



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년01월28일
 (11) 등록번호 10-0939421
 (24) 등록일자 2010년01월21일

(51) Int. Cl.
G01N 1/10 (2006.01) *B05D 5/00* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2004-7008312
 (22) 출원일자 2002년12월02일
 심사청구일자 2007년11월30일
 (85) 번역문제출일자 2004년05월29일
 (65) 공개번호 10-2005-0044623
 (43) 공개일자 2005년05월12일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2002/038252
 (87) 국제공개번호 wo 2003/048314
 국제공개일자 2003년06월12일
 (30) 우선권주장
 60/337,598 2001년11월30일 미국(US)
 60/362,924 2002년03월07일 미국(US)

(73) 특허권자
 노쓰웨스턴유니버시티
 미합중국일리노이주에반스톤클라크스트리트633
 (72) 발명자
 머킨, 채드, 에이.
 미국60201일리노이주에반스톤슈트100
 오크애비뉴1880노쓰웨스턴유니버시티테크놀로지트
 랜스퍼프프로그램
 더머스, 엠., 리넷트
 미국60201일리노이주에반스톤슈트100
 오크애비뉴1880노쓰웨스턴유니버시티테크놀로지트
 랜스퍼프프로그램
 진저, 데이비드, 에스.
 미국60201일리노이주에반스톤슈트100
 오크애비뉴1880노쓰웨스턴유니버시티테크놀로지트
 랜스퍼프프로그램
 (74) 대리인
 김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 27 항

심사관 : 정상태

(54) 나노스코픽 팁으로부터의 핵산의 직접 기입나노리소그래피 침착

(57) 요약

본 발명은 핵산의 고정된 나노규모 패턴을 전기 전도성 및 절연성 기관을 비롯한 여러 기관 상에 생성하는 데 있어서 직접 기입 나노리소그래피의 용도를 제공한다. 올리고뉴클레오타이드를 비롯한 핵산을 티올기와 같은 반응성기로 개질함으로써, 적절한 조건하에 적절한 주사 프로브 현미경 팁을 사용하여 패턴을 제공한다. 상기 반응성기는 기관 표면으로의 화학 흡착 또는 공유 결합을 위해 제공된다. 양호한 안정성을 나타내는 생성된 핵산 피쳐는 상보적인 핵산과 혼성화되어, 예를 들어 핵산으로 관능화된 나노입자를 사용하여 프로빙한다. 패턴화는 팁 처리, 상대 습도, 및 핵산 구조를 선택함으로써 조절할 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

주사 프로브 현미경 팁(scanning probe microscope tip)을 양의 전하를 띠면서 개질된 팁을 형성하도록 개질시키는 단계;

상기 개질된 팁을 용매, 핵산 및 무기염을 포함하는 잉크 조성물로 코팅시키는 단계; 및

핵산이 팁으로부터 기관으로 전달되어 기관 상에 안정한 나노규모 패턴을 형성할 수 있도록 충분히 높은 상대 습도에서, 상기 개질되고 코팅된 주사 프로브 현미경 팁을 상기 팁과 기관이 서로 근접하도록 기관에 대해 위치시키는(positioning) 단계

를 포함하는, 기관 상에 핵산의 나노규모 패턴을 생성시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 팁이 원자현미경 팁인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 팁이 중공 팁인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 팁이 양으로 하전된 아미노기를 갖도록 개질되는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상대 습도가 약 25% 이상인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상대 습도가 약 40% 내지 약 100%인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 핵산이 데옥시리보스 핵산인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 핵산이 단일 가닥 올리고뉴클레오티드인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 핵산이 기관에 대한 화학 흡착(chemisorption) 또는 공유 결합을 위해 제공되는 스페이서 기 및 말단기를 포함하도록 개질되는 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 기관이 전기 전도체인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 기관인 전기 절연체인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 패턴이 약 500 nm 이하의 측면 치수를 갖는 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 패턴이 약 200 nm 이하의 측면 치수를 갖는 것인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 패턴이 약 10 nm 내지 약 100nm의 측면 치수를 갖는 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 핵산 패턴이 상보적인 핵산과 혼성화될 수 있는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 핵산 패턴이 상보적인 핵산과 혼성화될 수 있고, 상기 상보적인 핵산이 프로브의 일부인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 핵산 패턴이 상보적인 핵산과 혼성화될 수 있고, 상기 상보적인 핵산이 핵산 패턴을 프로브에 연결시키는 링커의 일부인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 기관이 또한 패시베이션(passivation)되는 것인 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 팁이 원자현미경 팁이고, 상기 기관이 전기 전도체이고, 상기 핵산이 테옥시리보스 핵산이고, 상대 습도가 약 25% 이상인 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 팁이 원자현미경 팁이고, 상기 기관이 전기 전도체이고, 상기 핵산이 테옥시리보스 핵산이고, 상대 습도가 약 25% 이상이고, 상기 기관이 또한 패시베이션되는 것인 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 팁이 양의 전하를 함유하도록 처리된 원자현미경 팁이고, 상기 핵산이 테옥시리보스 핵산이고, 상대 습도가 약 25% 내지 약 100%인 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 팁이 양의 전하를 띠도록 개질된 원자현미경 팁이고, 상기 기관이 전기 전도체 또는 전기 절연체이고, 상기 핵산이 기관 표면에 대해 공유 결합 또는 화학 흡착을 하기 위한 작용기를 함유하는 테옥시리보스 핵산이고, 상대 습도가 약 40% 내지 약 50%이고, 상기 기관이 또한 패시베이션되는 것인 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 팁이 원자현미경 팁 또는 중공 팁이고, 상기 기관이 전기 전도체 또는 전기 절연체이고, 상기 핵산이 기관 표면에 대해 공유 결합 또는 화학 흡착을 하기 위한 작용기를 함유하는 테옥시리보스 핵산이고, 상대 습도가 약 25% 이상이고, 상기 기관이 또한 패시베이션되는 것인 방법.

청구항 24

기관, 및 상기 기관 상의 다수의 핵산 패턴을 포함하며, 상기 핵산 패턴이 기관에 화학 흡착 또는 공유 결합된 것이고, 약 1,000 nm 이하의 측면 치수를 가지고, 1,000 nm 이하의 간격으로 서로 이격되어 있고, 100,000 개/cm² 이상의 패턴 밀도를 가지고, 상보적인 핵산과 혼성화가능한 것이며, 상기 핵산 패턴이 제1항의 방법에 의해 형성된 것인, 핵산 나노어레이.

청구항 25

주사 프로브 현미경 팁을 아미노 작용기를 갖도록 개질시켜 개질된 팁을 형성하는 단계;
상기 개질된 팁을 핵산을 포함하는 잉크 조성물로 코팅시키는 단계; 및

핵산이 팀으로부터 기관으로 전달되어 기관 상에 안정한 패턴을 형성할 수 있도록 충분히 높은 상대 습도에서, 상기 개질되고 코팅된 주사 프로브 현미경 팀을 상기 팀과 기관이 서로 근접하도록 기관에 대해 위치시키는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 주사 프로브 현미경 팀이 원자현미경 팀인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 개질 단계를 아미노실란 화합물로 수행하는 것인 방법.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

명세서

기술분야

- <1> 본 출원은 2001년 11월 30일자로 출원된 미국 가출원 제60/337,598호 ("딥펜 나노리소그래피에 의한 핵산의 패터닝화" (머킨 (Mirkin) 등)), 및 2002년 3월 7일자로 출원된 미국 가출원 제60/362,924호로 우선권을 주장하며, 상기 출원의 전체 개시사항은 본 명세서에 참고로 인용된다.
- <2> 본 발명은 _____ 로부터의 인가 번호 제 _____ 호 하에 정부의 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 일정한 권리를 갖는다.

배경기술

- <3> 나노기술은 생물학, 생화학, 화학, 의학, 유전학, 진단학 및 치료학에 걸쳐 다양하게 적용된다. 총체적으로 새로운 기술을 생성하는 것 이외에도, 나노기술은 또한 당해 기술을 서브 마이크론 수준까지 더 소형화할 수 있도록 할 것이다. 매우 빈번히, 기술은 마이크론 규모로 제한된다. 예를 들어, 핵산 마이크로어레이 (microarray)는 게놈식 규모의 기록 유전자 발현을 비롯하여 생물학적 및 유전학 적용을 위한 마이크론 수준에서 상업화되었다 (예를 들어, 문헌 [*A Primer of Genome Science*, G. Gibson and S. Muse, 2002, Chapters 3-4] 참조). 현재의 마이크로어레이는 cDNA 및 올리고뉴클레오티드 유형을 포함한다. 그러나, 훨씬 작은 나노미터 규모로, 특히 약 100 nm 미만의 측면 치수로 어레이를 제조하는 것이 현재 상업적으로 강력하게 요구되고 있다. 즉, 단일 분자, 단일층 및 100 nm 이하 치수의 크기에 접근하는 훨씬 고밀도의 샘플 부위를 갖는 핵산 나노어레이가 요구된다. 그러나, 일반적으로 마이크로어레이를 제조하는데 사용되는 제조 방법으로는 나노어레이의 제조가 불가능하다. 더욱이, 현재 사용되는 상기 어레이의 로봇식 인쇄는, 값비싸고, 깨지기 쉽고, 딱히 하

기 쉽고, 균일성이 약하며 핵산 스프레드 (spread)로서 도넛형 스팟 (spot)을 팁으로부터 전달하는 경향이 있는 인쇄 핀으로 인해 문제가 된다. 핵산 어레이 외에도, 펄티드 어레이 또한 중요하며, 때때로 조합된 핵산 및 펄티드 구조가 흥미롭다. 따라서, 상업적 수준에서 나노어레이의 제조를 가능하게 하고, 마이크로어레이 소형화의 한계를 없애는 신규한 나노기술이 요구된다. 특히, 100 nm 이하의 장벽을 깬 경우, 단일 분자 및 단일층의 범위에 들어갈 경우, 그리고 상업적 시장에 들어갈 경우 어려움은 보다 심각해진다.

- <4> 주사 프로브 현미경 (scanning probe microscopic; SPM) 팁을 비롯한 나노스코픽 (nanoscopic) 팁은 일반적으로 나노규모 구조를 특성화하는데 사용되었으나, 나노규모 제작에서 이들을 사용하는 것에 대해서는 개발이 덜 되었다. 초기의 제작 시도는 성공적이지 않았다. 예를 들어, 생물학적 및 비생물학적 분야 둘 다에 적용되는 나노어레이의 제조를 비롯한 나노규모 제작에서 나노스코픽 SPM 팁을 보다 잘 사용할 필요가 있다. SPM 팁을 분자 수준에서 기관에의 직접 기입 및 패터화에 사용할 수 있을 경우 특히 흥미롭다. 이러한 수준에서 직접 기입하려는 시도는 핵산을 비롯한 생물학적 화합물의 직접 기입에 특히 중요하다. 예를 들어, 보다 우수한 해상도, 보다 높은 재현성, 보다 우수한 안정성, 및 분자 인식 및 혼성화의 보다 우수한 보유성을 제공하는 개선이 요구된다. 특히 중요한 하나의 시도는 일반적으로 비하전된 작은 분자의 직접 기입에 덜 적절한 인자인, 분자 크기 및 전하 효과가 중요해질 수 있는 단일 핵산 가닥의 직접 기입이다. 예를 들어, 존재하는 리소그래피 피쳐 (feature)에 흡착된 소규모의 핵산 구조를 생성하기 위한 간접 방법이 공지되어 있다. 그러나, 직접 기입은 간접 경로에 비해 상당한 이점을 제공한다.
- <5> 직접 기입 나노리소그래피에 대한 한 방법은 이하에서 더 기재되는 딥펜 나노리소그래피 (DIP PEN NANOLITHOGRAPHY)(등록상표) 인쇄 및 침착 (즉, DPN(등록상표) 인쇄 및 침착)이며, 노스웨스턴 유니버시티 (Northwestern University)의 머킨 그룹 및 나노잉크, 인크. (NanoInk, Inc) (미국 일리노이주 시카고에 소재)에서 개발되고 있다. DPN(등록상표) 및 딥펜 나노리소그래피(등록상표)는 나노잉크, 인크.의 상표명이다. 상기 방법은 다목적적으로 사용되며, 쉽게 접근가능한 장비로 수행할 수 있다. 복잡한 스탬프 및 레지스트가 일반적으로 요구되지 않는다. 현재까지 상기 기술의 성공에도 불구하고, 여전히 개선이 요구된다.
- <6> 마지막으로, 나노규모로 핵산 피쳐를 생성하는데 대한 관심은 또한 이러한 화합물이 분자 전자 및 광 소자를 비롯한 기능성 물질의 "상향식 (bottom-up)" 나노규모 제조를 위해 제공할 수 있는 핵산의 상보적인 가닥을 인지하고 그에 결합 (즉, 혼성화)해야 하는 능력 때문에 생긴다. DNA를 이용한 프로그램화된 물질 합성은 예를 들어 문헌 [Mirkin, *Inorganic Chem.*, 2000, 39, 2258-2272]; [Mirkin, *MRS Bulletin*, January, 2000, pgs. 43-54]; 및 [Storhoff et al., *Chem. Rev.*, 1999, 99, 1849-1862]에 기재되어 있다. 또한, 핵산의 혼성화는 예를 들어 문헌 [Herne et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 8916-8920]; [Levicky et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 9787-9792]의 표면 한정된 DNA 프로브 어레이의 내용에 기재되어 있다. 또한, 예를 들어 머킨 등 (나노스피어, 인크. (Nanosphere, Inc.))의 미국 특허 제6,361,944호에 논의된 바와 같이 진단학적 용도로 중요하다.
- <7> <발명의 개요>
- <8> 이 부분에서는, 본 명세서에 개시된 본 발명을 요약하지만, 상기 요약은 이하에서 상세히 기재되고 더 청구되는 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니다.
- <9> 본 발명은 간략히, 기관에 대해 나노스코픽 팁을 하나 이상 위치시켜 팁과 기관을 서로 접근시켜서, 상기 팁으로부터 상기 기관으로 핵산을 전달하여 상보적인 핵산과 혼성화가 가능한 기관 상에 안정한 핵산 나노규모 패터를 생성하는 단계를 포함하는, 직접 기입 나노리소그래피에 의해 핵산을 기관 상에 침착시키는 방법을 제공한다.
- <10> 또한, 본 발명은 간략히, 핵산이 팁으로부터 기관으로 전달되어 기관 상에 안정한 나노규모 패터를 형성할 수 있도록 충분히 높은 상대 습도에서 기관에 대해 주사 프로브 현미경 팁을 위치시켜 팁과 기관이 서로 접근할 수 있게 하고, 핵산의 전달 전에 팁이 핵산으로 습윤되도록 팁을 개질시키고, 핵산의 전달시 핵산이 기관에 화학 흡착 또는 공유 결합되도록 개질시키는 것을 포함하는, 기관 상에 핵산의 나노규모 패터를 생성시키는 방법을 제공한다.
- <11> 또한, 본 발명은 간략히, 주사 프로브 현미경 팁을 개질된 핵산으로 충전하는 단계, 및 상기 충전된 팁을 핵산이 기관으로 전달되어 나노규모 패터를 형성할 수 있을 정도로 충분히 가까이 기관에 위치시키는 단계를 포함하며, 상기 핵산은 기관으로의 화학 흡착 또는 공유 결합을 위한 관능기로 개질된 것이고, 상기 관능기는 스페이서를 통해 핵산과 결합된 것인, 개질된 핵산을 기관 상에 직접 패터화하는 방법을 제공한다.
- <12> 또한, 본 발명은 추가로, 개질된 핵산으로 충전된 주사 프로브 현미경 팁을 위치시키는 단계, 및 상기 충전된

팁을 핵산이 기관으로 전달되어 나노규모 패턴을 형성할 수 있을 정도로 충분히 가까이 기관에 위치시키는 단계를 포함하며, 상기 핵산은 기관으로의 공유 결합을 위한 친전자성 또는 친핵성 관능기로 개질된 것인, 개질된 핵산을 기관 상에 직접 패턴화하는 방법을 제공한다.

