[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12Q 1/68

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410095166.2

[43] 公开日 2005 年 8 月 31 日

[11] 公开号 CN 1661105A

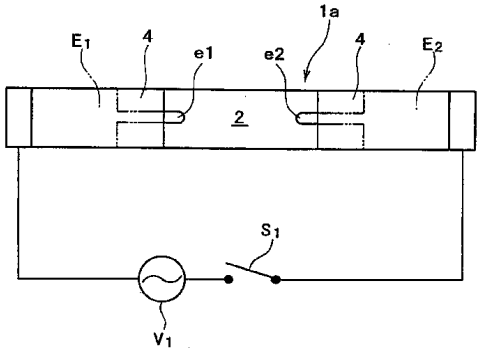
[22] 申请日 2004.9.30
[21] 申请号 200410095166.2
[30] 优先权
[32] 2003.10.2 [33] JP [31] 2003 - 343955
[71] 申请人 索尼株式会社
地址 日本东京
共同申请人 索尼国际（欧洲）股份有限公司
[72] 发明人 濑川雄司
[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 包于俊

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 13 页

[54] 发明名称 检测物质之间相互作用的装置及带该装置的生物测定基片

[57] 摘要

公开了检测物质之间相互作用的装置，含有该检测装置的生物测定基片，以及制造该检测装置的方法。 检测装置包括：提供物质之间相互作用例如杂交场所的反应区，互相相对设置的对置电极，以便对包含在反应区的介质例如水溶液或凝胶施加电场，组成对置电极的每个电极都具有向反应区凸起的凸起电极部分。



ISSN1008-4274

1. 一种检测物质之间相互作用的装置，其特征在于，所述装置包括：

提供所述物质间发生所述相互作用的场所的反应区；和

相对设置的对置电极，以便对包含在所述反应区的介质施加电场；

组成所述对置电极的每个电极具有向所述反应区凸起的形状。

2. 如权利要求 1 所述的检测物质之间相互作用的装置，其特征在于，所述的对置电极按照预定的间隔排列。

3. 如权利要求 1 所述的检测物质之间相互作用的装置，其特征在于，对所述对置电极施加交流电场。

4. 如权利要求 3 所述的检测物质之间相互作用的装置，其特征在于，所述对置电极的末端部分作为检测用核苷链的固定部分。

5. 如权利要求 1 所述的检测物质之间相互作用的装置，其特征在于，所述相互作用是杂交。

6. 一种含有相互作用检测装置的生物测定基片，其特征在于，所述基片包括：

提供所述物质间发生所述相互作用的场所的反应区；和

相对设置的对置电极，以便对包含在所述反应区的介质施加电场；

组成所述对置电极的每个电极具有向所述反应区凸起的形状。

7. 一种制造相互作用检测装置的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

在基片上形成由预设的凸起电极图案组成的电极层；

在所述电极层上层压光敏树脂层；

用树脂层和电极层作为掩模进行干蚀刻；和

在凸起电极部分较低的一侧进行湿蚀刻以形成凸起电极。

检测物质之间相互作用的装置及带该装置的生物测定基片

背景技术

本发明涉及在反应区中排列对置电极以提供物质之间相互作用的场所的技术，以及通过施加预定电场从而控制物质的高位结构、物质的迁移、物质的固定、非必要物质的去除等。

在此描述本发明涉及的主要的背景技术。首先，第一个技术（相关技术）是关于所谓的DNA芯片或DNA微阵列（下文中通常称DNA芯片）的生物测定整合物质，其中通过微阵列技术排列事先测定的DNA（见日本公开专利No.Hei 4-505763和WO98/503841）。

DNA芯片技术采用的结构是，不同种类和多样性的DNA寡链，cDNA（互补DNAs）和类似物整合到玻璃基片上或硅基片上，其特征是可以进行分子之间作用例如杂交的综合分析。因此，DNA芯片已用于分析基因的变异，SNPs（单核苷多肽性）分析，基因表达频率分析等，也广泛的用于药物发展，临床诊断，药理学的基因组，法医学和其他领域。除了DNA芯片，也发展了蛋白芯片，包括基片上的蛋白，分析各种物质之间相互作用的生物传感器芯片，等等。

