 3-50000, 4-10000, 5-1000, 6-900, 7-850, 8-800, 9-750, 10-700, 11 -650, 12-600, 13-550, 14-500, 15-450, 16-400, 17-350, 18-300, 19-250, 20-200, 21-150, 22-100, 23-50, 24-45, 25-40, 30-35. Los expertos en la materia apreciarán que el número total de oligonucleótidos sintetizados en paralelo puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 25-100. El número total de oligonucleótidos sintetizados en paralelo puede estar dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo. La masa molar total de oligonucleótidos sintetizados dentro del dispositivo o la masa molar de cada uno de los oligonucleótidos puede ser al menos o al menos de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 25000, 50000, 75000, 100000 picomoles o más. La longitud de cada uno de los oligonucleótidos o la longitud media de los oligonucleótidos dentro del dispositivo puede ser al menos o aproximadamente al menos de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 nucleótidos o más. La longitud de cada uno de los oligonucleótidos o la longitud media de los oligonucleótidos dentro del dispositivo puede ser como máximo o aproximadamente como máximo de 500, 400, 300, 200, 150, 100, 50, 45, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 nucleótidos o menos. La longitud de cada uno de los oligonucleótidos o la longitud media de los oligonucleótidos dentro del dispositivo puede estar entre 10-500, 9-400, 11-300, 12-200, 13-150, 14-100, 15-50, 16-45, 17-40, 18-35, 19-25. Los expertos en la materia apreciarán que la longitud de cada uno de los oligonucleótidos o la longitud media de los oligonucleótidos dentro del dispositivo puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 100-300. La longitud de cada uno de los oligonucleótidos o la longitud media de los oligonucleótidos dentro del dispositivo puede estar dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo.

65 En diversos ejemplos, Las altas áreas de superficie se consiguen estructurando la superficie de un sustrato con características elevadas y/o rebajadas como se ejemplifica en la figura 62. Las características elevadas o rebajadas pueden tener bordes afilados o redondeados y pueden tener secciones transversales (anchuras) de cualquier forma geométrica deseada, tal como rectangular, circular, etc. Pueden formar canales a lo largo de toda la superficie del

sustrato o una porción del mismo. Las características elevadas o rebajadas pueden tener una relación de aspecto de al menos o aproximadamente al menos 1:20, 2:20, 3:20, 4:20, 5:20, 6:20, 10:20, 15:20, 20:20, 20:10, 20:5, 20:1 o más. Las características elevadas o rebajadas pueden tener una relación de aspecto de como máximo o aproximadamente como máximo 20:1, 20:5, 20:10, 20:20, 20:15, 20:10, 20:10, 6:20, 5:20, 4:20, 3:20, 2:20, 1:20 o menos. Las características elevadas o rebajadas pueden tener una relación de aspecto que está entre 1:20-20:1, 2:20-20:5, 3:20-20:10, 4:20-20:15, 5:20-20:20, 6:20-20:20. Los expertos en la materia apreciarán que las características elevadas o rebajadas pueden tener una relación de aspecto que puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 3:20-4:20. Las características elevadas o rebajadas pueden tener una relación de aspecto que esté dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo.

Las características elevadas o rebajadas pueden tener secciones transversales de al menos o aproximadamente al menos 10 nanómetros (nm), 11 nm, 12 nm, 20 nm, 30 nm, 100 nm, 500 nm, 1000 nm, 10000 nm, 100000 nm, 1000000 nm o más. Las características elevadas o rebajadas pueden tener secciones transversales de como máximo o aproximadamente como máximo 1000000 nm, 100000 nm, 10000 nm, 1000 nm, 500 nm, 100 nm, 30 nm, 20 nm, 12 nm, 11 nm, 10 nm o menos. Las características elevadas o rebajadas pueden tener secciones transversales que están entre 10 nm-1000000 nm, 11 nm-100000 nm, 12 nm-10000 nm, 20 nm-1000 nm, 30 nm-500 nm. Los expertos en la materia apreciarán que las características elevadas o rebajadas pueden tener secciones transversales que pueden estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 10 nm-100 nm. Las características elevadas o rebajadas pueden tener secciones transversales que están dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo.

Las características elevadas o rebajadas pueden tener alturas de al menos o aproximadamente al menos 10 nanómetros (nm), 11 nm, 12 nm, 20 nm, 30 nm, 100 nm, 500 nm, 1000 nm, 10000 nm, 100000 nm, 1000000 nm o más. Las características elevadas o rebajadas pueden tener alturas de como máximo o aproximadamente como máximo 1000000 nanómetros (nm), 100000 nm, 10000 nm, 1000 nm, 500 nm, 100 nm, 30 nm, 20 nm, 12 nm, 11 nm, 10 nm o menos. Las características elevadas o rebajadas pueden tener alturas que varían entre 10 nm-1000000 nm, 11 nm-100000 nm, 12 nm-10000 nm, 20 nm-1000 nm, 30 nm-500 nm. Los expertos en la materia apreciarán que las características elevadas o rebajadas pueden tener alturas que pueden estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 100 nm-1000 nm. Las características elevadas o rebajadas pueden tener alturas que están dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo. Las características elevadas o rebajadas individuales pueden estar separadas de una característica elevada o rebajada vecina por una distancia de al menos o al menos aproximadamente 5 nanómetros (nm), 10 nm, 11 nm, 12 nm, 20 nm, 30 nm, 100 nm, 500 nm, 1000 nm, 10000 nm, 100000 nm, 1000000 nm o más. Las características elevadas o rebajadas individuales pueden estar separadas de una característica elevada o rebajada vecina por una distancia de como máximo o aproximadamente como máximo 1000000 nanómetros (nm), 100000 nm, 10000 nm, 1000 nm, 500 nm, 100 nm, 30 nm, 20 nm, 12 nm, 11 nm, 10 nm, 5 nm o menos. Las características elevadas o rebajadas pueden tener alturas que están entre 5 - 1000000 nm, 10 - 100000 nm, 11 - 10000 nm, 12 - 1000 nm, 20 - 500 nm, 30 - 100 nm. Los expertos en la materia apreciarán que las características elevadas o rebajadas individuales pueden estar separadas de una característica elevada o rebajada vecina por una distancia que puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 100 -1000 nm. Las características elevadas o rebajadas individuales pueden estar separadas de una característica elevada o rebajada vecina por una distancia que está dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo. En algunos ejemplos, la distancia entre dos características elevadas o rebajadas es al menos o aproximadamente al menos 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 veces o más, la sección transversal (anchura) o sección transversal promedio de las características elevadas o rebajadas. La distancia entre las dos características elevadas o rebajadas es como máximo o aproximadamente como máximo 10,0, 5,0, 3,0, 2,0, 1,0, 0,5, 0,2, 0,1 veces o menos, la sección transversal (anchura) o sección transversal promedio de las características elevadas o rebajadas. La distancia entre las dos características elevadas o rebajadas puede estar entre 0,1-10, 0,2-5,0, 1,0-3,0 veces, la sección transversal (anchura) o sección transversal promedio de las características elevadas o rebajadas. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia entre las dos características elevadas o rebajadas puede estar entre cualquier número de veces la sección transversal (anchura) o la sección transversal promedio de las características elevadas o rebajadas dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 5-10 veces. La distancia entre las dos características elevadas o rebajadas puede estar dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo.

En algunos ejemplos, los grupos de características elevadas o rebajadas están separados entre sí. Los perímetros de grupos de características elevadas o rebajadas pueden estar marcados por un tipo diferente de característica estructural o por funcionalización diferencial. Un grupo de características elevadas o rebajadas puede dedicarse a la síntesis de un único oligonucleótido. Un grupo de características elevadas o rebajadas puede abarcar un área de al menos o aproximadamente al menos 10  $\mu\text{m}$ , 11  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  o más de anchura en sección transversal. Un grupo de características elevadas o rebajadas puede abarcar un área de como máximo o aproximadamente como máximo 200  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 11  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  o menos en sección transversal. Un grupo de características elevadas o rebajadas puede abarcar un área de entre 10 - 200  $\mu\text{m}$ , 11 - 150  $\mu\text{m}$ , 12 - 100  $\mu\text{m}$ , 13 - 90  $\mu\text{m}$ , 14 - 70  $\mu\text{m}$ , 15 - 50  $\mu\text{m}$ , 13 - 20  $\mu\text{m}$ , de anchura en sección transversal. Los expertos en la materia apreciarán que un grupo de

características elevadas o rebajadas puede abarcar un área que está dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 12 - 200  $\mu\text{m}$ . Un grupo de características elevadas o rebajadas puede abarcar un área que está dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo.

5 En diversos ejemplos, las características elevadas o rebajadas en un sustrato aumentan el área total disponible para la síntesis de oligonucleótidos al menos o al menos aproximadamente 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 veces o más. Las características elevadas o rebajadas en un sustrato aumentan el área total disponible para la síntesis de oligonucleótidos entre 1,1-1000, 1,2-500, 1,3-200, 1,4-100, 2-50, 5-10, veces. Los expertos en la materia  
10 apreciarán que las características elevadas o rebajadas en un sustrato pueden aumentar el área total disponible para la síntesis de oligonucleótidos entre cualquier límite de veces por cualquiera de estos valores, por ejemplo, 20-80 veces. Las características elevadas o rebajadas en un sustrato aumentan el área total disponible para la síntesis de oligonucleótidos en un factor que puede estar dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo.

15 Los métodos y sistemas de la divulgación que utilizan grandes superficies de síntesis de oligonucleótidos permiten la síntesis en paralelo de varios oligonucleótidos con tiempos de ciclos de adición de nucleótidos de como máximo o aproximadamente como máximo 20 min, 15 min, 14 min, 13 min, 12 min, 11 min, 10 min, 1 min, 40 segundos, 30 segundos o menos. Los métodos y sistemas de la divulgación que utilizan grandes superficies de síntesis de oligonucleótidos permiten la síntesis en paralelo de varios oligonucleótidos con ciclos de adición de nucleótidos entre  
20 30 segundos-20 minutos, 40 segundos-10 minutos, 1 minuto-10 minutos. Los expertos en la materia apreciarán que los métodos y sistemas de la divulgación que utilizan grandes superficies de síntesis de oligonucleótidos permiten la síntesis en paralelo de varios oligonucleótidos con tiempos de ciclos de adición de nucleótidos entre cualquiera de estos valores, por ejemplo 30 segundos-10 minutos. Los métodos y sistemas de la divulgación que utilizan grandes superficies de síntesis de oligonucleótidos permiten la síntesis en paralelo de varios oligonucleótidos con tiempos de ciclos de adición de nucleótidos que pueden estar entre cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo.

30 La tasa de error o las tasas de error generales para tipos individuales de errores tales como deleciones, inserciones o sustituciones para cada oligonucleótido sintetizado en el sustrato, para al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más de los oligonucleótidos sintetizados en el sustrato, o para el sustrato promedio, pueden ser como máximo o como máximo de aproximadamente 1:100, 1:500, 1:1000, 1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:40000, 1:50000, 1:60000, 1:70000, 1:80000, 1:90000, 1:100000 o menos. La tasa de error o las tasas de error generales para tipos individuales de errores tales como deleciones, inserciones o sustituciones para cada oligonucleótido sintetizado en el sustrato, para al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, El 99,5 % o más de los oligonucleótidos sintetizados en el sustrato, o sustrato promedio, puede estar entre 1:100 y 1:10000, 1:500 y 1:30000. Los expertos en la materia, apreciarán que la tasa de error o las tasas de error generales para tipos individuales de errores tales como deleciones, inserciones o sustituciones para cada oligonucleótido sintetizado en el sustrato, para al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más de los oligonucleótidos sintetizados en el sustrato, o el sustrato promedio, puede estar entre cualquiera de estos valores, por ejemplo 1:500 y 1:10000. La tasa de error o las tasas de error generales para tipos individuales de errores tales como deleciones, inserciones o sustituciones para cada oligonucleótido sintetizado en el sustrato, para al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, El 99,5 % o más de los oligonucleótidos sintetizados en el sustrato, o sustrato promedio, puede estar entre cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo.

Pueden emplearse procesos de obleas de silicio convencionales para crear un sustrato que tenga un alta área de superficie como se ha descrito anteriormente y un flujo controlado, que permitan un rápido intercambio de exposición química. El sustrato de síntesis de oligonucleótidos se puede crear con una serie de estructuras con suficiente separación para permitir la síntesis de cadenas de oligómeros mayores de al menos o aproximadamente al menos 20 unidades, 25 unidades, 30 unidades, 50 unidades, 100 unidades, 200 unidades, 250 unidades, 300 unidades, 400 unidades, 500 unidades o más sin influencia sustancial sobre la dimensión general de los canales o poros, por ejemplo, debido a efectos de volumen excluido, a medida que crece el oligonucleótido. El sustrato de síntesis de oligonucleótidos se puede crear con una serie de estructuras con suficiente separación para permitir la síntesis de cadenas de oligómeros mayores de como máximo o aproximadamente como máximo 500 unidades, 200 unidades, 100 unidades, 50 unidades, 30 unidades, 25 unidades, 20 unidades, o menos sin influencia sustancial sobre la dimensión general de los canales o los poros, por ejemplo, debido a efectos de volumen excluido, a medida que crece el oligonucleótido. El sustrato de síntesis de oligonucleótidos se puede crear con una serie de estructuras con suficiente separación para permitir la síntesis de cadenas de oligómeros que sean al menos o al menos de aproximadamente  
60 20 unidades, 50 unidades, 75 unidades, 100 unidades, 125 unidades, 150 unidades, 175 unidades, 200 unidades, 250 unidades, 300 unidades, 350 unidades, 400 unidades, 500 unidades o más sin una influencia sustancial sobre la dimensión general de los canales o poros, por ejemplo, debido a efectos de volumen excluido, a medida que crece el oligonucleótido. Los expertos en la materia apreciarán que el sustrato de síntesis de oligonucleótidos se puede crear con una serie de estructuras con suficiente separación para permitir la síntesis de cadenas de oligómeros mayores que entre cualquiera de estos valores, por ejemplo, 20-300 unidades o 200 unidades sin influencia sustancial sobre la dimensión general de los canales o poros, por ejemplo, debido a efectos de volumen excluido, a medida que crece el

oligonucleótido.

La figura 62 muestra un sustrato ejemplar de acuerdo con los ejemplos de la divulgación con una matriz de estructuras. La distancia entre las características puede ser mayor que al menos o aproximadamente al menos 5 nm, 10 nm, 20 nm, 100 nm, 1000 nm, 10000 nm, 100000 nm, 1000000 nm o más. La distancia entre las características puede ser mayor de como máximo o aproximadamente como máximo 1000000 nm, 100000 nm, 10000 nm, 1000 nm, 100 nm, 20 nm, 10 nm, 5 nm o menos. La distancia entre las características puede estar entre 5-1000000 nm, 10-100000 nm, 20-10000 nm, 100-1000 nm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia entre las características puede estar entre cualquiera de estos valores, por ejemplo, 20-1000 nm. La distancia entre las características puede estar entre cualquier intervalo definido por cualquiera de los valores que sirven como puntos finales del intervalo. En un ejemplo, la distancia entre las características es superior a 200 nm. Las características pueden crearse mediante cualquier proceso MEMS adecuado descrito en otras partes del presente documento o conocido en la técnica, tal como un proceso que emplea un proceso de grabado iónico reactivo cronometrado. Dichos procesos de fabricación de semiconductores normalmente pueden crear tamaños de características inferiores a 200 nm, 100 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, 25 nm, 20 nm, 10 nm, 5 nm o menos. Los expertos en la materia apreciarán que el tamaño de la característica menor de 200 nm puede estar entre cualquiera de estos valores, por ejemplo, 20-100 nm. El tamaño de la característica puede estar dentro de cualquier intervalo definido por cualquiera de estos valores que sirven como puntos finales del intervalo. En un ejemplo, se graban una serie de postes de 40  $\mu\text{m}$  de anchura con 30  $\mu\text{m}$  de profundidad, lo que aumenta a aproximadamente el doble la superficie disponible para síntesis.

Las matrices de características elevadas o rebajadas pueden segregarse permitiendo la deposición de material de una química de fosforamida para la generación de bibliotecas densa y altamente compleja. La segregación se puede conseguir mediante estructuras más grandes o mediante funcionalización diferencial de la superficie generando regiones activas y pasivas para la síntesis de oligonucleótidos. Como alternativa, las localizaciones para la síntesis de oligonucleótidos individuales pueden separarse entre sí creando regiones de uniones de oligonucleótidos escindibles y no escindibles a la superficie en determinadas condiciones. Puede usarse un dispositivo, tal como una impresora de inyección de tinta, para depositar reactivos en las ubicaciones de síntesis de oligonucleótidos individuales. La funcionalización diferencial también puede conseguir alternar la hidrofobicidad a través de la superficie del sustrato, creando de ese modo efectos de ángulo de contacto con el agua que pueden provocar la formación de cuentas o humectación de los reactivos depositados. El empleo de estructuras más grandes puede disminuir las salpicaduras y la contaminación cruzada de las localizaciones de síntesis de oligonucleótidos individuales con reactivos de los puntos vecinos.

## Reactores

En otro aspecto, en el presente documento se describe una matriz de recintos. La matriz de recintos puede comprender una pluralidad de reactores resueltos que comprenden un primer sustrato y un segundo sustrato que comprenden tapas de reactor. En algunos casos, en cada reactor están contenidos al menos dos loci resueltos. Los reactores resueltos pueden separarse con un sello liberable. Las tapas de reactor pueden retener el contenido de los reactores tras la liberación del segundo sustrato del primer sustrato. La pluralidad de reactores resueltos puede tener cualquier densidad adecuada a una densidad de al menos 1 por  $\text{mm}^2$ . La pluralidad de tapas de reactor se puede recubrir con un resto. El resto puede ser un resto químicamente inerte o químicamente activo. El resto que recubre las tapas de reactor puede ser un resto que pueda minimizar la unión de los oligonucleótidos. Los tipos de restos químicos se describen con más detalle en otras partes del presente documento.

En algunos ejemplos, las tapas de reactor descritas en el presente documento pueden referirse a recintos con una parte superior abierta en la superficie de un sustrato de elemento de tapado. Por ejemplo, las tapas de reactor pueden parecerse a cilindros que sobresalen de la superficie del sustrato. El diámetro interno de las tapas de reactor puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente o menos de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 115, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500  $\mu\text{m}$ . El diámetro externo de las tapas de reactor puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente o menos de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 115, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 600  $\mu\text{m}$ . El borde del cilindro puede tener una anchura de aproximadamente, al menos aproximadamente, o menos de aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300 o 400  $\mu\text{m}$ . La altura de la protección de reactor medida en el interior puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente o menos de aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100  $\mu\text{m}$ . La figura 7 ilustra un ejemplo ilustrativo de tapas de reactor sobre un elemento de tapado.

Todas o parte de las superficies de las tapas de reactor, tal como la superficie del borde, pueden modificarse usando métodos de modificación de superficie adecuados descritos con más detalle en otras partes del presente documento y conocidos de otro modo en la técnica. En algunos casos, se diseñan irregularidades de la superficie. Las modificaciones químicas de la superficie y las irregularidades pueden servir para ajustar el ángulo de contacto con el agua del borde. También se pueden aplicar tratamientos de superficie similares sobre la superficie de un sustrato que se acerca a las tapas de reactor formando un sello, por ejemplo, un sello reversible. Se puede utilizar una válvula de

expansión capilar entre las dos superficies como se describe con más detalle en otras partes del presente documento. Los tratamientos de superficies pueden ser útiles en el control preciso de tales sellados comprendiendo válvulas de expansión capilar.

5 Las tapas de reactor comprendidas en un sustrato pueden tener cualquier forma o diseño conocido en la técnica. La protección de reactor puede contener un volumen de cavidad que es capaz de encerrar el contenido de los reactores. El contenido de los reactores puede proceder de una pluralidad de loci resueltos en un sustrato adyacente. La protección de reactor puede ser de forma circular, elíptica, rectangular o irregular. La protección de reactor puede tener esquinas afiladas. En algunos casos, la protección de reactor puede tener esquinas redondeadas para minimizar la  
10 retención de cualquier burbuja de aire y facilitar una mejor mezcla del contenido de los reactores. La tapa del reactor se puede fabricar en cualquier forma, organización o diseño que permita la transferencia o mezcla controlada del contenido de los reactores. El protector de reactor puede tener un diseño similar al de los lugares resueltos sobre el sustrato como se describe en la presente solicitud. En algunos ejemplos, las tapas de reactor pueden tener una forma que permita que el líquido fluya fácilmente sin crear burbujas de aire. En algunos ejemplos, las tapas de reactor pueden tener forma circular, con un diámetro que puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente, o menos de  
15 aproximadamente 1 micrómetro ( $\mu\text{m}$ ), 2  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$ , 7  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$ , 9  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 11  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 16  $\mu\text{m}$ , 17  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$ , 19  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 95  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 110  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{m}$ , 130  $\mu\text{m}$ , 140  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 170  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$ , 190  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 450  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 550  $\mu\text{m}$ , 600  $\mu\text{m}$ , 650  $\mu\text{m}$ , 700  $\mu\text{m}$  o 750  $\mu\text{m}$ . Las tapas de reactor pueden tener una distribución de tamaño monodispersa, es decir, todas las microestructuras pueden tener aproximadamente la misma anchura, altura y/o longitud. Como alternativa, las tapas de reactor pueden tener un número limitado de formas y/o tamaños, por ejemplo, las tapas de reactor se pueden representar en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 o más formas distintas, teniendo cada una un tamaño monodisperso. En algunos ejemplos, la misma forma se puede repetir en múltiples distribuciones de tamaño monodispersas, por  
20 ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 o más distribuciones de tamaño monodispersas. Una distribución monodispersa puede reflejarse en una distribución unimodular con una desviación típica de menos del 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,001 % del modo, o menor.

Cada una de las tapas de reactor puede tener cualquier área adecuada para llevar a cabo las reacciones de acuerdo con diversos ejemplos de la divulgación descrita en el presente documento. En algunos casos, la pluralidad de tapas de reactor puede ocupar cualquier porcentaje adecuado del área de superficie total del sustrato. En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor puede ocupar aproximadamente, al menos aproximadamente, o menos de aproximadamente el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la superficie del sustrato. En algunos ejemplos, las tapas de reactor pueden ocupar aproximadamente, al menos aproximadamente, o menos de aproximadamente 0,1 mm<sup>2</sup>, 0,15 mm<sup>2</sup>, 0,2 mm<sup>2</sup>, 0,25 mm<sup>2</sup>, 0,3 mm<sup>2</sup>, 0,35 mm<sup>2</sup>, 0,4 mm<sup>2</sup>, 0,45 mm<sup>2</sup>, 0,5 mm<sup>2</sup>, 0,55 mm<sup>2</sup>, 0,6 mm<sup>2</sup>, 0,65 mm<sup>2</sup>, 0,7 mm<sup>2</sup>, 0,75 mm<sup>2</sup>, 0,8 mm<sup>2</sup>, 0,85 mm<sup>2</sup>, 0,9 mm<sup>2</sup>, 0,95 mm<sup>2</sup>, 1 mm<sup>2</sup>, 2 mm<sup>2</sup>, 3 mm<sup>2</sup>, 4 mm<sup>2</sup>, 5 mm<sup>2</sup>, 6 mm<sup>2</sup>, 7 mm<sup>2</sup>, 8 mm<sup>2</sup>, 9 mm<sup>2</sup>, 10 mm<sup>2</sup>, 11 mm<sup>2</sup>, 12 mm<sup>2</sup>, 13 mm<sup>2</sup>, 14 mm<sup>2</sup>, 15 mm<sup>2</sup>, 16 mm<sup>2</sup>, 17 mm<sup>2</sup>, 18 mm<sup>2</sup>, 19 mm<sup>2</sup>, 20 mm<sup>2</sup>, 25 mm<sup>2</sup>, 30 mm<sup>2</sup>, 35 mm<sup>2</sup>, 40 mm<sup>2</sup>, 50 mm<sup>2</sup>, 75 mm<sup>2</sup>,  
30 100 mm<sup>2</sup>, 200 mm<sup>2</sup>, 300 mm<sup>2</sup>, 400 mm<sup>2</sup>, 500 mm<sup>2</sup>, 600 mm<sup>2</sup>, 700 mm<sup>2</sup>, 800 mm<sup>2</sup>, 900 mm<sup>2</sup>, 1000 mm<sup>2</sup>, 1500 mm<sup>2</sup>, 2000 mm<sup>2</sup>, 3000 mm<sup>2</sup>, 4000 mm<sup>2</sup>, 5000 mm<sup>2</sup>, 7500 mm<sup>2</sup>, 10000 mm<sup>2</sup>, 15000 mm<sup>2</sup>, 20000 mm<sup>2</sup>, 25000 mm<sup>2</sup>, 30000 mm<sup>2</sup>, 35000 mm<sup>2</sup>, 40000 mm<sup>2</sup>, 50000 mm<sup>2</sup>, 60000 mm<sup>2</sup>, 70000 mm<sup>2</sup>, 80000 mm<sup>2</sup>, 90000 mm<sup>2</sup>, 100000 mm<sup>2</sup>, 200000 mm<sup>2</sup>, 300000 mm<sup>2</sup> del área total, o más. Los reactores resueltos, los loci resueltos y las tapas de reactor pueden tener cualquier densidad. En algunos ejemplos, la superficie puede tener una densidad de reactores resueltos, loci resueltos o tapas de reactor de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000, aproximadamente 5000, aproximadamente 6000, aproximadamente 7000, aproximadamente 8000, aproximadamente 9000, aproximadamente 10000, aproximadamente 20000, aproximadamente 40000, aproximadamente 60000, aproximadamente 80000, aproximadamente 100000, o aproximadamente 500000 sitios por 1 mm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, la superficie tiene una densidad de reactores resueltos, loci resueltos o tapas de reactor de al menos aproximadamente 50, al menos 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 1500, al menos aproximadamente 2000, al menos aproximadamente 3000, al menos aproximadamente 4000, al menos aproximadamente 5000, al menos aproximadamente 6000, al menos aproximadamente 7000, al menos aproximadamente 8000, al menos aproximadamente 9000, al menos aproximadamente 10000, al menos aproximadamente 20000, al menos aproximadamente 40000, al menos aproximadamente 60000, al menos aproximadamente 80000, al menos aproximadamente 100000, o al menos aproximadamente 500000 sitios por 1 mm<sup>2</sup>.  
45 50 55 60 65

Teniendo en cuenta la densidad de los loci resueltos en una superficie de sustrato adyacente, la densidad, la

distribución y la forma de las tapas de reactor se pueden diseñar en consecuencia para configurarse para alinearse con un número preferido de loci resueltos en cada reactor. Cada uno de la pluralidad de reactores resueltos puede comprender varios loci resueltos. Por ejemplo, sin limitación, cada reactor puede comprender aproximadamente, al menos aproximadamente, menos de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 loci resueltos. En algunos casos, cada reactor puede comprender al menos 100 loci resueltos.

Comprendidos dentro de la matriz de la pluralidad de recintos, los loci resueltos o tapas de reactor pueden residir en microestructuras que se fabrican en una superficie de soporte. Las microestructuras se pueden fabricar mediante cualquier método conocido en la técnica, como se describe en otros párrafos del presente documento. Las microestructuras pueden ser microcanales o micropocillos que tienen cualquier forma y diseño en 2D o 3D. Las microestructuras (por ejemplo, microcanales o micropocillos) pueden comprender al menos dos canales en comunicación fluidica entre sí. Por ejemplo, los microcanales se pueden interconectar, permitiendo que el líquido se perfunda en condiciones determinadas, tales como succión al vacío. Las microestructuras individuales pueden direccionarse y resolverse individualmente, de manera que el contenido de dos loci resueltos se mantenga sin mezclar. Los microcanales pueden comprender al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 canales en comunicaciones fluidicas en cualquier combinación, permitiendo una mezcla, comunicación o distribución del fluido controladas. La conectividad de los microcanales se puede controlar mediante sistemas de válvulas que son conocidos en la técnica del diseño microfluidico. Por ejemplo, se puede fabricar una capa de sustrato de control de fluidos directamente sobre la capa de comunicación fluidica del sustrato. Se describen diferentes sistemas de válvulas microfluidicas en Marc A. Unger et al, "Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography," Science, vol. 288, n.º 7, págs. 113-116, Abril de 2000 y David C. Duffy *et al.*, "Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)," Analytical Chemistry, vol. 70, n.º 23, págs. 4974-4984, Diciembre de 1998.

Comprendidos dentro de la matriz de la pluralidad de recintos, los loci resueltos o las tapas de reactor pueden residir en microestructuras tales como microcanales o canales. Las dimensiones y diseños de los microcanales de los loci resueltos en la superficie del sustrato adyacente se describen en otras partes del presente documento. Las microestructuras pueden comprender al menos dos canales que están en comunicaciones fluidicas, en donde dichos al menos dos canales pueden comprender al menos dos canales con diferente anchura. En algunos casos, dichos al menos dos canales pueden tener la misma anchura, o una combinación de la misma anchura o anchuras diferentes. Por ejemplo, sin limitación, la anchura de los canales o microcanales puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100  $\mu\text{m}$ . Los canales o microcanales pueden tener cualquier longitud que permita comunicaciones fluidicas de los loci resueltos. Al menos un canal puede comprender una relación entre el área de la superficie y la longitud, o un perímetro, de aproximadamente, al menos aproximadamente, menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100  $\mu\text{m}$ . Al menos un canal puede tener un área de sección transversal que tiene forma circular y puede comprender un radio del área de sección transversal de aproximadamente, al menos aproximadamente, menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100  $\mu\text{m}$ .

Como se describe en el presente documento, una matriz de recintos puede comprender una pluralidad de reactores resueltos que comprenden un primer sustrato y un segundo sustrato que comprende tapas de reactor. Los reactores resueltos pueden formarse combinando o tapando el segundo sustrato sobre el primer sustrato y sellándolos juntos. El sello puede ser reversible o irreversible. En ejemplos preferidos, el sello es reversible o liberable. Tras el sellado de los reactores resueltos, el contenido de los reactores tal como oligonucleótidos o reactivos necesarios para la amplificación u otras reacciones posteriores se puede liberar y mezclar dentro de los reactores resueltos. Los reactores resueltos pueden separarse con un sello liberable y las tapas de los reactores pueden retener todo o una parte del contenido de los reactores tras la liberación del segundo sustrato del primer sustrato. Dependiendo de los materiales del primer sustrato y del segundo sustrato, el sello se puede diseñar de manera diferente para permitir un sellado reversible entre el primer sustrato y el segundo sustrato, y formar los reactores resueltos. El primer sustrato y el segundo sustrato pueden entrar en contacto físico directo cuando se forma el sello. En algunos casos, el primer sustrato y el segundo sustrato pueden estar muy próximos sin que sus respectivas superficies estén inmediatamente alrededor de un nanorreactor o entre dos nanorreactores que hacen un contacto físico directo. El sello puede comprender una válvula de expansión capilar. La distancia entre el primer sustrato y el segundo sustrato cuando se forma el sello puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente, menos de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$ , 0,3  $\mu\text{m}$ , 0,4  $\mu\text{m}$ , 0,5  $\mu\text{m}$ , 0,6  $\mu\text{m}$ , 0,7  $\mu\text{m}$ , 0,8  $\mu\text{m}$ , 0,9  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , 1,1  $\mu\text{m}$ , 1,2  $\mu\text{m}$ , 1,3  $\mu\text{m}$ , 1,4  $\mu\text{m}$ , 1,5  $\mu\text{m}$ , 1,6  $\mu\text{m}$ , 1,7  $\mu\text{m}$ , 1,8  $\mu\text{m}$ , 1,9  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$ , 2,5  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 3,5  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 4,5  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 5,5  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$ , 6,5  $\mu\text{m}$ , 7  $\mu\text{m}$ , 7,5  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$ , 8,5  $\mu\text{m}$ , 9  $\mu\text{m}$ , 9,5  $\mu\text{m}$  o 10  $\mu\text{m}$ . El sello puede comprender una válvula de expansión capilar.

En algunos casos, los recintos resueltos pueden comprender agujeros de liberación de presión. Los agujeros de liberación de presión pueden permitir la separación del primer sustrato y el segundo sustrato. El diseño de sistemas microfluidicos con sistema de liberación de presión se describe en la Patente Europea N.º EP 1987275 A1.

La pluralidad de tapas de reactor resueltas sobre un sustrato se puede fabricar mediante cualquier método que se describa en el presente documento o que se conozca de otro modo en la técnica (por ejemplo, procesos de microfabricación). Los procesos de microfabricación que se pueden usar para fabricar el sustrato con la pluralidad de tapas de reactor o reactores desvelados en el presente documento incluyen, sin limitación, litografía; técnicas de grabado tales como grabado químico en húmedo, en seco y eliminación de fotoprotector; técnicas microelectromecánicas (MEMS) entre las que se incluyen microfluidica/lab-on-a-chip, MEMS ópticas (también denominadas MOEMS), RF MEMS, Técnicas PowerMEMS y BioMEMS y grabado iónico reactivo profundo (DRIE); técnicas nanoelectromecánicas (NEMS); oxidación térmica de silicio; revestimiento electrolítico y no electrolítico; procesos de difusión tales como difusión de boro, fósforo, arsénico y antimonio; implantación iónica; deposición de película tal como evaporación (filamento, haz de electrones, destello y sombreado y cobertura por etapas), pulverización por bombardeo, deposición química en fase de vapor (CVD), epitaxia (fase de vapor, fase líquida y haz molecular), revestimiento electrolítico, serigrafía y laminación. Véase, en general, Jaeger, *Introduction to Microelectronic Fabrication* (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988); Runyan, *et al.*, *Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology* (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990); *Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998*; Rai-Choudhury, ed., *Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication* (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997).

En un aspecto, se puede fabricar un sustrato que tiene una pluralidad de tapas de reactor resueltas usando cualquier método conocido en la técnica. En algunos ejemplos, el material del sustrato que tiene una pluralidad de tapas de reactor puede ser un sustrato semiconductor tal como dióxido de silicio. Los materiales del sustrato también pueden ser otro material compuesto III-V o II-VI, tal como (GaAs), un semiconductor producido mediante el proceso de Czochralski (Grovenor, C. (1989). *Microelectronic Materials*. CRC Press. págs. 113-123). El material puede presentar una superficie plana dura que muestra un recubrimiento uniforme de grupos de óxido reactivo (-OH) en una solución en contacto con su superficie. Estos grupos de óxido pueden ser los puntos de unión para procesos de silanización posteriores. Como alternativa, puede depositarse un material de superficie lipófila e hidrófoba que imita las características de grabado del óxido de silicio. También pueden utilizarse superficies de nitruro de silicio y carburo de silicio para la fabricación de sustratos adecuados de acuerdo con los diversos ejemplos de la divulgación.

En algunos ejemplos, puede depositarse sobre el sustrato una capa de pasivación, que puede tener o no grupos de óxido reactivo. La capa de pasivación puede comprender nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) o polimida. En algunos casos, puede usarse una etapa fotolitográfica para definir regiones en las que se forman loci resueltos sobre la capa de pasivación.

El método para producir un sustrato que tiene una pluralidad de tapas de reactor puede comenzar con un sustrato. El sustrato (por ejemplo, silicio) puede tener cualquier número de capas dispuestas sobre el, incluyendo, pero sin limitación, una capa conductora tal como un metal. La capa conductora puede ser aluminio en algunas circunstancias. En algunos casos, el sustrato puede tener una capa protectora (por ejemplo, nitruro de titanio). En algunos casos, el sustrato puede tener una capa química con una alta energía de superficie. Las capas pueden depositarse con la ayuda de diversas técnicas de deposición, tal como, por ejemplo, deposición química en fase de vapor (CVD), deposición de capa atómica (ALD), CVD intensificada por plasma (PECVD), ALD intensificada por plasma (PEALD), CVD metal-orgánica (MOCVD), CVD de alambre caliente (HWCVD), CVD iniciada (iCVD), CVD modificada (MCVD), deposición axial de vapor (VAD), deposición de vapor exterior (OVD) y deposición física de vapor (por ejemplo, deposición catódica, deposición evaporativa).

En algunos casos, se deposita sobre el sustrato una capa de óxido. En algunos casos, la capa de óxido puede comprender dióxido de silicio. El dióxido de silicio puede depositarse usando tetraetil ortosilicato (TEOS), plasma de alta densidad (HDP) o cualquier combinación de los mismos.

En algunos casos, el dióxido de silicio puede depositarse usando una técnica de baja temperatura. En algunos casos, el proceso es deposición química en fase de vapor a baja temperatura de óxido de silicio. La temperatura generalmente es suficientemente baja para que no se dañe el metal preexistente en el chip. la temperatura de deposición puede ser de aproximadamente 50 °C, aproximadamente 100 °C, aproximadamente 150 °C, aproximadamente 200 °C, aproximadamente 250 °C, aproximadamente 300 °C, aproximadamente 350 °C y similares. En algunos ejemplos, la temperatura de deposición está por debajo de aproximadamente 50 °C, por debajo de aproximadamente 100 °C, por debajo de aproximadamente 150 °C, por debajo de aproximadamente 200 °C, por debajo de aproximadamente 250 °C, por debajo de aproximadamente 300 °C, por debajo de aproximadamente 350 °C, y similares. La deposición puede realizarse a cualquier presión adecuada. En algunos casos, el proceso de deposición usa energía de plasma RF.

En algunos casos, el óxido se deposita mediante un procedimiento de óxido desarrollado térmicamente en seco (por ejemplo, los que pueden usar temperaturas cercanas o superiores a 1.000 °C). En algunos casos, el óxido de silicio se produce por un proceso de vapor en húmedo.

El dióxido de silicio se puede depositar hasta un espesor adecuado para la formación de tapas de reactor que pueden formar una pluralidad de reactores resueltos que comprenden un volumen para los reactivos a depositar y mezclar que puede ser adecuado para amplificar cualquier cantidad deseada de oligonucleótidos u otras reacciones posteriores como se describe en otros párrafos de la presente divulgación.

El dióxido de silicio puede depositarse a cualquier espesor adecuado. En algunos ejemplos, el dióxido de silicio es de aproximadamente, al menos aproximadamente o menos de aproximadamente 1 nanómetro (nm), aproximadamente 2 nm, aproximadamente 3 nm, aproximadamente 4 nm, aproximadamente 5 nm, aproximadamente 6 nm, aproximadamente 7 nm, aproximadamente 8 nm, aproximadamente 9 nm, aproximadamente 10 nm, aproximadamente 15 nm, aproximadamente 20 nm, aproximadamente 25 nm, aproximadamente 30 nm, aproximadamente 35 nm, aproximadamente 40 nm, aproximadamente 45 nm, aproximadamente 50 nm, aproximadamente 55 nm, aproximadamente 60 nm, aproximadamente 65 nm, aproximadamente 70 nm, aproximadamente 75 nm, aproximadamente 80 nm, aproximadamente 85 nm, aproximadamente 90 nm, aproximadamente 95 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 125 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 175 nm, aproximadamente 200 nm, aproximadamente 300 nm, aproximadamente 400 nm o aproximadamente 500 nm de espesor.

Las tapas de reactor se pueden crear en un sustrato de dióxido de silicio utilizando diversas técnicas de fabricación que se conocen en la técnica. estas técnicas pueden incluir técnicas de fabricación de semiconductores. En algunos casos, las tapas de reactor se crean utilizando técnicas fotolitográficas como las que se utilizan en la industria de los semiconductores. Por ejemplo, puede aplicarse un recubrimiento de material fotoprotector (por ejemplo, un material que cambia las propiedades cuando se expone a la radiación electromagnética) sobre el dióxido de silicio (por ejemplo, por recubrimiento por centrifugado de una oblea) con cualquier espesor adecuado. Los sustratos que incluyen el fotoprotector pueden exponerse a una fuente de radiación electromagnética. Puede usarse una máscara para proteger de la radiación a porciones del fotoprotector con intención de definir el área de los loci resueltos. El fotoprotector puede ser un protector negativo o un protector positivo (por ejemplo, el área de las tapas de reactor puede exponerse a la radiación electromagnética o las áreas distintas de las tapas de reactor pueden exponerse a la radiación electromagnética como se define por la máscara). El área que recubre la localización en la que se van a crear las tapas de reactor se expone a radiación electromagnética para definir un patrón que corresponda a la localización y distribución de las tapas de reactor en la capa de dióxido de silicio. El fotoprotector puede exponerse a la radiación electromagnética a través de una máscara que define un patrón que corresponde a las tapas del reactor. A continuación, la parte expuesta del fotoprotector puede retirarse, tal como, por ejemplo, con la ayuda de una operación de lavado (por ejemplo, agua desionizada). La parte retirada de la máscara después puede exponerse a un agente químico de grabado para grabar el sustrato y transferir el patrón de tapas de reactor a la capa de dióxido de silicio. El agente de grabado puede incluir un ácido, tal como, por ejemplo, ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La capa de dióxido de silicio puede grabarse de una manera anisotrópica. Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden aplicarse métodos de fabricación de alta anisotropía, tales como DRIE, para fabricar microestructuras, tales como tapas de reactor, sobre o dentro de un sustrato con paredes laterales que se desvían menos de aproximadamente  $\pm 3^\circ$ ,  $2^\circ$ ,  $1^\circ$ ,  $0,5^\circ$ ,  $0,1^\circ$ , o menos desde la vertical con respecto a la superficie del sustrato. Pueden conseguirse valores reducidos de menos de aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1  $\mu\text{m}$  o menores que dan como resultado microestructuras altamente uniformes.

Pueden usarse diversos procedimientos de grabado para grabar el dióxido de silicio en el área en el que se van a formar las tapas de reactor. El grabado puede ser un grabado isotrópico (es decir, la tasa de grabado solo en una dirección es igual a la tasa de grabado a lo largo de una dirección ortogonal), o un grabado anisotrópico (es decir, la tasa de grabado a lo largo de una dirección es menor que la tasa de grabado solo en una dirección ortogonal), o variantes de los mismos. Las técnicas de grabado pueden ser grabados en húmedo de silicio tales como KOH, TMAH, EDP y similares, y grabado seco con plasma (por ejemplo DRIE). Pueden usarse ambos para grabar obleas con microestructuras a través de interconexiones.

En algunos casos, un grabado anisotrópico elimina la mayor parte del volumen de las tapas de reactor. Puede eliminarse cualquier porcentaje adecuado del volumen de las tapas de reactor, incluyendo aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 95 %. En algunos casos, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 % del material se elimina en un grabado anisotrópico. En algunos casos, como máximo aproximadamente el 60 %, como máximo aproximadamente el 70 %, como máximo aproximadamente el 80 %, como máximo aproximadamente el 90 % o como máximo aproximadamente el 95 % del material se elimina en un grabado anisotrópico. En algunos ejemplos, el grabado anisotrópico no elimina todo el material de dióxido de silicio a través del sustrato. Un grabado isotrópico elimina todo el material de dióxido de silicio a través del sustrato creando un agujero en algunos casos.

En algunos casos, las tapas de reactor se graban usando una etapa fotolitográfica para definir las tapas de reactor seguido de un grabado híbrido en seco y húmedo. La etapa fotolitográfica puede comprender aplicar un recubrimiento de dióxido de silicio con un fotoprotector y exponer el fotoprotector a radiación electromagnética a través de una máscara (o retícula) que tiene un patrón que define las tapas de reactor. En algunos casos, el grabado híbrido seco-húmedo comprende: (a) grabado en seco para eliminar la mayor parte del dióxido de silicio en las regiones de las tapas de reactor definidas en el fotoprotector por la etapa fotolitográfica; (b) limpieza del sustrato; y (c) grabado en húmedo para eliminar el dióxido de silicio restante del sustrato en las regiones de las tapas de reactor.

El sustrato puede limpiarse con la ayuda de una química de grabado con plasma o por exposición a un agente oxidante,

tal como, por ejemplo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o una combinación de los mismos, tal como una combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La limpieza puede comprender la eliminación del polímero residual, la eliminación de material que pueda bloquear el grabado en húmedo, o una combinación de las mismas. En algunos casos, la limpieza es limpieza con plasma. la etapa de limpieza puede proceder durante cualquier periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, de 15 a 20 segundos). En un ejemplo, la limpieza puede realizarse durante 20 segundos con una máquina eMAX-CT de Applied Materials con parámetros de 100 mT, 200 W, 20 G, 20 O<sub>2</sub>.

El grabado en seco puede ser un grabado anisotrópico que graba sustancialmente de forma vertical (por ejemplo, hacia el sustrato) pero no de forma lateral o sustancialmente de forma lateral (por ejemplo, paralelo al sustrato). En algunos casos, el grabado en seco comprende grabado con un agente de grabado basado en flúor tal como CF<sub>4</sub>, CHF<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>, o cualquier combinación de los mismos. En un caso, el grabado se realiza durante 400 segundos con una máquina eMAX-CT de Applied Materials que tiene parámetros de 100 mT, 1000 W, 20 G y 50 CF<sub>4</sub>. Los sustratos descritos en el presente documento pueden grabarse por grabado iónico reactivo profundo (DRIE). El DRIE es un proceso de grabado altamente anisotrópico usado para crear agujeros y fosas de paredes escalonadas y profundos en obleas/sustratos, normalmente con altas relaciones de aspecto. Los sustratos pueden grabarse usando dos tecnologías principales en el caso del DRIE de alta velocidad: criogénica y Bosch. Se describen métodos de aplicación de DRIE en la Patente de Estados Unidos N.º 5501893.

El grabado en húmedo puede ser un grabado isotrópico que elimina el material en todas las direcciones. En algunos casos, el grabado en húmedo deteriora el fotoprotector. El deterioro del fotoprotector puede hacer que el fotoprotector pueda eliminarse más fácilmente en una etapa posterior (por ejemplo, desprendimiento del fotoprotector). En un ejemplo, el grabado en húmedo es grabado con óxido tamponado (BOE). En algunos casos, los grabados en húmedo con óxido se realizan a temperatura ambiente con una base de ácido fluorhídrico que puede tamponarse (por ejemplo, con fluoruro amónico) para ralentizar la velocidad de grabado. La velocidad de grabado puede depender de la película que está grabada y de las concentraciones específicas de HF y/o NH<sub>4</sub>F. El tiempo de grabado necesario para eliminar completamente una capa de óxido se determina normalmente de forma empírica. En un ejemplo, el grabado se realiza a 22 °C con 15:1 BOE (grabado con óxido tamponado).

La capa de dióxido de silicio puede grabarse en una capa de material subyacente. Por ejemplo, la capa de dióxido de silicio puede grabarse hasta una capa de nitruro de titanio.

En un aspecto, un método para preparar un sustrato que tiene una pluralidad de tapas de reactor comprende grabar la cavidad de las tapas de reactor en un sustrato, tal como un sustrato de silicio que comprende una capa de dióxido de silicio como un recubrimiento de la misma usando (a) una etapa fotolitográfica para definir los loci resueltos; (b) un grabado en seco para eliminar la mayor parte del dióxido de silicio en las regiones de las tapas de reactor definidas por la etapa fotolitográfica; y (c) un grabado en húmedo para eliminar el dióxido de silicio restante del sustrato en las regiones de las tapas de reactor. En algunos casos, el método puede comprender la eliminación del polímero residual, la eliminación de material que pueda bloquear el grabado en húmedo, o una combinación de las mismas. El método puede incluir una etapa de limpieza con plasma.

En algunos ejemplos, el fotoprotector no se elimina del dióxido de silicio después de la etapa fotolitográfica o el grabado híbrido en húmedo-seco en algunos casos. Puede dejarse el fotoprotector para dirigir el metal selectivamente a las tapas de reactor y no sobre la superficie superior de la capa de dióxido de silicio en etapas posteriores. En algunos casos, el sustrato se recubre con un metal (por ejemplo, aluminio) y el grabado en húmedo no elimina ciertos componentes en el metal, por ejemplo, los que protegen el metal de la corrosión (por ejemplo, nitruro de titanio (TiN)). En algunos casos, sin embargo, la capa de fotoprotector puede retirarse, tal como con la ayuda de planarización mecánica química (CMP).

En las figuras 26A-D se muestra un nanorreactor ejemplar en diversas. Este nanorreactor comprende 108 pocillos que están elevados individualmente desde una base del nanorreactor. En la figura 26A se muestra una sección transversal del nanorreactor. En las figuras 26B y 26C se muestra una vista de dispositivo del nanorreactor. En la figura 26D se muestra una vista de soporte del nanorreactor. Un nanorreactor se puede configurar para recibir y albergar líquidos en una pluralidad de características. El nanorreactor de la figura 26 está diseñado para albergar líquidos en cualquier número de los 108 pocillos. Un nanorreactor puede ponerse en contacto y/o alinearse con un sustrato, tal como el ejemplificado en la figura 25. Los pocillos de un nanorreactor no se limitan a la configuración que se muestra en la figura 26, ya que se puede disponer cualquier número de pocillos en cualquier configuración dentro de un nanorreactor. En algunos ejemplos, los pocillos del nanorreactor están dispuestos en una configuración que se alinea con la configuración del sustrato. Representada por **2701**, la altura de un nanorreactor puede ser de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm, 3 mm, 3,5 mm, 4 mm, 4,5 mm, 5 mm, 5,5 mm, 6 mm, 6,5 mm, 7 mm, 7,5 mm, 8 mm, 8,5 mm, 9 mm, 9,5 mm o 10 mm. En algunos ejemplos, la altura de un nanorreactor puede ser de aproximadamente o como máximo aproximadamente 10 mm, 9,5 mm, 9 mm, 8,5 mm, 8 mm, 7,5 mm, 7 mm, 6,5 mm, 6 mm, 5,5 mm, 5 mm, 4,5 mm, 4 mm, 3,5 mm, 3 mm, 2,5 mm, 2 mm, 1,5 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm o 0,1 mm o menos. En algunos ejemplos, la altura de un nanorreactor puede variar entre 0,1 - 10 mm, 0,2 - 9 mm, 0,3 - 8 mm, 0,4 - 7 mm, 0,5 - 6 mm, 0,6 - 5 mm, 0,7 - 4 mm, 0,8 - 3 mm o 0,9 - 2 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores,

por ejemplo 0,2 mm - 0,8 mm. Representada por **2702**, la altura de un pocillo de un nanorreactor puede ser de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm, 3 mm, 3,5 mm, 4 mm, 4,5 mm, 5 mm, 5,5 mm, 6 mm, 6,5 mm, 7 mm, 7,5 mm, 8 mm, 8,5 mm, 9 mm, 9,5 mm o 10 mm. En algunos ejemplos, la altura de un pocillo de un nanorreactor puede ser de aproximadamente o como máximo aproximadamente 10 mm, 9,5 mm, 9 mm, 8,5 mm, 8 mm, 7,5 mm, 7 mm, 6,5 mm, 6 mm, 5,5 mm, 5 mm, 4,5 mm, 4 mm, 3,5 mm, 3 mm, 2,5 mm, 2 mm, 1,5 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm o 0,1 mm o menos. En algunos ejemplos, la altura de un pocillo de un nanorreactor puede variar entre 0,1 - 10 mm, 0,2 - 9 mm, 0,3 - 8 mm, 0,4 - 7 mm, 0,5 - 6 mm, 0,6 - 5 mm, 0,7 - 4 mm, 0,8 - 3 mm o 0,9 - 2 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,1 mm - 0,6 mm.

La figura 26B incluye un origen de referencia indicado por un eje 0,0 (X,Y), en donde se representa en diagrama la esquina superior izquierda de un nanorreactor ejemplar. En algunos ejemplos, la anchura del nanorreactor, representada como **2703**, es de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 150 mm a lo largo de una dimensión, medida desde el origen. En algunos ejemplos, la anchura de un nanorreactor, representada como **2704**, es de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 150 mm a lo largo de otra dimensión, medida desde el origen. En algunos ejemplos, la anchura de un nanorreactor en cualquier dimensión es de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 125 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 100 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 75 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 50 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 25 mm, de aproximadamente 25 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 50 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 75 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 100 mm a aproximadamente 150 mm, o de aproximadamente 125 mm a aproximadamente 150 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la anchura puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 5 - 25 mm. En algunos ejemplos, la anchura de un nanorreactor en cualquier dimensión es de aproximadamente o al menos aproximadamente 5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 25 mm, 30 mm, 40 mm, 50 mm, 60 mm, 70 mm, 80 mm, 90 mm, 100 mm, 110 mm, 120 mm, 130 mm, 140 mm o 150 mm. En algunos ejemplos, la anchura de un nanorreactor en cualquier dimensión es de aproximadamente o como máximo aproximadamente 150 mm, 140 mm, 130 mm, 120 mm, 110 mm, 100 mm, 90 mm, 80 mm, 70 mm, 60 mm, 50 mm, 50 mm, 40 mm, 30 mm, 25 mm, 20 mm, 15 mm, 10 mm o 5 mm o menos.

El nanorreactor que se muestra en la figura 26B comprende 108 pocillos. Los pocillos pueden disponerse en cualquier configuración. En la figura 26B, los pocillos están dispuestos en filas formando un cuadrado. Independientemente de la disposición, los pocillos pueden comenzar a una distancia de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 149 mm desde el origen, medido en el eje X o Y y terminar a una distancia de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 150 mm del origen. Las longitudes **2706** y **2705** representan las distancias más lejanas del centro de un pocillo en los ejes X e Y desde el origen, respectivamente. Las longitudes **2710** y **2709** representan las distancias más cercanas del centro de un pocillo en los ejes X e Y desde el origen, respectivamente. En algunos ejemplos, la distancia más lejana del centro de un pocillo en cualquier dimensión desde el origen es de aproximadamente o al menos aproximadamente 1 mm, 5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 25 mm, 30 mm, 40 mm, 50 mm, 60 mm, 70 mm, 80 mm, 90 mm, 100 mm, 110 mm, 120 mm, 130 mm, 140 mm o 150 mm. En algunos ejemplos, la distancia más lejana del centro de un pocillo en cualquier dimensión es de aproximadamente o como máximo aproximadamente 150 mm, 140 mm, 130 mm, 120 mm, 110 mm, 100 mm, 90 mm, 80 mm, 70 mm, 60 mm, 50 mm, 50 mm, 40 mm, 30 mm, 25 mm, 20 mm, 15 mm, 10 mm, 5 mm, 1 mm o menos. En algunos ejemplos, la distancia más lejana del centro de un pocillo en cualquier dimensión es de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 125 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 100 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 75 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 50 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 25 mm, de aproximadamente 25 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 50 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 75 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 100 mm a aproximadamente 150 mm, o de aproximadamente 125 mm a aproximadamente 150 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 5 - 25 mm. En algunos ejemplos, la distancia más lejana del centro de un pocillo en cualquier dimensión desde el origen es de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 25 mm, 30 mm, 40 mm, 50 mm, 60 mm, 70 mm, 80 mm, 90 mm, 100 mm, 110 mm, 120 mm, 130 mm, 140 mm o 149 mm. En algunos ejemplos, la distancia más cercana del centro de un pocillo en cualquier dimensión es de aproximadamente o como máximo aproximadamente 149 mm, 140 mm, 130 mm, 120 mm, 110 mm, 100 mm, 90 mm, 80 mm, 70 mm, 60 mm, 50 mm, 50 mm, 40 mm, 30 mm, 25 mm, 20 mm, 15 mm, 10 mm, 5 mm, 4 mm, 3 mm, 2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm, 0,1 mm o menos. En algunos ejemplos, la distancia más cercana del centro de un pocillo en cualquier dimensión es de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 125 mm, de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 100 mm, de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 75 mm, de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 50 mm, de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 25 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 40 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 30 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 20 mm, o de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,1 - 5 mm.

Los pocillos de un nanorreactor pueden estar localizados a cualquier distancia del borde de un nanorreactor. Las distancias ejemplares entre un pocillo y un borde de un nanorreactor se muestran mediante **2707** y **2708**. En algunos ejemplos, la distancia entre el centro de un pocillo y el borde de un nanorreactor en cualquier dimensión es de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 25 mm, 30 mm, 40 mm, 50 mm, 60 mm, 70 mm, 80 mm, 90 mm, 100 mm, 110 mm, 120 mm, 130 mm, 140 mm o 149 mm. En algunos ejemplos, la distancia entre el centro del pocillo y el borde de un nanorreactor en cualquier dimensión es de aproximadamente o como máximo aproximadamente 149 mm, 140 mm, 130 mm, 120 mm, 110 mm, 100 mm, 90 mm, 80 mm, 70 mm, 60 mm, 50 mm, 50 mm, 40 mm, 30 mm, 25 mm, 20 mm, 15 mm, 10 mm, 5 mm, 4 mm, 3 mm, 2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm, 0,1 mm o menos. En algunos ejemplos, la distancia entre el centro del pocillo y el borde de un nanorreactor en cualquier dimensión es de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 125 mm, de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 100 mm, de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 75 mm, de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 50 mm, de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 25 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 40 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 30 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 20 mm, o de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,1 - 5 mm.

En algunos ejemplos, los pocillos están dispuestos de modo que exista una distancia repetida entre dos pocillos. Como se muestra en **2711** y **2712**, la distancia entre dos pocillos puede ser de aproximadamente 0,3 mm a aproximadamente 9 mm. En algunos ejemplos, la distancia entre dos pocillos es de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,4 mm, 1,6 mm, 1,8 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,4 mm, 2,6 mm, 2,8 mm, 3 mm, 3,2 mm, 3,4 mm, 3,6 mm, 3,8 mm, 4 mm, 4,2 mm, 4,4 mm, 4,6 mm, 4,8 mm, 5 mm, 5,2 mm, 5,4 mm, 5,6 mm, 5,8 mm, 6 mm, 6,2 mm, 6,4 mm, 6,6 mm, 6,8 mm, 7 mm, 7,2 mm, 7,4 mm, 7,6 mm, 7,8 mm, 8 mm, 8,2 mm, 8,4 mm, 8,6 mm, 8,8 mm o 9 mm. En algunos ejemplos, la distancia entre dos pocillos es de aproximadamente o como máximo aproximadamente 9 mm, 8,8 mm, 8,6 mm, 8,4 mm, 8,2 mm, 8 mm, 7,8 mm, 7,6 mm, 7,4 mm, 7,2 mm, 7 mm, 6,8 mm, 6,6 mm, 6,4 mm, 6,2 mm, 6 mm, 5,8 mm, 5,6 mm, 5,4 mm, 5,2 mm, 5 mm, 4,8 mm, 4,6 mm, 4,4 mm, 4,2 mm, 4 mm, 3,8 mm, 3,6 mm, 3,4 mm, 3,2 mm, 3 mm, 2,8 mm, 2,6 mm, 2,4 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,8 mm, 1,6 mm, 1,4 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm o 0,3 mm. La distancia entre dos pocillos puede variar entre 0,3 y 9 mm, 0,4-8 mm, 0,5-7 mm, 0,6-6 mm, 0,7-5 mm, 0,7-4 mm, 0,8-3 mm o 0,9-2 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,8 mm - 2 mm.

En algunos ejemplos, la sección transversal del interior de un pocillo, como se muestra en **2721**, es de aproximadamente o al menos de aproximadamente 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,4 mm, 1,6 mm, 1,8 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,4 mm, 2,6 mm, 2,8 mm, 3 mm, 3,2 mm, 3,4 mm, 3,6 mm, 3,8 mm, 4 mm, 4,2 mm, 4,4 mm, 4,6 mm, 4,8 mm, 5 mm, 5,2 mm, 5,4 mm, 5,6 mm, 5,8 mm, 6 mm, 6,2 mm, 6,4 mm, 6,6 mm, 6,8 mm, 7 mm, 7,2 mm, 7,4 mm, 7,6 mm, 7,8 mm, 8 mm, 8,2 mm, 8,4 mm, 8,6 mm, 8,8 mm o 9 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal del interior de un pocillo es de aproximadamente o como máximo aproximadamente 9 mm, 8,8 mm, 8,6 mm, 8,4 mm, 8,2 mm, 8 mm, 7,8 mm, 7,6 mm, 7,4 mm, 7,2 mm, 7 mm, 6,8 mm, 6,6 mm, 6,4 mm, 6,2 mm, 6 mm, 5,8 mm, 5,6 mm, 5,4 mm, 5,2 mm, 5 mm, 4,8 mm, 4,6 mm, 4,4 mm, 4,2 mm, 4 mm, 3,8 mm, 3,6 mm, 3,4 mm, 3,2 mm, 3 mm, 2,8 mm, 2,6 mm, 2,4 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,8 mm, 1,6 mm, 1,4 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm o 0,3 mm. La sección transversal del interior de un pocillo puede variar entre 0,3-9 mm, 0,4-8 mm, 0,5-7 mm, 0,6-6 mm, 0,7-5 mm, 0,7-4 mm, 0,8-3 mm o 0,9-2 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la sección transversal puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,8 mm - 2 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal de un pocillo, incluyendo el borde del pocillo, como se muestra en **2720**, es de aproximadamente o al menos de aproximadamente 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,4 mm, 1,6 mm, 1,8 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,4 mm, 2,6 mm, 2,8 mm, 3 mm, 3,2 mm, 3,4 mm, 3,6 mm, 3,8 mm, 4 mm, 4,2 mm, 4,4 mm, 4,6 mm, 4,8 mm, 5 mm, 5,2 mm, 5,4 mm, 5,6 mm, 5,8 mm, 6 mm, 6,2 mm, 6,4 mm, 6,6 mm, 6,8 mm, 7 mm, 7,2 mm, 7,4 mm, 7,6 mm, 7,8 mm, 8 mm, 8,2 mm, 8,4 mm, 8,6 mm, 8,8 mm o 9 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal de un pocillo, incluyendo el borde del pocillo, es de aproximadamente o como máximo de aproximadamente 9 mm, 8,8 mm, 8,6 mm, 8,4 mm, 8,2 mm, 8 mm, 7,8 mm, 7,6 mm, 7,4 mm, 7,2 mm, 7 mm, 6,8 mm, 6,6 mm, 6,4 mm, 6,2 mm, 6 mm, 5,8 mm, 5,6 mm, 5,4 mm, 5,2 mm, 5 mm, 4,8 mm, 4,6 mm, 4,4 mm, 4,2 mm, 4 mm, 3,8 mm, 3,6 mm, 3,4 mm, 3,2 mm, 3 mm, 2,8 mm, 2,6 mm, 2,4 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,8 mm, 1,6 mm, 1,4 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm o 0,3 mm. La sección transversal de un pocillo, incluyendo el borde del pocillo, puede variar entre 0,3-9 mm, 0,4-8 mm, 0,5-7 mm, 0,6-6 mm, 0,7-5 mm, 0,7-4 mm, 0,8-3 mm o 0,9-2 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la sección transversal puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,8 mm - 2 mm.

Un nanorreactor puede comprender cualquier número de pocillos, incluyendo, pero sin limitación, cualquier número entre aproximadamente 2 y aproximadamente 250. En algunos ejemplos, el número de pocillos incluye de aproximadamente 2 a aproximadamente 225 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 175 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 150 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 125 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 75 pocillos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 pocillos, de

aproximadamente 2 a aproximadamente 25 pocillos, de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 75 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 100 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 125 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 175 a aproximadamente 250 pocillos, de aproximadamente 200 a aproximadamente 250 pocillos, o de aproximadamente 225 a aproximadamente 250 pocillos. Los expertos en la materia apreciarán que el número de pocillos puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 25-125.

Pueden colocarse marcas de referencia en un nanorreactor descrito en el presente documento para facilitar el alineamiento del nanorreactor con otros componentes de un sistema, por ejemplo, un dispositivo microfluídico o un componente de un dispositivo microfluídico. Los nanorreactores de la divulgación pueden tener una o más marcas de referencia, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más marcas de referencia. La vista de dispositivo del nanorreactor que se muestra en la figura 25B comprende tres marcas de referencia útiles para alinear el dispositivo con otros componentes de un sistema. Una marca de referencia se puede localizar en cualquier posición dentro del nanorreactor. Como se muestra en **2716** y **2717**, una marca de referencia puede localizarse cerca del origen, donde la marca de referencia está más cerca del origen que cualquier otro pocillo. En algunos ejemplos, una marca de referencia se localiza cerca de un borde del nanorreactor, como se muestra en **2713**, donde la distancia desde el borde se ejemplifica por **2714** y **2715**. La marca de referencia se puede localizar a una distancia de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm desde el borde del nanorreactor. En algunos ejemplos, la marca de referencia se localiza a una distancia de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,4 mm, 1,6 mm, 1,8 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,4 mm, 2,6 mm, 2,8 mm, 3 mm, 3,2 mm, 3,4 mm, 3,6 mm, 3,8 mm, 4 mm, 4,2 mm, 4,4 mm, 4,6 mm, 4,8 mm, 5 mm, 5,2 mm, 5,4 mm, 5,6 mm, 5,8 mm, 6 mm, 6,2 mm, 6,4 mm, 6,6 mm, 6,8 mm, 7 mm, 7,2 mm, 7,4 mm, 7,6 mm, 7,8 mm, 8 mm, 8,2 mm, 8,4 mm, 8,6 mm, 8,8 mm, 9 mm o 10 mm desde el borde del nanorreactor. En algunos ejemplos, la marca de referencia se localiza aproximadamente o como máximo aproximadamente a una distancia de 10 mm, 9 mm, 8,8 mm, 8,6 mm, 8,4 mm, 8,2 mm, 8 mm, 7,8 mm, 7,6 mm, 7,4 mm, 7,2 mm, 7 mm, 6,8 mm, 6,6 mm, 6,4 mm, 6,2 mm, 6 mm, 5,8 mm, 5,6 mm, 5,4 mm, 5,2 mm, 5 mm, 4,8 mm, 4,6 mm, 4,4 mm, 4,2 mm, 4 mm, 3,8 mm, 3,6 mm, 3,4 mm, 3,2 mm, 3 mm, 2,8 mm, 2,6 mm, 2,4 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,8 mm, 1,6 mm, 1,4 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm o 0,1 mm desde el borde del nanorreactor. La marca de referencia puede localizarse entre 0,1-10 mm, 0,2-9 mm, 0,3-8 mm, 0,4-7 mm, 0,5-6 mm, 0,1-6 mm, 0,2-5 mm, 0,3-4 mm, 0,4-3 mm, o 0,5-2 mm desde el borde del nanorreactor. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,1 mm - 5 mm. La marca de referencia se puede localizar cerca de un pocillo, donde las distancias ejemplares de los ejes X e Y están indicadas por **2719** y **2718**, respectivamente. En algunos ejemplos, una distancia entre un pocillo y una marca de referencia es de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,001 mm, 0,005 mm, 0,01 mm, 0,02 mm, 0,03 mm, 0,04 mm, 0,05 mm, 0,06 mm, 0,07 mm, 0,08 mm, 0,09 mm, 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,5 mm, 1,7 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,5 mm, 2,7 mm, 3 mm, 3,5 mm, 4 mm, 4,5 mm, 5 mm, 5,5 mm, 6 mm, 6,5 mm u 8 mm. En algunos ejemplos, una distancia entre un pocillo y una marca de referencia es de aproximadamente o como máximo aproximadamente 8 mm, 6,5 mm, 6 mm, 5,5 mm, 5 mm, 4,5 mm, 4 mm, 3,5 mm, 3 mm, 2,7 mm, 2,5 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,7 mm, 1,5 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm, 0,1 mm, 0,09 mm, 0,08 mm, 0,07 mm, 0,06 mm, 0,05 mm, 0,04 mm, 0,03 mm, 0,02 mm, 0,01 mm, 0,005 mm o 0,001 mm. La distancia entre un pocillo y una marca de referencia puede estar en un intervalo entre 0,001-8 mm, 0,01-7 mm, 0,05-6 mm, 0,1-5 mm, 0,5-4 mm, 0,6-3 mm, 0,7-2 mm o 0,8-1,7 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,5-2 mm.

La vista de soporte del nanorreactor que se muestra en la figura 26D comprende cuatro marcas de referencia útiles para alinear el dispositivo con otros componentes de un sistema. Una marca de referencia se puede localizar en cualquier posición dentro del nanorreactor. Como se muestra en **2722** y **2723** en la vista detallada de la marca de referencia **H**, una marca de referencia puede localizarse cerca de una esquina de un nanorreactor en el lado del soporte. La marca de referencia se puede localizar a una distancia de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm desde la esquina del nanorreactor. En algunos ejemplos, la marca de referencia se localiza a una distancia de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,4 mm, 1,6 mm, 1,8 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,4 mm, 2,6 mm, 2,8 mm, 3 mm, 3,2 mm, 3,4 mm, 3,6 mm, 3,8 mm, 4 mm, 4,2 mm, 4,4 mm, 4,6 mm, 4,8 mm, 5 mm, 5,2 mm, 5,4 mm, 5,6 mm, 5,8 mm, 6 mm, 6,2 mm, 6,4 mm, 6,6 mm, 6,8 mm, 7 mm, 7,2 mm, 7,4 mm, 7,6 mm, 7,8 mm, 8 mm, 8,2 mm, 8,4 mm, 8,6 mm, 8,8 mm, 9 mm o 10 mm desde la esquina del nanorreactor. En algunos ejemplos, la marca de referencia se localiza aproximadamente o como máximo aproximadamente a una distancia de 10 mm, 9 mm, 8,8 mm, 8,6 mm, 8,4 mm, 8,2 mm, 8 mm, 7,8 mm, 7,6 mm, 7,4 mm, 7,2 mm, 7 mm, 6,8 mm, 6,6 mm, 6,4 mm, 6,2 mm, 6 mm, 5,8 mm, 5,6 mm, 5,4 mm, 5,2 mm, 5 mm, 4,8 mm, 4,6 mm, 4,4 mm, 4,2 mm, 4 mm, 3,8 mm, 3,6 mm, 3,4 mm, 3,2 mm, 3 mm, 2,8 mm, 2,6 mm, 2,4 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,8 mm, 1,6 mm, 1,4 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm o 0,1 mm desde la esquina del nanorreactor. La marca de referencia puede localizarse entre 0,1-10 mm, 0,2-9 mm, 0,3-8 mm, 0,4-7 mm, 0,5-6 mm, 0,1-6 mm, 0,2-5 mm, 0,3-4 mm, 0,4-3 mm, o 0,5-2 mm desde la esquina del nanorreactor. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,1 mm - 5 mm. La marca de referencia puede tener cualquier anchura adecuada para su función. En algunos ejemplos, como se ejemplifica en **2724** y **2725**, la anchura de una marca de

referencia es de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,4 mm, 1,6 mm, 1,8 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,4 mm, 2,6 mm, 2,8 mm, 3 mm, 3,2 mm, 3,4 mm, 3,6 mm, 3,8 mm, 4 mm, 4,2 mm, 4,4 mm, 4,6 mm, 4,8 mm, 5 mm, 5,2 mm, 5,4 mm, 5,6 mm, 5,8 mm, 6 mm, 6,2 mm, 6,4 mm, 6,6 mm, 6,8 mm, 7 mm, 7,2 mm, 7,4 mm, 7,6 mm, 7,8 mm, 8 mm, 8,2 mm, 8,4 mm, 8,6 mm, 8,8 mm, 9 mm o 10 mm. En algunos ejemplos, la anchura de una marca de referencia es de aproximadamente o como máximo aproximadamente 10 mm, 9 mm, 8,8 mm, 8,6 mm, 8,4 mm, 8,2 mm, 8 mm, 7,8 mm, 7,6 mm, 7,4 mm, 7,2 mm, 7 mm, 6,8 mm, 6,6 mm, 6,4 mm, 6,2 mm, 6 mm, 5,8 mm, 5,6 mm, 5,4 mm, 5,2 mm, 5 mm, 4,8 mm, 4,6 mm, 4,4 mm, 4,2 mm, 4 mm, 3,8 mm, 3,6 mm, 3,4 mm, 3,2 mm, 3 mm, 2,8 mm, 2,6 mm, 2,4 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,8 mm, 1,6 mm, 1,4 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm o 0,1 mm. La anchura de la marca de referencia puede variar entre 0,1 y 10 mm, 0,2-9 mm, 0,3-8 mm, 0,4-7 mm, 0,5-6 mm, 0,1-6 mm, 0,2-5 mm, 0,3-4 mm, 0,4-3 mm o 0,5-2 mm de longitud. Los expertos en la materia apreciarán que la anchura puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,1 mm - 5 mm. Una sección transversal de una marca de referencia puede ser de cualquier tamaño adecuado, como se muestra en **2726**. En algunos ejemplos, la sección transversal de una marca de referencia es de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,001 mm, 0,002 mm, 0,004 mm, 0,006 mm, 0,008 mm, 0,01 mm, 0,012 mm, 0,014 mm, 0,016 mm, 0,018 mm, 0,02 mm, 0,025 mm, 0,03 mm, 0,035 mm, 0,04 mm, 0,045 mm, 0,05 mm, 0,055 mm, 0,06 mm, 0,065 mm, 0,07 mm, 0,075 mm, 0,08 mm, 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm o 0,5 mm. En algunos ejemplos, la sección transversal de una marca de referencia es de aproximadamente o como máximo aproximadamente 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm, 0,1 mm, 0,08 mm, 0,075 mm, 0,07 mm, 0,065 mm, 0,06 mm, 0,055 mm, 0,05 mm, 0,045 mm, 0,04 mm, 0,035 mm, 0,03 mm, 0,025 mm, 0,02 mm, 0,018 mm, 0,016 mm, 0,014 mm, 0,012 mm, 0,01 mm, 0,008 mm, 0,006 mm, 0,004 mm, 0,002 mm, 0,001 mm o menos. La sección transversal de una marca de referencia puede variar entre 0,001-0,5 mm, 0,004-0,4 mm, 0,008-0,3 mm, 0,01-0,2 mm, 0,015-0,1 mm, 0,018-0,1 mm o 0,02-0,05 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la sección transversal puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,02 mm - 0,1 mm.

En algunos ejemplos, el nanorreactor puede tener una localización para una etiqueta o una etiqueta de serie, como se ejemplifica en la figura 26E que representa un diseño ejemplar de pocillos en un nanorreactor. En algunos ejemplos, la etiqueta es un número de serie. La etiqueta puede localizarse cerca de un borde del nanorreactor, como se ejemplifica por las distancias **2728** y **2727**. En algunos ejemplos, cualquier porción de la etiqueta se localiza a una distancia de aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 10 mm desde el borde del nanorreactor. En algunos ejemplos, cualquier porción de la etiqueta se localiza a una distancia de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 1,2 mm, 1,4 mm, 1,6 mm, 1,8 mm, 2 mm, 2,2 mm, 2,4 mm, 2,6 mm, 2,8 mm, 3 mm, 3,2 mm, 3,4 mm, 3,6 mm, 3,8 mm, 4 mm, 4,2 mm, 4,4 mm, 4,6 mm, 4,8 mm, 5 mm, 5,2 mm, 5,4 mm, 5,6 mm, 5,8 mm, 6 mm, 6,2 mm, 6,4 mm, 6,6 mm, 6,8 mm, 7 mm, 7,2 mm, 7,4 mm, 7,6 mm, 7,8 mm, 8 mm, 8,2 mm, 8,4 mm, 8,6 mm, 8,8 mm, 9 mm o 10 mm desde el borde de un nanorreactor. En algunos ejemplos, dicha cualquier parte de la etiqueta se localiza a una distancia de aproximadamente o como máximo aproximadamente 10 mm, 9 mm, 8,8 mm, 8,6 mm, 8,4 mm, 8,2 mm, 8 mm, 7,8 mm, 7,6 mm, 7,4 mm, 7,2 mm, 7 mm, 6,8 mm, 6,6 mm, 6,4 mm, 6,2 mm, 6 mm, 5,8 mm, 5,6 mm, 5,4 mm, 5,2 mm, 5 mm, 4,8 mm, 4,6 mm, 4,4 mm, 4,2 mm, 4 mm, 3,8 mm, 3,6 mm, 3,4 mm, 3,2 mm, 3 mm, 2,8 mm, 2,6 mm, 2,4 mm, 2,2 mm, 2 mm, 1,8 mm, 1,6 mm, 1,4 mm, 1,2 mm, 1 mm, 0,9 mm, 0,8 mm, 0,7 mm, 0,6 mm, 0,5 mm, 0,4 mm, 0,3 mm, 0,2 mm o 0,1 mm desde el borde de un nanorreactor. La distancia puede estar en un intervalo entre 0,1-10 mm, 0,2-9 mm, 0,3-8 mm, 0,4-7 mm, 0,5-6 mm, 0,6-5 mm, 0,7-4 mm, 0,8-3 mm, 0,9-2 mm o 1,5 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la distancia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 0,5-2 mm. La etiqueta puede tener cualquier longitud, incluyendo de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 25 mm como se ejemplifica en **2726**. En algunos ejemplos, la longitud de una etiqueta es de aproximadamente o al menos aproximadamente 1 mm, 5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 25 mm, 30 mm, 40 mm, 50 mm, 60 mm, 70 mm, 80 mm, 90 mm, 100 mm, 110 mm, 120 mm, 130 mm, 140 mm o 150 mm. En algunos ejemplos, la longitud de una etiqueta es de aproximadamente o como máximo aproximadamente 150 mm, 140 mm, 130 mm, 120 mm, 110 mm, 100 mm, 90 mm, 80 mm, 70 mm, 60 mm, 50 mm, 50 mm, 40 mm, 30 mm, 25 mm, 20 mm, 15 mm, 10 mm, 5 mm, 1 mm o menos. En algunos ejemplos, la longitud de una etiqueta es de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 125 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 100 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 75 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 50 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 25 mm, de aproximadamente 25 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 50 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 75 mm a aproximadamente 150 mm, de aproximadamente 100 mm a aproximadamente 150 mm, o de aproximadamente 125 mm a aproximadamente 150 mm. Los expertos en la materia apreciarán que la longitud puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 5 - 25 mm.

## Materiales

Los sustratos, el soporte sólido o las microestructuras o reactores en el mismo pueden fabricarse a partir de una diversidad de materiales, adecuados para los métodos y composiciones de la divulgación descrita en el presente documento. En determinados ejemplos, los materiales a partir de los cuales se fabrican los sustratos/soportes sólidos que comprende la divulgación exhiben un bajo nivel de unión de oligonucleótidos. En algunas situaciones, puede emplearse material que sea transparente a la luz visible y/o UV. Pueden utilizarse materiales que sean suficientemente conductores, por ejemplo, los que pueden formar campos eléctricos uniformes en todo o en una porción de los

sustratos/soportes sólidos descritos en el presente documento. En algunos ejemplos, tales materiales pueden estar conectados a una toma de tierra. En algunos casos, el sustrato o soporte sólido puede ser conductor de calor o estar aislado. Los materiales pueden ser resistentes a los productos químicos y al calor para soportar reacciones químicas o bioquímicas tales como una serie de reacciones de síntesis de oligonucleótidos. En el caso de los materiales flexibles, los materiales de interés pueden incluir: nailon, tanto modificado como sin modificar, nitrocelulosa, polipropileno y similares. En el caso de los materiales rígidos, los materiales específicos de interés incluyen: vidrio; sílice fundida; silicio, plásticos (por ejemplo, politetrafluoroetileno, polipropileno, poliestireno, policarbonato y mezclas de los mismos y similares); metales (por ejemplo, oro, platino y similares). El sustrato, el soporte sólido o los reactores se pueden fabricar a partir de un material seleccionado del grupo que consiste en silicio, poliestireno, agarosa, dextrano, polímeros de celulosa, poli(acrilamidas, polidimetilsiloxano (PDMS) y vidrio. Los sustratos/soportes sólidos o las microestructuras y los reactores de los mismos se pueden fabricar con una combinación de materiales enumerados en el presente documento o cualquier otro material adecuado conocido en la técnica.

### Modificaciones de superficie

En diversos ejemplos, se emplean modificaciones de superficie para la alteración química y/o física de una superficie mediante un proceso aditivo o sustractivo para cambiar una o más propiedades químicas y/o físicas de la superficie de un sustrato o un sitio o región seleccionados de la superficie de un sustrato. Por ejemplo, la modificación de la superficie puede implicar (1) cambiar las propiedades humectantes de una superficie, (2) funcionalizar una superficie, es decir, proporcionar, modificar o sustituir grupos funcionales de la superficie, (3) desfuncionalizar una superficie, es decir, eliminar grupos funcionales de la superficie, (4) alterar de otro modo la composición química de una superficie, por ejemplo, mediante grabado, (5) aumentar o disminuir la rugosidad de la superficie, (6) proporcionar un recubrimiento sobre una superficie, por ejemplo, un recubrimiento que exhibe propiedades humectantes que son diferentes de las propiedades humectantes de la superficie, y/o (7) depositar partículas en una superficie.

La superficie del sustrato, o los loci resueltos, sobre la que se depositan los oligonucleótidos u otros restos puede ser lisa o sustancialmente plana, o tener irregularidades, tales como depresiones o elevaciones. La superficie puede modificarse con una o más capas diferentes de compuestos que sirven para modificar las propiedades de la superficie de una manera deseable. Tales capas de modificación de interés incluyen: capas inorgánicas y orgánicas tales como metales, óxidos metálicos, polímeros, pequeñas moléculas orgánicas y similares. Las capas poliméricas de interés incluyen capas de: péptidos, proteínas, ácidos nucleicos o miméticos de los mismos (por ejemplo, ácidos peptidonucleicos y similares); polisacáridos, fosfolípidos, poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietilenaminas, poli(arien sulfuros, polisiloxanos, poliimidas, poli(acetatos y similares, o cualquier otro compuesto adecuado descrito en el presente documento o conocido en la técnica, donde los polímeros pueden ser hetero u homopoliméricos, y pueden tener o no restos funcionales separados acoplados a los mismos (por ejemplo, conjugados). Se describen otros materiales y métodos para la modificación de la superficie del sustrato o recubrimiento del soporte sólido en la Patente de Estados Unidos N.º 6.773.888 y la Publicación de Estados Unidos N.º 2007/0054127.

Los loci resueltos se pueden funcionalizar con un resto que puede aumentar o disminuir la energía de superficie del soporte sólido. El resto puede ser químicamente inerte o, como alternativa, puede ser un resto adecuado para soportar una reacción química deseada. La energía de superficie, o hidrofobicidad, de una superficie puede determinar la afinidad de un oligonucleótido para unirse a la superficie. Un método para preparar un sustrato puede comprender: (a) proporcionar un sustrato que tiene una superficie que comprende dióxido de silicio; y (b) silanizar la superficie usando, un agente de silanización adecuado descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica, por ejemplo, una molécula de alcóxido de silano organofuncional. En algunos casos, la molécula de alcóxido de silano organofuncional puede ser dimetilcloro-octodecil-silano, metilcloro-octodecil-silano, tricloro-octodecil-silano, trimetil-octodecil-silano, trietil-octodecil-silano o cualquier combinación de los mismos.

La superficie del sustrato también se puede preparar para que tenga una baja energía de superficie utilizando cualquier método conocido en la técnica. La reducción de energía de superficie puede facilitar que los oligonucleótidos se unan a la superficie. La superficie se puede funcionalizar para permitir la unión covalente de restos moleculares que pueden reducir la energía de superficie de modo que se pueda reducir la humectabilidad. En algunos ejemplos, la funcionalización de superficies permite un aumento de la energía de superficie y la humectabilidad.