- <13> 그리고, 본 발명은 간략히, 주사 프로브 현미경 팁이 양으로 하전되도록 개질시키는 단계를 포함하는, 직접 기입 나노리소그래피 동안 상기 팁으로부터 기관으로의 핵산 전달을 개선시키는 방법을 제공한다.
- <14> 또한, 본 발명은 간략히, 팁에 대한 핵산의 부착성을 개선시키는 하나 이상의 조성물로 팁을 처리하는 단계를 포함하는, 주사 프로브 현미경 팁으로부터 기관으로의 핵산의 직접 기입 침착을 개선시키는 방법을 제공한다.
- <15> 또한, 본 발명은 간략히, (a) 직접 기입 나노리소그래피에 의해 나노스코픽 팁으로부터 제1 핵산을 기관 상에 침착시켜 약 1,000 nm 이하의 측면 나노규모 피처를 갖는 침착물을 형성하는 단계; (b) 상기 핵산 침착물을 나노입자와 혼성화시키는 단계를 포함하며, 상기 나노입자는 (1) 제1 핵산에 대해 상보적이거나, (2) 제1 핵산과 제2 핵산을 연결하는 연결 가닥의 핵산에 대해 상보적인 제2 핵산으로 관능화된 것인, 나노규모 패턴을 형성하기 위한 나노입자의 조립 방법을 제공한다.
- <16> 추가로, 또한 본 발명은 기관 상의 제1 핵산을 포함하는 핵산 나노규모 침착물을 나노입자와 혼성화시키는 단계를 포함하며, 상기 나노입자는 (1) 제1 핵산에 대해 상보적이거나, (2) 제1 핵산과 제2 핵산을 연결하는 연결 가닥의 핵산에 대해 상보적인 제2 핵산으로 관능화된 것인, 나노규모 패턴을 형성하기 위한 나노입자 조립 방법을 제공한다.
- <17> 추가로, 본 발명은 기관, 및 상기 기관 상에 형성된 하나 이상의 제1 핵산의 패턴을 포함하며, 상기 제1 핵산의 패턴이 기관에 화학 흡착 또는 공유 결합된 것이고, 1,000 nm 이하의 측면 치수를 갖고, 제1 핵산에 대해 상보적인 제2 핵산과 혼성화될 수 있는 것인, 기관 상의 나노규모 핵산 패턴을 제공한다.
- <18> 본 발명은 기관, 및 상기 기관 상에 형성된 다수의 핵산 패턴을 포함하며, 상기 핵산 패턴이 기관에 화학 흡착 또는 공유 결합된 것이고, 약 1,000 nm 이하의 측면 치수를 갖고, 서로 1,000 nm 이하의 간격으로 떨어져 있고, 100,000 개/cm² 이상의 패턴 밀도를 가지며, 상보적인 핵산과 혼성화가능한 것인, 핵산 나노어레이를 제공한다.
- <19> 그리고, 본 발명은 또한 핵산 패턴을 갖는 기관을 포함하는 물품, 핵산 나노어레이, 핵산으로 코팅된 주사 프로브 현미경 (SPM) 팁, SPM 팁을 코팅하는데 사용되는 용액, 핵산의 직접 기입 나노리소그래피를 위한 키트, 및 이를 위한 컴퓨터 소프트웨어를 포함한다.
- <20> 이하에서 상세히 논의되는 본 발명의 기본적인 신규한 측면은 다양하며, 전자 빔 및 포토리소그래피 방법과 같은 값비싸고 잠재적으로 파괴적인 방법을 사용하지 않으면서 예상된 나노규모 피처를 직접 기록하는 능력을 비롯한, 당업계에 이미 확립된 DPN 인쇄의 이점을 포함한다. 또한, 구조는 필요할 경우 존재하는 구조를 분해하지 않고 제작할 수 있다. 복잡한 스탬프 및 레지스트가 요구되지 않는다. 나노리소그래피의 일관성 및 안정성의 개선을 얻을 수 있다.

발명의 상세한 설명

- <37> DPN 인쇄, 패턴화, 및 침착 방법은 예를 들면 머킨 그룹의 문헌 (1) [Piner et al., Science, 283, Jan. 29,1999, page 661]; (2) [Hong et al., Science, 286, October 15,1999, page 523]; 및 (3) [Hong et al., Science, 288, June 9,2000, page 1808]에 개시되어 있으며, 이 문헌은 그의 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다. 또한, 기술 공개 문헌 ["Direct Patterning of Modified Oligonucleotides on Metals and Insulators by Dip-Pen Nanolithography", by Demers et al., Science, Vol. 296, June 7,2002, pgs. 1836-1838] 또한 그 에 인용된 온라인 보충 자료를 비롯하여 그의 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다. 핵산 뿐만 아니라 나노입자 핵산 프로브의 DPN 인쇄 및 패턴은 문헌 (1) [C.A. Mirkin, Mater. Res. Soc. Bull., 25,43 (2000)], (2) [C.A. Mirkin, Inorg Chem., 39, 2258 (2000)]에 기재되어 있으며, 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <38> 또한, 머킨 등의 의해 2001년 11월 30일자로 제출된 "딤펜 나노리소그래피에 의한 핵산의 패턴화 (Patterning of Nucleic Acid by Dip Pen Nanolithography)" 제목의 가출원 제60/337,598호는 그의 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <39> 또한, 박사 학위논문 [L.M. Demers, Northwestern University, June 2002, "Nanolithography and Biomolecular Recognition as Tools for the Directed Assembly and Study of Particle-Based Materials, "Chapter 6, "Direct-Patterning of DNA via Dip-Pen Nanolithography"]은 그의 전문이 본원에 참고문헌으로 포

함된다.

- <40> DPN 인쇄에 관련된 재료, 장치, 기구, 소프트웨어 및 하드웨어, 물품, 및 상담은 또한 나노잉크, 잉크. (일리노이주 시카고 소재)로부터 입수가 가능하다.
- <41> SPM 프로브 및 핵산 침착에 관련된 추가 기술 공개 문헌에는 문헌 (1) ["Meniscus Force Nanografting: Nanoscopic Patterning of DNA, "Schwartz, Laragmuir, 2001,17, 5971-5977]; (2) ["Molecular Transport from an Atomic Force Microscope Tip: A Comparative Study of Dip-Pen Nanolithography, "Schwartz, Languir, 2002, 18, 4041-4046]; 및 (3) WO 02/45215 A2호 (국제 PCT 공개일: 2002년 6월 6일, 머킨, 슈와르츠 (Schwartz) 등; "Nanolithography Methods and Products Therefor and Produced Thereby")를 들 수 있으며, 이들은 본원에 참고문헌으로 포함된다. 후자의 PCT 공개 공보에는 예를 들면 양이온성 계면활성제 및 암모늄 화합물, 예컨대 트리도데실메틸아민을 비롯한 핵산 및 염을 포함하는 패터닝 용액을 사용하는 것이 개시되어 있다. 용액은 수성일 수 있고, SPM 팁을 코팅하기 위해 사용될 수 있다.
- <42> 재료 적용에서 생분자의 역할은 문헌 (1) [J.J. Storhoff, C.A. Mirkin, Chem. Rev., 99, 1849 (1999)]; (2) [C.M. Niemeyer, Angew. Chem. Int. Ed. 40, 4128 (2001)]에 개시되어 있고, 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <43> 2001년 5월 24일자로 제출된 미국 특허 출원 제09/866,533호 (또한, 2002년 5월 30일자로 공개된 머킨 등의 상응하는 미국 특허 공보 제US 2002/0063212 A1호 참조)에는 DIP PEN (등록상표) 나노리소그래피 인쇄 배경 및 절차가 예를 들면 하기를 비롯한 광범위한 실시양태를 포함하여 상세하게 기재되어 있다:
- <44> - 배경 (페이지 1-3);
- <45> - 요약 (페이지 3-4);
- <46> - 도면의 간단한 설명 (페이지 4-10);
- <47> - 나노스코픽 주사 프로브 현미경 팁의 사용 (페이지 10-12);
- <48> - 기관 (페이지 12-13);
- <49> - 올리고뉴클레오티드, DNA, 및 RNA를 비롯한 패터닝 화합물 (페이지 13-17);
- <50> - 예를 들면 코팅 팁을 비롯한 실행 방법 (페이지 18-20);
- <51> - 나노플로터 (nanoplotter)를 포함하는 기구 사용 (페이지 20-24);
- <52> - 다층 및 관련 인쇄 및 리소그래피 방법 (페이지 24-26);
- <53> - 해상도 (페이지 26-27);
- <54> - 어레이 및 조합 어레이 (페이지 27-30);
- <55> - 소프트웨어 및 측정 (페이지 30-35; 68-70);
- <56> - 키트 및 다른 물품, 소수성 화합물로 코팅된 팁 (페이지 35-37);
- <57> - 7개의 실시예 (페이지 38-67);
- <58> - 상응하는 청구의 범위 및 요약서 (페이지 71-82); 및
- <59> - 도면 1-28.
- <60> 도면을 비롯한 상기 열거된 각종 소구분 각각을 포함하는 상기 문서 모두는 개시내용의 전문, 및 청구의 범위를 지지하는 일부 형태가 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <61> 또한, 머킨 등의 미국 특허 공보 제20020122873 A1호 (2002년 1월 28일 제출된 출원 제059,593호) (2002년 9월 5일자로 공개됨)는 또한 그의 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다. 예를 들면, 나노스코픽 주사 프로브 현미경 팁으로부터 기관으로의 침착 또는 패터닝 화합물의 이동을 조절하는 추진력을 사용하는 것이 개시되어 있다. 또한, 팁으로부터 기관으로의 침착 또는 패터닝 화합물의 이동을 제한하는 내공 및 틈을 갖는 팁이 개시되어 있다. 틈을 통한 침착 또는 패터닝 화합물의 이동 속도 및 정도는 추진력에 의해 조절될 수 있다. 핵산은 예를 들면 음으로 하전된 핵산을 끌어당기는 양으로 하전된 기관을 사용하는 이 방법에 의해 침착 또는 패터닝될 수 있다. 애퍼춰 펜 (Aperature Pen) 나노리소그래피 방법 및 만년필 (fountain pen) 나노리소그래피 방법은 본원

에 기술된 바와 같이 핵산의 침착 또는 패턴에 사용될 수 있다.

- <62> DIP PEN 나노리소그래피 인쇄, 및 상술된 절차, 기구 사용, 및 실시에는 또한 본원에 추가로 기재된 바와 같이 개선된 핵산 및 DNA 물품 및 나노어레이를 생성하기에 위해 채택될 수 있다. 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 핵산은 다양하게 변화될 수 있지만, 올리고뉴클레오티드는 특히 중요하고, 특히 기관 표면에 대한 공유 결합 또는 화학 흡착을 위해 제공되는 화학 구조를 가지거나 개질된 올리고뉴클레오티드가 중요하다.
- <63> 나노스코픽 팁에서 기관으로 핵산을 패턴 또는 침착물로서 전달하기 위해, 기관 및 팁은 서로에 대해 이동하여 서로 접근한다. 팁은 기관을 향해 이동될 수 있고, 기관은 팁을 향해 이동될 수 있거나, 또는 팁 및 기관 모두가 서로를 향해 이동될 수 있다.
- <64> 일반적으로, 팁으로부터 기관으로의 나노스코픽 초현미경 양의 핵산 패턴화 화합물을 전달, 패턴화, 또는 침착시킬 수 있는 나노스코픽 초현미경 팁을 사용할 수 있다. 나노스코픽 팁의 디자인은 특별히 제한되지 않지만, 일반적으로 나노스코픽 팁은 현미경 치수보다는 나노미터, 서브-마이크론 수준의 치수를 특징으로 하는, 점감되거나 또는 실질적으로 점감되는 말단 지점을 가질 수 있다. 예를 들면, 나노스코픽 수준의 팁 폭, 공동, 또는 틈 직경이 있을 수 있다. 일반적으로, 나노스코픽 팁은 나노스코픽 구조를 이미지화하고 나노스코픽 구조를 침착시킬 수 있는 것이 바람직하다. SPM 팁을 사용할 수 있고, 바람직한 유형의 SPM 팁은 원자현미경 (AFM) 팁이다. 일반적으로, 외부 표면 상을 잉크로 코팅할 수 있도록 고안된 팁, 예컨대 원자현미경 팁을 사용할 수 있다. 대안적으로, 팁은 틈 개구부를 갖는 팁 또는 NSOM 팁과 같이 중공일 수 있다. 잉크는 경우에 따라 연속적으로 전달될 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같은 팁의 어레이를 사용할 수 있으며, 여기서 각각의 팁이 개별적으로 조절되거나 목적하는 바와 같이 집단적으로 작동될 수 있다. 팁을 그의 캔틸레버 또는 기능성 동등물에 부착시킬 수 있다.
- <65> 예를 들면, 접촉, 비접촉, 탭핑, 및 측력 모드를 포함하는, 공지된 SPM 및 AFM 방법을 이용할 수 있다.
- <66> SPM 팁으로부터 기관으로의 핵산의 직접 전달 연구에서, 핵산 패턴화를 일관된 고품질 패턴화로 촉진하는 몇몇의 인자가 중요할 수 있다. 이들 인자는 또한 실시예 부분에서 추가로 논의된다.
- <67> 먼저, 예를 들면 팁을 핵산으로 잘 코팅할 수 있다. 예를 들면, 통상의 질화규소 AFM 캔틸레버의 표면-개질은 팁 표면으로의 핵산 잉크의 신뢰가능한 부착을 촉진할 수 있다 (예를 들면, 도 1 참조). 팁은 예를 들면 아미노 또는 암모늄기의 양전하를 비롯한 양전하를 갖도록 팁 표면에서 개질될 수 있다. 핵산 침착을 위해 고안된 팁을 생성하기 위해 단일 또는 다단계 공정을 이용할 수 있다. 예를 들면, 팁이 후속 단계에서 관능화되도록 하는 전처리 단계를 수행할 수 있다. 예를 들면, 히드록실화 표면이 제공되도록 팁을 개질시킨 다음, 상기 히드록시기를 추가로 관능화시킬 수 있다. 팁을 예를 들면 황산 및 과산화수소를 비롯한 강산 및 과산화물로 처리할 수 있다. 전처리 후에, 팁의 관능화는 예를 들면 실란 커플링제, 예컨대 아미노실란 커플링제, 3'-아미노프로필트리메톡시실란 (예를 들면, 1 내지 2 시간, 톨루엔 중의 1% v/v 용액)으로 팁을 처리함으로써 수행될 수 있다.
- <68> 실란화된 팁은 이어서 핵산으로 코팅될 수 있다. 핵산 및 염을 포함하는 용액을 사용하여 코팅을 수행할 수 있다. 용매는 경우에 따라 물과 더 혼합될 수 있는 비양성자성 용매, 예컨대 DMF일 수 있다. 일반적으로, 물보다 더 비양성자성인 용매를 사용할 수 있으며, 이로써 예를 들면 용매의 약 70 내지 약 90 중량%가 비양성자성일 수 있다. 염은 예를 들면 염화마그네슘을 비롯한 무기 염, 예컨대 제II족 염 또는 할로겐화물 염일 수 있다. 염의 농도는 예를 들면 약 0.01 M 내지 약 0.4 M, 보다 특별하게는 약 0.1 M 내지 약 0.2 M일 수 있다. 염 대 핵산의 비는 양호한 침착 조건 및 양호한 나노스코픽 구조를 제공하기 위해 변할 수 있다. 핵산의 농도는 예를 들면 약 0.1 mM 내지 약 10 mM, 보다 특별하게는 약 0.5 mM 내지 약 5 mM일 수 있다.
- <69> 경우에 따라 1분 이하, 예를 들면 약 20초 동안 팁을 핵산 팁 코팅 용액에 침지시키고 (실시예 참조), 이어서 압축 가스, 예컨대 디플루오로에탄으로 잠시 통풍 건조함으로써 팁을 처리할 수 있다. 이 방식으로 제조하고 핵산으로 코팅한 AFM 팁을 본원에 기재된 바와 같이 몇 시간 동안 직접 기입 인쇄 실험에 사용한 후에 재코팅할 수 있다. 또한, 팁을 재코팅하고, 동일한 핵산 서열에 대해 다시 사용할 수 있다.
- <70> 두번째로, 주위 상대 습도의 조절은 핵산의 일관된 고품질 직접 기입 패턴화를 제공할 수 있다. 팁으로부터 기관으로 핵산을 제공하기에 충분히 높도록 상대 습도를 조절할 수 있다. 일반적으로, 약 25% 이상, 보다 특별하게는 약 25% 내지 약 100%, 보다 특별하게는 약 40% 내지 약 100%, 보다 특별하게는 약 40% 내지 약 50%의 상대 습도를 사용할 수 있다. 예를 들면, 주위 패턴화는 상대 습도 45 ± 5% 및 23 ± 3 °C에서 환경 조절된 글러브박스 내에서 수행될 수 있다. 상대 습도는 핵산의 특성, 기관의 특성, 목적하는 패턴 (예컨대, 도트

또는 라인)의 특성, 팁을 습윤화시키기 위해 사용되는 핵산 용액의 특성, 팁의 특성 등을 포함하는 다른 침착 인자에 기초하여 조절될 수 있다. 메니스커스(meniscus)의 역할은 SPM 팁을 사용하는 직접 기입 나노리소그래피 인쇄와 함께 중요할 수 있고, 메니스커스의 크기는 상대 습도와 관련될 수 있다.

<71> 팁-코팅 및 습도 외에, 잉크-기관 조합의 선택은 또한 핵산을 일관된 고품질의 피처에 핵산을 직접 기입하는 것을 용이하게 할 수 있다. 예를 들면, 핵산을 기관에 화학 흡착 또는 공유 결합되는 관능기를 포함하도록 개질시킬 수 있다. 다수의 접근법을 이용할 수 있다. 예를 들면, 기관 결합을 위한 관능기는 핵산에 직접 결합되거나 또는 상대적으로 유연한 스페이서기에 의해 핵산에 연결될 수 있다. 스페이서기의 실례로는 유연성 올리고머 섀, 예컨대 알킬렌 글리콜, 예를 들면, 폴리에틸렌 또는 폴리프로필렌 글리콜이 포함된다. 스페이서기는 예를 들면 3 내지 20개 알킬렌옥시 반복 단위를 가질 수 있다. 관능기는 예를 들면 금 표면에 화학 흡착되도록 고안된 황-함유 잔기, 예컨대 티올 또는 이황화물일 수 있다. 이 방법이 환형 이황화물-개질된 핵산 및 트리티올-개질된 핵산을 패턴화시키기 위해 사용될 수 있다. 황 원자는 탄화수소기, 예컨대 C₄-C₁₈ 알킬기를 포함하는 알킬기에 결합될 수 있다. 관능기는 예를 들면 친핵성 표면과 반응하도록 고안된 친전자성 기, 또는 친전자성 표면과 반응하도록 고안된 친핵성 기일 수 있다. 마이클(Michael) 부가 반응은 예를 들면 기관에 핵산을 결합시키기 위해 사용될 수 있다.

<72> 예를 들면, 핵산티올, PEG-개질된 올리고뉴클레오티드는 크기가 약 50 nm 내지 수 μm 인 피처를 갖는 금 기관의 직접 패턴화에 사용될 수 있다. 핵산의 핵산티올기는 아래에 놓인 Au 표면에 대한 화학 흡착을 위해 제공될 수 있다. 핵산이 기관에 부착하도록 관능기로 개질시키는 다른 다른 실시양태에는 (1) 포스포로티오에이트 기 (예컨대, 미국 특허 제5,472,881호 참조), (2) 아미노실록산 및 머캅토알킬실록산을 비롯한 치환된 실록산, (3) 미국 특허 제6,361,944호에 기재된 실시양태가 포함되며, 이는 본원에 참고문헌으로 포함된다. 핵산의 유형 및 그의 가능한 개질 방법은 또한 하기에 추가로 기재된다.

