

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4617654号
(P4617654)

(45) 発行日 平成23年1月26日(2011.1.26)

(24) 登録日 平成22年11月5日(2010.11.5)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/566	(2006.01)	GO 1 N 33/566	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	F
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	M
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 2

請求項の数 2 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2003-346925 (P2003-346925)
 (22) 出願日 平成15年10月6日(2003.10.6)
 (65) 公開番号 特開2005-114468 (P2005-114468A)
 (43) 公開日 平成17年4月28日(2005.4.28)
 審査請求日 平成18年10月5日(2006.10.5)

(73) 特許権者 000002185
 ソニー株式会社
 東京都港区港南1丁目7番1号
 (74) 代理人 100112874
 弁理士 渡邊 薫
 (72) 発明者 大西 通博
 東京都品川区北品川6丁目7番35号
 ソニー株式会社内
 審査官 白形 由美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 親媒性加工を用いるバイオアッセイ用基板の製造方法及びバイオアッセイ用基板

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

物質間の相互作用の場を提供できる窪んだ反応領域と、前記反応領域以外の部分である非反応領域からなり、

前記反応領域は、疎水面からなり検出用物質が固定された検出用表面と、前記検出用表面の両脇に配置された親水面からなる非検出用表面と、からなり、

前記非反応領域は、疎水面からなるバイオアッセイ用基板。

【請求項2】

前記反応領域には、当該反応領域を挟み込むように一対の電極が形成された請求項1記載のバイオアッセイ用基板。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNAチップ、プロテインチップ等のバイオアッセイ基板に関する。より詳細には、親媒性(親水性、疎水性等)加工を行ったバイオアッセイ用基板に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明の主たる従来技術を以下説明する。現在、マイクロアレイ技術によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップ又はDNAマイクロアレイ(以下、「DNAチップ」と総称。)と呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板が、遺伝子の変異解析、S

N P s (一塩基多型) 分析、遺伝子発現頻度解析等に利用されており、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範囲に活用され始めている。

【 0 0 0 3 】

この DNA チップは、ガラス基板やシリコン基板上に多種・多数の DNA オリゴ鎖や c DNA (complementary DNA) 等が集積されていることから、ハイブリダイゼーション等の分子間相互反応の網羅的解析が可能となる点が特徴とされている。

【 0 0 0 4 】

DNA チップによる解析手法の一例を簡潔に説明すれば、ガラス基板やシリコン基板上に固相化された DNA プローブに対して、細胞、組織等から抽出した mRNA を逆転写 PCR 反応等によって蛍光プローブ d N T P を組み込みながら PCR 増幅し、前記基板上においてハイブリダイゼーションを行い、所定の検出器で蛍光測定を行うという手法である。

10

【 0 0 0 5 】

ここで、DNA チップは二つのタイプに分類できる。第 1 のタイプは、半導体露光技術を用いたフォトリソグラフィーの技術を用いて、所定の基板上に直接オリゴヌクレオチドを合成していくものであり、アフィメトリクス社 (Affymetrix 社) によるものが代表的である (例えば、特許文献 1 参照)。この種のチップは、集積度は高いが、基板上での DNA 合成には限界があって、数十塩基程度の長さである。

【 0 0 0 6 】

第 2 のタイプは、「スタンフォード方式」とも称されるもので、先割れピンを用いて、予め用意された DNA を基板上に分注・固相化していくことによって作製されるものである (例えば、特許文献 2 参照)。この種のチップは、集積度は前者に比べて低い、1 kb 程度の DNA 断片を固相化できるという利点がある。

20

【特許文献 1】特表平 4 - 5 0 5 7 6 3 号報

【特許文献 2】特表平 1 0 - 5 0 3 8 4 1 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

しかしながら、従来の技術には、以下のような解決すべき課題があった。

【 0 0 0 8 】

上記した従来の DNA チップ技術やバイオセンサー技術では、二次元である基板の狭小な反応部において、DNA プローブ等の検出用ヌクレオチド鎖やタンパク質等を固相化 (固定化) し、ハイブリダイゼーション反応や抗原抗体反応等の物質間の相互作用を進行させるという技術であることから、空間的に反応生成物の自由度が制限され、専ら標的ヌクレオチド鎖等のブラウン運動に基づいてハイブリダイゼーション等の相互作用をさせていた。このため、従来の DNA チップ技術又はバイオセンサー技術では、相互作用の効率が悪く、反応時間が長いという技術的課題があった。

30

【 0 0 0 9 】

また、DNA チップ等では、平面上に、検出用ヌクレオチド鎖等を固相化しているため、DNA チップ等のバイオアッセイ用基板を製造する際に、固定化する試料 (ヌクレオチド鎖等) の液滴を、基板上の目的の位置にとどまらせておくことが困難であるという問題があった。そのため、バイオアッセイ用基板の製造作業を、短い時間で効率的に行うことは難しく、また、固定化する試料をロスしやすいという課題が生じていた。

40

【 0 0 1 0 】

さらに、ターゲットとなるヌクレオチド鎖等が含まれた液滴を、相互作用が起こる基板上の反応領域に供給する際においても、ターゲットとなるヌクレオチド鎖等が含まれた液滴を目的の位置 (反応領域) にとどまらせておくことが困難であり、ターゲット試料のロスが大きく、効率を悪くする一因ともなっていた。その他、核酸等のターゲット試料を、少ない量しか DNA チップ等に供給できないため、目的の相互作用を検出する精度を上げることが難しかった。