第二个背景技术是关于电场对处于液相带电状态下的物质的作用。具体的是，已知核苷链（核酸分子）在液相电场的作用下的扩展或迁移。这种现象的原理如下。磷酸盐离子（负电荷）构成核苷链的骨架，水离子化产生的氢原子（正电荷）在磷酸盐离子周围形成离子雾，负电荷和正电荷产生的极化载体（偶极）作为一个整体排列成一个方向，在此之上运用高频率的高电压，导致核苷链的延伸，另外，当施加电力线集中在一部分的非均匀电场时，核苷链移向电力线集中的部分（见Seiichi Suzuki, Takeshi Yamanashi, Shin-ichi tazawa, Osamu Kurosawa 和Masao Washizu: “使用荧光各向异性在稳定的AC电场中定量分析DNA的静电定位”, 工业应用的IEEE学报，Vol.34, No.1, pp.75-83(1998)）。除此之外，已知DNA溶液放置在间隔为几十到几百微米的电极下，其中施加约1MV/m和1MHz的高频率电场，以随意盘绕的形式存在的DNA发生电介质极化，导致DNA分子

扩展成与电场平行的直线形式。然后通过称作“双向电泳”的电力学效应，极化的 DNA 自发的牵引到电极端，以一端与电极边缘接触的形式固定（见 Masao Washizu, “DNA handling conducted while viewing”, Visualized Information, Vol.20, No.76(1 月，2000)）。

上述的 DNA 芯片技术是将提供介质中物质相互作用场所的反应区预先设置在基片上，检测核苷链例如探针 DNA 预先固定在反应区，分析杂交，杂交是检测核苷链及其互补的靶核苷链之间的相互作用。

然而，DNA 芯片技术存在以下问题：（1）固定的检测核苷链显示出一种高级结构，在这种高级结构中，核苷链在布朗运动的作用下以随意盘绕的形式缠绕或卷曲；（2）固定的检测核苷链与周围表面发生的干扰作用（例如，黏附或接触）；（3）固定物表面的检测核苷链的整体密度有偏差；和（4）在固定的检测核苷链附近存在非互补核苷链和剩余嵌入剂。

迄今为止，不可能解决这些问题。所以在杂交时，由于核苷链的高级结构或非互补核苷链会产生位阻。因此，DNA 芯片技术中的技术问题是杂交效率低，完成反应耗时长，产生假阳性和假阴性，导致检测的准确性降低。

发明概述

因而，本发明的一个目的就是提供一种检测装置，可以用于自由地控制物质的高级结构，物质的迁移，物质的固定，非必要物质的去除等，和带有该装置的生物测定基片。

本发明的一个方面是提供一种检测物质之间相互作用的装置，包括：

提供物质间相互作用的场所的反应区；和

相对配置的对置电极以便可对反应区内的介质施加电场；

其中，组成对置电极的每一个电极具有向反应区凸起的形式。

本发明的另一个方面是提供一种带有相互作用检测装置的生物测定基片，包括:

提供物质间相互作用的场所的反应区；和

相对设置的对置电极以便可对反应区内的介质施加电场；

其中，组成对置电极的每一个电极都具有向反应区凸起的形状。

本发明的另一个方面是提供一种相互作用检测装置的制造方法，包括以下步骤:

在基片上形成由预先设定的凸起电极图案组成的电极层；

在电极层上层压光敏树脂层；

用树脂层和电极层作为掩模进行干蚀刻；和

在凸起电极部分较低的一侧进行湿蚀刻以形成凸起电极。

本发明中，检测核苷，例如DNA探针或靶核苷链的高级结构，在所施加的电场的作用下，可以从随意盘绕的形式变为伸展状态，从而可以避免相互作用时，例如杂交作用时的位阻。在电场的作用下，可以在电极表面排列和固定检测物质，可以促进表面上的检测物质和靶物质的浓集。通过这些影响，提高了相互作用的效率和准确性，从而缩短了操作时间，并且由于抑制了假阳性或假阴性的产生，提高了检测的准确性。