<73> 기관 상에 핵산 및 패시베이션 제제 모두가 포함되도록 기관을 처리할 수 있다. 예를 들면, 기관을 핵산으로 패턴화시킨 후에 기관을 패시베이션할 수 있다. 한 패시베이션 실시양태에서, 기관의 비패턴화된 영역을 패시베이션 제제로 처리하여 추가 가공 동안 기관의 비패턴화된 영역의 반응성을 감소시킬 수 있다. 예를 들면, 패턴화된 핵산의 분석 또는 탐지의 개선을 비롯한 수많은 이유로 패시베이션을 수행할 수 있다. 예를 들면, 핵산의 혼성화가 상보적인 핵산에 의해 이루어지는 경우, 핵산 패턴화된 영역과 비패턴화된 영역 사이의 상호작용의 선택성은 패시베이션을 통해 개선될 수 있다. 금과 같은 기관의 비패턴화된 영역에 대해 선택적으로 흡착하는 패시베이션 제제, 예컨대 알칸 티올을 함유하는 용액에 패턴화된 기관을 함침시킴으로써 패시베이션을 수행할 수 있다. 더욱이, 패시베이션 제제는 비패턴화된 기관으로의 화학 흡착 또는 공유 결합을 위한 하나의 반응성 관능기를 포함할 수 있지만, 다른 관능기는 갖지 않는다. 예를 들면, 패시베이션 제제는 흡착시 후속 가공, 예컨대 핵산 혼성화에 일반적으로 비반응성인 표면에 메틸기를 노출시키는 장쇄 알킬기를 포함할 수 있다. 패시베이션은 예를 들어 기관의 나머지 부분을 소수성으로 만들 수 있다. 예를 들면, 핵산으로 이미 패턴화된 금 기관을 1-옥타데칸티올(ODT, 1 mM)의 에탄올 용액에 1분 동안 함침시킬 수 있다. 이 절차는 비패턴화된 금 표면을 소수성 단일층으로 코팅하며, 상기 표면을 후속 혼성화 실험에서의 DNA 또는 DNA-개질된 나노입자의 비특이적 흡착에 대해 패시베이션한다.

<74> 일반적으로, 패시베이션 제제는 핵산이 기관에 대한 화학 흡착 또는 공유 결합을 위해 관능화되지 않는 경우 패턴화된 핵산을 치환시킬 수 있다. 예를 들면, 티올 잔기를 함유하지 않는 핵산은 ODT 처리 동안 표면으로부터 치환될 수 있다.

<75> 또다른 패시베이션 실시양태에서, 먼저 기관을 패시베이션 제제로 패턴화시킨 후에, 핵산으로 패턴화한다. 달리, 기관을 패시베이션한 후에 패턴화할 수 있다. 예를 들면, 기관은 올리고뉴클레오티드 및 다른 핵산이 결합될 수 있는 패시베이션 제제, 예컨대 흡착 내성 히드로겔로 처리될 수 있다. 마이크로어레이 기술 분야에 공지된 패시베이션 제제를 사용할 수 있다.

<76> 예를 들면 ODT 처리에 의해 기관을 패시베이션한 후, 탭핑 모드 AFM에 의해 핵산 패턴을 이미지화할 수 있다. 이 이미지화는 높이 측정값을 제공할 수 있다. 일반적으로, AFM 또는 유사한 기술로 측정하는 핵산 패턴의 피쳐 높이는 예를 들면 약 100 nm 이하, 보다 특별하게는 약 10 nm 이하일 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 경우, 높이는 예를 들면 약 2 nm 내지 약 5 nm일 수 있다.

<77> 패턴화되고 부동화된 핵산이 그의 매우 특이적인 인식 특성을 보유할 수 있고 혼성화될 수 있다는 것을 입증하기 위해 핵산 패턴을 사용하여 상보적인 핵산을 포함하는 나노입자의 조립을 지시할 수 있다 (예를 들면, 도 2 참조). 이 공정을 통해 마이크로론 내지 100 nm 이하 길이의 규모로 구조체를 제작할 수 있다. 따라서, 얻어지

는 고해상도는 예상된 구조의 형태로 표면 상에 개별 입자의 배치에 대한 조절을 가능하게 한다. 또한, 패턴 상의 핵산 밀도는 밀집 배열로 나노입자에 결합하기에 충분히 높을 수 있다.

- <78> 입자 조립에서, 도 2 및 추가로 실시예에 기재된 바와 같이 (1) 패턴화된 핵산, (2) 링커 핵산, 및 (3) 입자-결합된 핵산 (또한, 하기 사용되는 핵산의 C, G, 및 L 유형에 대해 본원에서의 약어 참조)의 3-성분 시스템이 적용될 수 있다. 이 접근법에서는 링커가 제외되거나 비상보적인 서열로 대체될 수 있는 내부 대조 실험이 있다. 하나의 이러한 대조 실험에서, 예를 들면, 15합체 DNA (G1) 개질된 금 나노입자는 처음 15개 염기가 입자-결합된 DNA에 상보적인 30합체 올리고뉴클레오티드 L2에 혼성화될 수 있다. 그러나, 15개-염기 분절 무함유 링커는 패턴화된 표면 C1 상의 DNA에 상보적일 수 없다 (연속 4개 미만의 염기가 중첩).
- <79> DNA-패턴화된 표면을 비상보적인 입자-링커 용액에 혼성화 조건 (예컨대, 0.3 M PBS, 0.025% SDS, 3 시간, 실온)하에 노출시킬 수 있지만, 입자는 많아야 단지 몇몇 위치의 패턴에 결합한다. 혼성화 조건은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들면 미국 특허 제6,361,944에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참고문헌으로 포함된다. ODT 단일층, DNA 패턴, 및 금 나노입자 사이의 더 양호한 대비를 상 AFM 이미지화 모드를 사용하여 달성할 수 있기 때문에 지형 이미지보다는 상 AFM 이미지를 사용할 수 있다. 따라서, 심지어 엄격한 (더 높은 온도) 세척이 없이도 DNA 나노패턴과 올리고뉴클레오티드-개질된 나노입자 사이의 상호작용은 매우 선택적이며, 비상보적인 DNA로 개질된 입자의 흡착을 막는다. 대조적으로, 높은 입자 밀도는 정확한 상보적인 링커 올리고뉴클레오티드가 존재하는 샘플에서 관찰될 수 있다.
- <80> 기관 상에 패턴화된 핵산 나노구조의 안정성은, 입자 조립체를 주위 조건 하에 3개월이 넘게 보관한 후에 이 입자 조립에 사용된 패턴화된 표면을 이용하여 측정할 수 있다. 놀랍게도, 고도의 특이적인 입자 흡착력은 표면으로부터 핵산이 분해되거나 티올-개질된 핵산이 손실되어 생성된 일부 고르지 못한 영역을 제외하고는 대부분의 영역에서 패턴이 손상되지 않았음을 나타낸다. 또한, 칩의 ODT 단일층 부위에 결합된 나노입자의 수를 약간 증가시킬 수 있다 (거의 완벽하게 입자가 없는 배경을 나타내는 신선한 샘플). 공기 및(또는) 티올-Au 결합의 광산화를 최소화하기 위하여 샘플을 비활성 기체 및 암실에 보관하는 경우, 입자 배경에서의 실질적인 감소가 달성될 수 있다.
- <81> DPN 인쇄의 중요한 특징은 피쳐 크기를 정밀 조절하는 동안 광범위한 길이 규모 (100 nm 이하 내지 수 μm)에 걸쳐 특이적인 화학 관능성을 갖는 패턴을 생성하는 능력이다. 본원에 기재된 방법을 이용하여, 핵산 및 올리고뉴클레오티드와 같은 고도로 하전된 거대분자를 소수성 소분자의 전달 방식과 동일한 방식으로 SPM 팁으로부터 기관으로 전달할 수 있다.
- <82> 특히, 본원에 기재된 방법을 이용하여 팁-표면의 접촉 시간에 따라 패턴 스팟의 크기를 증가시킬 수도, 대안적으로 그리는 속도를 감소시켜 라인 폭을 증가시킬 수도 있다. 상대 습도는, 예를 들어 45%에서 유지될 수 있으며, Au 기관 상의 상이한 지점에서 고정된 접촉 시간 동안 C1-DNA 코팅된 AFM 팁을 유지시킴으로써 핵산 스팟을 형성할 수 있다 (각각의 접촉 시간 (0.1 내지 100 초)에서 최소 5개의 스팟을 형성함). 이러한 조건하에, AFM 팁으로부터 표면으로 전달되는 DNA의 양은 소분자에 대하여 실험적으로 관찰된 접촉 시간 뿐만 아니라 이론적인 시뮬레이션에 의해 예측된 접촉 시간 (스팟 직경 $\sim t^{1/2}$)에 비례하여 패턴 영역에서 선형 증가될 수 있다. 각각의 잉크-기관 쌍에 대하여 속도 상수가 달라질 수 있다 하더라도, 이는 DPN 인쇄를 제어하면 소분자 및 염으로부터 하전된 유기 거대분자에 이르는 범위의 화합물들을 다양한 기관 상에 패턴화할 수 있다는 것을 분명히 나타내고 있다.
- <83> 또한, 금 기관 상에서 핵산 패턴이 형성되는 속도는 습도 조절에 유의하면서 본원에 기재된 방법을 이용하여 측정할 수 있다. 이러한 효과를 조사하고 정량하기 위하여, 각 스팟용 글러브박스 내의 상대 습도(RH)를 변화시키면서 팁이 금 기관과 접촉한 상태에서 예를 들어 10초 동안 팁을 유지시킴으로써 일련을 도트들을 형성시킬 수 있다. 습도는, 예를 들어 수조를 통해 질소를 버블링시키고, 증기를 상자로 배출시켜 증가시킬 수 있다. 대안적으로, 건조 질소 또는 수-포화된 질소를 상자를 통해 배출시키는 자동 조절기로 습도를 안정하게 유지시킬 수 있다. 패턴이 형성되기 전, 상자의 천장 및 바닥에 놓은 습도계가 동일한 습도 수치 ($\pm 0.5\%$)를 인식한 후에 습도 평형을 각각의 지점에서, 예를 들어 5 분 이상, 유지시킬 수 있다. 두 개의 별개의 실시양태에서 (다른 날에 다른 기관에서 수행하지만, 동일한 AFM 팁 및 DNA 서열 (C1)을 사용함) RH는 약 30 내지 약 46% 범위로 변화할 수 있다. 따라서, 피쳐 크기는 습도 조절을 이용하여 적당한 시간규모 상에서 넓은 동적 범위에 걸쳐 달라질 수 있다. 예를 들어, AFM 팁을 10 초 동안 유지시켜 생성된 스팟의 직경은 RH를 50%로 증가시키면 50 nm 미만 내지 1000 nm로 변화될 수 있다. 또한, 주어진 접촉 시간 동안 생성된 패턴 스팟의 크기에 대한 상대 습도의 효과는 잘 정의될 수 있다. 패턴 영역은 약 30 내지 80%의 습도 범위에 대하여 상대 습도의 제곱

에 따라 달라질 수 있다 (스팟 직경 ~ RH). 습도를 증가시키고, 감소시킬 때 최소한의 이력 현상이 나타날 수 있다는 것에 주의하여야 한다. 이러한 DNA 패터닝의 습도 의존성은 일반적으로 팁과 기관 사이의 물 메니스커스에 의존하는 AFM 팁으로부터 표면으로의 DNA 수송 메커니즘을 나타낸다. 또한, 습도에 대한 스팟 크기의 구획은 약 25 °C에서 DNA가 DPN 인쇄를 통해 직접 패터닝될 수 없는 최소 습도가 실온에서 존재한다는 것을 나타낼 수 있다 (예를 들어, 실시예의 도 13 및 14에 도시한 바와 같이, 23 °C에서 x-절편이 27% RH를 나타냄). 결국, 다른 기관 및 일자에서 실험을 수행하는 동안 높고 낮은 습도 조건 둘 모두에서 수득한 점을 따라 직선이 그려질 수 있다는 사실은 습도가 조절 역할을 제공한다는 것을 나타낸다.

<84> DPN 인쇄의 유리한 고유 성질 중 하나는 다중 잉크의 나노규모 패터를 고정함으로써 생성하는 능력이다. 다중-핵산 잉크 능력을 증명하기 위하여, DPN 인쇄를 2-성분 핵산 어레이를 제조하는 데 사용할 수 있다. 두 가지 상이한 티올-개질된 DNA 잉크의 패터를 정렬하기 위하여, 교차-혼합되지 않은 C1 및 C2 정렬 마커를 금 기관 상에서 두 개의 다른 위치에, 예를 들어 티올 16-머캅토헥사테칸산 (MHA)을 이용하는 DPN 인쇄를 통해, 우선적으로 그릴 수 있다. 패터닝되기 전에, MHA 패터닝에 대한 오프셋 좌표를 계산하기 위해 낮은 습도 (RH ~ 25%, 이러한 조건하에 DNA는 수송되지 못함)에서 C1-코팅 팁을 MHA 마커를 이미지화하는 데 사용할 수 있다. 그 후에, 습도는 예를 들어, 45%로 상승할 수 있었으며, 예를 들어 약 2 μm 간격으로 이격되어 있는 도트들의 삼각형 어레이 (예를 들어, ~ 760 nm 직경)이 형성될 수 있다. 이와 마찬가지로, C2로 구성된 2차 패터닝은 MHA 정렬 마커를 낮은 습도에서 코팅된 팁으로 다시 이미지화하고, 오프셋 좌표를 계산한 후 습도를 상승시키고, 예를 들어, 100 nm 직경을 갖는 도트들의 삼각형 어레이로 패터닝함으로써 정렬 내에 우선적으로 위치시킬 수 있다. 핵산 잉크 둘 모두가 패터닝된 후, 기관의 비패터닝된 영역은 ODT 처리에 의해 폐시페이셔널될 수 있으며, 톱핑 모드 AFM에 의해 이미지화 될 수 있다. 패터닝의 화학적 일체성 및 활성을 변화시키기 위하여, 칩을 혼성화 조건하에 2 시간 동안 L1 (C1 패터닝에 상보적임)으로 혼성화된 13 nm의 G1-개질된 금 입자의 용액을 노출시킬 수 있다. 이어서, 기관을 45 °C에서 0.025% SDS를 함유한 PBS 완충액으로 세정한 후 L2 (C2 패터닝에 상보적임)으로 혼성화된 30 nm의 G1-개질된 입자에 노출시킬 수 있다. 이 입자들은 DNA 스팟 또는 배경 상에서 교차-혼합되지 않고 정확한 패터닝으로 선택적으로 조립될 수 있다. 이 실시양태는 나노입자가 AFM-기체의 스크리닝 과정에서 진단 프로브로 사용될 수 있는 방법 뿐만 아니라 직접 기입하는 DPN 인쇄 접근법을 통해 제작된 나노구조가 나노입자-기체 구조물의 조립을 제어하는 데 사용될 수 있는 방법을 보여준다.

<85> 종종, DPN 인쇄 기술은 금 기관 상에서 적용될 수 있으나, 이는 일부 경우에 전자 및 광학 물질 적용의 관점에서는 바람직하지 않다. 금-티올 시스템은 DPN 인쇄를 이용하는 올리고뉴클레오티드 패터닝에 유용한 방법을 제공한다. 그러나, 금 기관의 전기 전도성은 상기 표면 상에 조립된 나노구조에서의 전하 수송 및 근접장 광학 현상 연구를 미연에 방지하며, 또한 임의의 표면-결합된 형광발색단으로부터의 방사를 쉐딩할 수 있다. 이러한 문제를 다루고, 조립된 나노구조의 전기 및 광학 특성화를 가능하게 하기 위하여, DPN 인쇄가 예를 들어 산화된 규소 웨이퍼와 같은 전기적으로 절연된 표면 상에서 핵산을 패터닝하는 데 사용될 수 있다.

<86> 열산화된 웨이퍼의 표면은 예를 들어 3'-머캅토프로필트리메톡시실란 (MPTMS)과 같은 관능성 실란 커플링제로 처리함으로써 활성화될 수 있다. 금 표면 상으로 DNA를 패터닝시키기 위해 AFM 팁의 제조 및 충전을 행할 수 있으나, 5'-말단 아크릴아미드기를 갖는 올리고뉴클레오티드 (C3 및 C4)를 말단 핵산티올이 개질된 올리고뉴클레오티드 대신에 사용할 수 있다. 실온 및 상대 습도 45%의 DPN 인쇄 조건하에, 아크릴아미드 잔기는 마이클 부가 반응을 통해 MPTMS의 펜던트 티올기와 반응하여 핵산을 표면에 공유 결합시킬 수 있다. 또한, 산화 규소 기관 상에서의 핵산 패터닝 형성은 금 기관의 경우와 유사한 팁-표면 접촉 시간 의존성을 나타낸다. 패터닝된 후에, 기관은 pH 10에서 완충된 아크릴산 단량체 (예를 들어, 아포젠트 디스커버리즈 (Apogent Discoveries) 티올 쉐딩 완충액)와의 반응에 의해 폐시페이셔널될 수 있다. 패터닝된 C3 올리고뉴클레오티드의 생물학적 활성은 표면을 상보적인 형광발색단-표지된 DNA (L3F)를 함유하는 용액에 노출시켜 다양화시킬 수 있다. 패터닝은 추후에 형광 현미경에 의해 특성화될 수 있다. 상기 방법을 이용하여 생성된 규소 상의 DNA 나노구조는 상보적인 DNA-개질된 금 나노입자 (G2로 변형됨)의 조립을 지시하는 데 사용될 수 있다. 상기 기술로, 산화규소 표면 상에 DNA 스팟이 생성되고, ~ 200 nm 직경 (영역 밀도로 환산하면 통상적인 마이크로어레이 상의 스팟 크기의 거의 1/10,000 크기임) 스팟을 검출할 수 있다.