En algunos ejemplos, la superficie del sustrato se pone en contacto con una composición de derivatización que contiene una mezcla de silanos, en condiciones de reacción eficaces para acoplar los silanos a la superficie del sustrato, normalmente a través de restos hidrófilos reactivos presentes en la superficie del sustrato. La silanización generalmente se puede utilizar para cubrir una superficie mediante el autoensamblaje con moléculas de alcóxido de silano organofuncionales. Se pueden usar además una diversidad de reactivos de funcionalización de siloxano como se conoce actualmente en la técnica, por ejemplo, para reducir o aumentar la energía de superficie. Los alcóxidos de silano organofuncionales se clasifican de acuerdo con sus funciones orgánicas. Los ejemplos no limitantes de reactivos de funcionalización de siloxano incluyen hidroxialquil siloxanos (superficie de sililato, funcionalización con diborano y oxidación del alcohol con peróxido de hidrógeno), diol(dihidroxialquil)siloxanos (superficie de sililato e hidrólisis a diol), aminoalquil siloxanos (las aminos no requieren un paso de funcionalización intermedio), glicidoxisilanos (3-glicidoxipropil-dimetil-etoxisilano, glicidoxi-trimetoxisilano), mercaptosilanos (3-mercaptopropil-trimetoxisilano, 3-4

epoxiciclohexil-etiltrimetoxisilano o 3-mercaptopropil-metil-dimetoxisilano), bicicloheptenil-triclorosilano, butil-aldehído-trimetoxisilano, o aminoalquil siloxanos secundarios diméricos. Los hidroxialquil siloxanos pueden incluir alil tricloroclorosilano que se convierte en 3-hidroxiopropilo, o 7-oct-1-enil-tricloroclorosilano que se convierte en 8-hidroxiociclo. Los diol(dihidroxialquil)siloxanos incluyen (2,3-dihidroxiopropilo)propilo derivado de glicidil trimetoxisilano. Los aminoalquil siloxanos incluyen 3-aminopropil trimetoxisilano que se convierte en 3-aminopropil (3-aminopropil-trietoxisilano, 3-aminopropil-dietoxi-metilsilano, 3-aminopropil-dimetil-etoxisilano o 3-aminopropil-trimetoxisilano). Los aminoalquil siloxanos secundarios diméricos pueden ser bis(3-trimetoxisililpropil)amina que se convierte en bis(sililoxilpropil)amina. Además, En la presente divulgación se pueden utilizar varias superficies funcionalizadas alternativas. Los ejemplos no limitantes incluyen los siguientes: 1. polietileno/polipropileno (funcionalizado por irradiación gamma u oxidación con ácido crómico y reducción a superficie de hidroxialquilo); 2. poliestireno-divinilbenceno altamente reticulado (derivatizado por clorometilación y aminado a superficie funcional con bencilamina); 3. nailon (los grupos aminohexilo terminales son directamente reactivos); o 4. grabado, politetrafluoroetileno reducido. Se describen otros métodos y agentes de funcionalización en la Patente de Estados Unidos N.º 5474796. La mezcla de grupos de funcionalización, por ejemplo, silanos, puede estar en diferentes proporciones. Por ejemplo, sin limitación, la mezcla puede comprender al menos dos tipos diferentes de agentes de funcionalización, por ejemplo, silanos. La proporción de dichos al menos dos tipos de agentes de funcionalización de superficies, por ejemplo, silanos, en una mezcla puede ser aproximadamente 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 2:3, 2:5, 2:7, 2:9, 2:11, 2:13, 2:15, 2:17, 2:19, 3:5, 3:7, 3:8, 3:10, 3:11, 3:13, 3:14, 3:16, 3:17, 3:19, 4:5, 4:7, 4:9, 4:11, 4:13, 4:15, 4:17, 4:19, 5:6, 5:8, 5:9, 5:11, 5:12, 5:13, 5:14, 5:16, 5:17, 5:18, 5:19, 6:7, 6:11, 6:13, 6:17, 6:19, 7:8, 7:9, 7:10, 7:11, 7:12, 7:13, 7:15, 7:16, 7:18, 7:19, 8:9, 8:11, 8:13, 8:15, 8:17, 8:19, 9:10, 9:11, 9:13, 9:14, 9:16, 9:17, 9:19, 10:11, 10:13, 10:17, 10:19, 11:12, 11:13, 11:14, 11:15, 11:16, 11:17, 11:18, 11:19, 12:13, 12:17, 12:19, 13:14, 13:15, 13:16, 13:17, 13:18, 13:19, 13:20, 14:15, 14:17, 14:19, 15:16, 15:17, 15:19, 16:17, 16:19, 17:18, 17:19, 17:20, 18:19, 19:20, o cualquier otra proporción para conseguir una representación de superficie deseada de dos grupos. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se entiende que la representación de la superficie será altamente proporcional a la proporción de dos grupos en una mezcla. Las características deseadas de tensión de superficie, humectabilidad, ángulo de contacto con el agua o ángulo de contacto para otros disolventes adecuados de acuerdo con los métodos y composiciones de la divulgación se pueden conseguir proporcionando una proporción de agentes de funcionalización. Además, los agentes en la mezcla pueden elegirse de restos reactivos e inertes adecuados para reacciones posteriores, diluyendo la densidad de superficie de los grupos reactivos a un nivel deseado de acuerdo con los métodos y composiciones de la divulgación. En algunos ejemplos, la densidad de la fracción de un grupo funcional de superficie que reacciona para formar un oligonucleótido en crecimiento en una reacción de síntesis de oligonucleótidos es aproximadamente, menor que aproximadamente, o mayor que aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 20,0, 50,0, 75,0, 100,0  $\mu\text{Mol}/\text{m}^2$ .

En diversos ejemplos, la superficie se modifica para tener una energía de superficie más alta, o se vuelve más hidrófila con un recubrimiento de restos hidrófilos reactivos. Mediante la alteración de la energía de superficie de diferentes partes de la superficie del sustrato, se puede ajustar el esparcimiento del líquido reactivo depositado, en algunos casos facilitada. Por ejemplo, La figura 5 ilustra un caso en el que una gotícula de reactivo se deposita en un micropocillo mediante una impresora de inyección de tinta. La gotícula de líquido puede esparcirse y llenar los micropocillos más pequeños porque la superficie de los micropocillos tiene una energía de superficie más alta en comparación con la otra superficie cercana en este caso. Los restos hidrófilos reactivos en la superficie del sustrato pueden ser grupos hidroxilo, grupos carboxilo, grupos tiol y/o grupos amino sustituidos o no sustituidos. Los materiales adecuados incluyen, pero sin limitación, soportes que pueden utilizarse para síntesis química en fase sólida, por ejemplo, materiales poliméricos reticulados (por ejemplo, polímeros basados en divinilbenceno estireno), agarosa (por ejemplo, Sepharose®), dextrano (por ejemplo, Sephadex®), polímeros de celulosa, poli(acrilamidas, sílice, vidrio (particularmente vidrio de poro controlado, o "CPG"), cerámica y similares. Los soportes pueden obtenerse comercialmente y usarse tal cual, o pueden tratarse o recubrirse antes de la funcionalización.

## 50 Superficies hidrófilas e hidrófobas

La energía de superficie, o hidrofobicidad de una superficie, se puede evaluar o medir midiendo un ángulo de contacto con el agua. El ángulo de contacto con el agua es el ángulo entre la superficie de la gota y una superficie sólida cuando una gotícula de agua se encuentra con la superficie sólida. La superficie sólida puede ser una superficie lisa, llana o plana. Se puede cuantificar la humectación de una superficie sólida por un líquido (por ejemplo, agua) mediante la ecuación de Young. En algunos casos, se puede observar histéresis del ángulo de contacto con el agua, que varía desde el denominado ángulo de contacto con el agua de avance (máximo) hasta el ángulo de contacto con el agua que retrocede (mínimo). El contacto de equilibrio con el agua se puede encontrar dentro de esos valores y se puede calcular a partir de los mismos. La hidrofobicidad y la hidrofilia se pueden expresar en términos cuantitativos relativos usando el ángulo de contacto con el agua. Si una superficie tiene un ángulo de contacto con el agua inferior a  $90^\circ$ , la superficie sólida puede considerarse hidrófila o polar. Si una superficie tiene un ángulo de contacto con el agua superior a  $90^\circ$ , la superficie sólida puede considerarse hidrófoba o apolar. Las superficies altamente hidrófobas con baja energía de superficie pueden tener un ángulo de contacto con el agua superior a  $120^\circ$ .

65 Las características superficiales de las superficies recubiertas se pueden ajustar de diversas formas adecuadas para la síntesis de oligonucleótidos. La superficie se puede seleccionar para que sean inertes a las condiciones de la

- síntesis de oligonucleótidos habitual; por ejemplo, la superficie sólida puede estar desprovista de grupos hidroxilo, amino o carboxilo libres en la interfaz del volumen de disolvente durante la adición de monómero, dependiendo de la química seleccionada. Como alternativa, la superficie puede comprender restos reactivos antes del comienzo del primer ciclo, o los primeros ciclos de la síntesis de oligonucleótidos y estos restos reactivos pueden agotarse rápidamente a densidades no medibles después de uno, dos, tres, cuatro, cinco o más ciclos de la reacción de síntesis de oligonucleótidos. La superficie se puede optimizar adicionalmente para una buena o mala humectación, por ejemplo, mediante disolventes orgánicos habituales tales como acetonitrilo y los éteres de glicol o disolventes acuosos, en relación con las superficies circundantes.
- 10 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se entiende que el fenómeno de humectación es una medida de la tensión de superficie o fuerzas de atracción entre moléculas en una interfaz sólido-líquido, y se expresa en dinas/cm<sup>2</sup>. Por ejemplo, los fluorocarburos tienen una tensión de superficie muy baja, lo cual se atribuye típicamente a la polaridad única (electronegatividad) del enlace carbono-flúor. En películas tipo Langmuir-Blodgett estrechamente estructuradas, La tensión de superficie de una capa se puede determinar principalmente por el porcentaje de flúor en el extremo de las cadenas de alquilo. En el caso de películas estrechamente ordenadas, un solo grupo trifluorometilo terminal puede hacer que una superficie sea casi tan lipófila como una capa de perfluoroalquilo. Cuando se acoplan fluorocarburos covalentemente a un soporte sólido derivatizado subyacente (por ejemplo, un polímero altamente reticulado), la densidad de sitios reactivos puede ser menor que la densidad de Langmuir-Blodgett y de grupos. Por ejemplo, La tensión de superficie de una superficie de metiltrimetoxisilano puede ser de aproximadamente 22,5 mN/m y la superficie de aminopropiltriethoxisilano puede ser de aproximadamente 35 mN/m. Se describen otros ejemplos de superficies de silano en Arkles B *et al.*, "The role of polarity in the structure of silanes employed in surface modification", Silanes and Other Coupling Agents, Vol. 5, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. En resumen, en general, se considera que el comportamiento hidrófilo de las superficies se produce cuando las tensiones de superficie críticas son superiores a 45 mN/m. A medida que aumenta la tensión de superficie crítica, la disminución esperada del ángulo de contacto va acompañada de un comportamiento de adsorción más fuerte. Generalmente se considera que el comportamiento hidrófobo de las superficies se produce cuando las tensiones de superficie críticas son menores de 35 mN/m. En primer lugar, la disminución de la tensión de superficie crítica está asociada con el comportamiento oleófilo, es decir, la humectación de las superficies con aceites de hidrocarburo. A medida que las tensiones de superficie críticas disminuyen por debajo de 20 mN/m, las superficies resisten la humectación por aceites de hidrocarburo y se consideran tanto oleófilas como hidrófilas. Por ejemplo, puede usarse modificación de la superficie con silano para generar una amplia gama de tensiones de superficie críticas. Por consiguiente, los métodos y composiciones de la divulgación pueden usar recubrimientos de superficie, por ejemplo, los que incluyen silanos, para conseguir tensiones de superficie inferiores a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 115, 120 mN/m, o mayores. Además, los métodos y composiciones de la divulgación pueden usar recubrimientos de superficie, por ejemplo, los que incluyen silanos, para conseguir tensiones de superficie de más de 115, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6 mN/m o menores. El ángulo de contacto con el agua y la tensión de superficie de ejemplos no limitantes de recubrimientos de superficies, por ejemplo, los que incluyen silanos, se describen en la Tabla 1 y la Tabla 2 de Arkles *et al.* (Silanes and Other Coupling Agents, Vol. 5v: The Role of Polarity in the Structure of Silanes Employed in Surface Modification. 2009).. Las tablas se reproducen a continuación.

Tabla 1.

**Ángulos de contacto con el agua (grados) en superficies lisas**

Heptadecafluorodeciltrimetoxisilano	113-115
Poli(tetrafluoroetileno)	108-112
Polipropileno	108
Octadecildimetilclorosilano	110
Octadeciltriclorosilano	102-109
Tris(trimetilsiloxi)sililetildimetilclorosilano	103-104
Octildimetilclorosilano	104
Butildimetilclorosilano	100
Trimetilclorosilano	90-100
Polietileno	88-103
Poliestireno	94
Poli(clorotrifluoroetileno)	90
Piel humana	75-90
Diamante	87
Grafito	86
Silicio (grabado)	86-88

(continuación)

**Ángulos de contacto con el agua (grados) en superficies lisas**

Talco	82-90
Quitosano	80-81
Acero	70-75
Metoxietoxiundeciltriclorosilano	73-74
Metacriloxipropiltrimetoxisilano	70
Oro, típico (véase oro, limpio)	66
Mucosa intestinal	50-60
Caolín	42-46
Platino	40
Nitruro de silicio	28-30
Yoduro de plata	17
[Metoxi(polietileno)propil]trimetoxisilano	15-16
Vidrio sodocálcico	<15
Oro, limpio	<10
Poli(etilenimina) sustituida con trimetoxisililpropilo, clorhidrato	<10

*Nota:* En la Tabla 1, los ángulos de contacto de los silanos se refieren a la deposición hidrolítica del silano sobre superficies lisas. Los presentes datos se han extraído de diversas fuentes bibliográficas y del trabajo de los autores. Las comparaciones exactas entre sustratos no tienen en cuenta las diferencias en los métodos de prueba o si se presentaron ángulos de contacto de avance, de retroceso o en equilibrio.

**Tabla 2.****Tensiones de superficie críticas (mN/m)**

Heptadecafluorodeciltriclorosilano	12
Poli(tetrafluoroetileno)	18,5
Octadeciltriclorosilano	20-24
Metiltrimetoxisilano	22,5
Nonafluorohexiltrimetoxisilano	23
Viniltrióxido	25
Cera de parafina	25,5
Etiltrimetoxisilano	27,0
Propiltrimetoxisilano	28,5
Vidrio, sodocálcico (húmedo)	30,0
Poli(clorotrifluoroetileno)	31,0
Polipropileno	31,0
Poli(óxido de propileno)	32
Poli(etileno)	33,0
Trifluoropropiltrimetoxisilano	33,5
3-(2-aminoetil)aminopropiltrimetoxisilano	33,5
Poli(estireno)	34
p-Toliltrimetoxisilano	34
Cianoetiltrimetoxisilano	34
Aminopropiltrióxido	35
Acetoxipropiltrimetoxisilano	37,5
Poli(metacrilato de metilo)	39
Poli(cloruro de vinilo)	39
Feniltrimetoxisilano	40,0
Cloropropiltrimetoxisilano	40,5
Mercaptopropiltrimetoxisilano	41
Glicidoxipropiltrimetoxisilano	42,5

(continuación)

**Tensiones de superficie críticas (mN/m)**

Poli(tereftalato de etileno)	43
Cobre (seco)	44
Poli(óxido de etileno)	43-45
Aluminio (seco)	45
Nailon 6/6	45-46
Hierro (seco)	46
Vidrio, sodocálcico (seco)	47
Óxido de titanio (anatasa)	91
Óxido férrico	107
Óxido de estaño	111

Los métodos para medir el ángulo de contacto con el agua pueden usar cualquier método conocido en la técnica, incluido el método estático de gota sésil, método dinámico de gota sésil, método dinámico de Wilhelmy, método de una sola fibra de Wilhelmy, método del ángulo de contacto de polvo y similares. En algunos casos, la superficie del sustrato, o una porción de la superficie del sustrato, como se describe en el presente documento en la presente descripción, puede funcionalizarse o modificarse para que sea hidrófoba, tenga una energía de superficie baja o tenga un ángulo de contacto con el agua que se mediría en más de aproximadamente 90 °, 95°, 100°, 105°, 110°, 115°, 120°, 125°, 130°, 135°, 140°, 145 ° o 150 ° en un equivalente no curvado, liso o plano de la superficie funcionalizada relevante del sustrato, como se describe en el presente documento. El ángulo de contacto con el agua de una superficie funcionalizada descrita en el presente documento puede referirse al ángulo de contacto de una gotícula de agua sobre la superficie funcionalizada en una geometría no curvada, lisa, llana y plana. En algunos casos, la superficie del sustrato, o una porción de la superficie del sustrato, como se describe en el presente documento en la presente descripción, puede funcionalizarse o modificarse para que sea hidrófila, tenga una energía de superficie alta o tenga un ángulo de contacto con el agua que se mediría en menos de aproximadamente 90 °, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15° o 10° en un equivalente no curvado, liso o plano de la superficie funcionalizada relevante del sustrato, como se describe en el presente documento. La superficie del sustrato o una porción de la superficie del sustrato puede funcionalizarse o modificarse para que sea más hidrófila o hidrófoba en comparación con la superficie o la porción de la superficie antes de la funcionalización o modificación.

En algunos casos, una o más superficies pueden modificarse para tener una diferencia en el ángulo de contacto con el agua de más de 90 °, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15 ° o 10 ° medida en una o más superficies equivalentes no curvadas, lisas o planas. En algunos casos, la superficie de las microestructuras, canales, loci resueltos, tapas de reactor resueltas u otras partes del sustrato pueden modificarse para tener una hidrofobicidad diferencial correspondiente a una diferencia en el ángulo de contacto con el agua que es superior a 90 °, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15 ° o 10 ° medida en superficies equivalentes no curvadas, lisas o planas de tales estructuras. Salvo que se especifique lo contrario, los ángulos de contacto con el agua mencionados en el presente documento corresponden a mediciones que se tomarían en equivalentes no curvadas, lisas o planas de las superficies en cuestión.

Se describen otros métodos para funcionalizar la superficie en la Patente de Estados Unidos N.º 6.028.189. Por ejemplo, se pueden generar loci resueltos hidrófilos aplicando primero un protector, o resist, sobre cada loci dentro del sustrato. El área no protegida después puede recubrirse con un agente hidrófobo para producir una superficie no reactiva. Por ejemplo, se puede crear un recubrimiento hidrófobo mediante la deposición química en fase de vapor de (tridecafluorotetrahidrooctil)-trióxido de silano sobre el óxido expuesto que rodea los círculos protegidos. Finalmente, el protector, o resist, puede eliminarse exponiendo las regiones de loci del sustrato para una posterior modificación y síntesis de oligonucleótidos. En algunos ejemplos, la modificación inicial de tales regiones desprotegidas puede resistir modificaciones posteriores y conservar su funcionalización de superficie, mientras que las áreas recientemente desprotegidas pueden someterse a posteriores etapas de modificación.

**Múltiples reacciones microfluídicas en paralelo**

En otro aspecto, en el presente documento se describen sistemas y métodos para realizar un conjunto de reacciones paralelas. El sistema puede comprender dos o más sustratos que se pueden sellar, por ejemplo, sellarse de forma liberable, entre sí, formando una pluralidad de reactores o volúmenes de reacción direccionables individualmente tras el sellado. Pueden formarse nuevos conjuntos de reactores liberando un primer sustrato de un segundo sustrato y alineándolo con un tercer sustrato. Cada sustrato puede llevar reactivos, por ejemplo, oligonucleótidos, enzimas, tampones o disolventes, para las reacciones deseadas. En algunos ejemplos, el sistema comprende una primera superficie con una pluralidad de loci resueltos en una primera densidad adecuada y un elemento de tapado con una pluralidad de tapas de reactor resueltas en una segunda densidad adecuada. el sistema puede alinear la pluralidad de tapas de reactor resueltas con la pluralidad de loci resueltos en la primera superficie formando un sellado temporal entre la primera superficie y el elemento de tapado. El sello temporal entre los sustratos alineados puede dividir

físicamente los loci en la primera superficie en grupos de aproximadamente, al menos aproximadamente, o menos de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 loci o más. Se puede realizar un conjunto de reacciones paralelas descritas en el presente documento de acuerdo con los métodos y composiciones de la divulgación. Se puede alinear una primera superficie con una pluralidad de loci resueltos en una primera densidad y un elemento de tapado con una pluralidad de tapas de reactor resueltas en una segunda densidad, de tal manera que la pluralidad de tapas de reactor resueltas con la pluralidad de loci resueltos en la primera superficie forman un sello temporal entre la primera superficie y el elemento de tapado y por lo tanto dividen físicamente los loci en la primera superficie en grupos de aproximadamente al menos, aproximadamente, o menos de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 loci o más. Se puede realizar una primera reacción, formando un primer conjunto de reactivos. El elemento de tapado puede liberarse de la primera superficie. Tras la liberación, cada una de las tapas de reactor puede retener al menos una porción del primer conjunto de reactivos en los volúmenes de reacción previamente sellados. La pluralidad de loci resueltos puede tener una densidad de aproximadamente, al menos aproximadamente o menos de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000, aproximadamente 5000, aproximadamente 6000, aproximadamente 7000, aproximadamente 8000, aproximadamente 9000, aproximadamente 10000, aproximadamente 20000, aproximadamente 40000, aproximadamente 60000, aproximadamente 80000, aproximadamente 100000 o aproximadamente 500000 por  $1 \text{ mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de loci resueltos puede tener una densidad de aproximadamente, al menos aproximadamente, menos de aproximadamente 100 por  $\text{mm}^2$ . La pluralidad de tapas de reactor resueltas puede tener una densidad de aproximadamente, al menos aproximadamente, menos de aproximadamente 1 por  $\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la pluralidad de tapas de reactor resueltas puede tener una densidad de aproximadamente, al menos aproximadamente o menos de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000, aproximadamente 5000, aproximadamente 6000, aproximadamente 7000, aproximadamente 8000, aproximadamente 9000, aproximadamente 10000, aproximadamente 20000, aproximadamente 40000, aproximadamente 60000, aproximadamente 80000, aproximadamente 100000 o aproximadamente 500000 por  $1 \text{ mm}^2$ . Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además proporcionar una segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos en una tercera densidad y alinear la pluralidad de tapas de reactor resueltas con la pluralidad de loci resueltos en la segunda superficie, y formar un sellado, típicamente un sellado temporal o liberable, entre la segunda superficie y el elemento de tapado. El sellado recién formado puede dividir físicamente los loci en la segunda superficie en grupos de aproximadamente, al menos aproximadamente o menos de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 loci, o más. Se puede realizar una segunda reacción, opcionalmente usando una porción del primer conjunto de reactivos, formando así un segundo conjunto de reactivos. El elemento de tapado se puede liberar de la segunda superficie. Tras la liberación, cada una de las tapas de reactor puede retener al menos una porción del segundo conjunto de reactivos en los segundos volúmenes de reacción previamente sellados. En algunos casos, la segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos puede tener una densidad de loci de al menos aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000, aproximadamente 5000, aproximadamente 6000, aproximadamente 7000, aproximadamente 8000, aproximadamente 9000, aproximadamente 10000, aproximadamente 20000, aproximadamente 40000, aproximadamente 60000, aproximadamente 80000, aproximadamente 100000 o aproximadamente 500000 por  $1 \text{ mm}^2$ . En el presente documento se describen varios aspectos de los ejemplos de los sistemas, métodos e instrumentaciones.

El conjunto del sistema puede comprender cualquier número de obleas estáticas y cualquier número de obleas dinámicas. Por ejemplo, el sistema puede comprender tres sustratos en una columna y cuatro sustratos en una fila. El sistema de transporte puede comprender tres obleas (o sustratos) estáticas y una oblea (o sustrato) dinámica. Las obleas dinámicas pueden moverse o transportarse entre una pluralidad de obleas estáticas. Una oblea dinámica se puede transportar entre tres obleas montadas estáticamente. En algunos ejemplos, la oblea dinámica puede tener un diámetro de aproximadamente 50, 100, 150, 200 o 250 mm o 2, 4, 6 u 8 pulgadas o más. Las obleas dinámicas se

pueden montar en un mandril de vacío con temperatura controlada. Los sistemas de la divulgación permiten configuraciones, en donde las obleas dinámicas pueden moverse en la dirección Z, que puede ser la dirección que es perpendicular a la superficie de una oblea que se enfrenta a la superficie de una segunda oblea, con aproximadamente o menos de aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 o 3  $\mu\text{m}$  de control de la posición z, y puede alinear theta\_z de obleas, el ángulo entre las normales de las superficies de dos obleas que están enfrentadas, por ejemplo, haciendo coincidir un patrón en la oblea dinámica con otro patrón en la oblea estática dentro de un intervalo de tolerancia. Las tolerancias de posicionamiento de la oblea pueden ser de aproximadamente o menos de aproximadamente 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300 350, 400, 450 o 500 microrradianes de diferencia en el ángulo de rotación en el plano x-y. En algunos ejemplos, las tolerancias de posicionamiento de la oblea pueden ser de aproximadamente o menos de aproximadamente 50 microrradianes de diferencia en el ángulo de rotación en el plano x-y. Las tolerancias de posicionamiento de la oblea pueden ser de aproximadamente o menos de aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15  $\mu\text{m}$  de distancia en la dirección x. Las tolerancias de posicionamiento de la oblea pueden ser de aproximadamente o menos de aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15  $\mu\text{m}$  de distancia en la dirección y. Las tolerancias de posicionamiento de la oblea pueden ser de aproximadamente o menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 microrradianes en las rotaciones del plano x-y en la dirección z. En algunos ejemplos, las tolerancias de posicionamiento de la oblea pueden ser de aproximadamente o menos de aproximadamente 5 microrradianes en las rotaciones del plano x-y en la dirección z. En algunos ejemplos, las tolerancias de posicionamiento de la oblea pueden ser de aproximadamente o menos de aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5  $\mu\text{m}$  de distancia en la dirección z. En algunos ejemplos, las tolerancias de posicionamiento de la oblea pueden ser de aproximadamente o menos de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de distancia en la dirección z.

En algunos casos, los sistemas y métodos para realizar un conjunto de reacciones paralelas pueden comprender además una tercera, una cuarta, una quinta, una sexta, una séptima, una octava, una novena o una décima superficie con una pluralidad de loci resueltos y/o un elemento de tapado con una pluralidad de tapas de reactor resueltas. La tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima, la octava, la novena o la décima superficies se pueden alinear y pueden formar un sello temporal entre las dos superficies y el elemento de tapado correspondiente, dividiendo así físicamente los loci y/o las tapas de reactor en las superficies. Se puede realizar una tercera, una cuarta, una quinta, una sexta, una séptima, una octava, una novena o una décima reacción usando una porción de los reactivos que se conservan de la reacción anterior, en concreto, el segundo, un tercero, un cuarto, un quinto, un sexto, un séptimo, un octavo o un noveno conjunto de reactivos, formando así el tercero, el cuarto, el quinto, el sexto, el séptimo, el octavo, el noveno o el décimo conjunto de reactivos. Cada uno de los elementos de tapado descritos en el presente documento puede liberarse de su superficie correspondiente, en donde las tapas de reactor pueden retener al menos una parte del conjunto anterior de reactivos de otro volumen de reacción. En algunos casos, la segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos puede tener una densidad de al menos  $2/\text{mm}^2$ . En algunos ejemplos, la segunda superficie con una pluralidad de loci resueltos puede tener una densidad de loci de al menos aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000, aproximadamente 5000, aproximadamente 6000, aproximadamente 7000, aproximadamente 8000, aproximadamente 9000, aproximadamente 10000, aproximadamente 20000, aproximadamente 40000, aproximadamente 60000, aproximadamente 80000, aproximadamente 100000 o aproximadamente 500000 por  $1 \text{ mm}^2$ . La porción de los reactivos retenidos cada vez puede ser diferente y controlada para estar en una porción deseable dependiendo de las reacciones a realizar.

La divulgación, en diversos ejemplos, contempla un sistema para realizar un conjunto de reacciones paralelas que comprende una primera superficie con una pluralidad de loci resueltos y un elemento de tapado con una pluralidad de tapas de reactor resueltas. La pluralidad de loci resueltos y el elemento de tapado con una pluralidad de tapas de reactor resueltas se pueden combinar para formar una pluralidad de reactores resueltos, como se describe con más detalle en otras partes del presente documento. En algunos casos, los loci resueltos de la primera superficie del primer sustrato pueden comprender un recubrimiento de reactivos. Los loci resueltos de la segunda superficie del segundo sustrato pueden comprender un recubrimiento de reactivos. En algunos ejemplos, el recubrimiento de reactivos puede unirse covalentemente a la primera o segunda superficie. En los casos en los que haya una tercera, una cuarta, una quinta, una sexta, una séptima, una octava, una novena o una décima superficie, cada superficie puede comprender un recubrimiento de reactivos.

El recubrimiento de reactivos sobre la primera superficie o la segunda superficie puede comprender oligonucleótidos. Los oligonucleótidos pueden tener cualquier longitud como se describe adicionalmente en otras partes del presente documento, por ejemplo, al menos 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 pb o más. Tras sellar los loci resueltos con las tapas del reactor resueltas, se pueden liberar los oligonucleótidos que están comprendidos dentro del recubrimiento de reactivos. Se puede realizar una diversidad de reacciones, por ejemplo, la reacción de amplificación de oligonucleótidos, PCA, generación de bibliotecas de secuenciación o corrección de errores, dentro de la pluralidad de reactores resueltos.

Los oligonucleótidos se pueden liberar de la superficie recubierta mediante una diversidad de métodos adecuados, como se describe con más detalle en otras partes del presente documento y se conoce en la técnica, por ejemplo por escisión enzimática, como es bien conocido en esta técnica. Los ejemplos de tal escisión enzimática incluyen, pero sin limitación, el uso de enzimas de restricción tales como MlyI u otras enzimas o combinaciones de enzimas capaces de escindir ADN monocatenario o bicatenario tales como, pero sin limitación, uracil ADN glicosilasa (UDG) y ADN endonucleasa IV. En la presente divulgación también se pueden emplear ventajosamente otros métodos de escisión conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, escisión química (lábil en medio básico) de moléculas de ADN o escisión óptica (fotolábil) de la superficie. También se pueden emplear PCR u otras reacciones de amplificación para generar material de construcción para la síntesis génica copiando los oligonucleótidos mientras todavía están anclados al sustrato. Se describen métodos de liberación de oligonucleótidos en la Publicación de Patente PCT N.º WO2007137242 y en la Patente de Estados Unidos N.º 5.750.672.

En algunos casos, la liberación en la liberación del elemento de tapado de la primera superficie y la liberación del elemento de tapado de la segunda superficie se pueden realizar a una velocidad diferente. La cantidad de la porción de reactivos que se retiene tras suministrar el elemento de tapado de la superficie correspondiente puede controlarse mediante la velocidad o la energía de superficie del elemento de tapado y la superficie correspondiente. En algunos casos, la primera y la segunda superficies comprenden una tensión de superficie, energía de superficie o hidrofobicidad diferente con un líquido determinado, tal como agua. En algunos casos, los loci resueltos de la primera superficie pueden comprender una alta energía de superficie, tensión de superficie o hidrofobicidad. La diferencia en la energía de superficie, o hidrofobicidad, del elemento de tapado y la superficie correspondiente puede ser un parámetro para controlar la porción de los reactivos que se retiene tras la liberación. El volumen de la primera y la segunda reacciones pueden ser diferentes.

En algunos casos, la presión del aire fuera de los reactores resueltos puede ser mayor que la presión dentro de los reactores resueltos. En otros casos, la presión del aire fuera de los reactores resueltos puede ser menor que la presión dentro de los reactores resueltos. La diferencia en la presión del aire fuera de los reactores resueltos y dentro de los reactores resueltos (o la presión diferencial) puede afectar el sellado de los reactores resueltos. Al modificarse la energía de superficie o hidrofobicidad de la primera superficie y la segunda superficie, la presión diferencial puede dar como resultado una curva o una interfaz directa aire/líquido dentro de un hueco entre la primera superficie y la tapa de reactor de la segunda superficie. Además, la fuerza necesaria para liberar el elemento de tapado de la superficie puede controlarse mediante la presión diferencial y la energía de superficie diferencial. En algunos casos, la superficie se puede modificar para que tenga una energía de superficie diferencial y una presión diferencial de modo que el elemento de tapado pueda liberarse de la superficie fácilmente.

La primera o segunda reacción, o cualquier reacción posterior a la segunda reacción, puede comprender diversos ensayos moleculares o bioquímicos como se describe en el presente documento o cualquier reacción adecuada conocida en la técnica. En algunos casos, la primera o segunda reacción puede comprender ensamblaje cíclico por polimerasa. En algunos casos, la primera o segunda reacción puede comprender síntesis enzimática de genes, reacción de templado y ligamiento, síntesis simultánea de dos genes a través de un gen híbrido, ligamiento shotgun y coligamiento, síntesis génica de inserción, síntesis génica mediante una cadena de ADN, ligamiento dirigido por molde, reacción en cadena de la ligasa, síntesis génica mediada por micromatriz, ensamblaje en fase sólida, tecnología de bloques de construcción de Sloning o síntesis génica mediada por ligamiento de ARN. Las reacciones o el método para realizar un conjunto de reacciones paralelas pueden comprender además enfriar el elemento de tapado o enfriar la primera superficie (segunda superficie).

El flujo de trabajo del proceso general de los métodos y composiciones de la presente divulgación que utilizan los sistemas descritos en el presente documento se ilustra en la figura 8.

## 50 Instrumentación auxiliar

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a sistemas y métodos para la síntesis de oligonucleótidos. El sistema para la síntesis de oligonucleótidos puede comprender un sistema de deposición de escaneo. Los sistemas para la síntesis de oligonucleótidos pueden comprender un primer sustrato (por ejemplo, oblea de síntesis de oligonucleótidos) que tiene una superficie funcionalizada y una pluralidad de loci resueltos y una impresora de inyección de tinta, que comprende típicamente una pluralidad de cabezales de impresión. Cada cabezal de impresión se configura normalmente para depositar uno de una diversidad de bloques de construcción para reacciones que se realizan en los loci resueltos de un primer sustrato, por ejemplo, bloques de construcción de nucleótidos para la síntesis de fosforamídita. Los loci resueltos de la oblea de síntesis de oligonucleótidos pueden residir en microcanales como se describe con más detalle en otra parte del presente documento. El sustrato se puede sellar dentro de una celda de flujo, por ejemplo, proporcionando un flujo continuo de líquidos tales como los que contienen los reactivos necesarios para las reacciones dentro de los loci resueltos (por ejemplo, oxidante en tolueno) o disolventes (por ejemplo, acetonitrilo), lo que permite un control preciso de la dosificación y concentración de reactivos en los sitios de síntesis, por ejemplo, los loci resueltos de una oblea de síntesis de oligonucleótidos. Se puede utilizar un flujo de un gas inerte, tal como nitrógeno, para secar el sustrato, normalmente a través de la evaporación mejorada de un sustrato volátil. Se puede utilizar una diversidad de medios, por ejemplo, una fuente de vacío/una bomba de despresurización o un tanque

de vacío, para crear una presión relativa reducida (presión negativa) o vacío para mejorar el secado y reducir la cantidad de humedad residual y cualquier gotícula de líquido en la superficie. Por consiguiente, la presión del entorno inmediato de los sustratos o los loci resueltos de los mismos puede medir aproximadamente o menos de aproximadamente 100, 75, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 mTorr o menos.

5 La figura 3 ilustra un ejemplo de un sistema para la síntesis de oligonucleótidos. Por consiguiente, una oblea de síntesis de oligonucleótidos está configurada para proporcionar los loci resueltos para la síntesis de oligonucleótidos con los reactivos a granel necesarios a través de un colector de entrada y, opcionalmente, un colector de salida. Los reactivos a granel pueden incluir cualquier reactivo, portador, disolvente, tampón o gas adecuado para la síntesis de oligonucleótidos que se necesite comúnmente entre una pluralidad de loci resueltos en varios ejemplos, tales como un oxidante, desbloqueante, acetonitrilo o nitrógeno gaseoso. Los cabezales de impresión de la impresora de inyección de tinta pueden moverse en la dirección X-Y a las localizaciones direccionables del primer sustrato. Un segundo sustrato, tal como un elemento de tapado, como se describe con más detalle en otras partes del presente documento, puede moverse en la dirección Z y, si es necesario, en las direcciones X e Y, para el sellado con el primer sustrato, formándose una pluralidad de reactores resueltos. Como alternativa, el segundo sustrato puede ser estacionario. En estos casos, el sustrato de síntesis puede moverse en la dirección Z y, si es necesario, en las direcciones X e Y, para alinearse y sellarse con el segundo sustrato. Los oligonucleótidos sintetizados pueden suministrarse del primer sustrato al segundo sustrato. Se pueden hacer pasar cantidades adecuadas de fluidos a través de un colector de entrada y los loci resueltos de un primer sustrato, a un segundo sustrato para facilitar el suministro de reactivos desde el primer sustrato/los loci resueltos del mismo al segundo sustrato. En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un sistema para el ensamblaje de oligonucleótidos que comprende la manipulación de obleas.

En diversos ejemplos, la presente divulgación hace uso de sistemas para la deposición de escaneo. Los sistemas de deposición de escaneo pueden comprender una inyección de tinta que se puede usar para depositar reactivos en los loci resueltos o micropocillos grabados en un sustrato. En algunos ejemplos, el sistema de deposición de escaneo puede utilizar tintas o disolventes orgánicos. En algunos casos, el sistema de deposición de escaneo puede comprender una pluralidad de obleas, tales como obleas de silicio, normalmente de aproximadamente 200 mm de diámetro. En algunos casos, todo el sistema se puede colocar y funcionar en un recinto controlado atmosféricamente. El sistema de deposición de escaneo puede comprender un área de trabajo, un conjunto de cabezal de impresión, un conjunto de celda de flujo y/o un área de servicio. En algunos casos, el conjunto del cabezal de impresión puede moverse mientras el conjunto de celda de flujo permanece estacionario. El sistema de deposición de escaneo puede comprender una o más células de flujo, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más células de flujo que dan servicio a uno o más sustratos/obleas, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más sustratos/obleas. Las obleas pueden permanecer fijas dentro de las células de flujo. En algunos casos, el sistema puede facilitar el alineamiento de sustratos mediante la automatización theta\_z. El área de trabajo puede incluir un área que comprende el recorrido de la dirección de escaneo, por ejemplo, aproximadamente (n-1) Paso del cabezal de impresión + Diámetro de la oblea = 9 \* 20 mm + 200 mm = 380 mm, en un ejemplo particular. Pueden concebirse áreas de trabajo adecuadas con configuraciones equivalentes. El área de servicio puede comprender cabezales de impresión que están estacionados para el servicio. En algunos casos, el área de servicio puede estar ambientalmente aislada de una caja más grande. En diversos ejemplos, los sistemas para los métodos y composiciones descritos en el presente documento comprenden sistemas de deposición de escaneo para la síntesis de oligonucleótidos, ensamblaje de oligonucleótidos o, más generalmente, para la fabricación de reactivos.

La pluralidad de loci resueltos y la pluralidad de tapas de reactor resueltas pueden localizarse en microestructuras que tienen interconectividad o comunicaciones fluidicas. Dichas comunicaciones fluidicas permiten lavar y perfundir nuevos reactivos en forma de gotículas o usando flujo continuo, para diferentes etapas de reacciones. Los microcanales de comunicación fluida pueden contener entradas y salidas hacia y/o desde la pluralidad de loci resueltos y la pluralidad de reactores resueltos. Las entradas y/o salidas pueden realizarse con cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las entradas y/o salidas se pueden proporcionar en un lado frontal y en el lado posterior del sustrato. Se describen métodos para crear las entradas y/o salidas en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º US 20080308884 A1, y puede comprender la fabricación de componentes microestructurales adecuados mediante procesos litográficos y de grabado en un lado frontal; y la perforación de agujeros desde la parte posterior de dicho sustrato en alineamiento preciso con las microestructuras en el lado frontal, para proporcionar entradas y/o salidas hacia y/o desde dicha estructura micromecánica. Las entradas y/o salidas pueden ser celdas de flujo tipo Hele-Shaw, fluyendo el fluido en un hueco delgado alimentado por un colector. Como se ilustra en la figura 9A, los sustratos descritos en el presente documento, pueden formar parte de una celda de flujo. La celda de flujo se puede cerrar deslizando una tapa sobre la parte superior del sustrato (es decir, una oblea) y se puede sujetar en su sitio formando un sello hermético a la presión alrededor del borde del sustrato. En algunos ejemplos, el sello puede ser adecuado para sellar frente al vacío o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 atmósferas de presión. Los reactivos pueden introducirse en un hueco delgado debajo del sustrato (es decir, oblea) y fluir hacia arriba a través del sustrato. Después los reactivos se pueden recoger en el recolector de residuos cónico como se ilustra en la figura 9B. Después de una última etapa de lavado con disolvente, en algunos ejemplos, la oblea se puede drenar, por ejemplo, a través del fondo del conjunto y después purgarse con nitrógeno. Después, la cámara se puede bajar al vacío para secar el disolvente que quede en cualquier microestructura, reduciéndose los líquidos o la humedad residual a menos del 50 %, 30 %, 30 %, 20 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %, 0,0001 %, 0,00001 %, o menos por volumen. Después, la cámara se puede bajar al vacío para reducir la presión que rodea al sustrato a menos

de 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 o 1000 mTorr. En algunos casos, la cámara se puede llenar con nitrógeno después de la etapa de vacío y el techo se puede deslizar para abrirlo nuevamente para permitir el acceso de las partes auxiliares del sistema, por ejemplo una impresora. En algunos casos, la celda de flujo se puede abrir. El sustrato/oblea se puede montar con el colector de residuos desplazado lateralmente, como se ilustra en la figura 9B. Esta configuración puede facilitar el acceso de la inyección de tinta a la oblea. En este punto, los reactivos se pueden depositar en los micropocillos. En algunos ejemplos, las tapas de los recintos resueltos (es decir, las celdas de flujo) pueden servir como un recolector de residuos, y el líquido de los reactivos puede fluir hacia los mismos. Las flechas en la figura 9B y 9C representan una dirección de flujo ejemplar para los reactivos. En algunos casos, los reactivos pueden entrar a través del hueco delgado en la parte inferior, pasando a través de los agujeros en el sustrato (por ejemplo, una oblea de silicio) y recogiendo en el recolector de desechos como se ilustra en la figura 9C. En algunos casos, se puede purgar el gas a través de un colector superior o inferior para expulsar el líquido, por ejemplo, a través de la parte inferior o superior de la celda de flujo. Se puede conectar un puerto de entrada o salida al vacío para completar el secado. El puerto de vacío se puede conectar en el lado de los residuos o en el lado de entrada, como se ilustra en la figura 10. En algunos ejemplos, puede haber una pluralidad de agujeros de liberación de presión que atraviesan el sustrato (es decir, la oblea). La pluralidad de agujeros puede ser más de aproximadamente 1000, 5000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000 o 2.000.000. En algunos casos, la pluralidad de agujeros puede ser superior a 5 millones. En algunos casos, las microestructuras para síntesis como se describen con más detalle en otras partes del presente documento sirven como agujeros de liberación de presión. Estos agujeros pueden permitir que el gas pase a través de un lado de la oblea a medida que los recintos resueltos se vacían para secar el sustrato. En algunos casos, por ejemplo, si el aire sale del lado del recolector de residuos, la presión del aire del lado del recolector de residuos,  $P_{\text{residuos}}$ , puede mantenerse sustancialmente al mismo nivel que la presión de aire del lado de entrada,  $P_{\text{entrada}}$ . En algunos ejemplos, se puede utilizar un puerto que conecta el colector de entrada al recolector de residuos. Por lo tanto, una pluralidad de las etapas descritas en el presente documento, tales como escaneo, deposición, inundación, lavado, purgado y/o secado, pueden realizarse sin transportar los sustratos de oblea.

Los reactores resueltos formados sellando el primer sustrato y el segundo sustrato pueden estar encerrados en cámaras con condiciones controladas de humedad, contenido de aire, presión de vapor y/o presión, formando un conjunto con un ambiente controlado. En algunos ejemplos, la humedad de las cámaras puede estar saturada o ser de aproximadamente el 100 % para evitar la evaporación del líquido de los reactores resueltos durante las reacciones. Por ejemplo, la humedad se puede controlar a aproximadamente, menos de aproximadamente o más de aproximadamente el 100 %, 99,5 %, 99 %, 98,5 %, 98 %, 97,5 %, 97 %, 96,5 %, 96 %, 95,5 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 % o 25 %.

Los sistemas descritos en el presente documento, tales como los que tienen conjuntos de ambiente controlado descritos anteriormente pueden incluir un dispositivo/mandril de vacío y/o un sistema de control de temperatura conectado operativamente con la pluralidad de reactores resueltos. Los sustratos se pueden colocar en un mandril de vacío. El mandril de vacío puede incluir irregularidades en la superficie situadas directamente debajo del sustrato. En diversos ejemplos, las irregularidades de la superficie pueden comprender canales o rebajes. El mandril de vacío puede estar en comunicación fluida con el sustrato para extraer gas de los espacios definidos por los canales. Se describen métodos para mantener el sustrato en el dispositivo de vacío con más detalle en la Patente de Estados Unidos N.º 8247221.

En diversos ejemplos, el sustrato (por ejemplo, una oblea de silicio) puede colocarse sobre un mandril, tal como el mandril de vacío descrito anteriormente. La figura 10 ejemplifica un conjunto de sistema de un mandril de vacío de una sola ranura y una pieza de metal sinterizado entre el sustrato y el dispositivo de control de temperatura. El mandril de vacío puede comprender una sola ranura con dimensiones adecuadas para albergar un sustrato. En algunos ejemplos, el mandril de vacío está diseñado de manera que se pueda mantener un sustrato en su sitio durante uno o más de los métodos descritos en el presente documento. El mandril de vacío, ilustrado en la figura 10A como ejemplo, comprende una sola ranura de 1-5 mm con aproximadamente 198 mm de diámetro. En algunos casos, se pueden utilizar diseños de mandril de vacío de una sola ranura para proporcionar una mejor transferencia de calor al sustrato. La figura 10B ilustra un inserto de metal sinterizado que está situado entre el sustrato (por ejemplo, oblea de silicio) y el mandril de vacío, que se fija en su lugar con adhesivos. En algunos ejemplos, el mandril puede ser un mandril electrostático, como se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N.º 5.530.516.

La pluralidad de tapas de reactor resueltas se puede alinear con la pluralidad de loci resueltos en la primera superficie formando un sello temporal entre la primera superficie y el elemento de tapado usando cualquier método que sea conocido en la técnica, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 8.367.016 y la Patente Europea N.º EP 0126621 B1, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Por ejemplo, para un sustrato con una pluralidad de loci resueltos que tienen dimensiones x, y y z y un punto central de profundidad del locus situado a lo largo de la dimensión z, el punto central de profundidad del locus se puede situar a una distancia de dimensión z conocida de una marca de referencia incluida dentro del sustrato. El sustrato se puede colocar dentro de un sistema de formación de imágenes que puede incluir un dispositivo óptico capaz de detectar la marca de referencia. El dispositivo óptico puede definir una trayectoria óptica alineada axialmente con la dimensión z y puede tener un plano focal perpendicular a la trayectoria óptica. Cuando el plano focal se mueve a lo largo de la trayectoria

5 óptica, la marca de referencia se puede detectar al máximo cuando el plano focal está en la profundidad z en comparación con cuando el plano focal no está sustancialmente adaptado a la profundidad z. Las marcas de referencia se pueden colocar selectivamente en una disposición espacial adecuada en un primer sustrato, por ejemplo, una oblea de síntesis que comprende una pluralidad de loci resueltos, y/o el segundo sustrato, por ejemplo, un elemento de reactor que comprende una pluralidad de elementos de tapado. En algunos ejemplos, la marca de referencia de alineamiento global se puede formar cerca de un locus resuelto. Dependiendo de la aplicación, puede haber variaciones, alternativas y modificaciones. Por ejemplo, dos de las marcas de referencia pueden estar cerca de los loci resueltos y la tercera marca de referencia puede estar en el borde del sustrato. Como otro ejemplo, el propio patrón de las microestructuras en los sustratos descritos en el presente documento puede seleccionarse de una manera reconocible adecuada para el alineamiento, por ejemplo, en un patrón asimétrico, y puede usarse para el alineamiento. En algunos casos, la marca de referencia sirve como un punto de alineamiento para corregir la profundidad de campo u otras características ópticas. La Patente de Estados Unidos N.º 4.123.661, divulga el alineamiento con haz de electrones realizado en un sustrato, siendo las marcas adyacentes pero estando separadas por una distancia de modo que las pendientes ascendentes y descendentes de las marcas puedan detectarse mediante una señal de vídeo, permitiéndose así los alineamientos.

10 El sistema puede comprender un componente de calefacción, un componente de enfriamiento o un elemento de temperatura controlada (por ejemplo, un dispositivo de ciclos térmicos). En diversos ejemplos, un dispositivo de ciclos térmicos para usar con una pluralidad de reactores resueltos puede configurarse para realizar amplificación o ensamblaje de ácidos nucleicos, tal como PCR o PCA o cualquier otra reacción de ácidos nucleicos adecuada descrita en el presente documento o conocida en la técnica. La temperatura se puede controlar de modo que las temperaturas dentro de los reactores puedan ser uniformes y el calor se pueda conducir rápidamente. En diversos ejemplos, los sistemas descritos en el presente documento pueden tener componentes de detección para la detección de punto final o en tiempo real de los reactores o las microestructuras individuales dentro de los sustratos, por ejemplo, durante la síntesis de oligonucleótidos, el ensamblaje de genes o la amplificación de ácidos nucleicos.

15 Cualquiera de los sistemas descritos en el presente documento, puede estar unido operativamente a un ordenador y puede automatizarse a través de un ordenador, ya sea de forma local o remota. Los ordenadores y sistemas informáticos para el control de los componentes del sistema descritos en el presente documento se describen con más detalle en otras partes del presente documento.

### Composiciones primarias - oligonucleótidos

20 Como se usa en el presente documento, los términos "secuencia preseleccionada", "secuencia predefinida" o "secuencia predeterminada" se usan indistintamente. Los términos significan que la secuencia del polímero se conoce y se elige antes de la síntesis o ensamblaje del polímero. En particular, en el presente documento se describen diversos aspectos de la divulgación principalmente con respecto a la preparación de moléculas de ácidos nucleicos, siendo conocida la secuencia del oligonucleótido o polinucleótido y elegida antes de la síntesis o ensamblaje de las moléculas de ácido nucleico. En un ejemplo, los oligonucleótidos son moléculas de ácido nucleico cortas. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 nucleótidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 400 nucleótidos, de aproximadamente 30 a aproximadamente 500 nucleótidos, de aproximadamente 40 a aproximadamente 600 nucleótidos, o de más de aproximadamente 600 nucleótidos de longitud. Los expertos en la materia apreciarán que las longitudes de los oligonucleótidos pueden estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores (por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 400 nucleótidos o de aproximadamente 300 a aproximadamente 400 nucleótidos, etc.). Pueden usarse oligonucleótidos convenientemente cortos o largos según lo requiera la aplicación específica. Se pueden diseñar oligonucleótidos individuales para que tengan una longitud diferente a otra en una biblioteca. Los oligonucleótidos pueden ser relativamente cortos, por ejemplo, más cortos que 200, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 nucleótidos, más particularmente. También se contemplan oligonucleótidos relativamente más largos; en algunos ejemplos, los oligonucleótidos son más largos o iguales a 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600 nucleótidos o más. Normalmente, los oligonucleótidos son moléculas de ADN o ARN monocatenarias.

25 En un aspecto de la divulgación, se proporciona un dispositivo para sintetizar una pluralidad de ácidos nucleicos que tienen una secuencia predeterminada. El dispositivo puede incluir un soporte que tiene una pluralidad de características, teniendo cada característica una pluralidad de oligonucleótidos. En algunos ejemplos, la pluralidad de oligonucleótidos que tienen una secuencia predefinida se inmovilizan en diferentes características discretas de un soporte sólido. En algunos ejemplos, los oligonucleótidos son monocatenarios. En algunos ejemplos, la pluralidad de secuencias de oligonucleótidos puede comprender secuencias degeneradas. En algunos ejemplos, los oligonucleótidos están unidos a un soporte. En algunos ejemplos, el dispositivo comprende un soporte sólido que tiene una pluralidad de puntos o características, y cada uno de la pluralidad de puntos incluye una pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte. En algunos ejemplos, los oligonucleótidos se unen covalentemente a través de su extremo 3' al soporte sólido. Sin embargo, en otros ejemplos, los oligonucleótidos se unen covalentemente a través de su extremo 5' al soporte sólido.

30 En algunos ejemplos, los oligonucleótidos de superficie o unidos al soporte se inmovilizan a través de su extremo 3'.

Debe apreciarse que por extremo 3', se entiende la secuencia aguas abajo hasta el extremo 5', por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 nucleótidos o más aguas abajo del extremo 5', como otro ejemplo en la mitad, tercera o cuarta parte 3' de la secuencia, como otro ejemplo más, a menos de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15 o 20 nucleótidos del extremo 3' absoluto, y por extremo 5' se entiende la secuencia aguas arriba del extremo 3', por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 nucleótidos o más aguas arriba del extremo 3', como otro ejemplo en la mitad, tercera o cuarta parte 5' de la secuencia, como otro ejemplo más, a menos de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15 o 20 nucleótidos del extremo 5' absoluto. Por ejemplo, un oligonucleótido puede inmovilizarse en el soporte a través de una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de unión degenerada), un enlazador o espaciador (por ejemplo, un resto que no está implicado en la hibridación). En algunos ejemplos, el oligonucleótido comprende un espaciador o enlazador para separar la secuencia oligonucleotídica del soporte. Los espaciadores o enlazadores útiles incluyen enlazadores fotoescindibles u otros enlazadores químicos tradicionales. En un ejemplo, los oligonucleótidos pueden acoplarse a un soporte sólido a través de un resto de enlace escindible. Por ejemplo, el soporte sólido puede funcionalizarse para proporcionar conectores escindibles para la unión covalente a los oligonucleótidos. El resto enlazador puede tener seis o más átomos de longitud. Como alternativa, el resto escindible puede estar dentro de un oligonucleótido y puede introducirse durante la síntesis *in situ*. En la técnica de la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida y micromatrices está disponible una amplia diversidad de restos escindibles (véase, por ejemplo, Pon, R., *Methods Mol. Biol.* 20:465-496 (1993); Verma et al, *Annu. Rev. Biochem.* 67:99-134 (1998); Patentes de Estados Unidos N.º 5.739.386, 5.700.642 y 5.830.655; y Publicaciones de Patentes de Estados Unidos N.º 2003/0186226 y 2004/0106728). Puede seleccionarse un resto escindible adecuado para que sea compatible con la naturaleza del grupo protector de las bases de nucleósidos, la elección del soporte sólido y/o el modo de suministro del reactivo, entre otros. En un ejemplo ilustrativo, los oligonucleótidos escindidos del soporte sólido contienen un extremo 3'-OH libre. Como alternativa, el extremo 3'-OH libre también puede obtenerse mediante tratamiento químico o enzimático, tras la escisión de oligonucleótidos. En diversos ejemplos, la divulgación se refiere a métodos y composiciones para la liberación de oligonucleótidos unidos a un soporte o unidos a la superficie en solución. El resto escindible puede eliminarse en condiciones que no degraden los oligonucleótidos. Preferentemente, el enlazador se puede escindir usando dos enfoques, ya sea simultáneamente en las mismas condiciones que la etapa de desprotección o posteriormente utilizando una condición o reactivo diferente para la escisión del enlazador después de la finalización de la etapa de desprotección.

En otros ejemplos, los oligonucleótidos están en solución. Por ejemplo, los oligonucleótidos se pueden proporcionar dentro de un volumen discreto, tal como una gotícula o una microgotícula en diferentes características discretas. En algunos ejemplos, se pueden usar microvolúmenes discretos de entre aproximadamente 0,5 pL y aproximadamente 100 nL. Sin embargo, se pueden utilizar volúmenes mayores o menores. En algunos ejemplos, puede utilizarse un dispensador adecuado o un flujo continuo, tal como el flujo a través de microestructuras que se acciona por una bomba, para transferir volúmenes de menos de 100 nL, menos de 10 nL, menos de 5 nL, menos de 100 pL, menos de 10 pL, o menos de 0,5 pL hacia y entre las microestructuras de los sustratos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se pueden dispensar pequeños volúmenes de una o más microestructuras de una oblea de síntesis de oligonucleótidos en una tapa de reactor de un elemento de tapado empujando un fluido a través de la oblea de síntesis de oligonucleótidos.

En algunos ejemplos, se proporciona una pluralidad de construcciones de ácidos nucleotídicos en diferentes características del soporte. En algunos ejemplos, las construcciones de ácido nucleico, incluidos oligonucleótidos cortos y polinucleótidos más largos/ensamblados, son oligonucleótidos parcialmente bicatenarios o dúplex. Como se usa en el presente documento, el término "dúplex" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es al menos parcialmente bicatenaria. Los términos "nucleósido" o "nucleótido" pretenden incluir los restos que contienen no solo las bases conocidas de purina y pirimidina, sino también otras bases heterocíclicas que se han modificado. Tales modificaciones incluyen purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas, ribosas alquiladas u otros heterociclos o cualquier otra modificación adecuada descrita en el presente documento o conocida de otro modo en la técnica. Además, los términos "nucleósido" y "nucleótido" incluyen los restos que contienen no solo azúcares convencionales de ribosa y desoxirribosa, sino también otros azúcares. Los nucleósidos o nucleótidos modificados también incluyen modificaciones en el resto de azúcar, por ejemplo, en donde uno o más de los grupos hidroxilo se reemplazan con átomos de halógeno o grupos alifáticos, o se funcionalizan como éteres, aminas o similares.

Se entenderá que, como se usa en el presente documento, los términos "nucleósido" y "nucleótido" se refieren a nucleósidos y nucleótidos que contienen no solo las bases convencionales de purina y pirimidina, es decir, adenina (A), timina (T), citosina (C), guanina (G) y uracilo (U), sino también formas protegidas de las mismas, por ejemplo, en donde la base está protegida con un grupo protector tal como acetilo, difluoroacetilo, trifluoroacetilo, isobutirilo o benzoilo, y análogos de purina y pirimidina. Los expertos en la materia conocerán análogos adecuados y se describen en los textos y la bibliografía pertinentes. Los análogos comunes incluyen, pero sin limitación, 1-metiladenina, 2-metiladenina, N6-metiladenina, N6-isopentiladenina, 2-metil-N6-isopentiladenina, N,N-dimetiladenina, 8-bromoadenina, 2-tiocitosina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, 5-etilcitosina, 4-acetilcitosina, 1-metilguanina, 2-metilguanina, 7-metilguanina, 2,2-dimetilguanina, 8-bromoguanina, 8-cloroguanina, 8-aminoguanina, 8-metilguanina, 8-tioguanina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, 5-etiluracilo, 5-propiluracilo, 5-metoxiuracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-(metilaminometil)uracilo, 5-(carboximetilaminometil)uracilo, 2-tiouracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-(2-bromovinil)uracilo, ácido uracil-5-oxiacético, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, 1-metilpseudouracilo, queosina, inosina, 1-metilinosina, hipoxantina, xantina, 2-aminopurina, 6-hidroxiaminopurina, 6-tiopurina y 2,6-diaminopurina. Además, los términos

"nucleósido" y "nucleótido" incluyen los restos que contienen no solo azúcares convencionales de ribosa y desoxirribosa, sino también otros azúcares. Los nucleósidos o nucleótidos modificados también incluyen modificaciones en el resto de azúcar, por ejemplo, en donde uno o más de los grupos hidroxilo se reemplazan con átomos de halógeno o grupos alifáticos, o se funcionalizan como éteres, aminas o similares.

5 Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" será genérico para polidesoxinucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), para polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), para cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glucósido de una base de purina o pirimidina, y para otros polímeros que contengan cadenas principales no nucleotídicas (por ejemplo, PNA), siempre que los polímeros contengan nucleobases en una configuración que permita el emparejamiento de bases y el apilamiento de bases, tal como la que se encuentra en el ADN y el ARN. Por lo tanto, estos términos incluyen tipos conocidos de modificaciones de oligonucleótidos, por ejemplo, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, las que tienen enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforoamidatos, carbamatos, etc.), las que no tienen enlaces cargados negativamente (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), y las que tienen enlaces cargados positivamente (por ejemplo, aminoalquilfosforamidatos, aminoalquilfosfotriésteres), las que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (incluidas nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), las que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.). No se pretende que haya distinción en la longitud entre el término "polinucleótido" y "oligonucleótido", y estos términos se utilizarán indistintamente.

El término "acoplado", como en, por ejemplo, una superficie de sustrato que tiene un resto "acoplado" a la misma, incluye unión covalente, adsorción e inmovilización física. Los términos "unión" y "unido" tienen el mismo significado que el término "acoplado".

25 En diversos ejemplos, la divulgación se refiere a la síntesis, tal como la síntesis química, de moléculas distintas de los ácidos nucleicos. Los términos "péptido", "peptidilo" y "peptídico", tal como se utilizan en toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, pretenden incluir cualquier estructura compuesta por dos o más aminoácidos. En su mayoría, los péptidos en las presentes matrices comprenden de aproximadamente 5 a 10.000 aminoácidos, preferentemente de aproximadamente 5 a 1000 aminoácidos. Los aminoácidos que forman todo o parte de un péptido pueden ser cualquiera de los veinte aminoácidos naturales convencionales, es decir, alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptófano (W) y tirosina (Y). Cualquiera de los aminoácidos de las moléculas peptídicas que forman las presentes matrices puede reemplazarse por un aminoácido no convencional. En general, se prefieren los reemplazos conservativos. Los reemplazos conservativos sustituyen el aminoácido original con un aminoácido no convencional que se parece al original en una o más de sus propiedades características (por ejemplo, carga, hidrofobicidad, volumen estérico; por ejemplo, se puede reemplazar Val con Nval). La expresión "aminoácido no convencional" se refiere a aminoácidos distintos de los aminoácidos convencionales, e incluye, por ejemplo, isómeros y modificaciones de los aminoácidos convencionales (por ejemplo, D-aminoácidos), aminoácidos no proteicos, aminoácidos modificados postraduccionalmente, aminoácidos modificados enzimáticamente, construcciones o estructuras diseñadas para imitar aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos, N-alkil aminoácidos, ácido láctico,  $\beta$ -alanina, naftilalanina, 3-piridilalanina, 4-hidroxiprolina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina y norleucina), y péptidos que tienen el enlace amida-CONH de origen natural reemplazado en uno o más sitios dentro de la cadena principal del péptido con un enlace no convencional tal como enlaces amida N-sustituida, éster, tioamida, retro péptido (-NHCO-), retrotioamida (-NHCS-), sulfonamido (-SO<sub>2</sub>NH-), y/o peptoide (glicina N-sustituida). Por consiguiente, las moléculas peptídicas de la matriz incluyen pseudopéptidos y peptidomiméticos. Los péptidos de esta divulgación pueden ser (a) de origen natural, (b) producidos por síntesis química, (c) producidos mediante tecnología de ADN recombinante, (d) producidos por fragmentación bioquímica o enzimática de moléculas más grandes, (e) producidos por métodos resultantes de una combinación de los métodos (a) a (d) enumerados anteriormente, o (f) producidos por cualquier otro medio para producir péptidos.

El término "oligómero" pretende abarcar cualquier polinucleótido o polipéptido u otro compuesto químico con restos repetidos tales como nucleótidos, aminoácidos, carbohidratos y similares.

55 En algunos ejemplos, el dispositivo tiene al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 1.000, 4.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 o más características diferentes (o "regiones" o "puntos") en una localización particular (es decir, una "dirección"). Debe apreciarse que un dispositivo puede comprender uno o más soportes sólidos. Cada localización direccionable de un dispositivo puede tener una composición diferente, tal como un oligonucleótido diferente. Como alternativa, grupos de localizaciones direccionables de un dispositivo pueden contener composiciones total o sustancialmente similares, por ejemplo, oligonucleótidos, que son diferentes de los que se encuentran en otros grupos de microestructuras de un dispositivo.

65 El número de cada oligonucleótido, que puede prepararse mediante los métodos de la divulgación en localizaciones direccionables individualmente y/o en poblaciones mixtas, puede variar de cinco a 500.000, de 500 a 500.000, de 1.000 a 500.000, de 5.000 a 500.000, de 10.000 a 500.000, de 20.000 a 500.000, de 30.000 a 500.000, de 5.000 a

250.000, de 5.000 a 100.000, de cinco a 5.000, de cinco a 50.000, de 5.000 a 800.000, de 5.000 a 1.000.000, de 5.000 a 2.000.000, de 10.000 a 2.000.000, de 20.000 a 1.000.000, de 30.000 a 2.000.000, etc. En diversos ejemplos, se pueden sintetizar aproximadamente o más de aproximadamente 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000, 1000000, 10000000, 100000000 o más copias de cada oligonucleótido. En algunos casos, se pueden sintetizar menos de 100000000, 10000000, 1000000, 100000, 10000, 1000, 100 o menos copias de un oligonucleótido.

Los oligonucleótidos fosforotioatos (OPS) son oligonucleótidos modificados en los que uno de los átomos de oxígeno en el resto de fosfato se reemplaza por azufre. Generalmente se usan fosforotioatos que tienen azufre en una posición sin puente. Los OPS son sustancialmente más estables frente a la hidrólisis por nucleasas. Esta propiedad hace que un OPS sea un candidato ventajoso para ser utilizado como oligonucleótido antisentido en aplicaciones *in vitro* e *in vivo* que comprenden una amplia exposición a nucleasas. De manera similar, para mejorar la estabilidad del ARNip, a menudo se introduce al menos un enlace fosforotioato en el extremo 3' de las cadenas con sentido y/o antisentido. En algunos ejemplos, los métodos y composiciones de la divulgación se refieren a la síntesis química/de novo de OPS. La síntesis de un gran número de OPS se puede llevar a cabo en paralelo utilizando los métodos y composiciones descritas en el presente documento.

### AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MONOCATENARIOS

En diversos ejemplos, los métodos y sistemas se refieren a la amplificación de ácidos nucleicos monocatenarios. Por consiguiente, se pueden amplificar ácidos nucleicos monocatenarios, por ejemplo, ADN monocatenario (ADNmc) en una muestra aislada, en una pluralidad de muestras en paralelo o en un formato multiplexado que tiene una pluralidad de ácidos nucleicos monocatenarios diferentes dentro de la misma muestra. La pluralidad de muestras que se pueden amplificar en formato paralelo puede ser al menos o aproximadamente al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 50, 55, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o más. La pluralidad de muestras que se pueden amplificar en formato paralelo puede estar entre 1-1000, 2-950, 3-900, 4-850, 5-800, 10-800, 20-750, 25-700, 30-650, 35-600, 40-550, 45-500, 50-450, 55-400, 60-350, 65-250, 70-200, 75-150, 80-100. Los expertos en la materia apreciarán que la pluralidad de muestras que se pueden amplificar en formato paralelo pueden estar entre cualquier intervalo, limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 3-800. El número de reacciones de amplificación multiplexadas puede ser al menos o aproximadamente al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 50, 100 o más. El número de reacciones de amplificación multiplexadas puede estar entre 1-100, 2-50, 3-25, 4-20, 5-10. Los expertos en la materia apreciarán que el número de reacciones de amplificación multiplexadas puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 3-100.

El número de ácidos nucleicos monocatenarios diferentes dentro de la misma muestra puede ser al menos o aproximadamente al menos 1, 2, 3, 10, 50, 100, 150, 200, 1000, 10000, 100000 o más. El número de ácidos nucleicos monocatenarios diferentes dentro de la misma muestra puede ser como máximo o aproximadamente como máximo 10000, 10000, 1000, 200, 150, 100, 50, 10, 3, 2, 1 o menos. El número de ácidos nucleicos monocatenarios diferentes dentro de la misma muestra puede estar entre 1-100000, 2-10000, 3-1000, 10-200, 50-100. Los expertos en la materia apreciarán que el número de ácidos nucleicos monocatenarios diferentes dentro de la misma muestra puede estar entre cualquier intervalo, limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo 3-100.

Los ácidos nucleicos diana monocatenarios pueden tener al menos o aproximadamente al menos 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 3000 o más nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos diana monocatenarios pueden ser de como máximo o aproximadamente como máximo 3000, 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10 o menos, nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos diana monocatenarios pueden tener una longitud de entre 50-500, 75-450 o 100-400 nucleótidos. Los expertos en la materia apreciarán que la longitud de los ácidos nucleicos diana monocatenarios puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo entre 50-1000.

A continuación, con referencia a la figura 64, un ácido nucleico diana monocatenario puede estar flanqueado por una o más secuencias de hibridación de adaptador. Estas secuencias de secuencias de hibridación de adaptador pueden tener al menos o aproximadamente al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos de longitud. Estas secuencias de secuencias de hibridación de adaptador pueden tener al menos o aproximadamente al menos 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 o menos nucleótidos de longitud. Las secuencias de hibridación de adaptador pueden tener entre 15-20, 16-19, 17-18 nucleótidos de longitud. Los expertos en la materia apreciarán que la longitud de las secuencias de hibridación de adaptador puede estar entre un intervalo limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo entre 15-17, 12-20 o 13, 25. Las secuencias de hibridación de adaptador pueden ser compartidas por una pluralidad de ácidos nucleicos dentro de una muestra, en donde dicha pluralidad de ácidos nucleicos monocatenarios tiene regiones de ácidos nucleicos diana monocatenarios variables. Múltiples grupos de ácidos nucleicos monocatenarios, teniendo cada grupo diferentes secuencias de hibridación de adaptador, pueden coexistir dentro de una muestra y someterse a los métodos de amplificación descritos en el presente documento. Las diferentes secuencias de hibridación de adaptador pueden diferir entre sí en al menos o al menos aproximadamente 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos. Las diferentes secuencias de hibridación de adaptador pueden diferir entre sí en como máximo o como máximo aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 o menos nucleótidos. Las diferentes secuencias de hibridación de adaptador pueden diferir entre sí en un número de nucleótidos entre 1-50, 2-45, 5-40, 10-35, 15-25 o 20-30. Los expertos en la materia apreciarán que, las diferentes secuencias de hibridación de adaptador pueden diferir entre sí en un número de nucleótidos que está en cualquier intervalo limitado

- por cualquiera de estos valores, por ejemplo entre 2-50. Por lo tanto, se puede usar un único adaptador universal para varios ácidos nucleicos monocatenarios que comparten secuencias terminales de manera que el adaptador universal se pueda hibridar con todos ellos. Puede usarse una pluralidad de adaptadores en una muestra con una pluralidad de grupos de ácidos nucleicos monocatenarios, en donde cada uno de los adaptadores se puede hibridar con las secuencias finales en uno o más de los grupos. Se pueden usar al menos o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 30, 50, 100 o más adaptadores de una manera multiplexada. Se pueden usar como máximo o aproximadamente como máximo 100, 50, 30, 25, 20, 10, 5, 4, 3, 21, 1 o menos adaptadores de una manera multiplexada. Se pueden usar entre 1-100, 2-50, 3-30, 4-25, 5-20 adaptadores de forma multiplexada. Los expertos en la materia apreciarán que el número de adaptadores que se pueden usar de forma multiplexada puede estar dentro de cualquier intervalo, limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo entre 2-30. Una primera secuencia en un adaptador puede hibridar con el extremo 5' de un ácido nucleico monocatenario y una segunda secuencia en el adaptador puede hibridar con el extremo 3' del mismo ácido nucleico monocatenario, facilitando la circularización del ácido nucleico monocatenario.
- 15 Los ácidos nucleicos monocatenarios se pueden circularizar tras la hibridación con un adaptador. El ácido nucleico monocatenario circularizado puede estar unido en sus extremos 5' y 3', formando un círculo contiguo. Diversos métodos y enzimas de ligamiento son adecuados para la reacción como se describe en otras partes del presente documento y se conocen de otro modo en la técnica.
- 20 El adaptador puede extenderse usando el ácido nucleico monocatenario circularizado como molde. Como alternativa, se pueden usar uno o más cebadores diferentes para hibridar en otra parte del círculo además del adaptador o en lugar del mismo y se pueden extender con una enzima polimerasa. La reacción de extensión, tal como la amplificación de círculo rodante, amplificación de círculo rodante con múltiples cebadores o cualquier otra reacción de extensión adecuada, puede facilitar la creación de un ácido nucleico de amplicón monocatenario largo y lineal que comprende réplicas alternas del ácido nucleico molde monocatenario y las secuencias de hibridación de adaptador. En algunos ejemplos, las réplicas combinadas de las secuencias de hibridación de adaptador son copias de la secuencia del adaptador, o difieren en menos de 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 nucleótidos. Estas secuencias se denominarán en conjunto "copias de adaptador" por facilidad, pero se entiende que pueden referirse a varios tipos diferentes de secuencias generadas a partir de la reacción de extensión utilizando el círculo como molde.
- 30 Pueden proporcionarse uno o más oligonucleótidos auxiliares para hibridar con los ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios. Los oligonucleótidos auxiliares pueden ser parcial o completamente complementarios a las copias del adaptador. La hibridación del oligonucleótido auxiliar con el ácido nucleico de amplicón monocatenario puede formar regiones alternas monocatenarias y bicatenarias. Las regiones monocatenarias pueden corresponder a réplicas de la secuencia de ácido nucleico molde monocatenario. La hibridación del oligonucleótido auxiliar con el ácido nucleico de amplicón monocatenario, por ejemplo, en copias de adaptadores, puede generar sitios de reconocimiento para un agente de escisión, tal como endonucleasas de restricción, por ejemplo, endonucleasas de restricción de Tipo IIS. Las secuencias se pueden diseñar de tal manera que el sitio de corte para el agente de escisión esté en o cerca de la unión de las regiones monocatenarias y bicatenarias. En algunos casos, tras la escisión con uno o más agentes de escisión, se formará una pluralidad de réplicas monocatenarias de los ácidos nucleicos diana monocatenarios, en donde los ácidos nucleicos diana monocatenarios no contienen porciones de las copias del adaptador, o contienen menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos de las copias del adaptador.
- 45 Los oligonucleótidos auxiliares pueden tener una etiqueta de afinidad, tal como biotina o un derivado de biotina. La etiqueta de afinidad puede estar en el extremo 5', en el extremo 3' o en la parte central del oligonucleótido. La purificación de los oligonucleótidos auxiliares de la muestra puede facilitarse utilizando un compañero de unión por afinidad en un medio de purificación, tal como superficies de perlas recubiertas con estreptavidina, o cualquier otro método de purificación por afinidad adecuado. Las copias de adaptador escindidas o una parte de las mismas también se pueden purificar junto con los oligonucleótidos auxiliares, lo cual se facilita por su hibridación con los oligonucleótidos auxiliares. En reacciones multiplexadas utilizando una pluralidad de adaptadores, se puede utilizar una pluralidad de oligonucleótidos auxiliares, cada uno hibridando con un grupo diferente de ácidos nucleicos de amplicón monocatenarios, por ejemplo, en las localizaciones de las copias de adaptador. Pueden usarse métodos de purificación alternativos, tales como purificación por HPLC o PAGE, con o sin oligonucleótidos con etiquetas de afinidad.
- 55 A continuación, con referencia a la figura 65, también pueden amplificarse ácidos nucleicos monocatenarios de forma similar al método descrito en la figura 64, con la excepción de que las secuencias y el agente de escisión se seleccionan de manera que el sitio de corte esté dentro de las copias de adaptador de manera que se formen réplicas monocatenarias de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria con regiones flanqueantes. Tales regiones flanqueantes pueden ser complementos inversos de las regiones flanqueantes de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenario original. Como alternativa, dependiendo de la localización exacta del sitio de corte, pueden "desplazar" nucleótidos de una región flanqueante a la otra. En estos casos, un oligonucleótido complementario inverso al nucleótido adaptador todavía puede hibridar eficazmente en ambos extremos facilitando otra ronda de circularización. Por lo tanto, el método ilustrado en la figura 65 se puede repetir una pluralidad de veces, tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más veces, solo o como una reacción precursora del método ilustrado en la figura 64, para amplificar el ácido nucleico diana monocatenario.

El método ilustrado en la figura 64 se puede utilizar como última ronda para deshacerse de las regiones flanqueantes, dejando copias o réplicas monocatenarias amplificadas de los ácidos nucleicos diana monocatenarios.

5 El producto de la reacción de extensión, tal como un producto de amplificación de círculo rodante, que comprende unidades repetidas monocatenarias de oligonucleótidos deseados amplificadas y oligonucleótidos adaptadores, puede escindirse dentro o cerca de los oligonucleótidos adaptadores para generar oligonucleótidos deseados liberados, en donde los oligonucleótidos deseados liberados pueden comprender o no nucleótidos adaptadores en los extremos 5' o 3' del oligonucleótido deseado. En algunos ejemplos, la escisión se realiza en la misma unión de las unidades repetidas monocatenarias de oligonucleótidos deseados amplificadas y secuencias adaptadoras. En algunos ejemplos, una o más regiones de una secuencia adaptadora comprenden un código de barras molecular, sitio de unión a proteínas, sitio de endonucleasa de restricción o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el producto de amplificación se escinde con una o más endonucleasas de restricción en o cerca de un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción, en donde el sitio de reconocimiento está localizado dentro de una secuencia de oligonucleótidos de adaptador. Antes de la escisión con una endonucleasa, el producto de amplificación se puede hibridar con un oligonucleótido auxiliar que comprende una secuencia complementaria a la secuencia de oligonucleótidos de adaptador que comprende el sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción.

20 El producto de amplificación se puede escindir en el extremo 5' de un sitio de reconocimiento mediante endonucleasas de Tipo II. El sitio de corte puede estar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 nucleótidos o más cadena arriba del primer nucleótido del sitio de reconocimiento. El extremo 5' o 3' de un sitio de reconocimiento puede formar un saliente de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos. Las endonucleasas romas de tipo II que se escinden con un saliente de 0 nucleótidos incluyen MlyI y SclI. Las endonucleasas de tipo IIS ejemplares que generan salientes 5' (por ejemplo, salientes de 1, 2, 3, 4, 5 nucleótidos) incluyen, pero sin limitación, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PfuI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BsfFI, BsoMAI, Bst71I, FagI, AceII, BbvII, BveI y LglI. Las endonucleasas de mellado (nicking) que eliminan el sitio de reconocimiento y escinden en el sitio 5' del sitio de reconocimiento incluyen, pero sin limitación Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TspI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl11081 y UbaPI.

30 El producto de amplificación se puede escindir mediante endonucleasas que no son de tipo IIS que escinden en el extremo 5' del sitio de reconocimiento en ambas cadenas para generar un extremo romo. El producto de amplificación puede escindirse por endonucleasas que no son de tipo IIS que escinden en el extremo 5' del sitio de reconocimiento en una cadena y en la parte central del sitio de reconocimiento en la otra cadena, generando un saliente 5'. Los ejemplos de endonucleasas que generan un saliente 5' incluyen, pero sin limitación, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjiI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI y Psp6I.

40 El producto de amplificación puede escindirse mediante el mellado de endonucleasas que escinden en el extremo 5' de un sitio de reconocimiento para producir una mella. El sitio de mellado puede estar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 nucleótidos o más cadena arriba del primer nucleótido del sitio de reconocimiento. Los ejemplos de endonucleasas de mellado incluyen, pero sin limitación, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TspI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl11081 y UbaPI.

45 El producto de amplificación puede escindirse en el extremo 3' de un sitio de reconocimiento por endonucleasas de Tipo IIS. El extremo 5' o 3' de un sitio de reconocimiento puede formar un saliente de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos. El sitio de corte puede estar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 nucleótidos o más cadena abajo del último nucleótido del sitio de reconocimiento. Las endonucleasas de tipo IIS que escinden en 0 nucleótidos cadena abajo del último nucleótido del sitio de reconocimiento incluyen MlyI y SclI. Las endonucleasas de tipo IIS ejemplares que generan salientes 3' (por ejemplo, salientes de 1, 2, 3, 4, 5 nucleótidos) incluyen, pero sin limitación, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, Bmul, BsbI y BscCI. Las endonucleasas que no son de tipo II que eliminan el sitio de reconocimiento en una cadena y generan un saliente 3' o un extremo romo en la otra cadena incluyen, pero sin limitación NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI y TseFI. Las endonucleasas de mellado que eliminan el sitio de reconocimiento y cortan en el extremo 3' del sitio de reconocimiento incluyen Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI y Nt.BspQI.

55 La distancia entre el sitio de reconocimiento y el sitio de escisión puede depender de la endonucleasa de restricción utilizada para la escisión. Por ejemplo, Las endonucleasas de restricción con sitios de corte localizados 1 par de bases cadena abajo o cadena arriba de un sitio de reconocimiento que pueden escindirse de manera eficaz en condiciones óptimas de reacción incluyen, pero sin limitación, AgeI, ApaI, AscI, BmtI, BsaI, BsmBI, BsrGI, DdeI, DraIII, HpaI, MseI, PaeI, PciI, PmeI, PvuI, SacII, SapI, Sau3AI, Scal, SfiI, SmaI, SphI, StuI y XmaI. Las endonucleasas de restricción con sitios de corte localizados 2 par de bases cadena abajo o cadena arriba de un sitio de reconocimiento que pueden escindirse de manera eficaz en condiciones óptimas de reacción incluyen, pero sin limitación, AgeI, AluI, ApaI, AscI, BglII, BmtI, BsaI, BsiWI, BsmBI, BsrGI, BssHII, DdeI, DraIII, EagI, HpaI, KpnI, MseI, NlaIII, PaeI, PciI, PmeI, PstI, PvuI, RsaI, SacII, SapI, Sau3AI, SbfI, Scal, SfiI, SmaI, SphI, SspI, StuI, StylI y XmaI. Las endonucleasas de restricción con sitios de corte localizados 3 par de bases cadena abajo o cadena arriba de un sitio de reconocimiento que pueden escindirse de manera eficaz en condiciones óptimas de reacción incluyen, pero sin limitación, AgeI, AluI, ApaI, AscI,

AvrII, BamHI, BglIII, BmtI, BsaI, BsiWI, BsmBI, BsrGI, BssHII, DdeI, DraIII, EagI, FseI, HindIII, HpaI, KpnI, MfeI, MluI, MseI, NcoI, NdeI, NheI, NlaIII, NsiI, PaeI, PciI, PmeI, PstI, RsaI, SacI, SacII, SalI, SapI, Sau3AI, SbfI, ScaI, SfiI, SmaI, SphI, SspI, StuI, StyI y XmaI. Las endonucleasas de restricción con sitios de corte localizados 4 par de bases cadena abajo o cadena arriba de un sitio de reconocimiento que pueden escindirse de manera eficaz en condiciones óptimas de reacción incluyen, pero sin limitación, Agel, AluI, ApaI, AscI, AvrII, BamHI, BglIII, BmtI, BsaI, BsiWI, BsmBI, BsrGI, BssHII, ClaI, DdeI, DraIII, EagI, EcoRI, FseI, HindIII, HpaI, KpnI, MfeI, MluI, MseI, NcoI, NdeI, NheI, NlaIII, NsiI, PaeI, PciI, PmeI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, SacI, SacII, SalI, SapI, Sau3AI, SbfI, ScaI, SfiI, SmaI, SphI, SspI, StuI, StyI, XhoI y XmaI.

La secuencia adaptadora puede comprender uno o más sitios de reconocimiento de restricción. En algunos ejemplos, el sitio de reconocimiento tiene al menos 4, 5 o 6 pares de bases de longitud. En algunos ejemplos, el sitio de reconocimiento no es palindrómico. En algunos ejemplos, el oligonucleótido adaptador comprende dos o más sitios de reconocimiento. Se pueden escindir dos o más sitios de reconocimiento con una o más enzimas de restricción. Un experto en la materia sabrá que la escisión de dos o más sitios de reconocimiento con dos o más enzimas de restricción se puede conseguir y/o perfeccionar mediante la optimización del tampón y la temperatura de reacción. Pares ejemplares de sitios de reconocimiento en una secuencia adaptadora incluyen, pero sin limitación, MlyI-MlyI, MlyI-Nt.AlwI, BsaI-MlyI, MlyI-BciVI y BfuCI-MlyI.

