

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4382285号
(P4382285)

(45) 発行日 平成21年12月9日(2009.12.9)

(24) 登録日 平成21年10月2日(2009.10.2)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/15	(2006.01)	GO 1 N 33/15	Z
C 1 2 M 1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/34	(2006.01)	C 1 2 M 1/34	F
GO 1 N 33/50	(2006.01)	C 1 2 M 1/34	Z
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/50	Z

請求項の数 21 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-570568 (P2000-570568)
(86) (22) 出願日	平成11年9月15日 (1999.9.15)
(65) 公表番号	特表2002-525573 (P2002-525573A)
(43) 公表日	平成14年8月13日 (2002.8.13)
(86) 国際出願番号	PCT/FR1999/002191
(87) 国際公開番号	W02000/016082
(87) 国際公開日	平成12年3月23日 (2000.3.23)
審査請求日	平成18年7月28日 (2006.7.28)
(31) 優先権主張番号	98/11561
(32) 優先日	平成10年9月16日 (1998.9.16)
(33) 優先権主張国	フランス (FR)

(73) 特許権者	590000514
	コミツサリア タ レネルジー アトミー ク
	フランス・75015・パリ・パティマン ・”ル・ポナン・デー”・リュ・ルブラン ・25
(74) 代理人	100064908
	弁理士 志賀 正武
(74) 代理人	100108578
	弁理士 高橋 詔男
(74) 代理人	100089037
	弁理士 渡邊 隆
(74) 代理人	100101465
	弁理士 青山 正和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キャリアーに複数の分析部位を備えた化学的または生物学的分析のための装置およびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分析部位がキャリアー(21、51)をくりぬいたマイクロディッシュ(23、53)からなり、マイクロディッシュの側壁および底、並びに、マイクロディッシュエッジと呼ばれる各マイクロディッシュの周りのキャリアー表面領域が、少なくとも一つの親水性部材(24、26、55、57)からなり、かつ、マイクロディッシュの周りの領域の間に配置されたキャリアーの平面状領域が疎水性部材(27、59)からなる、化学的または生物学的試薬を固定することができる複数の分析部位を備えたキャリアーを有する化学的または生物学的分析のための装置。

【請求項 2】

マイクロディッシュが、扁平した錐体の形状を備え、その小さい方の底面がマイクロディッシュの底に対応する、請求項 1 記載の装置。

【請求項 3】

マイクロディッシュの側壁、底およびエッジが、同一の親水性部材からなる、請求項 1 または 2 記載の装置。

【請求項 4】

マイクロディッシュの底が、第一の親水性部材(24、55)からなり、少なくとも一部のマイクロディッシュの側壁とマイクロディッシュのエッジが第二の親水性部材(26、57)からなり、単独で第一の親水性部材が化学的または生物学的試薬を固定することができる、請求項 1 または 2 に記載の装置。

10

20

【請求項 5】

親水性部材が、エポキシ基、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH-$ 、 $-NH_2$ および $-COOH$ から選択された親水性基を含む、請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 6】

疎水性部材が、炭化水素含有基および過フッ化炭化水素含有基から選択された疎水性基を含む、請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 7】

第一の親水性部材が、第二の親水性部材とは異なる親水性基を含む、請求項 4 および 5 記載の装置。

【請求項 8】

キャリアーが、電子的機能を有する集積電子システムを備えた活性基板を含む、請求項 1 ないし 7 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 9】

生物学的試薬がオリゴヌクレオチドである、請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 10】

請求項 3 にかかる化学的または生物学的分析のための装置を製造する方法であって、以下の工程：

- a) キャリアーの表面においてマイクロディッシュをくりぬくこと、
 - b) 疎水性部材を含めるキャリアー表面の領域を規定すること、および
 - c) 疎水性部材を全く含まない、マイクロディッシュとキャリアー表面の領域上に親水性部材を形成すること、
- を含む方法。

【請求項 11】

請求項 3 にかかる化学的または生物学的分析のための装置を製造する方法であって、以下の工程：

- a) キャリアーの表面においてマイクロディッシュをくりぬくこと、および
- b) 親水性部材を含めるキャリアー表面の領域に親水性部材を形成すること、を含む方法。

【請求項 12】

請求項 4 にかかる化学的または生物学的分析のための装置を製造する方法であって、以下の工程：

- a) キャリアーの表面においてマイクロディッシュをくりぬくこと、
- b) 疎水性部材を含めるキャリアー表面の領域を規定すること、
- c) 疎水性部材を全く含まないキャリアー表面、および、マイクロディッシュの表面に、第一親水性部材の部位に対応する第一領域と第二親水性部材の部位に対応する第二領域を規定すること、
- d) 第一領域に第一親水性部材を、並びに、第二領域に第二親水性部材を形成すること、を含む方法。

【請求項 13】

疎水性部材を含めるキャリアー表面の領域に疎水性部材を形成する付加工程を含む、請求項 10 ないし 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

マイクロディッシュがエッチングによって形成される、請求項 10 ないし 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

キャリアーが、ポリマーの表面層または電子的機能を備えた活性基板に沈着された鉍物酸化物を含み、マイクロディッシュがポリマーまたは酸化物層にエッチングによって形成される、請求項 10 ないし 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

キャリアーが、ケイ素またはガラスであり、疎水性部材は、ガラスまたはケイ素を予め酸化してから、疎水性シラニゼーション剤とを反応させることによって形成される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

疎水性シラニゼーション剤が、以下の式：

【化 1】



10

[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 が、同一または相違してもよく、 C_1 ないし C_3 アルコキシ基およびハロゲン原子から選択され、かつ R^4 が、それぞれ、直鎖または分枝状の、炭化水素含有基または過フッ化炭化水素含有基である]

を有するシランである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

キャリアーが、ケイ素またはガラスであり、親水性部材は、ガラスまたはケイ素を予め酸化してから、親水性シラニゼーション剤と反応させることによって形成される、請求項 10 ないし 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

親水性シラニゼーション剤が、以下の式：

【化 2】



20

[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 が、同一または相違してもよく、 C_1 ないし C_3 アルコキシ基およびハロゲン原子から選択され、かつ R^5 が、直鎖または分枝状の、エポキシ基、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NH}_2$ および $-\text{COOH}$ から選択された少なくとも一つの親水性基を有する炭化水素含有基である]