50

【 0 0 1 1 】

そこで、本発明は、試料のロスが少なく、ハイブリダイゼーション等の相互作用を効率的に行うことができるバイオアッセイ用基板を製造する方法を提供することを主な目的とする。また、ハイブリダイゼーション等の相互作用を効率的に起こし、相互作用の検出精度を高めたバイオアッセイ用基板を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

上記の技術的課題を解決するために、本発明では、以下の手段を提供する。

【 0 0 1 3 】

まず、物質間の相互作用の場を提供できる反応領域が形成された基板に、次の(1)から(3)の工程を組み合わせる加工することによって、相互作用を検出するバイオアッセイ用基板を製造する方法を提供する。

【 0 0 1 4 】

(1) 基板表面を疎水性物質で処理して疎水面を形成する疎水化工程。

【 0 0 1 5 】

(2) 疎水面の一部を親水面に変換する親水化工程。

【 0 0 1 6 】

(3) 親水面又は疎水面に検出用物質を固定化して、反応領域中に検出用表面を形成する検出用表面形成工程。

【 0 0 1 7 】

この三つの工程を適宜組み合わせることにより、バイオアッセイ用基板上の各領域を、目的に応じて、親水面にしたり、疎水面にしたりすることができる。

【 0 0 1 8 】

例えば、(2)の親水化工程により、反応領域の全域を親水面に変換することにより、反応領域が親水面になり、基板上のそれ以外の部分(非反応領域)が疎水面になるように、バイオアッセイ用基板を製造することができる。

【 0 0 1 9 】

バイオアッセイに用いるヌクレオチド鎖、タンパク質等の生体物質は、親水性である場合がほとんどであるため、これらの生体物質は、水溶液等として、基板に滴下・供給される。従って、基板上の反応領域が親水面に、非反応領域が疎水面になるように、バイオアッセイ用基板を製造することにより、生体物質を溶解した水溶液等を基板上に滴下・供給する際に、この水溶液等を、反応領域内にとどまらせ、基板上の非反応領域にこぼれないようにすることができる。

【 0 0 2 0 】

また、上記の方法は、基板上の反応領域内の各部分を、目的に応じて、適宜、親水面にしたり、疎水面にしたりすることもできる。例えば、(2)の親水化工程により、反応領域中の検出用表面部分のみを親水面に変換したり、逆に、反応領域中の検出用表面以外の部分(非検出用表面)のみを親水面に変換したりすることもできる。このように、反応領域内に、親水面と疎水面を設けることにより、バイオアッセイ用基板製造段階において使用する親水性又は疎水性の溶液を目的の場所に維持させたり、反応領域内の目的の場所にヌクレオチド鎖等の検出用物質を固定化したり、等が可能になる。

【 0 0 2 1 】

(1)の基板表面を疎水性物質で処理して疎水面を形成する疎水化工程は、例えば、疎水性物質であるアルキルシラン($R-Si-X_1, X_2, X_3$, R :アルキル基(不飽和基を含んでいてもよい)、 $X_n:Cl, OR$)を、基板の表面に固定化することにより、行うことができる。

【 0 0 2 2 】

(2)の疎水面の一部を親水面に変換する親水化工程は、疎水面に水酸基を形成する反応により、簡易に、行うことができる。例えば、疎水面が、前記したアルキルシランで形成されている場合、アルキルシランに、酸素存在下で紫外線を照射することにより、アル

10

20

30

40

50

キルシランのアルキル基又はケイ素に、水酸基を付加することができる。

【0023】

(3)の親水面又は疎水面に検出用物質を固定化して、反応領域中に検出用表面を形成する検出用表面形成工程は、検出用物質(ヌクレオチド鎖、タンパク質等)に応じて、適宜、目的に応じた反応を用いることにより行うことができる。

【0024】

例えば、反応領域内の検出用表面部位が、アルキルシランに水酸基が付加して親水面になっている場合、水酸基に親水性溶媒中のメルカプトアルキルシラン($\text{HS-R-Si-X1, X2, X3}$)を接触させ、メルカプト基に、予めメルカプト基を末端に付加した検出用物質(ヌクレオチド鎖等)を反応させてジスルフィド結合を形成し、ジスルフィド結合を介して検出用物質を固定化することにより、検出用物質を固定化したバイオアッセイ用基板を製造することができる。

10

【0025】

また、疎水面に疎水性溶媒中のメルカプトアルキルシランを接触させてメルカプト基を付加し、そのメルカプト基と、予めメルカプト基を備える検出用物質を反応させてジスルフィド結合を形成し、ジスルフィド結合を介して検出用物質を固定化することにより、検出用物質を固定化したバイオアッセイ用基板を製造することもできる。

【0026】

以上の方法により、バイオアッセイ用基板の反応領域内に、ヌクレオチド鎖等の検出用物質を固定化することができる。このバイオアッセイ用基板の反応領域内に、ターゲットとなる物質(ヌクレオチド鎖等)を滴下・供給することにより、相互作用(ハイブリダイゼーション等)が起き、目的の物質を検出・測定することができる。

20

【0027】

続いて、前記方法を、適宜用いて製造されたバイオアッセイ用基板を提供する。

【0028】

まず、物質間の相互作用の場を提供できる反応領域と、反応領域中に形成された検出用表面と、を少なくとも備える基板であって、検出用表面を含む反応領域の全域が親水性であるバイオアッセイ用基板を提供する。このバイオアッセイ用基板は、検出用表面を含む反応領域が親水性で、それ以外の部分(非反応領域)が疎水性であるため、親水性である試料溶液(ヌクレオチド鎖等を溶解した水溶液)を反応領域内に滴下・供給した際に、試料溶液が反応領域内にとどまり、非反応領域にこぼれないという作用を有する。従って、試料のロスを少なくすることができ、相互作用の効率を高めることができる。