本发明保证检测装置中的相互作用如杂交的高效率，所以可能大大缩短相互作用所需的时间。除此之外，因为可以形成一个环境保证过程简单、高准确度的相互作用的进行，所以可以抑制假阳性或假阴性的产生。因此，本发明可以用于生物测定基片例如 DNA 芯片，它具有如下特性：检测相互作用的分析操作效率优异，检测准确性高。

虽然使用术语描述本发明的优选实施例，但这种描述仅仅是解释目的，应当明白在不偏离下述权利要求的精神和范围的条件下，可以作出改变和修改。

附图的简单描述

下面的说明书和附加的权利要求，结合附图使得本发明的上述的和其他的目的，特征和优点很清楚，其中：

附图1是俯视图，示意性的显示本发明的检测物质之间相互作用的装置的基本构造；

附图2是俯视图，示意性的显示本发明的检测装置的改进构造；

附图3是沿着附图2中箭头I-I的剖面图；

附图4是沿着附图3中箭头I-I的对置电极的平面图；

附图5是平面图，所示的是改进的检测装置中的对置电极的组成构造；

附图6是举例说明使用本发明检测装置检测相互作用的步骤的图表（图表显示的是DNA探针固定步骤）

附图7是举例说明使用本发明检测装置检测相互作用的步骤的图表（图表显示的是靶DNA延伸和退火步骤）；

附图 8 显示的是带有交叉电极的检测装置的构造；

附图 9 是举例说明本发明所述检测装置的制造方法的图表（层压电极层的阶段）；

附图 10 是举例说明本发明所述检测装置的制造方法的图表（层压树脂层的阶段）；

附图 11 是举例说明本发明所述检测装置的制造方法的图表（干蚀刻阶段）；

附图 12 是举例说明本发明所述检测装置的制造方法的图表（软蚀刻阶段）；

附图 13 所示的是一个圆盘状的基片的例子，其上面带有本发明的检测装置。

优选实施例的详细说明

首先，定义本发明所使用的总的技术术语。本发明使用的术语“相互作用”广义指包括非共价连接，共价连接和氢键的化学连接和物质直接的解离，还包括例如核酸（核苷链）互补作用的杂交。

其次，术语“对置电极”指的是至少一对相对排列的电极。

术语“核苷链”指的是核苷磷酸酯的聚合物，其中嘌呤或嘧啶碱基和糖通过糖苷键连接，广义的包括寡核苷，包括探针 DNAs，聚核苷，嘌呤核苷和嘧啶核苷缩聚形成的 DNAs（全长或其中的一部分），反转录获得的 cDNAs（c 探针 DNAs），RNAs，聚酰胺核苷衍生物（PNAs）等。

术语“杂交”指的是具有互补碱基序列结构的核苷链之间的互补链（双链）形成反应。术语“杂交错误”指的是不正常的互补链形成反应。

术语“反应区”指的是可以为杂交或其他相互作用提供反应场所的区域，例如包括可以保存或容纳介质例如液相和凝胶的孔状的反应场所。反应区进行的相互作用并无严密限制，只要符合本发明的物质和效果的相互作用都包括在内。相互作用的例子不仅包括单链核苷酸之间的相互作用，也就是杂交，也包括肽（或蛋白）和检测核苷酸中的所想要得到的核苷酸之间的相互作用，酶反应和其他分子之间相互作用。例如使用双链核苷酸，可以分析激素受体或类似的转录因子与反应序列 DNA 部分或类似物之间的连接。

术语“检测物质”是预先加入到反应区中的物质，在反应区中处于游离的状态，或以固定在反应区的预定表面区域的状态存在的物质。检测物质是捕获和检测与物质显示特异性作用的物质，包括检测核苷链例如 DNA 探针。