を有するシランである、請求項 18 に記載の方法。

30

【請求項 20】

疎水性部材が、疎水性炭化水素含有基または過フッ化炭化水素含有基を含むチオールまたはジスルフィドと、疎水性部材から形成される、キャリアー表面の領域に沈着された、金、銀、銅またはそれらの合金の一つの金属層との反応によって形成される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 21】

親水性部材が、エポキシ基、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}_2$ および $-\text{COOH}$ から選択された少なくとも一つの親水性基を含むジスルフィドまたはチオールと、親水性部材から形成される、キャリアーの領域に沈着された、金、銀、銅またはそれらの合金の一つの金属層との反応によって形成される、請求項 10 ないし 13 のいずれか一項に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明の主題は、多数の分析部位を備えた化学的または生物学的分析のための装置であり、特に、薬理学的スクリーニングおよび生物学的 DNA テストに使用することができる。スクリーニングでは、同一試薬で被覆された多数の部位を備えたキャリアーにおいて、連続的に各部位に選択的に沈着される、種々の分子の効果が、調べられなければならない。

【0002】

DNA テストのような生物学的試験では、この装置の各部位は異なる DNA プローブで被

50

覆され、調べたいアナライト、そのゲノム配列が、全ての部位と、分析時に接触するように配置される。

分析化学において、化学反应用の皿（または化学的反応器）の小型化に対する強い要求がある。

これらの応用の全てについて、できるだけ多数の分析部位を備えたキャリアーを利用可能にすることが重要であるが、高密度の数の部位は、その部位に試薬またはサンプルの液滴を沈着させる際に十分な正確性の問題を生じる。

【0003】

【従来の技術】

米国特許US - A - 5 4 7 4 7 9 6号公報[1]は、キャリアーの表面にいくつかの分析部位を備えた装置を記載している。この装置では、分析部位は、平面状キャリアーの疎水性領域によって分けられた親水性領域によって形成されている。

添付した図1は、上に親水性領域3と疎水性領域5が設けられた、平面状キャリアー1を備えたこの装置の構造を示している。

【0004】

これらの親水性および疎水性領域は、フォトマスキングの後に、親水性または疎水性シランをガラスキャリアーと反応させることにより、キャリアー1上に形成される。

この場合には、平面状領域によって形成された親水性領域3が、隣接する疎水性領域5の存在によって、沈着された試薬7の液滴を、そのままの場所に維持させる。

【0005】

この装置は、試薬ディスペンサーが、液滴7のサイズが無限に減少されることを許容しないという事実によって顕著に制限される。

それゆえ、例えば、300μm未満に間隔を増大するために、キャリアーの部位の数の密度および集積化(integration)を増大することが望まれる場合には、リソグラフィ技術を用いて、部位密度を増大させるために親水性および疎水性領域の表面を制限することが十分に可能であることから、システムを現在制限する、ディスペンサーの解像力である。

【0006】

このシステムの他の重要なパラメーターは、例えばDNAプローブのような試薬が、その部位で乾燥される溶液中の部位に移されるので、その部位の有効表面領域である。それゆえ、その部位の有効表面領域が低減されれば、乾燥後の試薬の量は、非常に少なくなる。最後に、その表面上に沈着された液滴を有するキャリアーを扱うことは容易ではない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の主題はまさに、

その標準的な能力が、50から1000ピコリットルよりも少ない液滴を散布できない現行のディスペンサーを用いながらも、沈着物の良好な空間的精度で、キャリアーの部位の数の密度および集積化を増大させることが可能な化学的または生物学的分析のための装置である。

【0008】

【課題を解決するための手段】

発明の主題は、分析部位がキャリアーをくりぬいたマイクロディッシュからなり、マイクロディッシュの側壁および底、並びに、マイクロディッシュエッジと呼ばれる各マイクロディッシュの周りのキャリアー表面領域が、少なくとも一つの親水性部材からなるか、処理によって親水性とされており、かつ、マイクロディッシュの周りの領域の間に配置されたキャリアーの平面状領域が疎水性部材からなるか、処理によって疎水性とされた、化学的または生物学的試薬を固定することができる複数の分析部位を備えたキャリアーを有する化学的または生物学的分析のための装置である。

【0009】

明細書および特許請求の範囲において、用語“親水性部材”は、その部材が親水性であるか、処理を経て親水性とされたことを意味する。

10

20

30

40

50

同様に、用語“疎水性部材”は、その部材が疎水性であるか、処理を経て疎水性とされたことを意味する。

この装置において、マイクロディッシュは、特に、扁平した錐体の形状を備え、その小さい方の底面がマイクロディッシュの底に対応してもよい。

【0010】

この装置において、マイクロディッシュが親水性部材であり、マイクロディッシュの周りの領域、すなわちエッジも親水性部材であり、疎水性部材によって表面上で分離されているという事実が、キャリアーの厚み内に液滴固定ゾーンを与えることを可能にし、それによって液滴の量を制限することなく、分析部位の直径を制限できることを意味する。このように、従来技術の平面上キャリアーと比べて、活性部位のより高い高密度化を可能にする。

10

【0011】

それゆえ、本発明の構成は二つの興味ある利点を付与する：

- 1) 制限された解像度を有する液滴ディスペンサーの使用を可能にする、および
- 2) 溶媒を蒸発させた後により高濃度の溶質を与える、マイクロディッシュよりも大きな直径を有する液滴の使用を可能にする。

本発明の装置の第一の実施態様によれば、マイクロディッシュの側壁、底部およびエッジが、同一の親水性部材からなる。これは、特に、液滴がマイクロディッシュからあふれる場合に、マイクロディッシュ内およびマイクロディッシュのエッジ上における試薬の液滴のリフォーカシングおよび固定を確実にすることを可能にする。

20

【0012】

本発明の装置の第二の態様によれば、マイクロディッシュの底部は、第一の親水性部材からなり、少なくとも一部のマイクロディッシュの側壁とマイクロディッシュのエッジが第二の親水性部材からなり、単独で第一の親水性部材が化学的または生物学的試薬を固定することができる。

この特別な構造から、第二の親水性部材によりマイクロディッシュに液滴を引きつけ、第一の親水性部材によりマイクロディッシュの底に試薬を確実に固定化することができる。この装置は、試薬が水性溶液に希釈される場合に特に興味深いものである。マイクロディッシュを形成することにより、基板の性質に本来備わっている抵触シグナル(蛍光)をしばしば生じる基板の面(plane)とは異なる面において、分析段階において蛍光を観察することができる。