30

【0029】

また、物質間の相互作用の場を提供できる反応領域と、反応領域中に形成された検出用表面と、を少なくとも備える基板であって、反応領域の検出用表面を除く領域が親水性であるバイオアッセイ用基板を提供する。このバイオアッセイ用基板は、反応領域内の検出用表面を除く領域(非検出用表面)が親水性であるため、相互作用(ハイブリダイゼーション等)を起こした後、不要物質(遊離物質又はノ及び誤相互作用物質等)を、非検出用表面に吸着させる作用を持つ。従って、不要物質等が、再び、検出用表面の周辺領域に戻ってしまうことを防止し、相互作用の検出効率を高めることができる。

40

【0030】

前記の基板は、さらに、反応領域の中央位置に設けられた検出用表面と、検出用表面の両脇に形成された親水面と、それぞれが各親水面の外側に配置され、反応領域を挟むように対向する少なくとも一对の電極と、を有する構成とすることができる。この電極を設置することにより、検出用表面の近傍に存在する不要物質を誘電泳動によって親水面側に引き寄せることができる。検出用表面の両脇に形成された親水面は、前記のとおり、相互作用しなかった不要物質(遊離物質又はノ及び誤相互作用物質等)を吸着する作用があるため、誘電泳動によって親水面側に引き寄せられた遊離物質等を親水面に吸着させることにより、さらに効率的に、不要物質等が、再び、検出用表面の周辺領域に戻ってしまうことを防止し、相互作用の検出効率を高めることができる。

50

【0031】

さらに、物質間の相互作用の場を提供できる反応領域と、反応領域中に形成された検出用表面と、を少なくとも備える基板であって、反応領域の検出用表面部分のみが親水性であり、他の反応領域部分は疎水性であるバイオアッセイ用基板を提供する。反応領域内の検出用表面が親水性であり、反応領域内のその他の部分（非検出用表面）は疎水性であるため、ヌクレオチド鎖等の試料を溶解した水溶液は、検出用表面にのみとどまり、非検出用表面には移動しない。従って、ヌクレオチド鎖等の物質が検出用表面の周辺にとどまるため、相互作用（ハイブリダイゼーション等）を促進し、相互作用の検出効率を高めることができる。

【0032】

その他、物質間の相互作用の場を提供できる反応領域と、反応領域中に形成された検出用表面と、を少なくとも備える第1基板と、第1基板に重ね合わされる第2基板と、を備え、第2基板の反応領域に臨む内面領域が親水性であるバイオアッセイ用基板を提供する。第2基板を第1基板上に重ね合わせるにより、第1基板表面から裏面方向に窪んだ形状をしている反応領域に蓋をすることができるため、反応領域内の試料等を融解した緩衝液等の水溶液を、反応領域内に確実に保持することが可能になる。相互作用等の反応時には、反応領域内には、試料等を溶解した水溶液を容れる場合が多いので、第2基板の反応領域に臨む内面領域は、親水性であるほうがよい。

【0033】

続いて、物質間の相互作用の場を提供できる反応領域と、反応領域中に形成された検出用表面と、を少なくとも備える基板であって、反応領域の検出用表面部分のみが親水性であり、他の反応領域部分は疎水性であるバイオアッセイ用基板を用いるバイオアッセイ方法であって、反応領域の疎水性領域に対して、検出用表面に固定化された検出用物質と相互作用を示す標的物質を含有する水溶液を滴下することを特徴とするバイオアッセイ方法を提供する。このバイオアッセイ方法の場合、基板表面の反応領域の検出用表面が親水性で、反応領域内のその他の部分（非検出用表面）が疎水性であるため、標的物質を含有する水溶液を非検出用表面に滴下しても、すぐに親水性である検出用表面に移動し集まる。従って、標的物質を含有する水溶液が、検出用物質が固定化された検出用表面に保持されやすくなるため、相互作用を効率的に検出・測定することができる。また、検出用物質が固定化された検出用表面に、直接、標的物質を含有する水溶液を滴下しなくてもよいため、滴下による物理的力によって、検出用物質が傷んだり、固定化がはずれて流されてしまったり等の、弊害を除去することができる。

【0034】

なお、本発明において、相互作用とは、ハイブリダイゼーション、抗原抗体反応、酵素反応等、検出用物質と標的物質が何らかの反応を引き起こすことをいう。検出用物質とは、DNA等のヌクレオチド鎖、タンパク質等の相互作用する複数の物質のうち、バイオアッセイ基板の反応領域内に固定化したほうの物質をいう。標的物質とは、DNA等のヌクレオチド鎖、タンパク質等の相互作用する複数の物質のうち、検出用物質が固定化されたバイオアッセイ基板の反応領域内に、滴下・供給するほうの物質をいう。

【発明の効果】

【0035】

本発明によって奏される効果は、以下の通りである。

【0036】

本発明により、基板表面の親媒性（親水性、疎水性）を制御することができる。

【0037】

バイオアッセイ用基板の製造工程において、目的に応じて、適宜、基板の各領域の親媒性を設定、変更することができる。このことによって、バイオアッセイ用基板の製造工程の際に、親水性、疎水性の溶液を両方とも使用することができ、また、目的の領域のみに反応を起こさせることが可能となる。