### Genes

Los métodos y composiciones de la divulgación en diversos ejemplos permiten la construcción de genotecas que comprenden una colección de polinucleótidos de interés accesibles individualmente. Los polinucleótidos pueden ser lineales, pueden estar contenidos en vectores (por ejemplo, plásmido o fago), células (por ejemplo, células bacterianas), como ADN purificado, o en otras formas adecuadas conocidas en la técnica. Los miembros de la biblioteca (conocidos como clones, construcciones, polinucleótidos, etc.) se pueden almacenar de diversas formas para su recuperación y uso, incluyendo, por ejemplo, en cultivos multipocillo o placas de microtitulación, en viales, en un entorno celular adecuado (por ejemplo, células de *E. coli*), como composiciones de ADN purificado en medios de almacenamiento adecuados (por ejemplo, la tarjeta de biblioteca de ADN Storage IsoCodeD IDTM; Schleicher & Schuell BioScience), o una diversidad de otras formas de biblioteca adecuadas conocidas en la técnica. Una genoteca puede comprender al menos aproximadamente 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7500, 10000, 15000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 75000, 100000 miembros o más. Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento se pueden producir en cantidades a microescala (por ejemplo, cantidades de femtomoles a nanomoles, tales como de aproximadamente 0,001 femtomoles a aproximadamente 1,0 nanomol, de aproximadamente 0,01 femtomoles a aproximadamente 1,0 nanomol, de aproximadamente 0,1 femtomoles a aproximadamente 1,0 nanomol, de aproximadamente 0,001 femtomoles a aproximadamente 0,1 nanomol, de aproximadamente 0,001 femtomoles a aproximadamente 0,01 nanomol, de aproximadamente 0,001 femtomoles a aproximadamente 0,01 nanomol, de aproximadamente 0,001 femtomoles a aproximadamente 1,0 femtomoles a aproximadamente 1,0 nanomol, de aproximadamente 1,0 femtomoles a aproximadamente 0,1 nanomol, de aproximadamente 1,0 femtomoles a aproximadamente 0,01 nanomol, de aproximadamente 1,0 femtomoles a aproximadamente 0,001 nanomol, de aproximadamente 10 femtomoles a aproximadamente 1,0 nanomol, de aproximadamente 10 femtomoles a aproximadamente 0,001 nanomol, de aproximadamente 20 femtomoles a aproximadamente 1,0 nanomol, de aproximadamente 100 femtomoles a aproximadamente 1,0 nanomol, de aproximadamente 500 femtomoles a aproximadamente 1,0 nanomol, de aproximadamente 1 nanomol a aproximadamente 800 nanomoles, de aproximadamente 40 nanomoles a aproximadamente 800 nanomoles, de aproximadamente 100 nanomoles a aproximadamente 800 nanomoles, de aproximadamente 200 nanomoles a aproximadamente 800 nanomoles, de aproximadamente 500 nanomoles a aproximadamente 800 nanomoles, de aproximadamente 100 nanomoles a aproximadamente 1.000 nanomoles, etc.). Los expertos en la materia apreciarán que la cantidad de ácido nucleico puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores (por ejemplo, de aproximadamente 0,001 femtomoles a aproximadamente 1000 nanomoles o de aproximadamente 0,001 femtomoles a aproximadamente 0,01 femtomoles). En general, las moléculas de ácido nucleico se pueden producir en cantidades de aproximadamente o más de aproximadamente 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, femtomoles, 1, 10, 100 picomoles, 1, 10, 100 nanomoles, 1 micromol o más. En algunos ejemplos, Las moléculas de ácido nucleico se pueden producir en cantidades inferiores a aproximadamente 1 micromol, 100, 10, 1 nanomoles, 100, 10, 1 picomoles, 100, 10, 1, 0,1, 0,001, 0,001 femtomoles o menos. En algunos ejemplos, Las moléculas de ácido nucleico se pueden producir a concentraciones de aproximadamente o más de aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000 nM. En algunos ejemplos, la genoteca se sintetiza/ensambla y/o se mantiene en un espacio de menos de 1000, 100, 10, 1 m<sup>3</sup>, 100, 10, 1 dm<sup>3</sup>, 100, 10, 1 cm<sup>3</sup>, o menos.

La localización de los miembros accesibles individualmente puede estar disponible o determinarse fácilmente. Los miembros accesibles individualmente se pueden recuperar fácilmente de la biblioteca.

En diversos ejemplos, los métodos y composiciones de la divulgación permiten la producción de genes sintéticos (es decir, sintetizados de novo). Se pueden construir bibliotecas que comprenden genes sintéticos mediante una diversidad de métodos descritos con más detalle en otras partes del presente documento, tales como PCA, métodos de ensamblaje de genes que no son PCA o ensamblaje de genes jerárquico, combinación ("sutura") de dos o más polinucleótidos bicatenarios (denominados en el presente documento "sintones") para producir unidades de ADN más grandes (es decir, multisintones o chasis). Las bibliotecas de construcciones grandes pueden incluir polinucleótidos que son de al menos 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500 kb de longitud o más largas. Las construcciones grandes pueden estar limitadas por un límite superior seleccionado independientemente de aproximadamente 5000, 10000, 20000 o 50000 pares de bases. La síntesis de cualquier número de secuencias de nucleótidos que codifican segmentos polipeptídicos, incluidas secuencias que codifican péptidos no ribosómicos (NRP), secuencias que codifican módulos de péptido sintetasa no ribosómicos (NRPS) y variantes sintéticas, segmentos polipeptídicos de otras proteínas modulares, tales como anticuerpos, segmentos polipeptídicos de otras familias de proteínas, incluyendo ADN o ARN no codificante, tales como secuencias reguladoras, por ejemplo, promotores, factores de transcripción, potenciadores, ARNip, ARNhc, ARNi, miARN, ARN nucleolar pequeño derivado de microARN, o cualquier unidad de ADN o ARN funcional o estructural de interés. El término "gen", como se usa en el presente documento, se refiere en sentido amplio a cualquier tipo de polinucleótido largo o análogo de polinucleótido codificante o no codificante.

En diversos ejemplos, los métodos y composiciones de la divulgación se refieren a una genoteca. La genoteca puede comprender una pluralidad de subsegmentos. En uno o más subsegmentos, los genes de la biblioteca pueden estar unidos covalentemente. En uno o más subsegmentos, los genes de la biblioteca pueden codificar componentes de una primera ruta metabólica con uno o más productos finales metabólicos. En uno o más subsegmentos, los genes de la biblioteca pueden seleccionarse basándose en el proceso de fabricación de uno o más productos finales metabólicos establecidos como diana. Dichos uno o más productos metabólicos finales comprenden un biocombustible. En uno o más subsegmentos, los genes de la biblioteca pueden codificar componentes de una segunda ruta metabólica con uno o más productos finales metabólicos. Dichos uno o más productos finales de la primera y segunda rutas metabólicas pueden comprender uno o más productos finales compartidos. En algunos casos, la primera ruta metabólica comprende un producto final que se manipula en la segunda ruta metabólica.

En algunos ejemplos, un subsegmento de la biblioteca puede comprender, consistir en o consistir esencialmente en genes que codifican una parte o todo el genoma de un organismo sintético, por ejemplo, un virus o una bacteria. Por lo tanto, los términos "gen", "polinucleótido", "nucleótido", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a un polímero de nucleótidos. A menos que se limite de otra forma, los mismos incluyen análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de una manera similar (por ejemplo, hibridar) a los nucleótidos de origen natural. Pueden ser de forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento de gen, ADN intergénico, loci (locus) definidos a partir del análisis de enlaces, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc), microARN (miARN), ARN nucleolar pequeño, ribozimas, ADN complementario (ADNc), que es una representación de ADN de ARNm, generalmente obtenido por transcripción inversa de ARN mensajero (ARNm) o por amplificación; moléculas de ADN producidas sintéticamente o por amplificación, ADN genómico, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si está presente, pueden impartirse modificaciones a la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcado. Las secuencias polinucleotídicas, cuando se proporcionan, se enumeran en la dirección 5 'a 3', a menos que se indique lo contrario.

El término ácido nucleico abarca ácidos nucleicos bicatenarios o tricatenarios, así como moléculas monocatenarias. En ácidos nucleicos bicatenarios o tricatenarios, las cadenas de ácido nucleico no necesitan ser coextensivas (es decir, no es necesario que un ácido nucleico bicatenario sea bicatenario a lo largo de toda la longitud de ambas cadenas).

El término ácido nucleico también abarca cualquier modificación química del mismo, tal como por metilación y/o por tapado. Las modificaciones de ácidos nucleicos pueden incluir la adición de grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y funcionalidad con las bases de ácido nucleico individuales o con el ácido nucleico en su conjunto. Estas modificaciones pueden incluir modificaciones de base tales como modificaciones de azúcar en la posición 2', modificaciones de pirimidina en posición 5, modificaciones de purina en posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas de citosina, sustituciones de 5-bromo-uracilo, modificaciones de la cadena principal, combinaciones de pares de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina, y similares.

Más particularmente, en determinados ejemplos, los ácidos nucleicos, pueden incluir polidesoxirribonucleótidos (que

- contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y cualquier otro tipo de ácido nucleico que sea un N- o C-glucósido de una base de purina o pirimidina, así como otros polímeros que contienen cadenas principales no nucleotídicas, por ejemplo, poliamida (por ejemplo, ácidos peptidonucleicos (PNA)) y polímeros de polimorfolino (disponible comercialmente de Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oreg., como Neugene) y otros polímeros sintéticos de ácido nucleico específicos de secuencia, siempre que los polímeros contengan nucleobases en una configuración que permita la formación de pares de bases y el apilamiento de bases, tal como la que se encuentra en el ADN y el ARN. El término ácido nucleico también abarca ácidos nucleicos enlazados (LNA), que se describen en la Patentes de Estados Unidos N.º 6.794.499, 6.670.461, 6.262.490 y 6.770.748.
- 5
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "complementario" se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos nucleótidos. Si un nucleótido en una posición dada de un ácido nucleico es capaz de formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido de otro ácido nucleico, entonces los dos ácidos nucleicos se consideran complementarios entre sí en esa posición. La complementariedad entre dos moléculas de ácido nucleico monocatenario puede ser "parcial", en la que solo se unen algunos de los nucleótidos, o puede ser completa cuando existe una complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácidos nucleicos tiene efectos significativos sobre la eficacia y la fuerza de la hibridación entre las cadenas de ácidos nucleicos.
- 15
- "Hibridación" y "templado" se refieren a una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de los restos de nucleótidos. El enlace de hidrógeno se puede producir por la formación de pares de bases de Watson Crick, la unión de Hoogsteen, o de cualquier otra forma específica de secuencia. El complejo puede comprender dos cadenas que forman una estructura dúplex, tres o más cadenas que forman un complejo de múltiples cadenas, una sola cadena autohibridante, o cualquier combinación de las mismas. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un proceso más extenso, tal como el inicio de una PCR u otras reacciones de amplificación, o la escisión enzimática de un polinucleótido por una ribozima. Se dice que una primera secuencia que puede estabilizarse mediante enlaces de hidrógeno con las bases de los restos de nucleótidos de una segunda secuencia es "hibrizable" con dicha segunda secuencia. En tal caso, también se puede decir que la segunda secuencia puede hibridar con la primera secuencia.
- 20
- 25
- 30 El término "hibridado" aplicado a un polinucleótido se refiere a un polinucleótido en un complejo que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de los restos de nucleótidos. El enlace de hidrógeno se puede producir por la formación de pares de bases de Watson Crick, la unión de Hoogsteen, o de cualquier otra forma específica de secuencia. El complejo puede comprender dos cadenas que forman una estructura dúplex, tres o más cadenas que forman un complejo de múltiples cadenas, una sola cadena autohibridante, o cualquier combinación de las mismas. La reacción de hibridación puede constituir una etapa en un proceso más extenso, tal como el inicio de una reacción de PCR o la escisión enzimática de un polinucleótido por una ribozima. Una secuencia hibridada con una secuencia dada se denomina "complemento" de la secuencia dada.
- 35
- "Hibridación específica" se refiere a la unión de un ácido nucleico a una secuencia de nucleótidos diana en ausencia de unión sustancial a otras secuencias de nucleótidos presentes en la mezcla de hibridación en condiciones de rigurosidad definidas. Los expertos en la materia reconocen que relajar la rigurosidad de las condiciones de hibridación permite tolerar errores de apareamiento de secuencias.
- 40
- En general, un "complemento" de una secuencia dada es una secuencia que es completa o sustancialmente complementaria e hibrizable con la secuencia dada. En general, una primera secuencia que se puede hibridar con una segunda secuencia o conjunto de segundas secuencias es específica o selectivamente hibrizable con la segunda secuencia o conjunto de segundas secuencias, de tal modo que se prefiere la hibridación con la segunda secuencia o conjunto de segundas secuencias (por ejemplo, termodinámicamente más estable en un conjunto dado de condiciones, tales como condiciones rigurosas comúnmente utilizadas en la técnica) a la hibridación con secuencias no diana durante una reacción de hibridación. Normalmente, Las secuencias hibrizables comparten un grado de complementariedad de secuencias en la totalidad o una porción de sus longitudes respectivas, tal como entre el 25 % y el 100 % de complementariedad, incluyendo al menos aproximadamente el 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y 100 % de complementariedad de secuencia.
- 45
- 50
- 55 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido con capacidad de hibridación (también denominado "templado") con un ácido nucleico y que sirve como sitio de inicio para la polimerización de nucleótidos (ARN o ADN) en condiciones apropiadas (es decir, en presencia de cuatro diferentes nucleósido trifosfatos y un agente de polimerización, tal como ADN o ARN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. La longitud adecuada de un cebador depende del uso previsto del cebador, pero los cebadores típicamente tienen al menos 7 nucleótidos de longitud y, más típicamente, varían de 10 a 30 nucleótidos o, incluso más típicamente, de 15 a 30 nucleótidos, de longitud. Otros cebadores pueden ser algo más largos, por ejemplo, de 30 a 50 o 40-70 nucleótidos de longitud. Los expertos en la materia apreciarán que la longitud del cebador puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores (por ejemplo, de 7 a 70 o de 50 a 70). Pueden utilizarse oligonucleótidos de diversas longitudes, como se describe adicionalmente en el presente documento, como cebadores o bloques de construcción para reacciones de amplificación y/o ensamblaje de genes. En este contexto, "longitud del
- 60
- 65

cebador" se refiere a la parte de un oligonucleótido o ácido nucleico que hibrida con una secuencia "diana" complementaria y ceba la síntesis de nucleótidos. Las moléculas de cebador cortas generalmente requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. No es necesario que un cebador refleje la secuencia exacta del molde, pero debe ser suficientemente complementario como para hibridar con un molde. La expresión "sitio del cebador" o "sitio de unión del cebador" se refiere al segmento del ácido nucleico diana con el que se hibrida un cebador. Una construcción que presenta un sitio de unión del cebador a menudo se denomina "construcción lista para cebado" o "construcción lista para amplificación".

Se dice que un cebador hibrida con otro ácido nucleico si el cebador, o una porción del mismo, hibrida con una secuencia de nucleótidos dentro del ácido nucleico. La afirmación de que un cebador hibrida con una secuencia de nucleótidos particular no pretende implicar que el cebador hibride completa o exclusivamente con esa secuencia de nucleótidos.

### Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintetizados en los sustratos descritos en el presente documento pueden comprender más de aproximadamente 100, preferentemente más de aproximadamente 1000, más preferentemente más de aproximadamente 16.000 y aún más preferentemente más de 50.000 o 250.000 o incluso más de aproximadamente 1.000.000 sondas oligonucleotídicas diferentes, preferentemente en menos de 20, 10, 5, 1, 0,1 cm<sup>2</sup>, o un área de superficie más pequeña.

En diversos ejemplos se describe adicionalmente en el presente documento un método para sintetizar rápidamente oligonucleótidos de n unidades, tales como de al menos aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350 o más nucleótidos. El método puede usar un sustrato con loci resueltos que están funcionalizados con un resto químico adecuado para el acoplamiento de nucleótidos. En algunos casos puede utilizarse la química de la fosforamidita convencional. Por consiguiente, al menos dos bloques de construcción se acoplan a una pluralidad de cadenas de oligonucleótido en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad rápida, tal como una velocidad de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 nucleótidos por hora, o más. En algunos ejemplos, se usan bloques de construcción de adenina, guanina, timina, citosina o uridina, o análogos/versiones modificadas de los mismos, como se describe con más detalle en otras partes del presente documento. En algunos casos, los bloques de construcción añadidos comprenden dinucleótidos, trinucleótidos o bloques de construcción basados en nucleótidos más largos, tales como bloques de construcción que contienen aproximadamente o al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos. En algunos ejemplos, se sintetizan bibliotecas grandes de oligonucleótidos de n unidades en paralelo en el sustrato, por ejemplo, un sustrato con aproximadamente o al menos aproximadamente 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000 loci resueltos que albergan la síntesis de oligonucleótidos. Loci individuales pueden albergar la síntesis de oligonucleótidos que son diferentes entre sí. En algunos ejemplos, durante el flujo de la química de la fosforamidita, por ejemplo, un proceso con etapas de acoplamiento, tapado, oxidación y desbloqueo, puede controlarse de forma precisa la dosificación de reactivo mediante ciclos de flujo continuo/de desplazamiento de líquidos y etapas de secado al vacío, tales como una etapa de secado al vacío antes del acoplamiento de nuevos bloques de construcción. El sustrato puede comprender vías, tales como al menos aproximadamente 100, 1000, 10000, 100000, 1000000 o más vías que proporcionan comunicación fluida entre una primera superficie del sustrato y una segunda superficie del sustrato. Los sustratos pueden mantenerse en su sitio durante una o todas las etapas dentro de un ciclo de química de fosforamidita y pueden pasarse reactivos de flujo a través del sustrato.

Un método común para la preparación de ácidos nucleicos sintéticos se basa en el trabajo fundamental de Caruthers y se conoce como el método de la fosforamidita (M. H. Caruthers, *Methods in Enzymology* 154, 287-313, 1987). La secuencia de las moléculas resultantes puede controlarse por el orden de síntesis. Otros métodos, tales como el método del H-fosfonato, tienen el mismo propósito de síntesis sucesiva de un polímero a partir de sus subunidades.

Normalmente, la síntesis de oligómeros de ADN por los métodos de la divulgación puede conseguirse mediante la química de la fosforamidita tradicional. La síntesis química basada en fosforamidita de ácidos nucleicos es bien conocida por los expertos en la materia, revisándose en Streyer, *Biochemistry* (1988) pp 123-124 y en la Patente de Estados Unidos N.º 4.415.732, incorporados en el presente documento por referencia. Los reactivos de fosforamidita, entre los que se incluyen monómeros de B-cianoetil (CE) fosforamidita y CPG (vidrio poroso controlado) como reactivos utilizables con la divulgación pueden adquirirse en numerosas fuentes comerciales, entre las que se incluyen American International Chemical (Natick Mass.), BD Biosciences (Palo Alto Calif.), y otras.

En diversos ejemplos, la síntesis química de ácidos nucleicos se realiza de forma contundente usando variaciones de la química de la fosforamidita en superficies sólidas (Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites-a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1981;22:1859-1862; Caruthers MH. Gene synthesis machines - DNA chemistry and its uses. *Science.* 1985;230:281-285.)

Por ejemplo, pueden usarse métodos basados en fosforamidita para sintetizar modificaciones abundantes de base,

cadena principal y azúcar de ácidos desoxirribonucleicos y ribonucleicos, así como análogos de ácidos nucleicos (Beaucage SL, Iyer RP. *Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach*. *Tetrahedron*. 1992;48:2223-2311; Beigelman L, Matulic-Adamic J, Karpeisky A, Haeberli P, Sweedler D. Base-modified phosphoramidite analogs of pyrimidine ribonucleosides for RNA structure-activity studies. *Methods Enzymol*. 2000;317:39-65; Chen X, Dudgeon N, Shen L, Wang JH. Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development. *Drug Discov. Today*. 2005;10:587-593; Pankiewicz KW. Fluorinated nucleosides. *Carbohydrate Res*. 2000;327:87-105; Lesnikowski ZJ, Shi J, Schinazi RF. Nucleic acids and nucleosides containing carboranes. *J. Organometallic Chem*. 1999;581:156-169; Foldesi A, Trifonova A, Kundu MK, Chattopadhyaya J. The synthesis of deuterionucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2000;19:1615-1656; Leumann CJ. DNA Analogues: from supramolecular principles to biological properties. *Bioorg. Med. Chem*. 2002;10:841-854; Petersen M, Wengel J. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol*. 2003;21:74-81; De Mesmaeker A, Altmann K-H, Waldner A, Wendeborn S. Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 1995;5:343-355).

La química de la fosforamidita se ha adaptado para la síntesis in situ de ADN en sustratos sólidos, por ejemplo, micromatrices. esta síntesis se consigue típicamente por control espacial de una etapa del ciclo de síntesis, que tiene como resultado de miles a cientos de miles de oligonucleótidos únicos distribuidos en un área pequeña, por ejemplo, un área de pocos centímetros cuadrados. Las áreas y arquitecturas de sustratos para la síntesis de oligonucleótidos se describe adicionalmente en otras partes del presente documento con más detalle. Los métodos adecuados usados para conseguir control espacial pueden incluir (i) control de la etapa de acoplamiento mediante impresión de inyección de tinta (Agilent, Protogene; Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, *et al*. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat. Biotechnol*. 2001;19:342-347; Butler JH, Cronin M, Anderson KM, Biddison GM, Chatelain F, Cummer M, Davi DJ, Fisher L, Frauendorf AW, Frueh FW, *et al*. In situ synthesis of oligonucleotide arrays by using surface tension. *J. Am. Chem. Soc*. 2001;123:8887-8894) o máscaras físicas (Southern EM, Maskos U, Elder JK. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics*. 1992;13:1008-1017.), (ii) control de la etapa de desbloqueo del extremo 5'-hidroxilo por desprotección fotolitográfica clásica (Affymetrix; Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SPA. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid dna-sequence analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1994;91:5022-5026.) y sin máscara (Nimblegen; Singh-Gasson S, Green RD, Yue YJ, Nelson C, Blattner F, Sussman MR, Cerrina F. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat. Biotechnol*. 1999;17:974-978) de monómeros fotolábiles o (iii) activación digital de ácidos fotogenerados para realizar destrilación convencional (Xeotron/Atactic; Gao XL, LeProust E, Zhang H, Srivannavit O, Gulari E, Yu PL, Nishiguchi C, Xiang Q, Zhou XC. A flexible light-directed DNA chip synthesis gated by deprotection using solution photogenerated acids. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:4744-4750), todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Los oligonucleótidos obtenidos en sustratos pueden escindirse de su superficie sólida y opcionalmente agruparse para permitir nuevas aplicaciones tales como, ensamblaje de genes, amplificación de ácidos nucleicos, bibliotecas de secuenciación, bibliotecas de ARNhc, etc. (Cleary MA, Kilian K, Wang YQ, Bradshaw J, Cavet G, Ge W, Kulkarni A, Paddison PJ, Chang K, Sheth N, *et al*. Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. *Nature Methods*. 2004;1:241-248), síntesis génica (Richmond KE, Li MH, Rodesch MJ, Patel M, Lowe AM, Kim C, Chu LL, Venkataramaian N, Flickinger SF, Kaysen J, *et al*. Amplification and assembly of chip-eluted DNA (AACED): a method for high-throughput gene synthesis. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:5011-5018; Tian JD, Gong H, Sheng NJ, Zhou XC, Gulari E, Gao XL, Church G. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. *Nature*. 2004;432:1050-1054) y mutagénesis dirigida (Saboulard D, Dugas V, Jaber M, Broutin J, Souteyrand E, Sylvestre J, Delcourt M. High-throughput site-directed mutagenesis using oligonucleotides synthesized on DNA chips. *BioTechniques*. 2005;39:363-368), todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

La síntesis satisfactoria de oligonucleótidos largos de alta calidad se soporta fuertemente por altos rendimientos de acoplamiento por etapas, por ejemplo, rendimientos de acoplamiento por etapas que son de al menos aproximadamente el 99,5 %. En diversos ejemplos, los métodos y composiciones de la divulgación contemplan un rendimiento de acoplamiento de más del 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,96 %, 99,97 %, 99,98 %, 99,99 % o superior. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, si la eficacia de acoplamiento es inferior, por ejemplo, inferior al 99 %, el impacto sobre la integridad de la secuencia típicamente sigue uno de dos escenarios. Si se usa tapado, la baja eficacia de acoplamiento puede evidenciarse por secuencias cortas truncadas. Si no se usa tapado o si el tapado no es satisfactorio, se producirán deleciones de una sola base en el oligonucleótido y, como consecuencia, se formará un gran número de secuencias con fallos que carecen de uno o dos nucleótidos. La eliminación eficaz del grupo protector del 5'-hidroxilo soporta adicionalmente la síntesis de oligonucleótidos largos de alta calidad a rendimientos deseablemente elevados, tales como a eficacias muy altas que se aproximan al 100 % dentro de cada ciclo, por ejemplo, mayores o iguales al 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,96 %, 99,97 %, 99,98 %, 99,99 % o superior. Esta etapa puede optimizarse con el control preciso de la dosificación de reactivos así como otros parámetros ambientales, usando los métodos y composiciones descritos en el presente documento, evitando mezclas de producto final que comprenden una familia de oligómeros con deleciones de una sola base además del producto deseado.

Además, para la síntesis de oligonucleótidos largos, es importante minimizar la reacción secundaria más prevalente-despurinación (Carr PA, Park JS, Lee YJ, Yu T, Zhang SG, Jacobson JM. Protein-mediated error correction for de novo dna synthesis. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32:e162). La despurinación tiene como resultado la formación de un sitio abásico que típicamente no interfiere con la extensión de la cadena. Se producen lesiones críticas del ADN durante la desprotección final de nucleobases en condiciones básicas, que también escinde las cadenas oligonucleotídicas en sitios abásicos. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la despurinación puede afectar a la integridad de la secuencia mediante la generación de secuencias cortas truncadas que típicamente pueden localizarse en nucleobases de purina. Por lo tanto, la síntesis de oligonucleótidos de alto rendimiento y alta calidad se soporta mediante el control de la despurinación combinado con las reacciones altamente eficaces de acoplamiento y desprotección del 5'-hidroxilo. Con altos rendimientos de acoplamiento y baja despurinación, pueden sintetizarse oligonucleótidos largos de alta calidad sin la necesidad de una amplia purificación y/o amplificación por PCR para compensar el bajo rendimiento. Los métodos y composiciones de la divulgación en diversos ejemplos proporcionan condiciones para conseguir estos altos rendimientos de acoplamiento, baja despurinación y eliminación eficaz de grupos protectores.

En diversos ejemplos, los métodos y composiciones de la divulgación descritos en el presente documento se basan en la química de la fosforamidita convencional sobre un sustrato funcionalizado, por ejemplo, una oblea sililada, usando opcionalmente modificaciones adecuadas, conocidas en la técnica. Normalmente, después de la deposición de un monómero, por ejemplo, un mononucleótido, un dinucleótido o un oligonucleótido más largo con modificaciones adecuadas para la química de la fosforamidita, pueden realizarse una o más de las siguientes etapas al menos una vez para conseguir la síntesis por etapas de polímeros de alta calidad in situ: 1) Acoplamiento, 2) Tapado, 3) Oxidación, 4) Sulfurización, 5) Desbloqueo (destritilación) y 6) Lavado. Normalmente, se usará oxidación o sulfurización como una de las etapas, pero no ambas. La figura 11 ejemplifica un método de síntesis de fosforamidita de cuatro etapas que comprende etapas de acoplamiento, tapado, oxidación y desbloqueo.

El alargamiento de un oligodesoxinucleótido en crecimiento puede conseguirse mediante adiciones posteriores de bloques de construcción de fosforamidita normalmente a través de la formación de un enlace internucleotídico fosfato triéster. Durante la etapa de acoplamiento, puede activarse una solución de bloques de construcción de fosforamidita, por ejemplo, nucleósido fosforamidita (o una mezcla de varias fosforamiditas), normalmente a una concentración 0,02-0,2 M, en acetonitrilo, por ejemplo, mediante una solución de un catalizador ácido de azol, 1H-tetrazol, 2-etiltiotetrazol (Sproat *et al.*, 1995, "An efficient method for the isolation and purification of oligoribonucleotides". *Nucleosides & Nucleotides* 14 (1&2): 255-273), 2-benciltiotetrazol (Stutz *et al.*, 2000, "Novel fluoride-labile nucleobase-protecting groups for the synthesis of 3'(2')-O-amino-acylated RNA sequences", *Helv. Chim. Acta* 83 (9): 2477-2503; Welz *et al.*, 2002, "5-(Benzylmercapto)-1H-tetrazole as activator for 2'-O-TBDMS phosphoramidite building blocks in RNA synthesis", *Tetrahedron Lett.*, 43 (5): 795-797), 4,5-dicianoimidazol (Vargeese *et al.*, 1998, "Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4,5-dicyanoimidazole during oligonucleotide synthesis", *Nucl. Acids Res.*, 26 (4): 1046-1050) o varios compuestos similares, normalmente a una concentración 0,2-0,7 M. La mezcla puede conseguirse en líneas de fluido de una inyección de tinta mientras se liberan los componentes en puntos seleccionados de un sustrato adecuado descrito con más detalle en otras partes del presente documento. Los bloques de construcción de fosforamidita, tales como los activados como se ha descrito anteriormente, típicamente se proporcionan en un exceso de 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 veces o más sobre el material unido al sustrato y después entran en contacto con el soporte sólido con el soporte sólido (primer acoplamiento) o un precursor de oligonucleótido unido al soporte (acoplamientos posteriores). En la síntesis 3' a 5', el grupo 5'-hidroxilo del precursor puede prepararse para reaccionar con el resto de fosforamidita activado de la nucleósido fosforamidita entrante para formar un enlace fosfito triéster. La reacción también es muy sensible a la presencia de agua, particularmente cuando se usan soluciones diluidas de fosforamiditas, y normalmente se lleva a cabo en acetonitrilo anhidro. Después de finalizar el acoplamiento, todos los reactivos no unidos y los subproductos pueden eliminarse mediante una etapa de lavado.

El producto de la reacción de acoplamiento puede tratarse con un agente de tapado que puede, por ejemplo, esterificar secuencias con fallos y/o escindir productos de reacción de fosfato en las bases heterocíclicas. La etapa de tapado puede realizarse tratando el material unido al soporte sólido con una mezcla de anhídrido acético y 1-metilimidazol o DMAP como catalizadores y puede tener dos propósitos: Tras la finalización de la reacción de acoplamiento, puede quedar sin reaccionar una fracción de los grupos 5'-OH unidos al soporte sólido (por ejemplo, del 0,1 al 1 %). Estos grupos que no han reaccionado pueden estar permanentemente bloqueados frente al alargamiento de la cadena adicional para impedir la formación oligonucleotídica con una delección de base interna denominados comúnmente shortmers (n-1). Los grupos 5'-hidroxilo que no han reaccionado pueden acetilarse por la mezcla de tapado. Además, se entiende que las fosforamiditas activadas con 1H-tetrazol reaccionan, hasta cierto punto, con la posición O6 de la guanosina. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, tras la oxidación con I<sub>2</sub>/agua, este producto secundario, posiblemente mediante migración de O6-N7, puede experimentar despurinación. Los sitiosapurínicos pueden terminar al escindirse en el transcurso de la desprotección final del oligonucleótido, reduciéndose así el rendimiento del producto de longitud completa. Las modificaciones de O6 pueden eliminarse por tratamiento del reactivo de tapado antes de la oxidación con I<sub>2</sub>/agua.

La síntesis de oligonucleótidos fosforotioatos (OPS; descrita con más detalle en otras partes del presente documento)

normalmente no implica la oxidación con I<sub>2</sub>/agua y, en esa medida, no experimenta la reacción secundaria descrita anteriormente. Por otro lado, la mezcla de tapado puede interferir con la reacción de transferencia de azufre. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la mezcla de tapado puede causar una amplia formación de los enlaces internucleosídicos de fosfato triéster en lugar de los PS triésteres deseados. Por lo tanto, para la síntesis de OPS, la etapa de sulfurización puede realizarse antes que cualquier etapa de tapado.

El material unido al soporte puede tratarse con yodo y agua, normalmente en presencia de una base débil (por ejemplo, piridina, lutidina o colidina) para afectar a la oxidación del fosfito triéster a un fosfato triéster tetracoordinado, un precursor protegido del enlace internucleosídico de fosfato diéster natural. La oxidación puede realizarse en condiciones anhidras usando, por ejemplo, *tert*-butil hidroperóxido o (1S)-(+)-(10-canforsulfonil)-oxaziridina (CSO). La etapa de oxidación puede sustituirse por una etapa de sulfurización para obtener oligonucleótido fosforotioatos.

La síntesis de oligonucleótido fosforotioatos (OPS) puede conseguirse de forma similar a la de los oligonucleótidos naturales usando los métodos y composiciones de la divulgación en diversos ejemplos. En resumen, la etapa de oxidación puede reemplazarse por la reacción de transferencia de azufre (sulfurización) y cualquier etapa de tapado puede realizarse después de la sulfurización. Muchos reactivos son capaces de conseguir una transferencia de azufre eficaz, entre los que se incluyen, pero sin limitación, 3-(dimetilaminometilideno)amino-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona, DDTT, 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona, también conocido como reactivo de Beaucage, y N,N,N'-tetraetiluram disulfuro (TETD).

Una etapa de desbloqueo (o destritilación) puede servir para eliminar grupos bloqueantes, tales como el grupo DMT, por ejemplo, con una solución de un ácido, tal como ácido tricloroacético (TCA) al 2 % o ácido dicloroacético (DCA) al 3 %, en un disolvente inerte (diclorometano o tolueno). Puede realizarse una etapa de lavado. El precursor de oligonucleótido unido al soporte se ve afectado para portar un grupo hidroxilo libre 5'-terminal. Si se realiza la destritilación durante un periodo prolongado o con soluciones de ácidos más fuertes de lo recomendado, se puede obtener una mayor despurinación del oligonucleótido unido al soporte sólido y, por lo tanto, se reduce el rendimiento del producto de longitud completa deseado. Los métodos y composiciones de la divulgación descrita en el presente documento proporciona condiciones de desbloqueo controladas que limitan reacciones de despurinación indeseadas.

En algunos ejemplos, puede utilizarse una solución de oxidación que comprende I<sub>2</sub> aproximadamente 0,02 M en THF/piridina/H<sub>2</sub>O o cualquier variación adecuada evidente para el experto en la materia. La solución de destritilación puede ser ácido dicloroacético (DCA) al 3 % o ácido tricloroacético (TCA) al 2 % en tolueno o diclorometano o cualquier otro disolvente inerte adecuado. Se entenderá que son evidentes para un experto en la materia variaciones adecuadas de la solución de destritilación. Los métodos y composiciones de la divulgación permiten el desplazamiento de la solución de destritilación sin permitir una evaporación significativa del disolvente, impidiendo puntos concentrados de los componentes de despurinación, por ejemplo, DCA o TCA. Por ejemplo, puede utilizarse una solución de seguimiento después de la solución de destritilación. La densidad de la solución de seguimiento puede ajustarse para conseguir un proceso con una configuración primero en entrar, primero en salir. Para conseguir este resultado puede utilizarse una solución de seguimiento ligeramente más densa. Por ejemplo, la solución de destritilación puede seguirse con la solución de oxidación. la solución de seguimiento puede comprender un agente de inactivación, tal como piridina. En algunos ejemplos, se usan condiciones líquidas continuas hasta que la solución desbloqueante se ha eliminado sustancialmente de los loci de síntesis de oligonucleótidos en un sustrato. La concentración de los componentes de despurinación puede controlarse estrechamente, por ejemplo, limitando sus valores en los loci de síntesis de oligonucleótidos a menos de 3, 2,5, 2, 1,5, 1,4, 1,3, 1,25, 1,2, 1,15, 1,1, 1,05, 1,04, 1,03, 1,02, 1,01, 1,005 veces o menos de la concentración original.

El proceso de desplazamiento puede optimizarse para controlar de manera adecuada la dosificación química en los loci de síntesis de oligonucleótidos dentro de un intervalo útil. La dosificación puede referirse colectivamente a los efectos cinéticos sumados de tiempo, concentración y temperatura sobre tanto la finalización de la reacción deseada (destritilación) como el grado de la reacción secundaria (despurinación).

Además, la destritilación, debido a que es reversible, puede dar como resultado la síntesis de una serie de oligómeros que carecen de uno o más de los nucleótidos correctos. Una química de dos etapas propuesta por Sierzchala *et al.* (Solid-phase oligodeoxynucleotide synthesis: A two-step cycle using peroxy anion deprotection. J. Am. Chem. Soc. 2003;125:13427-13441) puede solucionar el problema de la despurinación eliminando el uso de desprotección ácida de los extremos 5' o 3' de la cadena en crecimiento. El ciclo de síntesis de dos etapas hace uso de aniones peroxi acuosos tamponados en condiciones levemente básicas, por ejemplo, a aproximadamente pH 9,6, para eliminar cualquier grupo ariloxicarbonilo, que sustituye el grupo DMT usado comúnmente en la síntesis de fosforamidita de cuatro etapas. Por consiguiente, la solución de anión peroxi, o cualquier variación adecuada con propiedades nucleófilas fuertes y ligeramente oxidantes permite consolidar las etapas de desbloqueo y oxidación en una. Además, los altos rendimientos cíclicos permiten la eliminación de etapas de tapado.

La desprotección y escisión del ADN del sustrato puede realizarse como se describe por Cleary *et al.* (Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. Nature Methods. 2004; 1:241-248), por ejemplo, por tratamiento con NH<sub>4</sub>OH, mediante la aplicación de luz ultravioleta a un enlazador fotoescindible, mediante direccionamiento, por ejemplo, tratamiento térmico, de sitios apurínicos, tales como los generados por

tratamiento con uracil-ADN glicosilasa de restos de dU incorporados, o cualquier método de escisión adecuado conocido en la técnica. Los oligonucleótidos pueden recuperarse después de la escisión por liofilización.

5 Para albergar la química de la fosforamida, la superficie de los loci de síntesis de oligonucleótidos de un sustrato puede modificarse químicamente para proporcionar un sitio apropiado para la unión de la cadena de nucleótidos en crecimiento a la superficie. Existen diversos tipos de química de modificación de superficie que permiten que un nucleótido se una a la superficie del sustrato. Las modificaciones de superficie pueden variar en su implementación dependiendo de si la cadena oligonucleotídica se va a escindir de la superficie al mismo tiempo que se desprotegen las bases de ácido nucleico, o se va a quedar unida a la superficie después de la desprotección. En la técnica se conocen diversos tipos de químicas de modificación de superficie adecuadas y se describen en [www.glenresearch.com](http://www.glenresearch.com). Una técnica de modificación de la superficie permite que los átomos N exocíclicos de las bases A, G y C se desprotejan mientras que la cadena oligonucleotídica permanece unida al sustrato.

15 Otro esquema comprende la reacción de una trialcóxido de silicio amina (por ejemplo,  $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ ) con grupos SiOH de la superficie de vidrio o sílice, seguida de la reacción con anhídrido succínico con la amina para crear un enlace amida y un OH libre sobre el cual podría comenzar el crecimiento de la cadena de nucleótidos.

20 Un tercer tipo de grupo enlazador puede basarse en cebadores fotoescindibles. este tipo de enlazador permite retirar el oligonucleótido del sustrato (por irradiación con luz, por ejemplo, luz de ~350 nm) sin escindir los grupos protectores en las funcionalidades de nitrógeno en cada base. El tratamiento típico con amoníaco o  $\text{NH}_3$  desprotege todo cuando se usa como reactivo para escindir los oligómeros del sustrato. El uso de enlazadores fotoescindibles de este tipo se describe en [www.glenresearch.com](http://www.glenresearch.com). En la técnica se conocen otros diversos grupos enlazadores escindibles adecuados y pueden utilizarse de forma alternativa.

25 Los marcos de tiempo para la oxidación y destrilación pueden ser normalmente de aproximadamente 30 s y 60 s, respectivamente. Los reactivos pueden drenarse, seguido por lavados de acetonitrilo (ACN). En los procesos de destrilación controlada por despurinación, la solución de destrilación puede expulsarse usando un flujo de entrada continuo de solución de oxidación sin una etapa de drenaje entre medias.

30 El control preciso del flujo de reactivos durante los pasos de síntesis in situ mejora el rendimiento, la uniformidad y la calidad de los productos. Por ejemplo, la concentración de ácido y los tiempos de destrilación se pueden controlar con precisión. Puede elegirse un ángulo de contacto con el agua para el sustrato, en particular, para regiones de síntesis in situ y/o áreas circundantes, para reducir la despurinación y/o la velocidad de síntesis. Los valores apropiados deseados del ángulo de contacto con el agua se describen en otra parte del presente documento. En algunos ejemplos, se puede conseguir una menor cantidad de despurinación en superficies de mayor energía de superficie, es decir, menor ángulo de contacto.

35 Los métodos y composiciones de la divulgación permiten una tasa reducida de despurinación durante la síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, una tasa menor del 0,1 %, 0,09 %, %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,009 %, 0,008 %, 0,007 %, 0,006 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0009 %, 0,0008 %, 0,0007 %, 0,0006 %, 0,0005 %, 0,0004 %, 0,0003 %, 0,0002 %, 0,0001 % por ciclo o menor. Además, los métodos y composiciones de la divulgación descrita en el presente documento permiten la reducción o eliminación de un gradiente de despurinación a través de la superficie de un sustrato que soporta la síntesis in situ de oligonucleótidos. Por lo tanto, puede conseguirse una síntesis de oligonucleótidos altamente uniforme, de alta calidad y alto rendimiento en sustratos que pueden albergar una alta densidad de loci de oligonucleótidos resueltos.

40 La síntesis in situ de oligonucleótidos comienza típicamente siendo el soporte sólido relativamente hidrófobo y, posteriormente, se vuelve cada vez más hidrófilo con la síntesis de características de oligonucleótidos que afectan a su energía de superficie. Las características de los oligonucleótidos pueden ganar una energía de superficie sustancial al aumentar la longitud del oligonucleótido. Generalmente, estos sitios o características que consisten en oligonucleótidos protegidos adquieren suficiente energía de superficie para humectarse espontáneamente en disolventes orgánicos de alta tensión superficial comúnmente usados en la síntesis de fosforamida, tales como acetonitrilo o carbonato de propileno, después de aproximadamente 10-20 ciclos de síntesis. Los métodos y composiciones de la divulgación permiten variar parámetros, tales como el tiempo, caudal, temperatura, volumen, viscosidad o concentración de reactivo, durante la síntesis de un oligonucleótido en crecimiento en función de la longitud para dar cuenta de las propiedades de superficie cambiantes en los loci de síntesis de oligonucleótidos. Esta variación puede aplicarse cambiando continuamente los parámetros en incrementos constantes o variables en ciclos repetidos de la síntesis. Como alternativa, los parámetros se pueden cambiar solo en ciclos seleccionados de la síntesis y, opcionalmente, pueden seguir un patrón, tal como en ciclos alternos, en un ciclo de cada tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc.

60 En diversos ejemplos, los métodos y composiciones de la divulgación contemplan una biblioteca de oligonucleótidos sintetizados en un sustrato, en donde la biblioteca comprende oligonucleótidos de diferentes tamaños, como se describe con más detalle en otras partes del presente documento. Además, los métodos y composiciones de la divulgación permiten la síntesis de cantidades sustancialmente similares de oligonucleótidos o, en algunos casos, cantidades variables preseleccionadas de oligonucleótidos, de tamaño, secuencia o composición de nucleótidos

variable sobre un sustrato. La variación en las cantidades puede limitarse a menos del 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % o menos entre dos oligonucleótidos sintetizados cualesquiera, o como alternativa, como error relativo o porcentaje de desviación en la biblioteca. Los métodos y composiciones de la divulgación descritos en el presente documento contemplan oligonucleótidos sintetizados sobre un sustrato en cantidades deseadas como se describe con más detalle en otras partes del presente documento.

En algunos ejemplos, los métodos y composiciones de la divulgación permiten la síntesis de bibliotecas de oligonucleótidos en sustratos, en donde la estequiometría de cada oligonucleótido está estrechamente controlada y se puede afinar variando el número relativo de características sintetizadas. Las funcionalizaciones y recubrimientos de superficie adecuados para ajustar la densidad de los oligonucleótidos en crecimiento en los loci resueltos de sustratos se describen con más detalle en otras partes del presente documento y se pueden aplicar uniformemente a todas las microestructuras de un sustrato, o como alternativa, se pueden aplicar en cantidades y proporciones seleccionadas a microestructuras individuales.

Los métodos de síntesis *in situ* incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos N.º 5.449.754 para sintetizar matrices de péptidos, así como en el documento WO 98/41531 y las referencias citadas en el mismo para sintetizar polinucleótidos (específicamente, ADN) usando fosforamidita u otra química. Otras patentes que describen dispositivos y protocolos de síntesis de matrices de ácidos nucleicos *in situ* incluyen la Publicación de Estados Unidos N.º 2013/0130321 y la Publicación de Estados Unidos N.º 2013/0017977.

Básicamente, se puede considerar que tales métodos de síntesis *in situ* repiten la secuencia de depositar gotículas de: un monómero protegido en localizaciones predeterminadas sobre un sustrato para enlazar con una superficie de sustrato adecuadamente activada (o con un monómero desprotegido previamente depositado); desproteger el monómero depositado de modo que pueda reaccionar con un monómero protegido depositado posteriormente; y depositar otro monómero protegido para la unión. Se pueden depositar diferentes monómeros en diferentes regiones del sustrato durante cualquier ciclo, de modo que las diferentes regiones de la matriz completa porten las diferentes secuencias de biopolímero según se desee en la matriz completa. Es posible que se requieran una o más etapas intermedias adicionales en cada repetición, tales como etapas de oxidación, sulfurización y/o lavado.

Se describen diversos métodos que pueden usarse para generar una matriz de oligonucleótidos en un solo sustrato en la Patente de Estados Unidos N.º 5.677.195, 5.384.261 y en la Publicación PCT N.º WO 93/09668. En los métodos desvelados en estas solicitudes, los reactivos se suministran al sustrato ya sea (1) fluyendo dentro de un canal definido en regiones predefinidas o (2) por "aplicación puntual" en regiones predefinidas o (3) mediante el uso de fotoprotector. Sin embargo, pueden emplearse otros enfoques, así como combinaciones de aplicación puntual y flujo. En cada caso, ciertas regiones activadas del sustrato se separan mecánicamente de otras regiones cuando las soluciones de monómeros se suministran a los diversos sitios de reacción. Por lo tanto, se puede conseguir una síntesis *in situ* de oligonucleótidos aplicando diversos métodos adecuados de síntesis conocidos en la técnica a los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Uno de estos métodos se basa en una técnica fotolitográfica que implica directamente la síntesis *in situ* de oligonucleótidos en sitios predeterminados resueltos en la superficie sólida o polimérica, utilizando grupos protectores fotolábiles (Kumar *et al.*, 2003). Los grupos hidroxilo pueden generarse en la superficie y bloquearse por grupos protectores fotolábiles. Cuando la superficie se expone a luz ultravioleta, por ejemplo, a través de una máscara fotolitográfica, se puede generar un patrón de grupos hidroxilo libres en la superficie. Estos grupos hidroxilo pueden reaccionar con nucleósidosfosforamiditas fotoprotegidas, según la química de la fosforamidita. Se puede aplicar una segunda máscara fotolitográfica y la superficie se puede exponer a la luz ultravioleta para generar un segundo patrón de grupos hidroxilo, seguido de acoplamiento con nucleósidosfosforamidita fotoprotegida en 5'. Análogamente, se pueden generar patrones y se pueden extender cadenas de oligómeros. Se conocen en la técnica diversos grupos protectores fotolábiles, que se pueden eliminar limpia y rápidamente de las funcionalidades 5'-hidroxilo. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la labilidad de un grupo fotoescindible depende de la longitud de onda y la polaridad del disolvente empleado y la velocidad de fotoescisión puede verse afectada por la duración de la exposición y la intensidad de la luz. Este método puede aprovechar varios factores, por ejemplo, precisión en el alineamiento de las máscaras, la eficacia de eliminación de los grupos fotoprotectores y los rendimientos de la etapa de acoplamiento de fosforamidita. Además, se puede minimizar la fuga involuntaria de luz a los sitios vecinos. La densidad del oligómero sintetizado por aplicación puntual se puede controlar ajustando la carga del nucleósido líder en la superficie de síntesis.

Se entiende que los métodos y composiciones de la divulgación pueden hacer uso de una serie de técnicas de construcción adecuadas que son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, sintetizadores de matriz sin máscara, métodos dirigidos por la luz que utilizan máscaras, métodos de canal de flujo, métodos de aplicación puntual, etc. En algunos ejemplos, se pueden sintetizar oligonucleótidos de construcción y/o selección en un soporte sólido usando un sintetizador de matriz sin máscara (MAS). Se describen los sintetizadores de matriz sin máscara, por ejemplo, en la solicitud PCT N.º WO 99/42813 y en la correspondiente Patente de Estados Unidos N.º 6.375.903. Se conocen otros ejemplos de instrumentos sin máscara que pueden fabricar una micromatriz de ADN personalizada en la que cada una de las características de la matriz tiene una molécula de ADN monocatenaria de secuencia deseada. Otros métodos para sintetizar oligonucleótidos de construcción y/o selección incluyen, por ejemplo, métodos dirigidos por la luz que utilizan máscaras, métodos de canal de flujo, métodos de aplicación puntual, métodos basados en pasadores y métodos que utilizan múltiples soportes. Se describen métodos dirigidos por luz que utilizan máscaras (por ejemplo,

métodos VLSIPS™) para la síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 5.143.854, 5.510.270 y 5.527.681. Estos métodos implican activar regiones predefinidas de un soporte sólido y luego poner en contacto el soporte con una solución de monómero preseleccionada. Las regiones seleccionadas se pueden activar mediante irradiación con una fuente de luz a través de una máscara de manera muy similar a las técnicas de fotolitografía utilizadas en la fabricación de circuitos integrados. Otras regiones del soporte permanecen inactivas porque la máscara bloquea la iluminación y quedan protegidas químicamente. Por lo tanto, un patrón de luz define qué regiones del soporte reaccionan con un monómero dado. Mediante la activación repetida de diferentes conjuntos de regiones predefinidas y el contacto de diferentes soluciones de monómeros con el soporte, se produce sobre el soporte una matriz diversa de polímeros. Opcionalmente se pueden utilizar otras etapas, tales como lavado de la solución de monómero sin reaccionar del soporte. Otros métodos aplicables incluyen técnicas mecánicas tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos N.º 5.384.261. Se describen métodos adicionales aplicables a la síntesis de oligonucleótidos de construcción y/o selección en un solo soporte, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 5.384.261. Por ejemplo, los reactivos se pueden suministrar al soporte haciéndolos fluir dentro de un canal definido en regiones predefinidas o mediante "aplicación puntual" en regiones predefinidas. También pueden emplearse otros enfoques, así como combinaciones de aplicación puntual y flujo. En cada caso, ciertas regiones activadas del soporte están separadas mecánicamente de otras regiones cuando las soluciones de monómeros se suministran a los diversos sitios de reacción. Los métodos de canal de flujo implican, por ejemplo, sistemas microfluídicos para controlar la síntesis de oligonucleótidos sobre un soporte sólido. Por ejemplo, se pueden sintetizar diversas secuencias de polímeros en regiones seleccionadas de un soporte sólido formando canales de flujo sobre o en una superficie del soporte a través de la cual fluyen los reactivos apropiados o en los que se ponen los reactivos apropiados. Los métodos de aplicación puntual para la preparación de oligonucleótidos sobre un soporte sólido implican el suministro de reactivos en cantidades relativamente pequeñas depositándolos directamente en regiones seleccionadas o estructuras conectadas fluidicamente a las mismas. En algunas etapas, toda la superficie de soporte se puede pulverizar o recubrir de otra manera con una solución. Se pueden depositar gota a gota alícuotas medidas con precisión de soluciones de monómero mediante un dispensador que se mueve de una región a otra. Se describen métodos basados en pasadores para la síntesis de oligonucleótidos en un soporte sólido, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 5.288.514. Los métodos basados en pasadores utilizan un soporte que tiene una pluralidad de pasadores u otras extensiones. Cada uno de los pasadores se inserta simultáneamente en recipientes de reactivos individuales en una bandeja.

En un enfoque alternativo, se puede conseguir una síntesis dirigida por luz de micromatrices de alta densidad en la dirección 5'-3' (Albert *et al.*, 2003). Este enfoque permite realizar reacciones posteriores, tales como el genotipado paralelo o la secuenciación, en la superficie de síntesis, porque el extremo 3' está disponible para reacciones enzimáticas, tales como reacciones de extensión y ligamiento de cebadores específicos de secuencia. Puede usarse la desprotección completa o sustancialmente completa de grupos 5'-OH fotoprotectidos, la fotodesprotección asistida por bases de NPPOC (2-(2-nitrofenil)propoxicarbonilo) (Beier *et al.*, 2002).

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden facilitar la producción de ácidos nucleicos sintéticos usando síntesis in situ sobre sustratos de diversas geometrías, incluyendo superficies planas o irregulares. Varios materiales adecuados para estos sustratos, por ejemplo, silicio, se describen en el presente documento o se conocen de otro modo en la técnica. Un sustrato puede cargarse con una multiplicidad de secuencias diferentes durante la síntesis. Los métodos de síntesis in situ sobre sustratos permiten la preparación de una multiplicidad de oligómeros de secuencias diferentes y definidas en localizaciones direccionables sobre un soporte común. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento permiten la síntesis in situ de oligonucleótidos que son más largos y de mayor calidad como se describe adicionalmente en otras partes del presente documento. Las etapas de síntesis pueden incorporar diversos conjuntos de materiales de alimentación, en el caso de la síntesis de oligonucleótidos, como regla, pueden usarse las 4 bases A, G, T y C, así como bases modificadas adecuadas conocidas en la técnica, algunas de las cuales se describen en el presente documento, construyendo secuencias deseadas de polímeros de ácido nucleico de una manera resuelta sobre un soporte o sustrato.

La fabricación y aplicación de oligonucleótidos de alta densidad sobre un soporte sólido, por ejemplo, matrices, se han divulgado previamente en, por ejemplo, las Publicaciones PCT N.º WO 97/10365, WO 92/10588, la Patente de Estados Unidos N.º 6.309.822 presentada el 23 de diciembre de 1996; número de serie 6.040.138 presentada el 15 de septiembre de 1995; número de serie 08/168.904 presentada el 15 de diciembre de 1993; número de serie 07/624.114 presentada el 6 de diciembre de 1990, número de serie 07/362.901 presentada el 7 de junio de 1990, y en el documento US 5.677.195, todos incorporados en el presente documento para todos los propósitos como referencia. En algunos ejemplos que utilizan matrices de alta densidad, las matrices de oligonucleótidos de alta densidad se sintetizan usando métodos tales como la síntesis de polímeros inmovilizados a gran escala (VLSIPS) descrita en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.445.934 y 6.566.495, ambas incorporados en el presente documento para todos los propósitos como referencia. Cada oligonucleótido ocupa una localización conocida en un sustrato.

En la técnica se conocen otros diversos métodos adecuados para formar matrices de oligonucleótidos de alta densidad, péptidos y otras secuencias poliméricas con un número mínimo de etapas sintéticas. La matriz de análogos de oligonucleótidos se puede sintetizar en un sustrato sólido por una diversidad de métodos, incluyendo, pero sin limitación, acoplamiento químico dirigido por luz y acoplamiento dirigido mecánicamente. Véase Pirrung *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 5.143.854 (véase también la Solicitud PCT N.º WO 90/15070) y Fodor *et al.*, Publicaciones PCT N.º WO 92/10092 y WO 93/09668 y Documento de Estados Unidos con N.º de Serie 07/980.523, que describen

métodos para formar vastas matrices de péptidos, oligonucleótidos y otras moléculas utilizando, por ejemplo, técnicas de síntesis dirigida por luz. Véase también, Fodor *et al.*, Science, 251, 767-77 (1991). Estos procedimientos para la síntesis de matrices de polímeros ahora se denominan procedimientos VLSIPS. Usando el enfoque VLSIPS, una matriz heterogénea de polímeros se convierte, mediante acoplamiento simultáneo en una serie de sitios de reacción, en una matriz heterogénea diferente. Véase, la Solicitud de Estados Unidos con Números de Serie 07/796.243 y 07/980.523.

En el caso de que se utilice un análogo de oligonucleótido con una cadena principal de poliamida en el procedimiento VLSIPS, a menudo no es adecuado utilizar la química de la fosforamida para realizar las etapas sintéticas, ya que los monómeros no se acoplan entre sí mediante un enlace fosfato. En su lugar, los métodos de síntesis de péptidos pueden sustituirse, por ejemplo, como se describe por Pirrung *et al.* en la Patente de Estados Unidos N.º 5.143.854.

Las especies moleculares individuales se pueden demarcar mediante compartimentos fluidicos separados para la adición de los materiales de alimentación de síntesis, como es el caso, por ejemplo, en el denominado método de aplicación puntual in situ o técnicas piezoeléctricas, basadas en la tecnología de impresión por inyección de tinta (A. Blanchard, en Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol. 20, Ed. J. Sedlow, 111-124, Plenum Press; A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood, High-Density Oligonucleotide Arrays, Biosens. & Bioelectronics 11, 687, 1996). La síntesis resuelta in situ de oligonucleótidos se puede lograr además mediante la activación espacialmente resuelta de los sitios de síntesis, que es posible mediante la iluminación selectiva, mediante la generación selectiva o espacialmente resuelta de reactivos de activación (reactivos de desprotección) o mediante la adición selectiva de reactivos de activación (reactivos de desprotección).

Son ejemplos de los métodos conocidos hasta la fecha para la síntesis in situ de matrices, la síntesis fotolitográfica basada en luz (McGall, G. *et al.*; J. Amer. Chem. Soc. 119; 5081-5090; 1997), síntesis basada en luz basada en proyector (documento PCT/EP99/06317), síntesis fluidica mediante separación física de los espacios de reacción (conocida por un experto en la materia a partir del trabajo del Prof. E. Southern, Oxford, Reino Unido, y de la empresa Oxford Gene Technologies, Oxford, Reino Unido), síntesis controlada por luz basada en proyector indirecto mediante fotoácidos activados por luz y cámaras de reacción adecuadas o espacios de reacción separados físicamente en un soporte de reacción, síntesis inducida electrónicamente por desprotección resuelta espacialmente en electrodos individuales en el soporte usando producción de protones inducida por los electrodos, y síntesis fluidica por deposición espacialmente resuelta de los monómeros de síntesis activados (conocido por A. Blanchard, en Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol. 20, Ed. J. Sedlow, 111-124, Plenum Press; A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood, High-Density Oligonucleotide Arrays, Biosens. & Bioelectronics 11, 687, 1996).

También se conocen métodos de preparación de ácidos nucleicos sintéticos, en particular dobles cadenas de ácido nucleico sobre un soporte sólido común, por las Publicaciones PCT WO 00/49142 y WO 2005/051970, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Puede conseguirse la preparación in situ de matrices de ácidos nucleicos, de 3' a 5', así como la dirección más tradicional de 5' a 3'. La adición de reactivos se puede conseguir mediante deposición por pulsorreactor (pulse-jet), por ejemplo, una nucleótido fosforamida apropiada y un activador en cada locus resuelto sobre o en la superficie del sustrato, por ejemplo, una superficie de oblea de silicio recubierta. Los loci resueltos del sustrato pueden someterse adicionalmente a reactivos adicionales de las otras etapas del ciclo de la fosforamida (desprotección del grupo 5'-hidroxilo, oxidación, sulfurización y/o sulfurización), que se pueden realizar en paralelo. Las etapas de deposición y del ciclo común de la fosforamida pueden realizarse sin mover la oblea de síntesis de oligonucleótidos. Por ejemplo, los reactivos pueden pasarse sobre loci resueltos dentro de un sustrato, haciéndolos fluir a través del sustrato desde una superficie a la superficie opuesta del sustrato. Como alternativa, el sustrato se puede mover, por ejemplo, a una celda de flujo, para algunas de las etapas del ciclo de la fosforamida. Después el sustrato se puede reposicionar, volver a registrar y/o volver a alinear antes de imprimir una siguiente capa de monómeros.

Los sustratos con oligonucleótidos se pueden fabricar usando la deposición de gotas a partir de pulsorreactores de cualquier unidad precursora de polinucleótido (tal como monómeros) en el caso de la fabricación in situ, o un polinucleótido sintetizado previamente. Tales métodos se describen con detalle en, por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos N.º 2013/0130321 y la Publicación de Estados Unidos N.º 2013/0017977. Se pueden utilizar otros métodos de deposición de gotas para la fabricación, tal como se describe en otras partes del presente documento. Además, en lugar de métodos de deposición de gota, se pueden utilizar métodos de fabricación dirigidos por luz, como se conocen en la técnica. No es necesario que estén presentes áreas entre las características, particularmente cuando las matrices se fabrican mediante protocolos de síntesis dirigida por luz.

Se pueden adaptar una variedad de dispositivos de fabricación in situ conocidos, incluyendo los dispositivos de pulsorreactor, pero sin limitación, los descritos en la Publicación de Estados Unidos N.º US2010/0256017, las Publicaciones de Patente de Estados Unidos US20120050411 y la Patente de Estados Unidos No 6.446.682, cuyas divulgaciones de patente se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

En diversos ejemplos, las matrices de biopolímeros sobre o dentro de sustratos se pueden fabricar utilizando la deposición de los biopolímeros obtenidos previamente o métodos de síntesis in situ. Los métodos de deposición

implican típicamente depositar biopolímeros en localizaciones predeterminadas sobre o en un sustrato que están adecuadamente activadas de manera que los biopolímeros se pueden unir a las mismas. Pueden depositarse biopolímeros de diferentes secuencias en diferentes regiones sobre o en un sustrato. Los procedimientos típicos conocidos en la técnica para la deposición de polinucleótidos obtenidos previamente, particularmente ADN, tales como oligómeros enteros o ADNc, incluyen, pero sin limitación, cargar el polinucleótido en un dispensador de gotas en forma de cabezal de pulsorreactor y dispararlo sobre el sustrato. Tal técnica se ha descrito en los documentos WO 95/25116 y WO 98/41531, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Se conocen en la técnica diversas formas adecuadas de inyectoros de tinta para la deposición de gotas en sitios resueltos de un sustrato.

En algunos ejemplos, la divulgación puede basarse en el uso de oligonucleótidos presintetizados dentro de una biblioteca de oligonucleótidos completa o partes de la misma, por ejemplo, una biblioteca de oligonucleótidos inmovilizada en una superficie. Se pueden fabricar sustratos que soportan una alta densidad de matrices de ácidos nucleicos depositando ácidos nucleicos presintetizados o naturales en posiciones predeterminadas sobre, en, o a través de un sustrato. Los ácidos nucleicos sintetizados o naturales pueden depositarse en localizaciones específicas de un sustrato mediante el direccionamiento dirigido por luz, el direccionamiento dirigido a oligonucleótidos o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. También pueden dirigirse ácidos nucleicos a localizaciones específicas. Se puede usar un dispensador que se mueva de una región a otra para depositar ácidos nucleicos en puntos específicos. El dispensador puede depositar el ácido nucleico a través de microcanales que conducen a regiones seleccionadas. Los dispensadores típicos incluyen una micropipeta o pasador capilar para suministrar ácido nucleico al sustrato y un sistema robótico para controlar la posición de la micropipeta con respecto al sustrato. En otros ejemplos, el dispensador incluye una serie de tubos, un colector, una matriz de pipetas o pasadores capilares, o similares, de modo que se puedan suministrar varios reactivos a las regiones de reacción simultáneamente.

El acoplamiento de secuencias oligonucleotídicas y/o polinucleotídicas presintetizadas a un soporte y la síntesis in situ de las mismas utilizando métodos dirigidos por luz, canales de flujo y métodos de aplicación puntual, métodos de inyección de tinta, métodos basados en pasadores y métodos basados en perlas, se describe con más detalle en las siguientes referencias: McGall *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 13555; Synthetic DNA Arrays In Genetic Engineering, Vol. 20: 111, Plenum Press (1998); Duggan *et al.* (1999) Nat. Genet. S21 : 10; Microarrays: Making Them and Using Them In Microarray Bioinformatics, Cambridge University Press, 2003; Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0068633 y 2002/0081582; Patentes de Estados Unidos N.º 6.833.450, 6.830.890, 6.824.866, 6.800.439, 6.375.903 y 5.700.637; y Publicaciones PCT N.º WO 04/031399, WO 04/031351, WO 04/029586, WO 03/100012, WO 03/066212, WO 03/065038, WO 03/064699, WO 03/064027, WO 03/064026, WO 03/046223, WO 03/040410 y WO 02/24597. En algunos ejemplos, los oligonucleótidos presintetizados se unen a un soporte o se sintetizan usando una metodología de aplicación puntual en la que las soluciones de monómeros se depositan gota a gota por un dispensador que se mueve de una región a otra (por ejemplo, inyección de tinta). En algunos ejemplos, los oligonucleótidos se aplican puntualmente sobre un soporte usando, por ejemplo, un dispensador accionado por ondas mecánicas.

Los sistemas descritos en el presente documento pueden incluir además un miembro para proporcionar una gotícula en un primer punto (o característica) que tiene una pluralidad de oligonucleótidos unidos al soporte. En algunos ejemplos, la gotícula puede incluir una o más composiciones que comprenden nucleótidos u oligonucleótidos (que también se denominan en el presente documento construcciones de adición de nucleótidos) que tienen un nucleótido específico o predeterminado a añadir y/o reactivos que permiten una o más etapas de hibridación, desnaturalización, reacción de extensión de la cadena, ligamiento y digestión. En algunos ejemplos, pueden depositarse diferentes composiciones o diferentes construcciones de adición de nucleótidos en diferentes direcciones sobre el soporte durante cualquier repetición para generar una matriz de secuencias oligonucleotídicas predeterminadas (teniendo las diferentes características del soporte diferentes secuencias oligonucleotídicas predeterminadas). Una forma particularmente útil de depositar las composiciones es depositando una o más gotículas, conteniendo cada gotícula el reactivo deseado (por ejemplo, construcción de adición de nucleótidos) desde un dispositivo pulsorreactor separado de la superficie de soporte, sobre la superficie de soporte o características construidas dentro de la superficie de soporte.

Para posibilitar la automatización del método químico de síntesis de polímeros a partir de subunidades, a menudo se emplean fases sólidas, sobre las que se ancla la cadena molecular en crecimiento. Una vez finalizada la síntesis, puede separarse, lo cual puede conseguirse rompiendo un enlazador adecuado entre el polímero real y la fase sólida. Para la automatización, el método puede emplear una superficie de sustrato directamente o el método puede emplear una superficie de sustrato de fases sólidas en forma de partículas activadas, que están empaquetadas en una columna o microcanal en un sustrato, por ejemplo, vidrio de poro controlado (CPG). La superficie del sustrato algunas veces puede llevar un tipo de oligo específicamente extraíble con una secuencia predeterminada. Después pueden añadirse los reactivos de síntesis individuales de forma controlable. La cantidad de moléculas sintetizadas puede controlarse por diversos factores, que incluyen, pero sin limitación, el tamaño de la superficie del sustrato específica, la cantidad de material de soporte, el tamaño de los lotes de reacción, el área de sustrato funcionalizado disponible para la síntesis, el grado de funcionalización o la duración de la reacción de síntesis.

Por lo tanto, varios ejemplos de la divulgación se refieren a la fabricación y el uso de sustratos que albergan una

biblioteca de composiciones, típicamente oligonucleótidos. Un sustrato con características resueltas es "direccionable" cuando tiene múltiples regiones de diferentes restos (por ejemplo, diferentes secuencias polinucleotídicas) de modo que una región (es decir, una "característica" o "punto" del sustrato) en una localización predeterminada particular (es decir, una "dirección") en el sustrato detectará una diana o clase de dianas particular (aunque una característica puede detectar incidentalmente no dianas de esa localización). Las características del sustrato típicamente, pero no necesariamente, están separadas por espacios intermedios. En algunos casos, las características pueden estar construidas dentro de un sustrato y pueden crear geometrías microfluidicas unidimensionales, bidimensionales o tridimensionales. Un "trazado de sustrato" se refiere a una o más características de las características, tales como el posicionamiento de características en el sustrato, una o más dimensiones de las características y una indicación de un resto en una localización determinada.

### Síntesis de otras moléculas

Los métodos y composiciones objeto se pueden usar para sintetizar otros tipos de moléculas de interés. La síntesis de péptidos en regiones de rejilla seleccionadas es uno de esos casos. Se conocen en la técnica diversas químicas adecuadas utilizadas en el crecimiento por etapas de péptidos en una superficie de matriz. Las técnicas de síntesis de péptidos descritas en la Patente de Estados Unidos N.º 5.449.754, pueden usarse con la presente divulgación. Los métodos y composiciones de la divulgación descritos en el presente documento también encuentran utilidad en la síntesis química de fármacos, inhibidores de proteínas o cualquier síntesis química en la que se desee la síntesis rápida de una pluralidad de compuestos.

### Ensamblaje de genes

En diversos ejemplos, la presente divulgación se refiere a la preparación de una secuencia polinucleotídica (también denominada "gen") usando el ensamblaje de oligonucleótidos más cortos superpuestos sintetizados o aplicados puntualmente sobre superficies de sustratos o, como alternativa, sustratos que albergan superficies adecuadas para la síntesis o aplicación puntual de oligonucleótidos, por ejemplo, perlas. Los oligonucleótidos más cortos se pueden combinar en la misma cadena usando oligonucleótidos de hibridación con regiones complementarias a oligonucleótidos ensamblados consecutivos, por ejemplo, utilizando una polimerasa que carezca de actividad de desplazamiento de cadena, una ligasa, química click, o cualquier otro método de ensamblaje adecuado conocido en la técnica. De esta manera, la secuencia del nucleótido de hibridación puede replicarse entre los oligonucleótidos consecutivos de la cadena opuesta. En algunos casos, los oligonucleótidos consecutivos de la misma cadena pueden suturarse entre sí sin la introducción de elementos de secuencia del oligonucleótido de hibridación, por ejemplo usando una ligasa, química click, o cualquier otra química de ensamblaje adecuada conocida en la técnica. En algunos casos, Pueden sintetizarse polinucleótidos más largos jerárquicamente a través de rondas de ensamblaje que implican polinucleótidos/oligonucleótidos más cortos.

Pueden sintetizarse genes o genomas de novo a partir de oligonucleótidos ensamblando polinucleótidos grandes como se describe en la síntesis de un genoma viral (7,5 kb; Cello et al, Science, 2002, 297, 1016), genoma de bacteriófago (5,4 kb; Smith et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 15440) y un grupo de genes de hasta 32 kb (Kodumal et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101, 15573), todos los cuales se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Se pueden fabricar bibliotecas de secuencias largas de ADN sintético, siguiendo los métodos descritos en el ensamblaje del genoma de 582 kb de una bacteria (*Mycoplasma genitalium*) por Venter y colaboradores (Gibson et al, Science, 2008, 319, 1215. Además, se pueden construir grandes biomoléculas de ADN con oligonucleótidos, como se describe para el caso de un ácido nucleico de 15 kb (Tian et al, Nature, 2004, 432, 1050). Los métodos y composiciones de la divulgación contemplan grandes bibliotecas de secuencias polinucleotídicas sintetizadas de novo usando métodos de ensamblaje de genes descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. La síntesis de tales secuencias se realiza típicamente en paralelo en altas densidades en regiones adecuadas de sustratos que se describen con más detalle en otras partes del presente documento. Además, estas grandes bibliotecas pueden sintetizarse con tasas de error muy bajas, como se describe con más detalle en otras partes del presente documento.

Los genes se pueden ensamblar a partir de un gran número de oligonucleótidos sintetizados que se combinan. Por ejemplo, se puede aplicar la síntesis de genes utilizando un conjunto de 600 oligonucleótidos distintos como se describe por Tian *et al.* (Tian *et al.* Nature, 432:1050, 2004). La longitud de los genes ensamblados se puede ampliar aún más utilizando oligonucleótidos más largos. Para genes y fragmentos de ADN aún más grandes, por ejemplo, mayores de aproximadamente 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5 kb o más, se puede aplicar más de una ronda de síntesis, típicamente dentro de un proceso de ensamblaje de genes jerárquico. El ensamblaje y síntesis por PCR a partir de oligonucleótidos como se describe en el presente documento puede adaptarse para su uso en serie, como se describe a continuación.

Se puede usar una variedad de métodos de ensamblaje de genes de acuerdo con los métodos y composiciones de la divulgación, que van desde métodos tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Chalmers y Curnow, Biotechniques, 30(2), 249-52, 2001; Wosnick et al, Gene, 60(1), 115-27, 1987) a conjuntos de estrategias de PCR (Stemmer et al, 164, Gene, 49-53, 1995; Prodromou y L. H. Pearl, 5(8), Protein Engineering, 827-9, 1992; Sandhu et al, 12(1), BioTechniques, 14-6, 1992; Young y Dong, Nucleic Acids Research, 32(7), e59, 2004; Gao et al, Nucleic

Acids Res., 31, e143, 2003; Xiong et al, Nucleic Acids Research, 32(12), e98, 2004) (FIG. 11). Si bien la mayoría de los protocolos de ensamblaje comienzan con grupos de oligos sintetizados superpuestos y terminan con la amplificación por PCR del gen ensamblado, la ruta entre esos dos puntos puede ser bastante diferente. En el caso de LCR, la población de oligo inicial tiene extremos 5' fosforilados que permiten que una ligasa, por ejemplo, la ADN ligasa Pfu, conecte covalentemente estos "bloques de construcción" entre sí para formar el molde inicial. El ensamblaje por PCR, sin embargo, normalmente utiliza oligos no fosforilados, que se someten a ciclos de PCR repetitivos para extender y crear un molde de longitud completa. Adicionalmente, los procesos de LCR pueden requerir concentraciones de oligo en el intervalo  $\mu\text{M}$ , mientras que las opciones de PCR de cadena sencilla y de cadena doble tienen requisitos de concentración mucho más bajos (por ejemplo, intervalo nM).

Los intentos de síntesis publicados han utilizado oligos que varían en tamaño de 20 a 70 pb, ensamblaje mediante hibridación de superposiciones (6-40 pb). Dado que muchos factores están determinados por la longitud y composición de los oligos ( $T_m$ , estructura secundaria, etc.), el tamaño y la heterogeneidad de esta población podrían tener un gran efecto sobre la eficacia del ensamblaje y la calidad de los genes ensamblados. El porcentaje de producto de ADN final correcto depende de la calidad y el número de oligo de los "bloques de construcción". Los oligos más cortos tienen una tasa de mutación más baja en comparación con los oligos más largos, pero se requieren más oligos para construir el producto de ADN. Además, las superposiciones reducidas de los oligos más cortos dan como resultado una menor  $T_m$  de la reacción de hibridación, lo cual promueve la hibridación inespecífica y reduce la eficacia del proceso de ensamblaje. Los métodos y composiciones de la divulgación abordan este problema mediante el suministro de oligonucleótidos largos con bajas tasas de error.

Un campo térmico variable en el tiempo se refiere al calentamiento regulado por el tiempo del dispositivo microfluídico para permitir que se produzcan reacciones de amplificación por PCR o PCA. El campo térmico variable en el tiempo se puede aplicar externamente, por ejemplo colocando un sustrato de dispositivo con reactores, por ejemplo, nanorreactores en la parte superior de un bloque de calentamiento térmico, o integrados dentro de un dispositivo microfluídico, por ejemplo, como un calentador de película delgada localizado inmediatamente debajo de las cámaras de PCA y PCR. Un controlador de temperatura puede variar la temperatura del elemento calentador junto con un sensor de temperatura conectado a un elemento calentador o integrado en la cámara de reacción. Un temporizador puede variar la duración del calor aplicado a las cámaras de reacción.

La temperatura del campo térmico puede variar de acuerdo con las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión de las reacciones PCR o PCA. Normalmente, los ácidos nucleicos se desnaturalizan a aproximadamente  $95\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 min, seguido de 30 o más ciclos de desnaturalización a  $95\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 segundos, templado a  $40\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 segundos y extensión a aproximadamente  $72\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 segundos, y una última extensión de  $72\text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. La duración y las temperaturas utilizadas pueden variar dependiendo de la composición de los oligonucleótidos, cebadores de PCR, tamaño del producto amplificado, molde y los reactivos utilizados, por ejemplo la polimerasa.

Las polimerasas son enzimas que incorporan nucleósido trifosfatos o desoxinucleósido trifosfatos, para extender un extremo 3' hidroxilo de un cebador de PCR, un oligonucleótido o un fragmento de ADN. Para un análisis general sobre las polimerasas, véase Watson, J. D. et al, (1987) Molecular Biology of the Gene, 4<sup>a</sup> Ed., W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif. Las polimerasas adecuadas incluyen, pero sin limitación, polimerasa KOD; polimerasa Pfu; Taq-polimerasa; ADN polimerasa I de *E. coli*, fragmento "Klenow", polimerasa T7, polimerasa T4, polimerasa T5 y transcriptasa inversa, todas las cuales son conocidas en la técnica. Puede usarse una polimerasa con capacidad de corrección, tal como Pfu y Pyrobest para replicar el ADN con alta fidelidad. La ADN polimerasa Pfu posee actividad de corrección exonucleasa 3' a 5', por tanto, puede corregir errores de incorporación errónea de nucleótidos. En varios ejemplos de la divulgación, los fragmentos de ácido nucleico se unen entre sí preferentemente mediante una reacción de hibridación específica entre regiones superpuestas de segmentos mutuamente complementarios de los fragmentos de ácido nucleico, obteniéndose así ácidos nucleicos sintéticos bicatenarios más largos. Los segmentos de secuencia individuales usados para construir ácidos nucleicos más largos pueden tener una longitud de, por ejemplo, 20-200, 50-300, 75-350 o 100-400 bloques de construcción de nucleótidos. Los expertos en la materia apreciarán que la longitud del segmento de secuencia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores (por ejemplo, 20-350 o 200-350).

Los segmentos de secuencia se seleccionan preferentemente de tal manera que se superpongan al menos parcialmente sobre un segmento de secuencia de la cadena antisentido del ácido nucleico complementario que se va a sintetizar, de modo que la cadena de ácido nucleico que se va a sintetizar se pueda construir mediante hibridación de segmentos de secuencia individuales. En un ejemplo alternativo, los segmentos de secuencia se seleccionan preferentemente de modo que los segmentos de secuencia en ambas cadenas del ácido nucleico a sintetizar se superpongan completamente y, por consiguiente, la preparación de una cadena doble más o menos completa ahora solo requiere un enlace covalente de la cadena principal de fosfodiéster. La longitud de las regiones complementarias o superposiciones entre fragmentos individuales puede ser, por ejemplo, de 10-50, 10-100, 12-25, 20-80, 15-20 o 15-25 bloques de construcción de nucleótidos. Los expertos en la materia apreciarán que la longitud del segmento de secuencia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores (por ejemplo, 25-100 o 10-25). Si la región de superposición o complementariedad entre dos fragmentos de ácido nucleico tiene un alto contenido de AT, por ejemplo, un contenido de AT superior al 50 %, 60 %, 65 % o más, la constante de unión es menor

en comparación con las secuencias más ricas en GC. Por consiguiente, por razones termodinámicas, la hibridación entre estos fragmentos puede ser de eficacia comparativamente baja. Esto puede influir en el ensamblaje de 2 o más fragmentos. Una posible consecuencia dependiente de la secuencia es un rendimiento reducido de cadenas dobles de ácido nucleico con la secuencia diana correcta. Por consiguiente, los segmentos de secuencia para ensamblar genes se pueden diseñar con los niveles deseados de contenido de GC en regiones superpuestas, por ejemplo, un contenido de GC de más del 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 % o superior. Se puede encontrar un análisis más detallado de ejemplos de métodos de ensamblaje de genes en la Patente de Estados Unidos N.º 8367335.

En diversos ejemplos, se pueden usar estrategias basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y no basadas en el ensamblaje cíclico de la polimerasa (PCA) para la síntesis química de genes. Además, puede usarse la síntesis química de genes no basada en PCA utilizando diferentes estrategias y métodos, incluyendo la síntesis de genes enzimática, reacción de hibridación y ligamiento, síntesis simultánea de dos genes a través de un gen híbrido, ligamiento shotgun y coligamiento, síntesis de genes de inserción, síntesis de genes a través de una cadena de ADN, ligamiento dirigido por molde, reacción en cadena de la ligasa, síntesis de genes mediada por micromatriz, tecnología de soporte sólido de Blue Heron, tecnología de bloques de construcción de Sloning, ensamblaje de genes mediado por ARN, método de síntesis de genes basado en PCR termodinámicamente equilibrada de adentro hacia afuera (TBIO) (Gao *et al.*, 2003), método de síntesis de genes total de dos etapas que combina PCR asimétrica dual (DA-PCR) (Sandhu *et al.*, 1992), PCR de extensión solapante (Young y Dong, 2004), síntesis de ADN de dos etapas basada en PCR (PTDS) (Xiong *et al.*, 2004b), método de PCR sucesivo (Xiong *et al.*, 2005, 2006a), o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica, en relación con los métodos y composiciones descritas en el presente documento, para el ensamblaje de polinucleótidos más largos a partir de oligonucleótidos más cortos.

Las secuencias de ADN que se han sintetizado químicamente utilizando los métodos y composiciones de la divulgación pueden extenderse para formar largas secuencias polinucleotídicas, por ejemplo, secuencias polinucleotídicas de más de 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 7500, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 75000, 100000 pares de bases o más largas. Los métodos y composiciones de la divulgación también permiten la síntesis química de secuencias polinucleotídicas con tasas de error muy bajas, como se describe adicionalmente en otras partes del presente documento.

En diversos ejemplos, se usan variaciones de las técnicas de ensamblaje mediadas por polimerasa, denominadas colectivamente construcción y amplificación por polimerasa, para la síntesis química de polinucleótidos. Algunas de las tecnologías comúnmente utilizadas conocidas en la técnica para la síntesis de genes personalizados se basan en el ensamblaje cíclico de la polimerasa y pueden conseguir la síntesis de novo de polinucleótidos más largos mediante el ensamblaje de un conjunto de oligonucleótidos. El conjunto de oligonucleótidos se puede sintetizar como bloques de construcción para su uso en diversas técnicas de síntesis de genes. La secuencia, longitud y distribución precisa de los oligonucleótidos, así como cualquier secuencia que se superponga dentro del grupo, puede diseñarse de acuerdo con la secuencia polinucleotídica deseada y el método de ensamblaje utilizado. El ADN de longitud completa deseado se puede obtener, por ejemplo, mediante unas pocas etapas de PCR con las condiciones de temperatura necesarias para la desnaturalización, hibridación y alargamiento de oligonucleótidos superpuestos.

#### Ensamblaje por PCR (PCA)

El ensamblaje por PCR usa la extensión de cadena mediada por la polimerasa en combinación con al menos dos oligonucleótidos que tienen extremos complementarios que pueden hibridar de manera que al menos uno de los polinucleótidos tenga un 3'-hidroxilo libre capaz de alargar la cadena polinucleotídica por una polimerasa (por ejemplo, una polimerasa termoestable tal como la polimerasa Taq, Polimerasa VENT™ (New England Biolabs), KOD (Novagen) y similares). Los oligonucleótidos superpuestos se pueden mezclar en una reacción de PCR convencional que contenga dNTP, una polimerasa y tampón. Los extremos superpuestos de los oligonucleótidos, tras la hibridación, crean regiones de secuencias de ácidos nucleicos bicatenarias que sirven como cebadores para el alargamiento por la polimerasa en una reacción PCR. Los productos de la reacción de alargamiento sirven como sustratos para la formación de secuencias de ácidos nucleicos bicatenarias más largas, que eventualmente dan como resultado la síntesis de la secuencia diana de longitud completa. Las condiciones de la PCR pueden optimizarse para aumentar el rendimiento de la secuencia de ADN larga diana.

Se pueden usar diversos métodos basados en PCR para sintetizar genes a partir de oligonucleótidos. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, método termodinámicamente equilibrado de adentro hacia afuera (TBIO) (Gao *et al.*, Nucleic Acids Research, 31: e143, 2003), PCR sucesiva (Xiong *et al.*, Nucleic Acids Research, 32: e98, 2004), PCR asimétrica dual (DA-PCR) (Sandhu *et al.*, Biotechniques, 12:14, 1992), PCR de extensión solapante (OE-PCR) (Young y Dong, Nucleic Acids Research, 32: e59, 2004; Prodromou y Pearl, Protein Eng., 5: 827, 1992) y síntesis de ADN de dos etapas basada en PCR (PTDS) (Xiong *et al.*, Nucleic Acids Research, 32: e98, 2004), todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad y se pueden adaptar para ensamblar un molde de PCR en un dispositivo microfluídico.

DA-PCR es un proceso de una sola etapa para construir genes sintéticos. En un ejemplo, cuatro oligonucleótidos adyacentes de, por ejemplo, 17-100 bases de longitud con superposiciones de, por ejemplo, 15-17 bases se usan como cebadores en una reacción de PCR. Otros tamaños de superposición y oligonucleótidos adecuados están dentro

de los límites de la divulgación como se describe con más detalle en el presente documento. La cantidad de los dos cebadores internos está muy limitada y la reacción resultante provoca una amplificación asimétrica monocatenaria de las dos mitades de la secuencia total debido a un exceso de los dos cebadores flanqueantes. En ciclos de PCR posteriores, estos fragmentos duales amplificados asimétricamente, que se superponen entre sí, producen un producto bicatenario de longitud completa.