<87> 직접 기입 나노리소그래피를 행하는 핵산은 특별히 제한되지는 않는다. 예를 들어, 핵산은 자연적으로 발생할 뿐만 아니라 합성 제조되고, 변형되어 예를 들어, 기관으로의 화학 흡착 또는 공유 결합을 위해 조정되는 관능기를 포함할 수 있다. 이는 저분자량, 중간 분자량 또는 고분자량의 올리고머 또는 중합체일 수 있다. 이는 단일-가닥, 이중-가닥 또는 심지어 삼중-가닥일 수 있다. 핵산은 데옥시리보핵산 (DNA), 리보핵산 (RNA), 또는 이들의 조합을 기재로 할 수 있다. 핵산의 구조는 일반적으로 예를 들어, 문헌 [Calladine and Drew,

Understand in DNA The molecule and How it Works 2nd Ed., 1997]에 기재되어 있다.

- <88> DPN 인쇄에 의해 패턴화 될 수 있는 핵산의 일반적인 유형으로는 예를 들어, DNA, RNA, PNA, CNA, RNA, HNA, p-RNA, 올리고뉴클레오티드, DNA의 올리고뉴클레오티드, RNA의 올리고뉴클레오티드, 프라이머, A-DNA, B-DNA, Z-DNA, DNA의 폴리뉴클레오티드, RNA의 폴리뉴클레오티드, 핵산의 T-접합, 비-핵산 중합체-핵산 차단 공중합체의 도메인, 및 이들의 조합이 있다. 핵산의 추가 일반적인 유형으로는 예를 들어, 바이러스 RNA 또는 DNA, 질 환 관련 유전자, 박테리아 DNA, 진균 DNA, 생물 공급원으로부터의 핵산, 중합효소 연쇄 반응 증폭의 생성물인 핵산, 나노입자와 접촉된 핵산, 및 이중-가닥 핵산 및 나노입자 상에서 올리고뉴클레오티드와 혼성화되어 삼중-가닥 복합체를 형성한 핵산이 있다.
- <89> 핵산은 일반적으로 유전 정보의 저장 및 복제, 및 단백질 합성을 통한 이 정보의 발현에 중요한 역할을 하는, 세포 및 바이러스에서 발견되는 임의의 유기 물질 균일 수 있다. 퓨린, 피리미딘, 탄수화물 및 인산은 일반적으로 핵산의 기본적인 유기 물질을 특성화한다. 퓨린 및 피리미딘은 뉴클레오티드 (2-데옥시-D-리보스 또는 D-리보스의 1차 히드록시기가 오르토인산에 의해 에스테르화된 뉴클레오시드)이다. 뉴클레오시드는 퓨린 또는 피리미딘 염기가 N-원자를 통해 2-데옥시-D-리보스 또는 D-리보스의 히드록시기를 대체하는 C-1에 결합된 화합물이다 (단, 임의의 인산기가 존재하지 않음). 생물계에 공통적인 뉴클레오시드는 아데노신, 구아노신, 시티딘 및 우리딘 (리보스 함유), 및 데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시시티딘 및 티미딘 (데옥시리보스 함유)이다. 따라서, 퓨린 염기는 아데닌 뉴클레오티드 또는 구아닌 뉴클레오티드일 수 있다. 피리미딘 염기는 티민 뉴클레오티드, 시토신 뉴클레오티드 또는 우라실 뉴클레오티드일 수 있다.
- <90> 핵산 서열은 무작위적이거나, 바람직한 아미노산 구조를 코딩할 수 있도록 특이적일 수 있다. 예를 들어, 세 개의 뉴클레오티드 균은 코돈을 포함할 수 있다. 하나의 코돈은 아미노산을 포함한다. 핵산의 코딩 영역은 코돈들을 포함한다.
- <91> 핵산은 유리된 형태로 존재하거나, 펩티드 또는 단백질에 결합하여, 구분되는 다발 또는 예를 들어 염색체와 같은 구조화된 형태의 핵산 단백질을 형성할 수 있다. 또한, 핵산은 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 선형, 원형 또는 수퍼코일 형태일 수도 있다. 핵산은 세포 또는 세포 기관으로부터 직접 단리될 수 있다. 플라스미드 또는 클로닝 벡터들 또한 핵산의 예이다.
- <92> 핵산은 뉴클레오티드 (각각 탄수화물 당 (데옥시리보스), 인산기, 및 질소를 함유한 퓨린-염기 및 피리미딘-염기의 혼합물 함유)로 구성될 수 있다. 당은 환형 또는 비환형 형태일 수 있다. DNA는 티민 및 시토신 피리미딘만을 포함하고, 우라실은 포함하지 않는다. DNA는 세포로부터 계놈, 핵 또는 미토콘드리아 DNA로 단리되거나, 합성법 (즉, 화학적 방법)에 의해 제조될 수 있다.
- <93> 세포에 존재하는 유전자는 통상적으로 DNA의 엑손 및 인트론 신장부로 구성된 계놈 DNA를 포함한다. 엑손 신장부는 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 뉴클레오티드를 포함하는 반면, DNA의 인트론 신장부는 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하지 않는 뉴클레오티드를 포함한다. 퓨린 및 피리미딘의 뉴클레오티드 서열은 이 유전자에 의해 특성화된 단백질의 폴리펩티드 쇄 내의 아미노산 서열을 결정한다.
- <94> DNA는 또한 RNA-의존성 DNA 중합효소의 작용에 의해 RNA 주형으로부터 생성된 상보성 또는 카피 DNA (cDNA)로 단리될 수 있다. 예를 들어, cDNA는 PCR로 증폭시킨 약 100 내지 800합체 가닥일 수 있다. RNA 주형이 가공되어 인트론을 제거한 경우, cDNA는 RNA가 전사되는 유전자와 동일하지 않게 될 것이다. 따라서, cDNA는 자연에서 거의 엑손인 뉴클레오티드 신장부를 포함할 수 있다.
- <95> 이중-가닥 형태일 때, 두 개의 DNA 가닥이 이중 나선을 형성한다. 이러한 나선 구조에서, DNA 한 가닥 내의 각 뉴클레오티드는 다른 가닥의 특이적인 뉴클레오티드에 수소 결합한다. 따라서, DNA에서 아데닌은 티민과 결합하고, 구아닌은 시토신과 결합한다. 각각의 가닥에 존재하는 뉴클레오티드가 각각의 다른 가닥에 존재하는 뉴클레오티드와 결합하는 능력은 이러한 가닥들이 상보적일 것인지를 (예를 들어, 한 가닥의 모든 아데닌이 다른 가닥의 티민일 것인지를) 결정한다.
- <96> RNA는 일반적으로 DNA와 유사할 수 있지만, 데옥시리보스 대신에 당 리보스를 함유하며, 티민 대신 우라실 염기를 갖는다. RNA는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있으며, 세포의 DNA로부터 전사된다. RNA 분자는 헤어핀 루프 (hairpin loop) 또는 다른 이중-가닥 구조를 형성할 수 있다. RNA는 주형 RNA, 메신저 RNA (mRNA), 전체 RNA, 또는 전달 RNA (tRNA) 폴리솜일 수 있다. RNA-DNA 혼성 분자는 본 발명에 따라 침착될 수 있다. 또한, 단백질-핵산, 또는 "펩티드 핵산" ("PNA")은 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

- <97> 상보적인 뉴클레오티드 사이에 나타나는 결합 특성은 핵산을 다른 핵산에 결합할 수 있는 프로브로서 유용하도록 만든다. 핵산은 표지될 수 있으며 프로브로 사용될 수 있다. 다수의 표준 표지 기술 중 어느 한 가지 기술에 의해, 핵산 프로브는 혼성화에 의한 다른 핵산의 검출에 사용될 수 있다. 이 혼성화는 표지가 예를 들어 형광, 방사선 또는 효소 표지인 경우 가시화되거나 검출될 수 있다. 따라서, 본 발명의 핵산은 또한 표지되거나 개질되어 검출가능한 인자 (예를 들어, 형광 마커 또는 태그, 금 입자 (스트렙타비딘 (streptavidin), 디곡시제닌 (digoxigenin)), 자기 비드, 또는 당업자에게 공지된 다른 마커)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 란데스의 (Landes) 미국 특허 제4,626,501호 ("표지된 DNA")를 참조한다 (본원에 참고문헌으로 포함된 것으로 간주함).
- <98> 뉴클레오티드 및 핵산은 또한 핵산 분해로부터 보호될 수 있도록 개질될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 리포솜 내에 삽입될 수 있다. 대안적으로, 티올기는 뉴클레오티드의 인산기를 대체함으로써 RNA 또는 DNA 분자와 같은 폴리뉴클레오티드로 혼입될 수 있다. 핵산의 "주쇄"로 혼입된 경우, 티올은 혼입된 위치에서의 DNA 절단을 방지하여 핵산 분자의 안정성을 개선시킬 수 있다.
- <99> 패터닝될 수 있고, 뉴클레아제 내성 및 세포 재흡수성이 개선된 올리고뉴클레오티드를 개시하고 있는 쿡 (Cook) 등의 미국 특허 제5,965,721호 또한 본원에 참고문헌으로 포함된 것으로 간주한다.
- <100> 따라서, 생체 내 핵산 처리의 생체이용가능성은 기재된 바와 같이 핵산을 개질시킴으로써 개선될 수 있다. 예를 들어, 개질된 핵산 제제는 비개질된 핵산보다 반감기가 증가하고(증가하거나) 혈장 내에서 보다 오랜 기간 동안 포함되어 있을 수 있다. 예를 들어, 핵산 및 폴리에틸렌 글리콜 제제는 또한 임의의 공지된 저속-방출 핵산과 같이 생체 내에서 핵산의 반감기를 증가시킬 수 있다. 따라서, 핵산을 개질시키는 것은 생체 내에서의 핵산의 효율성 및(또는) 생체이용가능성을 증가시킬 수 있다.
- <101> 핵산의 크기는 몇 개의 뉴클레오티드에서부터 올리고뉴클레오티드 또는 프로브, 폴리뉴클레오티드, 유전자, 염색체 단편 내지 전체 염색체 및 게놈에 이르기까지 상당히 광범위 할 수 있다. 예를 들어, 단일-가닥 또는 이중-가닥 핵산은 10-, 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 90- 또는 100-뉴클레오티드 또는 염기쌍 (bp) 이상의 길이일 수 있다. 또한, 핵산은 그 크기가 0.2 kb, 0.3 kb, 0.4 kb, 0.5 kb, 0.6 kb, 0.7 kb, 0.8 kb, 0.9 kb 또는 1.0 kb 이상일 수 있다. 실제로, 본 발명에 사용하기 위한 핵산은 그 크기가 1 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb 또는 10 kb 이상일 수 있다. 한 바람직한 크기 범위는 1-2 kb이다. 핵산은 다양한 길이를 갖는 뉴클레오티드 쇠일 수 있으며, 이는 통상적으로 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드라고 불리운다. 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 뉴클레오티드의 선형 서열로부터 유래하는 올리고머이다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 약 2 내지 약 100 뉴클레오티드, 약 2 내지 약 20 뉴클레오티드, 약 10 내지 약 90 뉴클레오티드, 또는 약 15 내지 약 35 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 어레이에서, 약 25합체 올리고뉴클레오티드를 사용할 수 있다. 다른 특정 범위는 약 60합체 내지 약 80합체이다 (상대적으로 긴 올리고뉴클레오티드임).
- <102> 핵산 선별, 프로빙, 표지화 및 검출 방법을 비롯한 마이크로어레이 방법이 미국 특허 제6,379,932호 및 제 6,410,231호 (이사이트 게노믹스; Incyte Genomics)에 기재되어 있으며, 이들을 사용할 수 있다. 이 특허들은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된 것으로 간주한다. 상기 참고문헌들이 딥센 나노리소그래피 방법을 언급하고 있다 하더라도, 이들은 본원에 기재된 개선된 나노어레이를 제조하는 데 사용될 수 있는 딥센 나노리소그래피 방법 및 이 방법에 대한 지침을 제안하지 못하였다.
- <103> 또한, 단일 뉴클레오티드를 포함하는 화합물은 잉크로 사용될 수 있다. 핵산의 혼합물을 사용할 수 있으며, 어레이 상의 다른 스팟들은 다른 핵산을 포함할 수 있다.
- <104> 본 발명에 따른 침착에 사용되는 핵산은 기관 표면에 직접 기입하여 침착시키기 전, 또는 후에 형성되거나 다른 성분과 함께 혼합될 수 있다. 따라서, 본 발명의 "잉크"는 원하는 핵산 샘플 이외에도 기관 표면 상에 침착시키기 위한 다른 화학 물질, 화합물 또는 조성물을 포함할 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 용매 및 염은 팁에 핵산을 도포하는 데 사용될 수 있다. 계면활성제가 사용될 수 있다. 예를 들어, 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드를 원하는 핵산과 함께 기관 표면 상에 침착시킬 수 있다.
- <105> 본원에 사용된 핵산 어레이, 및 핵산의 유형은 예를 들어 문헌 [A Primer of Genome Science, G. Gibson and S. Muse, 2002, Chapters 3-4 (pages123-181)] (본원에 참고문헌으로 포함된 것으로 간주함)에 기재되어 있다. 이 참고문헌은 예를 들어 cDNA 마이크로어레이 및 올리고뉴클레오티드 어레이 (둘 모두), 표지화, 혼성화, 및 통계분석법을 기재하고 있다. cDNA 어레이는 수천개 유전자의 상대적인 발현 수준을 동시에 모니터링하는 데 사용될 수 있다. PCR로 증폭시킨 cDNA 단편 (EST)은 형광표지되거나 또는 방사능 표지된 cDNA에 대하여 스팟팅

및 프로빙 될 수 있다. 관찰되는 신호의 강도는 연구하는 RNA 집단에 존재하는 전사체의 양에 비례하여 측정될 수 있다. 강도의 차이는 처리군 사이의 전사 수준 차이를 반영한다. 통계 분석 및 생체정보 분석은 통상적으로 확립된 분자 생물학적 접근법으로 시험할 수 있는 가설을 설정하기 위한 목적을 가지고 수행할 수 있다. 그러나, 최근의 cDNA 마이크로어레이 방법은 한계 (15,000 성분까지)를 가질 수 있으며, 고등 진핵생물의 게놈에 존재하는 유전자의 완전한 세트를 나타낼 수 없다. cDNA 마이크로어레이에 대한 올리고뉴클레오티드의 유리한 점 및 불리한 점은 상기 언급된 문헌 [A Primer of Genome Science]에 기재되어 있으며, 이는 본원에 기재된 핵산 나노어레이 설계에 사용될 수 있다.

<106> 딥펜 나노리소그래피 인쇄 (특히, 병렬 딥펜 나노리소그래피 인쇄)는 핵산 나노어레이 (특히, 결합 나노어레이) 제조에 유용하다. 어레이는 기관 상에서 보다 큰 패턴을 형성하는 다수의 분리된 샘플 영역, 또는 패턴 단위의 어레이이다. 샘플 영역, 또는 패턴은 임의의 형태 (예를 들어, 도트, 라인, 원, 사각형 또는 삼각형)일 수 있으며, 임의의 보다 큰 패턴 (예를 들어, 분리된 샘플 영역의 횡렬 및 종렬, 격자, 그리드 등)으로 어레이될 수 있다. 패턴은 개별 단위 또는 개별 단위의 보다 큰 집합체를 나타낼 수 있다. 각각의 샘플 영역은 어레이의 다른 샘플 영역에 함유된 동일하거나 상이한 샘플을 함유할 수 있다. "조합 어레이"은 각각의 샘플 영역 또는 복제 샘플 영역의 소집단 (통상적으로 2-4개의 군)이 어레이의 다른 샘플 영역에서 발견되는 것과 다른 샘플을 함유하는 어레이이다. "샘플"은 연구하고, 확인하고 반응시키는 물질 또는 물질들의 조합이다.

<107> 딥펜 나노리소그래피 인쇄 (특히, 병렬 딥펜 나노리소그래피 인쇄)는 서브마이크로 규모의 나노어레이 및 조합 나노어레이 제조에 특히 유용하다. 서브마이크로 규모, 또는 나노규모의 어레이는 깊이를 제외한 샘플 영역의 측면 치수 (예를 들어, 길이, 폭 또는 직경) 중 적어도 하나가 1 μm 미만이라는 것을 의미한다. 이러한 치수는 일반적으로 기관 평면에서의 측면 치수이다. 예를 들어, 딥펜 나노리소그래피 인쇄는 약 10 nm 직경의 도트를 형성하는 데 사용될 수 있다. 팁이 개선됨에 따라 (예를 들어, 보다 날카로운 팁), 1 nm 직경에 거의 근접한 크기의 도트가 생성될 수 있게 되었다. 서브마이크로 규모의 어레이는 현재 사용되고 있는 미세규모 (즉, 깊이를 제외한 치수가 모두 1-999 μm 임) 및 보다 큰 어레이보다 반응시간을 단축시키고, 시약의 사용을 감소시킨다. 또한, 단위 영역에서 보다 많은 정보를 취득할 수 있다 (즉, 어레이가 현재 사용되는 미세규모 어레이보다 조밀함). 결국, 서브마이크로어레이는 스크리닝에 새로운 가능성을 제공할 수 있다. 예를 들어, 상기 어레이를 SPM로 스크리닝하여 패턴 내의 (예를 들어, 형태, 두께, 높이의) 물리적 변화를 탐지하고(하거나) 핵산 서열을 비롯한 샘플 영역에 존재하는 화학 물질을 확인할 수 있다.