30

それゆえ、水性溶液の液滴は、第二親水性部材を湿らせるが、少量で存在する試薬は、マイクロディッシュの底に固定される。

【0013】

本発明によれば、このシステムのキャリアーは、特定の機能を持たない、有機ポリマー、ガラス、またはケイ素において化合しない基板であってもよい。本発明において、種々の電子的機能、部位アドレッシング、例えば、局部加熱、もしくは蛍光の集積検出のためのCCDを有する集積された電子的システムを備えた活性基板を含むキャリアーを用いることもできる。

このタイプの活性基板は、例えば、Eggersら、A versatile biochip for gene-based diagnostics, 1996, IEEE, p.87-92 [2]による刊行物に記載されている。かかるキャリアーでは、活性基板は、一般に、マイクロディッシュが形成されるポリマー層で被覆される。

40

【0014】

本発明のこのシステムでは、親水性部材は、エポキシ基、-OH、-SH、-NH-、-NH₂および-COOHから選択された親水性基を含む部材であってもよい。

疎水性部材は、疎水性有機ポリマーのキャリアーに関してキャリアー自身に形成されてもよく、また、キャリアー上に形成されてもよい。一般に、疎水性部材は、炭化水素含有基または過フッ化炭化水素含有基を含む。

用いられたベース部材、ガラスまたはケイ素は、適切な表面処理を用いて選択的に親水性または疎水性とされてもよい。

50

本発明のさらなる主題は、上記のような化学的または生物学的分析のための装置を製造する方法である。

【0015】

第一の実施態様によれば、この方法は、以下の工程

- a) キャリアーの表面にマイクロディッシュ（またはマイクロウェルまたはマイクロキャビティー）をくりぬくこと、
 - b) 疎水性部材を含むキャリアー表面の領域を規定すること、および
 - c) 疎水性部材を含まない、キャリアー表面およびマイクロディッシュの領域に親水性部材を形成すること、
- を含む。

10

第一の実施態様の変形によれば、この方法は以下の工程：

- a) キャリアーの表面にマイクロディッシュをくりぬくこと、および
- b) 親水性部材を含むキャリアー表面の領域に親水性部材を形成すること、を必要とする。

【0016】

上記方法は、側壁、底部およびエッジが同一の親水性部材からなるマイクロディッシュを製造するのに適している。

二つの異なる親水性部材を有するマイクロディッシュの形成に適した本発明の方法の第二の実施態様によれば、以下の工程：

- a) キャリアーの表面にマイクロディッシュをくりぬくこと、
- b) 疎水性部材を含むキャリアー表面の領域を規定すること、
- c) 疎水性部材を含まないキャリアー表面に、および、マイクロディッシュの表面に、第一親水性部材の位置に対応する第一領域と第二親水性部材の位置に対応する第二領域を規定すること、
- d) 第一領域に第一親水性部材を、並びに、第二領域に第二親水性部材を形成すること、を必要とする。

20

【0017】

このキャリアーが非疎水性部材であるならば、疎水性部材を含むキャリアー表面の領域に疎水性部材を形成するための付加工程を含む。

本発明の方法を適用するために、最初に、マイクロディッシュが、キャリアーの厚みにくりぬかれる。乾燥または化学的エッチングの後に従来のリソグラフィー技術が、この操作のために用いられてもよい。

30

キャリアーがケイ素である場合には、マイクロディッシュは、 54° の傾斜と平坦な底を備えたマイクロディッシュを与える、結晶面の優先化学エッチングによって形成されてもよい。マイクロディッシュの間隔またはピッチは、 10 ないし $500\mu\text{m}$ の範囲とすることができ、マイクロディッシュの深さは、 5 ないし $500\mu\text{m}$ の範囲とすることができる。一般に、リソグラフィー技術が所望の位置でマイクロディッシュを規定するために用いられる。

【0018】

ガラスキャリアーでは、マイクロディッシュは、マイクロディッシュの位置を規定するリソグラフィー技術を用いて、角度のない、乾燥等方性エッチングによって形成されてもよい。

40

キャリアーが電子的機能を備えた活性基板を含む場合には、このキャリアーは、好ましくは、ポリマーまたは鉱物酸化物層を備えた上面に設けられ、ここでマイクロディッシュは、マイクロディッシュの位置を規定するリソグラフィー技術も用いてエッチングによって形成される。

【0019】

いずれにしても、 5 ないし $500\mu\text{m}$ の深さのマイクロディッシュが、 10 ないし $500\mu\text{m}$ のマイクロディッシュのピッチで、かつ、マイクロディッシュの上方の開口が 3 ないし $450\mu\text{m}$ で得られる。

50

この方法の次の工程は、キャリアーの表面に疎水性部材の領域と親水性部材の領域を形成することからなる。

これらの領域は、疎水性または親水性の基をグラフトすることによってキャリアーの表面を変更することによって形成することができる。

しかしながら、キャリアーが疎水性有機ポリマーである場合、または疎水性有機ポリマーで被覆されている場合には、キャリアーの表面を変更して疎水性領域を形成する必要はない。

【0020】

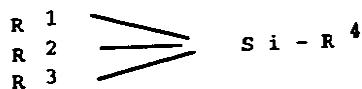
キャリアーがシリコンまたはガラスである場合には、この変更は、シリコンまたはガラスを疎水性または親水性シラニゼーション剤と反応させることによって実施される。

キャリアーがケイ素である場合には、先に酸化に処され、次いで、通常のクリーニング処理（例えば、HCl）されて、シラニゼーション剤と反応することができる表面上にOH基を得る。

【0021】

疎水性シラニゼーション剤は、以下の式：

【化3】



[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 が、同一または相違してもよく、 C_1 ないし C_3 アルコキシ基およびハロゲン原子（好ましくは塩素原子）から選択され、かつ R^4 が、直鎖または分枝状の、炭化水素含有基または過フッ化炭化水素含有基である]を有するシランであってもよい。