La síntesis TBIO requiere solo cebadores de cadena de sentido para la mitad amino-terminal y solo cebadores de cadena antisentido para la mitad carboxi-terminal de una secuencia génica. Además, los cebadores TBIO pueden contener regiones idénticas de superposición de cebadores con temperatura optimizada. El método TBIO implica la complementación entre el siguiente par de cebadores externos con los extremos de un fragmento interno completamente sintetizado. El alargamiento bidireccional de TBIO se completa para un par de cebadores externos dado antes de que tenga lugar la siguiente ronda de alargamiento bidireccional.

La PCR sucesiva es un enfoque de PCR de una sola etapa en el que la mitad de los cebadores de sentido corresponde a la mitad del molde que se va a ensamblar y los cebadores antisentido corresponden a la segunda mitad del molde que se va a ensamblar. Con este enfoque, La amplificación bidireccional con un par de cebadores externos no se producirá hasta que se complete la amplificación con un par de cebadores internos.

PDTs generalmente implica dos etapas. En primer lugar se sintetizan fragmentos individuales del ADN de interés: en algunos ejemplos de la divulgación, se mezclan 10-12 oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos de aproximadamente 60, 80, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 o más nucleótidos, con aproximadamente 20 pb de superposición y se lleva a cabo una reacción PCR con una polimerasa, tal como ADN polimerasa *pfu*, para producir fragmentos de ADN más largos. Y en segundo lugar, se sintetiza toda la secuencia del ADN de interés: se combinan 5-10 productos de PCR de la primera etapa y se utilizan como molde para una segunda reacción de PCR con una polimerasa, tal como la ADN polimerasa *pyrobest* con dos oligonucleótidos más externos como cebadores.

Aunque el ensamblaje por PCR que utiliza oligonucleótidos cortos funciona bien para ácidos nucleicos relativamente más cortos, puede haber un límite para el número máximo de oligonucleótidos que se pueden ensamblar en una sola reacción. Esto puede imponer un límite de tamaño al producto de ADN bicatenario. Una solución a este problema es hacer el ADN en serie. En este esquema, se sintetizan múltiples segmentos de ADN más pequeños en paralelo en cámaras separadas, en múltiples chips, o en serie y luego se introducen juntos como precursores de la reacción de PCA para ensamblar en un fragmento de ADN "más grande" para la posterior amplificación por PCR. En otras palabras, el ensamblaje por PCR usando oligonucleótidos daría como resultado un molde (un molde de primera ejecución) para la amplificación por PCR. Varios moldes de primera ejecución así producidos pueden servir como precursores para el ensamblaje PCA de fragmentos de ADN más grandes que los moldes de primera ejecución, produciendo así moldes de segunda ejecución. A su vez, los moldes de segunda ejecución pueden servir como precursores para el ensamblaje de un molde de tercera ejecución, y así sucesivamente. El enfoque puede repetirse hasta que se obtenga el ADN deseado.

Los oligonucleótidos usados en las reacciones de síntesis son típicamente moléculas monocatenarias para ensamblar ácidos nucleicos que son más largos que el propio oligonucleótido. Un oligonucleótido puede ser, por ejemplo, de 20-200, 50-300, 75-350 o 100-400 bloques de construcción de nucleótidos. Los expertos en la materia apreciarán que la longitud del segmento de secuencia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores (por ejemplo, 20-350 o 200-350). Una cámara de PCA que contiene una pluralidad de oligonucleótidos se refiere al conjunto de oligonucleótidos necesarios para producir un molde correspondiente a un gen o a un fragmento de ADN. Cuando las reacciones y los dispositivos de síntesis se utilizan en serie, la cámara de PCA en la siguiente serie de reacciones contendría un conjunto de fragmentos de ADN en lugar de los oligonucleótidos de partida para el ensamblaje en moldes para PCR. La figura 12 demuestra el ensamblaje cíclico de la polimerasa de construcciones más largas a partir de un conjunto de oligonucleótidos superpuestos en construcciones gradualmente más largas a través de múltiples ciclos de reacción.

Se entiende que se pueden usar ventajosamente oligonucleótidos más largos, como se describe en el presente documento, en una diversidad de métodos de ensamblaje de genes para evitar errores de ensamblaje y aumentar la calidad de los genes sintetizados (figura 13). Las repeticiones homólogas o las regiones de alta GC en una secuencia a ensamblar pueden introducir errores asociados con el orden correcto y la hibridación de oligonucleótidos más pequeños. Los oligonucleótidos más largos pueden evitar estos problemas reduciendo la cantidad de oligonucleótidos que se deben ordenar y alinear, evitando secuencias problemáticas, tales como repeticiones de homología o regiones de alto contenido de GC de sitios de alineamiento, y/o reduciendo el número de ciclos de ensamblaje necesarios para ensamblar el gen deseado.

Se pueden sintetizar genes más grandes combinando métodos de ensamblaje de genes jerárquicamente como se ejemplifica en la figura 14. Por consiguiente, varios genes de longitud intermedia, por ejemplo de aproximadamente 2 kb, se pueden ensamblar utilizando un primer método de ensamblaje de genes, tal como PCA. Se puede utilizar un segundo método de ensamblaje de genes, por ejemplo, ensamblaje de Gibson (Gibson et al, Science, 2008, 319, 1215) para combinar los genes de longitud intermedia en genes más grandes, por ejemplo, de aproximadamente 5 o 10 kb. El ensamblaje jerárquico se puede aplicar por etapas. Pueden usarse técnicas de recombinación *in vitro* para

ensamblar casetes de genes de longitud intermedia en secuencias cada vez más largas, por ejemplo, de más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 kb o más.

- 5 Los oligonucleótidos útiles para el ensamblaje de genes de novo pueden sintetizarse en uno o más soportes sólidos. Los soportes sólidos ejemplares incluyen, por ejemplo, portaobjetos, perlas, chips, partículas, tiras, geles, láminas, tubos, esferas, recipientes, capilares, almohadillas, cortes, películas, placas, polímeros o un dispositivo microfluídico. Además, los soportes sólidos pueden ser biológicos, no biológicos, orgánicos, inorgánicos o combinaciones de los mismos. En soportes que son sustancialmente planos, el soporte puede estar físicamente separado en regiones, por ejemplo, con fosas, ranuras, pocillos o barreras químicas (por ejemplo, revestimientos hidrófobos, etc.). Los soportes también pueden comprender regiones físicamente separadas construidas en una superficie, que opcionalmente abarcan toda la anchura de la superficie. En el presente documento se describen adicionalmente soportes adecuados para la síntesis mejorada de oligonucleótidos.
- 10
- 15 En un aspecto, los oligonucleótidos se pueden proporcionar sobre un soporte sólido para su uso en un dispositivo microfluídico, por ejemplo, como parte de la cámara de reacción de PCA. Como alternativa, los oligonucleótidos se pueden sintetizar y posteriormente introducir en un dispositivo microfluídico.

20 Generalmente, la secuencia completa del gen se descompone en oligonucleótidos (N) de longitud variable o fija, según sea apropiado. Se puede elegir una longitud de oligonucleótido adecuada, por ejemplo, 20-200, 50-300, 75-350 o 100-400 bloques de construcción de nucleótidos. Los expertos en la materia apreciarán que la longitud del segmento de secuencia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores (por ejemplo, 20-350 o 200-350). La longitud de la superposición entre subsecuencias es aproximadamente o menos de aproximadamente N/2, pero puede elegirse según las necesidades de la reacción de ensamblaje, por ejemplo, 6-40 pb, 10-20 pb y 20-30 pb de superposición. Los expertos en la materia apreciarán que la longitud del segmento de secuencia puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores (por ejemplo, 20-40 o 6-30). La cantidad de complementariedad de bases parcial puede variar dependiendo del método de ensamblaje utilizado. Para varios métodos de ensamblaje de genes superpuestos, los oligonucleótidos de PCA pueden superponerse en los extremos 5' y 3', excepto los que forman los extremos del molde de PCR resultante. Los desacoplamientos de pares de bases entre oligonucleótidos pueden afectar a la hibridación dependiendo de la naturaleza del desacoplamiento. Los desacoplamientos en o cerca del extremo 3' del oligonucleótido pueden inhibir la extensión. Sin embargo, una región de superposición rica en G/C puede superar los desacoplamientos, dando como resultado moldes que contienen errores. Por consiguiente, pueden tenerse en cuenta la consideración de la secuencia de superposición, la temperatura de fusión, el potencial de hibridación cruzada y la estructura secundaria en el diseño de oligonucleótidos.

25

30

35

Las secuencias de ácido nucleico que resultan de una reacción de ensamblaje por PCR pueden denominarse moldes y servir como ácido nucleico diana para la reproducción de una cadena complementaria por PCR. Normalmente, después de una reacción de ensamblaje, los productos de ensamblaje de PCR pueden ser ADN bicatenarios de tamaños variables debido quizás al ensamblaje incompleto y/o concatámeros. En algunos ejemplos, se ensambla un molde de primera ejecución a partir de oligonucleótidos. En otros ejemplos, se ensambla un molde de segunda ejecución a partir de fragmentos de ADN que comprenden al menos dos moldes de primera ejecución, siendo los dos moldes los productos de la reacción de PCR, opcionalmente purificados y/o filtrados por errores, obtenidos de las dos primeras ejecuciones. Se ensambla un molde de tercera ejecución a partir de fragmentos de ADN que comprenden al menos dos moldes de segunda ejecución, que pueden estar filtrados por errores de manera similar y así sucesivamente.

40

45

También pueden usarse para la síntesis química de polinucleótidos estrategias no basadas en ensamblaje cíclico por la polimerasa, tales como la reacción de hibridación y ligamiento (Climie y Santi, 1990; Smith *et al.*, 1990; Kalman *et al.*, 1990), síntesis de genes de inserción (IGS) (Ciccarelli *et al.*, 1990), síntesis de genes a través de una cadena (Chen *et al.*, 1990), ligamiento dirigido por molde (TDL) (Strizhov *et al.*, 1996), reacción en cadena de la ligasa (Au *et al.*, 1998), o cualquier método de ensamblaje adecuado conocido en la técnica. Otras estrategias de síntesis de genes no basadas en ensamblaje cíclico por la polimerasa incluyen, pero no se limitan a la tecnología de síntesis de genes basada en micromatrices (Zhou *et al.*, 2004), tecnología de soporte sólido de Blue Heron, tecnología de bloques de construcción de Sloning (Ball, 2004; Schmidt, 2006; Bugl *et al.*, 2007) y el ensamblaje de genes mediado por ARN a partir de matrices de ADN (Wu *et al.*, 2012).

50

55

### Síntesis enzimática de genes

Pueden usarse enzimas que reparan roturas monocatenarias en el ADN bicatenario, descubiertas por primera vez en la década de 1960 en *E. coli* y en células *E. coli* infectadas por bacteriófagos T4 (Meselson, 1964; Weiss y Richardson, 1967; Zimmerman *et al.*, 1967), para unir oligonucleótidos sintetizados químicamente, tales como desoxirribopolinucleótidos, para formar estructuras bihelicoidales continuas (Gupta *et al.*, 1968a). En otro ejemplo, puede usarse la ADN polimerasa I (Klenow) para unir oligonucleótidos formando polinucleótidos más largos. Además, los oligonucleótidos se pueden unir mediante ligamiento, por ejemplo usando una ligasa, tal como usando la polinucleótido ligasa del fago T4. En algunos casos, los oligonucleótidos se pueden ligar jerárquicamente, formándose polinucleótidos cada vez más largos en cada etapa.

60

65

**Reacción de hibridación y ligamiento**

5 Otro enfoque para la síntesis fácil de genes comprende el ensamblaje de un polinucleótido a partir de muchos oligonucleótidos a través de una reacción de hibridación y ligamiento (Climie y Santi, 1990; Smith *et al.*, 1990; Kalman *et al.*, 1990). En el primero, las dos cadenas de las secuencias deseadas se pueden dividir con extremos cohesivos cortos de modo que puedan aparearse pares adyacentes de oligonucleótidos complementarios. Los oligonucleótidos sintetizados pueden fosforilarse, por ejemplo, usando una quinasa, e hibridarse antes del ligamiento en un dúplex.

10 **Ligamiento shotgun y coligamiento**

El método de ligamiento shotgun comprende el ensamblaje de un gen completo a partir de varios bloques sintetizados (Eren y Swenson, 1989). Por consiguiente, un gen puede subensamblarse en varias secciones, cada una construida por ligamiento enzimático de varios pares complementarios de oligonucleótidos sintetizados químicamente con cadenas sencillas cortas complementarias a las de un par adyacente. El coligamiento de las secciones puede lograr la síntesis del polinucleótido final.

**Síntesis de genes de inserción**

20 Puede usarse la síntesis de genes de inserción (IGS) (Ciccarelli *et al.*, 1990) para ensamblar una secuencia de ADN por etapas dentro de un plásmido que contiene un origen de replicación de fago de ADN monocatenario. El método IGS se basa en inserciones dirigidas consecutivas de oligonucleótidos de ADN largos dentro de un plásmido mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos.

25 **Síntesis de genes a través de una cadena**

La síntesis de genes a través de una cadena se refiere a un método para sintetizar un gen a través de una cadena (Chen *et al.*; 1990). Un ADN de cadena positiva del gen diana se puede ensamblar mediante una reacción de ADN ligasa de T4 por etapas o en una sola etapa con varios, por ejemplo seis, oligonucleótidos en presencia de múltiples, por ejemplo dos, oligonucleótidos complementarios terminales y múltiples, por ejemplo, tres, oligonucleótidos complementarios cortos entre fragmentos. El uso de menos bases sintetizadas, en comparación con los métodos de doble cadena o superposición, puede reducir los costes.

**Ligamiento dirigido por molde**

35 El ligamiento dirigido por molde se refiere a un método para construir grandes genes sintéticos mediante ligamiento de módulos de oligonucleótidos, por hibridación parcial con un molde de ADN monocatenario derivado de un gen de tipo silvestre (Strizhov *et al.*; 1996). Se pueden sintetizar oligonucleótidos que comprenden solo una cadena, a diferencia de otras tecnologías que requieren la síntesis de dos cadenas. Puede usarse una ligasa, tal como la ADN ligasa *Pfu* para realizar ciclos térmicos para el ensamblaje, selección y ligamiento de oligonucleótidos de longitud completa, así como para la amplificación lineal del producto de ligamiento dirigida por molde (TDL). Debido a su dependencia de un molde homólogo, este método es adecuado para la síntesis de solo un número limitado de secuencias con similitud con una molécula polinucleotídica existente.

45 **Reacción en cadena de la ligasa**

Se puede utilizar un método de reacción en cadena de la ligasa (LCR) para la síntesis de polinucleótidos (Au *et al.*; 1998). Los fragmentos se pueden ensamblar a partir de varios oligonucleótidos mediante ligamiento, usando una ligasa, por ejemplo ADN ligasa *Pfu*. Después de la LCR, el gen de longitud completa se puede amplificar con la mezcla de fragmentos que comparten una superposición por desnaturalización y extensión usando los dos oligonucleótidos externos.

**Síntesis de genes mediada por micromatriz**

55 La síntesis de genes mediada por micromatriz, como concepto general, se basa en la capacidad de inmovilizar decenas de miles de sondas específicas en una pequeña superficie sólida (Lockhart y Barlow, 2001). Para la producción de matrices, el ADN se puede sintetizar directamente sobre el soporte sólido (Lipshutz *et al.*, 1999; Hughes *et al.*, 2001) o se puede depositar en una forma sintetizada previamente sobre la superficie, por ejemplo con pasadores o impresoras de inyección de tinta (Goldmann y González, 2000). Los oligonucleótidos obtenidos se pueden usar en condiciones de ligamiento con ciclos térmicos para generar construcciones de ADN de varios cientos de pares de bases. Otra tecnología basada en microchip para la síntesis precisa de genes multiplex, la tecnología de síntesis de genes mediada por matrices modificada (Tian *et al.*, 2004), es similar a la amplificación y ensamblaje de ADN eluido por chip (AACED), un método desarrollado para la síntesis de genes de alto rendimiento (Richmond *et al.*, 2004). Se pueden sintetizar conjuntos de miles de oligonucleótidos de 'construcción' y oligonucleótidos de 'selección' complementarios etiquetados en chips microfluídicos fotoprogramables, liberarse, amplificarse por ligamiento y seleccionarse por hibridación para reducir los errores de síntesis (Tian *et al.*, 2004).

### Tecnología Blue Heron

5 La tecnología Blue Heron, desarrollada por Blue Heron Biotechnology, se basa en una estrategia de soporte en fase sólida basada en la plataforma GeneMaker y permite la automatización (Parker y Mulligan, 2003; Mulligan y Tabone, 2003; Mulligan *et al.*, 2007). El protocolo GeneMaker generalmente puede comprender una entrada de datos de secuencia de usuario, un algoritmo que diseña oligonucleótidos adecuados para el ensamblaje de la secuencia introducida, síntesis de oligonucleótidos e hibridación en dúplex, ensamblaje en fase sólida basado en ligamiento automatizado a través de adiciones secuenciales automatizadas dentro de una columna en una matriz de soporte  
10 sólido y/o clonación y verificación de la secuencia. La tecnología Blue Heron se basa en la adición secuencial de bloques de construcción para reducir los errores que se producen con otros métodos de ensamblaje de genes basados en grupos de bloques de construcción que no están en serie, tales como los métodos de PCR.

15 Diversos ejemplos de la divulgación hacen uso de métodos de ensamblaje en serie y jerárquicos como se ejemplifica en la implementación de la tecnología Blue Heron.

### Tecnología de bloques de construcción de Sloning

20 La tecnología de bloques de construcción de Sloning (Slonomics™; Sloning Biotechnology GmbH, Puchheim, Alemania) es otro método que utiliza una estrategia basada en el ligamiento para la síntesis química de genes (Adis International, 2006). El método de síntesis de Sloning consiste en una serie de etapas de reacción repetitivas y estandarizadas paralelas (pipeteo, mezcla, incubación, lavado) (Schatz y O'Connell, 2003; Schatz *et al.*, 2004; Schatz, 2006). A diferencia del ligamiento de oligonucleótidos diseñados específicamente y sintetizados para una construcción génica determinada, la tecnología de Sloning utiliza una biblioteca de bloques de construcción estandarizados que se  
25 pueden combinar para formar cualquier secuencia deseada con una serie de etapas de reacción estandarizadas, completamente automatizadas y baratas (Schatz y O'Connell, 2003; Schatz, 2006).

### Ensamblaje Golden Gate

30 El método Golden-gate (véase, por ejemplo, Engler *et al.* (2008) PLoS ONE, 3(11): e3647; Engler *et al.* (2009) PLoS ONE 4 (5): e5553) ofrece un ensamblaje estandarizado de ADN de múltiples partes. El método Golden-gate puede utilizar endonucleasas de Tipo II, cuyos sitios de reconocimiento están distales de sus sitios de corte. Hay varias endonucleasas de tipo II diferentes para elegir, por ejemplo BsaI. El método Golden-gate puede resultar ventajoso mediante el uso de una única endonucleasa de Tipo II. El método Golden-gate se describe con más detalle en la  
35 Publicación de Patente de Estados Unidos 2012/0258487, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En algunos casos, los métodos y composiciones para el ensamblaje de genes pueden implicar una combinación de bloques de construcción sintetizados específicamente y bloques de construcción presintetizados. Pueden almacenarse bibliotecas de oligonucleótidos presintetizados y pueden optimizarse los procesos de ensamblaje para los ácidos nucleicos diana deseados para el uso máximo de oligonucleótidos presintetizados, minimizando la necesidad de una nueva síntesis. Los oligonucleótidos sintetizados específicamente pueden rellenar partes de un ácido nucleico diana, para las cuales no hay cobertura en bibliotecas de oligonucleótidos presintetizados.

### 45 Ensamblaje de genes mediado por ARN

En diversos ejemplos, se usa el ensamblaje de genes mediado por ARN para ensamblar transcritos de ARN a partir de elementos de ADN, opcionalmente inmovilizados en una superficie que forma una matriz de ADN inmovilizado. Los elementos de ADN están diseñados para incluir una secuencia promotora de ARN polimerasa (RNAP), tal como una  
50 secuencia promotora de la ARN polimerasa T7, hacia el extremo 5'. La hibridación de un oligonucleótido que codifica la secuencia promotora, tal como la secuencia promotora de RNAP T7, con un elemento de ADN puede producir un promotor de doble cadena. La adición de RNAP puede afectar a la transcripción a partir de estos promotores, opcionalmente unidos a la superficie, produciendo muchas copias de ARN. Estas moléculas de ARN amplificadas pueden diseñarse para permitir que el autoensamblaje produzca un ARN más largo. En resumen, los elementos de  
55 ADN pueden diseñarse para codificar "secuencias de segmentos", que son las secciones del transcrito de ARN de longitud completa deseada y "secuencias de férula", que son ARN complementarios que sirven como moldes para dirigir el correcto ensamblaje de los segmentos de ARN. Los elementos de ADN que codifican segmentos o férulas de ARN se pueden elegir para optimizar una o más reacciones durante la síntesis de polinucleótidos ensamblados. Por ejemplo, los elementos de ADN pueden construirse de manera que el extremo 5' de cada transcrito de ARN corresponda a un dinucleótido GG, que se cree que consigue una mayor eficacia de transcripción exhibida por la ARN polimerasa de T7 (RNAP T7). A su vez, pueden evitarse las secuencias de trinucleótidos GGG en el extremo 5', para evitar dar lugar a una escalera de transcritos poli G en la que el número de restos de G puede variar entre 1-3, atribuido al "deslizamiento" de la enzima durante el acoplamiento de GTP. El ensamblaje puede verse afectado por la hibridación  
60 ARN:ARN de los segmentos a las férulas. Las mellas se pueden sellar química o enzimáticamente, utilizando una enzima adecuada conocida en la técnica. En un ejemplo, el ensamblaje de las secuencias del segmento de ARN en el transcrito de ARN de longitud completa incluye el ligamiento con la ARN ligasa 2 de T4. Los transcritos trifosforilados,

tales como los generados por la ARN polimerasa de T7 se pueden "recortar" a sus análogos monofosforilados antes del ligamiento. El recorte se puede lograr mediante el tratamiento del conjunto de transcritos con ARN 5' pirofosfohidrolasa que elimina un grupo pirofosfato del extremo 5' de cada ARN. El transcrito, una vez sintetizado, se puede copiar mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para producir el gen correspondiente. La secuencia de ARN ensamblada o su ADN equivalente se puede amplificar usando un método de amplificación de ácido nucleico adecuado, incluyendo los descritos en otras partes del presente documento. El método se describe con más detalle en Wu *et al.* (Cheng-Hsien Wu, Matthew R. Lockett y Lloyd M. Smith, RNA-Mediated Gene Assembly from DNA Arrays, 2012, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 4628-4632).

## 10 Ligamiento químico no enzimático de ADN

Otros enfoques incluyen, ligamiento químico no enzimático de ADN, por ejemplo con bromuro de cianógeno como agente de condensación, como se describe para la síntesis de un minigen biológicamente activo de 183 pb (Shabarova *et al.*, 1991).

En algunos ejemplos, el ensamblaje de oligonucleótidos comprende el uso de química CLICK. Se conocen en la técnica métodos adecuados para unir varias moléculas usando la química CLICK (para el enlace químico CLICK de oligonucleótidos, véase, por ejemplo, El-Sagheer *et al.* (PNAS, 108: 28, 11338-11343, 2011). La química click se puede realizar en presencia de Cu<sup>1</sup>.

## 20 Tasas de error y correcciones

Una limitación crítica de la tecnología actual de síntesis de genes es la baja fidelidad de secuencia del proceso: los clones de genes creados a partir de ADN sintetizado químicamente a menudo contienen errores de secuencia. Estos errores se pueden introducir en muchas etapas del proceso: durante la síntesis química de los oligonucleótidos componentes, durante el ensamblaje de los oligonucleótidos bicatenarios, y por el daño químico que se produce durante la manipulación y el aislamiento del ADN o durante el proceso de clonación.

Los métodos conocidos que generan fragmentos de ADN sintetizados químicamente tienen tasas de error de secuencia muy altas, por ejemplo, cada 200 a 500 pb en promedio. Los métodos descritos en el presente documento permiten la síntesis inicial de novo de oligonucleótidos y polinucleótidos más largos con tasas de error muy bajas. Las mutaciones comunes en oligonucleótidos comprenden deleciones que pueden provenir de fallos de tapado, oxidación y/o desbloqueo. Otras reacciones secundarias importantes incluyen la modificación de guanósina (G) por amoniaco para dar 2,6-diaminopurina, que codifica como una adenosina (A). La desaminación también es posible con citidina (C) formando uridina (U) y adenosina formando inosina (I).

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los ejemplos no limitantes de modificaciones de bases típicamente producidas durante la síntesis de un oligonucleótido usando el método de fosforamidita incluyen la transaminación del oxígeno O6 de desoxiguanósina para formar un resto de 2,6-diaminopurina, desaminación de la N4-amina de desoxicitidina para formar un resto de uridina (Eadie, J. S. y Davidson, D. S., *Nucleic Acids Res.* 15: 8333, 1987), despurinación de N6-benzoil-desoxiadenosina produciendo un sitio apurínico (Shaller, H. y Khorana, H. G., *J. Am. Chem. Soc.* 85: 3828, 1963; Matteucci, M. D. y Caruthers, M. H., *J. Am. Chem. Soc.* 103: 3185, 1981) y la eliminación incompleta del grupo protector de N2-isobutililamida en la desoxiguanósina. Cada uno de estos productos secundarios (subproductos) puede contribuir a errores de secuencia en polinucleótidos sintéticos clonados.

Además, los métodos comunes de síntesis de oligonucleótidos son propensos a la formación de productos truncados que son menores que la longitud completa del oligonucleótido deseado. El enfoque de fase sólida para la síntesis de oligonucleótidos implica la construcción de una cadena de oligómeros que se ancla a un soporte sólido típicamente a través de su grupo 3'-hidroxilo, y se alarga mediante el acoplamiento de bloques de construcción a su extremo 5'. El rendimiento de cada etapa de acoplamiento en un ciclo de alargamiento de cadena dado será generalmente <100 %. Para un oligonucleótido de longitud n, hay n-1 enlaces y la estimación del rendimiento máximo normalmente se regirá por la [eficacia de acoplamiento]<sup>n-1</sup>. Para un oligonucleótido de 25 unidades, asumiendo una eficacia de acoplamiento del 98 %, el rendimiento máximo calculado de producto completo será de aproximadamente el 61 %. Por tanto, el producto final contendría cantidades decrecientes de n-1, n-2, n-3, etc. secuencias de fallos.

Otra clase de fallos sintéticos se producen en la formación de productos "n +" que son más largos que la longitud total del oligonucleótido deseado. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, estos productos pueden tener su origen en la ramificación del oligonucleótido en crecimiento, en la que un monómero de fosforamidita reacciona a través de las bases, especialmente el N-6 de la adenosina y el O-6 de la guanósina. Otra fuente de productos n+ es la iniciación y propagación desde sitios reactivos no deseados en el soporte sólido. Los productos n+ también pueden formarse si el grupo protector 5'-trilito se desprotege inadvertidamente durante la etapa de acoplamiento. Esta exposición prematura del 5'-hidroxilo permite una doble adición de una fosforamidita. Este tipo de fallo sintético del proceso de síntesis de oligonucleótidos también puede contribuir a errores de secuencia en genes sintéticos. Los métodos y composiciones de la divulgación, en diversos ejemplos, permiten reducir errores durante la síntesis de novo de oligonucleótidos mediante un control preciso de los parámetros de reacción como se describe con más detalle en otras partes del presente documento.

- Pueden introducirse otros tipos de errores durante el ensamblaje de oligonucleótidos en construcciones más largas durante los métodos de ensamblaje basados en PCR y no basados en PCR. Por ejemplo, el ligamiento de oligonucleótidos sintéticos bicatenarios con otros oligonucleótidos sintéticos bicatenarios para formar oligonucleótidos sintéticos bicatenarios puede ser propenso a errores. Por ejemplo, La ADN ligasa de T4 exhibe poca fidelidad, sellando mellas con desacoplamientos A/A o T/T 3' y 5' (Wu, D. Y., y Wallace, R. B., Gene 76: 245-54, 1989), desacoplamientos G/T 5' (Harada, K. y Orgel, L. Nucleic Acids Res. 21: 2287-91, 1993) o desacoplamientos C/A, C/T, T/G, T/T, T/C, A/C, G/G o G/T 3' (Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. y Hood, L., Science 241: 1077-80, 1988).
- 10 La tasa de error también limita el valor de la síntesis de genes para la producción de bibliotecas de variantes de genes. Con una tasa de error de 1/300, aproximadamente el 0,7 % de los clones en un gen de 1500 pares de bases serán correctos. Como la mayoría de los errores de la síntesis de oligonucleótidos dan como resultado mutaciones de desplazamiento de marco, más del 99 % de los clones en dicha biblioteca no producirán una proteína de longitud completa. La reducción de la tasa de error en un 75 % aumentaría la fracción de clones correctos en un factor de 40.
- 15 Los métodos y composiciones de la divulgación permiten la síntesis rápida de novo de grandes bibliotecas de oligonucleótidos y genes con tasas de error que son más bajas que en los métodos de síntesis de genes comúnmente observados debido tanto a la mejora de la calidad de la síntesis como a la aplicabilidad de métodos de corrección de errores que están habilitados de una manera masivamente paralela y eficaz en cuanto al tiempo. Por consiguiente, las bibliotecas se pueden sintetizar con inserción, eliminación o sustitución de bases o tasas de error totales inferiores a
- 20 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700, 1/800, 1/900, 1/1000, 1/1250, 1/1500, 1/2000, 1/2500, 1/3000, 1/4000, 1/5000, 1/6000, 1/7000, 1/8000, 1/9000, 1/10000, 1/12000, 1/15000, 1/20000, 1/25000, 1/30000, 1/40000, 1/50000, 1/60000, 1/70000, 1/80000, 1/90000, 1/100000, 1/125000, 1/150000, 1/200000, 1/300000, 1/400000, 1/500000, 1/600000, 1/700000, 1/800000, 1/900000, 1/1000000 o menos, en la biblioteca, o en más del 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 %, 99,99 % o más de la biblioteca. Los métodos y composiciones de la divulgación se refieren además a grandes bibliotecas de genes y oligonucleótidos sintéticos con bajas tasas de error asociadas con al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 %, 99,99 %, o más de los oligonucleótidos o genes en al menos un subconjunto de la biblioteca se relacionan con secuencias libres de errores en comparación con una secuencia predeterminada/preseleccionada. En algunos ejemplos, al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 %, 99,99 % o más de los oligonucleótidos o genes en un volumen aislado dentro de la biblioteca tienen la misma secuencia. En algunos ejemplos, al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 %, 99,99 % o más de los oligonucleótidos o genes relacionados con más del 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o más de similitud o identidad tienen la misma secuencia. En algunos ejemplos, se optimiza la tasa de error relacionada con un locus especificado en un oligonucleótido o gen. Por lo tanto, un locus dado o una pluralidad de loci seleccionados de uno o más oligonucleótidos o genes como parte de una gran biblioteca pueden tener cada uno una tasa de error menor que 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700, 1/800, 1/900, 1/1000, 1/1250, 1/1500, 1/2000, 1/2500, 1/3000, 1/4000, 1/5000, 1/6000, 1/7000, 1/8000, 1/9000, 1/10000, 1/12000, 1/15000, 1/20000, 1/25000, 1/30000, 1/40000, 1/50000, 1/60000, 1/70000, 1/80000, 1/90000, 1/100000, 1/125000, 1/150000, 1/200000, 1/300000, 1/400000, 1/500000, 1/600000, 1/700000, 1/800000, 1/900000, 1/1000000 o menos. En diversos ejemplos, tales loci optimizados para errores pueden comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 100000, 500000, 1000000, 2000000, 3000000 o más loci. Los loci optimizados para errores pueden distribuirse al menos en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 100000, 500000, 1000000, 2000000, 3000000 o más oligonucleótidos o genes.
- 45 Las tasas de error se pueden conseguir con o sin corrección de errores. Las tasas de error se pueden conseguir en toda la biblioteca o en más del 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 %, 99,99 % o más de la biblioteca.
- 50 La biblioteca puede comprender más de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 750, 1000, 15000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 75000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 750000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000 o más oligonucleótidos o genes diferentes. Los diferentes oligonucleótidos o genes pueden estar relacionados con secuencias predeterminadas/preseleccionadas. La biblioteca puede comprender oligonucleótidos o genes de más de 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1000 pb, 1250 pb, 1500 pb, 1750 pb, 2000 pb, 2500 pb, 3000 pb, 4000 pb, 5000 pb, 6000 pb, 7000 pb, 8000 pb, 9000 pb, 10 kb, 20 kb, 30 kb, 40 kb, 50 kb, 60 kb, 80 kb, 90 kb, 100 kb de longitud, o más largos. Se entiende que la biblioteca puede comprender una pluralidad de subsecciones diferentes, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 subsecciones o más, que se rigen por diferentes tasas de error y/o tamaños de construcción. Las composiciones y métodos de la divulgación permiten además la construcción de las grandes bibliotecas sintéticas de oligonucleótidos o genes mencionadas anteriormente con bajas tasas de error descritas anteriormente en períodos de tiempo cortos, tales como en menos de tres meses, dos meses, un mes, tres semanas, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 días o menos. Los genes de las bibliotecas mencionadas anteriormente pueden sintetizarse mediante el ensamblaje de oligonucleótidos sintetizados de novo mediante métodos de ensamblaje de genes adecuados descritos adicionalmente en detalle en otra parte del presente documento o
- 65

conocidos de otro modo en la técnica.

Se conocen varios métodos en la técnica para la eliminación de secuencias que contienen errores en un gen sintetizado. Puede emplearse una proteína de unión a desacoplamientos de ADN, MutS (de *Thermus aquaticus*) para eliminar los productos con fallos de genes sintéticos utilizando diferentes estrategias (Schofield y Hsieh, 2003; Carr *et al.*, 2004; Binkowski *et al.*, 2005). Algunas otras estrategias (Pogulis *et al.*, 1996; Ling y Robinson, 1997; An *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2006b) utilizan mutagénesis dirigida mediante PCR de extensión solapante para corregir errores, y se puede combinar con dos o más rondas de clonación y secuenciación, así como síntesis adicional de oligonucleótidos. La selección e identificación funcional después de la síntesis de genes es otro enfoque (Xiong *et al.*, 2004b; Smith *et al.*, 2003). Otro enfoque para la corrección de errores utiliza la endonucleasa SURVEYOR (Transgenomic), una endonucleasa de ADN específica de desacoplamientos para buscar mutaciones y polimorfismos conocidos y desconocidos en el ADN heterodúplex. La tecnología SURVEYOR se basa en una endonucleasa de ADN específica de desacoplamientos procedente del apio, la nucleasa Surveyor, que es un miembro de la familia de nucleasas CEL de endonucleasas de ADN de plantas (Qiu *et al.*, 2004). La nucleasa Surveyor se escinde con alta especificidad en el lado 3' de cualquier desacoplamiento de sustitución de bases y otro sitio de distorsión en ambas cadenas de ADN, incluyendo todas las sustituciones de bases e inserciones/deleciones hasta al menos 12 nucleótidos. Se pueden reconocer los desacoplamientos de inserción/delección y todos los desacoplamientos de sustitución de bases, con una eficacia variable de escisión basada en la secuencia de acoplamiento incorrecto. En un ejemplo, la tecnología de nucleasa Surveyor se puede utilizar para la detección de desacoplamientos en un método que implica cuatro etapas: (i) amplificación de polinucleótidos opcional, por ejemplo PCR, de dianas polinucleotídicas deseadas con secuencias mutantes/variantes y de tipo silvestre/deseadas; (ii) hibridación de heterodúplex resultantes que comprenden desacoplamientos; (iii) tratamiento de heterodúplex con nucleasa Surveyor para escindir en sitios de desacoplamiento; y (iv) análisis opcional de productos polinucleotídicos digeridos usando la plataforma de detección/separación de elección (figuras 15-16). Los productos de escisión resultantes del tratamiento de los heterodúplex pueden someterse a PCA después de digerirse el error en el sitio de escisión, por ejemplo, por una exonucleasa, para generar productos con errores reducidos (figura 15). Las bases de desacoplamiento se pueden eliminar sustancialmente o en algunos casos por completo para producir cadenas sin errores. En algunos ejemplos, las cadenas escindidas se pueden volver a hibridar en dianas en un conjunto de polinucleótidos y extenderse. Como la frecuencia de polinucleótidos que contienen errores es muy baja después de la hibridación inicial y la escisión de heterodúplex que elimina los desacoplamientos, la mayoría de las cadenas escindidas hibridarán con dianas con secuencias libres de error en el sitio del desacoplamiento inicial. Mediante la extensión a lo largo de las dianas, los polinucleótidos se pueden resintetizar sin el desacoplamiento inicial. Varios ejemplos de ensamblaje de genes incorporan corrección de errores. Por ejemplo, el protocolo de síntesis precisa (PAS) basado en PCR puede incorporar: el diseño del gen y oligonucleótidos, purificación de los oligonucleótidos, una primera PCR para sintetizar segmentos, una segunda PCR para ensamblar el gen de longitud completa, y secuenciación y corrección de errores (Xiong *et al.*, 2006). Como alternativa, la muestra se somete a PCR, en la que los productos escindidos no pueden participar, diluyendo así la abundancia del error en la muestra (figura 16).

En determinados ejemplos, la presente divulgación proporciona métodos que eliminan selectivamente oligonucleótidos bicatenarios, tales como moléculas de ADN, con desacoplamientos, protuberancias y pequeños bucles, bases químicamente alteradas y otros heterodúplex que surgen durante el proceso de síntesis química de ADN, a partir de soluciones que contienen fragmentos de ADN sintético perfectamente emparejados. Los métodos separan complejos específicos de proteína-ADN formados directamente en ADN heterodúplex o mediante un sistema de afinidad que comprende un análogo de nucleótido incorporado, por ejemplo, uno que se basa en complejos de avidina-biotina-ADN formados después de la introducción de una molécula de biotina o un análogo de biotina, en heterodúplex que contienen ADN y la posterior unión por cualquier miembro de la familia de proteínas de la avidina, incluida la estreptavidina. La avidina puede inmovilizarse sobre un soporte sólido.

En el método son fundamentales las enzimas que reconocen y se unen específicamente a bases desacopladas o no emparejadas dentro de una molécula de oligonucleótido bicatenario (por ejemplo, ADN) y permanecen asociadas en o cerca del sitio del heterodúplex, crean una rotura de una sola cadena o de las dos cadenas o son capaces de iniciar un acontecimiento de transposición de transferencia de cadena en o cerca del sitio del heterodúplex. La eliminación de moléculas de ADN de heterodúplex desacopladas, mal emparejadas y alteradas químicamente de una solución sintética de moléculas de ADN da como resultado una concentración reducida de moléculas de ADN que difieren de la secuencia de ADN sintetizada esperada.

Las proteínas de reconocimiento de desacoplamientos típicamente se unen a un acoplamiento o cerca de él. Los reactivos para la corrección de errores basada en proteínas de reconocimiento de desacoplamientos pueden comprender proteínas que son endonucleasas, enzimas de restricción, ribonucleasas, enzimas reparadoras de desacoplamientos, resolvasas, helicasas, ligasas, anticuerpos específicos para desacoplamientos y sus variantes. Las enzimas se pueden seleccionar, por ejemplo, de la endonucleasa 7 de T4, endonucleasa 1 de T7, S1, endonucleasa de judía mungo, MutY, MutS, MutH, MutL, cleavasa y HINF1. En ciertos ejemplos de la divulgación, una proteína de reconocimiento de desacoplamientos escinde al menos una cadena del ADN desacoplado en las proximidades del sitio de desacoplamiento.

En el caso de proteínas que reconocen y escinden el ADN heterodúplex formando una mella en una sola cadena, por

- ejemplo, la enzima endonucleasa CELI, la mella resultante se puede usar como sustrato para la ADN polimerasa para incorporar nucleótidos modificados adecuados para asociaciones de afinidad, por ejemplo, los que contienen un resto de biotina o un análogo del mismo. Hay muchos ejemplos de proteínas que reconocen el ADN desacoplado y producen una mella en una sola cadena, incluidas las endonucleasas resolvasas, glicosilasas y proteínas especializadas similares a MutS que poseen actividad endonucleasa. En algunos casos, la mella se crea en una molécula de ADN heterodúplex después de un procesamiento adicional, por ejemplo, se pueden usar ADN glicosilasas de timina para reconocer ADN desacoplado e hidrolizar el enlace entre la desoxirribosa y una de las bases en el ADN, generando un sitio básico sin escindir necesariamente la cadena principal de fosfato de azúcar del ADN. El sitio abásico se puede convertir mediante una AP endonucleasa en un sustrato mellado adecuado para la extensión por la ADN polimerasa. Por lo tanto, los complejos proteína-heterodúplex de ADN se pueden formar directamente, en el ejemplo de las proteínas MutS, o indirectamente, tras la incorporación de análogos de nucleótidos, por ejemplo biotina o análogos de la misma, en la cadena que contiene heterodúplex y la unión posterior de biotina o análogos de biotina con proteínas de estreptavidina o avidina.
- Otros métodos de corrección de errores pueden basarse en enzimas transposasas, tales como la transposasa MuA, que inserta preferentemente ADN marcado, por ejemplo, ADN marcado con biotina o análogo de biotina, que contiene una versión preescindida del sitio de unión del ADN de la transposasa en o cerca del sitio del ADN desacoplado *in vitro* mediante una reacción de transferencia de cadena. La transferencia de cadena dirigida por transposasa MuA *in vitro* se conoce por los expertos en la materia y están familiarizados con la actividad de la transposasa como específica para ADN desacoplado. En este método, el ADN del sitio de unión de MuA preescindido puede biotinilarse en el extremo 5' de la molécula, lo que permite la formación de un complejo proteína-biotina-ADN con la proteína estreptavidina o avidina después de la transferencia de la cadena al ADN que contiene heterodúplex.
- La separación de complejos proteína-ADN *in vitro* puede conseguirse mediante la incubación de la solución que contiene complejos proteína-ADN con una matriz sólida que posee alta afinidad y capacidad para la unión de proteínas y baja afinidad para la unión de ADN. En algunos casos, tales matrices se pueden incluirse dentro de dispositivos microfluídicos en relación con los diversos ejemplos de la divulgación descritos en el presente documento.
- Varias clases grandes de enzimas digieren preferentemente polinucleótidos heterodúplex, tales como sustratos de ADN, que contienen desacoplamientos, deleciones o bases dañadas. Normalmente, estas enzimas actúan para convertir sus sustratos dañados o desacoplados en mellas o huecos de un solo par de bases (en algunos casos con la ayuda de una endonucleasa AP que convierte sitios abásicos en mellas). Las ADN glicosilasas, las endonucleasas de desacoplamiento y las proteínas de reparación de desacoplamientos MutSLH son especialmente útiles por su utilidad para modificar fragmentos sintéticos que contienen errores. Los métodos y composiciones de la presente divulgación pueden basarse en estas mellas o pequeños huecos para identificar las moléculas de ADN que contienen errores y eliminarlas del proceso de clonación.
- Se puede utilizar una combinación de técnicas para eliminar los polinucleótidos tratados que contienen errores. Las ADN glicosilasas son una clase de enzimas que eliminan las bases desacopladas y, en algunos casos, escinden en el sitioapurínico/apirimidínico (AP) resultante. Las ADN glicosilasas de timina (TDG) se pueden utilizar para enriquecer poblaciones de ADN que contienen desacoplamientos o que coinciden perfectamente a partir de mezclas complejas (X. Pan y S. Weissman, "An approach for global scanning of single nucleotide variations" 2002 PNAS 99:9346-9351). Las ADN glicosilasas se pueden usar para hidrolizar la unión entre la desoxirribosa y una de las bases en el ADN, generando un sitio básico sin escindir necesariamente la cadena principal de fosfato de azúcar del ADN. Los cuatro grupos de desacoplamiento de una sola base y algunos otros desacoplamientos podrían hidrolizarse mediante una mezcla de dos TDG. Además, la alta afinidad de las enzimas por sitios abásicos en ausencia de magnesio se puede utilizar para separar moléculas de ADN en poblaciones enriquecidas o agotadas en heterodúplex. Se ha identificado un gran número de ADN glicosilasas y se pueden encontrar ejemplos no limitantes en la Publicación de Patente de Estados Unidos 2006/0134638. Las ADN glicosilasas actúan típicamente sobre un subconjunto de bases no naturales, dañadas o desacopladas, retirando la base y dejando un sustrato para su posterior reparación. Como clase, las ADN glicosilasas tienen especificidades amplias, distintas y superpuestas para los sustratos químicos que eliminarán del ADN. El tratamiento con glicosilasa puede ser especialmente útil para reducir las tasas de error de las sustituciones de bases a niveles bajos. Las glicosilasas que dejan sitios AP se combinan con una endonucleasa AP tal como la endonucleasa IV o Exo III de *E. coli* para generar una mella en el ADN.
- Los ejemplos no limitantes de enzimas endonucleasas de desacoplamiento para mellar el ADN en la región de desacoplamientos o ADN dañado incluyen la Endonucleasa I de T7, Endonucleasa V de *E. coli*, Endonucleasa VII de T4, nucleasa de judía mungo, Endonucleasa IV de *E. coli*, celular y UVDE.
- Smith *et al.* describen el uso del complejo MutSLH para eliminar la mayoría de los errores de los fragmentos de PCR (J. Smith y P. Modrich, "Removal of polymerase-produced mutant sequences from PCR products". 1997, PNAS 94: 6847-6850. En ausencia de metilación DAM, el complejo MutSLH se puede utilizar para catalizar la escisión bicatenaria en los sitios (GATC). Los productos de PCR se pueden tratar con MutSLH en presencia de ATP.
- Puede encontrarse una divulgación más detallada sobre la corrección de errores en polinucleótidos sintéticos en la Publicación de Patente de Estados Unidos 2006/0134638 y en la Patente de Estados Unidos N.º 6664112, ambas

incorporadas en el presente documento en su totalidad.

Las enzimas, los compañeros de unión y otros reactivos utilizados en la corrección de errores de polinucleótidos sintetizados de acuerdo con los métodos y composiciones de la divulgación pueden inmovilizarse en superficies, tales como superficies recubiertas o funcionalizadas, sobre soportes y sustratos descritos en el presente documento. Las reacciones se pueden llevar a cabo in situ con uno o más componentes inmovilizados. Se entiende que los esquemas de purificación que enriquecen polinucleótidos con menos o ningún error utilizando tales componentes en superficies apropiadas están dentro de los límites de la divulgación.

Finalmente, las estrategias para el ensamblaje de genes se basan en oligonucleótidos de alta calidad para conseguir la síntesis de novo de polinucleótidos con bajas tasas de error. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento permiten la síntesis de tales oligonucleótidos de alta calidad en diversos ejemplos.

### Amplificación de ácidos nucleicos

En algunos ejemplos, los ácidos nucleicos descritos en el presente documento se amplifican. La amplificación se puede realizar por cualquier medio conocido en la técnica. En algunos casos, los ácidos nucleicos se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conocen en la técnica varios métodos de PCR, como se describe en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.928.907 y 6.015.674, cuyas descripciones completas se incorporan en el presente documento como referencia para cualquier propósito. Otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la ligasa, ensayo de ligamientos de oligonucleótidos y ensayo de hibridación. Estos y otros métodos se describen con mayor detalle en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.928.907 y 6.015.674. En la técnica se conocen sistemas de detección óptica en tiempo real, como también se describe con mayor detalle en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.928.907 y 6.015.674, incorporadas en el presente documento anteriormente. Otros métodos de amplificación que se pueden usar en el presente documento incluyen los descritos en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.242.794; 5.494.810; 4.988.617; y 6.582.938, todos los cuales se incorporan en el presente documento en su totalidad.

En algunos aspectos de la divulgación, se utiliza la amplificación exponencial de ácidos nucleicos o polinucleótidos. Estos métodos a menudo dependen de la formación catalizada por el producto de múltiples copias de una molécula de ácido nucleico o polinucleótido o su complemento. Los productos de amplificación a veces se denominan "amplicones". Uno de estos métodos para la amplificación enzimática de secuencias específicas de ADN bicatenario es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este procedimiento de amplificación *in vitro* se basa en ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación de cebadores de oligonucleótidos y extensión de cebadores mediante polinucleótido polimerasa dependiente de molde termófilo, dando como resultado el aumento exponencial de copias de la secuencia deseada del analito polinucleotídico flanqueado por los cebadores. Los dos cebadores de PCR diferentes, que hibridan con cadenas opuestas del ADN, se colocan de modo que el producto de extensión catalizado por polimerasa de un cebador pueda servir como una cadena molde para el otro, produciéndose la acumulación de un fragmento discreto bicatenario cuya longitud está definida por la distancia entre los extremos 5' de los cebadores oligonucleotídicos. Otras técnicas de amplificación que pueden usarse en los métodos de la divulgación proporcionada incluyen, por ejemplo, PCR AFLP (polimorfismo de longitud de fragmento amplificado) (véase, por ejemplo: Vos *et al.* 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-14), PCR específica de alelo (véase, por ejemplo, Saiki R K, Bugawan T L, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes *Nature* 324: 163-166), PCR Alu, PCR de ensamblaje (véase > Sing Stemmer WP, Cramer A, Ha KD, Brennan TM, Heyneker HL (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides *Gene* 164: 49-53), asymmetric PCR (véase, por ejemplo, Saiki R K *supra*), PCR de colonias, PCR dependiente de helicasa (véase, por ejemplo, Myriam Vincent, Yan Xu y Huimin Kong (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification *EMBO reports* 5 (8): 795-800), PCR de inicio en caliente, PCR inversa (véase, por ejemplo, Ochman H, Gerber A S, Hartl D L. *Genetics*. Noviembre de 1988; 120(3):621-3), PCR in situ, PCR específica de intersecuencia o PCR IS SR, PCR digital, PCR lineal después de la exponencial o PCR tardía (véase, por ejemplo, Pierce K E y Wangh L T (2007). Linear-after-the-exponential polymerase chain reaction and allied technologies Real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells *Methods Mol. Med.* 132: 65-85), PCR larga, PCR anidada, PCR en tiempo real, PCR dúplex, PCR multiplex, PCR cuantitativa, PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR), PCR fluorescente multiplex (MF-PCR), PCR de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), PCR-RFLP/IRT-PCR-IRFLP, PCR polony, amplificación in situ de círculo rodante (RCA), PCR puente, PCR en placa Picotiter y PCR en emulsión, o PCR de una sola célula. Otros métodos de amplificación adecuados incluyen, amplificación de transcripción, replicación de secuencia autosostenida, amplificación selectiva de secuencias polinucleotídicas diana, reacción en cadena de la polimerasa cebada con secuencia consenso (CP-PCR), reacción en cadena de la polimerasa cebada arbitrariamente (AP-PCR) y PCR cebada con oligonucleótidos degenerados (DOP-PCR). Otro método para la amplificación implica la amplificación de un polinucleótido monocatenario usando un solo cebador oligonucleotídico. El polinucleótido monocatenario que se va a amplificar contiene dos secuencias no contiguas que son sustancial o completamente complementarias entre sí y, por tanto, son capaces de hibridar entre sí para formar una estructura de tallo-bucle. Este polinucleótido monocatenario ya puede ser parte de un analito polinucleotídico o puede crearse como resultado de la presencia de un analito polinucleotídico.

Otro método para conseguir el resultado de una amplificación de ácidos nucleicos se conoce como reacción en cadena de la ligasa (LCR). Este método utiliza una enzima ligasa para unir pares de sondas de ácido nucleico preformadas. Las sondas se hibridan con cada cadena complementaria del analito de ácido nucleico, si está presente, y se emplea ligasa para unir cada par de sondas entre sí, dando como resultado dos moldes que pueden servir en el siguiente ciclo para repetir la secuencia de ácido nucleico particular.

Otro método para conseguir la amplificación de ácidos nucleicos es la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA). Este método es un proceso enzimático dirigido por promotor que induce la amplificación homogénea e isotérmica continua *in vitro* de un ácido nucleico específico para proporcionar copias de ARN del ácido nucleico. Los reactivos para realizar NASBA incluyen un primer cebador de ADN con una cola 5' que comprende un promotor, un segundo cebador de ADN, transcriptasa inversa, RNasa-H, ARN polimerasa de T7, NTP y dNTP.

Otro método para amplificar un grupo específico de ácidos nucleicos es el método Q-beta-replicasa, que se basa en la capacidad de la Q-beta-replicasa para amplificar su sustrato de ARN exponencialmente. Los reactivos para realizar dicha amplificación incluyen "ARN midi-variante" (sonda de hibridación amplificable), NTP y Q-beta-replicasa.

Otro método para amplificar ácidos nucleicos se conoce como 3SR y es similar a NASBA con la excepción de que la actividad RNasa-H está presente en la transcriptasa inversa. La amplificación por 3SR es un método diana específico de ARN mediante el cual el ARN se amplifica en un proceso isotérmico que combina la ARN polimerasa dirigida por promotores, transcriptasa inversa y RNasa H con ARN diana. Véase, por ejemplo, Fahy *et al.* PCR Methods Appl. 1:25-33 (1991).

Otro método para amplificar ácidos nucleicos es la amplificación mediada por transcripción (TMA) utilizada por GenProbe. El método es similar a NASBA en la utilización de dos enzimas en una replicación de secuencia autosostenida. Véase la Patente de Estados Unidos N.º 5.299.491 incorporada en el presente documento como referencia.

Otro método para la amplificación de ácidos nucleicos es Strand Displacement Amplification (SDA) (Westin *et al.* 2000, Nature Biotechnology, 18, 199-202; Walker *et al.* 1992, Nucleic Acids Research, 20, 7, 1691-1696), que es una técnica de amplificación isotérmica basada en la capacidad de una endonucleasa de restricción tal como HincII o BsoBI para mellar la cadena no modificada de una forma hemifosforotioato de su sitio de reconocimiento, y la capacidad de una ADN polimerasa deficiente en exonucleasa tal como la polimerasa Klenow exo minus o polimerasa Bst, para extender el extremo 3' en la mella y desplazar la cadena de ADN aguas abajo. La amplificación exponencial resulta del acoplamiento de reacciones de sentido y antisentido en las que las cadenas desplazadas de una reacción de sentido sirven como dianas para una reacción antisentido y viceversa.

Otro método para la amplificación de ácidos nucleicos es Rolling Circle Amplification (RCA) (Lizardi *et al.* 1998, Nature Genetics, 19:225-232). El RCA se puede utilizar para amplificar moléculas monocatenarias en forma de círculos de ácidos nucleicos. En su forma más simple, el RCA implica la hibridación de un solo cebador a un ácido nucleico circular. La extensión del cebador por una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena da como resultado la producción de múltiples copias del ácido nucleico circular concatenadas en una sola cadena de ADN.

en algunos ejemplos de la divulgación, El RCA se combina con ligamiento. Por ejemplo, se puede usar un único oligonucleótido tanto para el ligamiento como en forma de molde circular para el RCA. Este tipo de polinucleótido puede denominarse "sonda padlock" o "sonda RCA". Para una sonda padlock, los dos extremos del oligonucleótido contienen secuencias complementarias a un dominio dentro de una secuencia de ácido nucleico de interés. El primer extremo de la sonda padlock es sustancialmente complementario a un primer dominio en la secuencia de ácido nucleico de interés, y el segundo extremo de la sonda padlock es sustancialmente complementario a un segundo dominio, adyacente al primer dominio cerca del primer dominio. La hibridación del oligonucleótido con el ácido nucleico diana da como resultado la formación de un complejo de hibridación. El ligamiento de los extremos de la sonda padlock da como resultado la formación de un complejo de hibridación modificado que contiene un polinucleótido circular. En algunos casos, antes del ligamiento, una polimerasa puede llenar el hueco extendiendo un extremo de la sonda padlock. El polinucleótido circular así formado puede servir como molde para el RCA que, con la adición de una polimerasa, da como resultado la formación de un producto de ácido nucleico amplificado. Los métodos de la divulgación descritos en el presente documento pueden producir productos amplificados con secuencias definidas en los extremos 5' y 3'. Estos productos amplificados se pueden utilizar como sondas padlock.

Algunos aspectos de la divulgación utilizan la amplificación lineal de ácidos nucleicos o polinucleótidos. La amplificación lineal generalmente se refiere a un método que implica la formación de una o más copias del complemento de una sola cadena de una molécula de ácido nucleico o polinucleótido, normalmente un analito de ácido nucleico o polinucleótido. Por lo tanto, la principal diferencia entre la amplificación lineal y la amplificación exponencial es que en el último proceso, el producto sirve como sustrato para la formación de más producto, mientras que en el primer proceso la secuencia de partida es el sustrato para la formación del producto, pero el producto de la reacción, es decir, la réplica del molde inicial, no es un sustrato para la generación de productos. En la amplificación lineal, la cantidad de producto formado aumenta como una función lineal del tiempo en oposición a la amplificación exponencial donde la cantidad de producto formado es una función exponencial del tiempo.

En algunos ejemplos, los métodos de amplificación pueden ser amplificación en fase sólida, amplificación polony, amplificación de colonias, PCR en emulsión, RCA en perlas, RCA en superficie, SDA en superficie, etc., como reconocerá un experto en la materia. En algunos ejemplos, se pueden usar métodos de amplificación que dan como resultado la amplificación de moléculas de ADN libres en solución o unidas a una matriz adecuada por solo un extremo de la molécula de ADN. Pueden usarse métodos que se basan en PCR puente, donde los dos cebadores de PCR están unidos a una superficie (véase, por ejemplo, el documento WO 2000/018957 y Adessi *et al.*, Nucleic Acids Research (2000): 28(20): E87). En algunos casos, los métodos de la divulgación pueden crear una "tecnología de colonias de polimerasa", o "polony" que hace referencia a una amplificación multiplex que mantiene el agrupamiento espacial de amplicones idénticos (consulte el sitio web del Harvard Molecular Technology Group y Lipper Center for Computational Genetics). Estos incluyen, por ejemplo, polony in situ (Mitra y Church, Nucleic Acid Research 27, e34, 15 de diciembre de 1999), amplificación in situ por círculo rodante (RCA) (Lizardi *et al.*, Nature Genetics 19, 225, Julio de 1998), PCR puente (Patente de Estados Unidos N.º 5.641.658), PCR picotiter (Leamon *et al.*, Electrophoresis 24, 3769, Noviembre de 2003) y PCR en emulsión (Dressman *et al.*, PNAS 100, 8817, 22 de julio de 2003). Los métodos de la divulgación proporcionan nuevos métodos para generar y usar la tecnología polony.

La amplificación se puede conseguir mediante cualquier proceso mediante el cual se aumente el número de copias de una secuencia diana, por ejemplo, PCR. Las condiciones favorables para la amplificación de secuencias diana mediante PCR se conocen en la técnica, se pueden optimizar en una diversidad de etapas en el proceso y depende de las características de los elementos en la reacción, tales como el tipo de diana, la concentración diana, la longitud de la secuencia a amplificar, la secuencia de la diana y/o uno o más cebadores, la longitud del cebador, la concentración de cebador, la polimerasa utilizada, el volumen de reacción, la relación de uno o más elementos con respecto a uno o más de otros elementos, y otros, de los que algunos o todos se pueden modificar. En general, la PCR implica las etapas de desnaturalización de la diana a amplificar (si es bicatenaria), hibridación de uno o más cebadores con la diana, y extensión de los cebadores por una ADN polimerasa, con las etapas repetidas (o "cíclicas") para amplificar la secuencia diana. Las etapas de este proceso se pueden optimizar para varios resultados, tal como para mejorar el rendimiento, disminuir la formación de productos espurios y/o aumentar o disminuir la especificidad de la hibridación del cebador. Los métodos de optimización son bien conocidos en la técnica e incluyen ajustes en el tipo o cantidad de elementos en la reacción de amplificación y/o en las condiciones de una etapa dada en el proceso, tal como la temperatura en una etapa particular, duración de una etapa particular y/o número de ciclos. En algunos ejemplos, una reacción de amplificación comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 50 o más ciclos. En algunos ejemplos, una reacción de amplificación comprende no más de 5, 10, 15, 20, 25, 35, 50 o más ciclos. Los ciclos pueden contener cualquier número de etapas, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más etapas. Las etapas pueden comprender cualquier temperatura o gradiente de temperaturas, adecuada para lograr el propósito de la etapa determinada, incluyendo, pero sin limitación, Extensión del extremo de 3' (relleno de adaptador), hibridación de cebador, extensión de cebador y desnaturalización de la cadena. Las etapas pueden ser de cualquier duración, incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente, menos de aproximadamente, o más de aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600 o más segundos, incluyendo indefinidamente hasta que se interrumpa manualmente. Se pueden combinar en cualquier orden ciclos de cualquier número que comprendan diferentes etapas. En algunos ejemplos, se combinan diferentes ciclos que comprenden diferentes etapas de manera que el número total de ciclos en la combinación es aproximadamente, menos de aproximadamente, o más de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 50 o más ciclos. La amplificación se puede realizar en cualquier punto durante un procedimiento de reacción múltiple utilizando los métodos y composiciones de la divulgación, por ejemplo, antes o después de la agrupación de bibliotecas de secuenciación de volúmenes de reacción independientes y puede usarse para amplificar cualquier molécula diana adecuada descrita en el presente documento.

### Reacciones de ligamiento

En algunos ejemplos, los oligonucleótidos se pueden ligar o unir a adaptadores o códigos de barras. El agente de unión puede ser una ligasa. En algunos ejemplos, la ligasa es la ADN ligasa de T4, utilizando procedimientos bien conocidos (Maniatis, T. en Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). También pueden usarse otras ADN ligasas. Con respecto al ligamiento, pueden usarse otras ligasas, tales como las derivadas de organismos termófilos, lo que permite el ligamiento a temperaturas más altas que permite el uso de oligonucleótidos más largos (con mayor especificidad) que podrían hibridarse y ligarse simultáneamente bajo las temperaturas más altas normalmente permisibles para hibridar tales oligonucleótidos.

Los términos "unión" y "ligamiento" como se usan en el presente documento, con respecto a dos polinucleótidos, se refieren a la unión covalente de dos polinucleótidos separados para producir un único polinucleótido más grande con una cadena principal contigua. Los métodos para unir dos polinucleótidos son conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, métodos enzimáticos y no enzimáticos (por ejemplo, químicos). Los ejemplos de reacciones de ligamiento que no son enzimáticas incluyen las técnicas de ligamiento no enzimáticas descritas en la Patente de Estados Unidos N.º 5.780.613 y 5.476.930, que se incorporan en el presente documento por referencia. En algunos ejemplos, un oligonucleótido adaptador se une a un polinucleótido diana mediante una ligasa, por ejemplo, una ADN ligasa o ARN ligasa. En la técnica se conocen múltiples ligasas, cada una con condiciones de reacción caracterizadas, e incluyen, sin limitación, ligasas dependientes de NAD<sup>+</sup>, incluida la ARNt ligasa, ADN ligasa Taq, ADN ligasa de *Thermus*

*filiformis*, ADN ligasa de *Escherichia coli*, ADN ligasa Tth, ADN ligasa (I y II) de *Thermus scotoductus*, ligasa termoestable, ADN ligasa ampligasa termoestable, ligasa tipo VanC, 9° N ADN ligasa, Tsp ADN ligasa y nuevas ligasas descubiertas mediante bioprospección; ligasas dependientes de ATP incluyendo la ARN ligasa de T4, ADN ligasa de T4, ADN ligasa de T3, ADN ligasa de T7, ADN ligasa Pfu, ADN ligasa 1, ADN ligasa III, ADN ligasa IV y nuevas ligasas descubiertas mediante bioprospección; e isoformas mutantes de tipo silvestre y variantes de ingeniería genética de las mismas. El ligamiento puede realizarse entre polinucleótidos que tienen secuencias hibridables, tales como salientes complementarios. El ligamiento también puede realizarse entre dos extremos romos. Generalmente, se utiliza un fosfato 5' en una reacción de ligamiento. El fosfato 5' puede proporcionarse por el polinucleótido diana, el oligonucleótido adaptador, o ambos. Los fosfatos 5' se pueden añadir o eliminar de los polinucleótidos que se van a unir, según sea necesario. En la técnica se conocen métodos para la adición o eliminación de fosfatos 5' e incluyen, sin limitación, procesos enzimáticos y químicos. Las enzimas útiles en la adición y/o eliminación de fosfatos 5' incluyen quinasas, fosfatasas y polimerasas. En algunos ejemplos, los dos extremos unidos en una reacción de ligamiento (por ejemplo, un extremo adaptador y un extremo polinucleotídico diana) proporcionan un fosfato 5', de modo que se forman dos enlaces covalentes al unir los dos extremos. En algunos ejemplos, solo uno de los dos extremos unidos en una reacción de ligamiento (por ejemplo, solo uno de un extremo adaptador y un extremo polinucleotídico diana) proporciona un fosfato 5', de modo que solo se forma un enlace covalente al unir los dos extremos. En algunos ejemplos, sólo una cadena en uno o los dos extremos de un polinucleótido diana se une a un oligonucleótido adaptador. En algunos ejemplos, las dos cadenas en uno o los dos extremos de un polinucleótido diana se unen a un oligonucleótido adaptador. En algunos ejemplos, los fosfatos 3' se eliminan antes del ligamiento. En algunos ejemplos, se añade un oligonucleótido adaptador a los dos extremos de un polinucleótido diana, en donde una o las dos cadenas en cada extremo se unen a uno o más oligonucleótidos adaptadores. Cuando las dos cadenas en ambos extremos se unen a un oligonucleótido adaptador, la unión puede ir seguida de una reacción de escisión que deja un saliente 5' que puede servir como plantilla para la extensión del extremo 3' correspondiente, pudiendo dicho extremo 3' incluir o no uno o más nucleótidos derivados del oligonucleótido adaptador. En algunos ejemplos, un polinucleótido diana se une a un primer oligonucleótido adaptador en un extremo y un segundo oligonucleótido adaptador en el otro extremo. En algunos ejemplos, el polinucleótido diana y el adaptador al que se une comprenden extremos romos. En algunos ejemplos, se llevan a cabo reacciones de ligamiento separadas para cada muestra, utilizando un primer oligonucleótido adaptador diferente que comprende al menos una secuencia de código de barras para cada muestra, de manera que ninguna secuencia de código de barras se une a los polinucleótidos diana de más de una muestra. Un polinucleótido diana que tiene un oligonucleótido adaptador/cebador unido al mismo se considera "etiquetado" por el adaptador unido.

En algunos ejemplos, Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento se unen utilizando la química CLICK. Se conocen en la técnica métodos adecuados para unir varias moléculas usando la química CLICK (para el enlace químico CLICK de oligonucleótidos, véase, por ejemplo, El-Sagheer *et al.* (PNAS, 108: 28, 11338-11343, 2011). La química click se puede realizar en presencia de Cul.

### Códigos de barras

Los códigos de barras son secuencias típicamente conocidas de ácidos nucleicos que permiten identificar alguna característica de un polinucleótido con el que está asociado el código de barras. En algunos ejemplos, un código de barras comprende una secuencia de ácido nucleico que cuando se une a un polinucleótido diana sirve como identificador de la muestra de la que se obtuvo el polinucleótido diana.

Los códigos de barras se pueden diseñar en longitudes adecuadas para permitir un grado suficiente de identificación, por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 o más nucleótidos de longitud. Pueden usarse múltiples códigos de barras, como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más códigos de barras, en la misma molécula, opcionalmente separados por secuencias sin códigos de barras. En algunos ejemplos, Los códigos de barras tienen menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos, Los códigos de barras asociados con algunos polinucleótidos son de diferente longitud que los códigos de barras asociados con otros polinucleótidos. En general, los códigos de barras tienen una longitud suficiente y comprenden secuencias lo suficientemente diferentes para permitir la identificación de muestras en función de los códigos de barras a los que están asociadas. En algunos ejemplos, un código de barras, y la fuente de muestra con la que está asociado, se pueden identificar con precisión después de la mutación, inserción o delección de uno o más nucleótidos en la secuencia del código de barras, tal como la mutación, inserción o delección de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos. En algunos ejemplos, cada código de barras en una pluralidad de códigos de barras difiere de todos los demás códigos de barras en la pluralidad en al menos tres posiciones de nucleótidos, tal como al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más posiciones.

### 60 Secuenciación

Los oligonucleótidos sintetizados de novo y los productos polinucleotídicos más largos descritos en el presente documento pueden someterse a un control de calidad antes de continuar con las etapas posteriores de un procedimiento, tal como un procedimiento multirreacción. El control de calidad se puede aplicar manteniendo los productos individuales en volúmenes separados, tal como en las características resueltas de un sustrato como se describe en el presente documento. Una fracción se puede dividir en alícuotas para el control de calidad, mientras que

el resto de volúmenes que compartimentan cada producto permanecen accesibles individualmente.

La figura 17 ilustra un procedimiento de control de calidad de ejemplo que comprende una secuenciación de última generación. Las sondas padlock específicas de genes dirigidas a un producto específico están diseñadas para cubrir segmentos de secuencia superpuestos del producto que se está probando. Los extremos de las sondas padlock individuales específicas para un producto génico pueden diseñarse para que se puedan hibridar con regiones dispersas a lo largo del producto génico para una cobertura adecuada durante la secuenciación. Todas las sondas específicas para el mismo producto génico pueden comprender una secuencia de código de barras asociada con ese producto génico. Puede usarse una polimerasa y/o ligasa adecuadas para rellenar entre los extremos de las sondas padlock a lo largo del producto génico diana. En algunos casos, las sondas padlock formarán ADN circular monocatenario. El producto génico típicamente lineal se puede digerir, por ejemplo, después de dividir en alícuotas una fracción del volumen del producto génico. Como alternativa, una fracción del volumen del producto génico se puede dividir en alícuotas antes de la adición de sondas padlock. Las sondas padlock que llevan segmentos del producto génico pueden amplificarse, por ejemplo, usando PCR. Las regiones de unión de cebadores universales o específicas en las sondas padlock pueden establecerse como diana durante la amplificación. Las regiones de unión del cebador de secuenciación pueden estar presentes originalmente en las sondas padlock o pueden añadirse durante las etapas posteriores, por ejemplo, utilizando adaptadores de secuenciación antes de, durante o después de la amplificación.

En diversos ejemplos, las sondas padlock específicas del producto génico se reunirán después de las etapas iniciales de la biblioteca de secuenciación. En esos casos, pueden utilizarse los códigos de barras específicos del producto génico para rastrear la información de la secuencia hasta los productos génicos individuales. La información de secuenciación obtenida por cualquier medio adecuado descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica se puede deconvolucionar, por ejemplo, mediante agrupamiento en un grupo de secuencia individual basándose en la información del código de barras. Se pueden utilizar algoritmos de confirmación de secuencia y alineamiento adecuados conocidos en la técnica para finalizar el control de calidad. Las tasas de error y las localizaciones se pueden analizar por locus de secuencia, por producto génico, por biblioteca o por subsegmento de biblioteca. El análisis de errores puede informar la aceptación o el rechazo de productos para etapas posteriores o para su entrega a un solicitante.

En cualquiera de los ejemplos, el análisis de detección o cuantificación de los oligonucleótidos puede realizarse mediante secuenciación. Las subunidades o los oligonucleótidos sintetizados completos se pueden detectar mediante la secuenciación completa de todos los oligonucleótidos mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, Illumina HiSeq 2500, incluyendo los métodos de secuenciación descritos en el presente documento.

La secuenciación se puede lograr mediante métodos de secuenciación clásicos de Sanger que son bien conocidos en la técnica. La secuenciación también se puede lograr utilizando sistemas de alto rendimiento, algunos de los cuales permiten la detección de un nucleótido secuenciado inmediatamente después o después de su incorporación en una cadena en crecimiento, es decir, detección de secuencia en tiempo real o sustancialmente en tiempo real. En algunos casos, la secuenciación de alto rendimiento genera al menos 1.000, al menos 5.000, al menos 10.000, al menos 20.000, al menos 30.000, al menos 40.000, al menos 50.000, al menos 100.000 o al menos 500.000 lecturas de secuencia por hora; siendo cada lectura de al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 120 o al menos 150 bases por lectura.

En algunos ejemplos, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de tecnología disponible por Genome Analyzer IIX de Illumina, Secuenciador personal MiSeq o sistemas HiSeq, tales como los que utilizan HiSeq 2500, HiSeq 1500, HiSeq 2000 o HiSeq 1000. Estas máquinas utilizan una secuenciación basada en terminadores reversibles mediante química de síntesis. Estas máquinas pueden realizar 200 mil millones de lecturas de ADN o más en ocho días. Se pueden utilizar sistemas más pequeños para ejecuciones en 3, 2, 1 días o menos. Se pueden usar ciclos de síntesis cortos para minimizar el tiempo que lleva obtener resultados de secuenciación.

En algunos ejemplos, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de tecnología disponible por ABI Solid System. Esta plataforma de análisis genético permite la secuenciación masiva en paralelo de fragmentos de ADN amplificados clonalmente unidos a perlas. La metodología de secuenciación se basa en el ligamiento secuencial con oligonucleótidos marcados con colorante.

La secuenciación de última generación puede comprender secuenciación mediante ion semiconductor (por ejemplo, utilizando tecnología de Life Technologies (Ion Torrent)). La secuenciación mediante ion semiconductor puede aprovechar el hecho de que cuando un nucleótido se incorpora en una cadena de ADN, se puede liberar un ion. Para realizar la secuenciación mediante ion semiconductor, se puede formar una matriz de alta densidad de pocillos micromecanizados. Cada pocillo puede contener un único molde de ADN. Debajo del pocillo puede haber una capa sensible a iones y debajo de la capa sensible a iones puede haber un sensor de iones. Cuando se añade un nucleótido a un ADN, se puede liberar H<sup>+</sup>, que puede medirse como un cambio de pH. El ion H<sup>+</sup> puede convertirse en voltaje y registrarse por el sensor semiconductor. Un chip de matriz se puede inundar secuencialmente con un nucleótido tras otro. Sin que se requiera escaneo, luz o cámaras. En algunos casos, se utiliza un secuenciador IONPROTON™ para secuenciar el ácido nucleico. En algunos casos, se utiliza un secuenciador IONPGM™. Ion Torrent Personal Genome

Machine (PGM) puede realizar 10 millones de lecturas en dos horas.

En algunos ejemplos, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de tecnología disponible por Helicos BioSciences Corporation (Cambridge, Massachusetts), tal como el método de secuenciación por síntesis de molécula única (SMSS). SMSS es único porque permite secuenciar todo el genoma humano en hasta 24 horas. Finalmente, SMSS es poderoso porque, como la tecnología MIP, no requiere una etapa de preamplificación antes de la hibridación. De hecho, SMSS no requiere ninguna amplificación. SMSS se describe en parte en las Solicitudes de Publicación de Estados Unidos N.º 2006002471 I; 20060024678; 20060012793; 20060012784; y 20050100932.

En algunos ejemplos, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de tecnología disponible por 454 Lifesciences, Inc. (Branford, Connecticut), tal como el dispositivo Pico Titer Plate que incluye una placa de fibra óptica que transmite la señal quimioluminiscente generada por la reacción de secuenciación para ser registrada por una cámara CCD en el instrumento. Este uso de fibra óptica permite la detección de un mínimo de 20 millones de pares de bases en 4,5 horas.

Se describen métodos para usar la amplificación de perlas seguida de detección con fibra óptica en Marguiles, M., *et al.* "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors", *Nature*, doi: 10.1038/nature03959; así como en las Solicitudes de Publicación de Estados Unidos N.º 20020012930; 20030058629; 20030100102; 20030148344; 20040248161; 20050079510, 20050124022; y 20060078909.

En algunos ejemplos, La secuenciación de alto rendimiento se realiza usando Clonal Single Molecule Array (Solexa, Inc.) o secuenciación por síntesis (SBS) utilizando química de terminador reversible. Estas tecnologías se describen, en parte, en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.969.488; 6.897.023; 6.833.246; 6.787.308; y en las Solicitudes de Publicación de Estados Unidos N.º 20040106130; 20030064398; 20030022207; y en Constans, A., *The Scientist* 2003, 17(13):36. La secuenciación de oligonucleótidos de alto rendimiento se puede conseguir usando cualquier método de secuenciación adecuado conocido en la técnica, tal como los comercializados por Pacific Biosciences, Complete Genomics, Genia Technologies, Halcyon Molecular, Oxford Nanopore Technologies y similares. Otros sistemas de secuenciación de alto rendimiento incluyen los descritos en Venter, J., *et al.* *Science* 16 de febrero de 2001; Adams, M. *et al.*, *Science* 24 de marzo de 2000; y M. J. Levene, *et al.* *Science* 299:682-686, enero de 2003; así como la Solicitud de Publicación de Estados Unidos N.º 20030044781 y 2006/0078937. En general, tales sistemas implican secuenciar una molécula de oligonucleótido diana que tiene una pluralidad de bases mediante la adición temporal de bases mediante una reacción de polimerización que se mide en una molécula de oligonucleótido, es decir, se sigue en tiempo real la actividad de una enzima polimerizadora de ácido nucleico sobre la molécula de oligonucleótido molde que se va a secuenciar. La secuencia puede deducirse después identificando qué base se está incorporando en la cadena complementaria en crecimiento del oligonucleótido diana mediante la actividad catalítica de la enzima polimerizadora de ácidos nucleicos en cada etapa en la secuencia de adiciones de bases. Se proporciona una polimerasa en el complejo de molécula de oligonucleótido diana en una posición adecuada para moverse a lo largo de la molécula de oligonucleótido diana y extender el cebador oligonucleotídico en un sitio activo. Se proporcionan una pluralidad de tipos marcados de análogos de nucleótidos cerca del sitio activo, siendo cada tipo distinguible de análogo de nucleótido complementario a un nucleótido diferente en la secuencia oligonucleotídica diana. La cadena de oligonucleótido en crecimiento se extiende mediante el uso de la polimerasa para añadir un análogo de nucleótido a la cadena de oligonucleótido en el sitio activo, donde el análogo de nucleótido que se añade es complementario al nucleótido del oligonucleótido diana en el sitio activo. Se identifica el análogo de nucleótido añadido al cebador oligonucleotídico como resultado de la etapa de polimerización. Las etapas para proporcionar análogos de nucleótidos marcados, para polimerizar la cadena de oligonucleótido en crecimiento y para identificar el análogo de nucleótido añadido se repiten de modo que la cadena de oligonucleótido se extienda más y se determina la secuencia del oligonucleótido diana.

La técnica de secuenciación de última generación puede comprender tecnología en tiempo real (SMRT™) de Pacific Biosciences. En SMRT, cada una de las cuatro bases de ADN se puede unir a uno de los cuatro tintes fluorescentes diferentes. Estos tintes pueden estar unidos por fosfo. Se puede inmovilizar una única ADN polimerasa con una única molécula de ADN monocatenario molde en la parte inferior de una guía de ondas en modo cero (ZMW). Una ZMW puede ser una estructura de confinamiento que permite la observación de la incorporación de un solo nucleótido por la ADN polimerasa en un fondo de nucleótidos fluorescentes que pueden difundirse rápidamente dentro y fuera de la ZMW (en microsegundos). Puede llevar varios milisegundos incorporar un nucleótido a una cadena en crecimiento. Durante este tiempo, el marcador fluorescente se puede excitar y producir una señal fluorescente, y la etiqueta fluorescente se puede escindir. La ZMW se puede iluminar desde abajo. La luz atenuada de un haz de excitación puede penetrar los 20-30 nm inferiores de cada ZMW. Se puede crear un microscopio con un límite de detección de 20 zeptolitros (10<sup>-21</sup> litros). El pequeño volumen de detección puede proporcionar una mejora de 1000 veces en la reducción de las interferencias de fondo. La detección de la fluorescencia correspondiente del tinte puede indicar qué base se incorporó. El proceso se puede repetir.

En algunos casos, la secuenciación de última generación es la secuenciación de nanoporos {véase, por ejemplo, Soni GV y Meller A. (2007) *Clin Chem* 53: 1996-2001}. Un nanoporo puede ser un pequeño agujero, del orden de aproximadamente un nanómetro de diámetro. La inmersión de un nanoporo en un fluido conductor y la aplicación de un potencial a través del mismo puede dar como resultado una ligera corriente eléctrica debido a la conducción de

iones a través del nanoporo. La cantidad de corriente que fluye puede ser sensible al tamaño del nanoporo. Cuando una molécula de ADN atraviesa un nanoporo, cada nucleótido de la molécula de ADN puede obstruir el nanoporo en un grado diferente. Por lo tanto, el cambio en la corriente que pasa por el nanoporo cuando la molécula de ADN pasa por el nanoporo puede representar una lectura de la secuencia de ADN. La tecnología de secuenciación de nanoporos puede ser de Oxford Nanopore Technologies; por ejemplo, un sistema GridION. Se puede insertar un solo nanoporo en una membrana de polímero en la parte superior de un micropocillo. Cada micropocillo puede tener un electrodo para detección individual. Los micropocillos se pueden fabricar en un chip de matriz, con 100.000 o más micropocillos (por ejemplo, más de 200.000, 300.000, 400.000, 500.000, 600.000, 700.000, 800.000, 900.000 o 1.000.000) por chip. Se puede utilizar un instrumento (o nodo) para analizar el chip. Los datos se pueden analizar en tiempo real. Se pueden hacer funcionar uno o más instrumentos a la vez. El nanoporo puede ser un nanoporo de proteína, por ejemplo, la proteína alfa-hemolisina, un poro de proteína heptamérica. El nanoporo puede ser un nanoporo de estado sólido fabricado, por ejemplo, un agujero de tamaño nanométrico formado en una membrana sintética (por ejemplo, SiNx o SiO<sub>2</sub>). El nanoporo puede ser un poro híbrido (por ejemplo, una integración de un poro de proteína en una membrana de estado sólido). El nanoporo puede ser un nanoporo con sensores integrados (por ejemplo, detectores de electrodo tunelizados, detectores capacitivos, o detectores de estado de borde o nano-hueco basados en grafeno (véase, por ejemplo, Garaj *et al.* (2010) Nature vol. 67, doi: 10.1038/nature09379)). Un nanoporo se puede funcionalizar para analizar un tipo específico de molécula (por ejemplo, ADN, ARN o proteína). La secuenciación de nanoporos puede comprender "secuenciación de cadenas" en la que los polímeros de ADN intactos se pueden pasar a través de un nanoporo de proteína con secuenciación en tiempo real a medida que el ADN transloca el poro. Una enzima puede separar cadenas de un ADN bicatenario y suministrar una cadena a través de un nanoporo. El ADN puede tener una horquilla en un extremo y el sistema puede leer ambas cadenas. En algunos casos, la secuenciación de nanoporos es la "secuenciación con exonucleasas" en la que los nucleótidos individuales pueden escindirse de una cadena de ADN mediante una exonucleasa procesadora, y los nucleótidos pueden pasar a través de un nanoporo de proteína. Los nucleótidos pueden unirse transitoriamente a una molécula en el poro (por ejemplo, ciclodextrano). Se puede utilizar una interrupción característica en la corriente para identificar bases.

Se puede utilizar la tecnología de secuenciación de nanoporos de GENIA. Un poro de proteína diseñado por ingeniería genética se puede incluir en una membrana de bicapa lipídica. Puede usarse la tecnología "Control Activo" para permitir un ensamblaje eficaz de nanoporos-membrana y el control del movimiento del ADN a través del canal. En algunos casos, la tecnología de secuenciación de nanoporos es de NABsys. El ADN genómico se puede fragmentar en cadenas de longitud media de aproximadamente 100 kb. Los fragmentos de 100 kb pueden fabricarse de una sola cadena y posteriormente hibridarse con una sonda de 6 unidades. Los fragmentos genómicos con sondas se pueden conducir a través de un nanoporo, que puede crear un rastreo actual frente al tiempo. El rastreo actual puede proporcionar las posiciones de las sondas en cada fragmento genómico. Los fragmentos genómicos se pueden alinear para crear un mapa de sonda para el genoma. El proceso se puede realizar en paralelo para una biblioteca de sondas. Se puede generar un mapa de sonda de longitud del genoma para cada sonda. Los errores se pueden fijar con un proceso denominado "secuenciación de ventana móvil por hibridación (mwSBH)". En algunos casos, la tecnología de secuenciación de nanoporos es de IBM/Roche. Se puede usar un haz de electrones para hacer una abertura del tamaño de un nanoporo en un microchip. Se puede usar un campo eléctrico para poner o pasar el ADN a través del nanoporo. Un dispositivo de transistor de ADN en el nanoporo puede comprender capas alternas de metal y dieléctrico de tamaño nanométrico. Las cargas discretas en la cadena principal del ADN pueden quedar atrapadas por campos eléctricos dentro del nanoporo de ADN. El apagado y encendido de los voltajes de puerta puede permitir la lectura de la secuencia de ADN.