<108> 어레이의 각 샘플 영역은 단일 샘플 또는 단일 침착물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 샘플은 상기 총괄하여 기재된 핵산 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드, DNA 또는 RNA), 단백질 또는 펩티드 (예를 들어, 항체 또는 효소), 리간드 (예를 들어, 항원, 효소 기관, 수용체 또는 수용체에 대한 리간드) 또는 생체 물질의 조합 또는 혼합물 (예를 들어, 단백질 또는 핵산의 혼합물)과 같은 생체 물질일 수 있다.

<109> 본 발명은 특히 핵산, 올리고뉴클레오티드 및 DNA 나노어레이에 초점을 두고 있다. 어레이 및 어레이 사용 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 상기 어레이는 생체 또는 화학 물질의 동정 및(또는) 정량을 위한 생체 및 화학 물질의 스크리닝 (예를 들어, 면역분석, 효소 활성 분석, 게노믹스 및 프로테오믹스)에 사용될 수 있다. 자연-발생 화합물 또는 합성 화합물, 및 다른 물질들 (세포 포함)의 생물학적 및 화학적 라이브러리는 예를 들어, 약물 후보 물질, 효소 억제제, 수용체에 대한 리간드 및 리간드에 대한 수용체의 동정 및 명명, 또는 정제에 사용될 수 있으며, 게노믹스 및 프로테오믹스에 사용될 수도 있다. 미세입자 및 나노입자의 어레이는 여러 목적을 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 출원 2002/0063212 A1의 실시예 7 참조). 어레이는 또한 결정화, 예칭 (예를 들어 미국 특허 출원 2002/0063212 A1의 실시예 5 참조) 등의 연구에 사용될 수 있다. 조합 어레이 및 다른 어레이, 및 이들의 용도를 기재하고 있는 참고문헌으로는, 예를 들어 미국 특허 제 5,747,334호, 제5,962,736호 및 제5,985,356호, 및 PCT 출원 WO 96/31625, WO 99/31267, WO 00/04382, WO 00/04389, WO 00/04390, WO 00/36136 및 WO 00/46406이 있다 (이들의 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된 것으로 간주함). 마지막으로, 본 발명의 어레이 상에서 수행한 실험의 결과는 통상적인 수단 (예를 들어, 형광, 화학 발광, 생물 발광 및 방사능)에 의해 검출될 수 있다. 대안적으로, SPM은 스크리닝 배열에 사용될 수 있다. 예를 들어, AFM은 분자의 정량 이미지화 및 동정 (화학적 또는 분자생물학적 확인 물질로 코팅된 SPM 팁의 이용을 통한 화학 분자 및 생체 분자의 이미지화 및 동정 포함)에 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Frisbie et al., Science, 265, 2071-2074 (1994)]; [Wilbur et al., Langmuir, 11, 825-831 (1995)]; [Noy et al., J. Am. Chem. Soc., 117, 7943-7951 (1995)]; [Noy et al., Langmuir, 14, 1508-1511 (1998)]; 및 미국 특허 출원 제5,363,697호, 제5,372,93호, 제5,472,881호 및 제5,874,668호 (그의 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된 것으로 간주함)를 참조한다.

- <110> 직접 기입 나노리소그래피 인쇄는 다수개의 도트 또는 다수개의 라인이 기관에 형성될 수 있는, 나노스코픽 피처를 갖는 서브마이크로미터 규모의 어레이인 핵산 나노어레이의 제조에 특히 유용하다. 다수개의 도트는 당업계에 잘 알려진 6각형 또는 4각형 격자와 같은 도트 격자일 수 있다. 다수개의 라인은 라인들의 수직 및 수평 배열과 같은 그리드를 형성할 수 있다.
- <111> 도트 직경 및 라인 폭을 비롯한 각 패턴의 측면 치수는 예를 들어, 약 1,000 nm 이하, 약 500 nm 이하, 약 300 nm 이하, 약 200 nm 이하, 보다 특별하게는 약 100 nm 이하의 나노규모일 수 있다. 이 치수는 예를 들어 약 1 nm 내지 약 750 nm, 약 10 nm 내지 약 500 nm, 보다 특별하게는 약 100 nm 내지 약 350 nm의 범위일 수 있다. 약 10 nm 내지 약 100 nm의 작은 범위가 사용될 수 있다.
- <112> 다수개의 패턴에 있어서 패턴의 수는 특별히 단일 기관에 제한되지 않으며, 대체로는 높은 패턴 밀도가 요구된다. 그것은 예를 들어 10개 이상, 100 개 이상, 1,000개 이상, 10,000개 이상, 심지어는 100,000개 이상일 수 있다. 예를 들어, 10 X 10 어레이와 같은 사각형 배열이 가능하다. 일반적으로 평방 센티미터 당 100 개 이상, 바람직하게는 1,000 개 이상, 보다 바람직하게는 10,000 개 이상, 더더욱 바람직하게는 100,000 개 이상의 불연속 요소와 같은 보다 고밀도의 어레이가 바람직하다. 놀랍게도, 본 명세서에서 기재한 나노기술은 패턴 밀도로서 평방 센티미터 당 불연속 요소를 백만개 이상, 1억개 이상, 보다 특별하게는 10억개 이상 포함하는 초고밀도 나노어레이를 생성하는 데 사용될 수 있다.
- <113> 나노어레이에서 각 패턴 사이의 거리는 달라질 수 있으며 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 패턴은 1 마이크로미터 미만 또는 1 마이크로미터 초과로 이격될 수 있다. 이 거리는 예를 들어, 약 300 내지 약 1,500 마이크로미터, 또는 약 500 내지 1,000 마이크로미터일 수 있다. 이격된 패턴 사이의 거리는 도트의 중심 또는 라인의 중앙과 같은 패턴의 중심으로부터 측정될 수 있다.
- <114> 특정 스팟 또는 침착물에서 핵산의 양은 제한적이지는 않지만, 예를 들어 pg 또는 ng 수준, 예컨대 약 0.1 ng 내지 약 100 ng, 보다 구체적으로 약 1 ng 내지 약 50 ng이 될 수 있다. 핵산 마이크로어레이 기술에서 사용하는 스팟팅 용액 방법은 필요한 경우 나노어레이 기술에서도 또한 사용될 수 있다.
- <115> 본 명세서에서 기재한 방법에 의해, 기관 및 기관 상의 다수개의 핵산 패턴을 포함하는 핵산 나노어레이가 제조될 수 있으며, 여기서 핵산 패턴은 기관에 화학 흡착되거나 공유 결합되며, 측면 치수가 약 1,000 nm 이하이고, 1,000 nm 이하의 거리로 서로 이격되며, 상보적인 핵산과 혼성화가 가능하다. 바람직한 실시양태에서, 핵산 나노어레이는 측면 치수가 약 500 nm 이하이고, 500 nm 이하의 거리로 이격되어 있으며, 도트형인 핵산 패턴을 1,000 개 이상 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 핵산 나노어레이는 패턴의 측면 치수가 약 200 nm 이하이고, 500 nm 이하의 거리로 서로 이격되어 있으며, 도트형인 핵산 패턴을 10,000 개 이상 포함한다.
- <116> 직접 기입 나노리소그래피 및 핵산 마이크로어레이에서 사용하는 것으로 알려진, 유리를 비롯한 통상적인 기관이 사용될 수 있다. 상기 기재한 것 외에도, 막, 플라스틱 또는 중합성 젤, 마이크로웰, 전극, 나노갭 및 센서 소자와 같은 것들을 기관으로 들 수 있다. 막으로는 니트로셀룰로즈 및 나일론 막을 비롯한 핵산 마이크로어레이의 현기술에서 사용되는 것들을 들 수 있다. 핵산을 기관에 침착시키기 전에, 예를 들어 단일층 또는 프라이머층으로 기관을 처리할 수 있다. 프라이머층은 핵산을 공유 결합으로 고정시키도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 5'-아미노아실화된 PCR 프라이머를 EST를 증폭하는 데 사용한다면, 핵산 분자의 말단에 결합하는 알데히드계 코팅을 사용할 수 있다. 다층 구조가 만들어질 수 있다.
- <117> 생접합된 나노입자 표지 및 빌딩 블록의 빠른 증식이라는 관점에서, 본 명세서에 기재된 방법은 금속성 또는 절연성 기관 모두에서 다양한 금속성, 반전도성, 자성 및 절연성 미세구조체의 DPN- 및 핵산-주형 조립을 가능하게 해야 한다. 대표적인 문헌으로는 (1) [M. Bruchez et al, Science, 281, 2013 (1998)], (2) [S. R. Nicewarner-Pena et al., Science, 294, 137 (2001)], (3) [Y. Cui, et al., Science, 293, 1289 (2001)]을 들 수 있다. 이 구조체들은 또한 분자 전자공학, 포토닉스, 고밀도 정보 저장 및 바이오센싱에 대한 문제를 다루는 데 사용될 수 있다. 이 방법은 또한 마이크로어레이 소형화의 근본적인 한계를 연구하는 새로운 방법을 제시한다. 본 명세서에서 설명되는 기술에 따르면, 약 100,000 개의 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드 스팟을 갖는 어레이가 통상적인 로봇식 스팟팅 방법과 유사한 시간 규모에서 전형적인 AFM 스캐너의 크기 (100 um X 100 um) 영역에서 생성될 수 있으므로, 나노- 및 마이크로어레이 제작 및 해독에 대한 주사 프로브 방법의 연구가 가능하다. 예를 들어, 로봇식 방법은 침착물의 스팟팅 속도가 1 초 당 단지 몇 개로 제한될 수 있는데, 이는 로봇이 5000 클론 이상을 함유하는 100 마이크로어레이를 제조하는 데 최대 2 일이 걸릴 수 있다는 것을 의미한다.

<118> 본 발명의 실시에서 유용한 나노입자로는 금속 (예를 들어, 금, 은, 구리 및 팔라듐), 반도체 (예를 들어, CdSe, CdS, 및 ZnS로 코팅된 CdSe 또는 CdS) 및 자성체 (예를 들어, 강자철광), 콜로이드 물질을 들 수 있다. 본 발명의 실시에서 유용한 다른 나노입자로는 ZnS, ZnO, TiO₂, AgI, AgBr, HgI₂, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In₂S₃, In₂Se₃, Cd₃P₂, Cd₂As₂, InAs 및 GaAs를 들 수 있다. 나노입자의 크기는 바람직하게는 약 5 nm 내지 약 150 nm (평균 직경), 더 바람직하게는 약 5 nm 내지 약 50 nm, 더욱 바람직하게는 약 10 nm 내지 약 30 nm이다. 핵산에 결합된 나노입자를 제조해서 사용하는 방법은 본 명세서에 참고로 인용한 미국 특허 제 6,361,944호에 기재되어 있다.

<119> 본 발명은 하기의 실시예에 의해 더 설명되는데, 이는 상기에서 구체적으로 기술되며 하기에서 청구되는 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

실시예

<120> 본 발명은 하기의 비제한적 실험 부분 및 실시예에 의해 더 설명된다. 또한 미국 특허 공개 2002/0063212 A1호 (머킨 등)의 실시예 1 내지 7은 디펜 (상표명: DIP PEN) 나노리소그래피 인쇄에 대한 다양한 실시양태를 예시하며, 본 명세서에서 참고로 인용된다.

실험 부분

<122> 일반적인 방법 및 물질.

<123> 1-옥타데칸티올은 알드리치 (Aldrich, 위스콘신주 밀워키 소재)로부터 구입하였다. 앵커기와 DNA (C1, C2, 표 I 참조) 사이에 18 개 원자에 해당하는 폴리에틸렌글리콜 스페이서를 갖는 티올-개질된 15합체 DNA는 아이디티 (IDT, 아이오와주 코랄빌 소재, PAGE 정제)로부터 구입하였으며 더 정제하지 않고 사용하였다. 금 기관 패턴 실험에서 사용한 연결 DNA (L1 및 L2) 및 금 나노입자-결합된 DNA (G1)는 이전에 보고된 문헌 (예를 들어, 문헌 [J.J. Storhoff et al., J. Am. Chem. Soc., 120, 1959 (1998)]; 및 미국 특허 제 6,417,340호 및 제 6,361,944호 (머킨 등) 참조)에서와 같이 합성하였다.

<124> 아크릴아미드 개질된 (아크리디트(상표명: Acrydite)) 12- 및 15합체 DNA (C3 및 C4)는 아이디티 (RP HPLC 정제)로부터 구입하였다. 산화규소 패턴화 실험에서 사용한 연결 DNA (L3 및 L4) 및 나노입자-결합된 DNA (G2 및 G3)는 공지된 방법 (예를 들어, 문헌 [J.J. Storhoff et al., J. Am. Chem. Soc., 120, 1959 (1998)]; 및 미국 특허 제 6,417,340호 및 제 6,361,944호 (머킨 등) 참조)에 의해 합성하였다.

표 I

<125>

DPN 패턴화, 나노입자 개질, 및 DNA-패턴화된 표면으로의 입자 연결에 사용된 올리고뉴클레오티드 서열.	
가닥 이름	서열 및 말단 개질
C1	5'HS(CH ₂) ₆ -PEG ₆ -GAG GGA TTA TTG TTA
C2	5'HS(CH ₂) ₆ -PEG ₆ -AGT CGC TTC TAC CAT
L1	5'AGA GTT GAG CTA TAA CAA TAA TCC CTC
L2	5'AGA GTT GAG CTA ATG GTA GAA GCG ACT
G1	5'TAG CTC AAC TCT A ₂₀ (CH ₂) ₃ SH
C3	5'아크리디트-PEG ₆ -ATC CTT ATC AAT ATT
C4	5'아크리디트-PEG ₆ -CGC ATT CAG GAT
L3	5'GGA TTA TTG TTA AAT ATT GAT AAG GAT
L4	5'TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG
L3F	오레곤 그린 488X-5'GGA TTA TTG TTA AAT
L4F	오레곤 그린488X-5'TAC GAG TTG AGA
G2	5'TCT CAA CTC GTA A ₁₀ (CH ₂) ₃ SH
G3	5'TAA CAA TAA TCC A ₁₀ (CH ₂) ₃ SH

<126> 단결정 실리콘 웨이퍼 상의 금 박막은 이전에 보고된 방법 (문헌 [L. M. Demers et al., Anal. Chem. 72, 5535 (2000)] 참조)에 따라 제조되었다. 산화규소 기관을 피라냐 용액 (술폰산 대 30% 과산화수소 3:1)으로 세척하

고, 후에 2 시간 동안 증기 이동에 의해 머캅토프로필트리메톡시실란 (MPTMS)으로 실란화킨 후 (예를 들어, 문헌 [D. G. Kurth et al. Langmuir, 9, 2965 (1993)] 참조), 에탄올로 세정하고 80 °C에서 10 분 동안 N₂ 유동하에서 경화시켰다.

<127> **AFM 팁 제조.**

<128> 통상적인 질화규소 프로브 칩 (탄성 상수 약 0.3 Nm⁻¹, 써모마이크로스코프스 (Thermomicroscopes), 캘리포니아주 서니베일 소재)을 10 분 동안 피라냐 용액 (1 H₂O₂:3 H₂SO₄)으로 먼저 세척하고, 탈이온수, 에탄올 및 톨루엔으로 세정하고, 이후 유리 페트리 디쉬에서 1-2 시간 동안 톨루엔 중 3-아미노프로필트리메톡시실란 (APS) 1% v/v 용액에 함침시켰다. 실란화 후에 칩을 톨루엔으로 세정하고, 이후 질소 스트림하에서 건조시켰다. 전형적인 방법으로, 팁을 팁 코팅 용액 (1 mM DNA, 90% 디메틸포름아미드 (dmf), 10% 물, 0.3 M MgCl₂)에 20 초 동안 침지시켜 티올-개질된 DNA로 즉시 코팅하고, 후속적으로 압축 디플루오로에탄올로 건조하였다. 아민-코팅된 팁을 실란화 후에 즉시 용액에 침지시키면, DNA의 디메틸포름아미드 (DMF) 용액으로 잘 코팅되지만, 대체로 약 12 시간 후에는 아마도 팁 표면의 오염 때문에 코팅이 불량하게 된다.

<129> **딥펜 나노리소그래피 인쇄 실험.**

<130> 딥펜 나노리소그래피 인쇄는 DNA-코팅된 AFM 팁 (접촉력 약 2.5 nN)을 사용하여 조절된 대기 글러브박스에서 실시되었다. 글러브박스는 온도와 습도를 ± 5 °C 및 ± 5 % 상대 습도내로 조절하는 것을 가능하게 하였다. 모든 DPN 인쇄 실험은 주문 제작한 DPN 인쇄 소프트웨어 인터페이스를 갖는 파크 사이언티픽 인스트루먼트 오토 프로브 (Park Scientific Instruments Autoprobe) CP AFM을 사용하여 실시되었다.