好ましくは、炭化水素基または過フッ化炭化水素基が、4ないし18炭素原子を含む。

【0022】

疎水性シラニゼーション剤の例として、以下の化合物を挙げることができる：

- “レペルシラン(Repelsilane)”と呼ばれる商業的に入手可能な製品、
- オクタデシルトリエトキシシラン、
- トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチルジメチルクロロシラン、
- 3-(1,1-ジヒドロペルフルオロオクチルオキシ)プロピルトリエトキシシラン、
- ヘキサメチルジシラザン(HMDS)。

【0023】

親水性シラニゼーション剤が、以下の式：

【化4】



[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 が、同一または相違してもよく、 C_1 ないし C_3 アルコキシ基およびハロゲン原子、好ましくは塩素原子から選択され、かつ R^5 が、直鎖または分枝状の、エポキシ基、-OH、-SH、-NH₂、-NH-および-COOHから選択された少なくとも一つの親水性基を有する炭化水素基である]

を有するシランであってもよい。

炭化水素基が、有利に3ないし18の炭素原子を有する。

【0024】

親水性シラニゼーション剤の例として、以下の化合物：

- アミノプロピルトリメトキシシラン “APS”、
- トリメトキシシリルプロピル-ジセエントリアミン(ditheyene)トリアミン “DETA”、

- N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシ-シラン“EDA”、
- N,N-ビス(ヒドロキシエチル)アミノプロピルトリエトキシ-シラン、
- “Bind Silane” と呼ばれる商業的製品、
- アミノエチルアミノメチル フェネチルトリメトキシシラン“PEDEA”またはさらなるメルカプトプロピルトリメトキシシラン：

【化5】



10

を挙げることができる。

【0025】

また、親水性または疎水性の基を添加するために、チオールまたはジスルフィドを用いてキャリアーに疎水性部材および/または親水性部材を形成することもできる。この場合、最初に、金、銀、銅またはそれらの合金の一つの金属層が変更される領域に沈着され、その後、この層が、一以上の親水性または疎水性基を含むチオールまたはジスルフィドと反応させられる。上述したように、疎水性基は、直鎖または分枝鎖状の炭化水素含有基または過フッ化炭化水素含有基とすることができる。親水性基は、エポキシ基、-OH、-NH-、-NH₂、-COOHおよび-SHから選択することができる。

【0026】

20

Au、Ag、Cuを機能化するために、使用できるチオールおよびジスルフィドの例として、以下の化合物：

- オクタデカンチオール、R-SH (R = C₈ないしC₁₈)、疎水性、
- ヘキサデカンチオール、
- 3-メルカプトプロピオン酸 親水性 (金を親水性にする)

を挙げることができる。

本発明の方法によれば、親水性部材の領域または親水性とされた領域、および疎水性部材の領域または疎水性とされた領域は、通常のマクロエレクトロニクス技術、例えば、マスクングと樹脂展開を備えた、ネガティブまたはポジティブフォトレジストを用いたリソグラフィ法を用いてキャリアー上に規定することができる。展開された領域は、処理され、次いで、樹脂が除かれ、露出された領域が別のシラニゼーション剤で処理される。

30

【0027】

それゆえ、本発明によれば、親水性および疎水性領域は、例えばキャリアーの全ての表面を処理して親水性または疎水性とし、次いで、例えばレーザーによってキャリアーの一部の領域の親水性または疎水性部材を除くことによって、エッチング法を用いてキャリアー上に形成される。露出された領域は、所望の疎水性または親水性領域を形成するように処理される。

本発明の他の特徴および利点は、例示的であって、非限定的な、添付の図面を参照することによって、より明確になる。

【0028】

40

【発明の実施の形態】

図2は、単一の親水性部材が用いられる、本発明にかかる装置の第一の実施態様を示す。この図では、マイクロディッシュ23がくりぬかれ、その小さい方のベースがマイクロディッシュの底24に対応する扁平した錐体の形状を有するキャリアー21が見られる。本発明の第一の実施態様では、底部24、側壁25、および以後、マイクロディッシュのエッジ26と称する、各マイクロディッシュの周りのキャリアー表面の領域が、親水性部材から形成されるが、マイクロディッシュのエッジ間に位置するキャリアー表面は疎水性部材27からなる。

【0029】

図3は、二つの異なる親水性部材が用いられる、本発明にかかる装置の第二の実施態様を

50

示す。

この図では、キャリアー 2 1、マイクロディッシュ 2 3 および疎水性部材 2 7 の領域を称するために、同一の参照番号が用いられる。この場合、マイクロディッシュの底 2 4 と一部の側壁 2 5 a が第一の親水性部材からなり、残りの側壁 2 5 b とエッジ 2 6 は、第二の親水性部材からなる。これは、後に記載するように、化学的または生物学的試薬をマイクロディッシュの底に付着させることを可能にする。

【 0 0 3 0 】

本発明の装置にかかるこれら二つの実施態様では、キャリアーの三次元構造が多数の利点を得ることを可能にする。

この構造によれば、マイクロディッシュが、キャリアーの厚みにおいてくりぬかれ、かつ、より小さい有効表面領域に対してより多くの試薬またはサンプルを含むことができるので、マイクロディッシュの開口に対応する反応部位の表面を制限することを可能にする。それゆえ、試薬またはサンプルを分散するロボットの位置づけ精度、または液滴の量によって制限されることなく、マイクロディッシュのピッチとサイズを微小(micronic)サイズに低減することができる。さらに、疎水性であるキャリアーの他の部分と対照的に、マイクロディッシュの周りおよびマイクロディッシュ内に親水性の領域を設けることにより、図 4 A および 4 B に見られるように、液滴を、マイクロディッシュに固定および誘導することができる。

【 0 0 3 1 】

図 4 A を参照すると、親水性領域 2 4 と疎水性領域 2 7 を備えたマイクロディッシュ 2 3 が設けられたキャリアー 2 1 を有する、本発明の最初の実施態様にかかる装置が見られる。

図 4 A は、マイクロディスペンサー(マイクロピペッティングロボット)やインクジェットプリントヘッドによって沈着される試薬またはサンプルの液滴 2 9 の供給段階の装置を示す。

【 0 0 3 2 】

図 4 A に見られるように、液滴はマイクロディッシュの開口に垂直に配置される必要はない。しかしながら、親水性領域 2 4 と疎水性領域 2 7 の存在が、液滴をマイクロディッシュに固定および誘導する。表面の親水性によって付与された表面張力により、沈着された液滴は位置にスライドして、図 4 B に記載されているように完全にマイクロディッシュを満たす。それゆえ、液滴間にまたがって、試薬が混合される危険を伴うことなく、所定の液滴のサイズで、試薬部位のピッチがキャリアー上で低減される。また、液滴の配置が不完全であっても、以下から分かるように、マイクロ加工の使用を介して極端に精密なマイクロディッシュの位置決めによって付与されるような完全な空間的分布を可能にする。