La secuenciación de próxima generación puede comprender la secuenciación de nanobolas de ADN (según se realiza, por ejemplo, por Complete Genomics; véase, por ejemplo, Drmanac *et al.* (2010) Science 327: 78-81). El ADN se puede aislar, fragmentar y seleccionarse el tamaño. Por ejemplo, el ADN puede fragmentarse (por ejemplo, por sonicación) hasta una longitud media de aproximadamente 500 pb. Se pueden unir adaptadores (Ad1) a los extremos de los fragmentos. Los adaptadores se pueden usar para hibridar con anclajes para reacciones de secuenciación. El ADN con adaptadores unidos a cada extremo se puede amplificar por PCR. Las secuencias adaptadoras pueden modificarse de modo que los extremos complementarios de una sola cadena se unan entre sí formando ADN circular. El ADN se puede metilar para protegerlo de la escisión por una enzima de restricción de tipo IIS utilizada en una etapa posterior. Un adaptador (por ejemplo, el adaptador derecho) puede tener un sitio de reconocimiento de restricción y el sitio de reconocimiento de restricción puede permanecer sin metilar. El sitio de reconocimiento de restricción no metilado en el adaptador puede ser reconocido por una enzima de restricción (por ejemplo, Acul), y el ADN puede escindirse por Acul 13 pb a la derecha del adaptador derecho para formar ADN bicatenario lineal. Se puede ligar una segunda ronda de adaptadores derecho e izquierdo (Ad2) en cualquier extremo del ADN lineal, y todo el ADN con ambos adaptadores unidos se puede amplificar por PCR (por ejemplo, por PCR). Las secuencias de Ad2 se pueden modificar para permitir que se unan entre sí y formen ADN circular. El ADN puede estar metilado, pero un sitio de reconocimiento de enzima de restricción puede permanecer no metilado en el adaptador Ad1 izquierdo. Se puede aplicar una enzima de restricción (por ejemplo, Acul) y el ADN se puede escindir 13 pb a la izquierda del Ad1 para formar un fragmento de ADN lineal. Una tercera ronda de adaptadores derecho e izquierdo (Ad3) puede ligarse al flanco derecho e izquierdo del ADN lineal, y el fragmento resultante puede amplificarse por PCR. Los adaptadores se pueden modificar para que puedan unirse entre sí y formar un ADN circular. Puede añadirse una enzima de restricción de tipo III (por ejemplo, EcoP15); EcoP15 puede escindir el ADN 26 pb a la izquierda de Ad3 y 26 pb a la derecha de Ad2. Esta escisión puede eliminar un gran segmento de ADN y linealizar el ADN una vez más. Se puede ligar al ADN

una cuarta ronda de adaptadores derecho e izquierdo (Ad4), el ADN puede amplificarse (por ejemplo, mediante PCR) y modificarse para que se unan entre sí y formen el molde circular de ADN completo.

Puede usarse la replicación de círculo rodante (por ejemplo, usando la ADN polimerasa Phi 29) para amplificar pequeños fragmentos de ADN. Las cuatro secuencias adaptadoras pueden contener secuencias palindrómicas que pueden hibridar y una sola cadena puede plegarse sobre sí misma para formar una nanobola de ADN (DNB™) que puede tener aproximadamente 200-300 nanómetros de diámetro en promedio. Se puede unir una nanobola de ADN (por ejemplo, por adsorción) a una micromatriz (celda de flujo de secuenciación). La celda de flujo puede ser una oblea de silicio recubierta con dióxido de silicio, titanio y hexametildisilazano (HMDS) y un material fotoprotector. La secuenciación se puede realizar mediante secuenciación desencadenada ligando sondas fluorescentes al ADN. El color de la fluorescencia de una posición interrogada se puede visualizar con una cámara de alta resolución. Puede determinarse la identidad de secuencias de nucleótidos entre secuencias adaptadoras.

### Depósitos de inyección de tinta

Los métodos y composiciones de la divulgación, en algunos ejemplos, hacen uso de la deposición, colocación o situación de una composición en un lugar específico sobre o en la superficie de un soporte. La deposición puede comprender poner en contacto una composición con otra. La deposición puede ser manual o automática, por ejemplo, la deposición puede realizarse mediante dispositivos robóticos automatizados. Pueden usarse chorros de impulsos o chorros de tinta para dispensar gotas de una composición fluida sobre un soporte. Los chorros de impulsos funcionan típicamente liberando un impulso de presión (tal como mediante un elemento piezoeléctrico o termoelectrónico) al líquido adyacente a una salida u orificio de manera que se pueda dispensar una gota desde el mismo.

Los líquidos de los reactivos pueden depositarse en los loci resueltos de un sustrato descrito con más detalle en otra parte del presente documento utilizando varios métodos o sistemas conocidos en la técnica. Pueden suministrarse microgotículas de fluido en una superficie o loci resueltos sobre o dentro de un sustrato descrito en la presente divulgación con una precisión submicrométrica. Pueden emplearse equipos dispensadores disponibles comercialmente que utilizan tecnología de inyección de tinta como método de microdispensación para el volumen de fluido que se muestra más adelante. Las gotículas producidas usando tecnología de inyección de tinta son altamente reproducibles y pueden controlarse de modo que una gotícula pueda ponerse en una localización específica en un momento específico de acuerdo con los datos de imagen almacenados digitalmente. Los diámetros de gotícula típicos para los dispositivos de inyección de tinta en modo de demanda pueden ser de 30-100  $\mu\text{m}$ , lo que se traduce en volúmenes de gotícula de 14-520 pl. Las tasas de creación de gotículas para los dispositivos de inyección de tinta en modo de demanda pueden ser de 2000 a 5000 gotículas por segundo. La microdispensación por inyección de tinta en modo de demanda se puede utilizar con resoluciones y rendimientos adecuados para dar servicio a sustratos con altas densidades de loci resueltos descritos con más detalle en otras partes del presente documento. Se describen con más detalle métodos y sistemas para depositar o suministrar reactivos en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.843.767 y 6.893.816, ambas incorporadas por referencia en su totalidad.

Los sistemas para depositar o suministrar los reactivos a los loci resueltos pueden comprender uno o más subsistemas que incluyen, pero sin limitación: un cabezal dispensador de microchorro, un sistema de suministro de fluido o una bomba de inyección de tinta, un sistema de posicionamiento X-Y, un sistema de visión o un controlador de sistema. El cabezal dispensador de microchorro puede ser un conjunto de una pluralidad de dispositivos MicroJet (por ejemplo, 8 dispositivos MicroJet) y la electrónica de accionamiento requerida. La complejidad del sistema se puede minimizar mediante el uso de un solo canal de electrónica de accionamiento para multiplexar los 8 o 10 dispositivos dispensadores. Los requisitos de forma de onda de accionamiento para cada dispositivo individual se pueden descargar desde el controlador del sistema. La electrónica de accionamiento se puede construir usando métodos convencionales que se conocen en la técnica. El sistema de suministro de fluido, o la bomba de inyección de tinta, puede ser un Beckman Biomec modificado para actuar como sistema de entrada de múltiples reactivos. Entre éste y el cabezal de dispensación MicroJet puede haber un sistema de válvulas solenoides, controlado por el controlador del sistema. Proporcionan fluido de lavado presurizado y aire para purgar el reactivo del sistema y vacío para cargar el reactivo en el sistema. El sistema de posicionamiento X-Y puede ser cualquier sistema de posicionamiento X-Y de precisión disponible comercialmente con un controlador. El sistema de posicionamiento puede dimensionarse para acomodar una pluralidad de sensores. El sistema de visión se puede utilizar para calibrar la "zona de aterrizaje" de cada dispositivo MicroJet en relación con el sistema de posicionamiento. La calibración se puede realizar después de cada ciclo de carga de reactivo. Además, el sistema de visión puede localizar cada sitio de dispensación en cada sensor cuando la bandeja del sensor se carga por primera vez a través de marcas de referencia en los sensores. Se puede utilizar un sistema basado en software o un sistema de visión basado en hardware. El controlador del sistema puede ser un sistema informático convencional que se utiliza como controlador general del sistema. La captura y el procesamiento de imágenes del sistema de visión también residen en el controlador del sistema. Los sistemas para depositar o suministrar los reactivos en loci resueltos se describen con más detalle en la publicación PCT N.º WO2000039344, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La figura 18 ilustra un ejemplo de un conjunto de inyección de tinta. En algunos ejemplos, el conjunto de inyección de tinta puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 45, 48, 50, 56, 60, 64, 72, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más cabezales de inyección

de tinta. Cada uno de los cabezales de inyección de tinta puede depositar bloques de construcción de codones (trinucleótidos) diferentes. En un ejemplo ilustrativo, los cabezales de inyección de tinta pueden tener placas de silicio con orificios con 256 boquillas en centros de 254  $\mu\text{m}$  y una altura de vuelo de 100  $\mu\text{m}$ . Cada cabezal puede tener acceso a cada pocillo que atraviesa. El conjunto de inyección de tinta puede tener una velocidad de exploración de aproximadamente 100 mm/s con una precisión en el plano de desplazamiento (x,y) de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ . En algunos casos, la altura de escaneo sobre la oblea del conjunto de inyección de tinta puede ser de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  con una desviación de planitud de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20  $\mu\text{m}$ . En algunos casos, el conjunto de inyección de tinta puede comprender un sistema de visión para alinear la inyección de tinta con los sustratos, por ejemplo, obleas de silicio, puestos en un mandril de vacío, en algunos casos como parte de un conjunto de celda de flujo.

En algunos casos, los métodos y sistemas para depositar reactivos en una pluralidad de loci resueltos descritos en el presente documento pueden comprender aplicar a través de una bomba de inyección de tinta al menos una microgotícula de un primer reactivo a un primer locus de la pluralidad de loci y aplicar a través de una bomba de inyección de tinta al menos una microgotícula de un segundo reactivo a un segundo locus de la pluralidad de loci resueltos. En algunos ejemplos, el segundo locus puede ser adyacente al primer locus, y el primer y segundo reactivos pueden ser diferentes. El primer y segundo loci pueden residir en microestructuras fabricadas en una superficie de soporte y las microestructuras pueden comprender al menos un canal. En algunos casos, dicho al menos un canal tiene más de 100  $\mu\text{m}$  de profundidad. En algunos ejemplos, el primer y el segundo reactivos pueden ser iguales. En algunos casos, las microestructuras comprenden un microcanal grande y uno o más microcanales que están conectados fluidicamente al primer microcanal. El microcanal grande inicial recibe inicialmente un líquido depositado, típicamente reduciendo cualquier contaminación cruzada de reactivos hacia y desde microestructuras adyacentes. El contenido de la gotícula puede fluir posteriormente hacia uno o más microcanales más pequeños, que pueden albergar superficies adecuadas para las reacciones descritas en el presente documento, tales como la síntesis de oligonucleótidos.

Dicho al menos un canal puede tener una profundidad que puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, dicho al menos un canal puede tener una profundidad que puede estar entre aproximadamente 50-100, 50-150, 50-200, 100-200, 100-300, 20-300 o 20-100  $\mu\text{m}$ . En algunos ejemplos, dicho al menos un canal puede tener más de 100  $\mu\text{m}$  de profundidad.

Cada una de las gotículas de reactivo puede tener un volumen adecuado que puede atravesar la profundidad del microcanal sin perder impulso. El volumen adecuado puede comprender una cantidad deseada de reactivos para la síntesis de oligonucleótidos. Por ejemplo, sin limitación, cada una de las gotículas que comprenden reactivos puede tener un volumen de aproximadamente o al menos aproximadamente 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500 pl, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 500 nl o más. En diversos ejemplos, el sistema se ajusta de manera que cualquier gotícula satélite que se arrastra detrás de una gotícula depositada sea lo suficientemente pequeña como para minimizar la contaminación cruzada. En el caso de una inyección de tinta, los cabezales de impresión se pueden acercar lo suficiente a un sustrato, por ejemplo, dentro de 100  $\mu\text{m}$ , de manera que una gotícula depositada y sus gotas satélite estén sustancialmente dentro de un canal del sustrato antes del movimiento del aerosol. Las gotículas satélite pueden tener un diámetro de menos de 0,5, 1, 1,5 o 2  $\mu\text{m}$ . En diversos ejemplos, la fracción volumétrica de las gotículas satélite que participan en el movimiento del aerosol es menos del 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 % de una gotícula depositada, o menos.

Como se describe en otras partes del presente documento, las microestructuras pueden comprender múltiples canales en comunicación fluidica entre sí. En algunos casos, las microestructuras pueden comprender al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez canales en comunicaciones fluidas. Los canales pueden tener diferentes dimensiones, por ejemplo, anchuras o longitudes, como se describe con más detalle en otras partes del presente documento. En algunos ejemplos, los canales conectados fluidicamente de las microestructuras pueden comprender dos o más canales con la misma anchura, longitud y/u otras dimensiones.

Las microgotículas de fluido se pueden suministrar a una superficie o loci resueltos dentro de un sustrato como se describe en otra parte del presente documento con una alta precisión y con una contaminación cruzada mínima. En algunos casos, el primer locus puede recibir menos del 0,1 % de un segundo reactivo destinado a depositarse en un segundo locus y, de manera similar, el segundo locus puede recibir menos del 0,1 % del primer reactivo. En algunos casos, el primer locus puede recibir menos de aproximadamente el 0,5 %, 0,45 %, 0,4 %, 0,35 %, 0,3 %, 0,25 %, 0,2 %, 0,15 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 % o 0,01 % del segundo reactivo. El segundo locus puede recibir menos de aproximadamente el 0,5 %, 0,45 %, 0,4 %, 0,35 %, 0,3 %, 0,25 %, 0,2 %, 0,15 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 % o 0,01 % del primer reactivo.

En algunos casos, los reactivos se pueden suministrar en gotículas que tienen un diámetro de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150,

160, 170, 180, 190 o 200  $\mu\text{m}$ . Las gotículas de reactivo pueden tener un diámetro de al menos aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ . Los reactivos se pueden suministrar en gotículas que tienen un diámetro de menos de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200  $\mu\text{m}$ . Los reactivos se pueden administrar en gotículas que tienen un diámetro de entre 2-10, 2-5, 10-200, 10-150, 10-100, 10-500, 20-200, 20-150, 20-100, 30-100, 30-200, 30-150, 40-100, 40-80 o 50-60  $\mu\text{m}$ .

Las gotículas de reactivos se pueden depositar a una velocidad de aproximadamente o al menos aproximadamente 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 o 5000 gotículas por segundo.

## 10 Aterrizaje suave

También se describen en el presente documento sistemas y métodos para depositar gotículas en una pluralidad de micropocillos. En un aspecto, las gotículas se pueden depositar en un micropocillo de un sistema microfluídico que comprende una primera superficie con una pluralidad de micropocillos. La gotícula puede tener un número de Reynolds adecuado, tal como aproximadamente 1-1000, 1-2000, 1-3000, 0,5-1000, 0,5-2000, 0,5-3000, 0,5-4000, 0,5-5000, 1-500, 2-500, 1-100, 2-100, 5-100, 1-50, 2-50, 5-50 o 10-50, de manera que se minimice el rebote de líquidos al llegar al fondo del micropocillo. Los expertos en la materia apreciarán que el número de Reynolds puede estar dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de estos valores (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 500). Se describen métodos adecuados para la estimación precisa de los números de Reynolds en sistemas de fluidos en Clift *et al.* (Clift, Roland, John R. Grace y Martin E. Weber, Bubbles, Drops and Particles, 2005. Dover Publications) y Happel *et al.* (Happel, John y Howard Brenner, 1965. Prentice Hall), cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

La densidad de la pluralidad de micropocillos puede ser más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 o más por  $\text{mm}^2$ . Siguiendo los métodos descritos en el presente documento, la gotícula del líquido puede fluir a través del micropocillo suavemente y aterrizar suavemente en el fondo del micropocillo.

Las gotículas de líquido se pueden depositar usando cualquier método y sistema conocido en la técnica. En algunos ejemplos, el sistema microfluídico puede comprender además una bomba de inyección de tinta. La bomba de inyección de tinta se puede utilizar para depositar la gotícula de líquido en uno de la pluralidad de micropocillos. Varios ejemplos de los sistemas de depósito de líquidos se describen en otra parte de la memoria descriptiva.

En algunos casos, los micropocillos pueden tener diferentes anchuras, la misma anchura o una combinación de la misma anchura o diferentes anchuras dentro de las subregiones de un sustrato. Los micropocillos pueden tener cualquier anchura diferente. Por ejemplo, sin limitación, la anchura de los micropocillos puede ser aproximadamente, mayor de aproximadamente, o menor de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100  $\mu\text{m}$ .

Los micropocillos pueden tener diferentes longitudes. Por ejemplo, sin limitación, la longitud de los micropocillos puede ser aproximadamente, mayor de aproximadamente o menor de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000  $\mu\text{m}$ .

Los micropocillos se pueden conectar de forma fluida a al menos un microcanal. Los micropocillos pueden comprender una relación entre el área de la superficie y la longitud, o un perímetro, de aproximadamente, al menos aproximadamente, o menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100  $\mu\text{m}$ .

Las gotículas del líquido pueden tener un volumen adecuado para los métodos descritos en el presente documento. En algunos ejemplos, la gotícula puede tener un volumen inferior a aproximadamente 0,5 microlitros ( $\mu\text{l}$ ), menor de aproximadamente 1  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 1,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 2  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 2,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 3  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 3,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 4  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 4,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 5,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 6  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 6,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 7  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 7,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 8  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 8,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 9  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 9,5  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 10  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 11  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 12  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 13  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 14  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 15  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 16  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 17  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 18  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 19  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 20  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 25  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 30  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 35  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 40  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 45  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 50  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 55  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 60  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 65  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 70  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 75  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 80  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 85  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 90  $\mu\text{l}$ , menor de aproximadamente 95  $\mu\text{l}$  o menor de aproximadamente 100  $\mu\text{l}$ . En algunos ejemplos,

la gotícula puede tener un volumen de aproximadamente 0,5 microlitros ( $\mu\text{l}$ ), aproximadamente 1  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 1.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 2  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 2.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 3  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 3.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 4  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 4.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 5.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 6  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 6.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 7  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 7.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 8  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 8.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 9  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 9.5  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 11  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 12  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 13  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 14  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 15  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 16  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 17  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 18  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 19  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 20  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 25  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 30  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 35  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 40  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 45  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 50  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 55  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 60  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 65  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 70  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 75  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 80  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 85  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 90  $\mu\text{l}$ , aproximadamente 95  $\mu\text{l}$  o aproximadamente 100  $\mu\text{l}$ .

En algunos casos, los microcanales se pueden recubrir con un resto, tal como un resto químicamente inerte, que aumenta la energía de superficie. Los tipos de restos químicamente inertes o reactivos adecuados se describen en otra parte de la presente memoria descriptiva.

El número de Reynolds de la gotícula puede estar en un intervalo de número de Reynolds que permite que el líquido fluya suavemente a través de micropocillos y/o microcanales como se describe en el presente documento. En algunos ejemplos, el número de Reynolds de la gotícula puede ser menor que aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000. En algunos ejemplos, el número de Reynolds de la gotícula puede ser mayor de aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000. En algunos casos, las gotículas pueden fluir a través de los micropocillos en un flujo laminar o en un flujo casi laminar.

La gotícula se puede aplicar o depositar a una velocidad de al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 m/seg o más.

### División programable

El sistema como se describe en el presente documento puede comprender una pluralidad de loci resueltos y una pluralidad de tapas de reactor resueltas que se pueden sellar conjuntamente para formar una pluralidad de reactores resueltos. La pluralidad de reactores resueltos puede contener reactivos. El sellado puede ser reversible o suelto, y la pluralidad de tapas de reactor resueltas puede liberarse de la pluralidad de loci resueltos. Tras la liberación de la primera superficie que comprende la pluralidad de loci resueltos, las tapas de reactor pueden retener al menos una parte de los reactivos. Mediante el control de la liberación de las tapas de reactor de la pluralidad de loci resueltos, se puede controlar el reparto del líquido o de los reactivos. En un aspecto de la presente divulgación, en el presente documento se describe un método de reparto. El método puede comprender poner en contacto una primera superficie que comprende un líquido en una primera pluralidad de loci resueltos con una segunda superficie que comprende una segunda pluralidad de loci resueltos, tales como tapas de reactor, en donde la primera superficie puede comprender una primera tensión de superficie con el líquido, la segunda superficie puede comprender una segunda tensión de superficie con el líquido y determinar una velocidad de liberación de modo que una fracción deseada del líquido pueda transferirse desde la primera pluralidad de loci resueltos a la segunda pluralidad de loci resueltos. Tras separar la segunda superficie de la primera superficie a esta velocidad calculada, una fracción deseada del contenido de los reactores puede retenerse en los reactores. La primera superficie que comprende la primera pluralidad de loci resueltos puede comprender la pluralidad de loci resueltos que están recubiertos con oligonucleótidos. La segunda superficie que comprende la segunda pluralidad de loci resueltos puede ser un elemento de tapado que comprende una pluralidad de tapas de reactor. En algunos casos, el método puede comprender además poner en contacto una tercera superficie con una tercera pluralidad de loci resueltos. En el presente documento se describen varios aspectos o ejemplos.

El líquido que queda retenido en la segunda superficie se puede retener mediante cualquier método conocido en la técnica. En algunos casos, la primera o la segunda superficie pueden comprender microcanales que albergan al menos una porción del líquido. En algunos casos, la primera o la segunda superficie pueden comprender nanorreactores que albergan al menos una porción del líquido. En algunos casos, el líquido se puede retener debido a las diferencias de tensión de superficie entre la primera y la segunda superficies. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, para líquidos acuosos, una porción mayor del líquido puede quedar retenida en la superficie que tiene una energía de superficie más alta, o menos hidrófoba.

El líquido se puede dividir de manera que una fracción deseada de los reactivos se pueda retener sobre la primera o la segunda superficie tras la liberación. Por ejemplo, sin limitación, la fracción deseada puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o más de aproximadamente el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

### 65 Métodos de mezcla microfluídicos en paralelo

En otro aspecto de la presente divulgación, Se describen en el presente documento métodos para mezclar líquidos. Los métodos pueden comprender proporcionar un primer sustrato que comprende una pluralidad de microestructuras fabricadas en el mismo; proporcionar un segundo sustrato que comprende una pluralidad de tapas de reactor resueltas; alinear el primer y segundo sustratos de manera que una primera tapa de reactor de la pluralidad se configure para recibir líquido de n microestructuras en el primer sustrato; y liberar líquido desde las n microestructuras en la primera tapa del reactor, mezclándose así el líquido de las n microestructuras formando una mezcla. en el presente documento se describen varios ejemplos y variaciones.

La densidad de las tapas de reactor resueltas puede ser cualquier densidad adecuada que permita el alineamiento deseado de las microestructuras de un primer sustrato y las tapas del reactor de un segundo sustrato. En algunos casos, la densidad de las tapas de reactor resueltas puede ser de al menos 1/mm<sup>2</sup>. En algunos casos, la densidad de los reactores resueltos puede ser de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, o aproximadamente 2000 sitios por 1 mm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, la densidad de los reactores resueltos puede ser de al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 1500, al menos aproximadamente 2000 o al menos aproximadamente 3000 sitios por 1 mm<sup>2</sup>.

Las microestructuras pueden tener cualquier densidad practicable de acuerdo con los métodos y composiciones de la divulgación. En algunos casos, las microestructuras pueden tener una densidad de aproximadamente, al menos aproximadamente, o menos de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, o aproximadamente 3000 sitios por 1 mm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, las microestructuras pueden estar a una densidad de al menos 100 por 1 mm<sup>2</sup>. En algunos casos, las microestructuras pueden tener una densidad de superficie que es aproximadamente la misma que la densidad de los reactores resueltos.

En algunos casos, puede haber un hueco, por ejemplo, un hueco de menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 µm entre el primer y el segundo sustratos después de alinear el primer y el segundo sustratos de tal manera que una primera tapa de reactor de la pluralidad esté configurada para recibir líquido de n microestructuras en el primer sustrato.

En algunos casos, la mezcla o el líquido puede extenderse parcialmente al interior del hueco entre el primer y el segundo sustratos después de alinear el primer y el segundo sustratos de modo que una primera tapa de reactor de la pluralidad esté configurada para recibir líquido de n microestructuras en el primer sustrato. El líquido o la mezcla que se esparce parcialmente al interior del hueco puede formar una válvula de expansión capilar. Los métodos de mezcla pueden comprender además sellar el hueco acercando el primer y segundo sustratos entre sí. En algunos casos, el primer y el segundo sustratos pueden estar en contacto físico directo.

La pluralidad de microestructuras y tapas de reactor pueden tener cualquier diseño o dimensiones adecuados como se describe con más detalle en otra parte del presente documento. Al menos un canal puede tener un área de sección transversal que tiene forma circular y puede comprender un radio del área de sección transversal de aproximadamente, al menos aproximadamente, menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 µm.

En algunos casos, los canales pueden estar recubiertos con un resto, tal como un resto químicamente inerte, que aumenta la energía de superficie correspondiente a un ángulo de contacto con el agua de menos de 90 °. La energía de superficie, o hidrofobicidad de una superficie, se puede evaluar o medir midiendo un ángulo de contacto con el agua. Un ángulo de contacto con el agua de menos de 90 ° puede funcionalizar la superficie sólida de una manera relativamente hidrófila. Un ángulo de contacto con el agua de más de 90 ° puede funcionalizar la superficie sólida de una manera relativamente hidrófoba. Las superficies altamente hidrófobas con baja energía de superficie pueden tener ángulos de contacto con el agua superiores a 120 °. En algunos casos, la superficie de los canales, o uno de los dos

canales como se describe en el presente documento, se puede funcionalizar o modificar para que sea hidrófoba, tenga una energía de superficie baja, o tenga un ángulo de contacto con el agua que puede ser mayor de aproximadamente 90 °, 95°, 100°, 105°, 110°, 115°, 120°, 125°, 130°, 135°, 140°, 145 ° o 150 ° medidos en una superficie no curvada.

5 En algunos casos, la superficie de los canales, o uno de los dos canales como se describe en el presente documento en la presente descripción puede funcionalizarse o modificarse para que sea hidrófila, tenga una energía de superficie alta, o tenga un ángulo de contacto con el agua que puede ser menor de aproximadamente 90 °, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15° o 10° medidos en una superficie no curvada. La superficie de los canales o uno de los dos canales puede funcionalizarse o modificarse para que sea más hidrófila o hidrófoba. En algunos casos, las superficies del primer y segundo sustratos pueden comprender una energía de superficie diferente  
10 con un líquido dado, tal como agua. En algunos casos, las superficies del primer y segundo sustratos pueden comprender un ángulo diferencial de contacto con el agua de entre aproximadamente 5 °, 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90 °. Se describen otros métodos para funcionalizar la superficie en la Patente de Estados Unidos N.º 6.028.189.

15 En algunos ejemplos, el suministro se puede realizar por presión. El suministro de líquido de las n microestructuras a la primera tapa del reactor puede hacer que se mezcle el líquido de las n microestructuras y forme una mezcla.

En algunos casos, el volumen del líquido total de la mezcla puede ser mayor que el volumen de la tapa de reactor. Todas o parte de las superficies de las tapas de reactor, tal como la superficie del borde, pueden modificarse usando  
20 métodos de modificación de superficie adecuados descritos con más detalle en otras partes del presente documento y conocidos de otro modo en la técnica. En algunos casos, se diseñan irregularidades de la superficie. Las modificaciones químicas de la superficie y las irregularidades pueden servir para ajustar el ángulo de contacto con el agua del borde. También se pueden aplicar tratamientos de superficie similares sobre la superficie de un sustrato que se acerca a las tapas de reactor formando un sello, por ejemplo, un sello reversible. Se puede utilizar una válvula de expansión capilar entre las dos superficies como se describe con más detalle en otras partes del presente documento.  
25 Los tratamientos de superficies pueden ser útiles en el control preciso de tales sellados comprendiendo válvulas de expansión capilar.

En algunos casos, la liberación del elemento de tapado de la primera superficie y la liberación del elemento de tapado  
30 de la segunda superficie pueden realizarse a una velocidad diferente. La cantidad de la porción de reactivos que se retiene tras suministrar el elemento de tapado de la superficie correspondiente puede controlarse mediante la velocidad o la energía de superficie del elemento de tapado y la superficie correspondiente. La diferencia en la energía de superficie, o hidrofobicidad, del elemento de tapado y la superficie correspondiente puede ser un parámetro para controlar la porción de los reactivos que se retiene tras la liberación. El volumen de la primera y la segunda reacciones  
35 pueden ser diferentes.

### Aplicaciones posteriores

Los métodos y composiciones de la divulgación pueden usarse para estudios de hibridación de ácidos nucleicos tales  
40 como análisis de expresión génica, genotipado, análisis de heterodúplex, determinaciones de secuenciación de ácidos nucleicos basadas en hibridación, síntesis de ADN, ARN, péptidos, proteínas u otras moléculas oligoméricas o no oligoméricas, bibliotecas combinatorias para la evaluación de fármacos candidatos.

El ADN y el ARN sintetizados de acuerdo con la divulgación pueden usarse en cualquier aplicación, incluyendo, a  
45 modo de ejemplo, sondas para métodos de hibridación tales como el análisis de expresión génica, genotipado por hibridación (hibridación competitiva y análisis de heterodúplex), secuenciación por hibridación, sondas para análisis de transferencia de Southern (cebadores marcados), sondas para la hibridación de matrices (micromatriz o matriz de filtros), sondas "padlock" utilizables con colorantes de transferencia de energía para detectar la hibridación en ensayos de expresión o genotipado, y otros tipos de sondas. El ADN y el ARN preparados de acuerdo con la divulgación  
50 también se pueden usar en reacciones basadas en enzimas tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como cebadores para PCR, moldes para PCR, técnicas de PCR (genotipado/haplotipado) específicas de alelo, PCR en tiempo real, PCR cuantitativa, PCR con transcriptasa inversa y otras técnicas de PCR. El ADN y el ARN se pueden utilizar para diversas técnicas de ligamiento, incluyendo el genotipado basado en ligamiento, ensayos de ligamiento de oligos (OLA), amplificación basada en ligamiento, ligamiento de secuencias adaptadoras para experimentos de clonación, secuenciación dideoxi de Sanger (cebadores, cebadores marcados), secuenciación de alto rendimiento  
55 (mediante separación electroforética u otro método de separación), extensiones de cebadores, mini-secuenciaciones y extensiones de una sola base (SBE). El ADN y el ARN producidos de acuerdo con la divulgación pueden usarse en estudios de mutagénesis, (introduciendo una mutación en una secuencia conocida con un oligo), transcripción inversa (haciendo una copia de ADNc de un transcrito de ARN), síntesis génica, introducción de sitios de restricción (una forma de mutagénesis), estudios de unión de proteína-ADN y experimentos similares. A los expertos en la técnica se les ocurrirán varios otros usos de los ADN y ARN producidos por los métodos del presente documento, y dichos usos  
60 también se consideran dentro del alcance de esta divulgación.

### Sistemas informáticos

65 En diversos ejemplos, los métodos y sistemas de la divulgación pueden comprender además programas de software

en sistemas informáticos y su uso. Por consiguiente, el control computarizado para la sincronización de las funciones de dispensación/vacío/relleno tal como el orquestado y sincronización del movimiento del cabezal de impresión, la acción de dispensación y el accionamiento de vacío está dentro de los límites de la divulgación. Los sistemas informáticos pueden programarse para interactuar entre la secuencia de bases especificada por el usuario y la posición de un cabezal dispensador para administrar los reactivos correctos a regiones específicas del sustrato.

El sistema informático 1900 ilustrado en la figura 19 puede entenderse como un aparato lógico que puede leer instrucciones desde el medio 1911 y/o un puerto de red 1905, que se puede conectar opcionalmente al servidor 1909 que tiene un medio fijo 1912. El sistema, tal como se muestra en la figura 19 puede incluir una CPU 1901, unidades de disco 1903, dispositivos de entrada opcionales tales como un teclado 1915 y/o ratón 1916 y un monitor opcional 1907. La comunicación de datos se puede lograr a través del medio de comunicación indicado a un servidor en una ubicación local o remota. El medio de comunicación puede incluir cualquier medio de transmisión y/o recepción de datos. Por ejemplo, el medio de comunicación puede ser una conexión de red, una conexión inalámbrica o una conexión a Internet. Dicha conexión puede proporcionar comunicación a través de la World Wide Web. Se prevé que los datos relacionados con la presente divulgación puedan transmitirse a través de tales redes o conexiones para su recepción y/o revisión por una parte 1922 como se ilustra en la figura 19.

La figura 20 es un diagrama de bloques que ilustra una primera arquitectura de ejemplo de un sistema informático 2000 que puede usarse en relación con ejemplos ilustrativos de la presente divulgación. Como se representa en la figura 20, el sistema informático ejemplar puede incluir un procesador 2002 para procesar instrucciones. Los ejemplos no limitantes de procesadores incluyen: procesador Intel Xeon™, procesador AMD Opteron™, procesador Samsung RISC ARM 1176JZ (F)-S v1.0™ de 32 bits, procesador ARM Cortex-A8 Samsung S5PC100™, procesador ARM Cortex-A8 Apple A4™, procesador Marvell PXA 930™ o un procesador funcionalmente equivalente. Se pueden utilizar múltiples hilos de ejecución para el procesamiento en paralelo. En algunos ejemplos, también se pueden utilizar múltiples procesadores o procesadores con múltiples núcleos, ya sea en un solo sistema informático, en un grupo, o distribuidos entre sistemas a través de una red que comprende una pluralidad de ordenadores, teléfonos móviles y/o dispositivos de asistencia de datos personales.

Como se ilustra en la figura 20, un caché de alta velocidad 2004 se puede conectar o incorporar en, el procesador 2002 para proporcionar una memoria de alta velocidad para instrucciones o datos que se han usado recientemente, o se usan con frecuencia, por el procesador 2002. El procesador 2002 está conectado a un puente norte 2006 mediante un bus de procesador 2008. El puente norte 2006 está conectado a la memoria de acceso aleatorio (RAM) 2010 mediante un bus de memoria 2012 y gestiona el acceso a la RAM 2010 mediante el procesador 2002. El puente norte 2006 también está conectado a un puente sur 2014 mediante un bus de chipset 2016. El puente sur 2014, a su vez, está conectado a un bus periférico 2018. El bus periférico puede ser, por ejemplo, PCI, PCI-X, PCI Express u otro bus periférico. El puente norte y el puente sur a menudo se denominan chipset de procesador y administran la transferencia de datos entre el procesador, RAM y componentes periféricos en el bus periférico 2018. En algunas arquitecturas alternativas, la funcionalidad del puente norte se puede incorporar al procesador en lugar de utilizar un chip de puente norte separado.

En algunos ejemplos, el sistema 2000 puede incluir una tarjeta aceleradora 2022 conectada al bus periférico 2018. El acelerador puede incluir matrices de puertas programables en campo (FPGA) u otro hardware para acelerar cierto procesamiento. Por ejemplo, se puede utilizar un acelerador para la reestructuración adaptativa de datos o para evaluar expresiones algebraicas utilizadas en el procesamiento de conjuntos extendidos.

El software y los datos se almacenan en el almacenamiento externo 2024 y se pueden cargar en RAM 2010 y/o caché 2004 para que los utilice el procesador. El sistema 2000 incluye un sistema operativo para gestionar los recursos del sistema; los ejemplos no limitantes de sistemas operativos incluyen: Linux, Windows™, MACOS™, BlackBerry OSTM, iOSTM y otros sistemas operativos funcionalmente equivalentes, así como software de aplicación que se ejecuta en la parte superior del sistema operativo para gestionar el almacenamiento de datos y la optimización de acuerdo con ejemplos ilustrativos de la presente divulgación.

En este ejemplo, el sistema 2000 también incluye tarjetas de interfaz de red (NIC) 2020 y 2021 conectadas al bus periférico para proporcionar interfaces de red al almacenamiento externo, tales como almacenamiento conectado a la red (NAS) y otros sistemas informáticos que se pueden utilizar para el procesamiento paralelo distribuido.

La figura 21 es un diagrama que muestra una red 2100 con una pluralidad de sistemas informáticos 2102a y 2102b, una pluralidad de teléfonos móviles y asistentes de datos personales 2102c, y almacenamiento conectado a la red (NAS) 2104a y 2104b. En ejemplos ilustrativos, los sistemas 2102a, 2102b y 2102c pueden administrar el almacenamiento de datos y optimizar el acceso a los datos almacenados en el almacenamiento conectado a la red (NAS) 2104a y 2104b. Se puede usar un modelo matemático para los datos y evaluarlo usando procesamiento paralelo distribuido entre los sistemas informáticos 2102a y 2102b, y los sistemas de asistente de datos personales y de teléfono celular 2102c. Los sistemas informáticos 2102a y 2102b, y los sistemas de asistentes de datos personales y de teléfonos móviles 2102c también pueden proporcionar un procesamiento paralelo para la reestructuración de datos adaptativa de los datos almacenados en el almacenamiento conectado a la red (NAS) 2104a y 2104b. La figura 21 ilustra solo un ejemplo, y se puede usar una amplia diversidad de otras arquitecturas y sistemas informáticos junto con

los diversos ejemplos de la presente divulgación. Por ejemplo, se puede utilizar un servidor Blade para proporcionar procesamiento en paralelo. Los blades del procesador se pueden conectar a través de un plano posterior para proporcionar procesamiento en paralelo. El almacenamiento también se puede conectar al plano posterior o como almacenamiento conectado a la red (NAS) a través de una interfaz de red separada.

En algunos ejemplos ilustrativos, los procesadores pueden mantener espacios de memoria separados y transmitir datos a través de interfaces de red, plano posterior u otros conectores para procesamiento en paralelo por otros procesadores. En otros ejemplos, algunos o todos los procesadores pueden utilizar un espacio de memoria de dirección virtual compartida.

La figura 22 es un diagrama de bloques de un sistema informático multiprocesador 2200 que utiliza un espacio de memoria de dirección virtual compartida de acuerdo con un ejemplo ilustrativo. El sistema incluye una pluralidad de procesadores 2202a-f que pueden acceder a un subsistema de memoria compartida 2204. El sistema incorpora una pluralidad de algoritmos de memoria de hardware programables (MAP) 2206a-f en el subsistema de memoria 2204. Cada MAP 2206a-f puede comprender una memoria 2208a-f y una o más matrices de puertas programables en campo (FPGA) 2210a-f. El MAP proporciona una unidad funcional configurable y se pueden proporcionar algoritmos particulares o porciones de algoritmos a las FPGA 2210a-f para su procesamiento en estrecha coordinación con un procesador respectivo. Por ejemplo, los MAP se pueden utilizar para evaluar expresiones algebraicas con respecto al modelo de datos y para realizar una reestructuración adaptativa de datos en ejemplos ilustrativos. En este ejemplo, todos los procesadores pueden acceder globalmente a cada MAP para estos fines. En una configuración, cada MAP puede utilizar el acceso directo a memoria (DMA) para acceder a una memoria asociada 2208a-f, lo que le permite ejecutar tareas de forma independiente y asíncrona del microprocesador respectivo 2202a-f. En esta configuración, un MAP puede enviar resultados directamente a otro MAP para canalizar y ejecutar en paralelo algoritmos.

Las arquitecturas y sistemas informáticos anteriores son solo ejemplos, y se puede usar una amplia diversidad de otras arquitecturas y sistemas de ordenadores, teléfonos móviles y asistentes de datos personales en relación con ejemplos ilustrativos, incluidos los sistemas que utilizan cualquier combinación de procesadores generales, coprocesadores, FPGA y otros dispositivos lógicos programables, sistema en chips (SOC), circuitos integrados para aplicaciones específicas (ASIC) y otros elementos de procesamiento y lógicos. En algunos ejemplos, todo o parte del sistema informático se puede implementar en software o hardware. Se puede usar cualquier variedad de medios de almacenamiento de datos en relación con ejemplos ilustrativos, incluida la memoria de acceso aleatorio, unidades de disco duro, memoria flash, unidades de cinta, matrices de discos, almacenamiento conectado a la red (NAS) y otros dispositivos y sistemas de almacenamiento de datos locales o distribuidos.

En ejemplos ilustrativos, el sistema informático se puede implementar utilizando módulos de software que se ejecutan en cualquiera de los anteriores u otras arquitecturas y sistemas informáticos. En otros ejemplos, las funciones del sistema se pueden implementar parcial o completamente en firmware, dispositivos lógicos programables tales como matrices de puertas programables en campo (FPGA) como se hace referencia en la figura 22, sistema en chips (SOC), circuitos integrados para aplicaciones específicas (ASIC) u otros elementos de procesamiento y lógicos. Por ejemplo, el Set Processor and Optimizer se puede implementar con aceleración de hardware mediante el uso de una tarjeta aceleradora de hardware, tal como la tarjeta aceleradora 122 ilustrada en la figura 20.

#### **EJEMPLO 1: Procesamiento frontal de una oblea de silicio para crear un micropocillo**

Las obleas de silicio se graban para crear un sustrato ejemplar que comprende una pluralidad de micropocillos usando un método de procesamiento frontal como se ilustra en la figura 23. Comenzando con un sustrato SOI con una capa de óxido en las dos superficies del sustrato, se aplica un recubrimiento de capa de fotoprotector usando el método de fotolitografía en el lado del soporte del sustrato en localizaciones. Tras el recubrimiento del fotoprotector, se realiza el DRIE en el lado del soporte hasta llegar a la capa de óxido en la parte central de la oblea. Después, se quita el revestimiento de fotoprotector quedando expuesta la capa de óxido de abajo. De manera similar, se aplica un recubrimiento de una segunda capa de fotoprotector utilizando el método de fotolitografía en el lado del dispositivo del sustrato en localizaciones preferidas, con diámetros adecuados. Tras la aplicación de la segunda capa de fotoprotector como un recubrimiento, se vuelve a realizar el DRIE en el lado del dispositivo de la oblea de silicio hasta alcanzar la capa de óxido en la parte central de la oblea de silicio. Después, se eliminan el fotoprotector y la capa de óxido en la parte central de la oblea. Finalmente, se recubre con óxido toda la superficie de la oblea, creando una oblea de silicio con una pluralidad de microestructuras, comprendiendo cada una un micropocillo más grande y uno o más microcanales conectados fluidicamente al micropocillo.

#### **EJEMPLO 2: Procesamiento en la parte posterior de una oblea de silicio para funcionalizar la superficie seleccionada del micropocillo**

La oblea de silicio con micropocillos grabados se procesa adicionalmente para funcionalizar porciones seleccionadas de los micropocillos utilizando un método de procesamiento en la parte posterior como se ilustra en la figura 24. Para recubrir solo la superficie de un micropocillo más pequeño dentro de un micropocillo con un agente de funcionalización activo que aumenta la energía de superficie, se utiliza como material de partida el producto del ejemplo 1. Se deposita

una gotícula de fotoprotector en el microcanal usando una impresora de inyección de tinta como se describe en el presente documento. La gotícula de fotoprotector se esparce en el microcanal en conexión fluidica con el micropocillo. Después de la deposición de fotoprotector, se realiza el grabado con plasma de oxígeno para eliminar el exceso de fotoprotector, dejando una superficie más lisa de fotoprotector como se ilustra en la figura 24. Se deposita una capa de un resto químicamente inerte como un recubrimiento sobre todas las superficies expuestas de la oblea de silicio para crear una capa de funcionalización pasiva con baja energía de superficie. Después, se elimina el fotoprotector, quedando expuesta la superficie del microcanal más pequeño en comunicación fluidica con el micropocillo. Tras la eliminación del fotoprotector, se aplica una capa de agente de funcionalización activo como un recubrimiento sobre la superficie del microcanal más pequeño para aumentar la energía de superficie de la superficie del micropocillo y/o para proporcionar químicas de superficie para el crecimiento de oligonucleótidos. Las superficies previamente funcionalizadas permanecen sustancialmente inalteradas por la segunda aplicación de funcionalización de superficie. Como resultado, se fabrica sobre un sustrato sólido una pluralidad de micropocillos con una primera funcionalización de superficie, cada uno en comunicación fluidica con uno o más microcanales con una segunda funcionalización de superficie.

### EJEMPLO 3: Dispositivo microfluídico

Se fabricó un dispositivo microfluídico que comprende una porción de sustrato sustancialmente plana de acuerdo con los métodos y composiciones de la divulgación como se muestra en la figura 25D. En la figura 25E se muestra una sección transversal del sustrato. El sustrato comprende 108 grupos, en el que cada grupo comprende 109 agrupamientos de conexiones fluidicas. Cada agrupamiento comprende 5 segundos canales que se extienden desde un primer canal. La figura 25A es una vista de dispositivo de cada grupo que comprende los 109 agrupamientos. La figura 25C es una vista de soporte del grupo de la figura 25A. La figura 25B es una vista en sección de la figura 25A que muestra una fila de 11 agrupamientos. La figura 25F es otra vista del sustrato mostrado en la figura 25D, donde se visualiza la posición de un marcador. La figura 25G es una vista ampliada de la figura 25A, que indica los 109 agrupamientos del grupo.

Como se muestra en las figuras 25A y 25C, los 109 agrupamientos están dispuestas en filas desplazadas para formar un grupo en un patrón circular, donde las regiones individuales no se superponen entre sí. Los agrupamientos individuales forman un círculo. Representada por 2503, la distancia entre tres filas de estos agrupamientos es de 0,254 mm. Como se muestra en 2506, la distancia entre dos agrupamientos en una fila de agrupamientos es de 0,0978 mm. La sección transversal del primer canal en un agrupamiento, como se muestra en 2504, es de 0,075 mm. La sección transversal de cada segundo canal en un agrupamiento, como se muestra en 2505, es de 0,020 mm. La longitud del primer canal en un agrupamiento, como se muestra en 2502, es de 0,400 mm. La longitud de cada segundo canal en un agrupamiento, como se muestra en 2501, es de 0,030 mm.

El grupo de 109 agrupamientos que se muestran en las figuras 25A y 25C están dispuestos en una conformación adecuada para su colocación en un solo pocillo de reacción que puede estar adyacente al grupo en las figuras 25A y 25C. El resto de los grupos en la figura 25D están dispuestos de manera similar de una manera que facilita el suministro a varios pocillos de reacción, tal como la placa del nanorreactor descrita en la figura 26 y el ejemplo 4. El sustrato comprende 108 pocillos de reacción, que proporcionan 11.772 agrupamientos.

La anchura del sustrato a lo largo de una dimensión, como se indica en 2508, es de 32,000 mm. La anchura del sustrato a lo largo de otra dimensión, como se indica en 2519, es de 32,000 mm.

La porción de sustrato sustancialmente plana, como se muestra en la figura 25D, comprende 108 grupos de agrupamientos. Los grupos están dispuestos en filas formando un cuadrado. La distancia más lejana desde el centro de un grupo al origen en una dimensión, como se indica en 2518, es de 24,467 mm. La distancia más lejana desde el centro de un grupo hasta el origen en otra dimensión, como se indica en 2509, es de 23,620 mm. La distancia más cercana desde el centro de un grupo al origen en una dimensión, como se muestra en 2517, es de 7,533. La distancia más cercana desde el centro de un grupo al origen en otra dimensión, como se muestra en 2512, es de 8,380. La distancia entre los centros de dos grupos en la misma fila, como se muestra en 2507 y 2522 es 1,69334 mm.

El sustrato comprende 3 marcas de referencia para facilitar el alineamiento del dispositivo microfluídico con otros componentes de un sistema. Una primera marca de referencia se encuentra cerca del origen, donde la marca de referencia está más cerca del origen que cualquier grupo. La primera marca de referencia se encuentra a 5,840 mm del origen en una dimensión (2516) y a 6,687 mm del origen en otra dimensión (2513). La primera marca de referencia se encuentra a 1,69334 mm de un grupo en una dimensión (2515) y a 1,69344 mm del mismo grupo en otra dimensión (2514). Otras dos marcas de referencia se encuentran cada una a 0,500 mm de un borde del sustrato (2510 y 2520) y a 16,000 mm (2511 y 2521) del origen.

En la figura 25E se muestra una sección transversal del sustrato, donde la longitud total de un agrupamiento indicada por 2523, es de 0,430 mm.

En la figura 25F se muestra otra vista del sustrato, que muestra la disposición de los 108 grupos y la posición de un marcador. El marcador se encuentra a 1,5 mm (2603) de un borde del sustrato. El marcador está localizado a una

distancia entre 4,0 mm (2602) y 9,0 mm (2601), medida desde el origen.

#### **EJEMPLO 4: Nanorreactor.**

5 Se fabricó un nanorreactor de acuerdo con los métodos y composiciones de la divulgación como se muestra en las figuras 26B y 26C. En la figura 26A se muestra una sección transversal del nanorreactor. El nanorreactor comprende 108 pocillos. La figura 26D es una vista de soporte de un nanorreactor. La figura 26E es otra vista del nanorreactor que se muestra en la figura 26B, donde se visualiza la posición de un marcador.

10 Como se muestra en la figura 26B, los 108 pocillos están dispuestos en filas para formar un patrón cuadrado, donde los pocillos individuales están elevados en la base del nanorreactor. Como se muestra en 2711, la distancia entre los centros de dos pocillos en una fila de pocillos es de 1,69334 mm. La sección transversal del interior de un pocillo, como se muestra en 2721, es 1,15 mm. La sección transversal de un pocillo, incluyendo el borde del pocillo, como se muestra en 2720, es de 1,450 mm. La altura de un pocillo en un nanorreactor, como se muestra en 2702, es de 0,450 mm. La altura total de un nanorreactor, como se muestra en 2701, es de 0,725 mm.

Los pocillos en la figura 26B están dispuestos de una manera que facilita el suministro desde un dispositivo microfluídico que tiene 108 pocillos, como se ejemplifica en la figura 26, en los 108 pocillos de reacción del nanorreactor.

20 La anchura del nanorreactor a lo largo de una dimensión, como se indica en 2703, es de 24,000 mm. La anchura del nanorreactor a lo largo de otra dimensión, como se indica en 2704, es de 24,000 mm.

El nanorreactor, como se muestra en la figura 26B, comprende 108 pocillos. Los pocillos están dispuestos en filas formando un cuadrado. La distancia más lejana desde el centro de un pocillo hasta el origen en una dimensión, como se indica en 2706, es de 20,467 mm. La distancia más lejana desde el centro de un pocillo hasta el origen en otra dimensión, como se indica en 2705, es de 19,620 mm. La distancia más cercana desde el centro de un pocillo al origen en una dimensión, como se muestra en 2710, es de 3,533 mm. La distancia más cercana desde el centro de un pocillo al origen en otra dimensión, como se muestra en 2709, es de 4,380 mm. La distancia entre los centros de dos pocillos en la misma fila, como se muestra en 2711 y 2712 es de 1,69334 mm. La distancia desde el centro de un pocillo hasta el borde de un nanorreactor en una dimensión, como se muestra en 2707, es de 3,387 mm. La distancia desde el centro de un pocillo hasta el borde de un nanorreactor en otra dimensión, como se muestra en 2708, es de 2,540 mm.

El nanorreactor comprende 3 marcas de referencia en el lado del dispositivo para facilitar el alineamiento del nanorreactor con otros componentes de un sistema, por ejemplo, un dispositivo microfluídico como se describe en el ejemplo 3. Una primera marca de referencia se encuentra cerca del origen, donde la marca de referencia está más cerca del origen que cualquier otro pocillo. La primera marca de referencia se encuentra a 1,840 mm del origen en una dimensión (2717) y a 2,687 mm del origen en otra dimensión (2716). La primera marca de referencia está localizada a 1,6933 mm de un pocillo en una dimensión (2719) y 1,6934 mm del mismo pocillo en otra dimensión (2718). Otras dos marcas de referencia están localizadas cada una a 0,500 mm de un borde del nanorreactor (2714 y 2715) y a 12,000 mm (2713) del origen.

El nanorreactor comprende 4 marcas de referencia en el lado del soporte, como se muestra en la figura 26D. La distancia desde el centro o una marca de referencia y la esquina más cercana del nanorreactor en una dimensión es de 1,000 mm (2722 y 2723). La longitud de una marca de referencia en una dimensión es 1,000 mm (2724 y 2725). La anchura de una marca de referencia, como se muestra en 2726, es de 0,050 mm.

En la figura 26E se muestra otra vista del nanorreactor, que muestra la disposición de los 108 pocillos y la posición de un marcador. El marcador está localizado a 1,5 mm (2728) de un borde del nanorreactor. El marcador está localizado a 1,0 mm (2727) de una esquina del nanorreactor. El marcador tiene 9,0 mm (2726) de longitud.

#### **EJEMPLO 5: Fabricación de un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos**

Se grabó una oblea de silicio sobre aislante (SOI) con una capa de dispositivo de aproximadamente 30 um de espesor y una capa de soporte de aproximadamente 400 um de espesor que intercalaban una capa de aislante eléctrico de dióxido de silicio para crear el sustrato ejemplar descrito en el ejemplo 3 que comprende una pluralidad de características que tienen conexiones microfluídicas tridimensionales, utilizando un método de procesamiento frontal como se ilustra en la figura 28. La figura 27 ilustra en detalle las características de diseño del dispositivo. La oblea de SOI se oxidó para cubrirla con óxido térmico en ambas superficies (figura 28A). Se aplicó fotolitografía en el lado del dispositivo para crear una máscara de fotoprotector (rojo) como se muestra en la figura 28B. Se utilizó una etapa de grabado iónico reactivo profundo (DRIE) para grabar las paredes laterales verticales a una profundidad de aproximadamente 30 um hasta la capa de óxido SOI (figura 28C) en localizaciones desprovistas de fotoprotector. El material fotoprotector se eliminó usando un proceso convencional de extracción de protector conocido en la técnica.

65 Se repitieron la fotolitografía, DRIE, y la extracción de fotoprotector en el lado de soporte (figuras 28E-G) para generar el patrón deseado de acuerdo con el dispositivo descrito en el ejemplo 3. El óxido enterrado (BOX) se eliminó mediante

un proceso de grabado en húmedo (figura 28G). Los fluoropolímeros contaminantes que podían haberse depositado en las paredes laterales de las características microfluídicas se eliminaron mediante oxidación térmica. La oxidación térmica se eliminó mediante un proceso de grabado en húmedo.

5 Las obleas de SOI grabadas se sometieron a las etapas de procesamiento descritos en la figura 29.

En primer lugar, la oblea se limpió mediante una etapa de limpieza en húmedo con una solución piraña seguida de una exposición a plasma de O<sub>2</sub> en seco. La capa de dispositivo (en la parte superior en la figura 29B) del chip se recubrió con fotoprotector en un proceso gobernado por absorción al interior de los canales de la capa de dispositivo  
10 que tienen aproximadamente 20 µm de anchura. Se creó un patrón para el fotoprotector mediante fotolitografía para exponer las áreas que se desea que sean pasivas (sin síntesis de oligonucleótidos en el futuro). Este proceso funciona exponiendo el protector a la luz a través de una máscara binaria que tiene el patrón de interés. Después de la exposición, se eliminó el protector de las regiones expuestas en solución de revelado. (Figura 29C).

15 Las superficies sin fotoprotector se expusieron a un gas de fluorosilano mediante deposición química en fase de vapor (CVD). Esto da como resultado la deposición de un fluorocarburo en las superficies sin fotoprotector. En aplicaciones alternativas, para esta etapa se utiliza un silano de hidrocarburo. Las superficies silanizadas no responden a las capas adicionales de silano creando una monocapa en la superficie. A continuación, se disolvió el fotoprotector en disolvente orgánico, dejando fluoración en la superficie y exponiendo el silicio/dióxido de silicio que estaba debajo del  
20 fotoprotector. Se realizó una etapa final de funcionalización activa para preparar la superficie para el crecimiento de oligonucleótidos (figura 29F).

Se consiguió una densidad de superficie controlada de grupos hidroxilo (figura 30) en la superficie mediante un proceso húmedo utilizando una solución al 1 % de N-(3-TRIETOXISILILPROPILO-4-HIDROXIBUTIRAMIDA en etanol y ácido acético durante 4 horas, seguido de la colocación de los chips en una placa caliente a 150 °C durante 14 horas. En  
25 aplicaciones alternativas, se realiza un proceso CVD mediante el suministro de silano a la superficie en estado gaseoso y la aplicación de una presión de deposición controlada de aproximadamente 200 mTor y una temperatura controlada de aproximadamente 150 °C. El proceso CVD permite la limpieza con plasma in situ y es muy adecuado para producir monocapas autoensambladas (SAM) ordenadas.

30 La figura 31 muestra una imagen de un dispositivo fabricado de acuerdo con los métodos anteriores.

#### **EJEMPLO 6. Fabricación de un dispositivo nanorreactor.**

35 Se fabricó un chip de nanorreactor con nanopocillos como se describe en la figura 32. Se oxidó una oblea de silicio de tamaño adecuado para cubrirla con óxido térmico en ambas superficies (figura 33A).

Se aplicó fotolitografía en el lado posterior para crear una máscara de fotoprotector (rojo) como se muestra en la figura 33B. El lado posterior se grabó en localizaciones desprovistas de fotoprotector, más allá de la capa de óxido térmico,  
40 creando pocillos poco profundos (figura 33C). El material fotoprotector se eliminó usando un proceso convencional de extracción de protector conocido en la técnica (figura 33D).

La etapa de fotolitografía se repitió en el lado frontal de acuerdo con el patrón de la figura 33E. Se utilizó una etapa de grabado iónico reactivo profundo (DRIE) para grabar las paredes laterales verticales a una profundidad de  
45 aproximadamente 450 µm utilizando un grabado cronometrado. En otros casos, se utiliza una oblea de SOI y la capa de soporte se graba hasta la capa BOX, en donde la capa BOX puede servir como un tope de grabado. (Figura 33F). Se eliminó el fotoprotector en la parte frontal (figura 33G), generando el patrón deseado de acuerdo con el dispositivo descrito en la figura 32. Los fluoropolímeros contaminantes que pueden haberse depositado en las paredes laterales de las características microfluídicas se eliminaron mediante oxidación térmica y la oxidación térmica se eliminó  
50 mediante un proceso de grabado en húmedo (figura 33H).

A continuación, la oblea se limpió mediante una etapa de limpieza en húmedo con una solución piraña seguida de una exposición a plasma de O<sub>2</sub> en seco (figura 34A). A continuación, se depositó fotoprotector en pocillos individuales utilizando un sistema de deposición de microgotas (arriba, en la figura 34B). Las superficies sin protector se expusieron  
55 a un gas de fluorosilano mediante deposición química en fase de vapor (CVD; figura 34C). Esto da como resultado la deposición de un fluorocarburo en las superficies sin protector. En aplicaciones alternativas, para esta etapa se usa un silano de hidrocarburo u otros tipos de silanos. Las superficies silanizadas no responden a las capas adicionales de silano creando una monocapa en la superficie. A continuación, se disolvió el protector en disolvente orgánico, dejando fluoración en la superficie y exponiendo la superficie de silicio que estaba debajo del protector.

60 La figura 35A-B ilustra los nanopocillos en un dispositivo nanorreactor fabricado como se describe.

#### **EJEMPLO 7 - Síntesis de una secuencia de 50 unidades en un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos 2D**

65 Un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos bidimensional se ensambló en una celda de flujo, que se conectó a una celda de flujo (Applied Biosystems (ABI394 DNA Synthesizer)). El dispositivo de síntesis de oligonucleótidos

bidimensional se funcionalizó uniformemente con N-(3-TRIETOXISILILPROPILO)-4-HIDROXIBUTIRAMIDA (Gelest, [shop.gelest.com/Product.aspx?catnum=SIT8189\\_5&Index=0&TotalCount=1](http://shop.gelest.com/Product.aspx?catnum=SIT8189_5&Index=0&TotalCount=1)) y se usó para sintetizar un oligonucleótido ejemplar de 50 pb ("oligonucleótido de 50 unidades") usando métodos de síntesis de oligonucleótidos descritos en el presente documento.

5

La secuencia de oligonucleótido de 50 unidades fue como se describe en la SEQ ID NO.: 1.

5'AGACAATCAACCATTGGGGTGGACAGCCTTGACCTCTAGACTTCGGCA T##TTTTTTTTTTT3' (SEQ ID NO.: 1), donde # indica Timidina-succinil hexamida CED fosforamidita (CLP-2244 de ChemGenes), que es un enlazador escindible que permite la liberación de oligos de la superficie durante la desprotección.

10

La síntesis se realizó utilizando la química de síntesis de ADN convencional (acoplamiento, tapado, oxidación y desbloqueo) según el protocolo de la Tabla 3 y un sintetizador ABI.

15

**Tabla 3:**

Nombre general del proceso de síntesis de ADN	Tabla 3	
	Etapas de proceso	Tiempo (segundos)
<b>LAVADO</b> (Flujo de lavado de acetonitrilo)	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Acetonitrilo a celda de flujo	23
	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
<b>ADICIÓN DE BASE DE ADN</b> (Flujo de fosforamidita + activador)	Enjuague del colector activador	2
	Activador a celda de flujo	6
	Activador + fosforamidita a celda de flujo	6
	Activador a celda de flujo	0,5
	Activador + fosforamidita a celda de flujo	5
	Activador a celda de flujo	0,5
	Activador + fosforamidita a celda de flujo	5
	Activador a celda de flujo	0,5
	Activador + fosforamidita a celda de flujo	5
	Incubar durante 25 segundos	25
<b>LAVADO</b> (Flujo de lavado de acetonitrilo)	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Acetonitrilo a celda de flujo	15
	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
<b>ADICIÓN DE BASE DE ADN</b> (Flujo de fosforamidita + activador)	Enjuague del colector activador	2
	Activador a celda de flujo	5
	Activador + fosforamidita a celda de flujo	18
	Incubar durante 25 segundos	25
<b>LAVADO</b> (Flujo de lavado de acetonitrilo)	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Acetonitrilo a celda de flujo	15
	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4

(continuación)

Nombre general del proceso de síntesis de ADN	Tabla 3	
	Etapa de proceso	Tiempo (segundos)
<b>TAPADO</b> (CapA+B, 1:1, flujo)	CapA+B a celda de flujo	15
<b>LAVADO</b> (Flujo de lavado de acetonitrilo)	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Acetonitrilo a celda de flujo	15
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
<b>OXIDACIÓN</b> (Flujo de oxidante)	Oxidante a celda de flujo	18
<b>LAVADO</b> (Flujo de lavado de acetonitrilo)	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Acetonitrilo a celda de flujo	15
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Acetonitrilo a celda de flujo	15
	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Acetonitrilo a celda de flujo	23
	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
<b>DESBLOQUEO</b> (Flujo de desbloqueo)	Desbloqueo a celda de flujo	36
<b>LAVADO</b> (Flujo de lavado de acetonitrilo)	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Acetonitrilo a celda de flujo	18
	Enjuague con sistema N2	4,13
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4,13
Acetonitrilo a celda de flujo	15	

La combinación de fosforamidita/activador se suministró de manera similar al suministro de reactivos a granel a través de la celda de flujo. No se realizaron etapas de secado ya que el ambiente permanece "húmedo" con el reactivo todo el tiempo.

5

El limitador de flujo se retiró del sintetizador ABI 394 para permitir un flujo más rápido. Sin limitador de flujo, los caudales para las amiditas (0,1 M en ACN), el activador, (Benzoiltiotetrazol 0,25 M ("BTT"; 30-3070-xx de GlenResearch) en ACN) y Ox (0,02 M 12 en 20 % de piridina, 10 % de agua y 70 % de THF) fueron de aproximadamente ~ 100 uL/s, para el acetonitrilo ("ACN") y los reactivos de tapado (mezcla 1:1 de CapA y CapB, donde CapA es anhídrido acético en THF/Piridina y CapB es 16 % de 1-metilimidazol en THF), de aproximadamente ~ 200 uL/seg y para el desbloqueante (3 % de ácido dicloroacético en tolueno), de aproximadamente ~ 300 ul/seg (comparado con ~ 50 ul/seg para todos los reactivos con limitador de flujo).

10

Se observó el tiempo para expulsar completamente el oxidante, se ajustaron los tiempos de flujo de los productos químicos en consecuencia y se introdujo un lavado adicional de ACN entre los diferentes productos químicos.

15

Después de la síntesis de oligonucleótidos, el chip se desprotegió en amoniaco gaseoso durante la noche a 75 psi. Se aplicaron cinco gotas de agua a la superficie para recuperar los oligos (figura 45A). A continuación, los oligos recuperados se analizaron en un chip de ARN pequeño BioAnalyzer (figura 45B).

20

**EJEMPLO 8: Síntesis de una secuencia de 100 unidades en un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos 2D**

Se usó el mismo proceso que se describe en el ejemplo 7 para la síntesis de la secuencia de 50 unidades para la síntesis de un oligonucleótido de 100 unidades ("oligonucleótido de 100 unidades"; 5' CGGGATCCTTATCGTCATCGTCGTACAGATCCCGACCCATTTGCTGTCCACCAGTCA TGCTAGCCATACCATGATGATGATGATGATGAGAACCCCGCAT##TTTTTTTTTT3', donde # denota timidina-succinil hexamida CED fosforamidita (CLP-2244 de ChemGenes); SEQ ID NO.: 2) en dos chips de silicio diferentes, el primero funcionalizado uniformemente con N- (3-TRIETOXISILILPROPI)-4-HIDROXIBUTIRAMIDA y el segundo funcionalizado con una mezcla 5/95 de 11-acetoxiundeciltrióxosilano y n-deciltrióxosilano, y los oligos extraídos de la superficie se analizaron en un instrumento BioAnalyzer (figura 46).

Las diez muestras de los dos chips se amplificaron posteriormente mediante PCR utilizando un cebador directo (5'ATGCGGGGTTCTCATCATC3'; SEQ ID NO.: 3) y un cebador inverso (5'CGGGATCCTTATCGTCATCG3'; SEQ ID NO.: 4) en una mezcla de PCR de 50 uL (25 uL de mezcla maestra NEB Q5, 2,5 uL de cebador directo 10 uM, 2,5 uL de cebador inverso 10 uM, 1 uL de oligo extraído de la superficie y agua hasta 50 uL) usando el siguiente programa de termociclado:

98 C, 30 s  
 98 C, 10 s; 63C, 10 s; 72C, 10 s; repetir 12 ciclos  
 72C, 2 minutos

Los productos de PCR también se procesaron en un BioAnalyzer (figura 47), demostrando picos afilados en la posición de 100 unidades.

A continuación, las muestras amplificadas por PCR se clonaron y secuenciaron por el método de Sanger. La Tabla 4 resume los resultados de la secuenciación de Sanger para las muestras tomadas de los puntos 1-5 del chip 1 y para las muestras tomadas de los puntos 6-10 del chip 2.

**Tabla 4:**

Punto	Tasa de error	Eficacia del ciclo
1	1/763 pb	99,87 %
2	1/824 pb	99,88 %
3	1/780 pb	99,87 %
4	1/429 pb	99,77 %
5	1/1525 pb	99,93 %
6	1/1615 pb	99,94 %
7	1/531 pb	99,81 %
8	1/1769 pb	99,94 %
9	1/854 pb	99,88 %
10	1/1451 pb	99,93 %

Por lo tanto, la alta calidad y uniformidad de los oligonucleótidos sintetizados se repitieron en dos chips con diferentes químicas de superficie. En general, el 89 %, correspondiente a 233 de los 262 oligonucleótidos de 100 unidades que se secuenciaron fueron secuencias perfectas sin errores.

Las figuras 48 y 49 muestran mapas de alineamiento para muestras tomadas de los puntos 8 y 7, respectivamente, donde "x" denota una deleción de una sola base, "asterisco" denota una mutación de una sola base y "+" denota manchas de baja calidad según la secuenciación de Sanger. Las secuencias alineadas en la figura 48 conjuntamente representan una tasa de error de aproximadamente el 97 %, donde 28 de 29 lecturas corresponden a secuencias perfectas. Las secuencias alineadas en la figura 49 conjuntamente representan una tasa de error de aproximadamente el 81 %, donde 22 de 27 lecturas corresponden a secuencias perfectas.

Finalmente, La Tabla 5 resume las características de error clave para las secuencias obtenidas de las muestras de oligonucleótidos de los puntos 1-10.

Tabla 5:

ID de Muestra/Punto N.º	OSA_0046/1	OSA_0047/2	OSA_0048/3	OSA_0049/4	OSA_0050/5	OSA_0051/6	OSA_0052/7	OSA_0053/8	OSA_0054/9	OSA_0055/10
Secuencias Totales	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
Calidad de Secuenciación	25 de 28	27 de 27	26 de 30	21 de 23	25 de 26	29 de 30	27 de 31	29 de 31	28 de 29	25 de 28
Calidad de Oligo	23 de 25	25 de 27	22 de 26	18 de 21	24 de 25	25 de 29	22 de 27	28 de 29	26 de 28	20 de 25
Recuento de Coincidencias de ROI	2500	2698	2561	2122	2499	2666	2625	2899	2798	2348
Mutación de ROI	2	2	1	3	1	0	2	1	2	1
Delección de Múltiples Bases de ROI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inserción Pequeña de ROI	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Delección de Base Única de ROI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cantidad de Delecciones Grandes	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
Mutación: G>A	2	2	1	2	1	0	2	1	2	1
Mutación: T>C	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Recuento de Errores de ROI	3	2	2	3	1	1	3	1	2	1
Tasa de error de ROI	Err: ~ 1 en 834	Err: ~ 1 en 1350	Err: ~ 1 en 1282	Err: ~ 1 en 708	Err: ~ 1 en 2500	Err: ~ 1 en 2667	Err: ~ 1 en 876	Err: ~ 1 en 2900	Err: ~ 1 en 1400	Err: ~ 1 en 2349
Tasa de Error Cebador Negativo de ROI	MP Err: ~ 1 en 763	MP Err: ~ 1 en 824	MP Err: ~ 1 en 780	MP Err: ~ 1 en 429	MP Err: ~ 1 en 1525	MP Err: ~ 1 en 1615	MP Err: ~ 1 en 531	MP Err: ~ 1 en 1769	MP Err: ~ 1 en 854	MP Err: ~ 1 en 1451

**EJEMPLO 9: Síntesis de una secuencia de 100 unidades en un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos 3D**

Un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos tridimensional como se describe en el Ejemplo 3 que se funcionalizó diferencialmente con una mezcla 5/95 de 11-acetoxiundeciltrióxosilano y n-deciltrióxosilano en áreas activas para síntesis se ensambló en una celda de flujo para sintetizar el oligonucleótido de 100 unidades del ejemplo 8 usando métodos de síntesis de oligonucleótidos descritos en el presente documento. La síntesis se realizó utilizando la química de síntesis de ADN convencional (acoplamiento, tapado, oxidación y desbloqueo) como se describe en el ejemplo 7, según el protocolo de la Tabla 3. El chip se desprotegió en amoníaco gaseoso, a 75 psi, durante una noche y los oligos se eluyeron en 500 uL de agua. Después de la evaporación, todos los oligos se resuspendieron en 20 uL de agua para el análisis posterior. La muestra resuspendida se analizó en un instrumento BioAnalyzer (figura 50A).

Las diez muestras de los dos chips se amplificaron posteriormente mediante PCR utilizando un cebador directo (5'ATGCGGGGTTCTCATCATC3'; SEQ ID NO.: 5) y un cebador inverso (5'CGGGATCCTTATCGTCATCG3'; SEQ ID NO.: 6) en una mezcla de PCR de 50 uL que incluía 25 uL de mezcla maestra NEB Q5, 2,5 uL de cebador directo 10 uM, 2,5 uL de cebador inverso 10 uM, 1 uL de oligo extraído de la superficie y agua hasta 50 uL, de acuerdo con el siguiente programa de termociclado:

1 ciclo: 98C, 30 s

12 ciclos: 98C, 10 s; 63C, 10 s; 72C, 10 s

1 ciclo: 72C, 2 minutos

El producto de PCR también se procesó en el BioAnalyzer (figura 50B) mostrando un pico afilado en la posición de 100 unidades.

El resultado de la secuenciación de los productos de la PCR mostró que 23 de las 29 secuencias eran perfectas y la tasa de error era de ~ 1 en 600 pb, como se ilustra en los mapas de alineamiento en la figura 51, donde "x" denota una delección de una sola base, "asterisco" denota una mutación de una sola base y "+" denota manchas de baja calidad según la secuenciación de Sanger.

**EJEMPLO 10: Síntesis de oligonucleótidos en paralelo en un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos microfluídicos tridimensional**

El protocolo de síntesis del EJEMPLO 7 se modifica usando una configuración interna para realizar la síntesis de oligonucleótidos en paralelo en el dispositivo microfluídico tridimensional del EJEMPLO 9.

La Tabla 6 ilustra una comparación por pares de los dos protocolos.

**Tabla 6:**

Nombre general del proceso de síntesis de ADN	EJEMPLO 7 Protocolo		Protocolo de sintetizador interno Twist	
	EJEMPLO 7 Etapa del proceso	Tiempo (segundos)	Etapa del proceso Twist	Tiempo (segundos)
LAVADO (Flujo de lavado de acetonitrilo)	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4	NA	
	Acetonitrilo a celda de flujo	23		
	Enjuague con sistema N2	4		
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4		

(continuación)

Nombre general del proceso de síntesis de ADN	EJEMPLO 7 Protocolo		Protocolo de sintetizador interno Twist	
	EJEMPLO 7 Etapa del proceso	Tiempo (segundos)	Etapa del proceso Twist	Tiempo (segundos)
<b>ADICIÓN DE BASE DE ADN</b> (Flujo de fosforamidita + activador)	Enjuague del colector activador	2	Los cabezales de impresión imprimen 1:1 de activador + fosforamidita directamente en los sitios activos del chip	120
	Activador a celda de flujo	6		
	Activador + fosforamidita a celda de flujo	6		
	Activador a celda de flujo	0,5		
	Activador + fosforamidita a celda de flujo	5		
	Activador a celda de flujo	0,5		
	Activador + fosforamidita a celda de flujo	5		
	Activador a celda de flujo	0,5		
	Activador + fosforamidita a celda de flujo	5		
	Incubar durante 25 segundos	25		
<b>LAVADO</b> (Flujo de lavado de acetonitrilo)	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4		
	Acetonitrilo a celda de flujo	15		
	Enjuague con sistema N2	4		
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4		
<b>ADICIÓN DE BASE DE ADN</b> (Flujo de fosforamidita + activador)	Enjuague del colector activador	2		
	Activador a celda de flujo	5		
	Activador + fosforamidita a celda de flujo	18		
	Incubar durante 25 segundos	25		
<b>LAVADO</b> (Flujo de lavado de acetonitrilo)	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Acetonitrilo a celda de flujo	15	Acetonitrilo a celda de flujo	15
	Enjuague con sistema N2	4	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4

(continuación)

Nombre general del proceso de síntesis de ADN	EJEMPLO 7 Protocolo		Protocolo de sintetizador interno Twist	
	EJEMPLO 7 Etapa del proceso	Tiempo (segundos)	Etapa del proceso Twist	Tiempo (segundos)
<b>TAPADO</b> (CapA+B, 1:1, flujo)	CapA+B a celda de flujo	15	CapA+B a celda de flujo	15
<b>LAVADO</b> (Flujo de lavado de acetoniitrilo)	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4
	Acetoniitrilo a celda de flujo	15	Acetoniitrilo a celda de flujo	15
	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4
<b>OXIDACIÓN</b> (Flujo de oxidante)	Oxidante a celda de flujo	18	Oxidante a celda de flujo	18
<b>LAVADO</b> (Flujo de lavado de acetoniitrilo)	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4
	Enjuague con sistema N2	4	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4
	Acetoniitrilo a celda de flujo	15	Acetoniitrilo a celda de flujo	15
	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4
	Acetoniitrilo a celda de flujo	15	Acetoniitrilo a celda de flujo	15
	Enjuague con sistema N2	4	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4
	Acetoniitrilo a celda de flujo	23	Acetoniitrilo a celda de flujo	23
	Enjuague con sistema N2	4	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4
<b>DESBLOQUEO</b> (Flujo de desbloqueo)	Desbloqueo a celda de flujo	36	Desbloqueo a celda de flujo	36
<b>LAVADO</b> (Flujo de lavado de acetoniitrilo)	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4
	Enjuague con sistema N2	4	Enjuague con sistema N2	4
	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4	Enjuague con sistema de acetoniitrilo	4
	Acetoniitrilo a celda de flujo	18	Acetoniitrilo a celda de flujo	18
	Enjuague con sistema N2	4	Enjuague con sistema N2	4

(continuación)

Nombre general del proceso de síntesis de ADN	EJEMPLO 7 Protocolo		Protocolo de sintetizador interno Twist	
	EJEMPLO 7 Etapa del proceso	Tiempo (segundos)	Etapa del proceso Twist	Tiempo (segundos)
	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4	Enjuague con sistema de acetonitrilo	4
	Acetonitrilo a celda de flujo	15	Acetonitrilo a celda de flujo	15
<b>SECADO DE CELDA de FLUJO</b> (Específico del sintetizador Twist)	NA		Enjuague con sistema N2	4
			N2 a celda de flujo	19,5
			Enjuague con sistema N2	4
			Secado al vacío en celda de flujo	10
			Enjuague con sistema N2	4
			N2 a celda de flujo	19,5

El acetonitrilo (ACN) se pasa a través de un desgasificador en línea (modelo N.º 403-0202-1; Random Technologies), pasando el líquido a lo largo de una membrana muy hidrófoba, que anteriormente se había demostrado que funciona a caudales que varían de 50 a 400 uL/seg y elimina las burbujas de gas que se forman en una celda de flujo, sin desear quedar ligado a teoría alguna, probablemente disolviéndolas en el disolvente infrasaturado.

Los reactivos se intercambian en la celda de flujo con diferentes reactivos de la siguiente manera:

1) Iniciar el flujo de reactivo a la celda de flujo.

2) Cebiar ajustando las válvulas para "empujar" el reactivo anterior fuera de la línea de suministro con el nuevo reactivo. Este estado de la válvula se mantiene durante 3,75 segundos.

3) Estado de la válvula 2D: configurar las válvulas para reemplazar el reactivo anterior residente en la superficie de la celda de flujo con el nuevo reactivo. Esto tiene lugar mientras la etapa 2 ha estado activa durante 3,75 segundos. Las etapas 2 y 3 están activas simultáneamente durante 0,25 segundos, después de lo cual se apaga el estado de la válvula de cebado.

4) Estado de la válvula 3D: las válvulas cambian para permitir que los reactivos fluyan a través de las características microfluídicas tridimensionales del silicio en la celda de flujo, que comienza después de que hayan transcurrido 0,75 segundos del estado de la válvula 2D en la etapa 3.

5) El flujo de reactivo: el estado de la válvula 2D y los estados de la válvula 3D permanecen abiertos durante un tiempo designado para permitir la dosificación adecuada de reactivo a la superficie de silicio en el chip.

Por consiguiente, durante un ciclo de 5 segundos de intercambio de reactivos, el suministro de fluido se realiza mediante cebado durante el período inicial que abarca de 0 a 4 segundos, encendido del estado de la válvula 2D durante el período que abarca los 3,75-5 segundos y encendido del estado de la válvula 3D durante el período que abarca los 4,5-5 segundos.

La combinación de fosoramidita/activador se suministra mediante una etapa de impresión por inyección de tinta. El suministro puede ser una deposición 1:1, gota a gota, sobre la superficie de silicio. El tamaño de la gotícula puede ser de aproximadamente 10 pL. En algunos ejemplos, el tamaño de la gotícula es de al menos o al menos aproximadamente 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 picolitros, o más. En algunos ejemplos, el tamaño de la gotícula es de como máximo o como máximo aproximadamente 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1 picolitros, o menos. El tamaño de la gotícula puede estar entre 0,1-50, 1-150 o 5-75 picolitros. El tamaño de la gotícula puede estar dentro de un intervalo que está limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo, 2-50 picolitros. Las gotículas se pueden depositar con una velocidad inicial de 1-100 m/seg. En algunos casos, las gotículas se pueden depositar con una velocidad inicial de al menos o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 40, 35, 40, 45, 50, 75, 100 m/seg o más. En algunos casos, las gotículas pueden depositarse con una velocidad inicial de como máximo o como máximo aproximadamente 100, 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, m/seg o menos. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 40, 35, 40, 45, 50, 75, 100 o más. Las gotículas pueden depositarse con una velocidad inicial que está comprendida entre aproximadamente 1-50 m/seg, 5-15 m/seg, 5-30 m/seg o 1-30 m/seg. Los expertos en la materia comprenderán que las gotículas pueden depositarse con una velocidad inicial que está por debajo de un intervalo limitado por cualquiera de estos valores.

Una etapa de secado prepara la superficie de silicio para las etapas de impresión después de las secuencias de reactivos a granel. Para conseguir condiciones secas que faciliten la reacción de los reactivos impresos, la celda de flujo se lava con gas N<sub>2</sub> a aproximadamente 5 PSI durante aproximadamente 19,5 segundos, se aplica un pequeño vacío en la cámara de la celda de flujo durante 10 segundos, y la celda de flujo se lava de nuevo con gas N<sub>2</sub> durante otros 19,5 segundos. Todos los reactivos fluyen a aproximadamente 200-400 uL/seg

Los caudales se pueden controlar en el sistema interno utilizando diferentes presiones. El caudal es uno de los aspectos limitantes de los sintetizadores disponibles comercialmente. En la configuración de la máquina interna, los caudales pueden coincidir con sus valores en el Ejemplo 7 o con caudales aumentados o disminuidos, según sea apropiado, para mejorar el proceso de síntesis. Generalmente, un flujo más rápido presenta ventajas, ya que permite desplazar las burbujas de manera mucho más eficaz y permite un mayor intercambio de nuevos reactivos a la superficie durante un intervalo de tiempo dado en comparación con los caudales más lentos.

#### **EJEMPLO 11: Transferencia de oligonucleótidos basada en secante desde un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos a un dispositivo nanorreactor**

Se sintetizaron oligonucleótidos de 50 unidades en un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos 3-D como se describe en el Ejemplo 9. No se aplicó funcionalización activa. La figura 53A-B ilustra la distribución del canal de síntesis de oligonucleótidos en un grupo en el lado de dispositivo del dispositivo de síntesis de oligonucleótidos y la figura 53C ilustra la funcionalización de la superficie. Los oligonucleótidos se liberaron de la superficie mediante tratamiento en una cámara de amoniaco gaseoso a 75 psi durante 14 horas.

Los pocillos de un dispositivo nanorreactor que se fabricó de acuerdo con el ejemplo 4 con paredes internas hidrófilas y bordes superiores hidrófobos (figura 54) se llenaron primero con un tampón adecuado para PCA como control negativo (tampón Q5 5X; New England Biolabs). Se pipetearon manualmente alícuotas de 200-300 nL para introducirlas en un BioAnalyzer para mostrar la ausencia de ácidos nucleicos contaminantes en los nanorreactores individuales (figura 55).