【0038】

疎水性物質であるアルキルシラン等の表面処理剤と紫外線照射等の親水化手段を、適宜、調節して用いることにより、基板の反応領域内の検出用表面を任意に設定でき、また、簡単な工程で、検出用物質を固定化することができる。

【0039】

各領域の親媒性を制御することにより、生体分子等を融解した水溶液を、目的の場所に移動して保持させることができる。

【0040】

本発明に係るバイオアッセイ用基板は、目的の相互作用を、少ない試料で、高精度に検出・測定することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0041】

以下、本発明を実施するための好適な形態について、添付図面を参照にしながら説明する。

【0042】

図1は、基板1の反応領域12にヌクレオチド鎖Nを固定化するまでの一連の工程を示した図である。図1に示すとおり、基板1の表面11には、表面11から基板1の裏面方向(図面下方向)に窪んだ反応領域12が集積している。そして、反応領域12内には、ヌクレオチド鎖Nを固定化する検出用表面13と、それ以外の部分14(非検出用表面)がある。検出用表面13は、反応領域12の中央に位置する必要はなく、反応領域12内であれば、目的に応じて、適宜、場所を設定することができる。基板1の表面11の反応領域12以外の部分は、非反応領域15とする。なお、基板1は、シリカ又は酸化シリコン、酸化物表面を持つ金属等よりなる表面を有するものを用いることができる。

【0043】

まず、図1に示すとおり、基板1の表面11全体に、アルキルシラン(符号Aで示す)等のアルキル基を持つカップリング剤の溶液を用いて、アルキルシランAを固定化する。アルキルシランAは疎水性物質であるので、基板1の表面11は、全て疎水面を形成する(疎水性化)。

【0044】

次に、ヌクレオチド鎖Nを固定化したくない領域(非検出用表面14及び非反応領域15)を、紫外線Uを吸収又は反射する材質のマスク2で覆った後、大気中又は酸素雰囲気下で紫外線Uを照射し、基板1表面11のマスク2で覆われていない部分(検出用表面13)のみを、水酸化する。これにより、アルキルシランAのR基又はケイ素に水酸基(-OH)が付加されるため、図2に示すとおり、紫外線U照射された部分(検出用表面13)だけ、親水面に変換される(親水性化)。

【0045】

なお、以上の工程を用いることにより、基板1の表面11に集積された全ての反応領域12内に、適宜、疎水面又は/及び親水面を形成することが出来る。例えば、マスクで覆う部分を適宜変更して紫外線U照射を行うことにより、反応領域12の全域を親水面に変換して、非反応領域15を疎水面としたり(図示せず)、反応領域12内の非検出用表面14のみを、親水面に変換し、検出用表面13は、疎水面とする構成にしたり(図示せず)、することもできる。

【0046】

次に、上記の工程により表面の一部が水酸化された基板1を、メルカプトアルキルシラン水溶液に浸漬し、検出用表面13にある水酸基(-OH)をメルカプト基(-SH)に結合させる。これにより、基板1表面11の中で、水酸基(-OH)が付加した領域(親水面)のみに、メルカプト基(-SH)が付加される(図3参照)。

【0047】

そして、予め片側の末端にメルカプト基(-SH)を結合させたヌクレオチド鎖Nの溶液に、表面11にメルカプト基の付加した基板1を浸漬すると、メルカプト基同士のジスルフィド結合により、目的のヌクレオチド鎖Nが、基板1表面11の検出用表面13に固

10

20

30

40

50

定される（図4参照）。

【0048】

図5～11は、バイオアッセイ用基板の製造工程を示した断面模式図である。基板1の表面11には、裏面方向（図面下方向）に窪んだ反応領域12が集積している。

【0049】

以下、図5～7を用いて、まず、メルカプトアルキルシランの水系溶液を用いたバイオアッセイ用基板の製造工程について説明する。図1～4と同様に、反応領域12内にある、ヌクレオチド鎖Nを固定化する領域を検出用表面13と、それ以外の領域を非検出用表面14とし、また、基板1の表面11の反応領域12以外の部分を非反応領域15とする。

10

【0050】

基板1の全面をアルキルシランAで疎水化したのち、非検出用表面14及び非反応領域15を、前記と同様にマスクで覆って、紫外線Uを照射することにより、検出用表面13のみに水酸基（-OH）が付加し、親水化する。これにより、検出用表面13が親水性となり、非検出用表面14と非反応領域15は疎水性となる（図5参照）。

【0051】

次に、エタノールと水系の溶媒に溶解したメルカプトアルキルシランを、反応領域12中に滴下すると、検出用表面13に付加した水酸基（-OH）に、メルカプトアルキルシランが結合する。

【0052】

次に、メルカプトアルキルシラン溶液を洗浄して除去したのち、検出用表面13及び非反応領域15にマスクをして、紫外線Uを照射することにより、非検出用表面14に水酸基（-OH）が付加して親水性化する。以上の工程により、検出用表面13は、メルカプト基（-SH）が付加し、非検出用表面14は、親水性となり、非反応領域15は、疎水性となる（図6）。

20

【0053】

次に、予め片側の末端にメルカプト基（-SH）を結合させたヌクレオチド鎖Nの溶液を、反応領域12に滴下する。これにより、検出用表面13のメルカプト基（-SH）とヌクレオチド鎖Nに付加されたメルカプト基がジスルフィド結合し、ヌクレオチド鎖Nが、検出用表面13に固定化される（図7）。