<131> **금 나노입자 조립.**

<132> 금 나노입자는 공지된 방법 (예를 들어, 문헌 [J.J. Storhoff et al., J. Am. Chem. Soc., 120, 1959 (1998)]; 및 미국 특허 제6,417,340호 및 제6,361,944호 (머킨 등) 참조)에 의해 티올-관능화된 DNA로 개질되었다. 패터닝된 금 기관 상으로의 조립을 위해서는, 티올-캡핑된 DNA로 개질된 나노입자 (20 μl, 13 nm 직경, 5 nM)를 12 시간 이상 동안 혼성화 용액 (최종 농도 0.1 μM DNA, 0.3 M PBS (0.01 M 인산 완충액 pH 7, 0.3 M NaCl), 0.025 % 나트륨 도데실 설페이트 (SDS))에서 연결 DNA와 밤새 혼성화하였다. 이후, 입자-DNA 용액을 수평면상의 패터닝된 기관 상에 액적 상태로 놓고, 실온에서 3 시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 슬라이드를 폴리프로필렌 튜브에 넣고, 실온에서 완충액 (0.3 M PBS, 0.025 % SDS) 스트림하에서 세정한 후, pH 7의 0.3 M 암모늄 아세테이트로 세척하여 표면으로부터 염을 제거하여 AFM 이미지화를 위한 슬라이드를 제조하였다. DNA-패터닝된 SiO_x 기관 상으로의 입자 조립을 위해서는, 링커 DNA를 5 분 동안 60 °C로 가열하여 DNA-개질된 나노입자 (0.5 μM 링커, 10 nM 입자, 총부피 0.2 ml)로 혼성화한 후, 30 분간 냉각하였다. 후속적으로, 이 용액을 0.3 M PBS 0.025 % SDS를 사용하여 총부피 1 ml로 희석시키고, 상기 기재한 패터닝된 기관과 혼성화하는 데 사용하였다.

<133> **이미지화 실험.**

<134> DNA 패터닝 및 나노입자의 탭핑 모드 토포그래피 (topography) 및 위상 AFM 이미지를 디지털 인스트루먼트 (Digital Instruments, 캘리포니아주 산타 바바라 소재)로부터의 실리콘 캔틸레버가 있는 디지털 인스트루먼트 나노스코프 IIIa를 사용하여 얻었다 (탄성 상수 약 40 Nm⁻¹). 모든 AFM 이미지는 1 차 또는 2 차 플래트닝 기능만을 적용하여 처리되었다. 형광 이미지화의 경우에는, 패터닝된 기관을 2X SSPE 완충액 (2 μM DNA, 0.3 M NaCl, 0.02 M 인산나트륨, 0.002 M EDTA, 0.2% SDS, pH 7.4)에서 형광발색단-표지된 상보적인 DNA로 30 분 동안 실온에서 혼성화하고, 2X SSPE 0.2% SDS로 세정하고, 이후 10 분 동안 2X SSPE 0.2% SDS에 함침시켰다. 기관을 0.3 M 암모늄 아세테이트로 세정하고, N₂로 송풍 건조한 후, Hg 램프 백색광 여기 광원이 있는 제이스 악시오버트 (Zeiss Axiovert) 100 현미경으로 형광 이미지화 하였다.

<135> **실시예 1: 딥펜 나노리소그래피 인쇄에 의한 핵산의 패터닝**

<136> 이 실시예는, 팁-코팅, 기관 표면으로의 확산 및 후-처리 단계 동안의 패터닝 안정화가 개선된, DPN 인쇄에 의한 핵산 패터닝 방법을 기술한다. 이 방법은 아미노실란-개질된 질화규소 AFM 캔틸레버-팁 조립, 및 시클릭 디솔 피드 및 폴리에틸렌글리콜로 개질된 합성 핵산을 이용하여 금 기관 상에 안정한 올리고뉴클레오티드 패터닝을 형성하는데, 이는 예를 들어 나노입자 프로브를 비롯한 프로브로 혼성화할 수 있다. 인쇄 동안 상대 습도를 적절

히 선택하여 인쇄되는 피처의 크기를 제어한다.

<137> 1. AFM 팁 전처리 과정

<138> 통상적인 질화규소 AFM 팁을 먼저 트리메톡시아미노-프로필실란 (ASP)으로 개질시켰다. 캔틸레버를 피라냐 식각액 (진한 황산/30% 과산화수소 3:1)에서 10 분 동안 세척한 후, 나노 정제수와 에탄올로 세정하고, 질소 스트림에서 건조하였다. 이후 팁을 톨루엔 중의 APS 1 % 용액에 1 시간 동안 함침시켜 공유 결합으로 개질시키고, 톨루엔으로 세정하였다. 이 과정으로 음으로 하전된 핵산이 부착된, 양으로 하전된 표면이 만들어졌다.

<139> 2. AFM 팁 코팅

<140> (a) 하나의 핵산티올 잔기 또는 시클릭 디설피드 에피안드로스테론 링커 (b) 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 스페이서 (도 1 및 3 참조)를 함유하는 개질된 합성 DNA의 1 mM 용액을 디메틸포름아미드 (DMF) 20 μ l 및 물 중의 1.5 M $MgCl_2$ 1 μ l 중에서 제조하였다. 전처리된 AFM 팁을 20-60 초 동안 상기 용액에 침지시켜 DNA로 코팅하고, 압축 공기 또는 질소로 송풍 건조하였다. 일반적으로, DMF는 DNA를 용해하는 역할을 하여 APM 팁을 코팅 용액으로 습윤시킬 수 있다. 일반적으로, DNA 가닥간 반발 작용을 차단하여 표면상의 고밀도의 DNA 패턴을 얻기 위해 저농도의 $MgCl_2$ 를 사용하였다. 일반적으로, PEG 스페이서는 기관에 DNA를 확산시키는 데 있어 중요할 수 있다.

<141> 3. DPN 인쇄를 통한 DNA의 직접 패턴화

<142> DNA를 금 기관에 전달하기 위해 DNA 코팅된 AFM 팁을 기관에 대해 위치시키고, 기관과 접촉할 만큼 가까이 놓았다 (도 3 참조). 기관을 따르는 팁의 이동은 DPN 인쇄 소프트웨어에 의해 제어되었다. 패턴 크기에 대한 제어는 대기 조절 챔버에서 상대 습도를 변경함으로써 달성되었다. 예를 들어, 도트 패턴의 직경은 약 88 % 상대 습도에서 약 780 nm (상위열) 내지 약 50 % 상대 습도에서 약 430 nm (하위열;도 4 참조-모든 도트들은 AFM을 해당 위치에서 20 초 동안 유지시킴으로써 만들어졌음)로 변경될 수 있다. 디설피드 링커는 기관에 DNA 결합의 안정성을 증가시키는 금 기관에 대한 킬레이트 결합을 형성한다. 이런 식으로 결합된 DNA는 주위의 비패턴화된 금의 패시베이션을 위해 사용되는 알칸티올 (예컨대, 1-옥타데칸티올)에 의해서 치환되지 않는다. 이 DNA 패턴은 상보적인 DNA 서열 (도 5 참조 및 예를 들어, 문헌 [Letsinger, R. L, Elghanian, R.; Viswanadham, G.; Mirkin, C. A. Bioconjugate Chemistry, 2000, 11, 289-291]; 및 PCT 출원 공개 WO 98/04740 참조)로 개질된 금 나노입자 프로브와의 혼성화에 의해 생물학적 활성을 갖는 것으로 나타났다.

<143> 실시예 2 및 3:

<144> 금과 같은 금속성의 전도성 기관 (실시예 2) 및 절연성 기관 (실시예 3) 상에 공유 결합된 올리고뉴클레오티드 나노규모 패턴을 생성하기 위해 직접 기입 뎀펜 나노리소그래피 인쇄 (예컨대, DPN 인쇄)를 이용하였다. 금상에서의 패턴화를 위해서는 핵산티올기로 DNA를 개질하였으며 (실시예 2), 유도 실리카상에서는 5'-말단 아크릴 아미드기를 갖는 올리고뉴클레오티드를 패턴화하였다 (실시예 3). 이들 실시예에서는 수 마이크로미터 내지 100 나노미터 미만 범위의 피처 크기가 얻어졌으며, 얻어진 패턴은 이들을 구성하는 DNA의 서열-특이적 결합 특성을 나타냈다. 표면에 개별 올리고뉴클레오티드-개질된 입자들의 조립을 지시하는 데 이 패턴을 사용하였으며, 단일 어레이에서 다중 DNA 서열의 침착이 증명되었다.

<145> DPN 인쇄를 이용하여 금 (실시예 2) 및 산화규소 (실시예 3) 표면에 올리고뉴클레오티드를 패턴화하였다. DNA 패턴화를 용이하게 하는 몇몇 요소가 확인되었다. 첫째, AFM 팁은 DNA로 잘 코팅되었다. DPN에 의해 다양한 소수성 분자를 침착시키는 데 비개질 질화규소 캔틸레버가 사용되어 왔지만, 이러한 캔틸레버에 의해서는 피처 크기 및 형상이 매번 어렵게 제어되는 DNA 패턴이 얻어진다. 3'-아미노프로필트리메톡시실란으로 (톨루엔 중의 1 % v/v 용액에서 1 시간) 질화규소 AFM 캔틸레버를 표면 개질하여 DNA 패턴화에 대한 제어가 개선되었으며, 이는 팁 표면에 DNA 잉크의 확실한 부착을 촉진한다.

<146> 실란화된 팁을 1 mM DNA 및 0.3 M $MgCl_2$ 를 함유하는 90 % 디메틸포름아미드/ 10 % 수용액에 10 초 동안 침지시켜 DNA로 코팅하고, 이후 팁을 압축 디플루오로에탄올로 송풍 건조하였다. 양으로 하전된 친수성 팁 표면은 이 DNA 잉크 용액에 의해 쉽게 습윤되었고, 이러한 AFM 팁은 재코팅되기 전 몇 시간 동안 DPN 인쇄 실험에서 사용될 수 있었다. 팁은 또한 이들을 증발된 금층 및 시스테아민의 자기 조립 단일층으로 코팅함으로써 성공적으로 사용되었다. 또한 주변 습도 조절에 의해 올리고뉴클레오티드의 신뢰성 있는 DPN 패턴화가 가능하다는 것이 밝혀졌다. 특별한 언급이 없다면, 모든 패턴화는 23 \pm 3 $^{\circ}$ C, 45 \pm 5 %의 상대 습도로 환경 제어된 글러브박스 안에서 실시하였다.

<147> 잉크-기판 조합을 적합히 선택하는 것도 DPN 인쇄 공정을 용이하게 하였다. 실시예 2에서는 예를 들어, 핵산티올 개질된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 크기가 50 nm 내지 수 마이크로미터 범위의 피처를 금 기판에 직접 패터닝하였다 (도 6-10). 일반적으로는, DNA의 핵산티올기가 Au 표면에 화학 흡착했다고 여겨진다 (예를 들어, 문헌 [T. M. Herne et al., J. Am. Chem. Soc., 119, 8916 (1997)] 참조). 기판을 올리고뉴클레오티드로 패터닝화시킨 후, 1-옥타데칸티올 (ODT, 1 mM)의 에탄올 용액에 1 분 동안 침시켰다. 이 과정으로 비패터닝된 금 표면이 소수성 단일층으로 코팅되었으며, 이는 이후의 혼성화 실험에서 DNA 또는 DNA-개질된 나노입자의 비특이적 흡착에 대해 비패터닝된 금 표면을 패시베이션시킨다. 기판의 ODT 처리 후, 탭핑 모드 AFM에 의해 올리고뉴클레오티드 패턴을 이미징화 하였고, 피처의 높이는 2 내지 5 nm인 것으로 나타났다 (도 6A) (문헌 [R. Levicky et al. J. Am. Chem. Soc., 120, 9787 (1998)] 참조). 부동화된 DNA는 그의 매우 특이적인 인식 특성을 유지하였으며, 이 패턴을 사용하여 13 nm 직경의 올리고뉴클레오티드-개질된 금 나노입자의 조립을 지시할 수 있었다 (도 6B). 이 과정에 의해 구조체는 수 마이크로미터에서 100 nm 미만 길이의 규모로 제작되었으며, 각 입자들은 미리 계획한 구조 형태로 표면상에 위치하였다 (도 6-9). DNA 나노패턴과 올리고뉴클레오티드-개질된 나노입자 사이의 상호작용은 매우 선택적이었으며, 상보적인 연결 가닥이 없어도 비특이적 결합은 거의 없었다 (도 7).

<148> 금-티올계가 DPN 인쇄를 이용하는 올리고뉴클레오티드 패터닝에 대한 탁월한 방법을 제공하지만, 금 기판의 전기 전도성으로 인해 전자 이동 및 이러한 표면에서 조립된 나노구조에서의 근접 광학 현상에 대한 연구가 방해되며, 또한 표면에 결합된 임의의 형광발색단의 발광이 켜진다. 따라서, DPN 인쇄 방법은 산화된 실리콘 웨이퍼에서 DNA의 패턴을 생성하도록 개발되었다 (도 10). 열 산화된 웨이퍼의 표면을 3'-머캡토프로필트리메톡시실란 (MPTMS)으로 처리하여 활성화하였다 (문헌 [D. G. Kurth et al., Langmuir, 9, 2965 (1993)] 참조). AFM 팁의 제조 및 충전은 금 표면 상에서의 DNA 패터닝과 사실상 동일하게 실시되었지만, 이 경우에는 5'-말단 아크릴아미드기를 갖는 올리고뉴클레오티드가 사용되었다 (문헌 [M. Kenney, Biotechniques, 25, 516 (1998)] 참조). 실온 및 45 % 상대 습도의 DPN 인쇄 조건하에서 아크릴아미드 잔기는 MPTMS의 펜던트 티올기와의 마이클 부가 반응에 의해 표면에 DNA를 공유 결합시킨다 (도 11 참조). 패터닝 후, 기판을 pH 10으로 완충된 (아포젠트 디스커버리즈 켄치 용액 (Apogent Discoveries Quench Solution) 30 mm.) 아크릴산 단량체와 반응시켜 패시베이션하였다. 모든 DNA 스팟과 서열을 패터닝한 후, 전형적으로는 기판을 밤새 방치하여 티오에테르 부가물이 형성되게 한 후, 기판을 세척하고, 비패터닝 영역에서의 미반응된 티올기는 켜졌다. 패터닝된 올리고뉴클레오티드의 생물학적 활성은 표면을 상보적인 및 비상보적인 형광발색단-표지된 DNA를 모두 함유하는 용액에 노출시킴에 따라 확인되었다. 패터닝 이후 외형광성 현미경 검사에 의해 특성화 하였다 (도 10 A). 모든 경우에 있어서, 상보적인 표적 및 패터닝된 영역에 상응하는 형광만이 검출되었다. (탈이온수로 세정하여 단일-가닥 상보체를 탈혼성화한 후) 동일한 DNA 나노구조체를 사용하여 상보적인 DNA 개질된 금 나노입자의 조립을 지시할 수 있다 (도 10 B). 이러한 기술에 의해 DNA 스팟은 통상적인 마이크로어레이의 스팟보다 (영역 밀도의 관점에서) 거의 160,000 배나 작은 약 50 nm의 직경으로 생성 및 검출되었다.

<149> 실시예 4

<150> DPN 인쇄의 주요 특징은 이전에 고안된 방법에 비해 피처 크기가 제어되면서, 폭넓은 범위의 길이 규모로 특정한 화학 관능성의 패터닝을 생성하는 능력이다. 놀랍게도, 올리고뉴클레오티드와 같이 고하전된 거대분자의 패터닝이 작은 소수성 분자와 거의 동일한 방법으로 기판에 전달될 수 있다. 금 및 MPTMS-개질된 산화규소 기판 모두에서 AFM 팁으로부터 표면으로의 DNA 이동은, 금에서의 알칸티올 (문헌 [D. A. Weinberger et al., Adv. Mater., 12, 1600 (2000)] 참조) 및 규소 및 갈륨 아르세니드에서의 실라잔 (문헌 [Maynor et al., Langmuir, 17, 2575 (2001)] 참조)에 대해 관찰된 것과 마찬가지로 이론상 예측된 접촉 시간에 대해 패터닝된 영역에서 동일하게 선형 증가하였다 (문헌 [J. Jang et al., J. Chem. Phys., 115, 2721 (2001)] 참조) (도 12 및 13 A,B). 각 잉크-기판 쌍에 대해 속도 상수가 다를 수는 있지만, 이런 결과는 제어 DPN 인쇄에 의해 작은 분자 및 염에서부터 유기 거대분자 범위의 화합물을 다양한 기판상에 패터닝하는 것이 가능하다는 것을 분명히 보여준다.

<151> 실시예 5

<152> 금 및 산화규소 모두에서, DNA의 이동 속도 및 패터닝 크기가 신중한 습도 제어에 맞춰질 수 있다. 따라서, 피처 크기를 적합한 시간 규모에서 매우 큰 범위로 다양화하는 것이 가능하다. 예를 들어, 금에서 10 초 동안 AFM 팁을 유지하여 생성되는 스팟의 직경은 15 %의 상대 습도 변화에 대해 50 내지 300 nm로 달라진다 (도 13 C 및 도 14 참조). 이러한 습도 의존성은 일반적으로, 대개는 팁과 기판 사이의 물 메니스커스에 좌우되는 AFM 으로부터 표면으로 DNA의 이동에 대한 메카니즘을 나타내는 것이다 (예를 들어, 문헌 [Piner et al., Languir,

15,5457 (1999)] 참조).

<153> 실시예 6

<154> 다중-DNA 충전 능력을 증명하기 위해서, DPN 인쇄를 이용하여 산화된 실리콘 기관 상에 2-성분 DNA 어레이를 제조하고, 상보적인 형광발색단-표지된 프로브로 혼성화하여 그의 서열 특이적 활성을 입증하였다 (도 15 및 16). 패턴의 화학 일체성을 더 입증하기 위해, 동일한 칩을 탈이온수로 처리하여 형광발색단-표지된 DNA를 제거하고, 이후 5 및 13 nm 직경의 금 나노입자의 혼합물을 함유한 용액에 노출시켰다. 큰 입자 및 작은 입자는 각각 제1 및 제2 패턴에 상보적인 DNA로 개질되었다. 입자들은 적합한 혼성화 조건하에서 정확한 패턴으로 선택적으로 조립되었다. 이 실험은 나노입자가 AFM계 스크리닝 과정에서 진단용 프로브로 사용되는 방법 뿐만 아니라 나노구조가 직접 기입 DPN 법에 의해 형성되어 나노입자계 구조의 조립을 제어 및 제작하는 방법을 보여준다.