A continuación, los nanorreactores se llenaron con aproximadamente 650 nL de tampón PCA formando un menisco que sobresalía ligeramente (figura 53). El dispositivo nanorreactor se acopló con el dispositivo de oligonucleótidos para sumergir los canales de síntesis de oligonucleótidos ("revólver") con el tampón de PCA a una velocidad de aproximadamente 5 mm/seg. En otros casos, la velocidad de montaje para acoplar los dos dispositivos se puede variar como se describe en el presente documento, para conseguir, entre otras cosas, la transferencia de líquido más o menos eficaz entre los dispositivos que da lugar a una alícuota controlada de los volúmenes deseados de líquido o para controlar la evaporación. El dispositivo de oligonucleótidos y el nanorreactor se mantuvieron acoplados con un hueco de aproximadamente 50 um entre los dos dispositivos, durante aproximadamente 10 minutos, permitiendo que los oligonucleótidos se difundan al interior de la solución (figura 57). En algunos casos, el conjunto o el dispositivo de síntesis de oligonucleótidos solo se puede hacer vibrar u oscilar para facilitar una difusión más rápida. También pueden usarse tiempos de difusión superiores a 10 min, tales como al menos o al menos aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 min o más para facilitar un mayor rendimiento. El dispositivo nanorreactor se liberó del dispositivo de oligonucleótidos a una velocidad de aproximadamente 5 mm/seg, capturando los oligonucleótidos liberados en los nanorreactores individuales. En otros casos, la velocidad de desmontaje para acoplar los dos dispositivos se puede variar como se describe en el presente documento, para conseguir, entre otras cosas, la transferencia de líquido más o menos eficaz entre los dispositivos que da lugar a una alícuota controlada de los volúmenes deseados de líquido. Se observó que quedaba una pequeña cantidad de líquido sobre el dispositivo de oligonucleótidos.

Se extrajeron con pipeta muestras de aproximadamente 300 nL de varios nanorreactores individuales en el dispositivo nanorreactor y se diluyeron en un volumen de 1 uL, estableciendo una dilución 4,3X. Las muestras diluidas se procesaron individualmente en un BioAnalyzer estableciendo la liberación de los oligonucleótidos en los nanorreactores (figura 55).

Se tomaron muestras adicionales como control positivo usando una jeringa manual. Se utilizó un tubo Tygon para crear un sello estanco con el dispositivo de síntesis de oligonucleótidos. La jeringa, rellena con 500 ul de agua, se utilizó para descargar el líquido a través de un grupo completo, así como partes de grupos vecinos desde el lado de soporte. El líquido descargado se recogió en un tubo Eppendorf de 1,5 ml en el lado de dispositivo. La muestra se secó al vacío y luego se resuspendió en 10 uL de agua. Luego, la muestra se analizó de manera similar en un BioAnalyzer. Cuando se contabilizaron las tasas de dilución, se liberó una concentración comparable de oligonucleótidos utilizando el método de control positivo y el método de transferencia de nanorreactor.

#### **EJEMPLO 12: Transferencia de oligonucleótidos basada en inyección desde un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos a un nanorreactor**

Se sintetizan oligonucleótidos 50 unidades en un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos 3-D como se describe en el ejemplo 9. Los oligonucleótidos se liberan de la superficie mediante tratamiento en una cámara de amoniaco a aproximadamente 75 psi durante aproximadamente 14 horas. Como alternativa, se pueden usar presiones de 20-120

psi durante 1-48 horas o más para la liberación de los oligonucleótidos. La temperatura es la temperatura ambiente. En algunos casos, la tasa de desprotección puede incrementarse aumentando la temperatura, por ejemplo hasta al menos o al menos aproximadamente 25C, 30C, 35C, 40C, 45C, 50C, 55C, 60C, 65C o más. También se puede usar metilamina gaseosa para la desprotección a temperatura ambiente o a una temperatura elevada de al menos o al menos aproximadamente 25C, 30C, 35C, 40C, 45C, 50C, 55C, 60C, 65C o más. La desprotección en metilamina se produce típicamente más rápido que en amoníaco gaseoso.

El dispositivo de síntesis de oligonucleótidos se ensambla en una celda de flujo Hele Shaw con una sola entrada y una sola salida. El flujo se genera usando una jeringa que se conecta a la celda de flujo mediante un tubo Tygon y se controla manualmente (figura 57). La figura 56 ilustra un esquema de la fluidica en la celda de flujo. El circuito fluidico se usa para hacer fluir fluido desde el lado de soporte hacia el interior de los primeros canales (o vías) y el fluido se introduce adicionalmente en los segundos canales, por ejemplo, los que forman un patrón de revólver que comprende sitios de síntesis de oligonucleótidos. El fluido se suministra desde una entrada de un solo punto y se recoge desde una salida de un solo punto (figura 56B). En otros casos, se puede usar una fuente de línea y un sumidero de línea para pasar fluidos (figura 56A). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, es de esperar que las combinaciones de fuente/sumidero puntuales formen un frente de aire uniforme, que puede ser más eficaz para expulsar todo el líquido de la celda de flujo Hele-Shaw. Al limpiar el líquido de la celda de flujo, el líquido está contenido solo en las vías del lado de soporte y los segundos canales o canales de síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, en un patrón de revólver en el lado del dispositivo. Se estima que este volumen es de 300 nL por grupo de vías (o primeros canales). Tal contención de fluido puede facilitar la formación de gotículas sésiles uniformes en la superficie de la capa de dispositivo del dispositivo de síntesis de oligonucleótidos.

Para esta etapa, se selecciona un tampón de liberación adecuado, tal como un tampón compatible con PCA, para disolver los oligonucleótidos liberados en solución. Al llenar las vías y los segundos canales, el líquido se elimina de la celda de flujo Hele-shaw en la superficie de soporte del chip de síntesis de oligonucleótidos usando aproximadamente 500-1000 Pa, dejando líquido solo en la zona estancada (soporte y revólver) del dispositivo, que se estima en 300 nL por grupo de ensamblaje (figura 56C). La salida de un solo punto se bloquea y se hace volar aire presurizado sobre la superficie de la capa de soporte a aproximadamente 3000-5000 Pa para expulsar gotículas sobre la superficie de la capa de dispositivo (figura 56D). Se empuja suficiente tampón de liberación a través de la celda de flujo para formar gotas sésiles que emergen de los segundos canales (o canales de síntesis de oligonucleótidos) sobre la superficie del lado de dispositivo del dispositivo de síntesis de oligonucleótidos. El tamaño de la gota sésil puede ser de aproximadamente 300-400 nL, pero se puede variar hasta un tamaño adecuado según las dimensiones particulares de los grupos de síntesis de oligonucleótidos y/o los nanorreactores, así como según la concentración deseada de oligonucleótidos. Por ejemplo, se pueden formar gotas sésiles de aproximadamente 500 nL. La formación de gotas sésiles se controla opcionalmente con un microscopio para asegurarse de que la formación de gotas sea completa a través del dispositivo de síntesis de oligonucleótidos. En algunos casos, el líquido que forma las gotas sésiles se puede preparar a partir de una mezcla de componentes de modo que se consiga un ángulo de contacto deseado en la capa de dispositivo. Por consiguiente, la solución se puede complementar con un componente, tal como un detergente, por ejemplo, polisorbato 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán, también conocido como Tween-20).

Como alternativa, se deposita una cantidad adecuada de tampón de liberación en los pocillos/primeros canales individuales desde el lado del soporte y se empuja a través del canal de síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, aplicando presión desde el lado del soporte formando una celda de flujo Hele-shaw en el lado de soporte. Se monta un dispositivo nanorreactor contra el lado de dispositivo del dispositivo de síntesis de oligonucleótidos a una velocidad adecuada, por ejemplo, aproximadamente de 1-10 mm/s y una distancia, por ejemplo, de aproximadamente 50 um. El montaje se puede realizar rápidamente después de la formación de gotas para evitar la evaporación. La evaporación también es mínima una vez que los dos dispositivos (nanorreactor y reactor de síntesis de oligonucleótidos) están montados.

**EJEMPLO 13: Ensamblaje de genes en nanorreactores usando PCA de mezclas de reacción transferidas desde el lado de dispositivo de una síntesis de oligonucleótidos**

Se preparó una mezcla de reacción de PCA como se describe en la Tabla 7 usando las SEQ ID NO: 7-66 de la Tabla 8, para ensamblar el gen LacZ de 3075 pb (SEQ ID NO.: 67; Tabla 8).

**Tabla 7:**

	PCA	1 (x100 ul)	conc final.
	H2O	62,00	
	Tampón Q5 5x	20,00	1x
	dNTP 10 mM	1,00	100 uM
	BSA 20 mg/ml	5,00	1 mg/ml
	Mezcla de oligo 50 nM cada una	10,00	5 nM
	Q5 pol 2U/ul	2,00	2 u/50 ul

Tabla 8:

Nombre de la secuencia	Secuencia
Oligo_1, SEQ ID NO.: 7	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAAC GTCGTGACTGGGAAAACCTGG3'
Oligo_2, SEQ ID NO.: 8	5'GCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTA AGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'
Oligo_3, SEQ ID NO.: 9	5'CCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGC ACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC3'
Oligo_4, SEQ ID NO.: 10	5'CGGCACCGCTTCTGGTGCCGAAACCAGGCAAAGCGCC ATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGA3'
Oligo_5, SEQ ID NO.: 11	5'CACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGAT CTTCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTC3'
Oligo_6, SEQ ID NO.: 12	5'GATAGGTCACGTTGGTGTAGATGGGCGCATCGTAACCGT GCATCTGCCAGTTTGAGGGGACGACGACAGTATCGG3'
Oligo_7, SEQ ID NO.: 13	5'CCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATC CGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGTTG3'
Oligo_8, SEQ ID NO.: 14	5'GTCTGGCCTTCCTGTAGCCAGCTTTCATCAACATTAATG TGAGCGAGTAACAACCCGTCGGATTCTCCGTG3'
Oligo_9, SEQ ID NO.: 15	5'GCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATG GCGTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGG3'
Oligo_10, SEQ ID NO.: 16	5'CAGGTCAAATTCAGACGGCAAACGACTGTCCTGGCCGTA ACCGACCCAGCGCCCGTTGCACCACAGATGAAACG3'
Oligo_11, SEQ ID NO.: 17	5'CGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGGC CCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTG3'
Oligo_12, SEQ ID NO.: 18	5'GCCGCTCATCCGCCACATATCCTGATCTTCCAGATAACTG CCGTCACTCCAGCGCAGCACCATCACCGCGAG3'
Oligo_13, SEQ ID NO.: 19	5'AGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTC GTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTC3'
Oligo_14, SEQ ID NO.: 20	5'CTCCAGTACAGCGCGGCTGAAATCATCATTAAAGCGAGT GGCAACATGGAATCGCTGATTTGTGTAGTCGGTTTATG3'
Oligo_15, SEQ ID NO.: 21	5'ATTTAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGT GCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTT3'
Oligo_16, SEQ ID NO.: 22	5'AAAGGCGCGGTGCCGCTGGCGACCTGCGTTTCACCCTGC CATAAAGAACTGTTACCCGTAGGTAGTCACG3'
Oligo_17, SEQ ID NO.: 23	5'GCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGC GTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACG3'
Oligo_18, SEQ ID NO.: 24	5'GATAGAGATTCGGGATTTTCGGCGCTCCACAGTTTTCGGGTT TTCGACGTTTCAGACGTAGTGTGACGCGATCGGCA3'
Oligo_19, SEQ ID NO.: 25	5'GAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCGGTGGTTGA ACTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAG3'

ES 2 815 099 T3

(continuación)

Nombre de la secuencia	Secuencia
Oligo_20, SEQ ID NO.: 26	5'CAGCAGCAGACCATTTTCAATCCGCACCTCGCGGAAACC GACATCGCAGGCTTCTGCTTCAATCAGCGTGCCG3'
Oligo_21, SEQ ID NO.: 27	5'CGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCG TTGCTGATTTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCA3'
Oligo_22, SEQ ID NO.: 28	5'GCAGGATATCCTGCACCATCGTCTGCTCATCCATGACCTG ACCATGCAGAGGATGATGCTCGTGACGGTTAACGC3'
Oligo_23, SEQ ID NO.: 29	5'CAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAAC AACTTTAACGCCGTGCGCTGTTTCGCATTATCCGAAC3'
Oligo_24, SEQ ID NO.: 30	5'TCCACCACATACAGGCCGTAGCGGTTCGCACAGCGTGTAC CACAGCGGATGGTTCGGATAATGCGAACAGCGCAC3'
Oligo_25, SEQ ID NO.: 31	5'GCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAAC CCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATG3'
Oligo_26, SEQ ID NO.: 32	5'GCACCATTCGCGTTACGCGTTCGCTCATCGCCGGTAGCCA GCGCGGATCATCGGTCAGACGATTCATTGGCAC3'
Oligo_27, SEQ ID NO.: 33	5'CGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCACCCG AGTGTGATCATCTGGTTCGCTGGGGAATGAATCAG3'
Oligo_28, SEQ ID NO.: 34	5'GGATCGACAGATTTGATCCAGCGATACAGCGCGTTCGTGA TTAGCGCCGTGGCCTGATTCATCCCCAGCGACCAGATG3'
Oligo_29, SEQ ID NO.: 35	5'GTATCGCTGGATCAAATCTGTTCGATCCTTCCCGCCCGGTG CAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGC3'
Oligo_30, SEQ ID NO.: 36	5'CGGGAAGGGCTGGTCTTCATCCACGCGCGCGTACATCGG GCAAATAATATCGGTGGCCGTGGTGTTCGGCTC3'
Oligo_31, SEQ ID NO.: 37	5'TGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGT CCATCAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGAGAC3'
Oligo_32, SEQ ID NO.: 38	5'CCAAGACTGTTACCCATCGCGTGGGCGTATTCGCAAAGG ATCAGCGGGCGCGTCTCTCCAGGTAGCGAAAGCC3'
Oligo_33, SEQ ID NO.: 39	5'CGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTG GCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGC3'
Oligo_34, SEQ ID NO.: 40	5'GCCGTTTTTCATCATATTTAATCAGCGACTGATCCACCCAG TCCCAGACGAAGCCGCCCTGTAAACGGGGATACTGACG3'
Oligo_35, SEQ ID NO.: 41	5'CAGTCGCTGATTAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGG TCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACG3'
Oligo_36, SEQ ID NO.: 42	5'GCGGCGTGCGGTTCGGCAAAGACCAGACCGTTCATACAG AACTGGCGATCGTTCGGCGTATCGCCAAA3'
Oligo_37, SEQ ID NO.: 43	5'CGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAAC ACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCGGTTTATCCG3'
Oligo_38, SEQ ID NO.: 44	5'CTCGTTATCGCTATGACGGAACAGGTATTCGCTGGTCACT TCGATGGTTTGGCCGGATAAACGGAACTGGAAAACTGC3'

ES 2 815 099 T3

(continuación)

Nombre de la secuencia	Secuencia
Oligo_39, SEQ ID NO.: 45	5'AATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTG GATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCG3'
Oligo_40, SEQ ID NO.: 46	5'GTTTCAGGCAGTTCAATCAACTGTTTACCTTGTGGAGCGA CATCCAGAGGCACTTCACCGCTTGCCAGCGGCTTACC3'
Oligo_41, SEQ ID NO.: 47	5'CAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAG CCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTA3'
Oligo_42, SEQ ID NO.: 48	5'GCGCTGATGTGCCCGGCTTCTGACCATGCGGTTCGCGTTC GGTTGCACTACGCGTACTGTGAGCCAGAGTTG3'
Oligo_43, SEQ ID NO.: 49	5'CCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCG GAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGC3'
Oligo_44, SEQ ID NO.: 50	5'CCAGCTCGATGCAAAAATCCATTTTCGCTGGTGGTCAGAT GCGGGATGGCGTGGGACGCGGGCGGGGAGCGTC3'
Oligo_45, SEQ ID NO.: 51	5'CGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGG CAATTTAACC GCCAGTCAGGCTTTCTTTCACAGATGTG3'
Oligo_46, SEQ ID NO.: 52	5'TGAACTGATCGCGCAGCGGCGTCAGCAGTTGTTTTTATC GCCAATCCACATCTGTGAAAGAAAGCCTGACTGG3'
Oligo_47, SEQ ID NO.: 53	5'GCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAA CGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGAC3'
Oligo_48, SEQ ID NO.: 54	5'GGCCTGGTAATGGCCCGCCGCCTTCCAGCGTTCGACCCA GGCGTTAGGGTCAATGCGGGTCGCTTCACTTA3'
Oligo_49, SEQ ID NO.: 55	5'CGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCA CGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGAT3'
Oligo_50, SEQ ID NO.: 56	5'TCCGGCTGATAAATAAGGTTTTCCCTGATGCTGCCACGC GTGAGCGGTGTAATCAGCACCGCATCAGCAAGTG3'
Oligo_51, SEQ ID NO.: 57	5'GGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACCGGAT TGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGA3'
Oligo_52, SEQ ID NO.: 58	5'GGCAGTTCAGGCCAATCCGCGCCGGATGCGGTGTATCGC TCGCCACTTCAACATCAACGGTAATCGCCATTTGAC3'
Oligo_53, SEQ ID NO.: 59	5'GCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAG AGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAG3'
Oligo_54, SEQ ID NO.: 60	5'GGCAGATCCCAGCGGTCAAACAGGCGGCAGTAAGGCG GTCGGGATAGTTTTCTTGCGGCCCTAATCCGAGC3'
Oligo_55, SEQ ID NO.: 61	5'GTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATAC CCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGC3'
Oligo_56, SEQ ID NO.: 62	5'GTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTC AATTCGCG CGTCCCGCAGCGCAGACCGTTTTTCGCTCGG3'
Oligo_57, SEQ ID NO.: 63	5'ACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCT ACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACCAGCCATC3'
Oligo_58, SEQ ID NO.: 64	5'GAAACCGTCGATATTCAGCCATGTGCCTTCTTCCGCGTGC AGCAGATGGCGATGGCTGGTTTTCCATCAGTTGCTG3'

ES 2 815 099 T3

(continuación)

Nombre de la secuencia	Secuencia
Oligo_59, SEQ ID NO.: 65	5'CATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTGG CGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCG3'
Oligo_60, SEQ ID NO.: 66	5'TTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGGTAGCGACCG GCGCTCAGCTGGAATTCCGCCGATACTGACGGGC3'
Gen LacZ - SEQ ID NO: 67	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAA CGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATC GCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAG CGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGC AGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCAC CAGAAGCGGTGCCGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTC CTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCGCCCTCAAACCTGGCAGAT GCACGGTTACGATGCGCCATCTACACCAACGTGACCTAT CCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACGGAGAATC CGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAG CTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGC GTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGG TCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTGA CCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCG GTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAA GATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACG TCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTT CCATGTTGCCACTCGCTTTAATGATGATTTTCAGCCGCGCT GTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGT GACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAA CGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAA TTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACT ACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGA AATCCCGAATCTCTATCGTGCGGTGGTTGAACTGCACACC GCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGATGTC GGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGC TGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCA CGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAG ACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAAC TTTAACGCCGTGCGCTGTTTCGATTATCCGAACCATCCGC TGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGT GGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAAT GAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCGGCGATG AGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAAT CACCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAG

(continuación)

Nombre de la secuencia	Secuencia
	<p>GCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAA  ATCTGTCGATCCTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAGGCGGC  GGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGCCCGATGT  ACGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCC  GAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGA  GACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCACGCGATG  GGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGT  TTCGTCAGTATCCCGGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGA  CTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAATATGATGAAAACGG  CAACCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACG  CCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTG  CCGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAAC  ACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCGGTTTATCCGGGCAAAC  CATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGAT  AACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAG  CCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCAC  AAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGC  CGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTAG  TGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACA  TCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCA  GTGTGACGCTCCCGCCGCGTCCACGCCATCCCGCATCT  GACCACCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAAT  AAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCAC  AGATGTGGATTGGCGATAAAAAACA ACTGCTGACGCCGC  TGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAACGACAT  TGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAACGCCTG  GGTCGAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGA  AGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGAT  GCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAG  GGGAAAACCTTATTTATCAGCCGAAAACCTACC GGATTG  ATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGT  GGCGAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAA  CTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCT  CGGATTAGGGCCGCAAGAAA ACTATCCCGACCGCCTTACT  GCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACA  TGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCG  CTGCGGGACGCGCAATTGAATTATGGCCCACACCAGTG  GCGCGGGGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAA  CAGCAACTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCAC  GCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCAT  ATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTAT  CGGCGGAATTCCAGCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCA  GTTGGTCTGGTGTCAAAAATAA3'</p>

Se dispensaron gotas de aproximadamente 400 nL usando un dispensador Mantis (Formulatrix, MA) en la parte superior de los revólveres (canales de síntesis de oligonucleótidos) en el lado de dispositivo de un dispositivo de síntesis de oligonucleótidos. Se acopló manualmente un chip de nanorreactor con el dispositivo de oligonucleótidos para recoger las gotículas que tenían la mezcla de reacción de PCA. Las gotículas se recogieron en los nanorreactores

5

individuales en el chip de nanorreactor liberando el nanorreactor del dispositivo de síntesis de oligonucleótidos inmediatamente después de la recolección (figura 59).

- 5 Los nanorreactores se sellaron con una cubierta de película/cinta de sellado térmico (Eppendorf, [eshop.eppendorfna.com/products/Eppendorf\\_Heat\\_Sealing\\_PCR\\_Film\\_and\\_Foil](http://eshop.eppendorfna.com/products/Eppendorf_Heat_Sealing_PCR_Film_and_Foil)) y se pusieron en un termociclador adecuadamente configurado que se construyó utilizando un kit de termociclador (OpenPCR).

Se utilizó el siguiente protocolo de temperaturas en el termociclador:

- 10 1 ciclo: 98C, 45 segundos  
 40 ciclos: 98 C, 15 segundos; 63 C, 45 segundos; 72 C, 60 segundos;  
 1 ciclo: 72 C, 5 minutos  
 1 ciclo: 4C, mantenido
- 15 Se recogió una alícuota de 0,50 ul de los pocillos individuales 1-10 como se muestra en la figura 60 y se amplificaron las alícuotas en tubos de plástico, en una mezcla de reacción de PCR (Tabla 9) y de acuerdo con el siguiente programa de termociclador, usando un cebador directo (cebador D; 5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCC3'; SEQ ID NO: 68) y uno inverso (cebador I; 5'TTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGG3'; SEQ ID NO: 69):  
 Termociclador:
- 20 1 ciclo: 98 C, 30 segundos  
 30 ciclos: 98 C, 7 segundos; 63 C, 30 segundos; 72 C, 90 segundos  
 1 ciclo: 72 C, 5 minutos  
 1 ciclo: 4 C, mantenido

25

**Tabla 9:**

PCR	1 (x25 ul)	conc final.
H2O	17,50	
Tampón Q5 5x	5,00	1x
dNTP 10 mM	0,50	200 uM
cebador D 20 uM	0,63	0,5 uM
cebador I 20 uM	0,63	0,5 uM
BSA 20 mg/ml	0,00	
Q5 pol 2U/ul	0,25	1 u/50 ul
molde (ensamblaje PCA)	0,50	1 ul/50 ul rxn

- 30 Los productos de amplificación resultantes se procesaron en un instrumento BioAnalyzer (figura 60BB, paneles 1-10) así como en un gel (figura 60C), mostrando un producto que es ligeramente mayor que 3000 pb. Se realizó una 11<sup>a</sup> reacción de PCR usando una reacción de PCA realizada en un tubo de plástico como control positivo (figura 60B, panel 11 y figura 60C). Se realizó una 12<sup>a</sup> reacción de PCR sin el molde de PCA como control negativo que no mostró producto (figura 60B, panel 12 y figura 60C).

**EJEMPLO 14: Corrección de errores de ácidos nucleicos ensamblados**

Tabla 10

Ácido Nucleico	Secuencia
Gene ensamblado, SEQ ID NO.: 70	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT GACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCCTTGCAGCAC ATCCCCCTTTGCCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA TCGCCCTTCCCAACAGTTGGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTT GCCTGGTTTCCGGCACCAAGAGCGGTGCCGGAAGCTGGCTGGAG TGGGATCTTCTGAGGCCGATACTGTCGTCCTCCCTCAAACCTGGC AGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCC CATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACCGGAGAATCCGACGGGT TGTTACTCGCTCACATTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAG GCCAGACGGCAATTAATTTGATGGCGTTAACTCGCGCTTTCATCT GTGGTGCAACGGGCGCTGGGTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTG CCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGGCCGGAGAAAACC GCCTCGCGGTGATGGTGTGCTGCGTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGA AGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCG TTGCTGCATAAACCGACTACACAATCAGCGATTTCCATGTTGCCA CTCGCTTAAATGATGATTTCAAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGT TCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCT TTATGGCAGGGTGAAACGCAAGTCCGCCAGCGGCACCGGCCCTTTCG GCGGTGAAATTAATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCAC ACTACGTCCTGAACGTCGAAAACCCGAAAACCTGTGGAGCGCCGAAAT CCCGAACTCTATC3'
Ensamblaje del oligonucleótido 1, SEQ ID NO.: 71	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT GACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCCTTGCAGCAC ATCCCCCTTTGCCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA TCGCCCTTCCCAACAGTTGGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTT
Ensamblaje del oligonucleótido 2, SEQ ID NO.: 72	5'GATAGGTCACGTTGGTGTAGATGGGCGCATCGTAACCGTGCATCT GCCAGTTTGAGGGGACGACGACAGTATCGGCCCTCAGGAAGATCCG ACTCCAGCCAGCTTCCGGCACCGCTTCTGGTCCCGGAAACCAGGC AAAGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGA3'

(continuación)

Ácido Nucleico	Secuencia
Ensamblaje del oligonucleótido 3, SEQ ID NO.: 73	5'CCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCG TTTGTCCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTACTCGCTCACATTTA ATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACCGGAATATTTT TGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGG3'
Ensamblaje del oligonucleótido 4, SEQ ID NO.: 74	5' GCCGCTATCCGCCACATAATCCTGATCTCCAGATAAAGTCCCGTCA CTCCAGCGCAGCACCATCACCCGCGAGGGGTTTTCTCCGGCGCGTA AAAATGCGCTCAGGTCAAAATTCAGACGGCAACGACTGTCTCTGGC CGTAACCGACCCAGCGCCCGTTGCACCACAGATGAAACG 3'
Ensamblaje del oligonucleótido 5, SEQ ID NO.: 75	5'AGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGCTCTCGTTGC TGCATAAACCGACTACACAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCG CTTTAATGATGATTTTCAGCCGCGCTGACTGGAGGCTGAGTTTCAG ATGTGCGGCGGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTT 3'
Ensamblaje del oligonucleótido 6, SEQ ID NO.: 76	5'GATAGAGATTCCGGGATTTCCGGCGTCCACAGTTTTCGGGTTTTCGA CGTTCAGACGTAGTGTGACCGGATCCGGCATAACCCACCGCTCATC GATAATTTCAACCGCCGAAAGCGCGGTGCCCGTGGCCGACCTGCGTT TCACCCCTGCCATAAAGAAACTGTTACCCGTAGGTAGTACAG 3'

Un gen de aproximadamente 1 kb (SEQ ID NO.: 70; Tabla 10) se ensambló usando 6 oligonucleótidos comprados (5 nM cada uno durante PCA) (Ultramer; SEQ ID NO.: 71-76; Tabla 10) y se ensambló en una reacción de PCA usando un tampón NEB Q5 1x con 0,02 U/uL de polimerasa Q5 de alta fidelidad de inicio en caliente y dNTP 100 uM de la siguiente manera:

1 ciclo: 98 C, 30 s  
 15 ciclos: 98 C, 7 s; 62 C 30 s; 72 C, 30 s  
 1 ciclo: 72 C, 5 min

Es de esperar que los oligonucleótidos ultramer tengan tasas de error de al menos 1 en 500 nucleótidos, más probablemente al menos 1 en 200 nucleótidos o más.

El gen ensamblado se amplificó en una reacción PCR usando un cebador directo (5' ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCC3' SEQ ID NO.: 77) y un cebador inverso (5'GATAGAGATTCCGGGATTTCCGGCGCTCC

3' SEQ ID NO.: 78), usando tampón NEB Q5 1x con 0,02 U/uL de polimerasa Q5 de alta fidelidad de inicio en caliente, DNTP 200 uM y cebadores 0,5 uM como se indica a continuación:

1 ciclo: 98 C, 30 s  
 30 ciclos: 98 C, 7 s; 65 C 30 s; 72 C, 45 s  
 1 ciclo: 72 C, 5 min

El gen ensamblado amplificado se analizó en un BioAnalyzer (figura 52A) y se clonó. Se secuenciaron por el método de Sanger minipreparaciones procedentes de ~ 24 colonias. El análisis de BioAnalyzer proporcionó un pico amplio y una cola para el gen no corregido, lo que indicaba una alta tasa de error. La secuenciación indicó una tasa de error de 1/789 (datos no mostrados). Se siguieron dos rondas de corrección de errores utilizando CorrectASE (Life Technologies, www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A14972) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de genes resultantes se analizaron de manera similar en el BioAnalyzer después de la ronda uno (figura 60B) y la ronda dos (figura 60C) y se clonaron. Se seleccionaron 24 colonias para la secuenciación. Los resultados de la secuenciación indicaron una tasa de error de 1/5190 pb y 1/6315 pb después de la primera y segunda rondas de corrección de errores, respectivamente.

**EJEMPLO 15: Generación de una gran cantidad de oligonucleótidos monocatenarios sin cebador**

Reactivos. Todas las enzimas y tampones excepto la ADN polimerasa phi29 se adquirieron de NEB a menos que se indique lo contrario. La ADN polimerasa phi29 se adquirió de Enzymatics.

Generación de oligonucleótidos. Se sintetizó mediante IDT un oligonucleótido padlock (OS\_1518) que tenía una secuencia complementaria inversa a un oligonucleótido deseado (Tabla 1). También se sintetizaron oligonucleótidos padlock adicionales OS\_1515, OS\_1516, OS\_1517, OS\_1519 para trabajar con combinaciones de oligonucleótidos auxiliares/adaptadores que funcionan con diferentes conjuntos de enzimas de restricción. El oligonucleótido padlock se fosforiló mezclando 5 µl de padlock (200 nM) con 5 µl de tampón T4 PNK, 0,5 µl de ATP (100 mM), 2 µl de T4 PNK (10 U/µl), 1 µl de BSA (100 µg/µl), 2 µl de DTT (100 mM) y 32,5 µl de agua, e incubando la mezcla durante 60 min a 37 °C, seguido de incubación durante 20 min a 65 °C. Se sintetizó mediante IDT un oligonucleótido adaptador que tenía una secuencia complementaria al oligonucleótido padlock (Tabla 11). Se sintetizó mediante IDT un oligonucleótido auxiliar que tenía una secuencia complementaria al oligonucleótido adaptador y se biotiniló.

**Tabla 11. Secuencias oligonucleotídicas.**

Padlock, SEQ ID NO.: 79	5' <u>ATCTTTGAGTCTTCTGCTTGGTCAGACGAGTGCATGTGCGTGACA</u> AATTGGCGCGAGGAGCTCGTGTCAATCACAACCTGCTCTTAGGCTAC TCAGGCATGGTGAGATGCTACGGTGGTTGATGGATACCTAGAT3'
Adaptador, SEQ ID NO.: 80	5'CAGAAGACTCAAAGATATCTAGGTATCCATCAAC3'
Auxiliar, SEQ ID NO.: 81	/5Biosg/GTTGATGGATACCTAGATATCTTTGAGTCTTCTG3'
Subrayado = complementariedad con el oligonucleótido adaptador Subrayado ondulado = sitio de restricción /5Biosg/= sitio de biotinilación	

Hibridación y ligamiento. Se combinaron 48 µl de la mezcla de reacción de fosforilación padlock con 1,5 µl de oligonucleótido adaptador (2 µM) y 0,5 µl de ligasa de T4. La reacción se incubó durante 60 min a 37 °C, seguido de

20 min a 65 °C. Se mezcló una muestra de 5 µl de la reacción con 5 µl de tampón de carga 2X y se analizó en un gel de TBE-urea al 15 % (180 V, 75 min).

5 Se realizó un tratamiento con exonucleasa opcional como se indica a continuación. Se trataron 10 µl de producto de ligamiento con 0,15 µl de Exol y ExoIII (NEB o Enzymatics) a 37 °C durante 60 min, seguido de 95 °C durante 20 min. Después de la incubación, se añadieron 0,3 µl de oligonucleótido adaptador (2 µM) a cada 10 µl de solución, se calentó a 95 °C durante 5 min y se enfrió lentamente. Se mezcló una muestra de 5 µl de la reacción con 5 µl de tampón de carga 2X y se analizó en un gel de TBE-urea al 15 % (180 V, 75 min).

10 Amplificación de círculo rodante. Se preparó una mezcla maestra de 10 µl de 2X RCA combinando 0,6 µl de ADN polimerasa phi29 (baja concentración, Enzymatics), 0,5 µl de dNTP 10 mM, 1 µl de tampón T4 PNK, 0,2 µl de BSA 100x, 0,5 µl de DTT 100 mM y 7,2 µl de agua sobre hielo. En algunos casos, pueden usarse aditivos de PCR, tales como la betaína, por ejemplo, betaína 5 M, para reducir el sesgo de amplificación. Los 10 µl de mezcla maestra de RCA se combinaron con 10 µl de producto de ligamiento (con o sin tratamiento con exonucleasa) y se incubaron a 40 °C durante 90 min o 4 h. A continuación, la reacción se incubó a 70 °C durante 10 min para desactivar la ADN polimerasa phi29. Se mezcló una muestra de 0,1 µl de la reacción con 4,9 µl de agua y 5 µl de tampón de carga 2X, y la mezcla se analizó en un gel de TBE-urea al 15 % (180 V, 75 min).

20 Digestión con endonucleasas de restricción. Se mezcló una muestra de 2 µl del producto RCA con 2 µl de CutSmart 10x, 2 µl de oligonucleótido auxiliar biotinilado (20 µM) y 12 µl de agua. La mezcla se calentó a 98 °C y se enfrió lentamente a temperatura ambiente. Se añadió 1 µl de cada uno de BciVI y MlyI a la mezcla, seguido de incubación durante 1 hora a 37 °C, y después 20 min a 80 °C. Se mezcló una muestra de 1 µl de la reacción con 4 µl de agua y 5 µl de tampón de carga 2X, y la mezcla se analizó en un gel de TBE-urea al 15 % (180 V, 75 min).

25 Se realizó una etapa de purificación opcional como sigue. Se retuvo 1 µl de la muestra de digestión con endonucleasas de restricción como muestra de prepurificación. Se resuspendieron perlas NanoLink (Solulink) mediante agitación vigorosa con vórtice. Se añadió una alícuota de 5 µl de perlas a un tubo de 1,5 ml. Se añadió al tubo tampón de unión y lavado de ácidos nucleicos o NABWB (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 8,0) hasta un volumen final de 250 µl, y el tubo se mezcló para resuspender. El tubo se puso en un soporte magnético durante 2 min, seguido de la eliminación del sobrenadante. El tubo se retiró del imán y las perlas se resuspendieron con 180 µl de NABWB. Se añadieron 180 µl de las perlas resuspendidas a 20 µl de la reacción de digestión con endonucleasas de restricción y la mezcla se sometió a agitación vorticial. La mezcla se incubó durante 60 min a 40 °C en un agitador de plataforma, para que las perlas no sedimentaran. A continuación, el tubo se puso sobre un imán durante 2 min y el sobrenadante que comprendía el producto purificado se transfirió a un nuevo tubo. Se mezcló una muestra de 10 µl del producto purificado con 5 µl de tampón de carga 2X y se analizó en un gel de TBE-urea al 15 % (180 V, 75 min). La concentración del producto RCA purificado se midió usando el kit Qubit ssDNA.

40 Purificación alternativa. En algunos flujos de trabajo, los oligonucleótidos digeridos se pueden purificar usando HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

45 La figura 63 representa la separación de los productos de amplificación escindidos con enzimas de restricción, donde cada producto de amplificación monocatenario se ha hibridado con un oligonucleótido auxiliar complementario al producto de amplificación en los sitios de copia del adaptador, antes de la escisión. También se muestran datos relacionados con la amplificación de ácidos nucleicos monocatenarios usando sondas padlock OS\_1515, OS\_1516, OS\_1517, OS\_1518, OS\_1519, con diferentes conjuntos de enzimas de restricción.

50 Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la materia que tales realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. A los expertos en la materia se les ocurrirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Debe entenderse que se pueden emplear varias alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento para llevar a la práctica la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para sintetizar oligonucleótidos de n unidades en un sustrato, que comprende:

- 5 (a) proporcionar un sustrato con loci individuales resueltos en forma de microestructuras que están funcionalizadas con un resto químico adecuado para el acoplamiento de nucleótidos; y
- (b) acoplar al menos dos bloques de construcción nucleotídicos a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas individuales en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci individuales resueltos a una velocidad de al menos 10 nucleótidos por hora de acuerdo con una secuencia predeterminada con especificidad de locus, sintetizándose de esta manera una pluralidad de oligonucleótidos que tienen n pares de bases de longitud, y en donde la pluralidad de oligonucleótidos en el sustrato se desvía de secuencias predeterminadas con especificidad de locus respectivas a una tasa de error menor de 1/1000 pb, en donde los bloques de construcción comprenden un nucleótido, un dinucleótido o un trinucleótido y
- 10 (c) escindir los oligonucleótidos sintetizados del sustrato,

15 en donde n es al menos 100.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 12 nucleótidos por hora.

20

3. El método de la reivindicación 1, que comprende además acoplar al menos dos bloques de construcción a una pluralidad de cadenas oligonucleotídicas en crecimiento, residiendo cada una en uno de los loci resueltos a una velocidad de al menos 15 nucleótidos por hora.

25

4. El método de la reivindicación 1, en donde los bloques de construcción comprenden un grupo adenina, guanina, timina, citosina o uridina, o un nucleótido modificado.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el sustrato comprende al menos 100 loci resueltos y en donde al menos dos de la pluralidad de oligonucleótidos en crecimiento son diferentes entre sí.

30

6. El método de la reivindicación 1, que comprende además secar al vacío el sustrato antes del acoplamiento.

7. El método de la reivindicación 1, en donde los bloques de construcción comprenden un grupo bloqueante.

35

8. El método de la reivindicación 7, en donde el grupo bloqueante comprende DMT lábil en medio ácido.

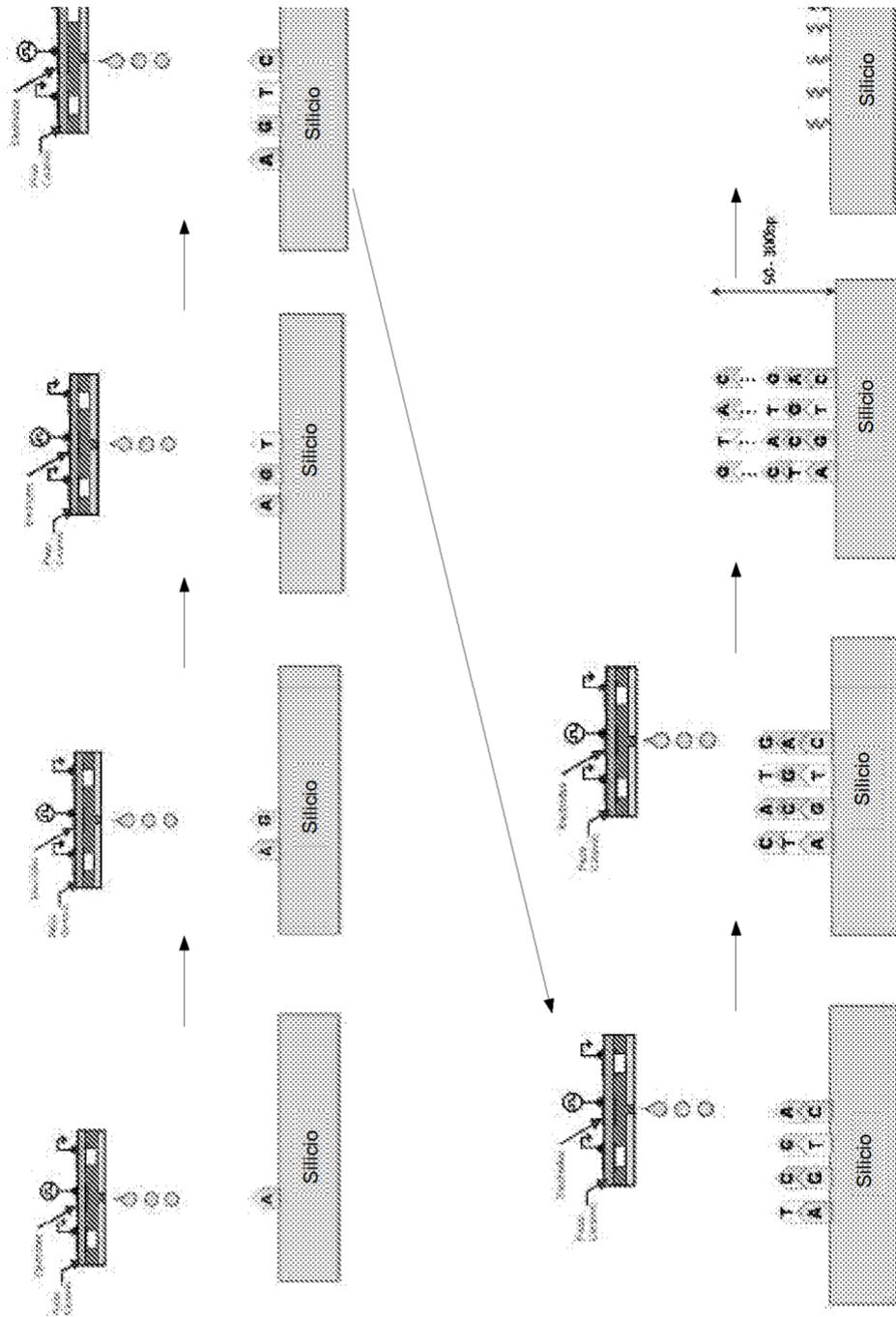
9. El método de la reivindicación 8, en donde el DMT lábil en medio ácido comprende 4,4'-dimetoxitritilo.

40 10. El método de la reivindicación 1, en donde las microestructuras tienen formas bidimensionales o tridimensionales.

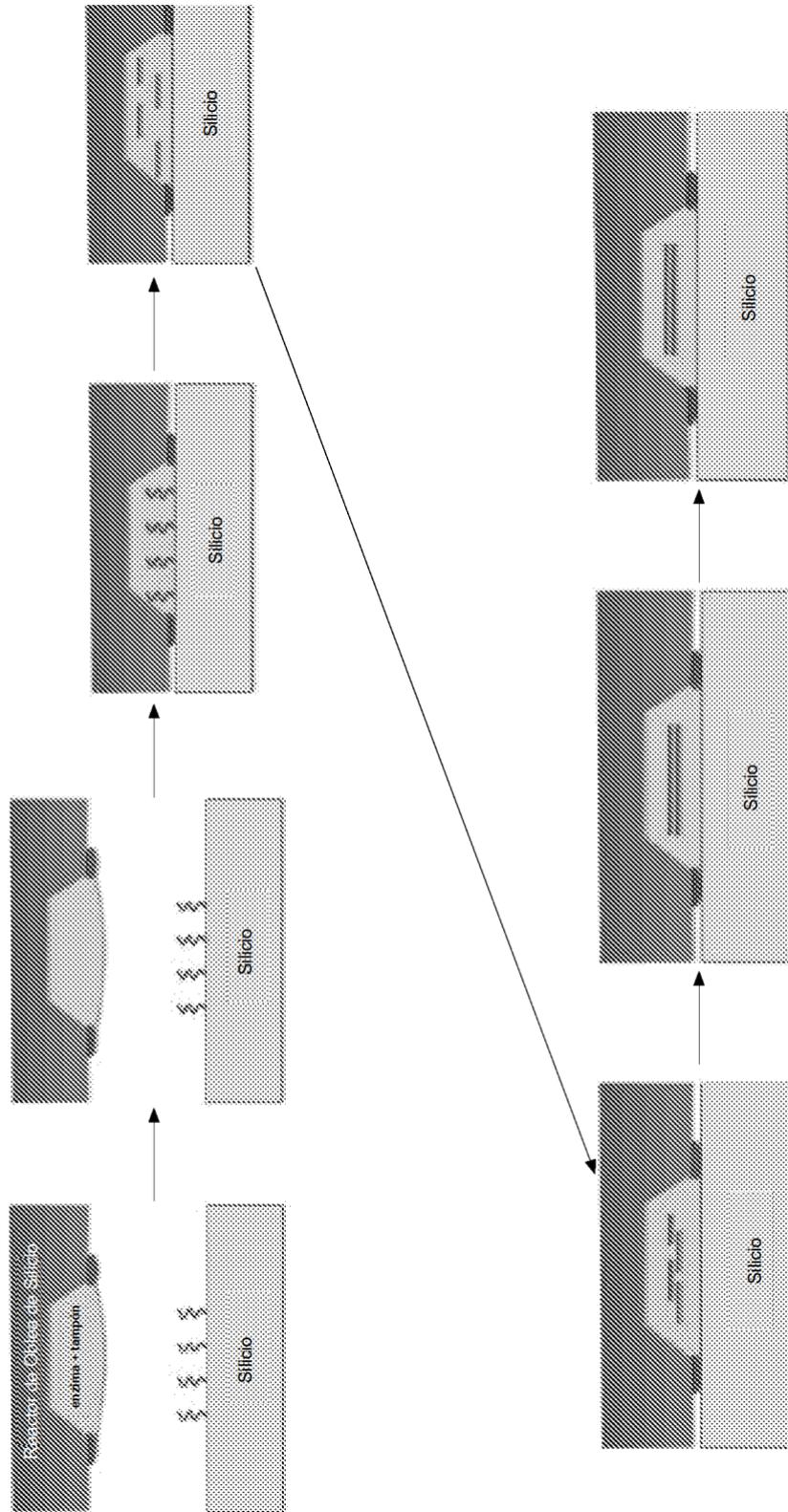
11. El método de la reivindicación 10, en donde la microestructura de los loci resueltos está en forma de microcanal.

12. El método de la reivindicación 10, en donde la microestructura de los loci resueltos está en forma de micropocillo.

Figura 1A

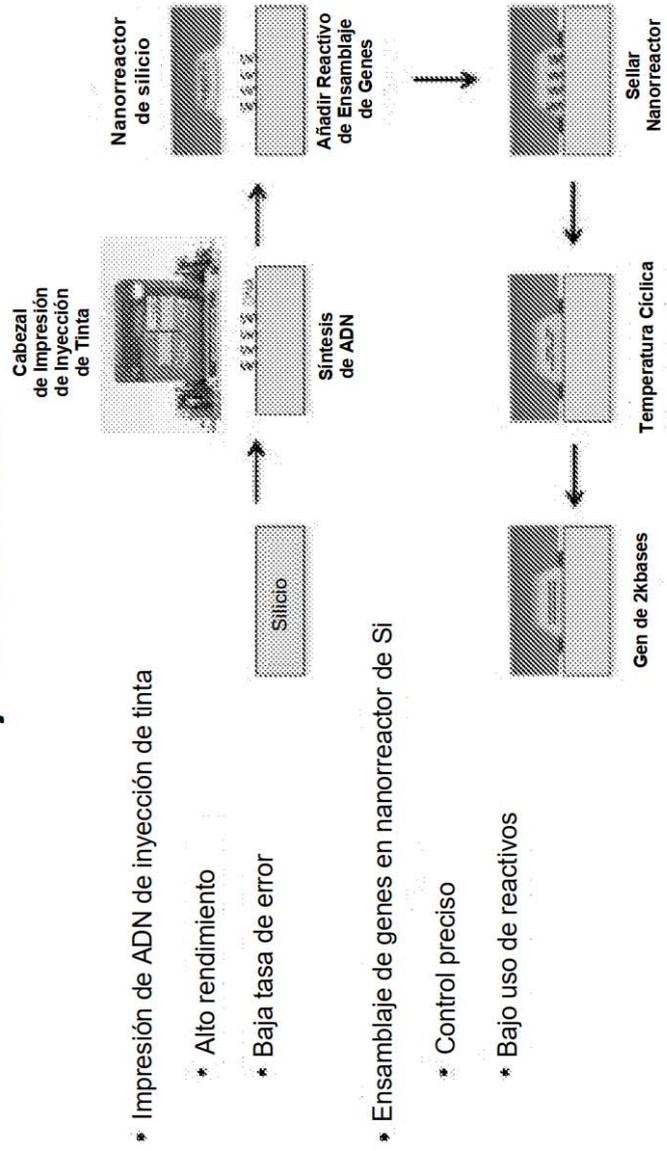


**Figura 1B**

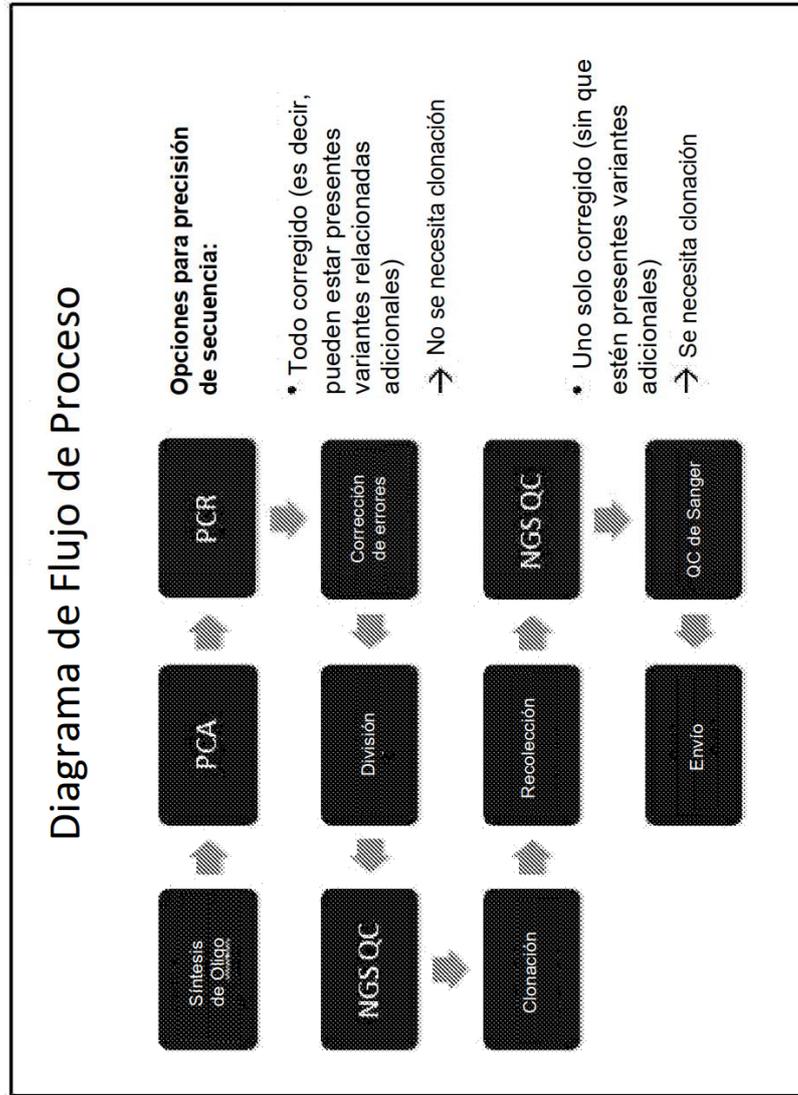


# Figura 1C

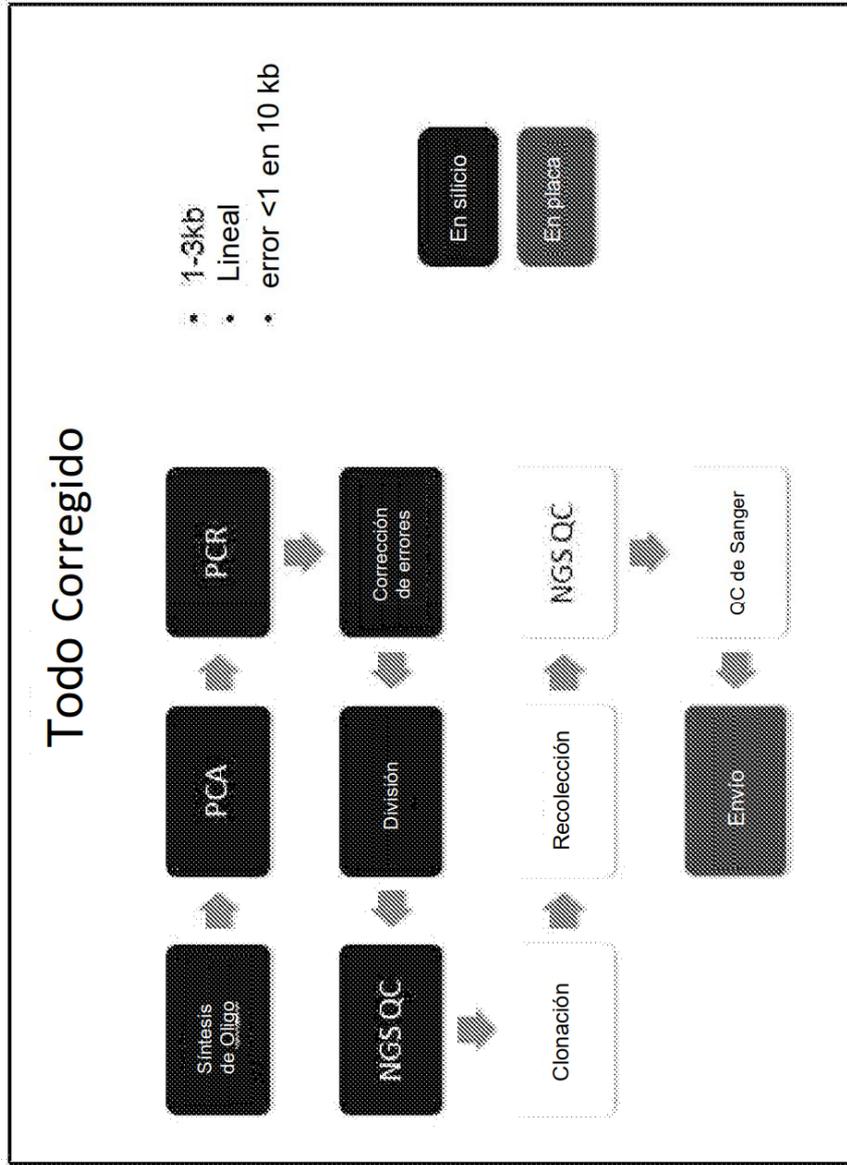
## Tecnología Génica de Impresión y NanoReactor



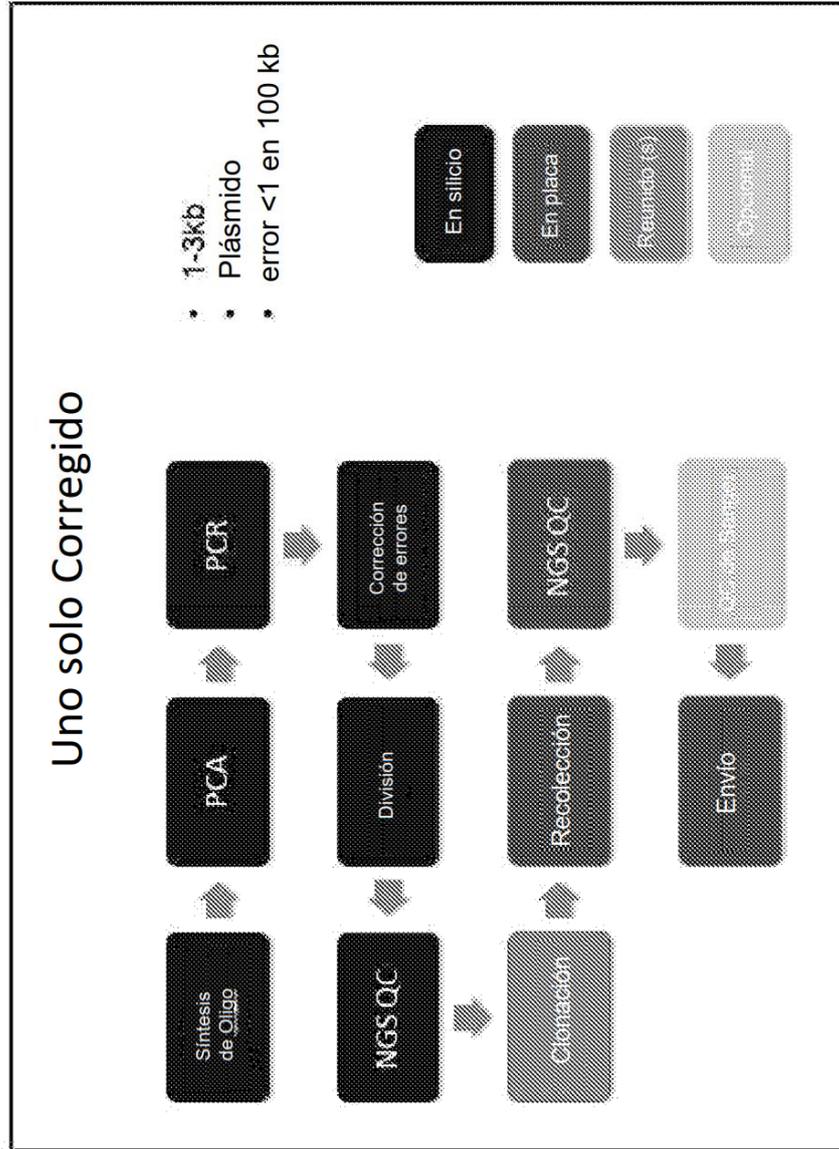
**Figura 2A**



**Figura 2B**

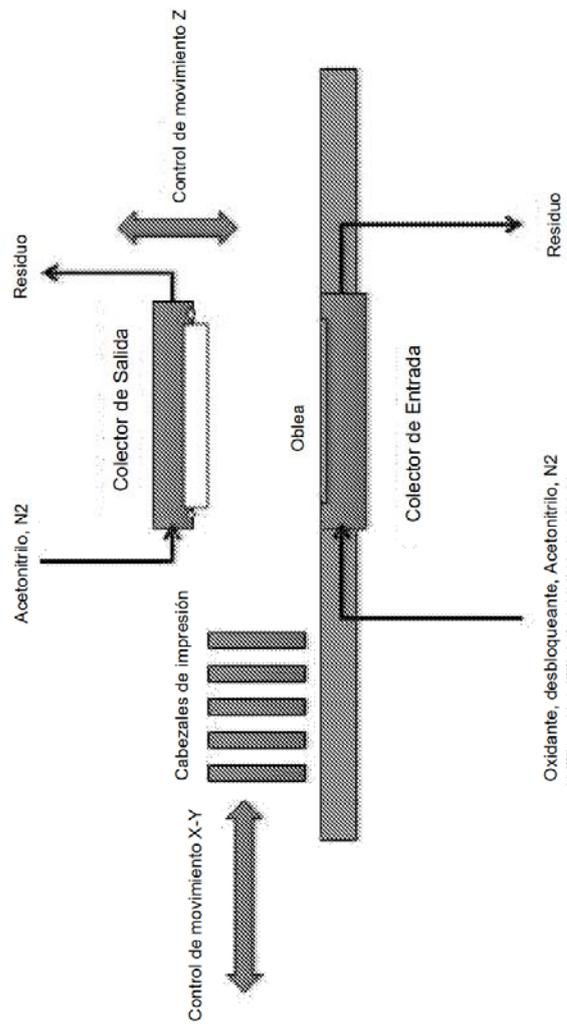


# Figura 2C



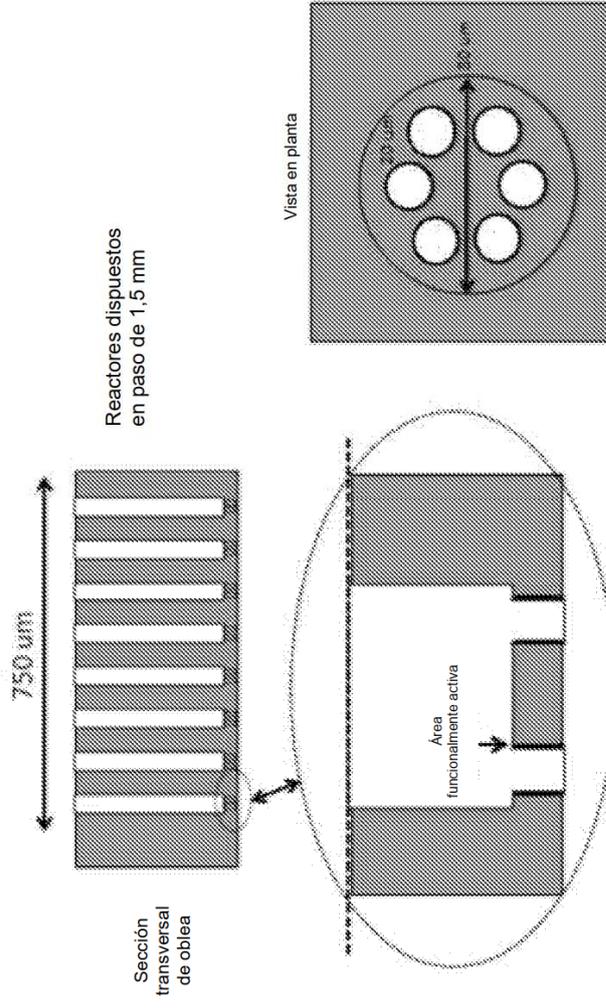
# Figura 3

## Impresora de Oligos



# Figura 4

## Reactor de Oblea de Silicio



# Figura 5

## Deposición de reactivos

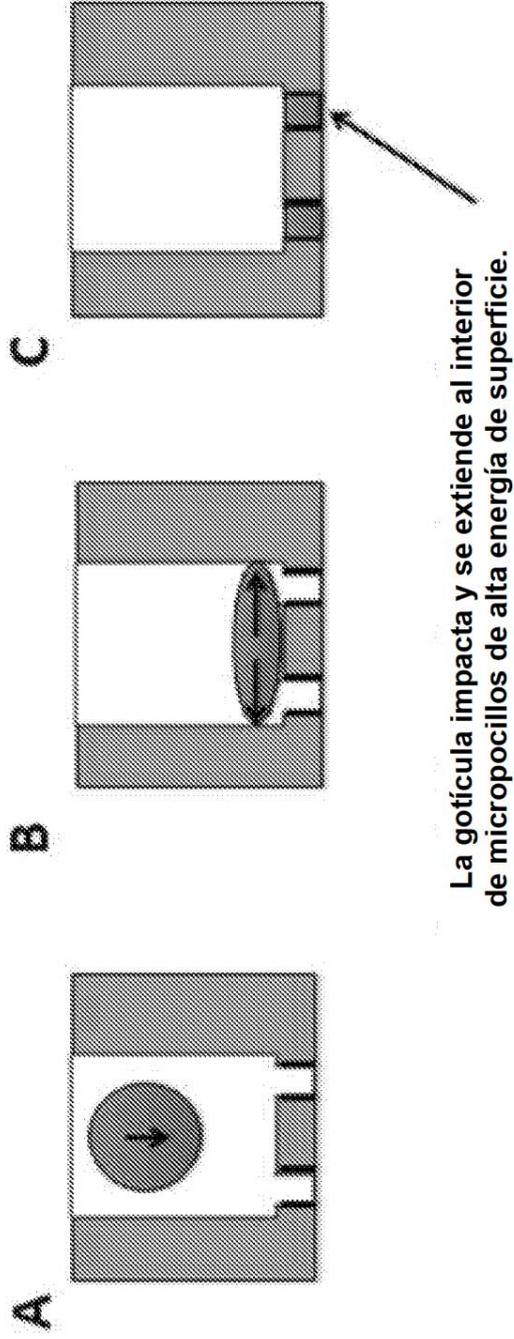
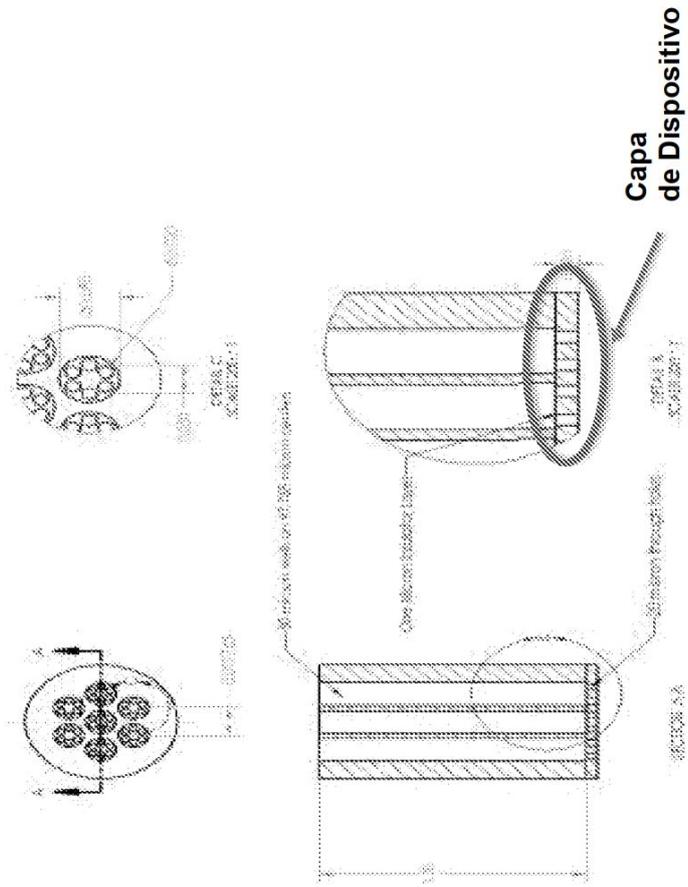
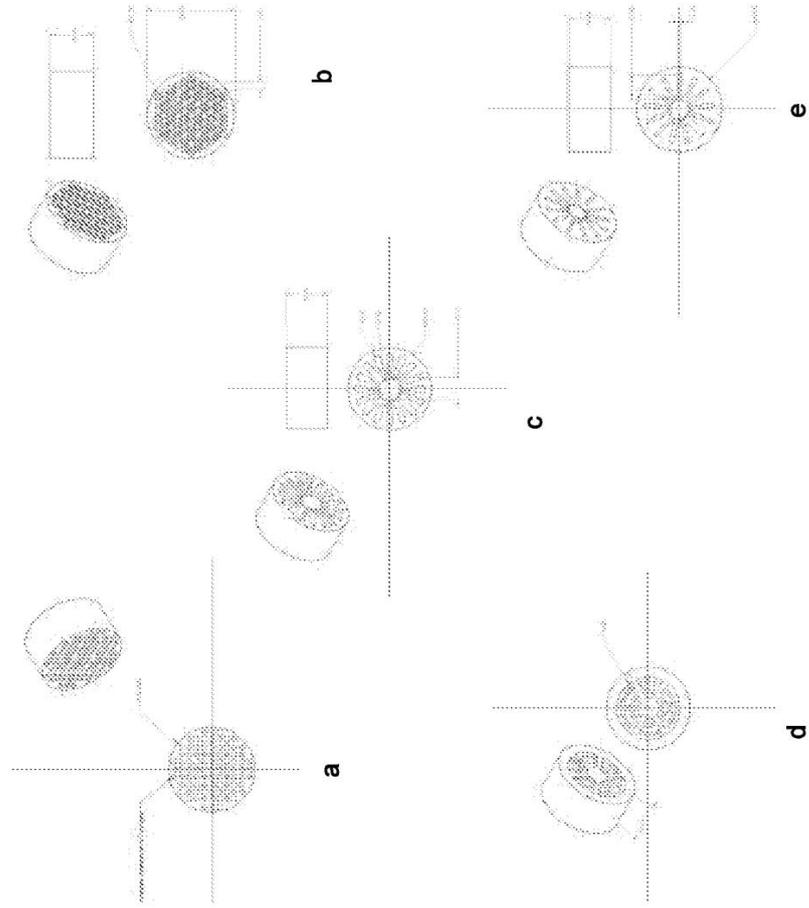