30

【0054】

以上により、基板1の表面12上に集積した反応領域12に、ヌクレオチド鎖Nが固定化され、バイオアッセイ用基板（DNAチップ）の製造工程が終了する。そして、そのバイオアッセイ用基板1の反応領域12に、ターゲットとなるヌクレオチド鎖N'を溶解した水溶液を滴下、供給することにより、検出用表面13に固定化されたヌクレオチド鎖Nと、ターゲットとなるヌクレオチド鎖N'が相互作用（ハイブリダイゼーション）し、目的のターゲットとなるヌクレオチド鎖N'を検出、測定することができる。

【0055】

なお、非反応領域15が疎水性になっているので、ヌクレオチド鎖N又はN'を溶解した水溶液は、滴下・供給した際に、親水性である反応領域12内にとどまり、疎水性の非反応領域15にこぼれない。従って、本発明により、より少ない量の核酸水溶液で、十分かつ確実に、核酸を固定化したり、相互作用を検出・測定したりすることができる。また、基板1又は反応領域12内に、適宜、目的に応じて、親水性の領域と疎水性の領域を設けることにより、各種溶液を、供給したい領域に誘導することが可能となる。その他、反応領域12の親水性を維持するために、中性の界面活性剤を用いてもよい。

40

【0056】

続いて、図8～11を用いて、メルカプトアルキルシランの、トルエン等の疎水性溶液を用いたバイオアッセイ用基板の製造工程について、以下に説明する。

【0057】

まず、基板1の全面を、アルキルシランAで疎水化したのち、検出用表面13をマスク

50

し、非検出用表面 1 4 と非反応領域 1 5 に、紫外線 U を照射して、水酸基 (- O H) を付加し、非検出用表面 1 4 と非反応領域 1 5 を親水性化する (図 8) 。

【 0 0 5 8 】

次に、メルカプトアルキルシランのトルエン溶液を反応領域 1 2 に滴下し、検出用表面 1 3 のアルキルシランに、メルカプト基 (- S H) に付加させる (図 9) 。なお、トルエン溶液は、疎水性であるので、親水性である非検出用表面 1 4 及び非反応領域 1 5 とは反応し、疎水性である検出用表面 1 3 にとどまろうとする。そのため、メルカプトアルキルシランは、検出表面 1 3 のアルキルシランと接触し、メルカプト基を付加する。

【 0 0 5 9 】

次に、メルカプトアルキルシランのトルエン溶液を洗浄・除去したのち、基板 1 全体を、再び、アルキルシラン A で処理し、非反応領域 1 5 を、アルキルシランで、再びコーティングする (図 1 0) 。これにより、検出用表面 1 3 はメルカプト基が結合した状態、非検出用表面 1 4 は疎水性、非反応領域 1 5 も疎水性となる。

【 0 0 6 0 】

次に、上記と同様の方法により、非検出用表面 1 4 にのみ、紫外線 U を照射し、水酸基を付加して、親水性化する。これにより、上記したメルカプトアルキルシランの水系溶液を用いた場合と同様に、検出用表面 1 3 はメルカプト基が結合した状態、非検出用表面 1 4 は親水性、非反応領域 1 5 は疎水性となる (図 1 1) 。

【 0 0 6 1 】

以下の工程は、上記したメルカプトアルキルシランの水系溶液を用いた場合と同様である。すなわち、予め片側の末端にメルカプト基 (- S H) を結合させたヌクレオチド鎖 N の溶液を、反応領域 1 2 に滴下する。これにより、検出用表面 1 3 のメルカプト基 (- S H) とヌクレオチド鎖 N に付加されたメルカプト基がジスルフィド結合し、ヌクレオチド鎖 N が、検出用表面 1 3 に固定化される (図 7 参照) 。

【 0 0 6 2 】

以上により、基板 1 の表面 1 2 上に集積した反応領域 1 2 に、ヌクレオチド鎖 N が固定化され、バイオアッセイ用基板 (D N A チップ) の製造工程が終了する。そして、そのバイオアッセイ用基板 1 の反応領域 1 2 に、ターゲットとなるヌクレオチド鎖 N ' を溶解した水溶液を滴下、供給することにより、検出用表面 1 3 に固定化されたヌクレオチド鎖 N と、ターゲットとなるヌクレオチド鎖 N ' が相互作用 (ハイブリダイゼーション) し、目的のターゲットとなるヌクレオチド鎖 N ' を検出、測定することができる。

【 0 0 6 3 】

なお、上記のメルカプトアルキルシランの水系溶液を用いた場合と同様に、非反応領域 1 5 が疎水性になっているので、ヌクレオチド鎖 N 又は N ' を溶解した水溶液は、滴下・供給した際に、親水性である反応領域 1 2 内にとどまり、疎水性の非反応領域 1 5 にこぼれない。従って、本発明により、より少ない量の核酸水溶液で、十分かつ確実に、核酸を固定化したり、相互作用を検出・測定したりすることができる。また、基板 1 又は反応領域 1 2 内に、適宜、目的に応じて、親水性の領域と疎水性の領域を設けることにより、各種溶液を、供給したい領域に誘導することが可能となる。その他、反応領域 1 2 の親水性を維持するために、中性の界面活性剤を用いてもよい。

【 0 0 6 4 】

図 1 2 は、反応領域 1 2 を挟むように対向した電極 3、3 が設けられた、基板 1 の反応領域 1 2 周辺の断面模式図である。

【 0 0 6 5 】

この基板 1 は、上記したバイオアッセイ用基板の製造工程により製造されたものであり、検出用表面 1 3 にはヌクレオチド鎖 N が固定化され、非検出用表面 1 4 は親水性、非反応領域 1 5 は、疎水性である。そして、図 1 2 に示すとおり、反応領域 1 2 に、ターゲットのヌクレオチド鎖 N ' が溶解した水溶液を、滴下・供給すると、固定化されたヌクレオチド鎖 N とターゲットのヌクレオチド鎖 N ' が相互作用 (ハイブリダイゼーション) し、目的のヌクレオチド鎖 N ' を検出・測定することができる。