【 0 0 3 3 】

この装置では、容量 / 試薬と接触する面の比率が、空間の同一占有(identical occupation)に関して増大することにも注意する。これは、親水性領域において、乾燥後に、固定される物質を試薬が含む場合に、それらは数字上遙かに大きい。

また、このタイプの構造は、例えば集積されたヒーティングまたは読み取り手段を備えた DNA チップのような活性基板の上に添加することができる。

最後に、本発明の装置のこの構造は、局所的 in situ DNA 合成法にも適する。プローブの最初の塩基をマイクロディッシュに固定した後、このプローブをマイクロディッシュにおいて塩基毎に構成する。

【 0 0 3 4 】

図 5 から図 7 は、DNA チップを製造するための、本発明の装置の第二態様にかかる装置を用いる利点を示す。

図 5 では、この装置のマイクロディッシュの一つが記載されている。これは、マイクロディッシュ内とそれらのエッジ上に第一親水性部材 5 5 と第二親水性部材 5 7 が存在し、かつ、マイクロディッシュ間に疎水性部材 5 9 が存在するマイクロディッシュ 5 3 を備えたキャリアー 5 1 である。

【 0 0 3 5 】

この図は、第一親水性部材の親水性基 5 6、第二親水性部材の親水性基 5 8 および疎水性部材の疎水性基 6 0 を記載する。親水性基 5 6 は親水性基 5 8 と異なり、親水性基 5 6 は試薬、例えば、試薬 6 5 の液滴に存在する核酸プローブ 6 3 を固定するように選択されることが分かる。それゆえ、図 5 は、この装置の液滴供給段階に相当する。

図 6 は、疎水性領域 5 9 においてはじかれることにより、親水性領域上における液滴 6 5 のリフォーカシング(refocusing)状態を示す。

図 7 は、第一親水性部材 5 5 の親水性基 5 6 と、プローブの親水性基 6 4 の反応による、第一親水性部材 5 5 上における核酸プローブ 6 3 の固定化段階を示す。

【 0 0 3 6 】

例として、ヌクレオチドプローブが OH 基で官能化され、かつ、第一親水性部材 5 5 が OH 親水性基を含み、一方で、第二親水性部材が COOH または NH₂ 親水性基を含んでもよい。この場合、第一親水性部材 5 5 にはプローブのみが結合する。

シラニゼーションによってあらかじめ修飾されたガラス表面におけるオリゴヌクレオチドプローブの固定化技術は、Beattieら Clin.Chem., vol.39, No4, 1993, 714-722 頁 [3] に記載されている。

本発明の装置のこの態様は、特に興味深い。なぜなら、マイクロディッシュのピッチが低減すれば、蛍光が結果の読み取りに用いられる場合に、検出の問題を生じる、種々の試薬で被覆された部位が互いに近くなるからである。試薬部位間の十分な空間を維持しつつ、比較的多数の液滴の使用を可能にすることにより、一連の入手が単純化される。

【 0 0 3 7 】

さらに、かかる改良により、試薬はマイクロディッシュの底だけに得られ、異なる平面においてあらゆる化学反応の部位の位置を定めることを可能にする。これは、例えば、キャリアーの表面の蛍光を妨害することを克服するための読み取りシステムによって用いられてもよい(差異フォーカシング)。

【 0 0 3 8 】

上記マイクロディッシュは、機械的に分配された液滴を受けることができる。以下の本発明の二つの特別な利点が考慮されなければならないことが分かっている：

- ディスペンサーの本質的な精度を克服すること：不適切に調節された液滴でさえ、各ディッシュの周りのキャリアーの平面部にまたがる親水性領域(26 または 57)によりマイクロディッシュ内に“収まる”。

- 液滴に含まれる実質的な量の試薬をディッシュに固定すること：ディッシュの周りにまたがる親水性領域によってディッシュにわたって集まるので、ディッシュよりもはるかに多い液滴が沈着されてもよい。液滴に含まれる試薬があまり濃縮できないか、分布の問題が生じるので、非常に重要である。

【 0 0 3 9 】

トポロジーに関して、例示的に、図 2 に示すような以下の大きさを備えた二つのタイプのディッシュを製造した。

1) - 空洞の底のディッシュの直径 D : 1 0 0 μ m

- ディッシュの深さ P : 3 0 μ m

- 各サイドの平面部にまたがる領域 L : 1 5 μ m

- ピッチ : 1 8 0 μ m

2) - 空洞の底のディッシュの直径 D : 7 0 μ m

- ディッシュの深さ P : 2 0 μ m

- 各サイドの平面部にまたがる領域 L : 1 0 μ m

- ピッチ : 1 4 0 μ m。

【 0 0 4 0 】

図 8 A から図 8 E は、単一の親水性部材を用いて本発明の装置を製造する種々の工程を図示しており、親水性および疎水性領域がシラニゼーションによって形成され、キャリアーはケイ素である。

図 8 A では、ケイ素の最初のキャリアー 2 1 が図示されている。

図 8 B は、キャリアー 2 1 におけるマイクロディッシュ 2 3 の形成段階を示す。これは、結晶平面に沿ったリソグラフィーおよび化学エッチングによって形成することができる。このようにして、 54° の斜面と平坦な底を備えた扁平した錐体の形状のマイクロディッシュが得られる。試薬を自動沈着することによって分配された液滴の大きさに適合させるために、マイクロディッシュのピッチは $10 \sim 500 \mu\text{m}$ であり、その深さは $5 \sim 500 \mu\text{m}$ とすることができる。

【 0 0 4 1 】

マイクロディッシュのリソグラフィーの後に、ケイ素表面に OH 基を得るために、このユニットを、 800°C よりも高い温度、例えば 850°C で熱酸化処理する。