Figura 6A

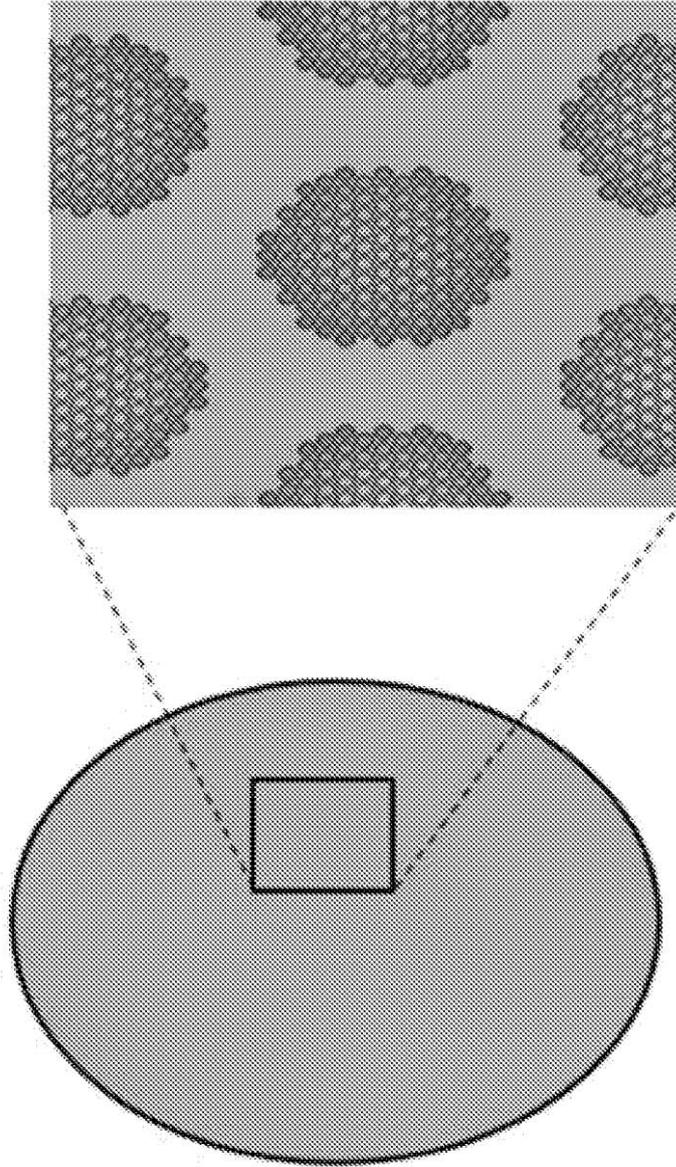


**Figura 6B**



# Figura 6C

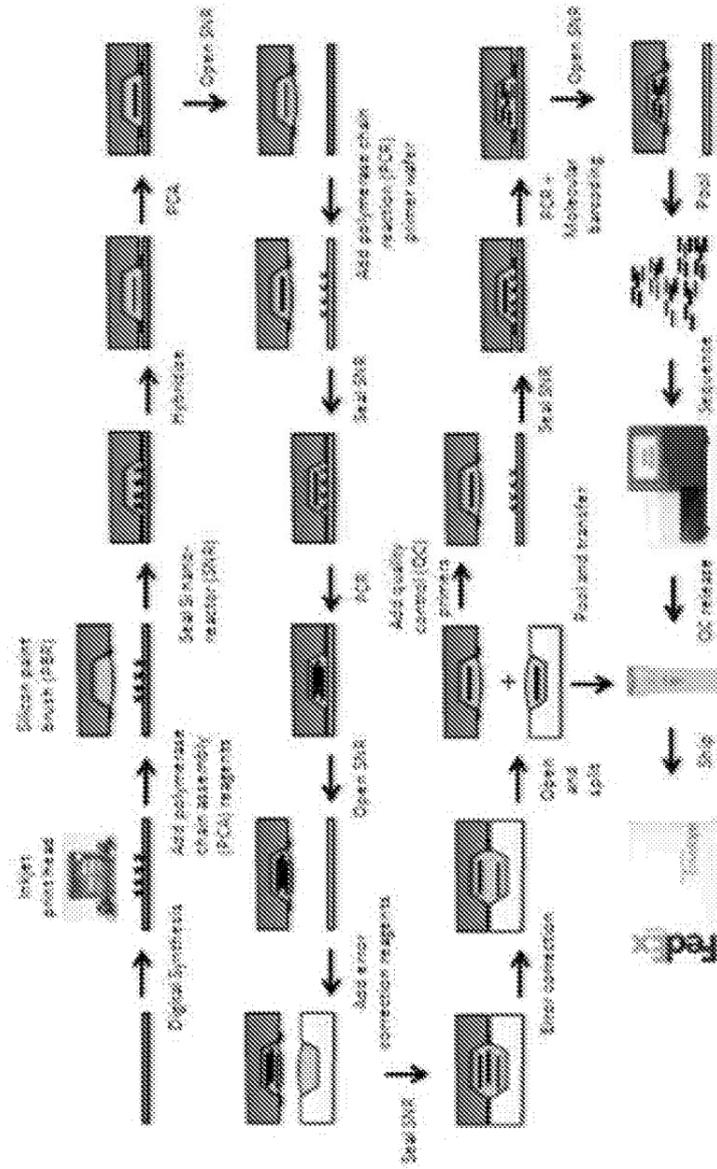
Trazado de oblea



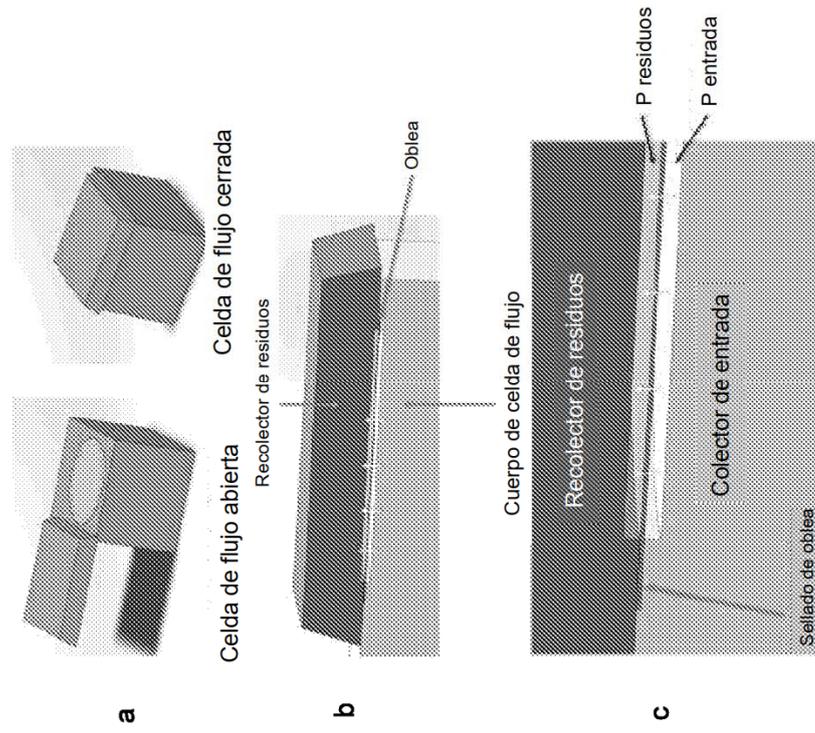


# Figura 8

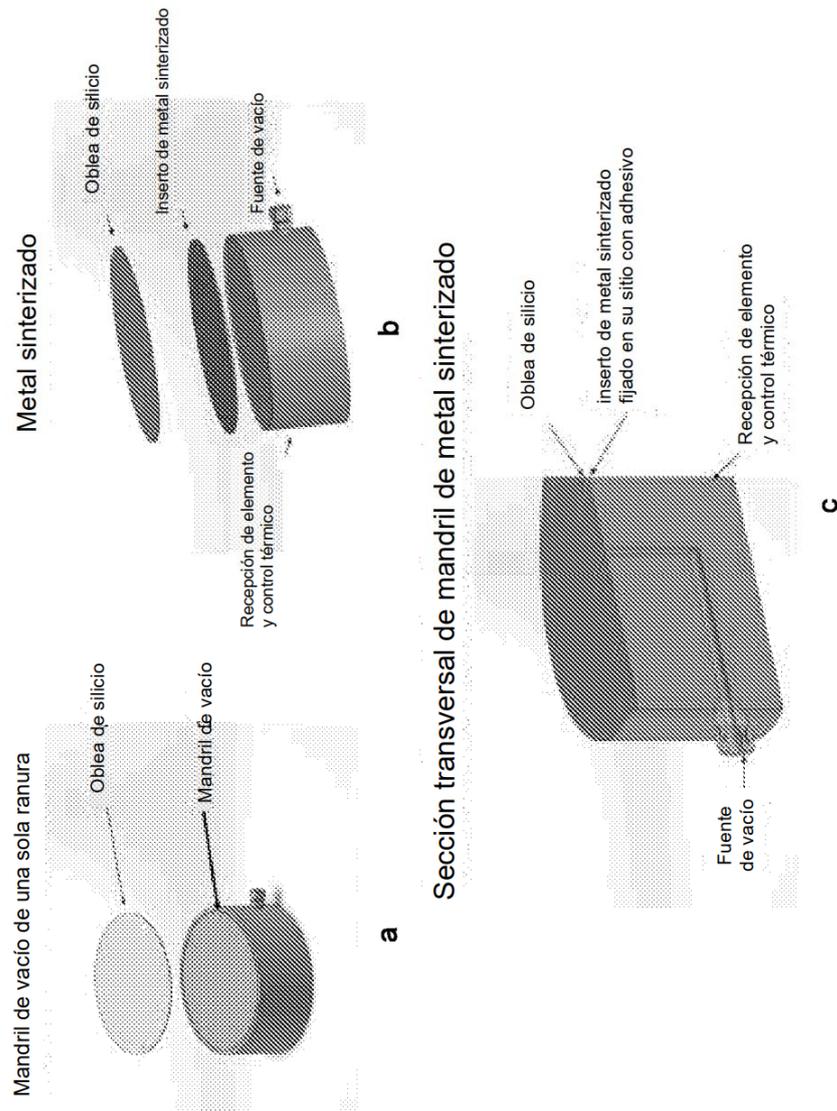
## Flujo de trabajo del proceso



# Figura 9

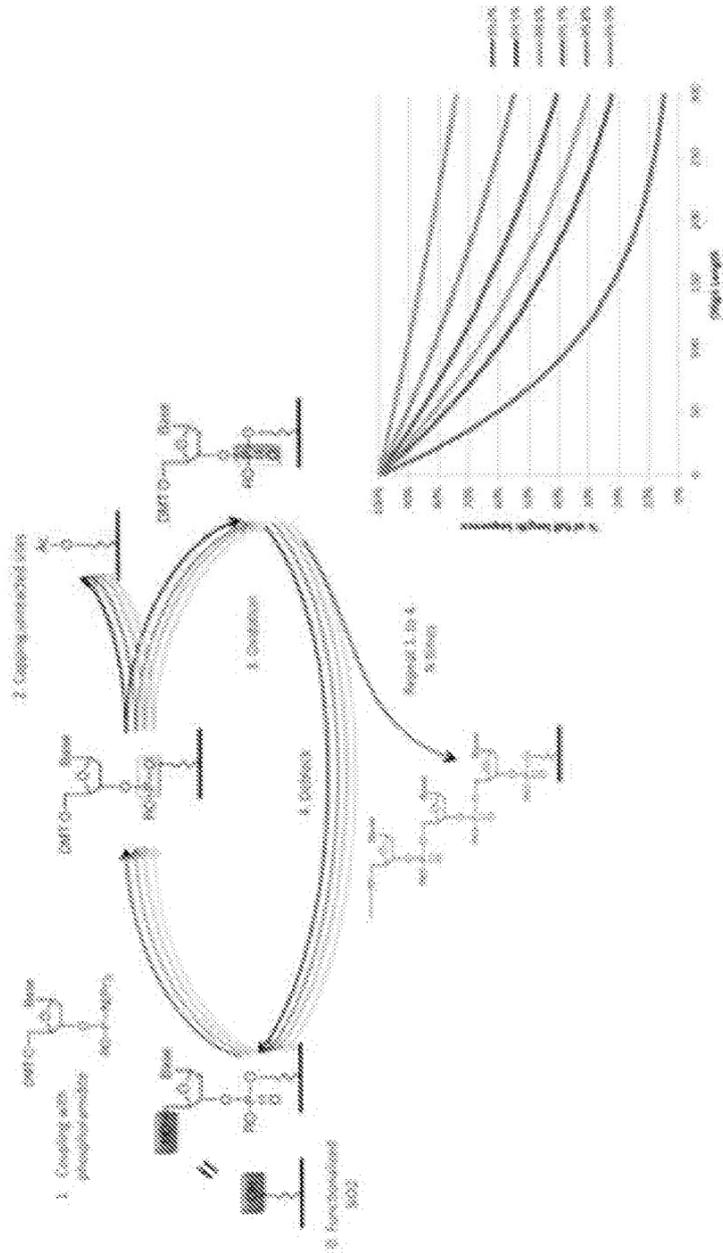


# Figura 10



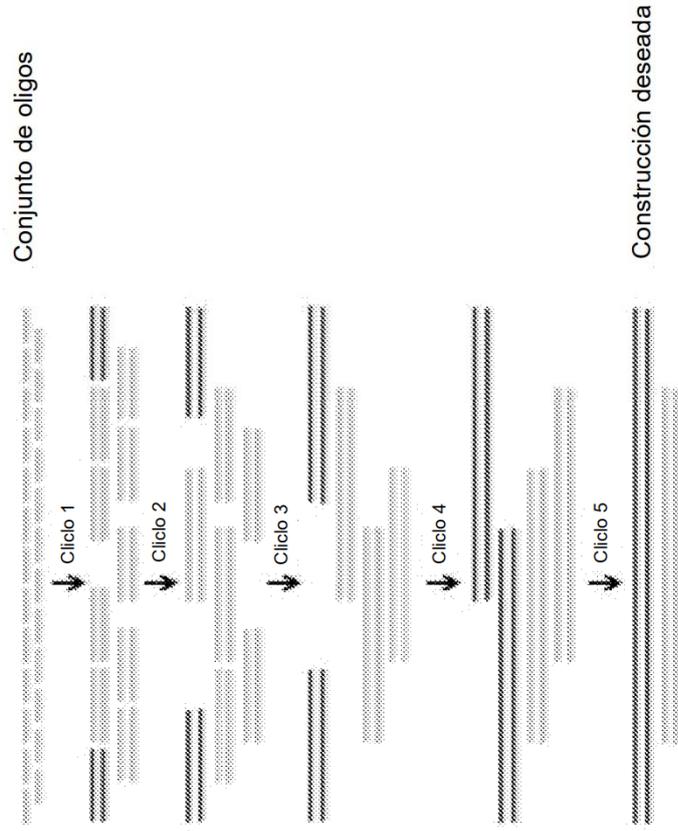
# Figura 11

## Química de fosforamida convencional



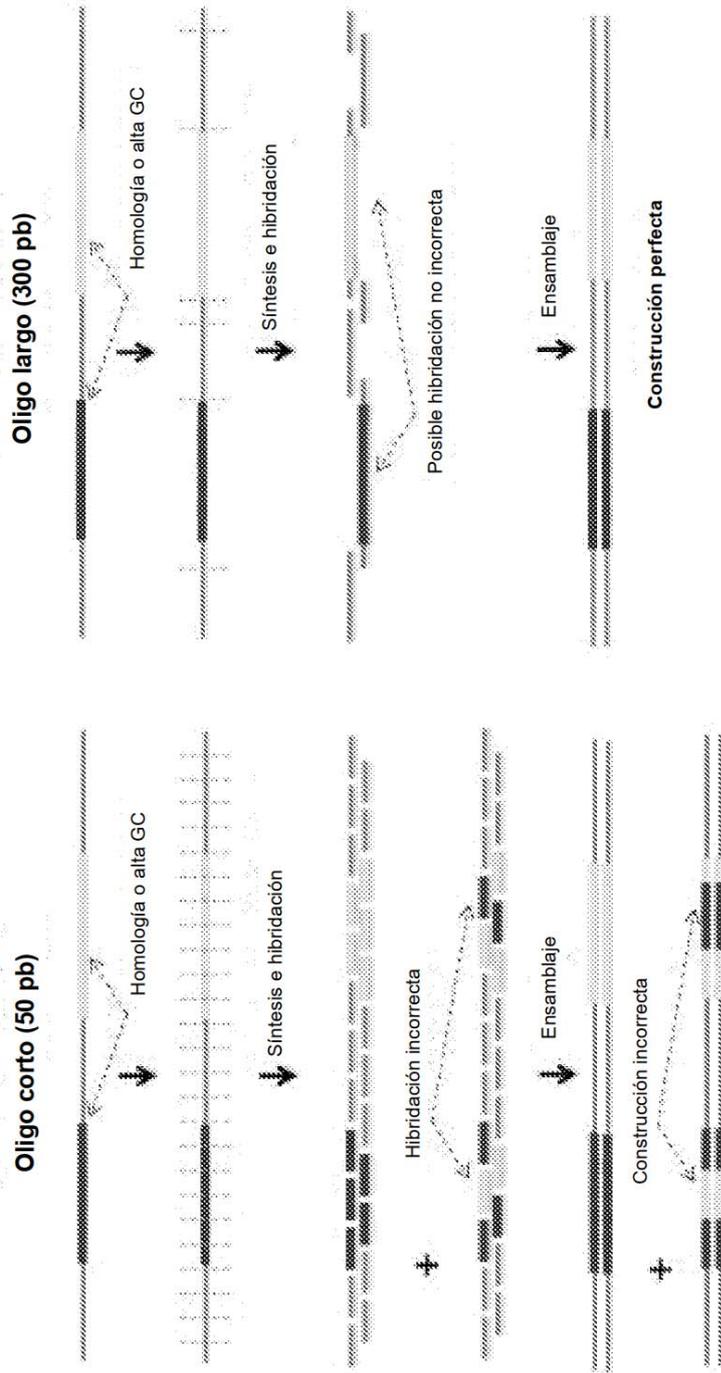
# Figura 12

## Ensamblaje de cadenas por polimerasa



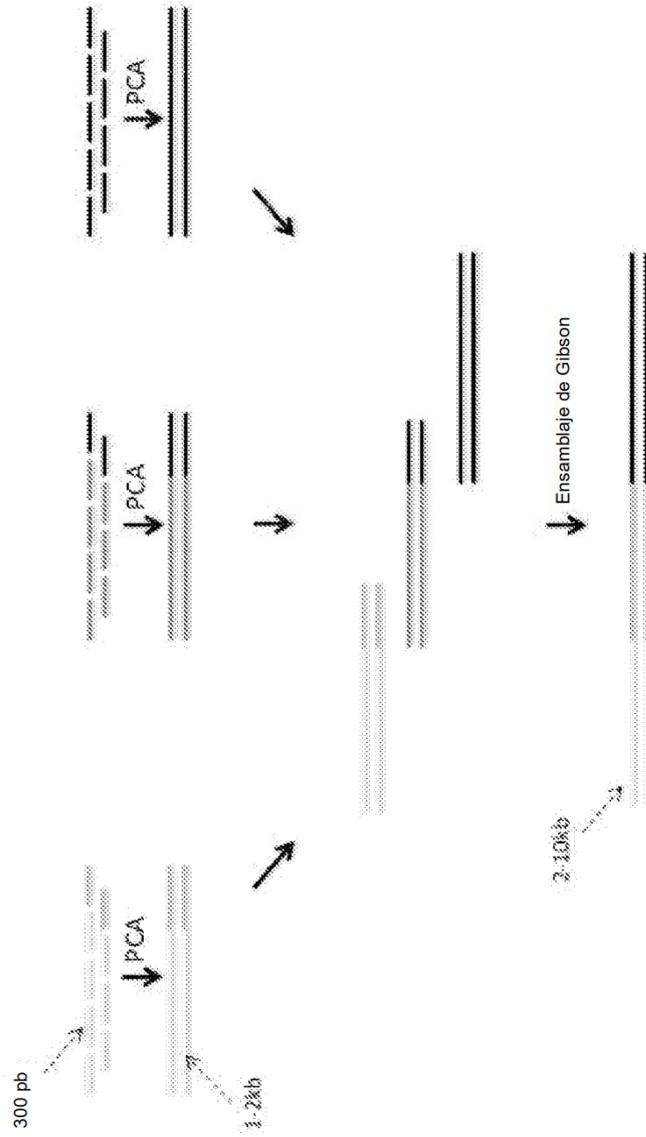
# Figura 13

## Ventaja de Oligos Largos



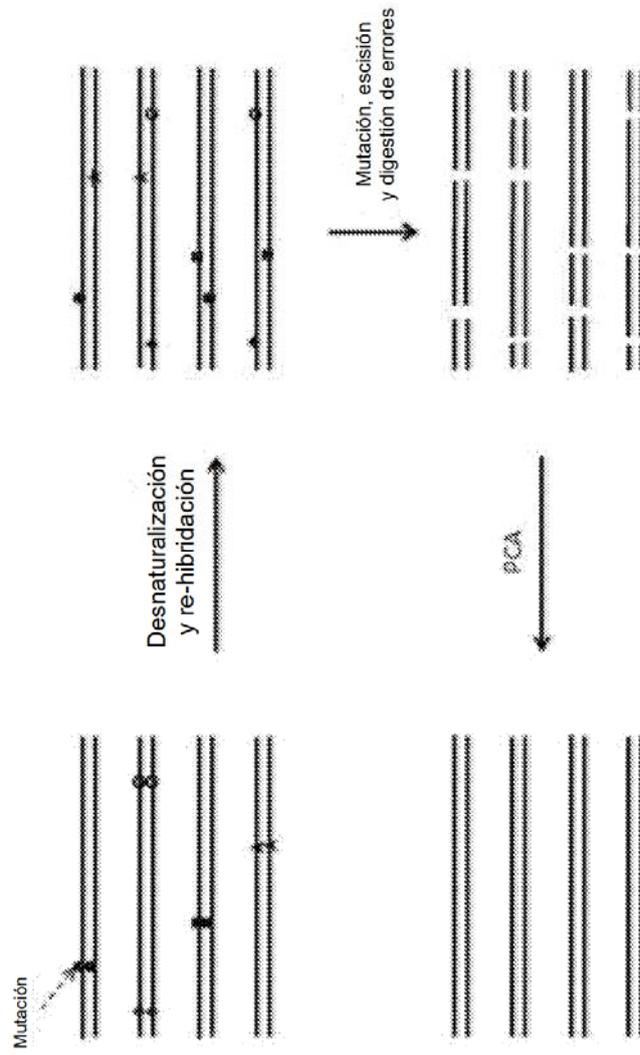
# Figura 14

## PCA + Gibson: ensamblaje de 2-10 kb



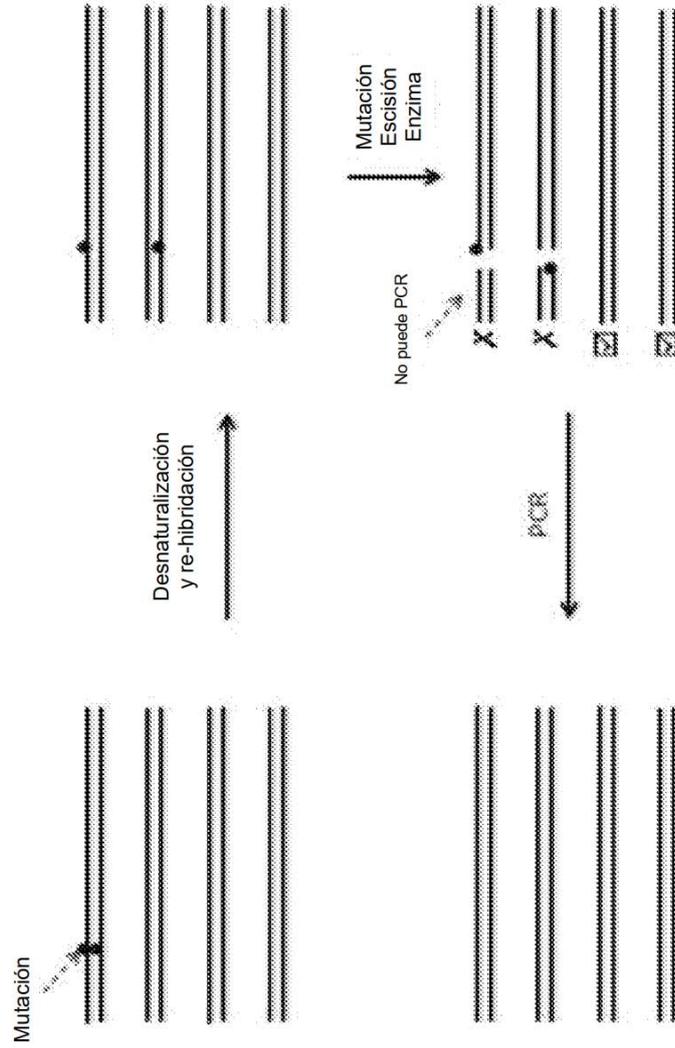
# Figura 15

## Corrección de Errores: Alta Tasa de Errores



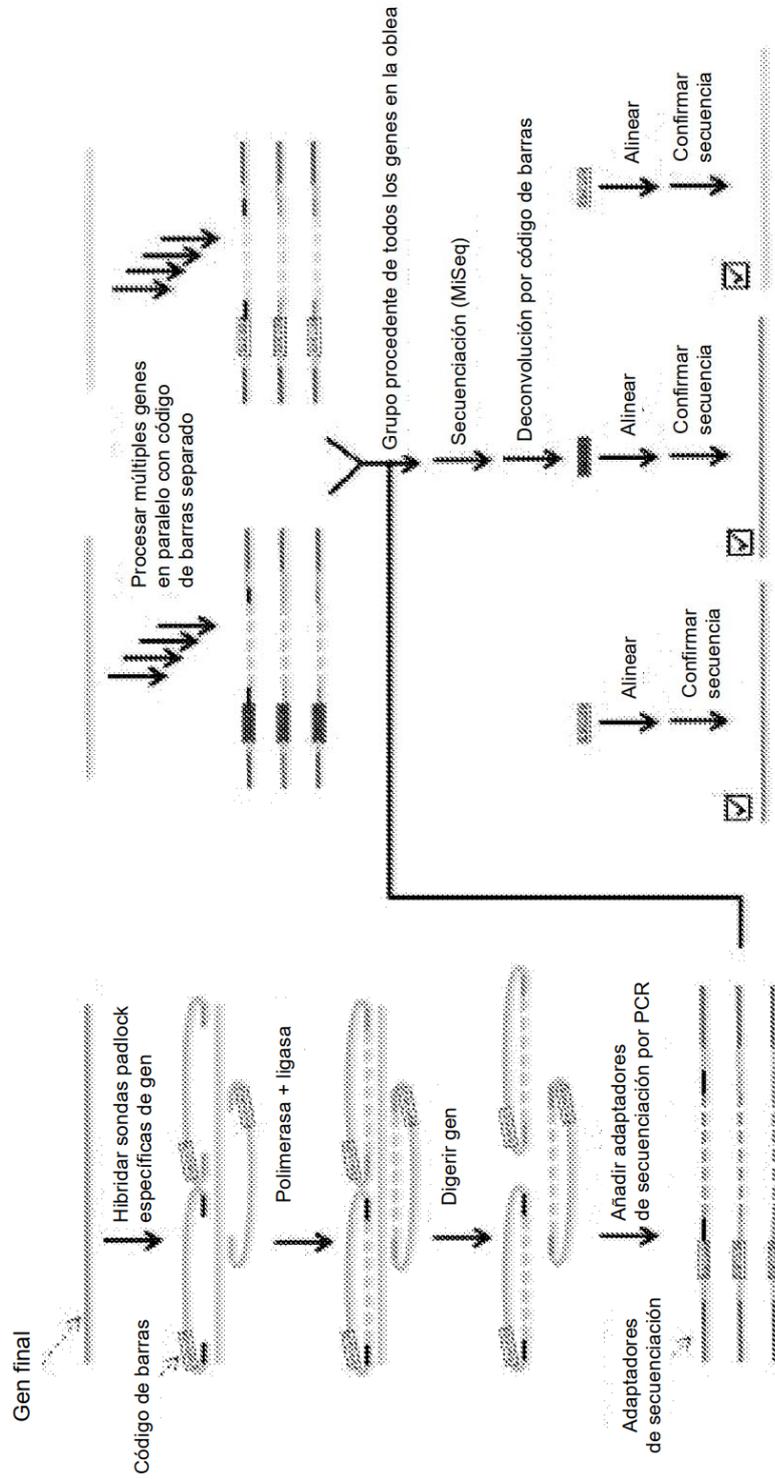
# Figura 16

## Corrección de Errores: Baja Tasa de Errores



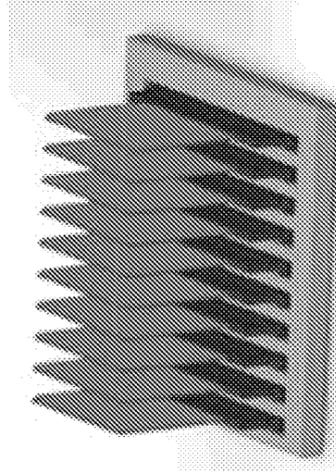
# Figura 17

## Código de Barras Molecular y NGS QC



# Figura 18

## Ensamblaje de inyección de tinta



- \* Ensamblaje de inyección de tinta de 10 cabezales
- \* Los cabezales de inyección de tinta tienen placas de silicio con orificios con 256 boquillas en centros de 254  $\mu\text{m}$
- \* Altura de vuelo de 100 micrómetros
- \* Cada cabezal necesita acceso a cada pocillo que atraviesa

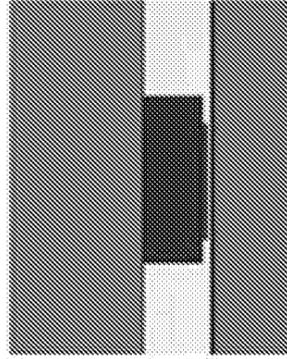
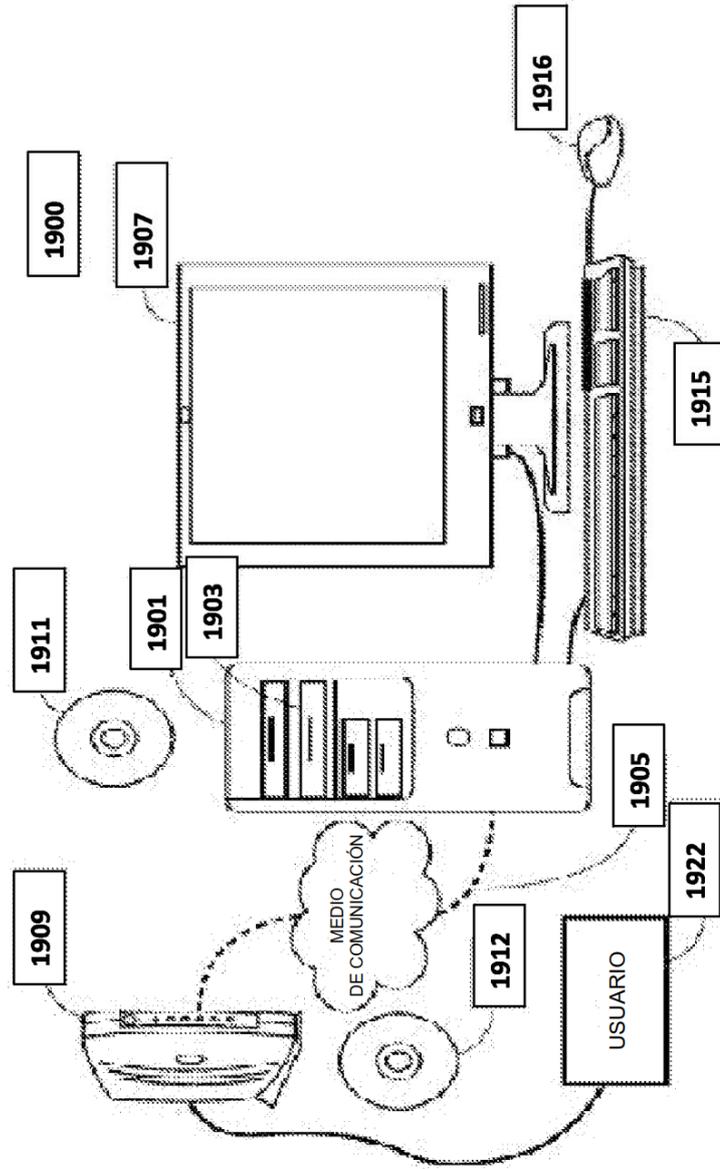
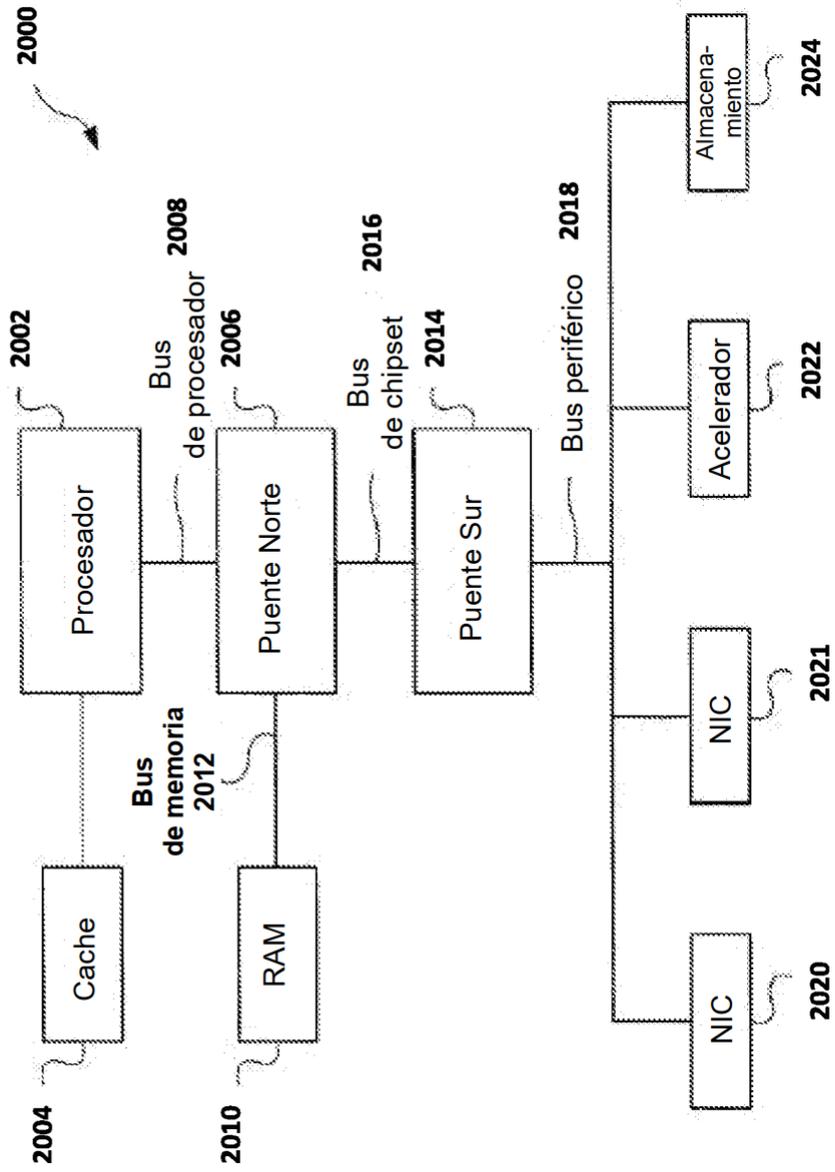


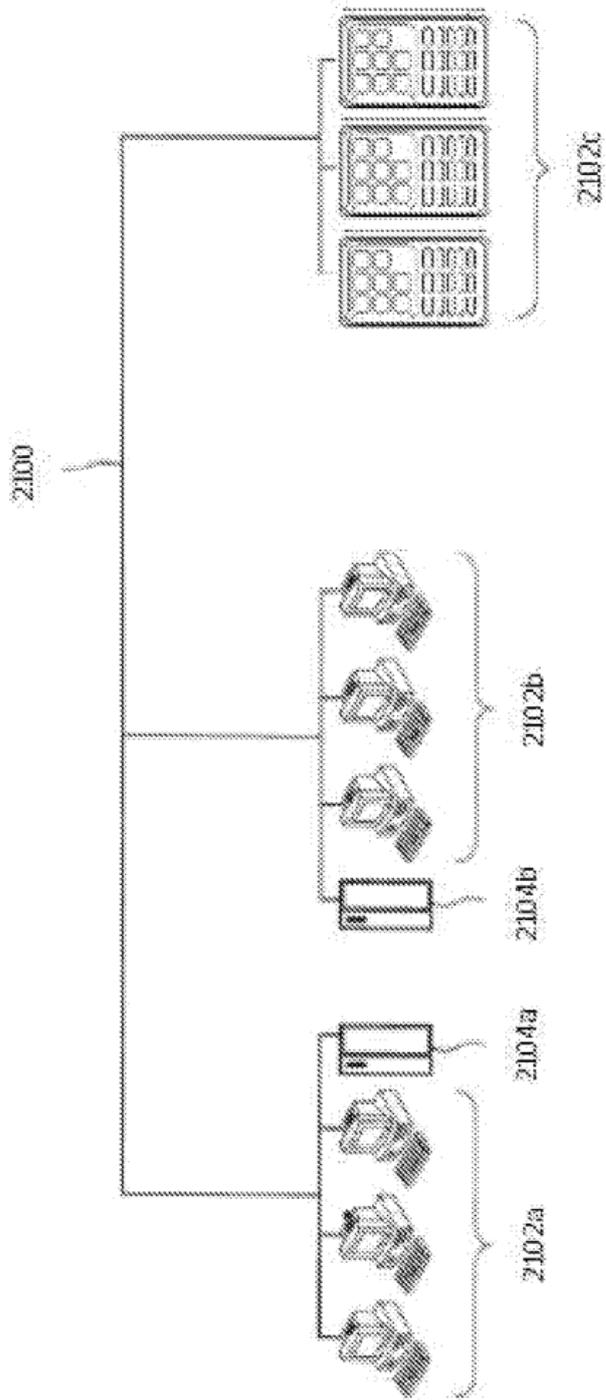
Figura 19



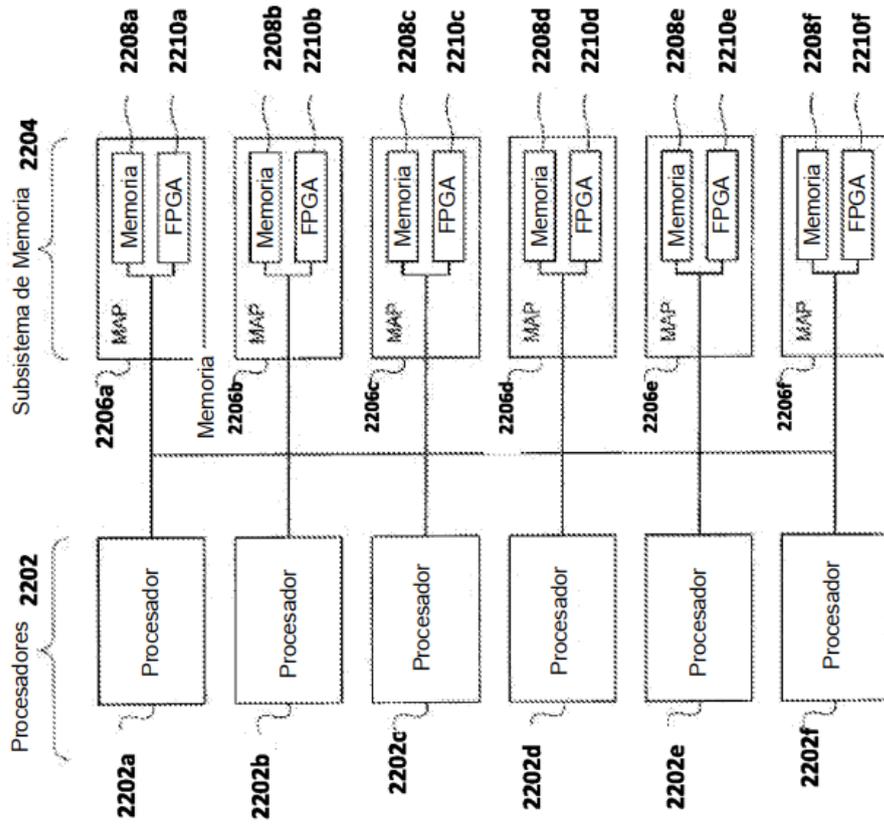
# Figura 20



# Figura 21

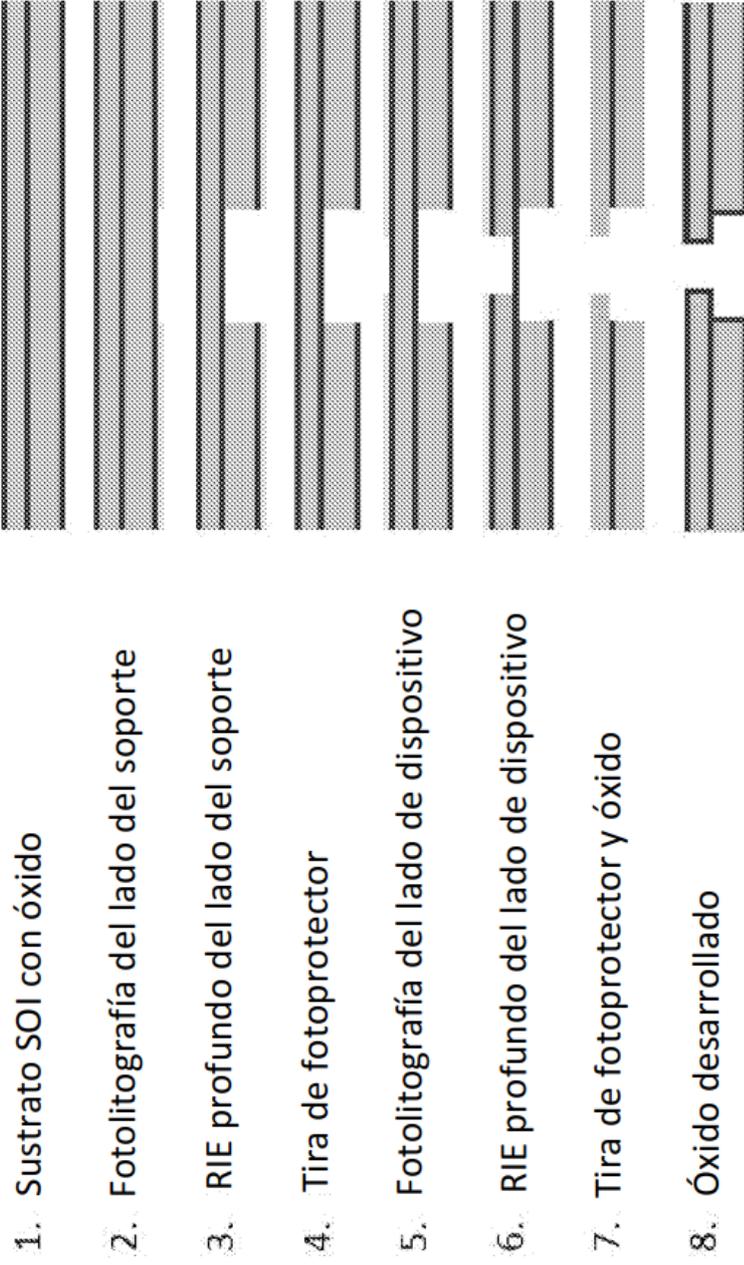


# Figura 22



# Figura 23

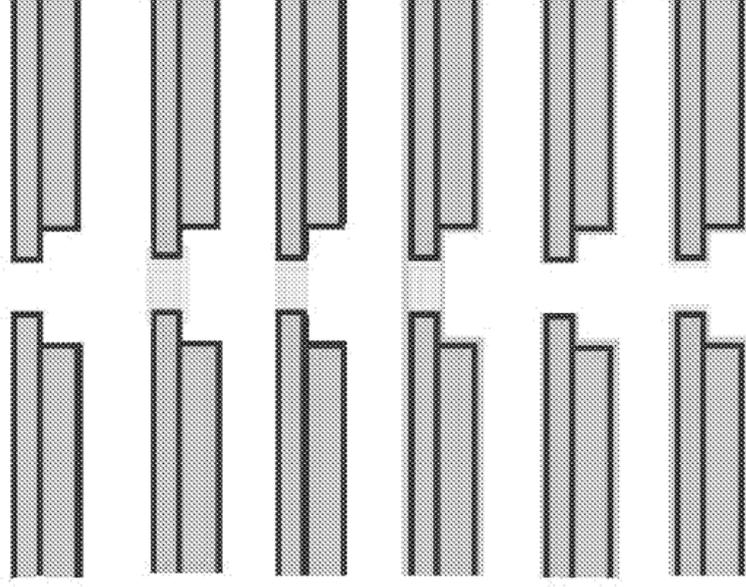
## Procesamiento de Extremo Frontal



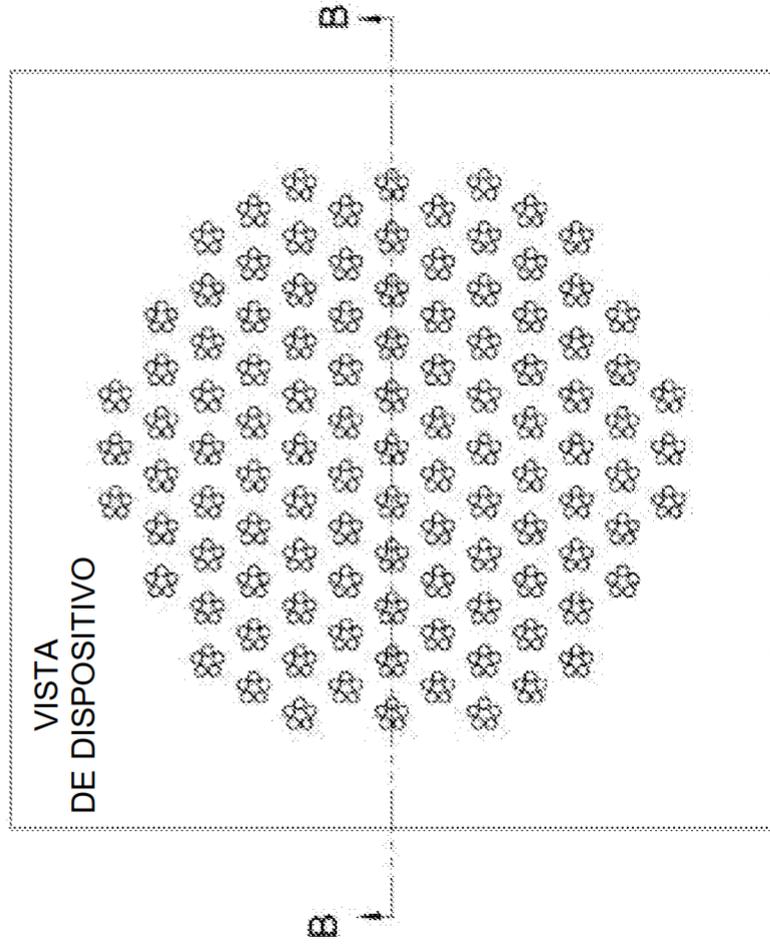
# Figura 24A

## Procesamiento de Extremo Posterior

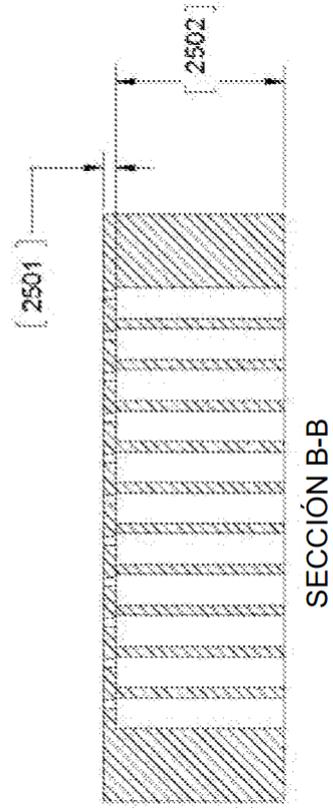
1. Resultado de procesamiento de extremo frontal
2. Inyección de fotoprotector
3. Grabado con plasma de oxígeno en la parte posterior
4. Funcionalización pasiva
5. Eliminación de capa de fotoprotector
6. Funcionalización activa



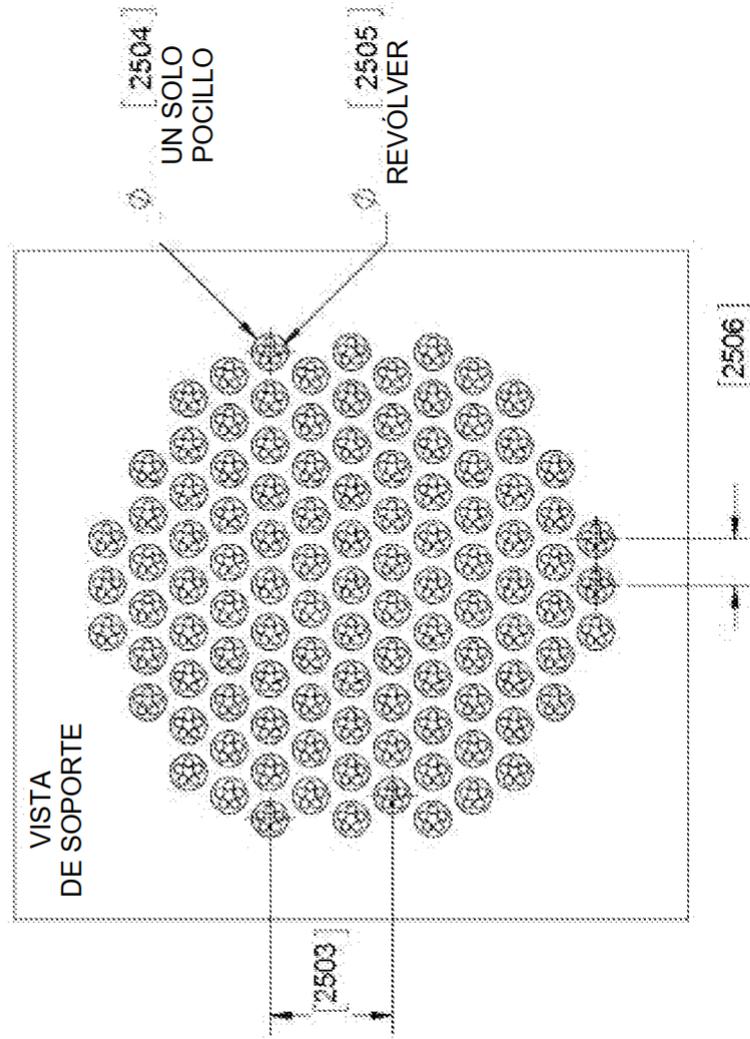
# Figura 25A



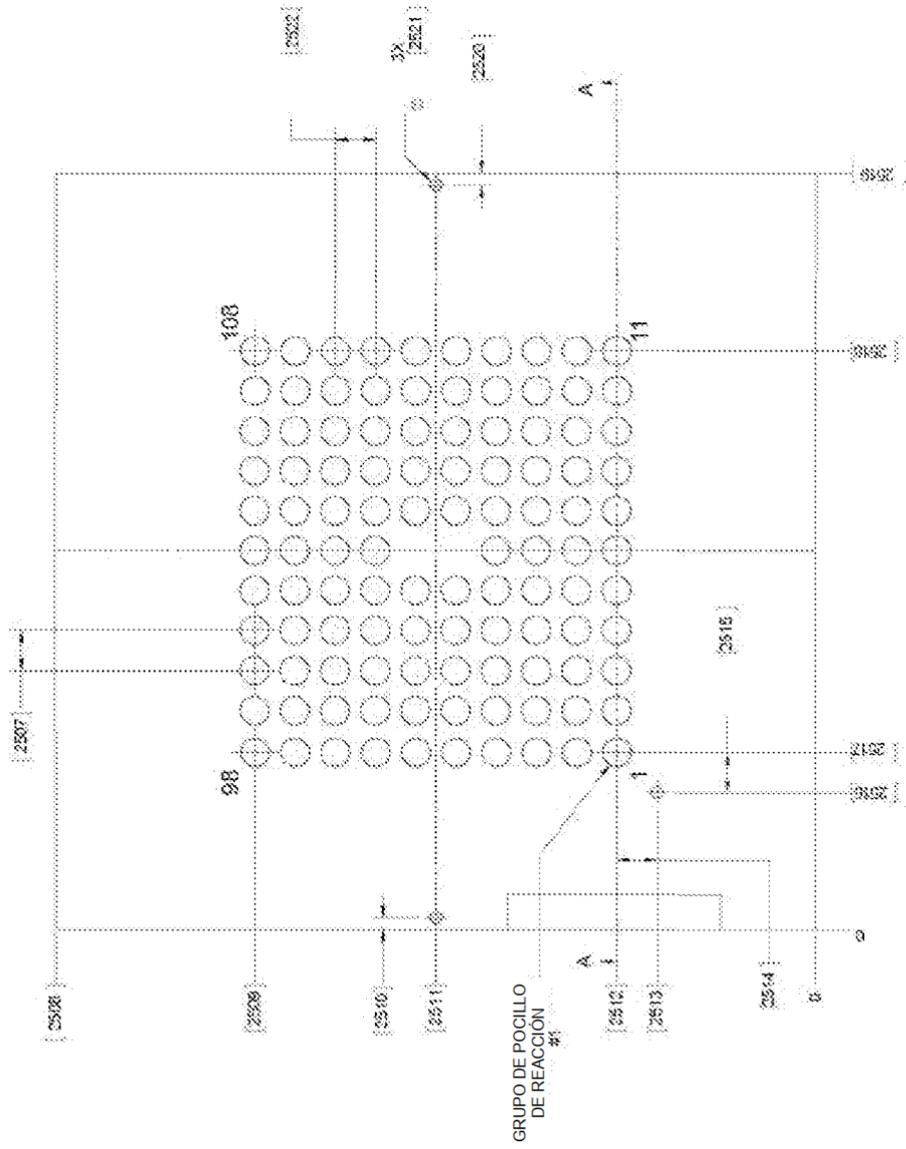
# Figura 25B



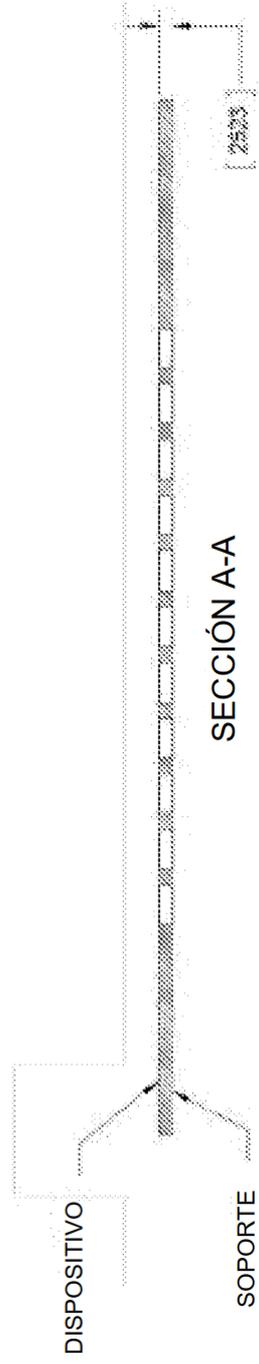
# Figura 25C



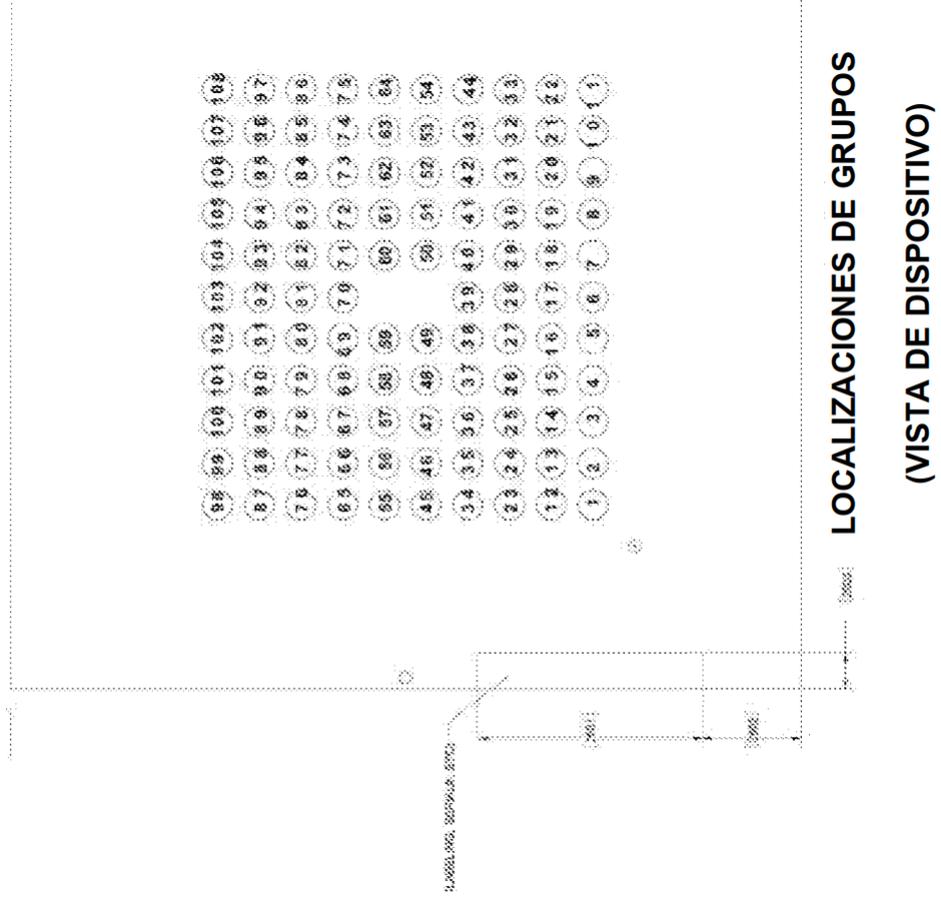
# Figura 25D



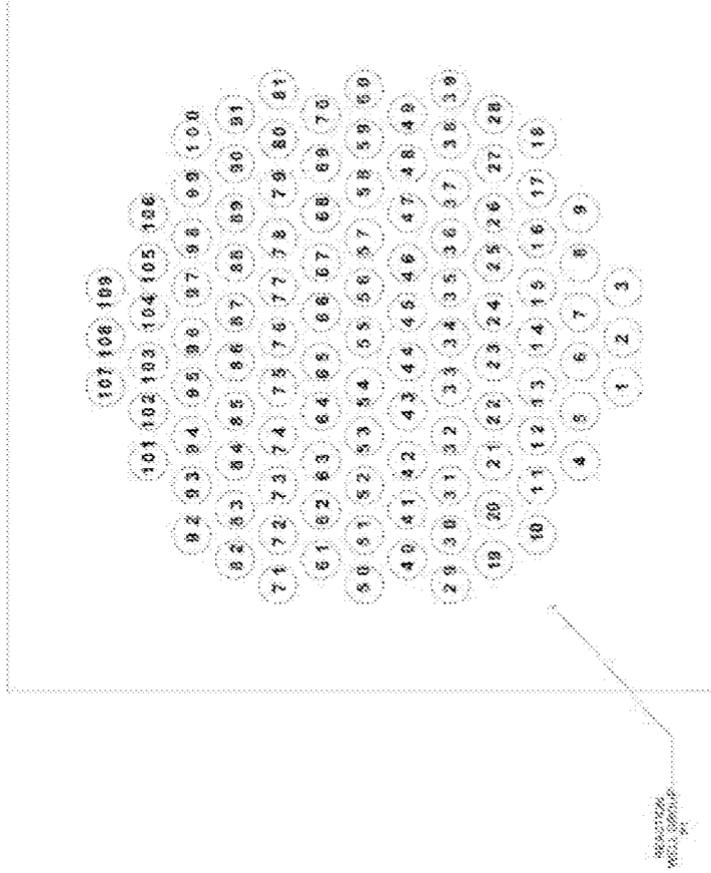
# Figura 25E



# Figura 25F

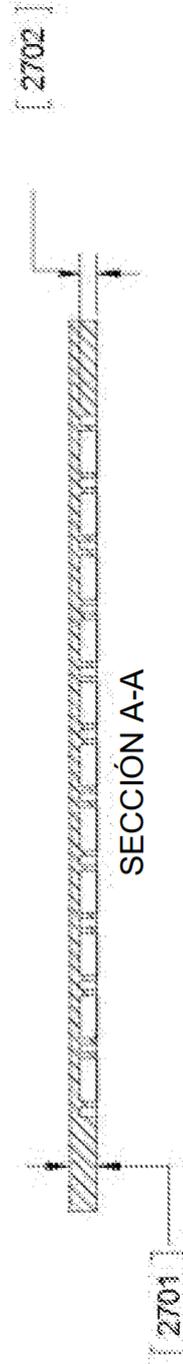


# Figura 25G



**LOCALIZACIONES DE POCILLOS DENTRO  
DE GRUPO INDIVIDUAL  
(VISTA DE DISPOSITIVO)**

# Figura 26A



# Figura 26B

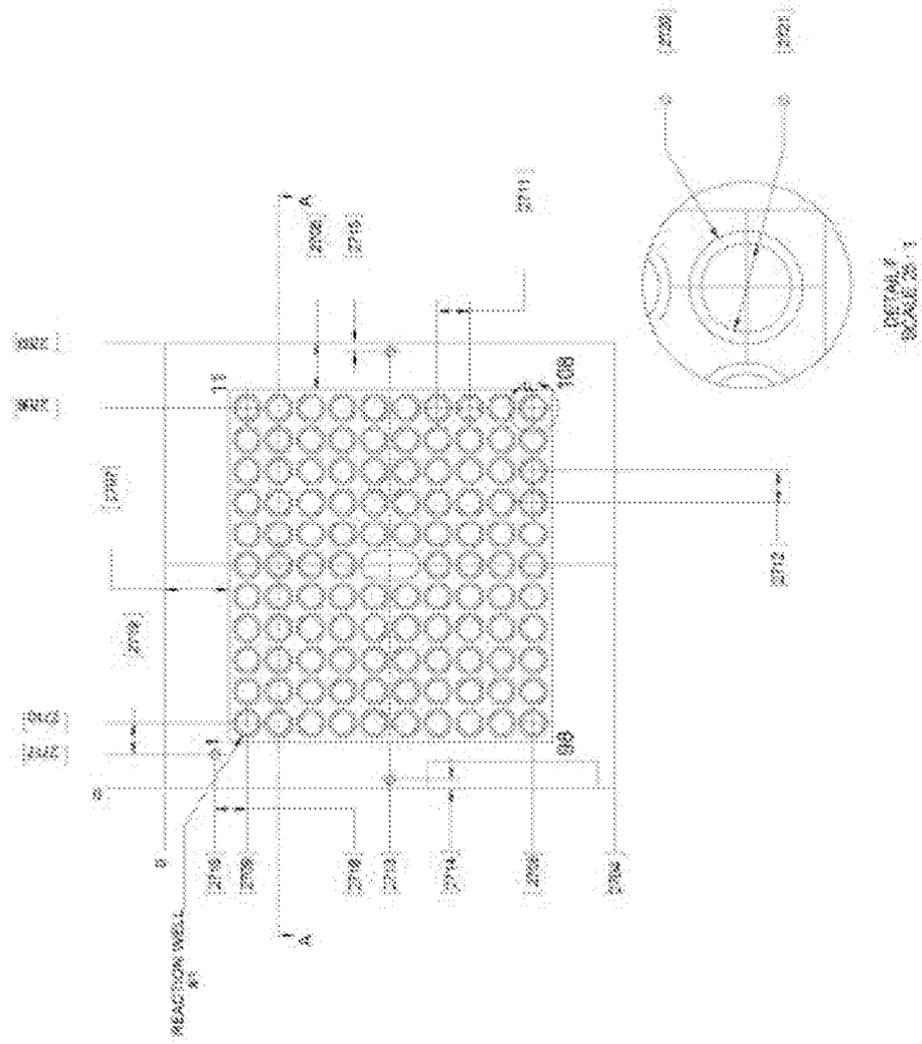
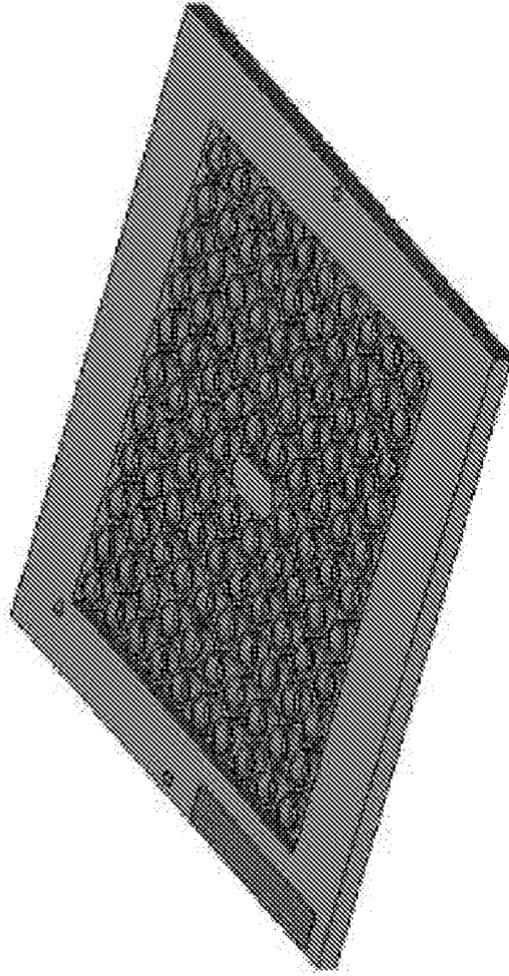
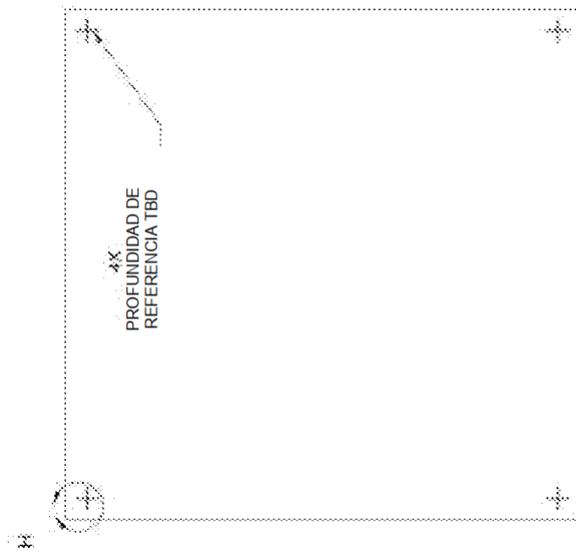
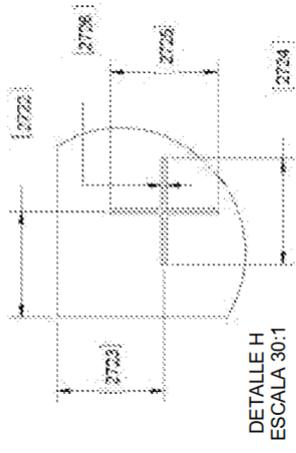


Figura 26C

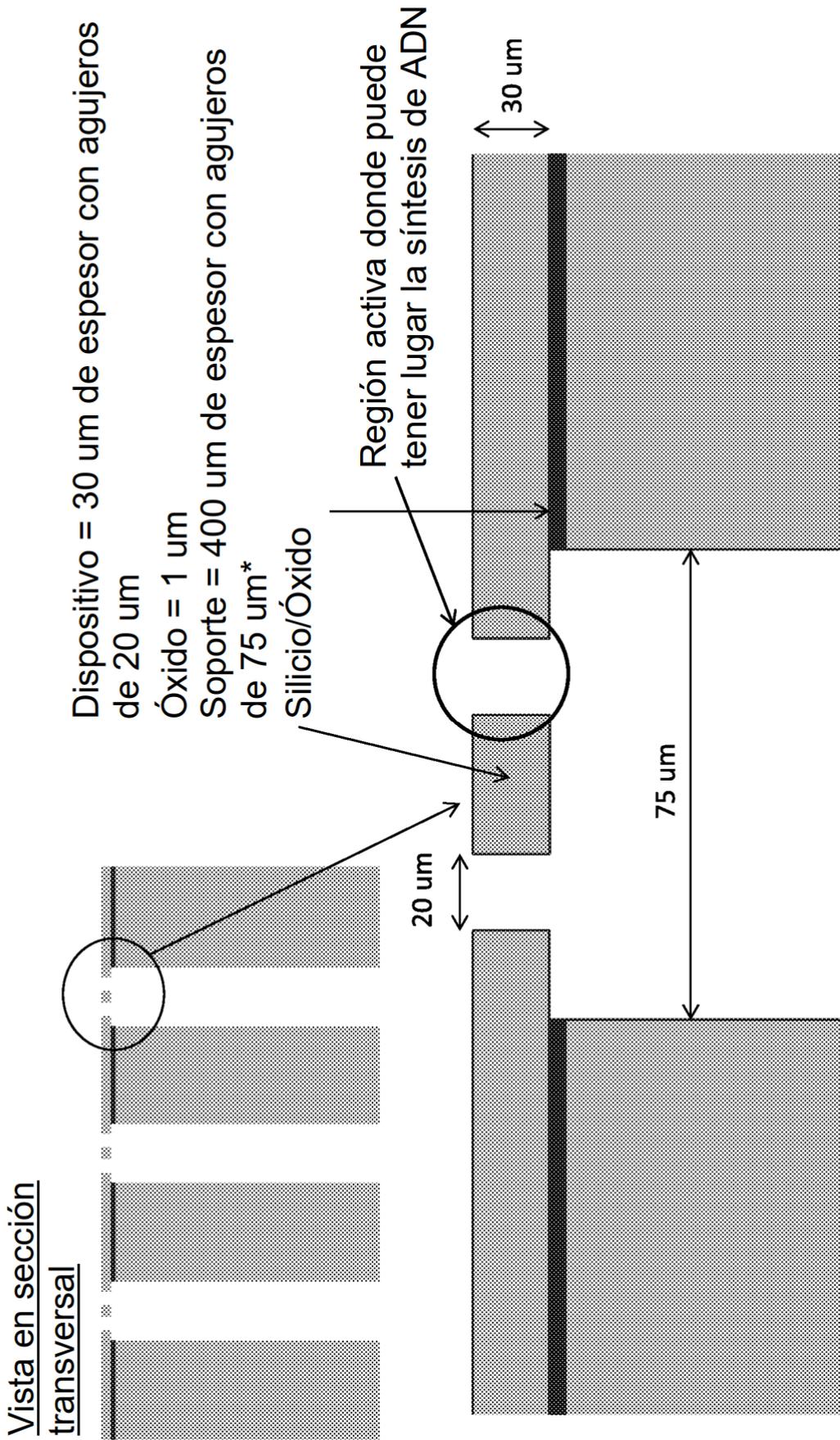


# Figura 26D

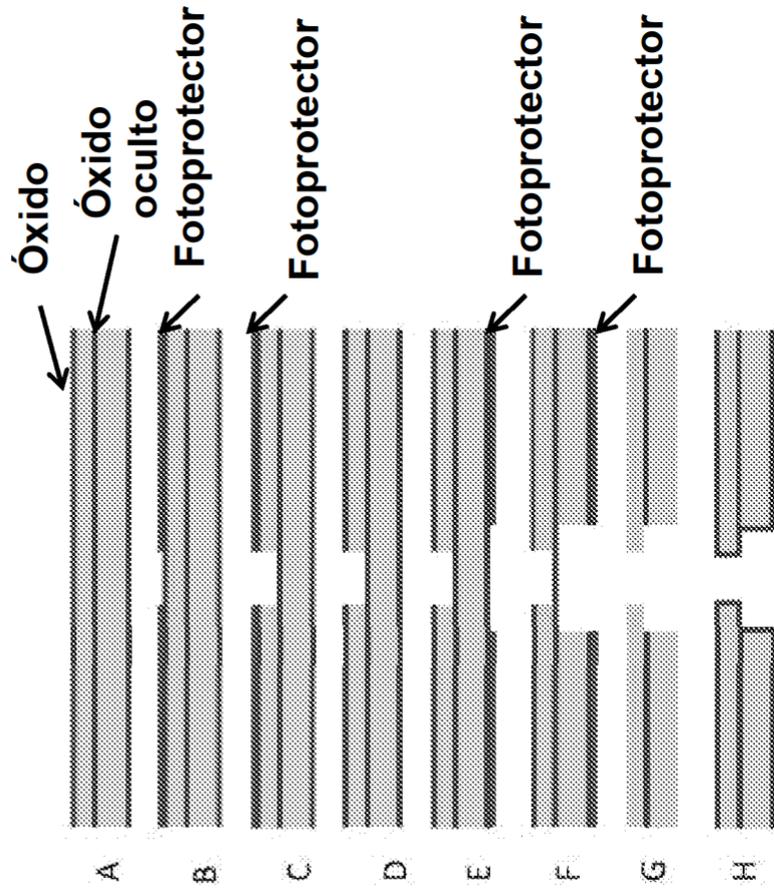




# Figura 27

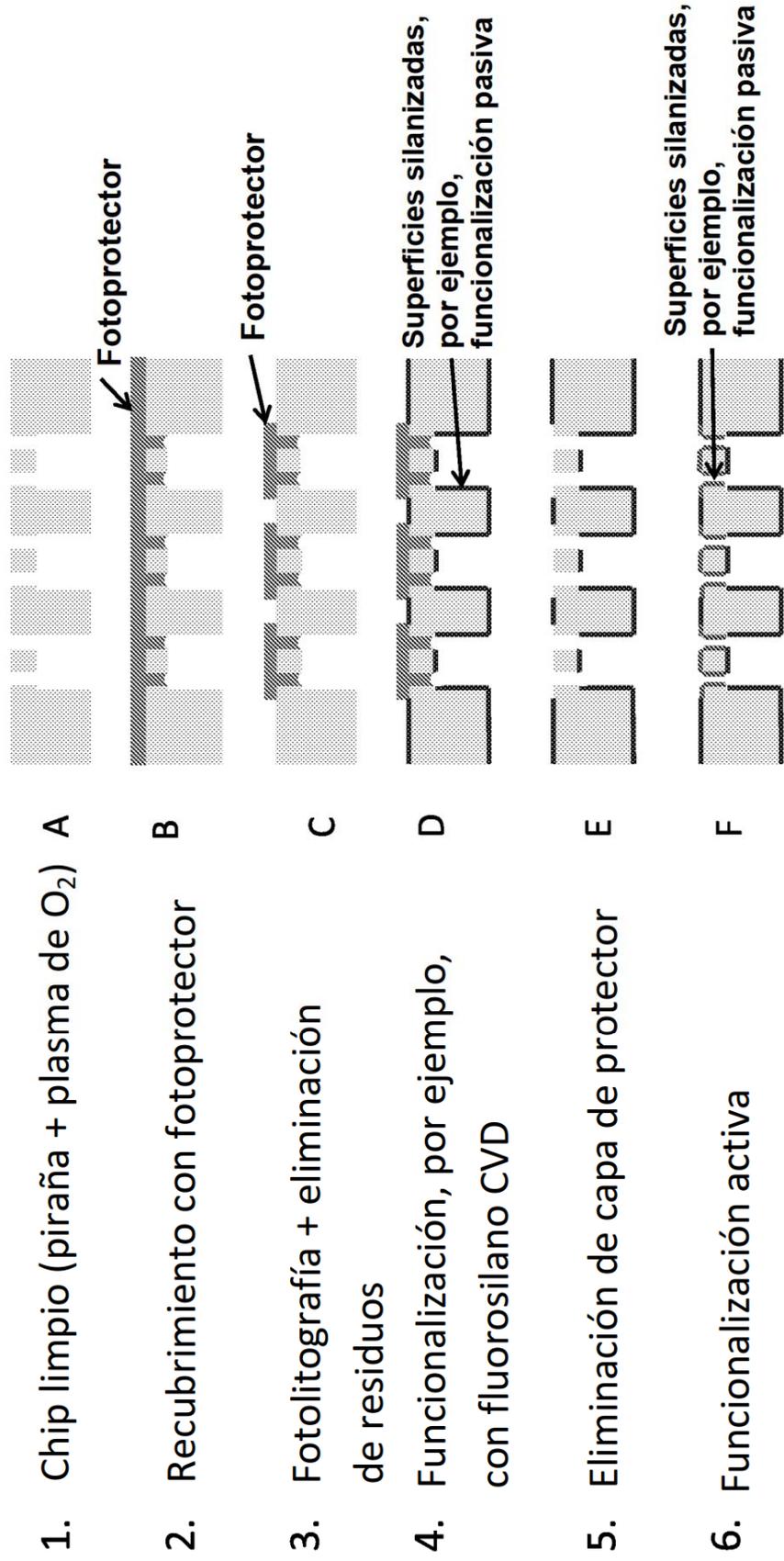


# Figura 28



1. Oxidación de sustrato SOI
2. Fotolitografía del lado del dispositivo
3. RIE profundo del lado del dispositivo
4. Eliminación de capa de fotoprotector
5. Fotolitografía del lado de soporte
6. RIE profundo del lado de soporte
7. Tira de fotoprotector y óxido y grabado BOX
8. Oxidación/eliminación/oxidación

# Figura 29



# Figura 30

## Funcionalización activa

- Diluir la concentración de grupos hidroxilo en una gran pluralidad de grupos pasivos mediante aplicación de silanos mixtos

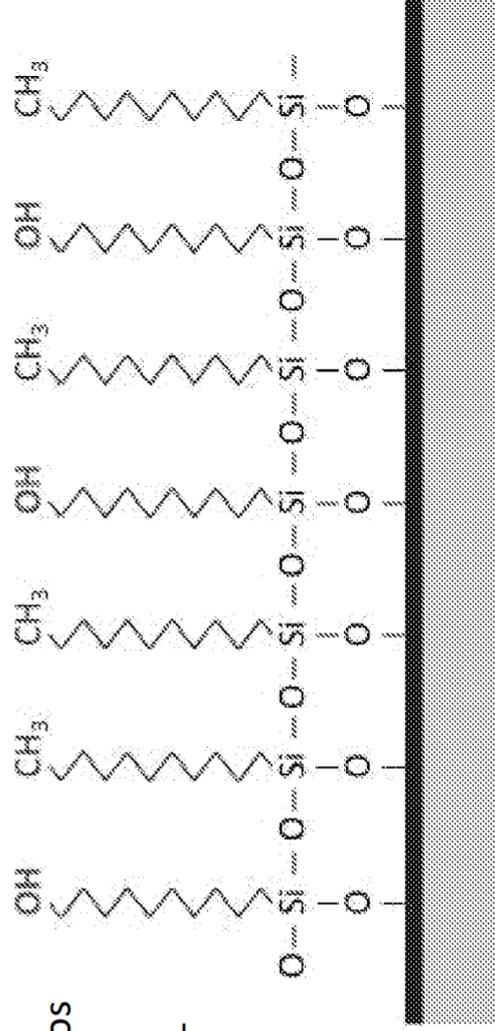
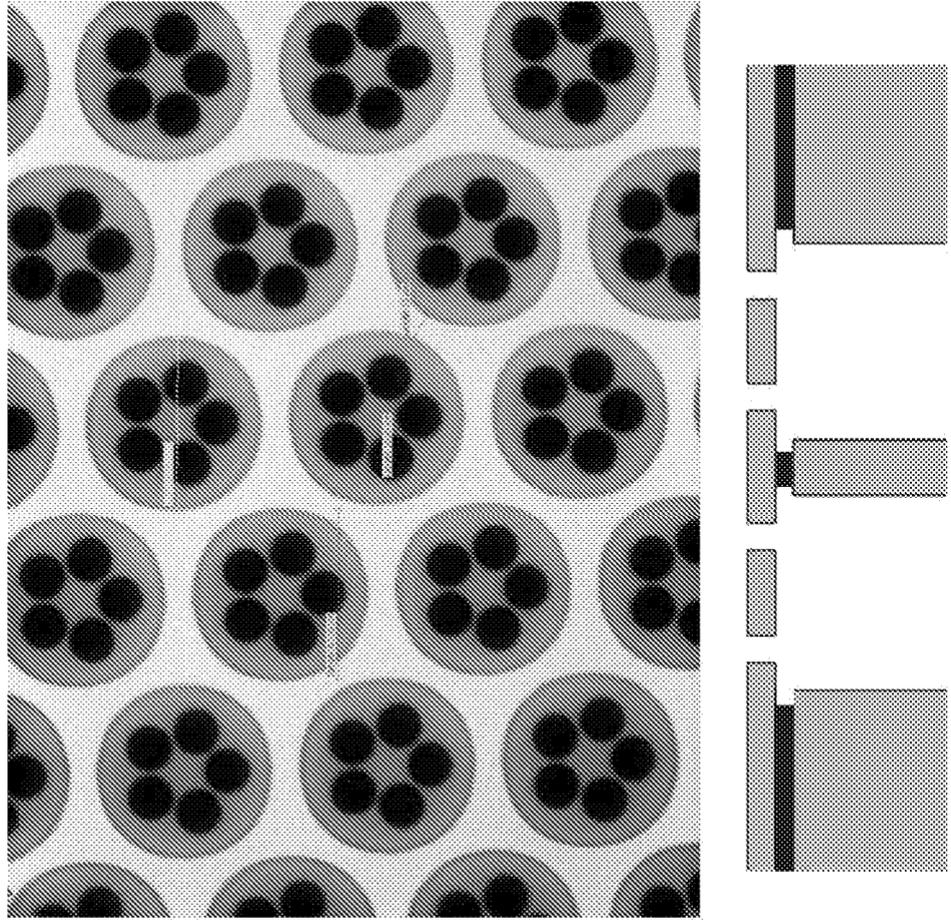


Figura 31

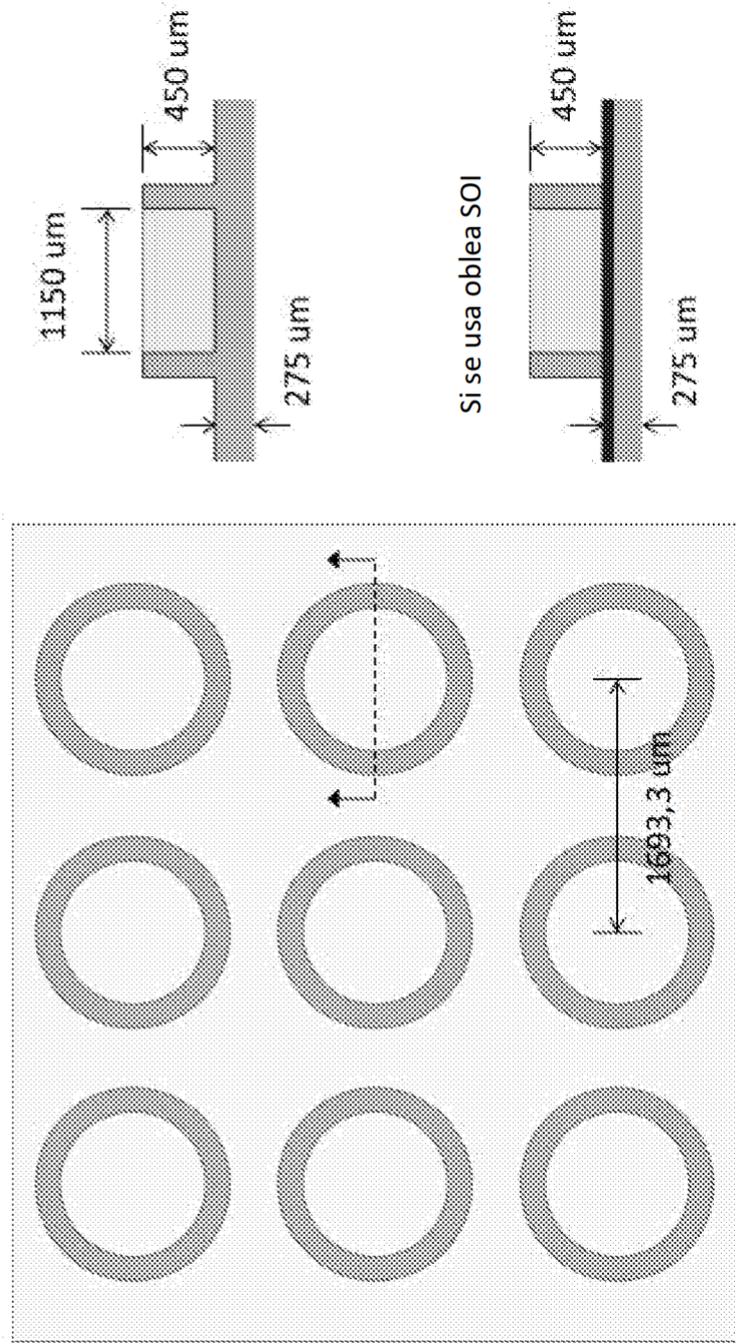


A

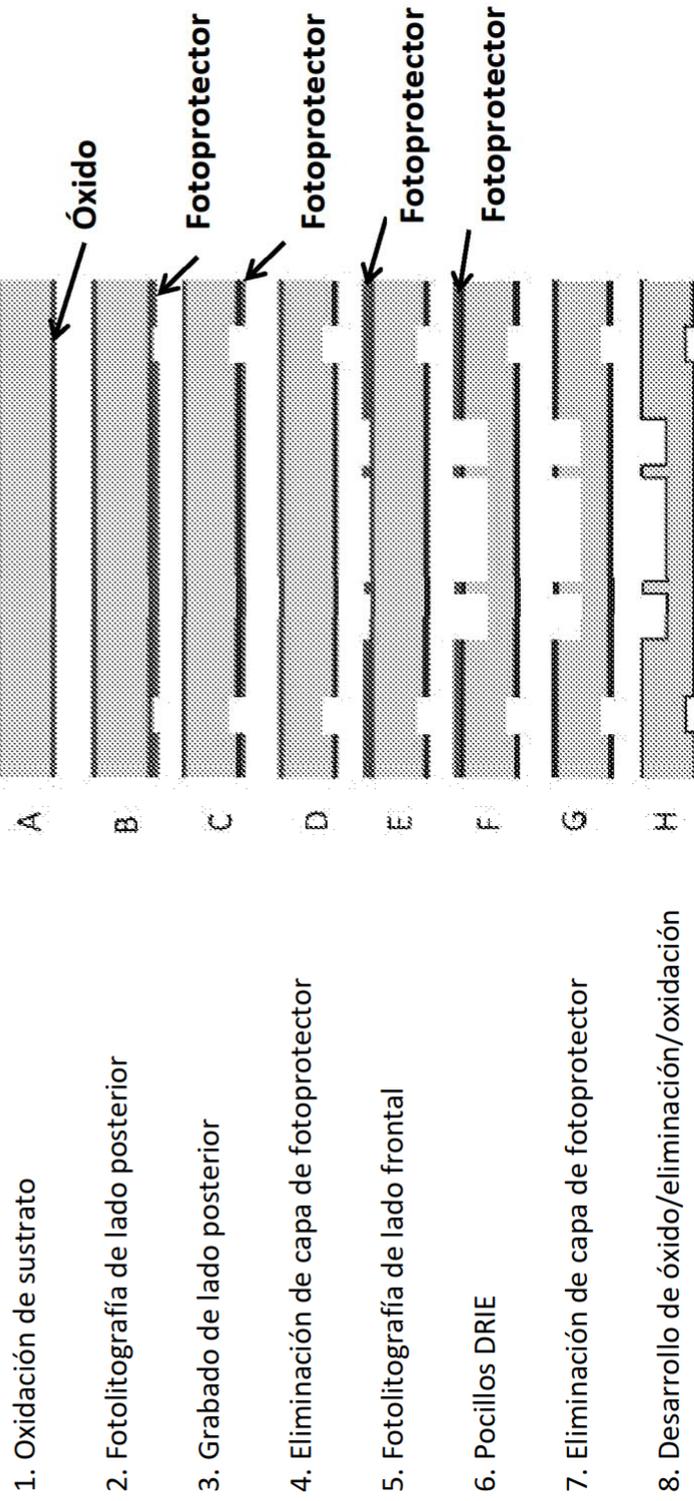
B

# Figura 32

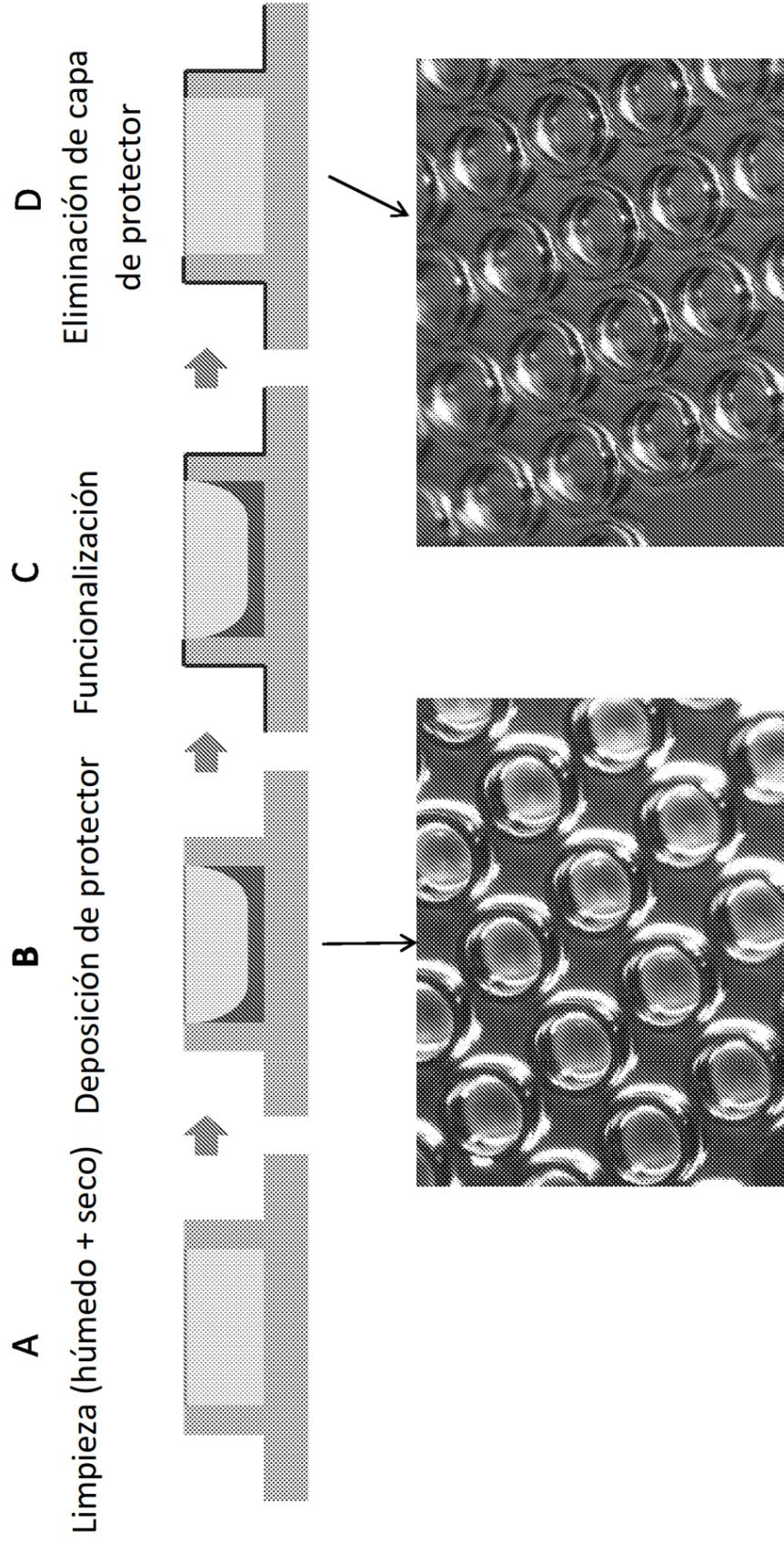
## Estructura de Chip de Nanopocillos



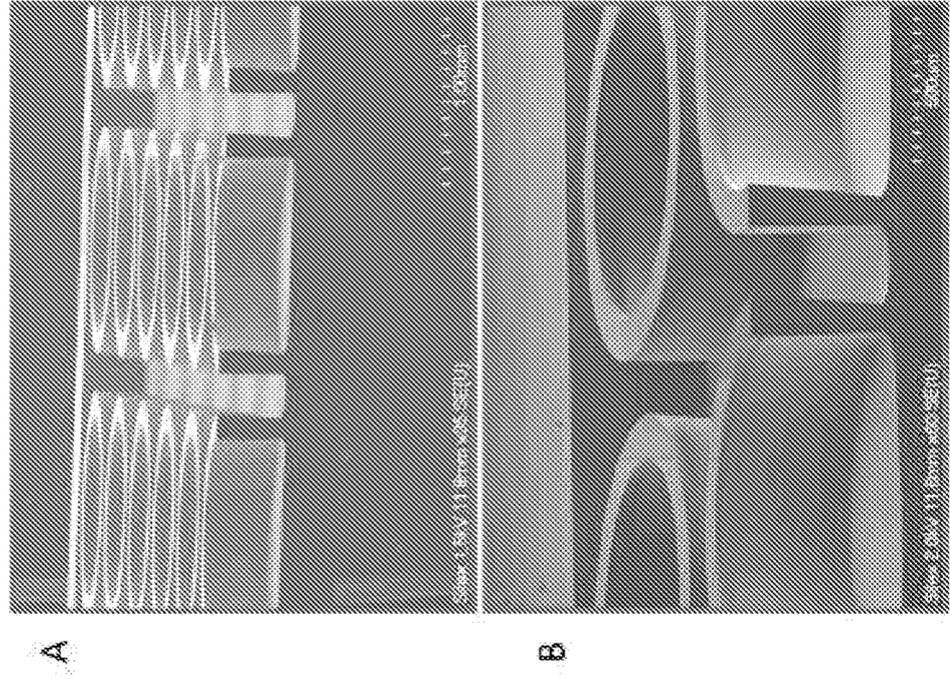
# Figura 33



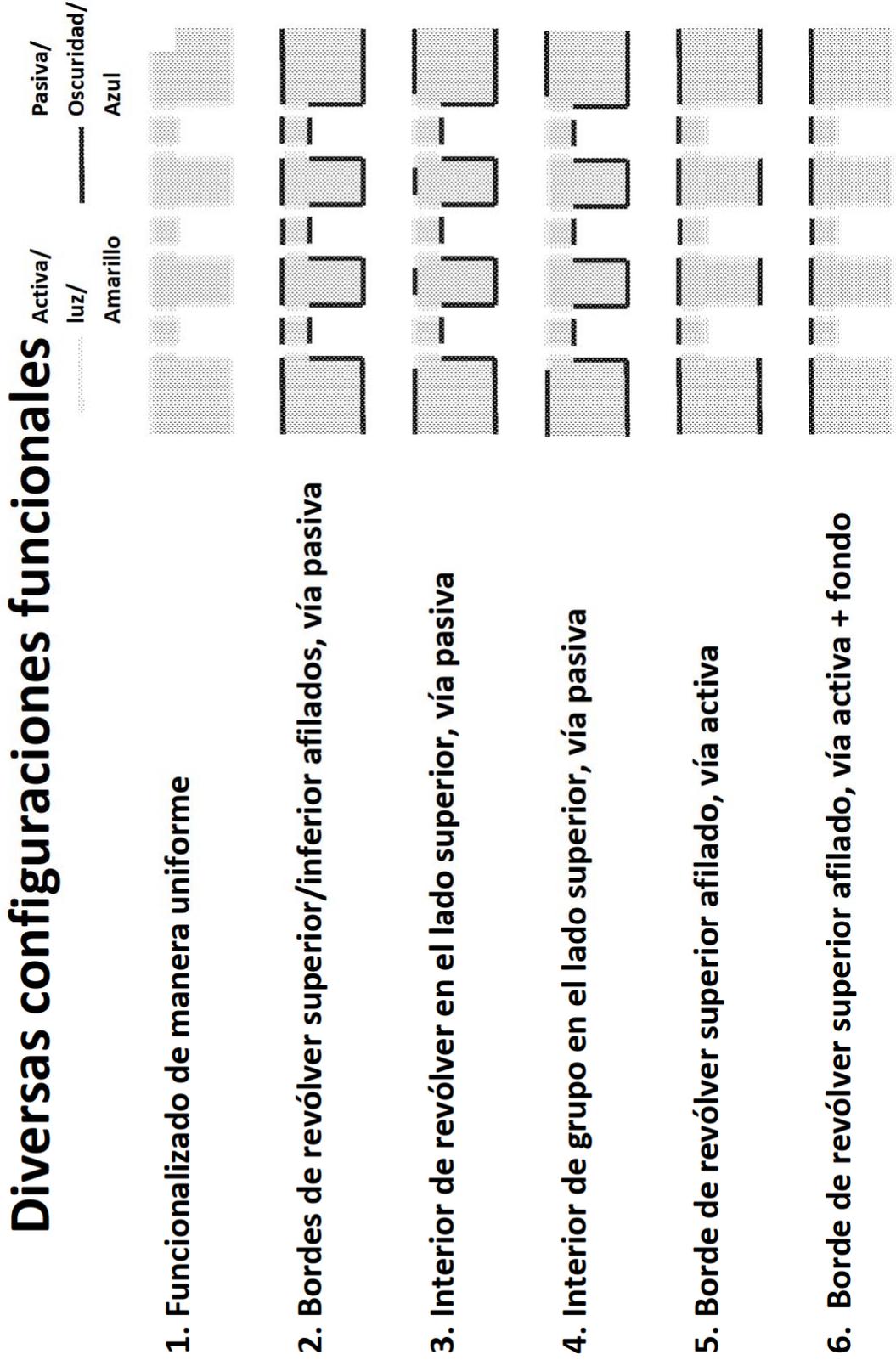
# Figura 34



# Figura 35

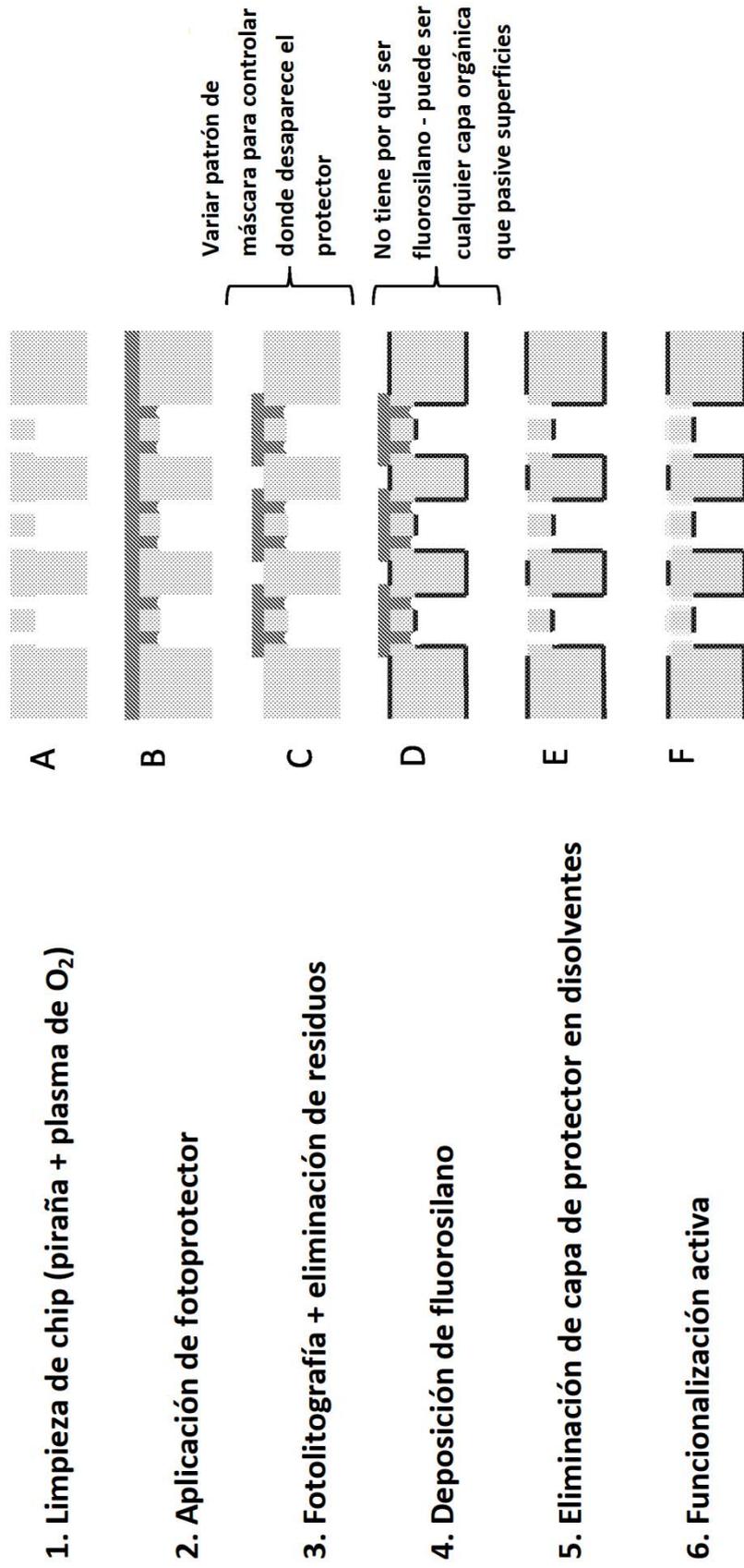


# Figura 36



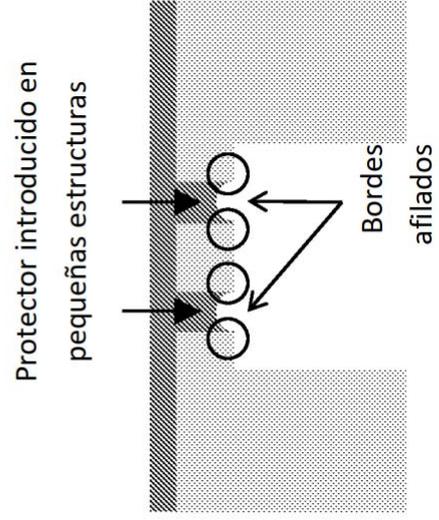
**Figura 37**

**Flujo de Proceso A (para config 2 - 4)**

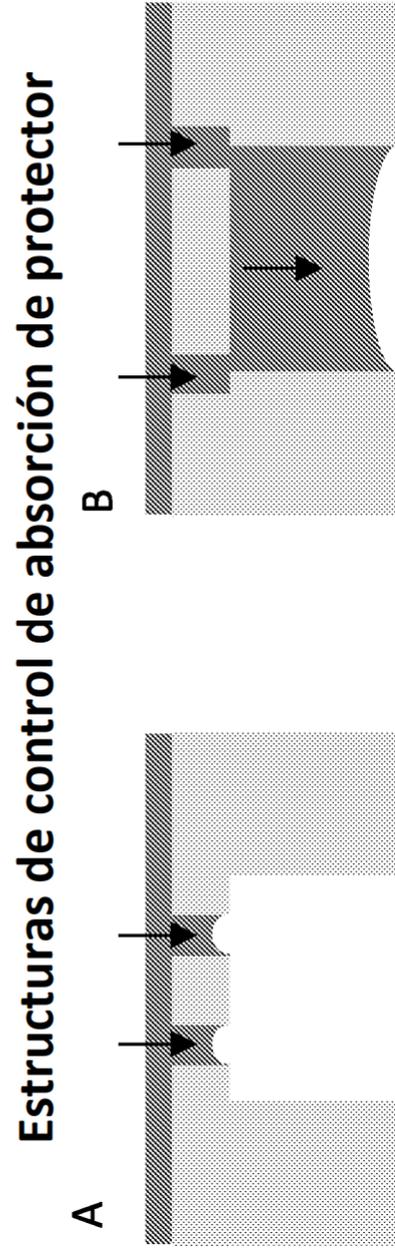


**Figura 38**

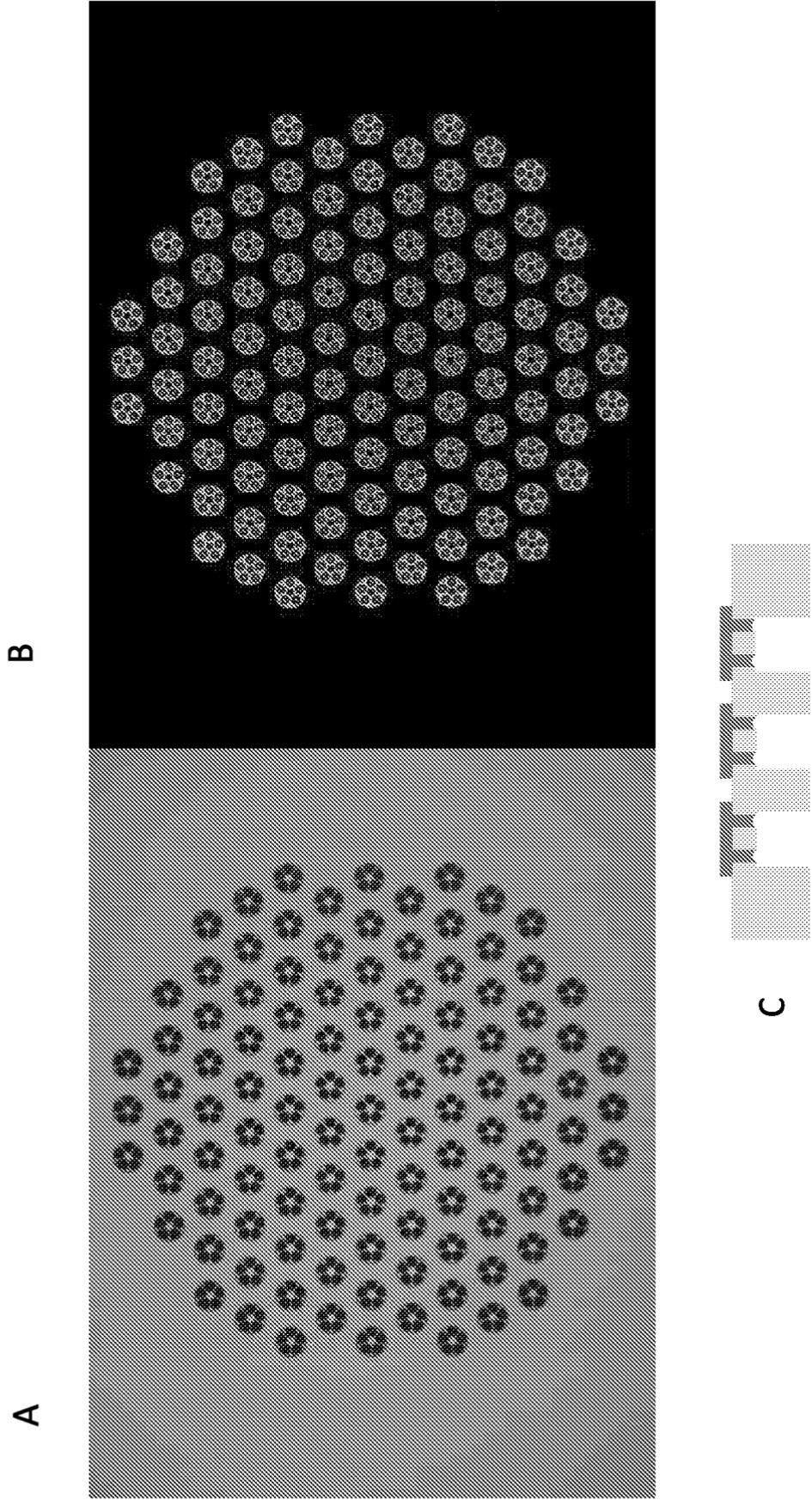
**Proceso de control de absorción de protector**