도면의 간단한 설명

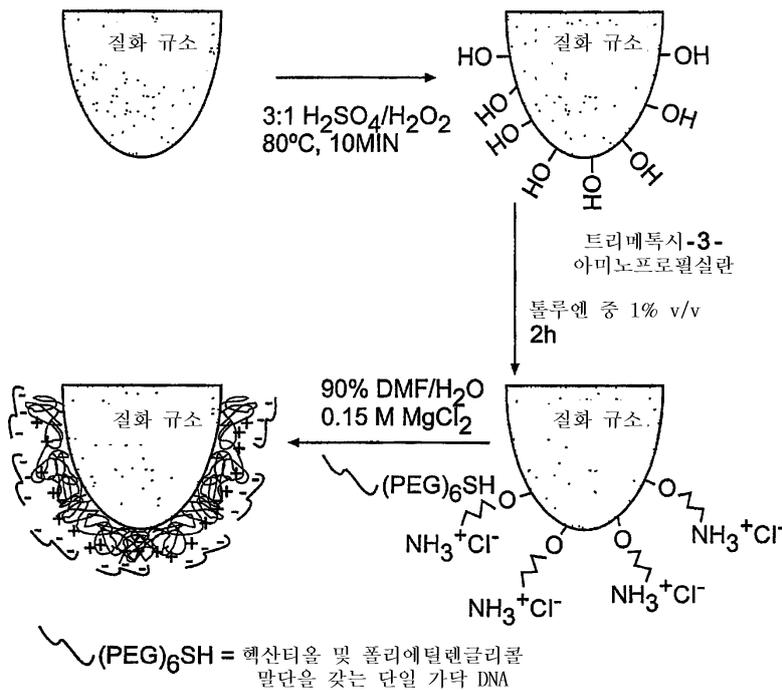
- <21> 도 1은 핵산티올 및 폴리에틸렌 글리콜 말단을 갖는 단일 가닥 DNA로 질화규소 팁을 코팅하는 것을 도시한다.
- <22> 도 2는 나노규모 피쳐 상으로의 직접 입자 조립을 위해 DNA 상보적인 링커 가닥을 사용하는 것을 도시한다. 입자 조립은 비상보적인 링커 가닥 또는 링커 무함유 가닥을 사용하는 경우에는 일어나지 않는다.
- <23> 도 3은 환형 디설피드 개질된 DNA를 코팅된 AFM 팁으로부터 금 기관으로 전달하는 것을 도시한다.
- <24> 도 4는 DNA 패턴의 측면 현미경 이미지를 도시한다. DNA 패턴 크기의 조절은 대기 조절 챔버의 상대 습도를 변화시킴으로써 달성되었다.
- <25> 도 5는 DPN을 통해 금 상에 생성된 DNA 패턴 (라인) 및 특정 DNA 혼성화 상호작용을 통해 상기 패턴 상에 조립된 13 nm 금 나노입자에 대한 탭핑 모드 (tapping mode) AFM 이미지를 도시한다.
- <26> 도 6은 DPN 인쇄에 의한 금 기관 상으로의 DNA의 직접 전달을 도시한다. (A) 다결정질 금 상에 패턴화된 핵산티올 개질된 올리고뉴클레오티드의 탭핑 모드 AFM 이미지. 척도 막대는 2 마이크로를 나타내고, 화살표 사이의 간격은 150 nm이다. (B) 상보적인 연결 DNA의 존재하에 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 염기 쌍에 의해 금 상의 고해상도 DNA 라인에 결합된 단일 올리고뉴클레오티드 개질된 금 나노입자 (직경 13 nm)의 탭핑 모드 AFM 이미지. 척도 막대는 1 마이크로를 나타낸다.
- <27> 도 7은 패턴화된 DNA에 상보적이지 않은 24-염기 링커 서열에 미리 혼성화된 올리고뉴클레오티드 개질된 금 나노입자 (직경 13 nm)에 노출시킨 후 다결정질 금 상에서 패턴화된 핵산티올 개질된 올리고뉴클레오티드의 탭핑 모드 AFM 상 이미지를 도시한다.
- <28> 도 8은 DPN 인쇄를 통한 다결정질 금 기관 상으로의 핵산티올 개질된 올리고뉴클레오티드의 직접 전달을 도시한다. (A) ODT 처리 후 패턴화된 표면의 측면 원자현미경 사진, (B) ODT 처리 후 DNA 패턴의 탭핑 모드 AFM 이미지.
- <29> 도 9는 (A) 상보적인 연결 DNA, L1의 존재하에 왓슨-크릭 염기 쌍을 통한 금 상의 C1의 DNA 라인 (폭 50 nm)에 결합된 단일 G1 개질된 금 나노입자 (직경 13 nm), 및 (B) L1의 존재하에 혼성화를 통해 두꺼운 DNA 라인에 결합된 G1 개질된 금 나노입자의 탭핑 모드 AFM 이미지를 도시한다.
- <30> 도 10은 절연 기관 상으로의 DNA의 직접 DPN 전달을 도시한다. (A) SiO_x 표면 상의 상보적인 올리고뉴클레오티드의 DPN에 의해 생성된 패턴에 혼성화된 형광발색단-표지된 DNA (오레곤 그린 (Oregon Green) 488-X)의 형광 현미경 사진. 척도 막대는 12 마이크로를 나타낸다. (B) 형광발색단-표지된 DNA의 제거 (탈이온수 이용) 후 제2 고해상도 패턴에 혼성화된 올리고뉴클레오티드 개질된 금 나노입자 (직경 13 nm)의 탭핑 모드 AFM 이미지. 척도 막대는 1.5 마이크로를 나타내고, 화살표 사이의 간격은 100 nm이다.
- <31> 도 11은 SiO_x 기관의 DPN 인쇄의 관능화에 대한 계략도를 도시한다. (A) 규소 웨이퍼를 3-머캅토프로필트리메톡시실란으로 처리하고, (B) DNA 코팅된 AFM 팁을 (수초 동안) 기관과 간단히 접촉시켜 아크릴아미드 개질된 DNA를 기관에 전달한다.
- <32> 도 12는 침착된 DNA 피쳐 크기에 대한 DPN 인쇄의 조절을 도시한다. (A) 상대 습도 45%에서 상이한 팁 접촉 시간 동안 금 기관 상에 침착된 티올 개질된 DNA의 탭핑 모드 AFM 이미지. (B) 스팟 직경 (상기 (A)로부터, 2

회 실험) 대 접촉 시간의 제곱근의 플롯. 오차 막대는 5개 이상의 점의 표준 편차로부터 계산하였다.

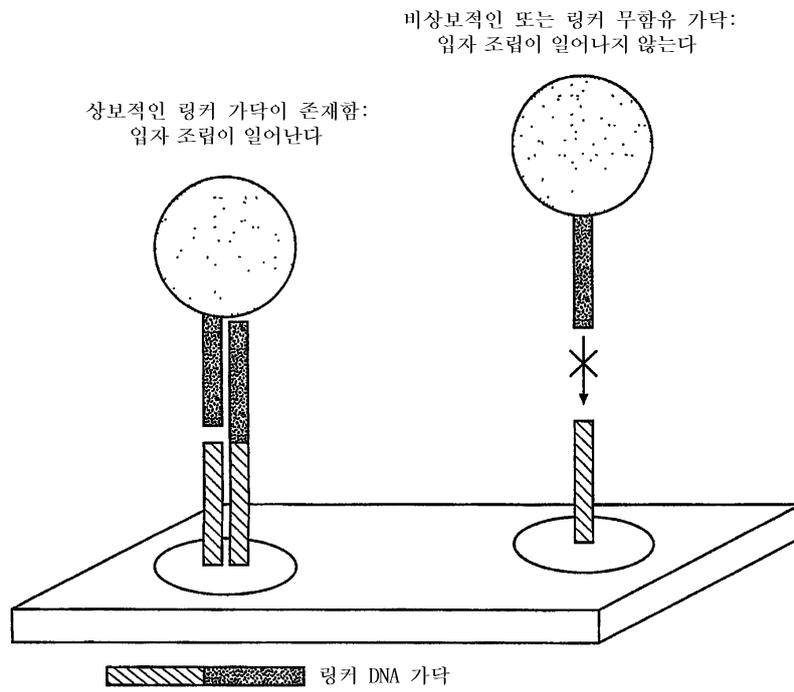
- <33> 도 13은 침착된 피쳐 크기에 대한 DPN 인쇄의 조절을 추가로 도시한다. (A) 상대 습도 45%에서 상이한 팁 접촉 시간 동안 금 기관 상에 찍힌 티올 개질된 DNA의 탭핑 모드 AFM 이미지 (위), 및 도트 직경 대 접촉 시간의 제곱근의 플롯 (아래). (B) 상대 습도 45%에서 상이한 접촉 시간 동안 SiO_x 상에 형성된 DNA 스팟에 혼성화된 나노입자의 탭핑 모드 AFM 이미지 (위), 및 도트 직경 대 접촉 시간의 제곱근의 플롯 (아래). (A) 및 (B)에 대한 척도 막대는 2 마이크로를 나타낸다. (C) 다양한 상대 습도에서 10초/스팟의 접촉 시간하에 다결정질 Au 상에 생성된 DNA 스팟의 탭핑 모드 AFM 이미지 (위), 및 스팟 직경 대 상대 습도의 플롯 (아래). 척도 막대는 1 마이크로를 나타낸다. 모든 플롯에 대한 오차 막대는 5개 이상의 점의 표준 편차로부터 계산하였다.
- <34> 도 14는 DNA 전달물의 습도 의존성을 도시한다. (A) 30 내지 46%의 상대 습도 (RH)에서 (아래에서 위로) 10초/스팟의 접촉 시간하에 다결정질 Au 상에 생성된 DNA 스팟의 탭핑 모드 AFM 이미지; (B) 50 내지 80%의 상대 습도 (RH)에서 (아래에서 위로) 10초/스팟의 접촉 시간하에 생성된 DNA 스팟에 혼성화된 13 nm 금 입자의 탭핑 모드 AFM 이미지; (C) 상기 (A) 및 (B)에서 점에 대한 스팟 직경 대 상대 습도.
- <35> 도 15는 DPN 인쇄에 의한 다중-DNA 잉크의 직접 패터닝을 도시한다. (A) DPN 인쇄에 의해 SiO_x 기관 상에 침착된 2-서열 어레이에 동시에 혼성화된 2개의 상이한 형광발색단-표지된 서열 (오레곤 그린 488-X 및 텍사스 레드-X (Texas Red-X))의 조합된 적색-녹색 형광 이미지. (B) 형광발색단-표지된 DNA의 탈혼성화 후 동일한 패턴 상에 조립된 직경 5 nm (어두움) 및 직경 13 nm (밝음) 금 나노입자의 탭핑 모드 AFM 이미지. 척도 막대는 4 마이크로를 나타낸다. (C) 라인 플롯은 두 나노입자 패턴으로부터 대각선으로 취하였고, (B)에서 시작 및 끝은 화살표로 나타내어진다. 척도 막대는 4 마이크로를 나타낸다.
- <36> 도 16은 패터닝된 금 기관의 AFM 이미지를 도시한다. (A) ODT 패시베이션 후 DNA 패턴의 탭핑 모드 AFM 이미지, C1 (사각형 도트 어레이) 및 C2 (삼각형 도트 어레이)의 탭핑 모드 AFM 이미지. (B) 각각 L1 및 L2의 존재하에 C1 및 C2 DNA 패턴에 선택적으로 혼성화된 직경 13 nm 및 직경 30 nm 금 나노입자의 탭핑 모드 AFM 이미지. (C) 직경 13 nm 및 직경 30 nm 입자에 혼성화된 후 상기 (A)에서의 패턴을 가로지르는 높이 프로파일을 보여주는 라인 스캔.