図 8 C は、疎水性部材の領域がマスクを用いて規定される段階を示す。このマスクは、感光性樹脂 R からなり、キャリアー上に沈着され、必要なパターンを得るために露光され、疎水性領域を現すように現像される。樹脂 R は、マイクロエレクトロニクスにおいて用いられるフォトレジストであってもよい。特に、ポジティブシップリー (shippley) 樹脂 (S 1 8 1 3 または S T R 1 0 7 5) またはネガティブ樹脂 S A L 6 0 1 を使用することができる。Microposit MF 319 現像薬を用いることができる。

【 0 0 4 2 】

図 8 D は、例えば、トリデカフルオロテトラヒドロ - オクチルトリエトキシ - シラン (F 1 3 とも言う) のようなシラニゼーション剤によって曝されたケイ素キャリアーの疎水性シラニゼーションによって疎水性部材 2 7 の領域を形成するための工程を示す。

疎水性部材 2 7 の領域を形成した後、親水性部材を含む領域を曝すために例えばアセトン中で樹脂 R を溶解して取り除く。

図 8 E は、E D A、A P S または D E T A を用いた親水性シラニゼーションによる親水性部材 2 4 におけるかかる領域の形成を示す。

【 0 0 4 3 】

図 9 A ~ 図 9 D は、金プレーティングで被覆されたケイ素のキャリアーを備えた本発明の装置の態様の変形を示し、チオールが親水性部材と疎水性部材を形成するために用いられている。この場合、上記と同様に、扁平した形状の錐体形状 2 3 のマイクロディッシュ 2 3 が、結晶プレートに沿った化学的リソ-エッチングによりケイ素キャリアー 2 1 にくりぬかれており、次いで、金が $50 \sim 5000 \mu\text{m}$ の厚みを備えた層を形成するようにキャリアー全体に沈着される。

図 9 A は、マイクロディッシュ 2 3 を備え、かつ、金属 M で被覆されたたたキャリアー 2 1 を示す。

【 0 0 4 4 】

マイクロディッシュが形成された後に、親水性材料の領域が上述したように感光性樹脂 R を用いたリソグラフィーによって規定される。

このように、図 9 B に示された構造は、金属 M が疎水性になる領域上で露呈されて得られる。

疎水性部材は、オクタデカンチオール $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SH}$ のような疎水性チオールと、露呈された金の沈着との反応によって形成される。

これは、疎水性部材 2 7 の領域を備えた図 9 C に示された構造を与える。かかる操作の後、樹脂 R の層は、上述したように、アセトンにおける溶解によって取り除かれ、未被覆領域が親水性チオールで処理される。親水性チオールとして、 $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4)_n\text{SH}$ 、 $\text{HOOC}(\text{C}_2\text{H}_4)_n\text{SH}$ が用いられる ($n = 3 \sim 18$)。

【 0 0 4 5 】

このようにして、疎水性部材 2 7 の領域で分離された親水性部材 2 4 の領域を備えた図 9 D に示された構造が得られる。

上記の二つの例では、親水性および疎水性部材が、シラニゼーション処理またはチオールによる修飾によって形成されたが、これら二つの可能な修飾を組み合わせることも当然に可能であり、一部の領域をシラニゼーションによって形成し、かつ、他の領域をチオール

10

20

30

40

50

とキャリアーの反応によって形成するか、あるいは、別の親水性化または疎水性化技術によって形成することが可能である。

【 0 0 4 6 】

キャリアーがガラスの場合には、マイクロディッシュは、アングルフリーの等方性エッチングによって形成され、次いで、親水性部材の領域と疎水性部材の領域が上記方法を用いて形成されてもよい。これらの領域がシラニゼーションによって形成される場合には、マイクロディッシュをエッチングした後にキャリアーを酸化処理する必要はない。これは、ガラスが後の工程について必要なOH官能性を持つからである。また、ガラス基板は、チオールとの反応により金を沈着させた後に親水性部材および疎水性部材の領域を形成し、これらの方法を組み合わせることができる。

10

【 0 0 4 7 】

ガラス基板の利点は、マイクロディッシュが等方性エッチングによって形成されることを可能にすることであり、アングルフリーマイクロディッシュを得ることを導き、それによって種々のすすぎ操作を容易にする。

上述したように、本発明は、集積エレクトロニクスを備えた活性基板を含むキャリアーに設けられてもよい。このタイプの基板は、部位の局所ヒーティングまたはこれらの部位で分析される試薬 - 電解質対のCCD読み取りを可能にし、あるいは、例えば電圧を適用する各部位のアドレッシングを可能にする。この活性基板は、フラットパネル技術を用いてケイ素またはガラスから形成されてもよい。

20

【 0 0 4 8 】

この場合、本発明の構造は、鉱物酸化物層またはポリマー層を用いて被覆することによって仕上がった活性基板上に構成され、沈着された層は、所望の深さのマイクロディッシュを形成するのに十分に厚いものとされる。

鉱物酸化物のポリマーの層にマイクロディッシュを形成した後に、親水性領域および疎水性領域は、上記のように、金属とチオールとの反応によって規定できる。ポリマー層については、疎水性領域はポリマー層によって形成されてもよい。

【 0 0 4 9 】

図 1 0 A から 1 0 C は、この装置を製造する工程を例示する。

図 1 0 A は、分析の部位に対応する位置に表面パッド 2 1 b を設けた活性基板 2 1 a を示す。

30

このキャリアー 2 1 a では、例えば、5 ないし 1 0 0 μ m の厚みを備えたポリイミドである、ポリマー 2 1 c の厚い層が沈着され、次いで、マイクロディッシュ 2 3 がリソグラフィによってこの層からくりぬかれ、キャストイング。

親水性部材とされるキャリアーの領域では、金の層 M が親水性層を規定するために沈着される。

図 1 0 B は、活性基板 2 1 a、表面パッド 2 1 b、ポリマー層 2 1 c、マイクロディッシュ 2 3 および金属 M を含む構造を示す。

図 1 0 c は、自身を金 M に固定して、親水性部材 2 4 の領域を形成する親水性チオールを用いて、ユニット全体を処理することにより親水性領域を形成する工程を示す。

この場合、疎水性部材の領域を形成する必要はなく、これは、マイクロディッシュ 2 3 間に残るポリマー 2 1 c の層によって形成される。

40

【 0 0 5 0 】

図 1 1 A から 図 1 1 G は、二つのタイプの親水性部材を含む、本発明の第二実施態様にかかる装置の製造方法の種々の工程を示す。

この場合、図 1 1 A に示されているように、キャリアー 5 1 は、ケイ素であり、例えば、扁平した錐形のマイクロディッシュ 5 3 が第一実施態様と同様にリソ - エッチングによって形成されている。次いで、金属 M がユニット全体に沈着される。