【 0 0 6 6 】

その際、上記のとおり、非検出用表面 1 4 は、水酸基 (- O H) が付加して親水性になっているので、相互作用を起こさなかったヌクレオチド鎖 N ' を、非検出用表面 1 4 の水酸基に吸着させ、検出用表面 1 3 の領域からある程度除去することができる。

【 0 0 6 7 】

図 1 2 に示した反応領域 1 2 は、前記のとおり、電極 3、3 を備えている。ターゲットのヌクレオチド鎖 N ' を滴下・供給して、相互作用 (ハイブリダイゼーション) を起こした後で、電極 3 に交流電界を印加することによって、相互作用しなかったヌクレオチド鎖 N ' やミスハイブリした (結合の弱い) ヌクレオチド鎖 N ' を電極 3 の方向 (図中矢印) に誘電泳動し、そのヌクレオチド鎖 N ' を親水性の非検出用表面 1 4 の水酸基 (- O H) に吸着させることができる。従って、電極 5 を設けることにより、電界によって、検出用表面 1 3 の周辺領域から、相互作用しなかったヌクレオチド鎖 N ' 等を除去できるとともに、電界によって誘導されたそのヌクレオチド鎖 N ' を非検出用表面 1 4 に吸着させ、再び、検出用表面 1 3 の周辺領域に拡散することを防止することができる。

10

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 6 8 】

本発明は、親媒性 (親水性、疎水性) を制御してバイオアッセイ用基板を製造する方法であり、簡易な工程で、基板の反応領域内に検出用物質を固定かできる点で、産業上有用である。

20

【 0 0 6 9 】

本発明により、より少ない量の検出用物質で、効率的に、バイオアッセイ用基板を製造することができるので、産業上有用である。

【 0 0 7 0 】

本発明に係るバイオアッセイ用基板及びバイオアッセイ方法は、より少ない量の標的物質で、高精度に相互作用を検出測定できる点で、産業上の利用可能性がある。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 1 】

【 図 1 】 基板 (1) の反応領域 (1 2) にヌクレオチド鎖 (N) を固定化するまでの一連の工程を示した、基板 (1) の反応領域 (1 2) 及びその周辺の断面模式図であり、基板表面を疎水化した工程を示す図である。

30

【 図 2 】 前記工程において、紫外線 U 照射により、検出用表面 (1 3) を親水化した工程を示す図である。

【 図 3 】 前記工程において、水酸基 (- O H) をメルカプト基 (- S H) に置換した工程を示す図である。

【 図 4 】 前記工程において、ヌクレオチド鎖 N を固定化した工程を示す図である。

【 図 5 】 バイオアッセイ用基板の製造工程を示した、基板 (1) の反応領域 (1 2) 及びその周辺の断面模式図 (メルカプトアルキルシランの水系溶液を用いた場合)。検出用表面 (1 3) を親水化した工程を示す図である。

【 図 6 】 前記工程において、水酸基 (- O H) をメルカプト基 (- S H) に置換し、非検出用表面 (1 4) を親水化した工程を示す図である。

40

【 図 7 】 前記工程において、ヌクレオチド鎖 N を固定化した工程を示す図である。

【 図 8 】 バイオアッセイ用基板の製造工程を示した、基板 (1) の反応領域 (1 2) 及びその周辺の断面模式図 (メルカプトアルキルシランの、トルエン等の疎水性溶液を用いた場合)。非検出用表面 (1 4) 及び非反応領域 (1 5) を親水化した工程を示す図である。

【 図 9 】 前記工程において、検出用表面 (1 3) にメルカプト基 (- S H) を付加した工程を示す図である。

【 図 1 0 】 前記工程において、非検出用表面 (1 4) 及び非反応領域 (1 5) を疎水化した工程を示す図である。

50

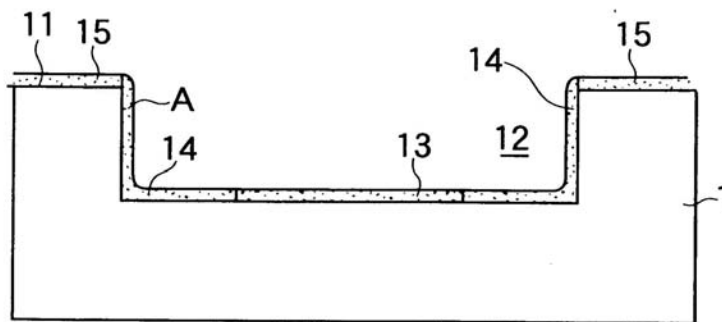
【図 1 1】前記工程において、非検出用表面（14）を親水化した工程を示す図である。
 【図 1 2】反応領域（12）を挟むように対向した電極（3、3）が設けられた、基板（1）の反応領域（12）周辺の断面模式図である。