术语“目标物质”指的是作为与检测物质相互作用的目标的物质，例如包括

具有与DNA探针互补的碱基序列的核苷链。

术语“位阻”指的是由于在反应中心附近存在巨大的构成基团，反应分子的姿势，或立体结构（高级结构）而引起的现象，介质类分子进入很难，因此，很难进行所需要的反应（在本发明中指杂交）。

术语“双向电泳”是非均一电场中分子被牵引到更高电场一边的现象。使用AC 电压，极化作用的极性伴随着施加的电压的极性的反转而逆转，所以在 DC 时获得相同方式的牵引效果（见“微机和材料技术（由 CMC Publishing Co.出版）”在 Teru Hayashi 监督下的应用， pp.37-46，第 5 章， 细胞和 DNA 操作）。

术语“生物测定基片”指的是用于生化或分子生物学分析的信息整合基片，包括所谓的 DNA 芯片。

现在，下面将参考附图描述本发明的优选实施例。首先，附图 1 是俯视图，示意性的显示本发明所述的检测物质之间相互作用的装置（在此简称“检测装置”）的基本构造。

附图 1 中的符号 1a 表示本发明所述的检测装置的一个最基本的例子的必需部分。检测装置 1a 在基片上形成（见附图 3 中的符号 3），是设计用来检测物质之间相互作用的部分，基片是由例如玻璃、合成树脂或类似物形成的。

检测装置 1a 和其它检测装置 1b（附图 2），1c（附图 5），1d（附图 8）每一种都带有反应区 2，它具有预定的容量，能够保存或存储介质，例如水溶液和凝胶，这些介质作为物质之间相互作用的场所。一对对置电极 E_1,E_2 相对的放置在反应区 2 的两边。

对置电极 E_1,E_2 由例如金，铝的金属或由不是金属的导电体构成；例如，可以由透明导电体 ITO（铟锡氧化物）构成。顺便提及，通过将开关 S_1 转向“ON”，对置电极 E_1，E_2 就与 V_1 所表示的电源连接。

每个对置电极 E_1,E_2 都形成为向反应区 2 凸起的形状，包括互相相对设置的针状或棒状的凸起电极部分 e1 和 e2。

对置电极 E_1,E_2 面对反应区 2 的每个表面都覆盖着绝缘层（未示出），绝缘层防止保存在反应区 2 中的离子溶液的电化学反应。形成绝缘层的材料例如 SiO_2，SiN，SiOC，SiOF，SiC，TiO_2 等。

附图 2 是俯视图，示意性的显示本发明的检测装置的改进构造。检测装置 1b 代表改进形式，包括对置电极 E_{11},E_{21}。在检测装置 1b 的结构中，上文所述的对置

电极 E_1,E_2 按照预定的规则间隔分别排列。因此，许多对（图中是 6 对）凸起电极部分 e1,e2 互相对置在检测装置 1b 的反应区 2。

顺便提及，虽然图中未显示，组成电极 E_{11} 的凸起电极部分 e1 和组成电极 E_{21} 的凸起电极部分 e2 并非必需按常规间隔排列，此间隔可以任意选择。另外，还可以采用下述结构，一边的凸起电极部分的数量远大于另一边的凸起电极部分的数量，或者一边单位长度中凸起电极部分的密度远高于另一边单位长度中凸起电极部分的密度。凸起电极部分密度较高的这边电力线更集中。

接下来，附图 3 是沿着附图 2 中箭头 I-I 的剖面图。如附图 3 所示，对置电极 E_{11} 和 E_{21} 与由玻璃、合成树脂等物质形成的基片 3 紧密接触。如图所示，对置电极 E_{11} 和 E_{21} 上形成无机材料例如 SiO_2 或聚酰亚胺合成树脂层，或类似物。

反应区 2 可以是一个凹陷部分，上表面开放，如图 3 所示。从喷嘴 N 或置于上表面的类似装置将水溶液或类似溶液注入到反应区 2 中，溶液含有检测物质 D，如 DNA 探针和与检测物质 D 发生相互作用的靶物质 T，如图中所示意的。