도면

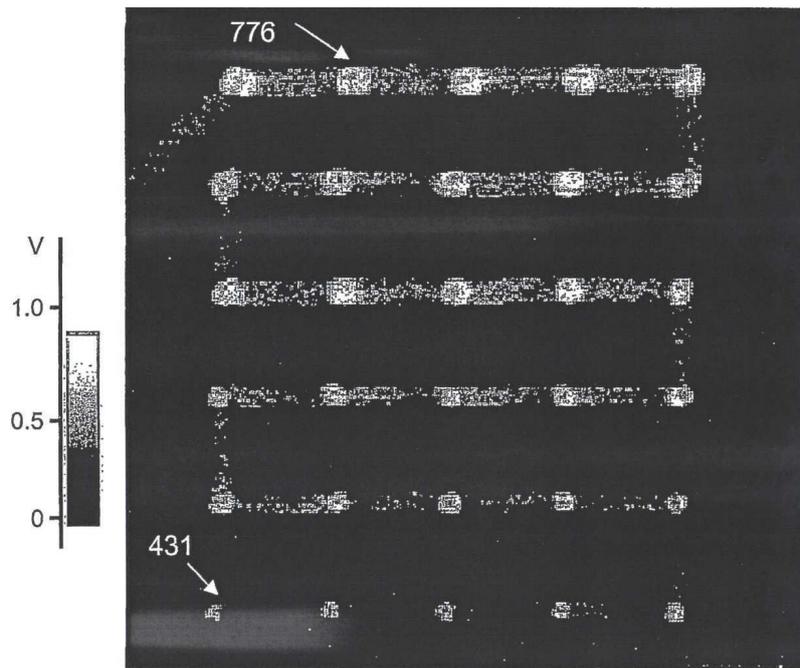
도면1



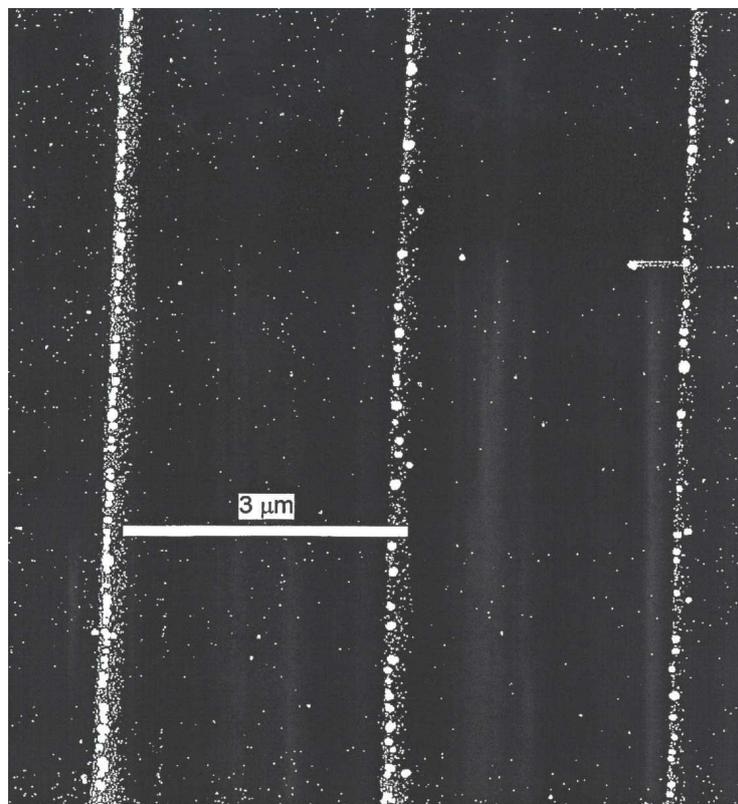
도면2



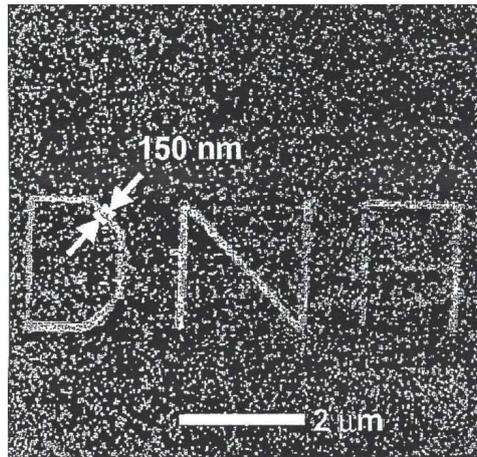
도면4



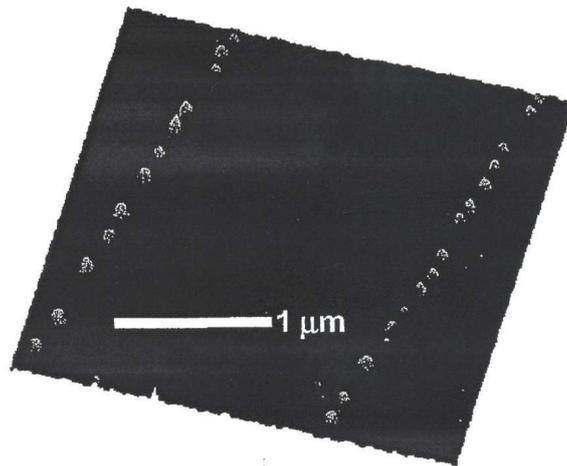
도면5



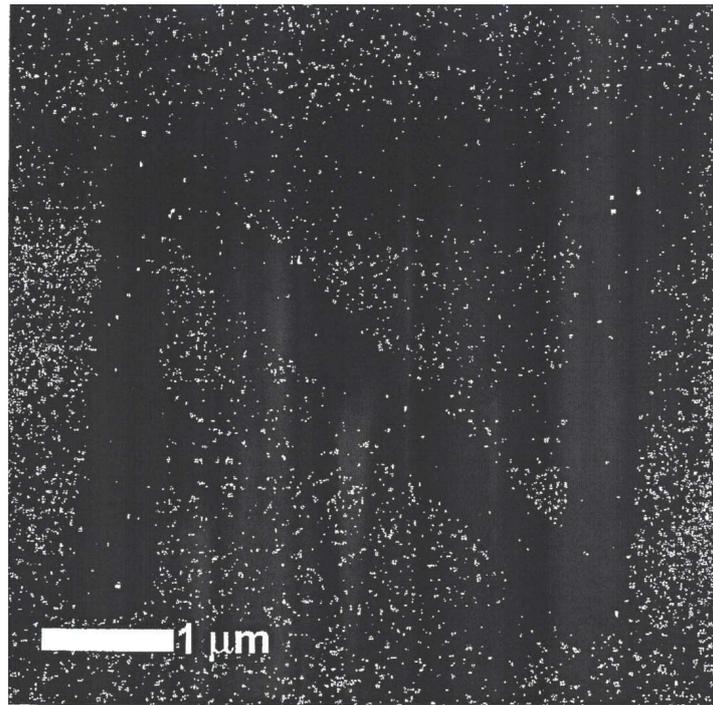
도면6A



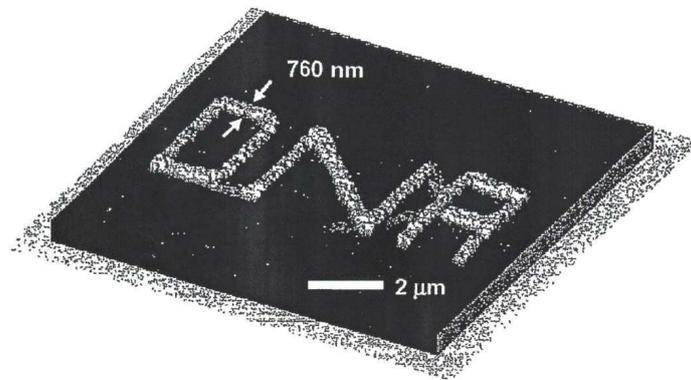
도면6B



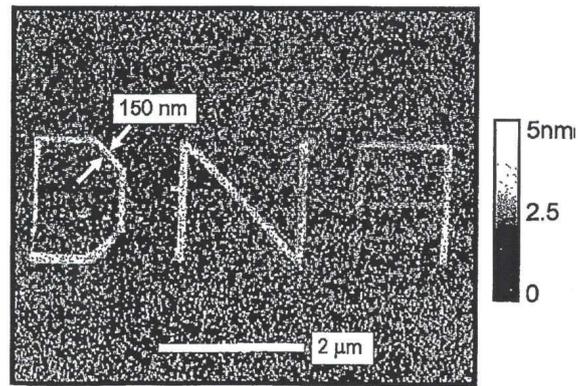
도면7



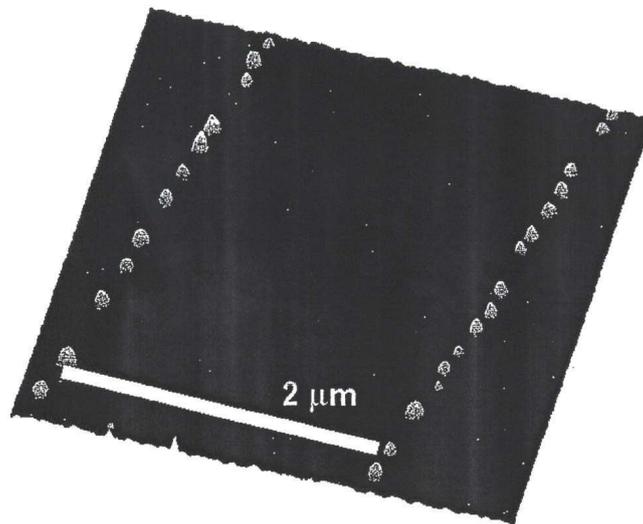
도면8A



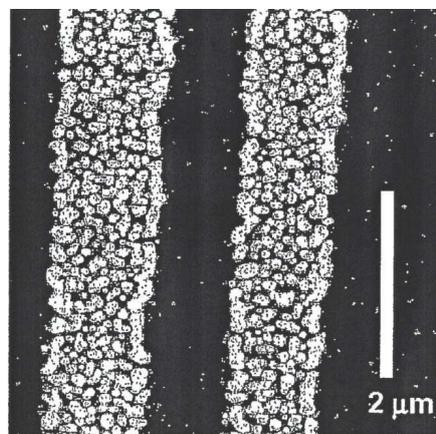
도면8B



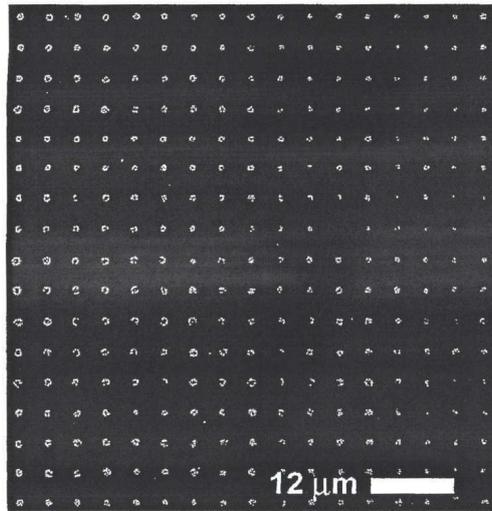
도면9A



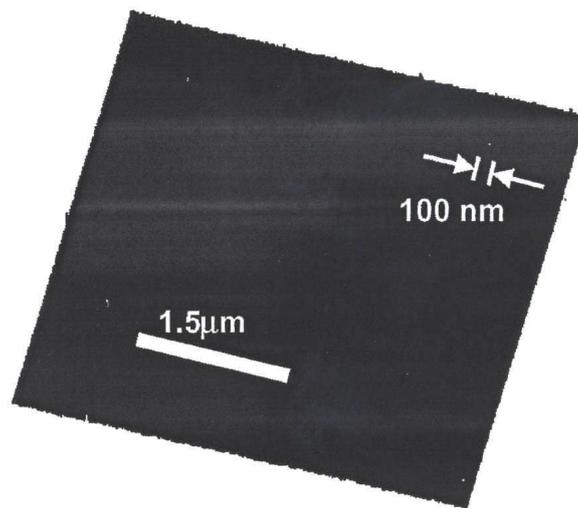
도면9B



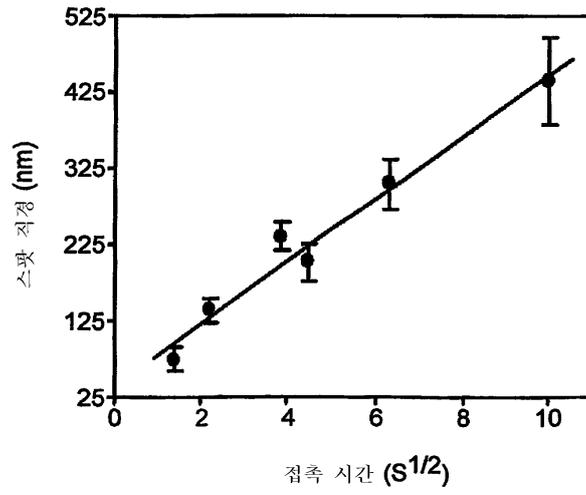
도면10A



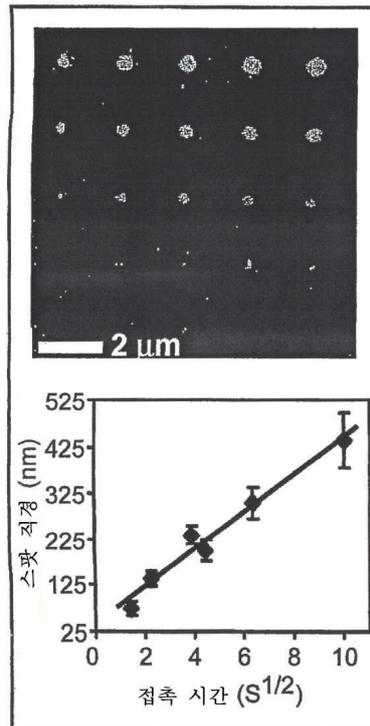
도면10B



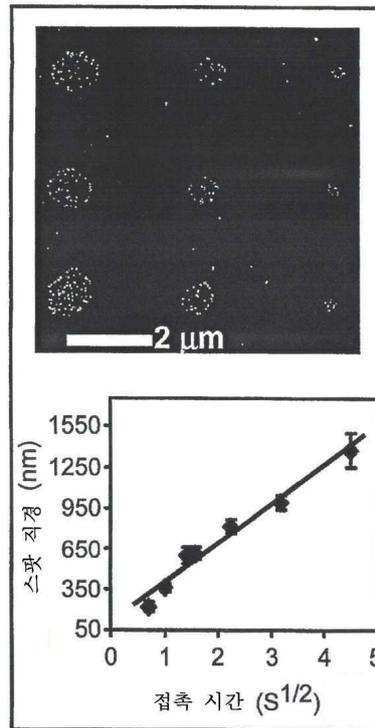
도면12B



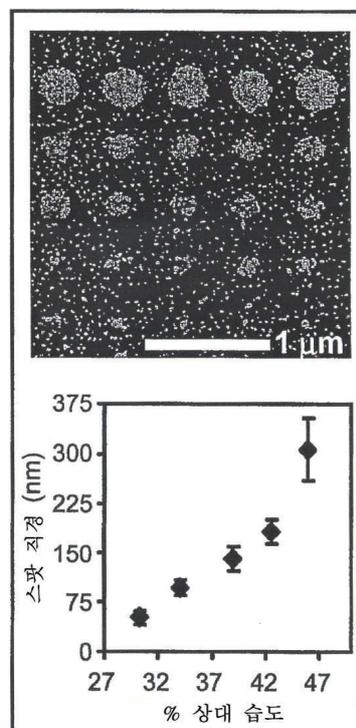
도면13A



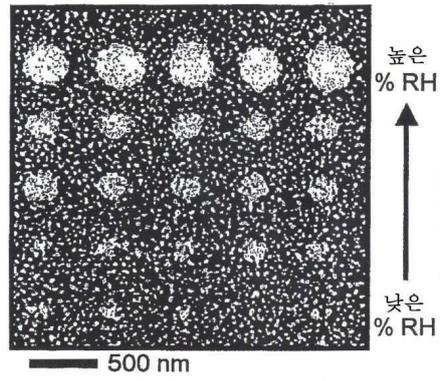
도면13B



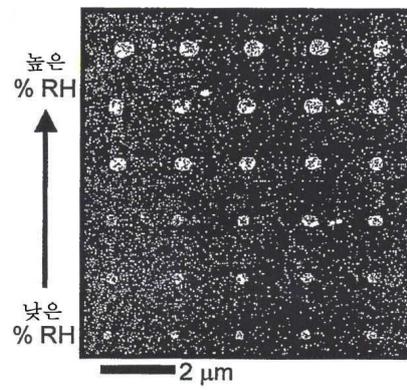
도면13C



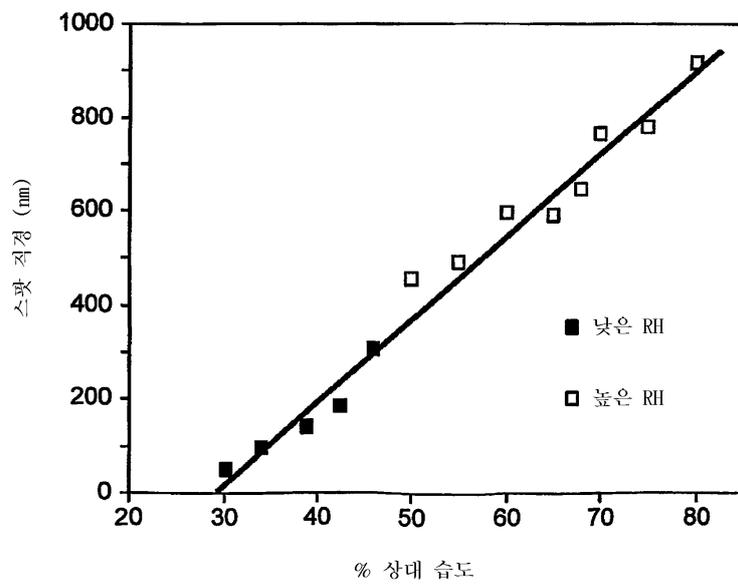
도면14A



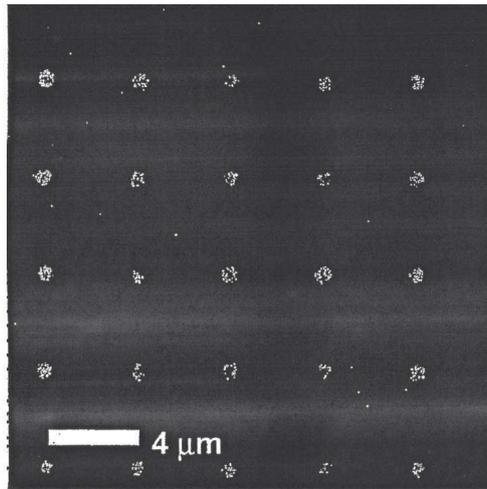
도면14B



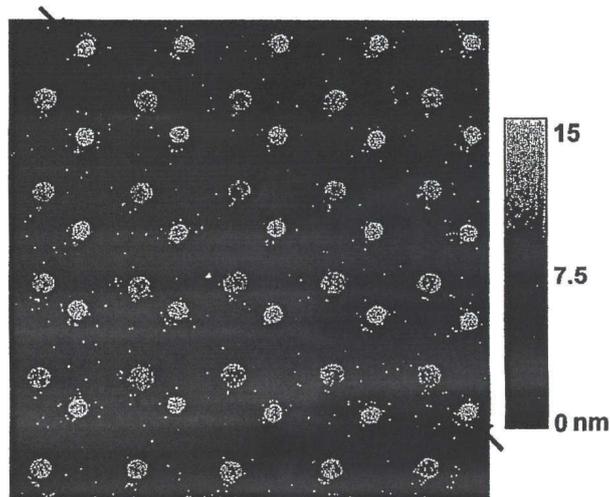
도면14C



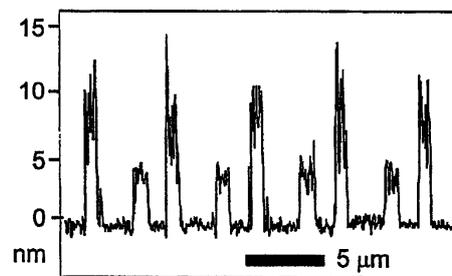
도면15A



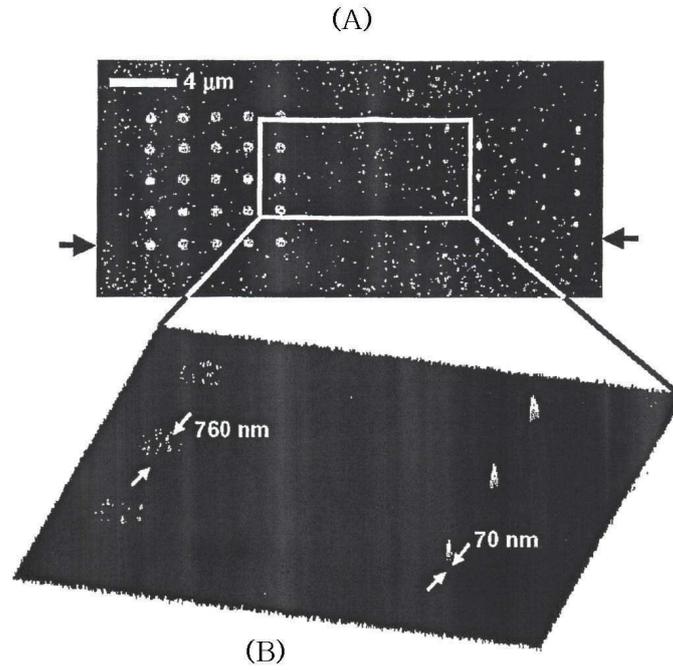
도면15B



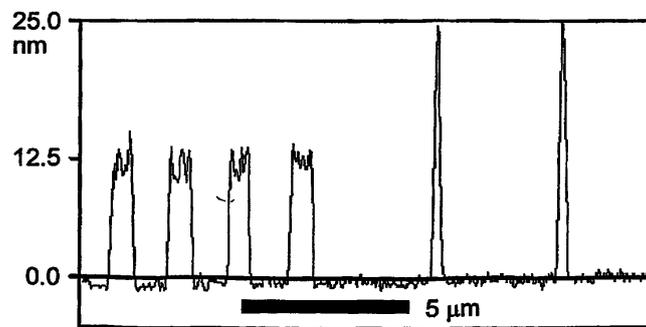
도면15C



도면16A



도면16C



서열 목록

<110> MIRKIN, CHAD A.
DEMERS, LINETTE
GINGER, DAVID S.

<120> DIRECT WRITE NANOLITHOGRAPHIC DEPOSITION OF NUCLEIC
ACIDS FROM NANOSCOPIC TIPS

<130> 083847/0147

<140> 10/307,515
<141> 2002-12-02

<150> 60/337,598
<151> 2001-11-30

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 1
gaggattat tgta 15

<210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 2
agtcgcttct accat 15

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 3
agagttgagc tataacaata atccctc 27

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 4
agagttgagc taatggtaga agcgact 27

<210> 5
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 5
tagctcaact ctaaaaaaaaa aaaaaaaaa aa 32

<210> 6
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 6
atccttatca atatt 15

<210> 7
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 7
 cgattcagg at 12

<210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 8
 ggattattgt taaatattga taaggat 27

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 9
 tacgattga gaatcctgaa tgcg 24

<210> 10
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 10
 ggattattgt taaat 15

<210> 11
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 11
 tacgagttga ga 12

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 12
 tctcaactcg taaaaaaaaa aa 22

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 13
 taacaataat ccaaaaaaaaa aa 22