【符号の説明】

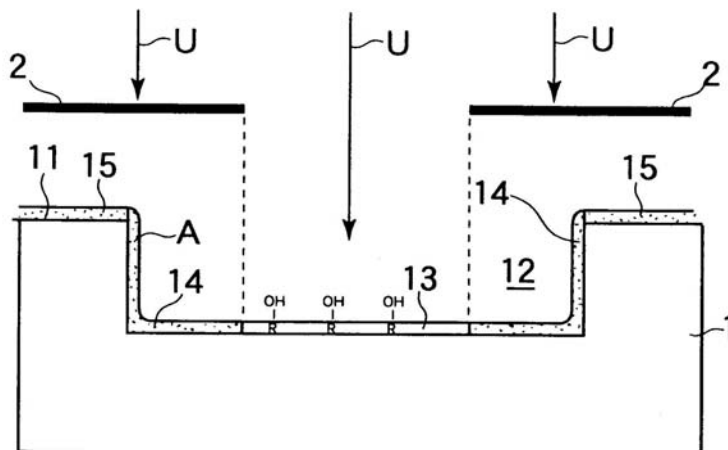
【0072】

- 1 基板
- 12 反応領域
- 13 検出用表面
- 14 非検出用表面
- 15 非反応領域
- 2 マスク
- 3 電極
- A アルキルシラン

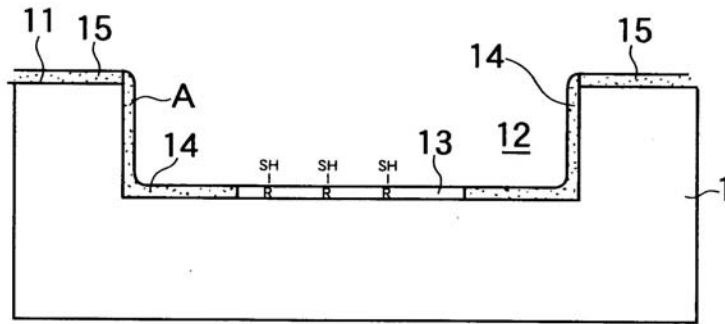
【図 1】



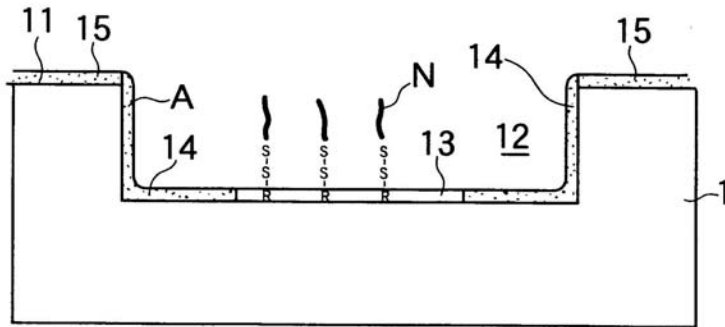
【図 2】



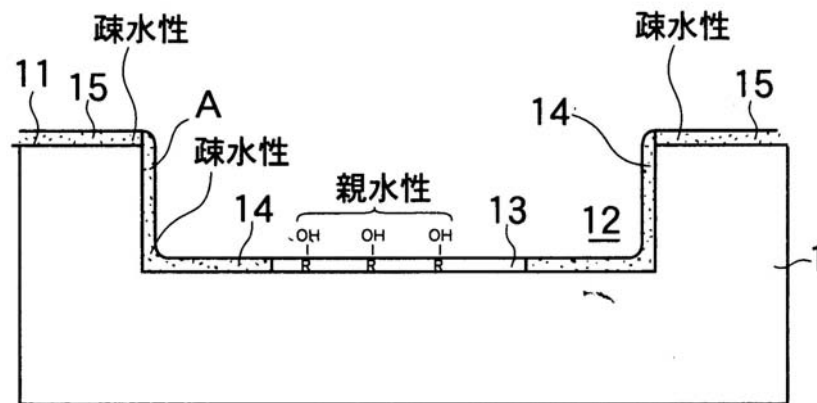
【図3】



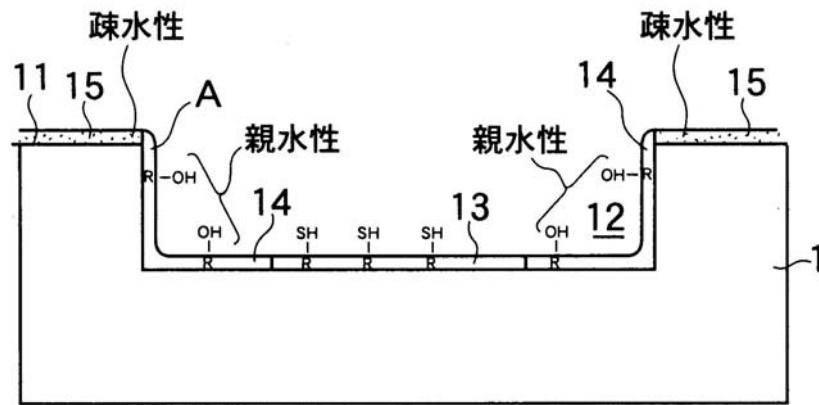
【図4】



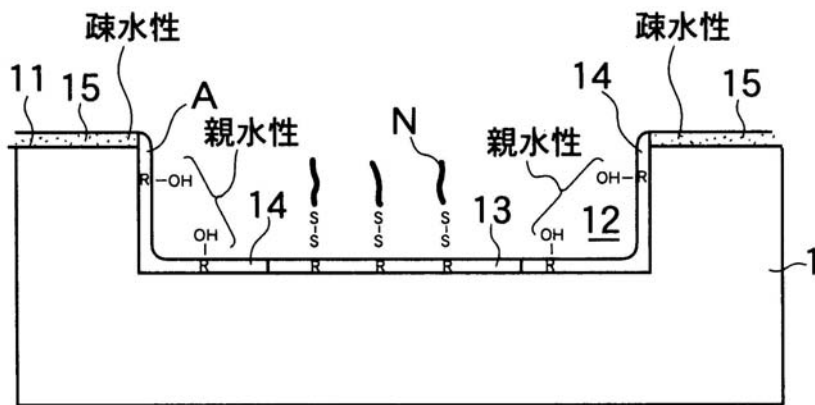
【図5】



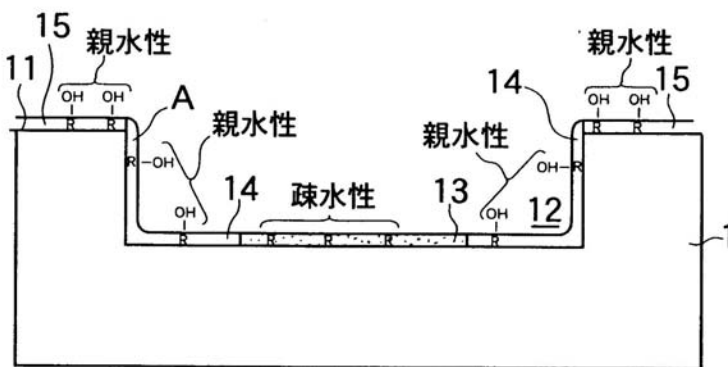
【 図 6 】



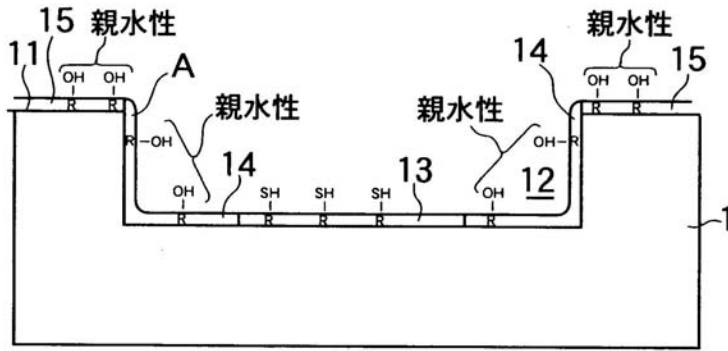
【 図 7 】



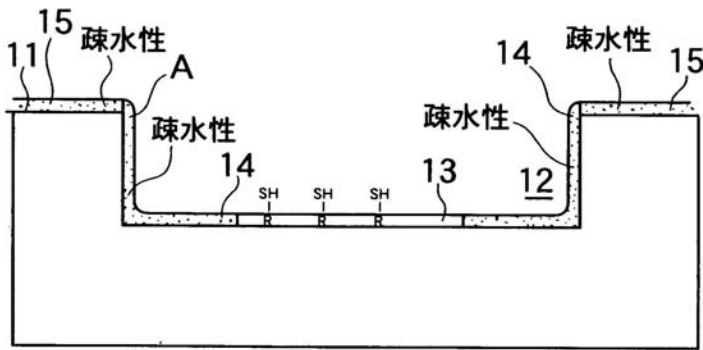