附图 4 是沿着附图 3 中箭头 II-II 的对置电极 E_{11},E_{21} 的平面图。凸起电极部分 e1,e2 的宽度（和厚度）W_1 可以设置为，例如 0.5μm，凸起电极部分 e1 和 e1（或 e2 和 e2）之间的间隔 W_2 可以设置为，例如约 1-10μm。除了 W_1 和 W_2，凸起电极部分 e1,e2 的长度 W_3 和反应区 2 的深度 W_4（见附图 3）可以根据检测介质 D 和要检测的靶物质 T 的分子长度来决定。

附图 5 是检测装置 1c 中对置电极 E_{11},E_{21} 的构造平面图，1c 代表另一种改进结构的实例。对置电极 E_{11},E_{21} 的凸起电极部分 e11,e21 是三角形的形状。所以，本发明的凸起电极部分可以是任意形状，只要电力线容易在其形状边缘集中。

现在，参考附图 6 和 7 来描述通过使用本发明所述的检测装置检测物质之间相互作用的步骤，以附图 1 所示的检测装置 1a 中的电极 E_1 的行为作为代表性实例。顺便提及，虽然在这个实例中，将杂交看作物质之间的相互作用，但是相互作用并不仅限于杂交作用。

首先，通过喷嘴（见附图 3）将预定量的含有 DNA 探针 D_1 的水溶液注入到反应区 2，DNA 探针 D_1 是检测物质 D 的代表实例。接着，开关 S_1 转向 “ON”，从电源 V_1 施加 AC 电场。此处所施加的电场优选为，例如约 $1X10^6V/m$ 和 1MHz（见 Masao Washizu 和 Osamu Kurosawa : “微纤化结构的 DNA 的静电操作”, 工业应用的 IEEE 学报，Vol.26, No.26, pp.1165-1172(1990)）。顺便提及，所滴入的

DNA 探针 D_1 在布朗运动作用下呈现随意盘绕形式的高级结构。

通过施加电场，附图 6 中符号 D_1 所表示的摆动状态的 DNA 探针 D_1 在双向电泳的作用下向凸起电极部分 e1 的方向移动同时沿着 AC 电场伸展，最终，它的终末端部分固定到凸起电极部分 e1，电场 P 的电力线也在此处集中。随便提及，附图 6 中的符号 D_2 表示固定的 DNA 探针。

另外，当凸起电极部分 e1 的表面用链霉抗生物素蛋白处理过，在这种情况下，系统适用于固定生物素化的 DNA 探针的终末端。或者，当凸起电极部分 e1 的表面用巯基（SH）基团处理过，在这种情况下，系统适用于固定 DNA 探针，该探针是通过二硫键（-S-S-）对其终末端用巯基进行了修饰的 DNA 探针。

通过上述方法固定了 DNA 探针 D_1 之后，用预定的缓冲液（例如，磷酸盐缓冲液）冲洗装置，将多余的 DNA 探针以及与凸起电极部分 e1 的表面非特异性吸附的 DNA 探针移出反应区 2。

接下来，含有靶 DNA 的溶液注入到反应区 2，如附图 3 所示的靶物质 T 是靶 DNA 的代表实例。然后，附图 1 中的开关 S_1 转向“ON”施加 AC 电场。这种情况下的电场条件也优选为，例如约 $1X10^6V/m$ 和 1MHz（见 Masao Washizu 和 Osamu Kurosawa：“微纤化结构的 DNA 的静电操作”，工业应用的 IEEE 学报，Vol.26, No.26, pp.1165-1172(1990)）。

通过施加电场，附图 7 中符号 T_1 表示的靶 DNA 也在双向电泳的作用下向凸起电极部分 e1 的方向移动同时沿着 AC 电场伸展，最终，它移动到凸起电极部分 e1 的附近，电场 P 的电力线也在此处集中。顺便提及，含有靶 DNA 的溶液注入反应区 2 时，能过选择性的插入并与双链部分连接的嵌入剂也同时被注入。