図 1 1 B は、第二親水性部材を含ませる領域に対応する場所で樹脂 R を沈着させた後のキャリアーの構造を示す。

図 1 1 C は、疎水性部材に対応する領域と第一親水性部材に対応する領域における金属を

50

除去するために金のエッチングをした後であって、かつ、第二親水性部材に対応する領域から樹脂Rを除去した後に得られた構造を示す。

【0051】

図11Dは、第一樹脂Rと同一または異なる樹脂Rによってマイクロディッシュの底を保護した後に得られた構造を示す。この保護は、所望の部位において露光され、後に所望の領域から取り除かれる感光性樹脂を沈着させることによって、リソグラフィー技術を用いて実施することができる。

図11Eは、Repel Silaneによるキャリアーの疎水性シラニゼーションによって形成される疎水性部材59の領域の形成を示す。

図11Fは、COOHまたはNH₂基を含有する親水性チオール、例えばHOOC-(CH₂)₂-SHと金との反応による第二親水性部材の領域57の形成を示す。

図11Gは、マイクロディッシュの底から樹脂Rを取り除き、かつ、このキャリアーをOH(CH₂)₁₆-SHを用いてシラニゼーション処理した後に得られた最終的な構造を示す。

【0052】

それゆえ、シラニゼーション処理を用いて、OH親水性基を有する第一親水性部材55が得られ、一方、第二親水性部材の領域57は、COOH親水性基を含む。ゆえに、OH基で官能化された、オリゴヌクレオチド、リンカーまたはヌクレオチド合成の前駆物質のようなOH基を備えた試薬を用いることにより、この試薬を、マイクロディッシュの底に優先的に固定することができる。

明らかに、上記実施態様の例では、工程の順が異なってもよい。同様に、別の技術を、第一および第二の親水性部材の領域57および55を形成するために用いることができ、キャリアーが疎水性である場合には、疎水性部材の領域59を形成する工程を廃止するために用いることができる。

【0053】

引用文献

[1] 米国特許第5474796号公報

[2] Eggersら, A versatile biochip for gene-based diagnostics, 0-7803-3271-7/96, 1996, IEEE, p.87-92