【 図 8 】



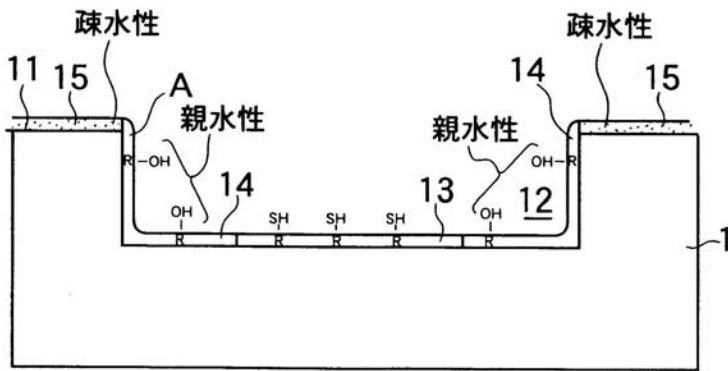
【図9】



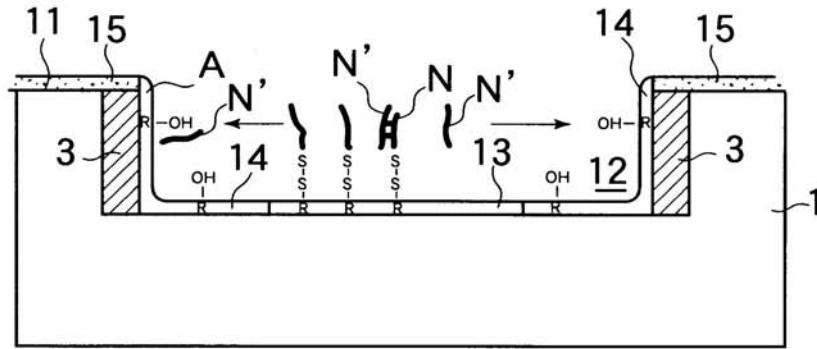
【図10】



【図11】



【 図 1 2 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特表平11-502617(JP,A)
特開2003-121442(JP,A)
国際公開第03/056337(WO,A1)
特表2002-525573(JP,A)
特表2000-510710(JP,A)
特開2000-060554(JP,A)
特表平09-500568(JP,A)
特開2003-156504(JP,A)
特開2002-122610(JP,A)
特開2003-066046(JP,A)
特開平07-084371(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - G01N 33/98
C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 37/00