**Figura 39**



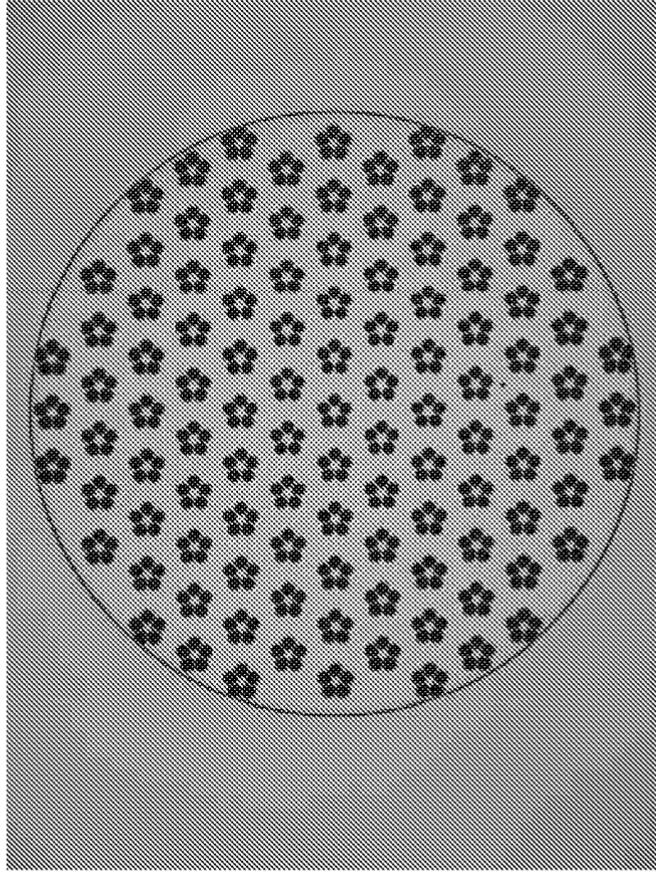
**Figura 40**  
**Patrones de protector después de la litografía**



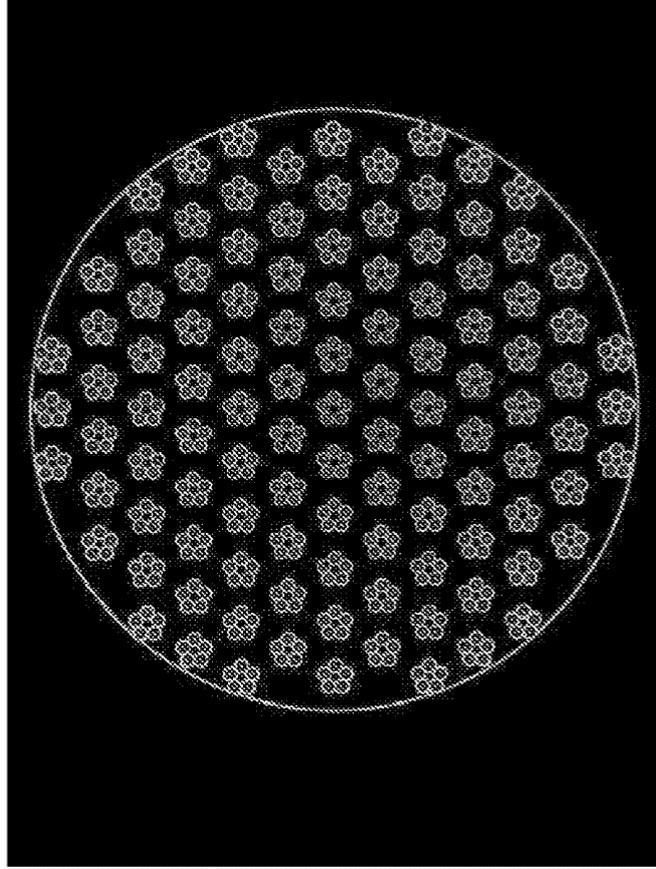
**Figura 41**

**Patrones de protector después de la litografía**

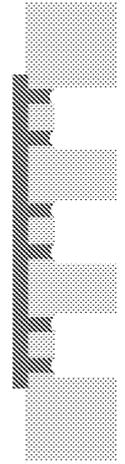
A



B

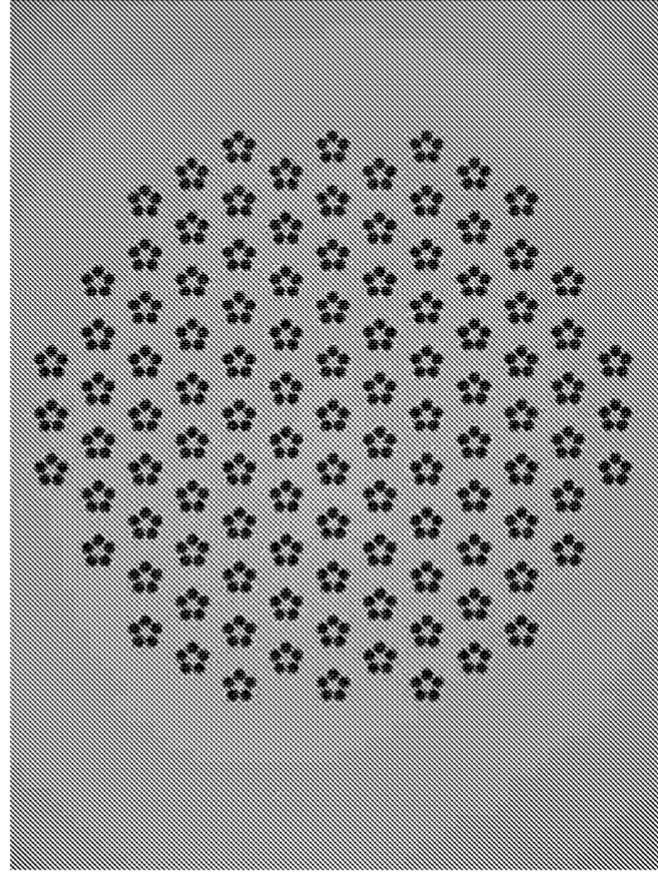


C

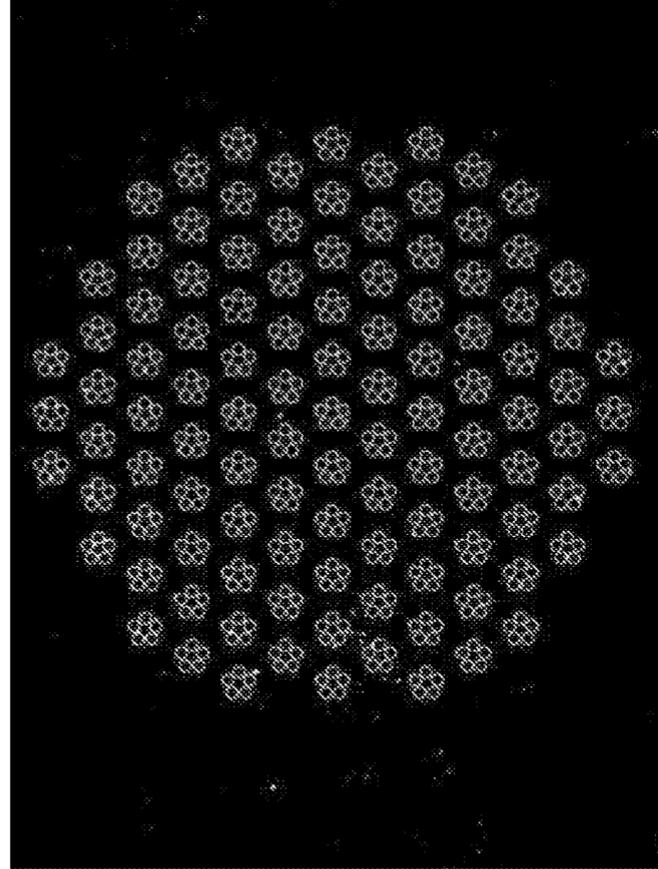


**Figura 42**  
**Después de eliminación de capa de protector**  
**(después de fluoración)**

A



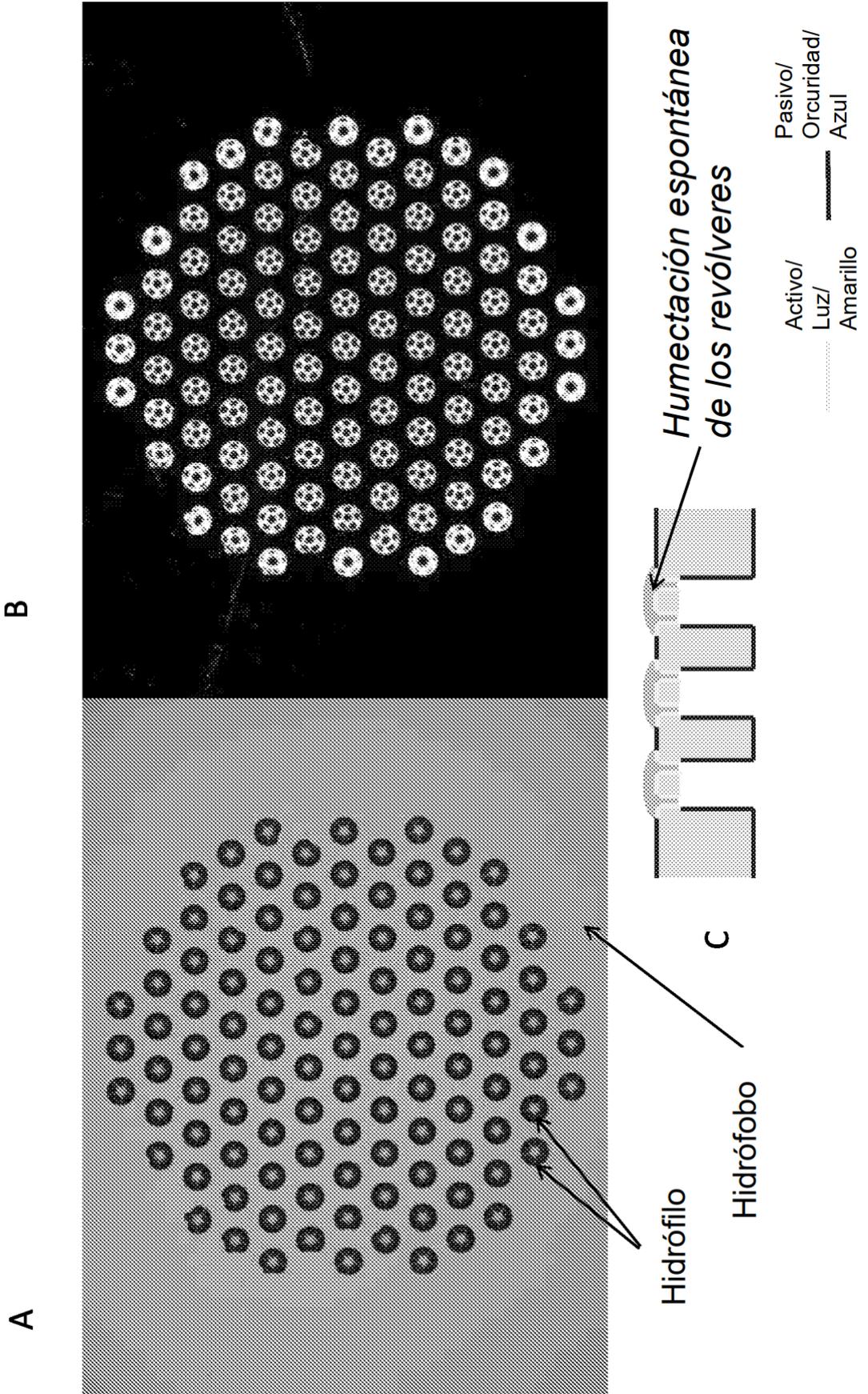
B



C



**Figura 43**  
**Chip de queratina completamente cargado con DMSO**



# Figura 44

## Flujo de Proceso B (para config 6)

1. Limpieza de chip  
(piraña + plasma de O<sub>2</sub>)
2. Funcionalización pasiva
3. Aplicación de protector
4. Fitolitografía + grabado
5. Eliminación de capa de protector
6. Funcionalización activa

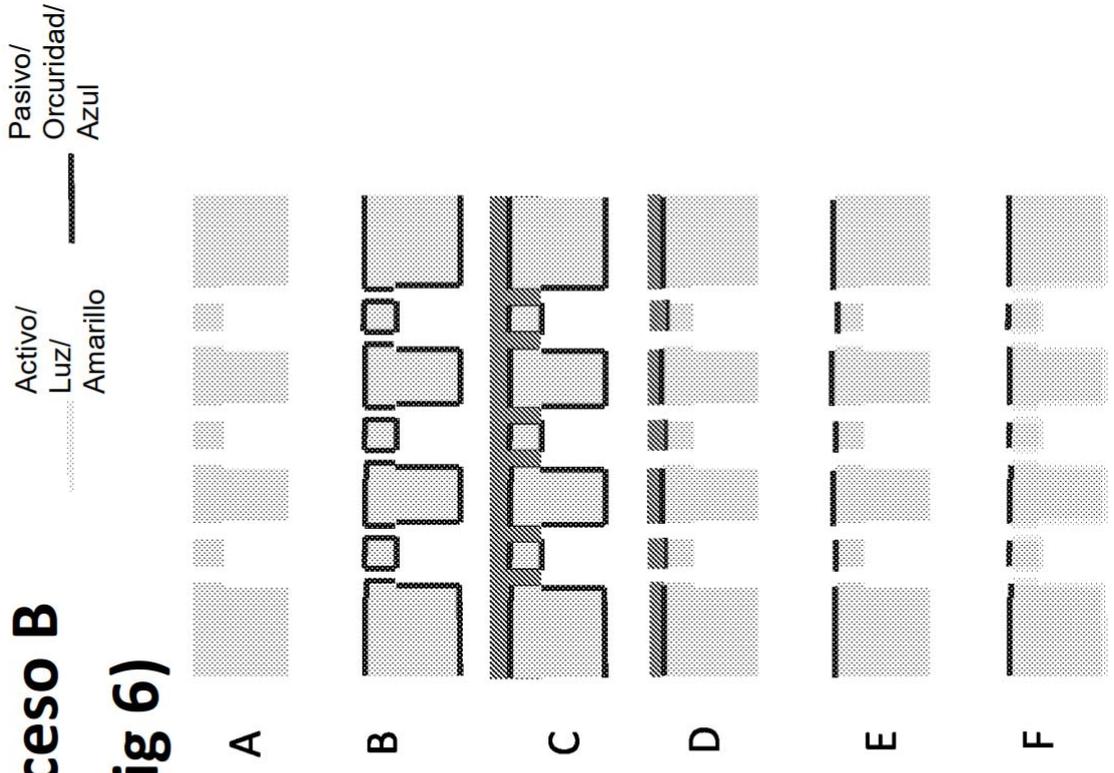
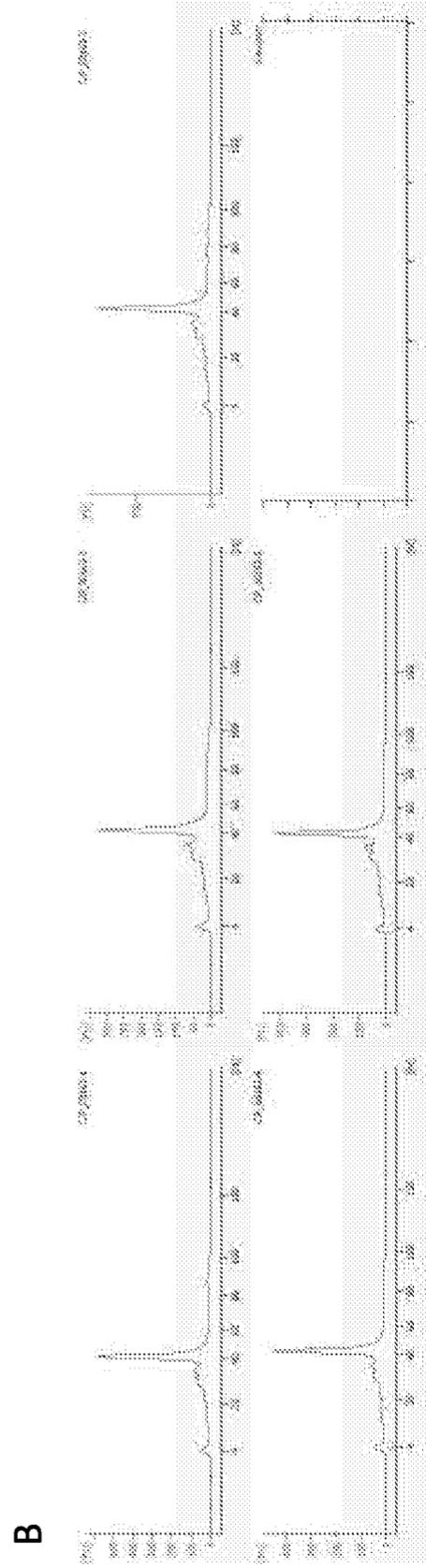
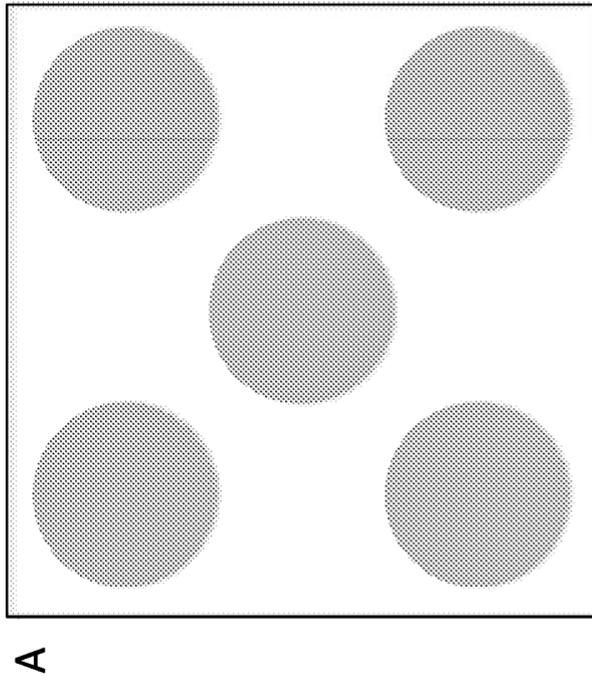


Figura 45



**Figura 46**

**Síntesis de una secuencia de 100 unidades en dispositivo  
de síntesis de oligonucleótidos 2D**

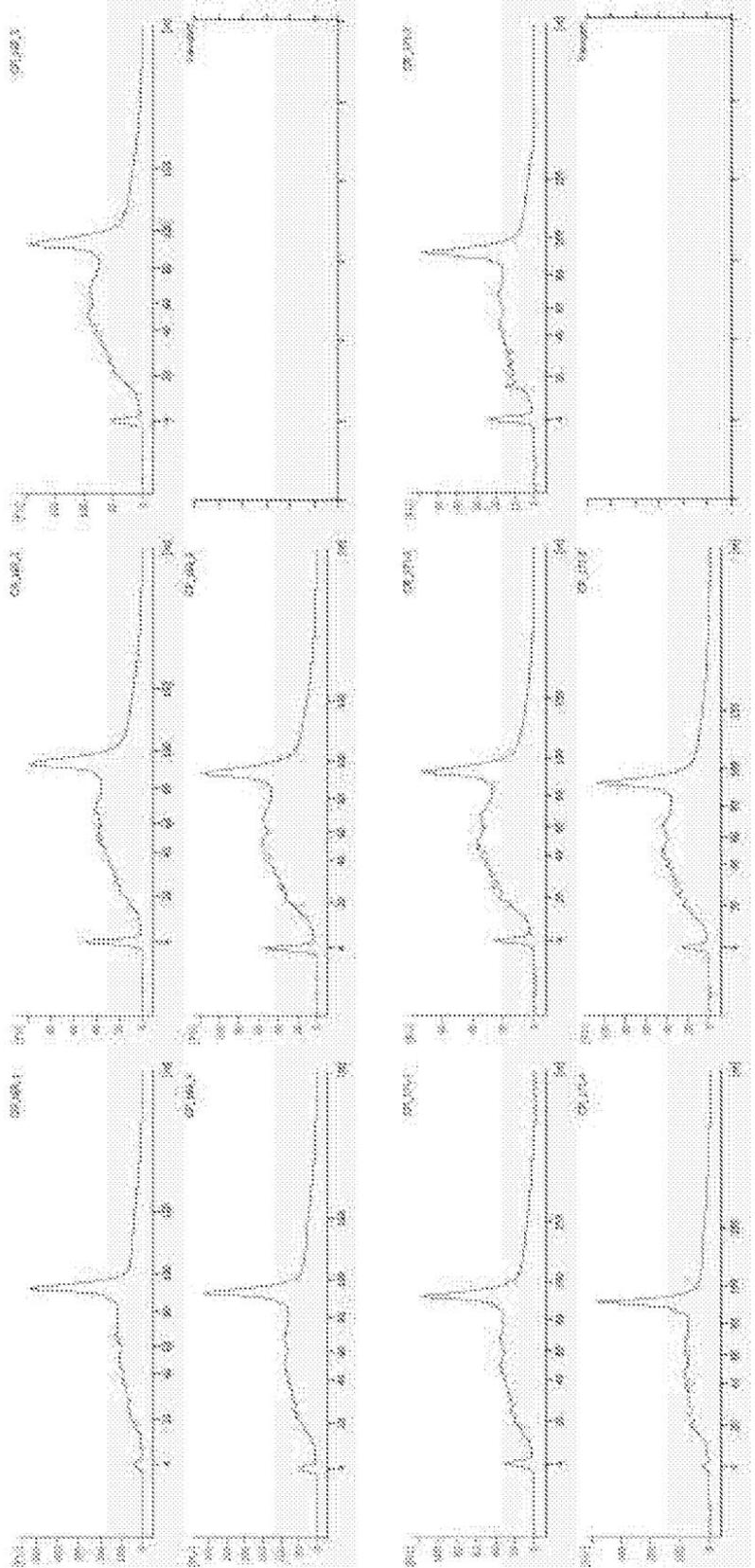
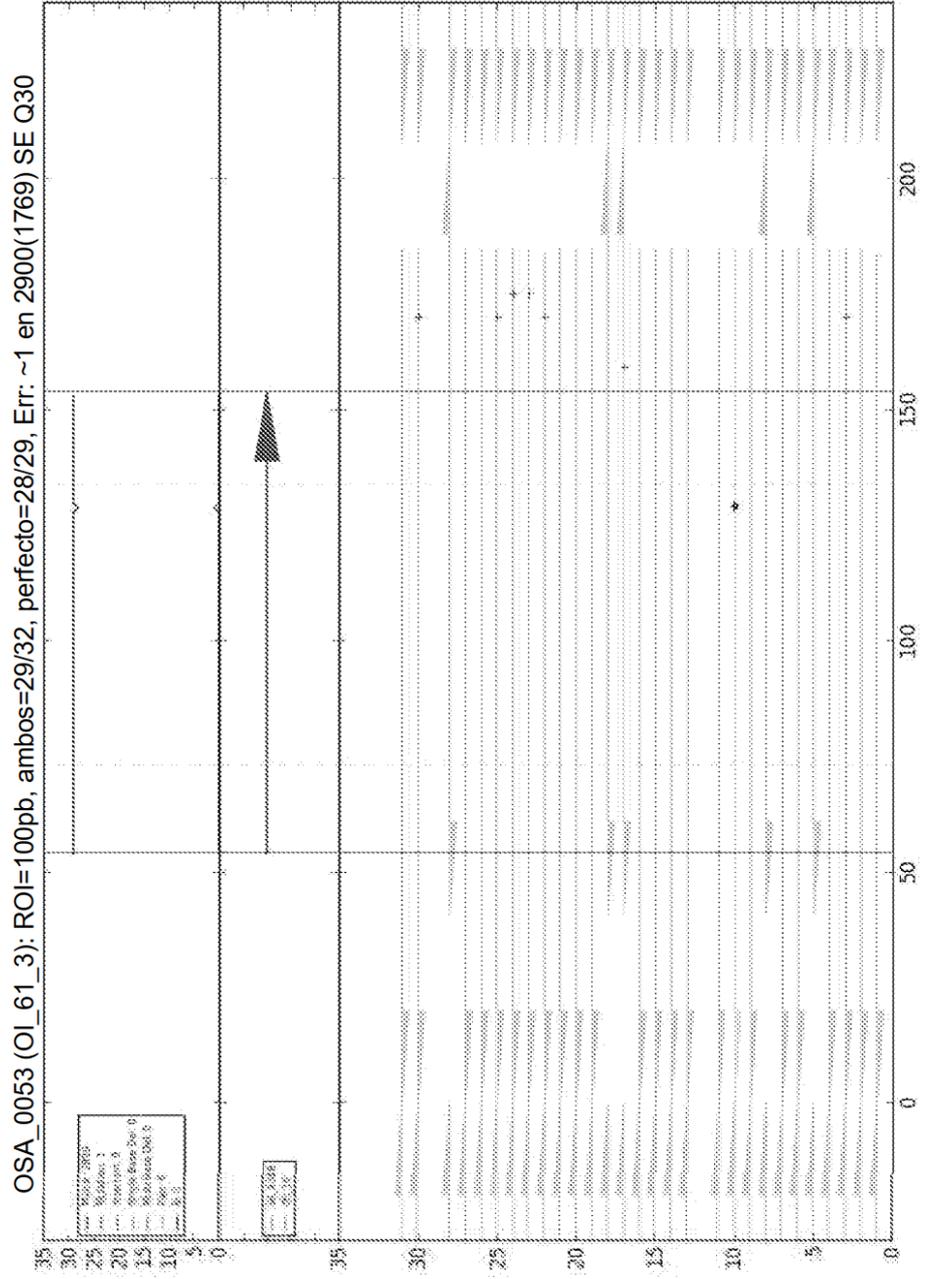




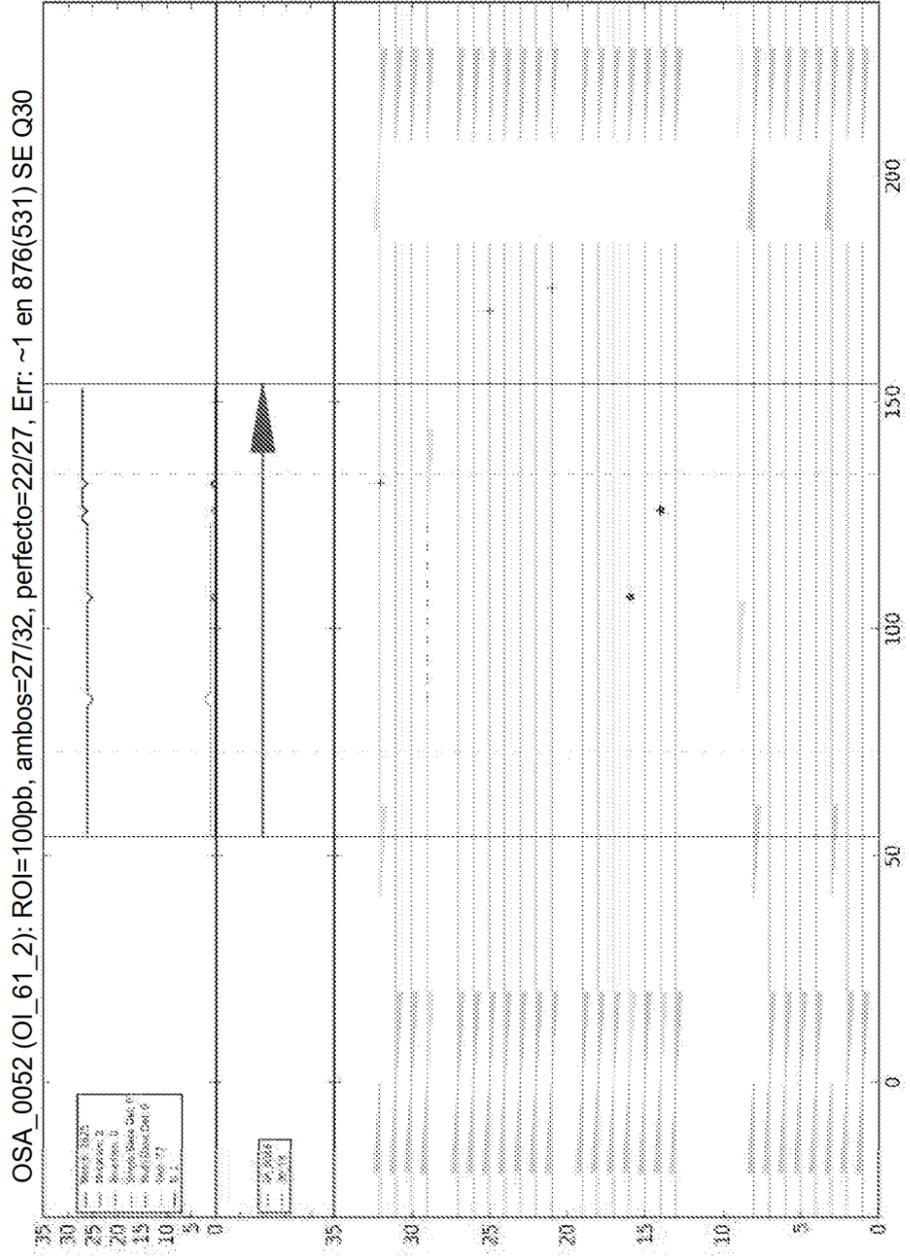
Figura 48

### Mapa de alineamiento



# Figura 49

## Mapa de alineamiento



8/5/2014

Figura 50

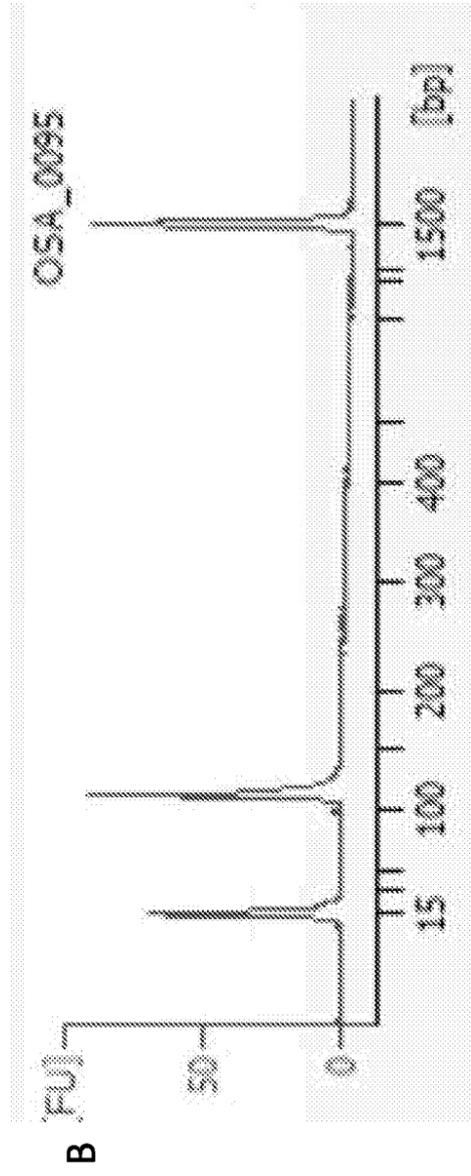
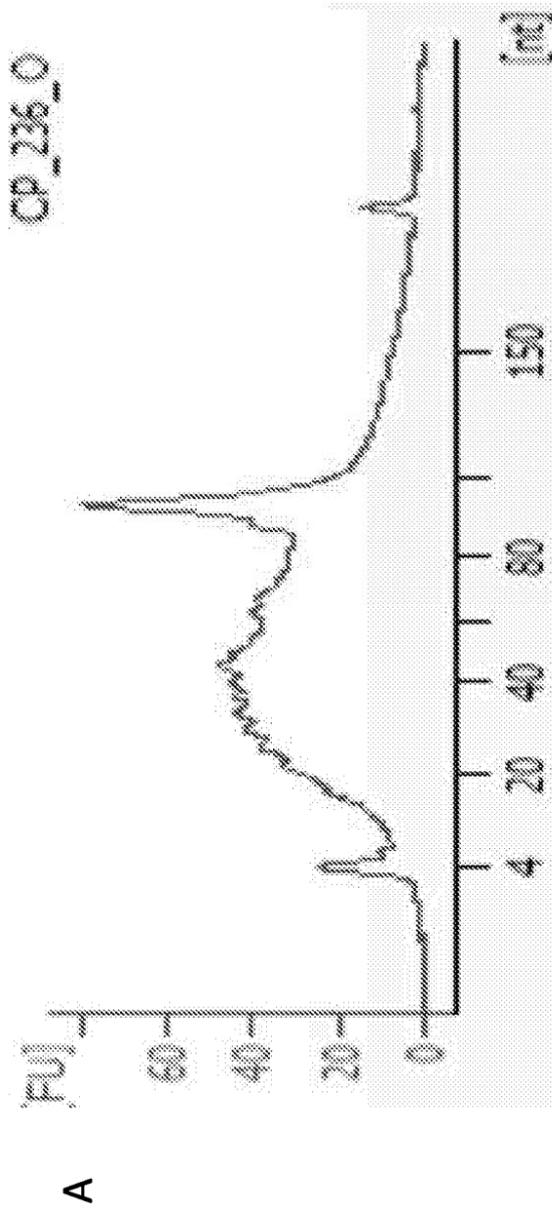
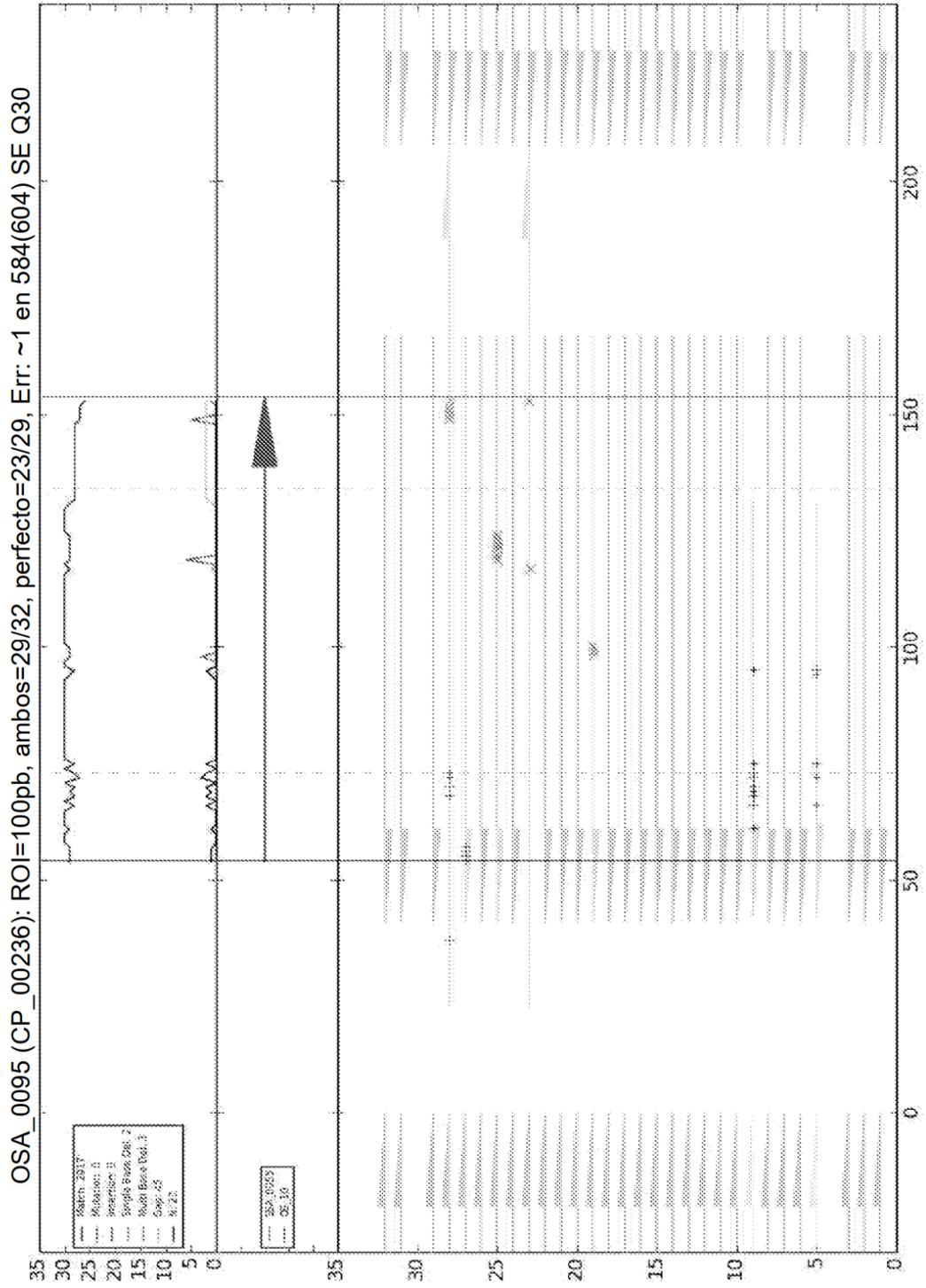


Figura 51

Mapa de alineamiento



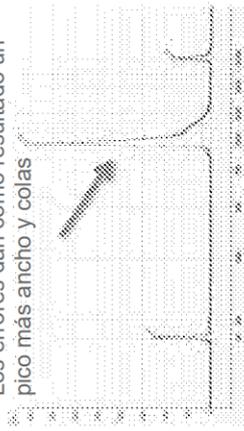
**Figura 52**

## Corrección de Errores

rendimiento conseguido con CorrectASA - tasa de error menor de 1 error en 5 kb

Tratamiento con correctASA de 1 kb gen sintetizado a partir de oligos de baja calidad

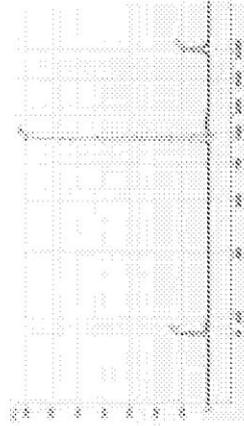
Los errores dan como resultado un pico más ancho y colas



Antes de la corrección de errores, 1 error en 789 pb



Después de la primera corrección de errores, 1 error en 5.190 pb



Después de la segunda corrección de errores, 1 error en 6.315 pb

Figura 53

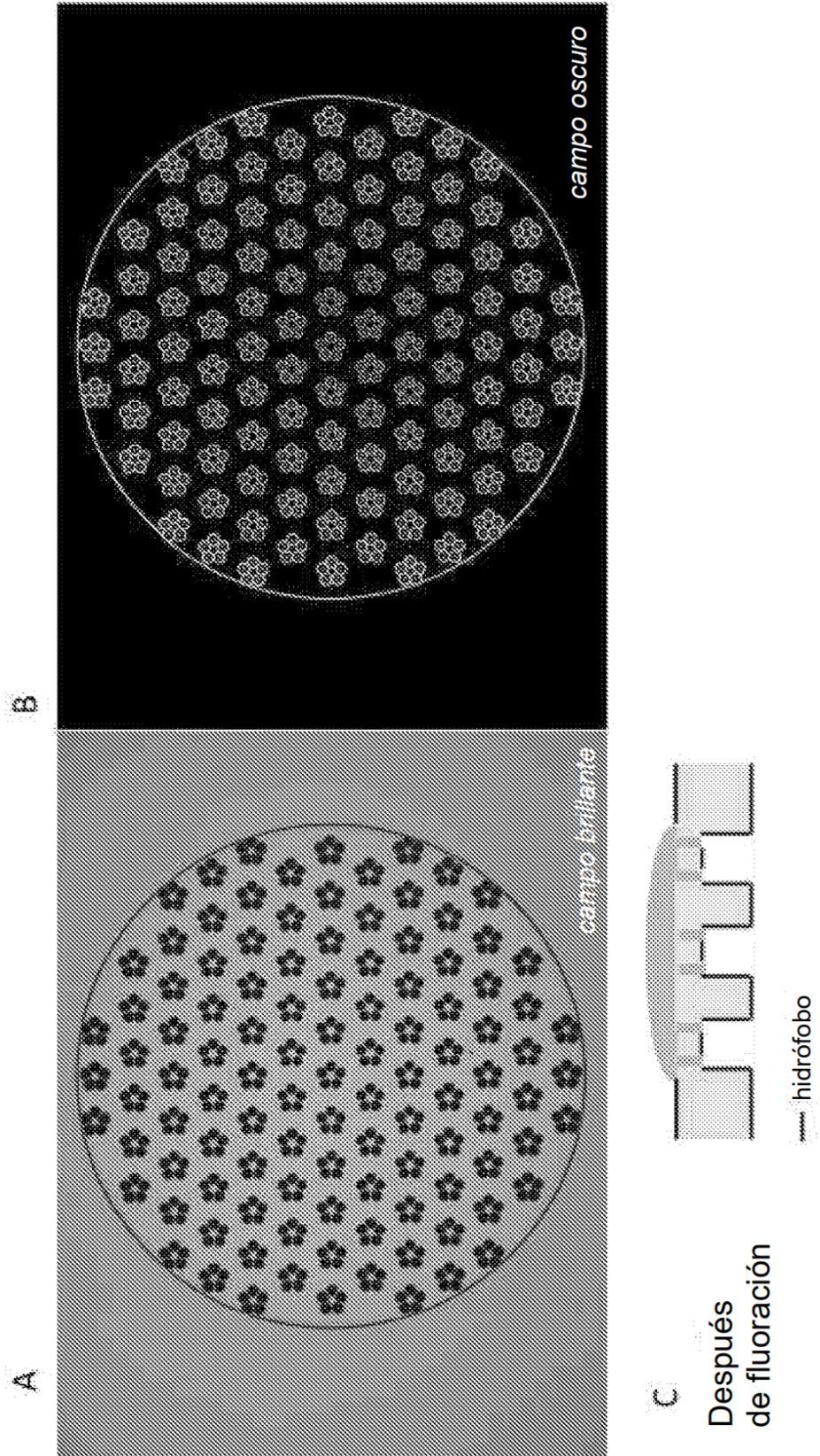
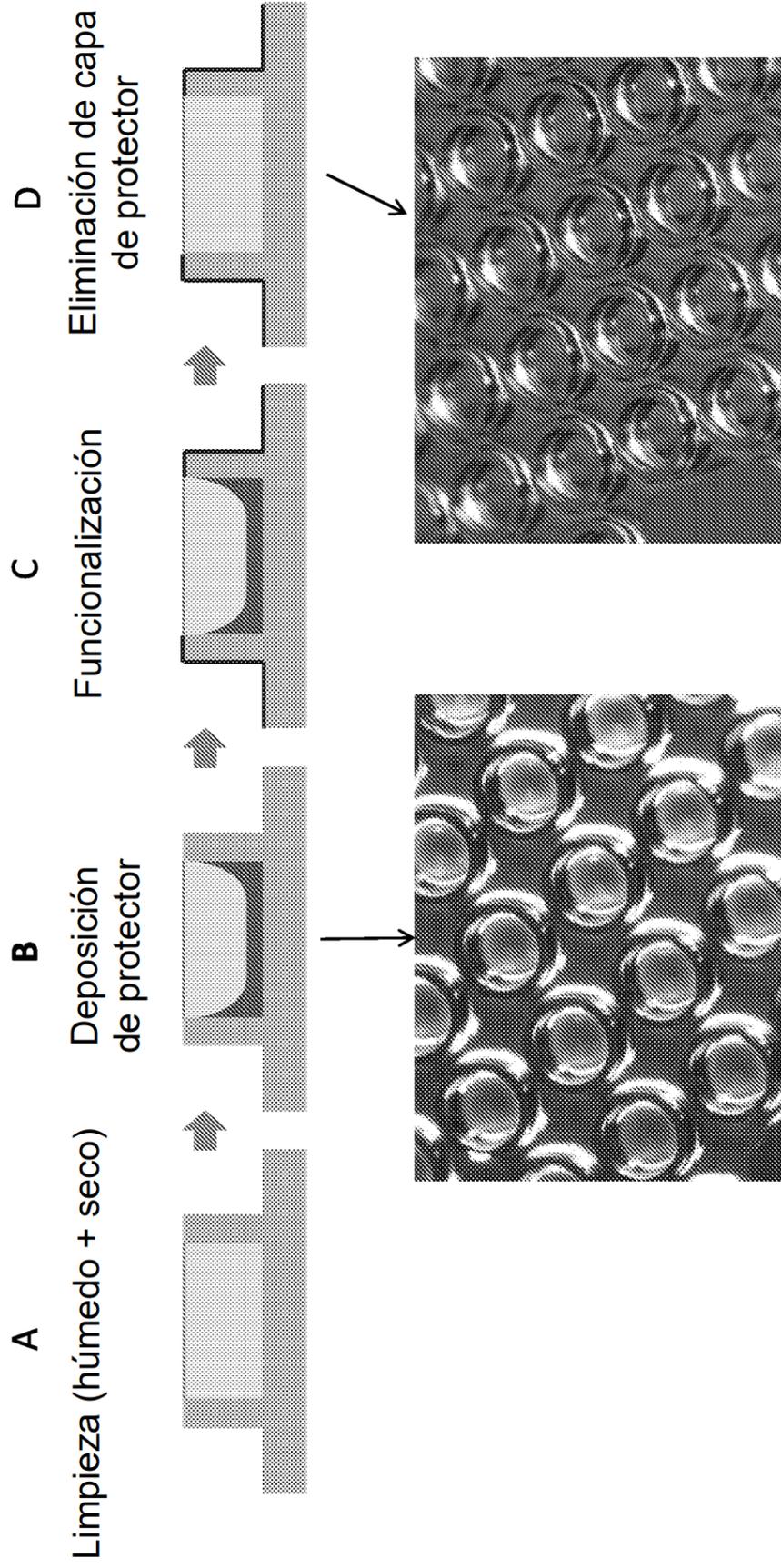


Figura 54



# Figura 55

## Resultados de BioAnalyzer

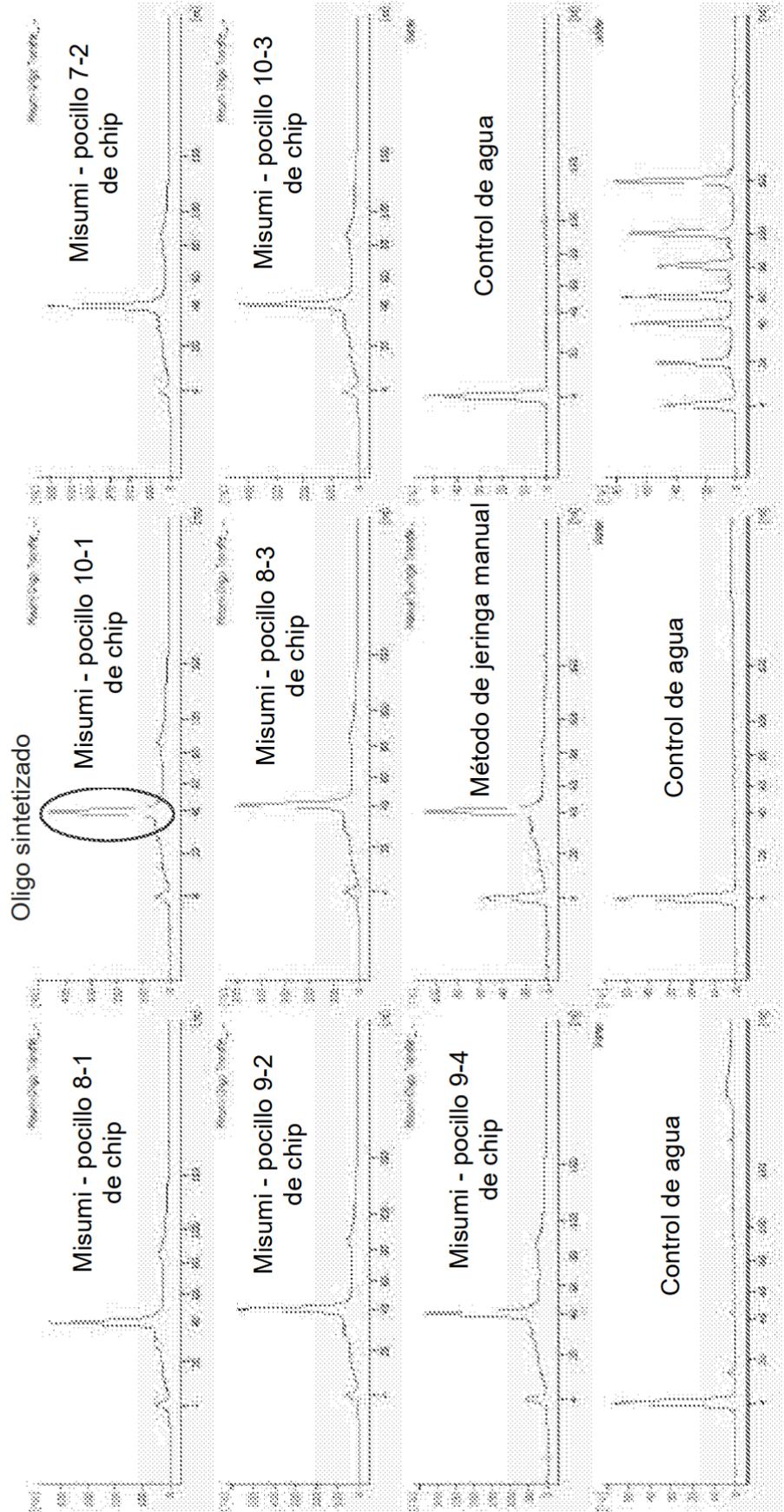
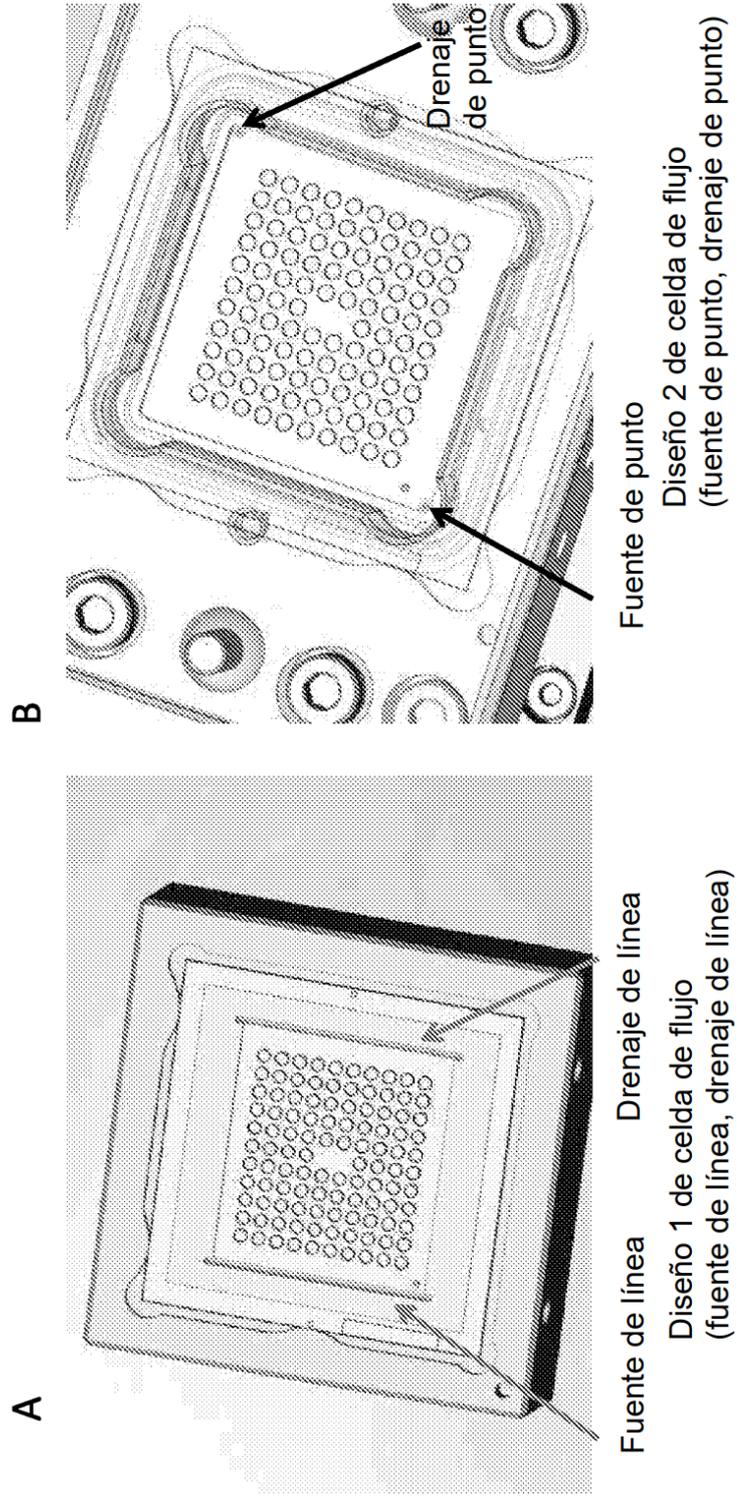
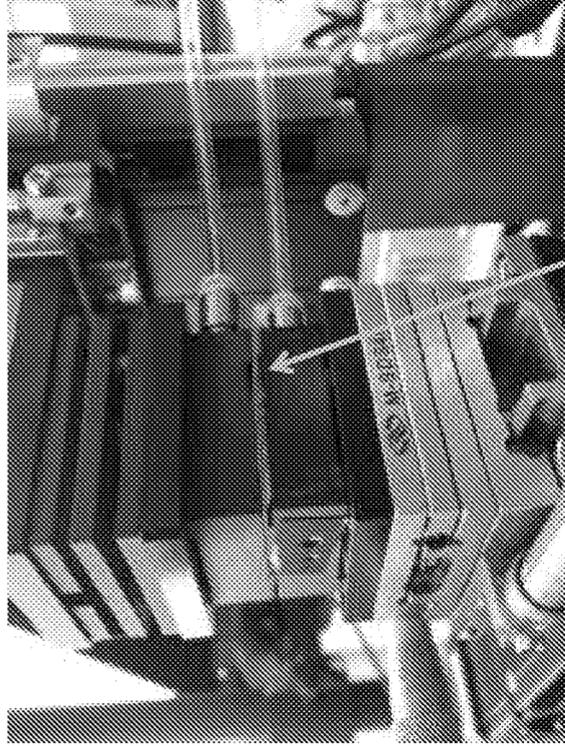


Figura 56

### Fuente de punto y drenaje de punto

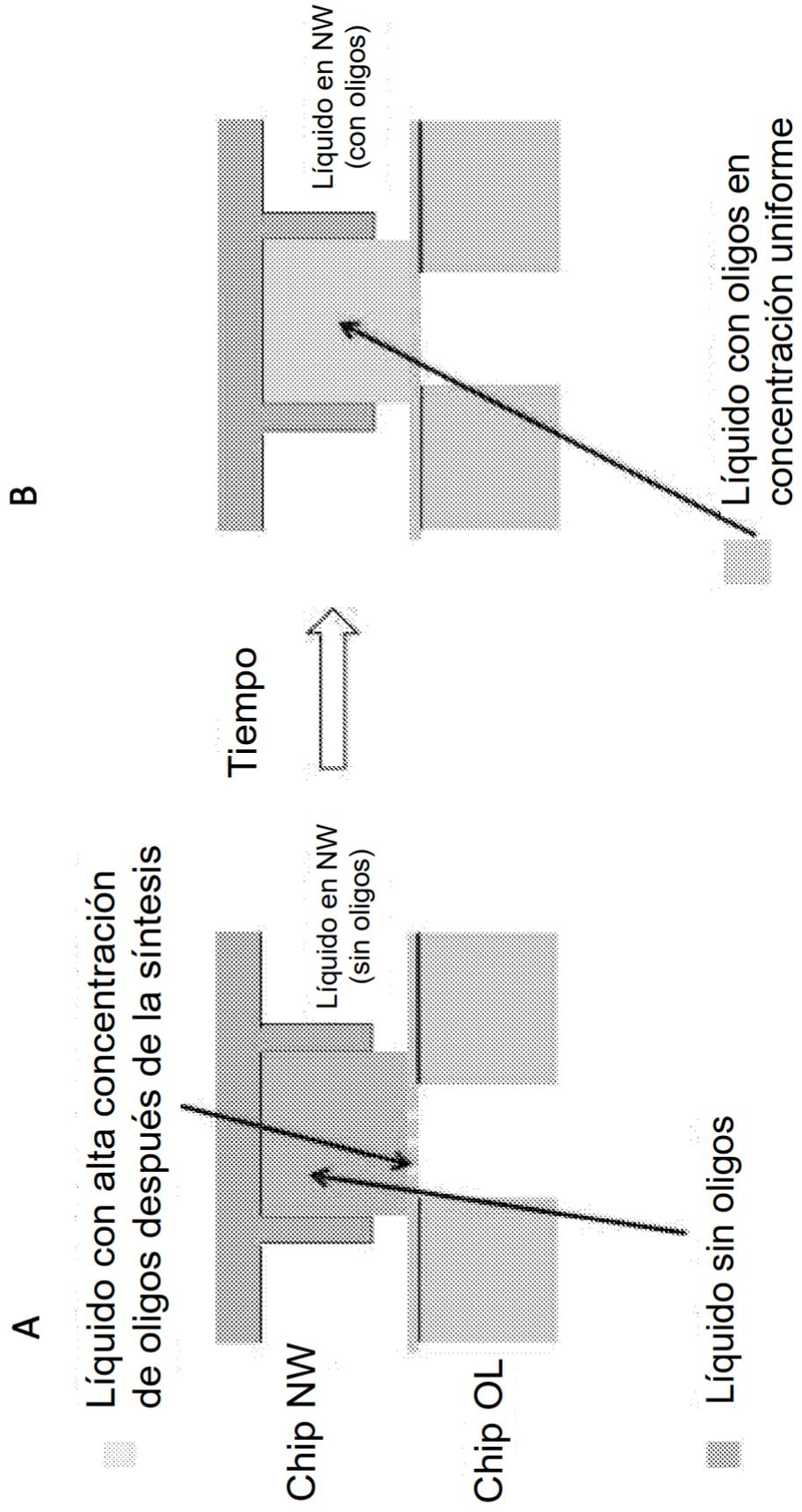


**Figura 57**

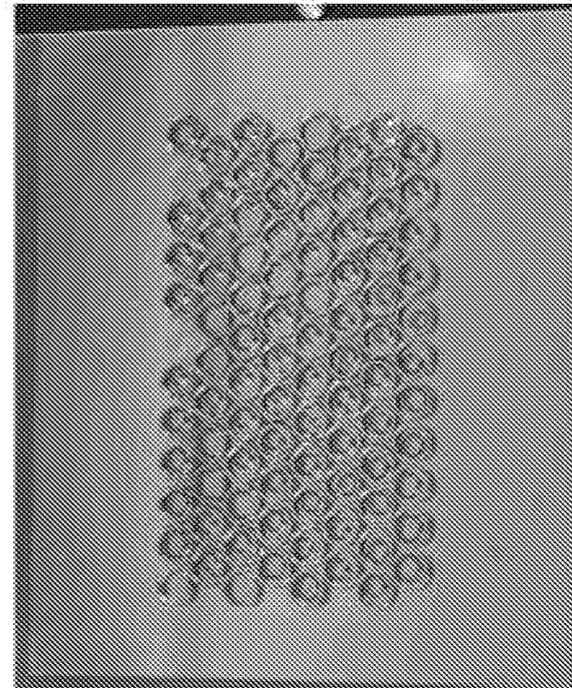


hueco ~50  $\mu\text{m}$ , 10 min

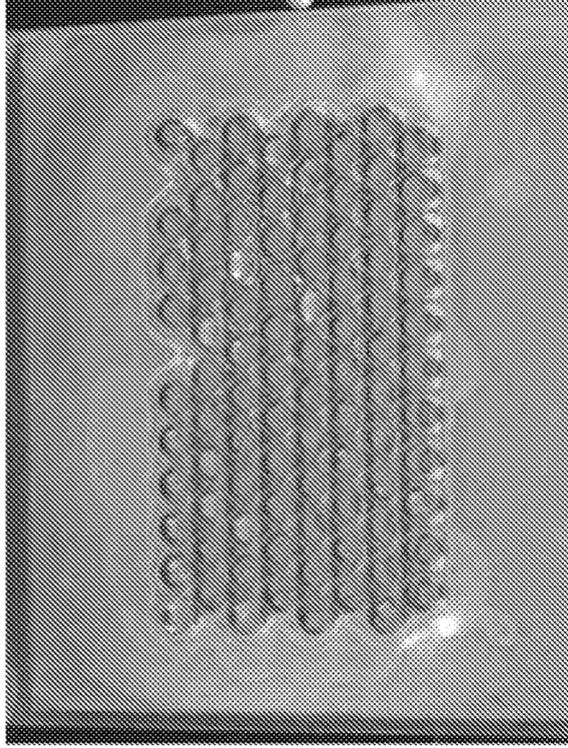
Figura 58



**Figura 59**

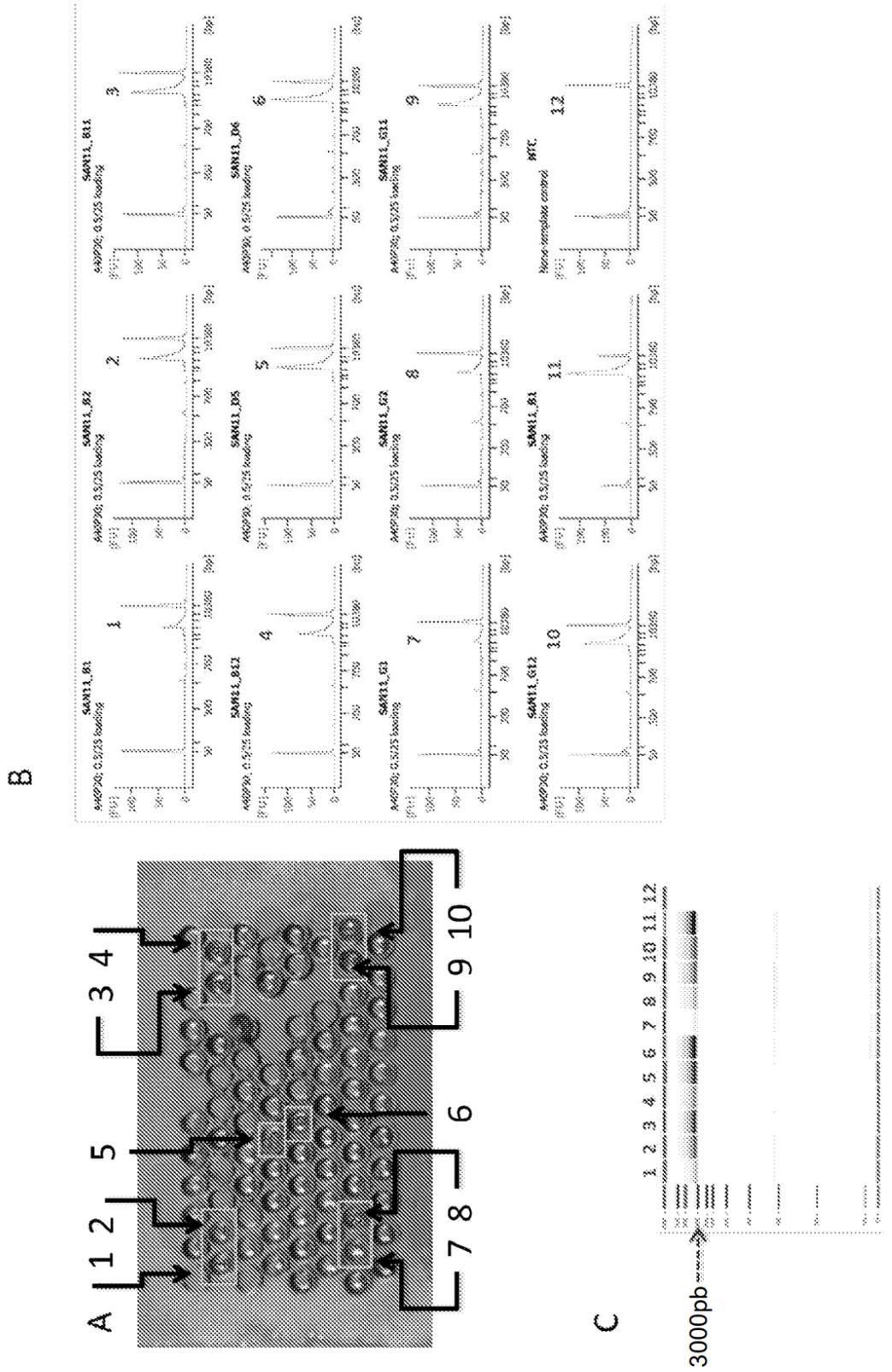


Antes de PCA

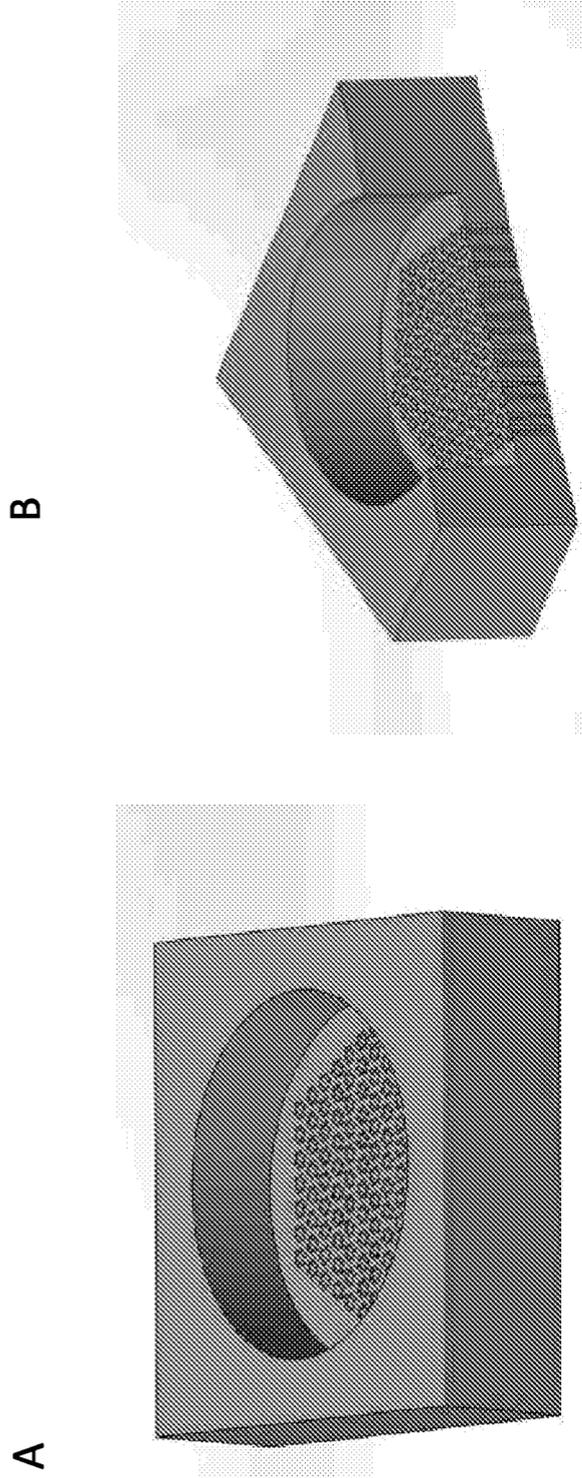


Después de PCA

Figura 60



**Figura 61**



**Figura 62**

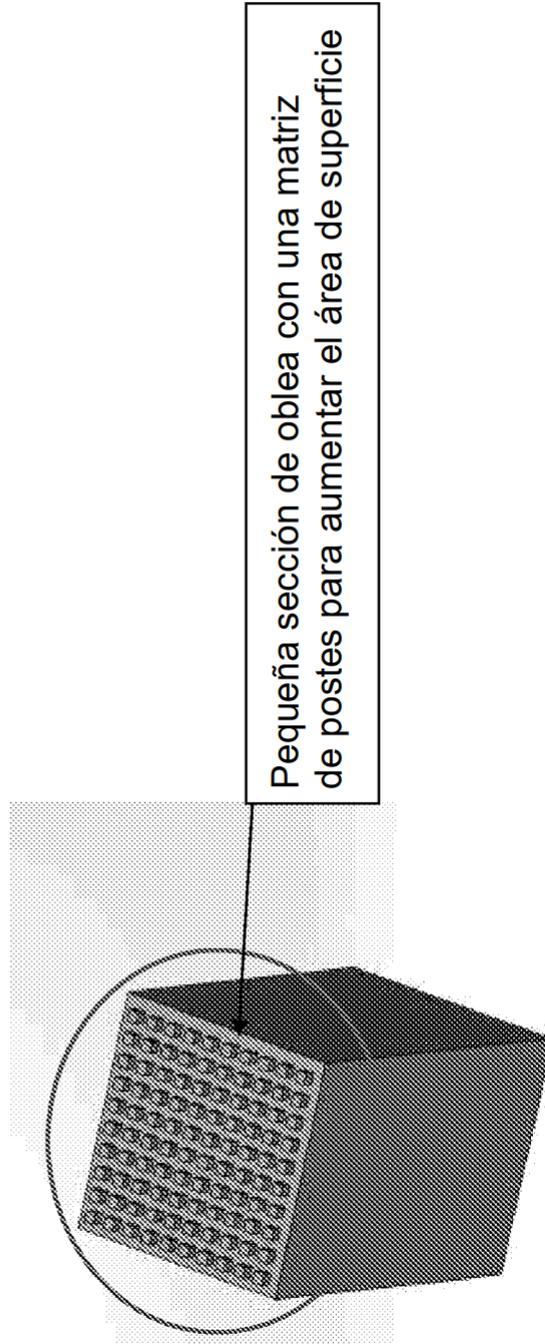
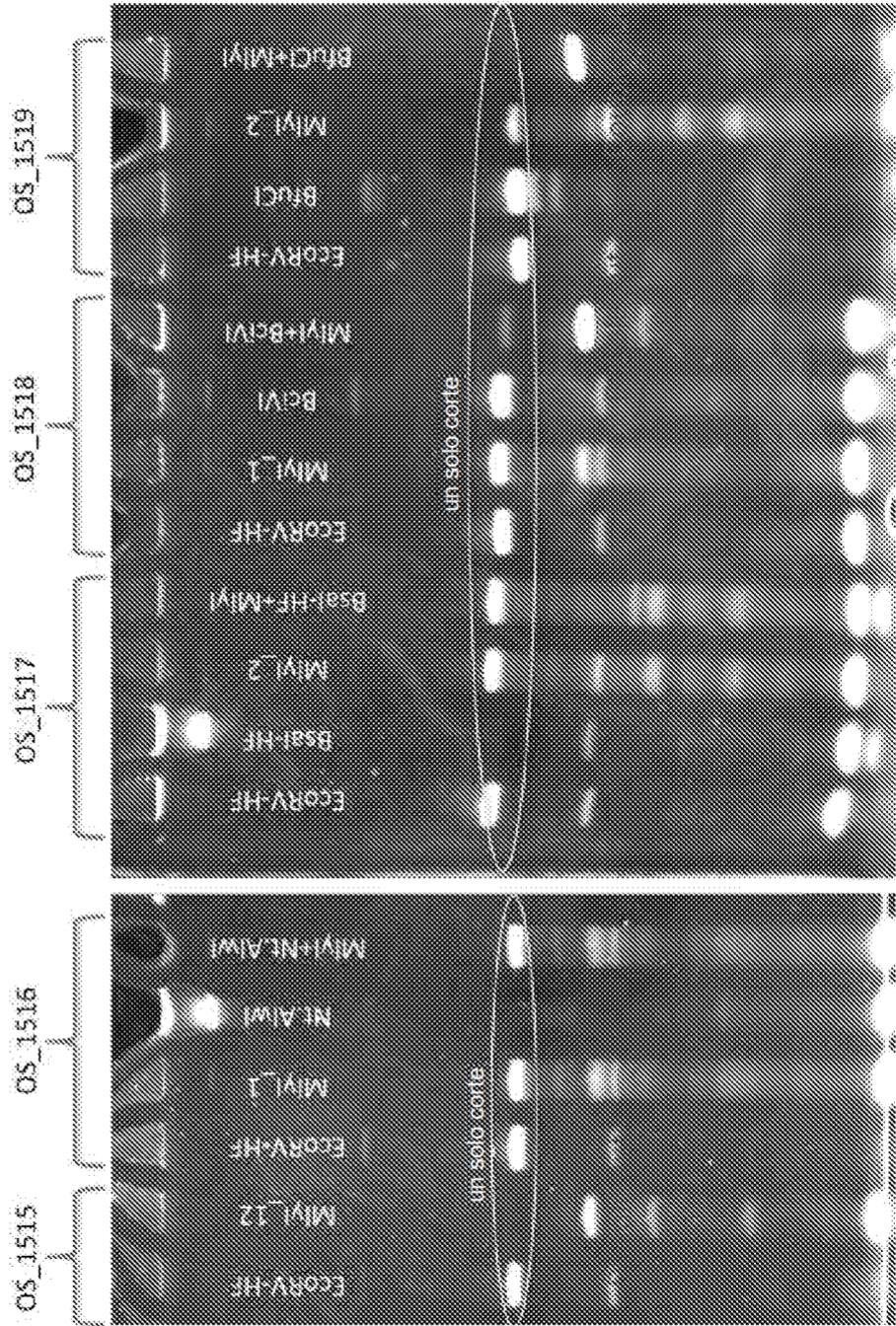
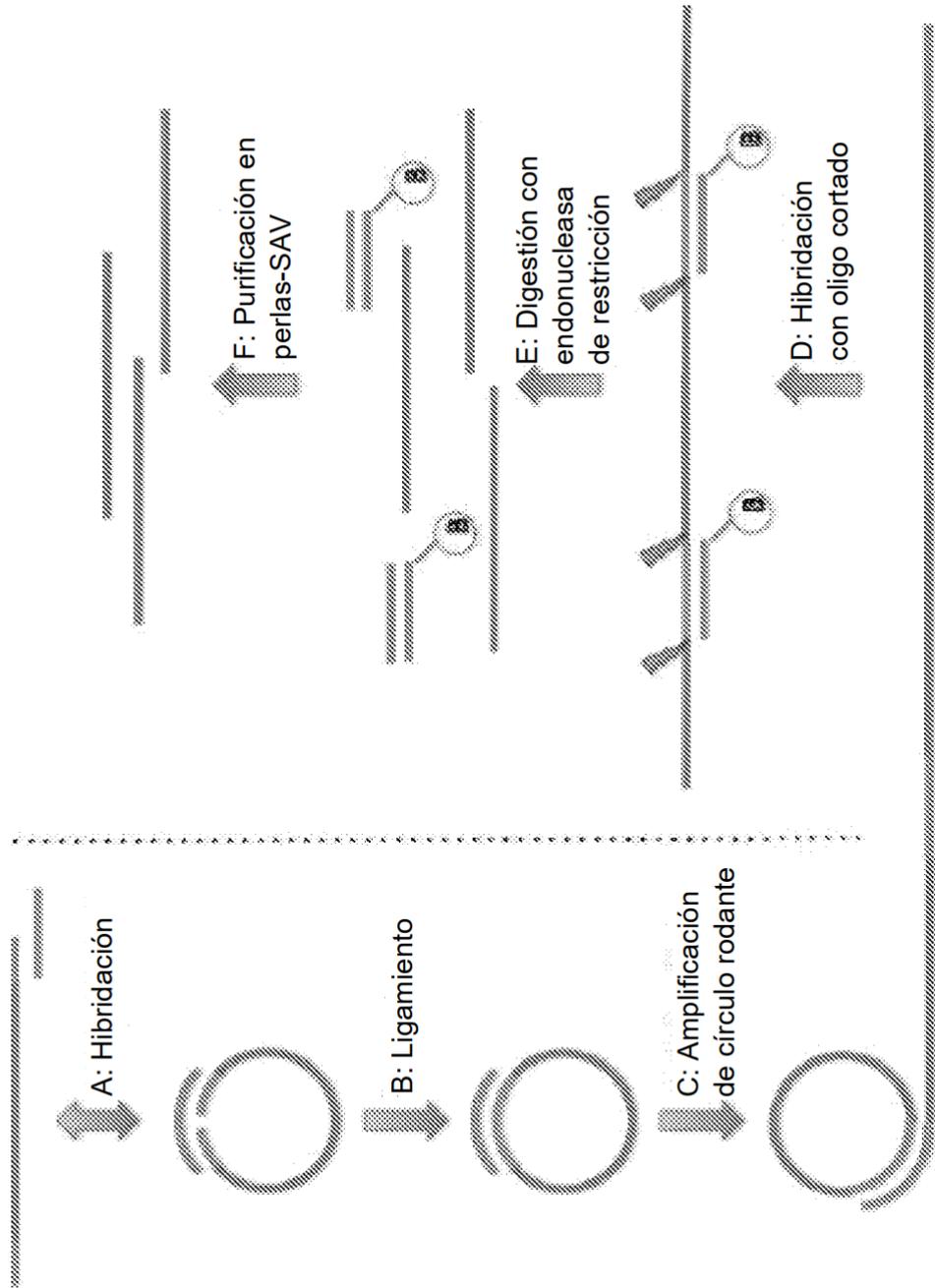


Figura 63



**Figura 64**



**Figura 65**