[3] Beattieら Clin.Chem., vol.39, No4, 1993, 719-722頁

【図面の簡単な説明】

【図1】 従来技術にかかる装置の図である。

【図2】 本発明の装置の第一の実施態様を示す。

【図3】 本発明の装置の第二の実施態様を示す。

【図4】 図4Aおよび4Bは、本発明の装置における試薬の液滴の配置を示す。

【図5】 生物学的試薬をマイクロディッシュの底に付着させる、本発明の装置の第二の実施態様の利点を示す。

【図6】 生物学的試薬をマイクロディッシュの底に付着させる、本発明の装置の第二の実施態様の利点を示す。

【図7】 生物学的試薬をマイクロディッシュの底に付着させる、本発明の装置の第二の実施態様の利点を示す。

【図8】 図8Aから8Eは、疎水性および親水性領域を形成するためにシラニゼーションが用いられる場合の、本発明の装置の製造方法の種々の工程を示す。

【図9】 図9Aから9Dは、親水性および疎水性領域を形成するためにチオールを用いて本発明の装置を製造する方法の種々の工程を示す。

【図10】 図10Aから10Cは、疎水性ポリマー層で被覆された、電子的機能を有する活性基板を用いた本発明の装置の製造方法における工程を示す。

【図11】 図11Aから11Gは、本発明の第二の実施態様にかかる装置の製造方法の種々の工程を図示する。

【符号の説明】

10

20

30

40

50

- 2 1 キャリアー
- 2 3 マイクロディッシュ
- 2 4 親水性部材
- 2 5 側壁
- 2 6 エッジ
- 2 7 疎水性部材

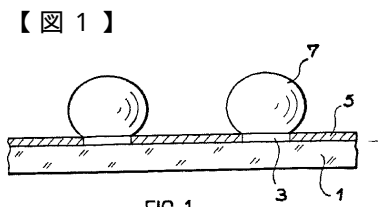


FIG. 1

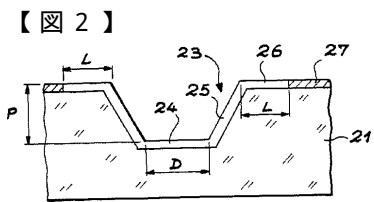


FIG. 2

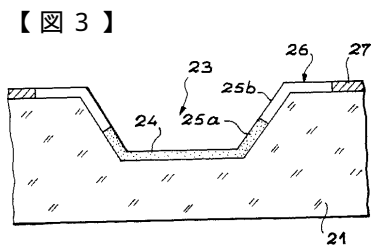


FIG. 3

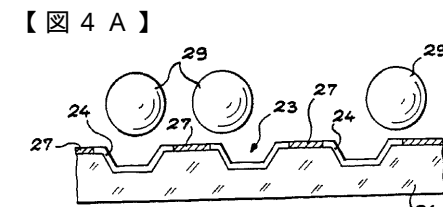


FIG. 4 A

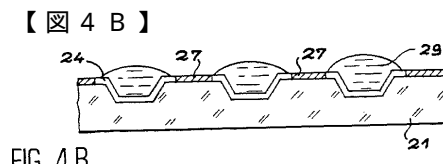


FIG. 4 B

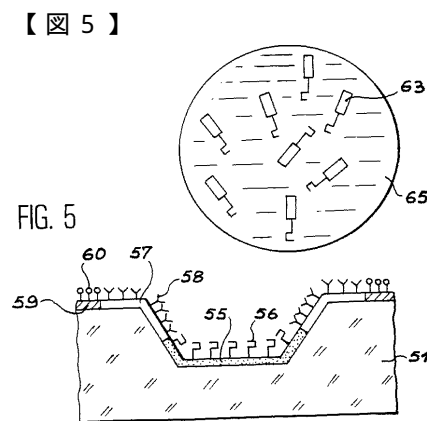


FIG. 5

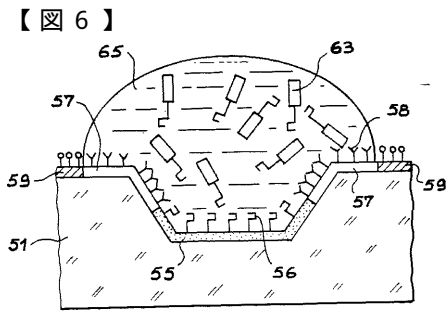


FIG. 6

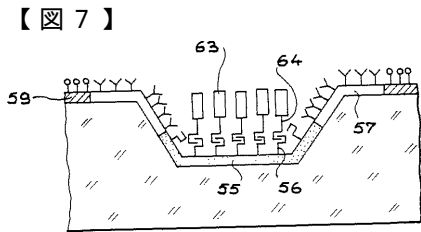


FIG. 7

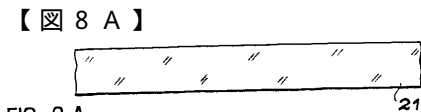


FIG. 8 A

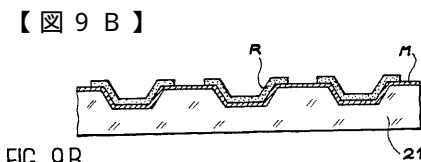


FIG. 9 B

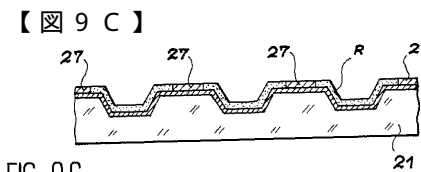


FIG. 9 C

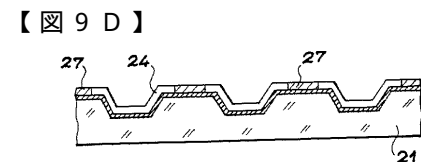


FIG. 9 D

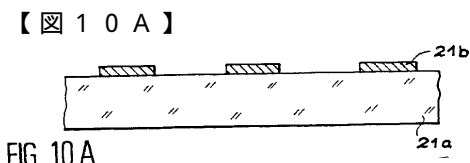


FIG. 10 A

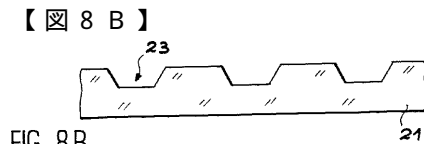


FIG. 8 B

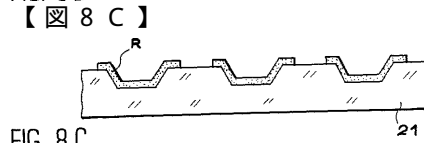


FIG. 8 C

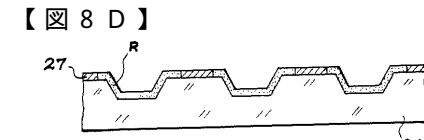


FIG. 8 D

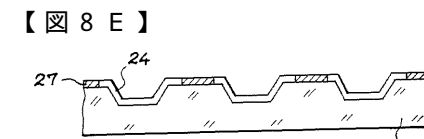


FIG. 8 E

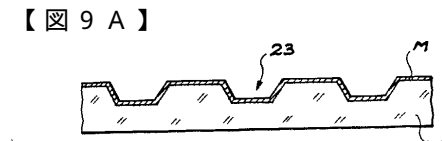


FIG. 9 A

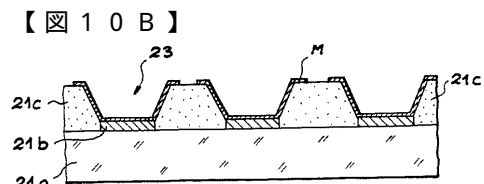


FIG. 10 B

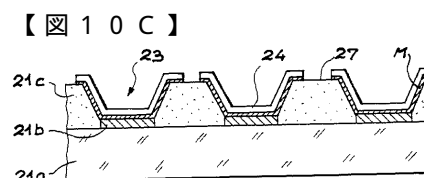


FIG. 10 C

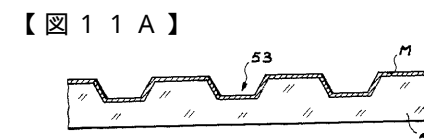


FIG. 11 A

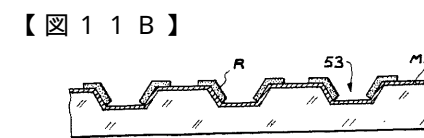



FIG. 11 B

【 1 1 C】

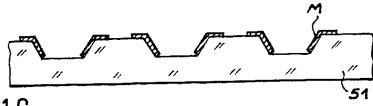



FIG.11C

【 1 1 D】

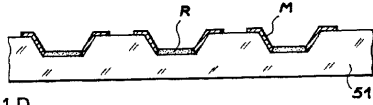



FIG.11D

【 1 1 E】

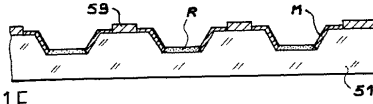



FIG.11E

【 1 1 F】

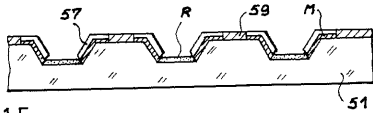



FIG.11F

【 1 1 G】

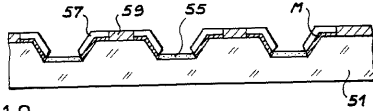


FIG.11G

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 2 5 U
		G 0 1 N 33/543	5 2 5 W
		G 0 1 N 33/53	M

(74)代理人 100094400
弁理士 鈴木 三義

(74)代理人 100107836
弁理士 西 和哉

(74)代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364
弁理士 実広 信哉

(72)発明者 パトリス・カヤ
フランス・F - 3 8 1 3 0 ・エシロール・リュ・ドゥ・プロヴァンス・1 0

(72)発明者 シャルル・ロシリオ
フランス・F - 9 1 1 9 0 ・ジフ - スユール - イヴェット・アレ・ドゥ・ラ・ボメラエ・1 6

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 国際公開第 9 8 / 0 3 2 5 7 (W O , A 1)
米国特許第 5 0 4 1 2 6 6 (U S , A)
特開昭 6 3 - 1 5 1 8 5 7 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G01N 33/50-33/543
G01N 33/15
C12M 1/00-1/34