接下来，开关 S_1 转向“OFF”（见附图 1）停止施加 AC 电场，在自然发生的布朗运动作用下，杂交继续进行。附图 7 示意性显示了固定的 DNA 探针 D_2 与符号 T_1 所表示的伸展状态的靶 DNA 继续杂交的情况。顺便提及，嵌入剂也可以在杂交反应后被注入到反应区 2。

通常，符号 T（T_1）代表的靶 DNA 比 DNA 探针 D_2 长；所以，靶 DNA 在狭小的反应区 2 中可能互相干扰产生位阻现象，妨碍杂交，或者靶 DNA 可能粘附在固定区表面附近做的反应区 2 的壁面上。因此抑止杂交反应的进行。

另外，在本发明中，形成非均一电场的凸起电极部分 e1 和 e2，其边缘远离周围的壁表面，并且凸起电极部分 e1 和 e2 也互相远离（见附图 4 和 5）。这样就

保证了杂交反应的充分空间，因此很难发生位阻现象。

顺便提及，附图 8 所示的改进实例中，可以放置另一对对置电极 E_{21}-E_{22}，其轴线与对置电极 E_{11}-E_{21} 水平或垂直交叉（如图所示）。杂交反应之后，附图 8 中的开关 S_2 转向“ON”，从电源 V_2 对对置电极 E_{21}-E_{22} 施加 AC 电场，使得杂交错误的 DNA（符号 M 表示）和多余的嵌入剂 C 被反向电极 E_{21} 或 E_{22} 吸附，从而移出检测区域。

接下来，根据附图 9 和 12 描述本发明所述的检测装置的制造方法的实例。以符号 1b 所表示的检测装置作为代表性实例，在这个例子中，基片 3 用玻璃制成，预定电极层 E,E 用金在玻璃基片 3 上形成（见附图 9）。为了保证玻璃基片 3 与金制的电极层 E,E 紧密接触，最好在玻璃基片 3 和电极层 E,E 之间预先铺制一层 Cr，Ti 或类似物。

接下来，如附图 10 所示，光敏树脂层 4（例如聚酰亚胺树脂层）层压到电极层 E,E 上，以保证反应区 2 所需的厚度。随后，如附图 11 所示，以树脂层 4 和电极层 E,E 作为标记，采用干蚀刻技术，例如 RIE 蚀刻基片 3。

然后，使用 HF 溶液或类似溶液，对凸起电极部分较低的一边进行湿蚀刻以形成凸起电极部分 E_{11},E_{21}。顺便提及，由于金不会被 HF 溶液腐蚀，如附图 12 所示的凸起电极结构最终可以形成。

另外，玻璃制成的基片 3 可以采用 HF 溶液以软蚀刻的方法一次完成，而不必采用上述的干蚀刻技术。然而，制造本发明所述的检测装置时，建议联合使用干蚀刻和软蚀刻，以增加对电极形状的控制。另外，当使用绝缘层对如此获得的凸起电极进行覆盖时，建议使用 CVD 形成 SiO_2 膜或类似物。

通过将符号 1a-1d 所表示的上述检测装置按照预定的阵列预先排列在基片上，就获得了生物测定基片，例如 DNA 芯片。使用该基片，物质之间的相互作用例如杂交可以在短时间内进行，并且还可以进行综合分析。

附图 13 显示的是一个生物测定基片的实例。如附图 13 所示，多种检测装置 1a 及其类似物以分组的方式排列在一个圆盘状的基片 5 上。

顺便提及，在基片 5 提供的检测装置 1a 或类似装置上进行对物质之间相互作用的检测可以采用已知的光学检测方法进行，即预先以荧光物质标记检测介质 D 并固定到电极表面，或者将荧光嵌入剂插入并与物质（双链核酸）连接，在预先确定的波长的荧光射线激发显示相互作用并检测荧光。或者，采用检测装置 1a

和类似装置光发射图像的方法，定量分析和检测来源于图像的光的数量。

本发明并不仅限于上面描述的优选的具体方案。所附加的权利要求界定了本发明的范围，等价于权利要求范围内的所有变化和修改都属于本发明范围。

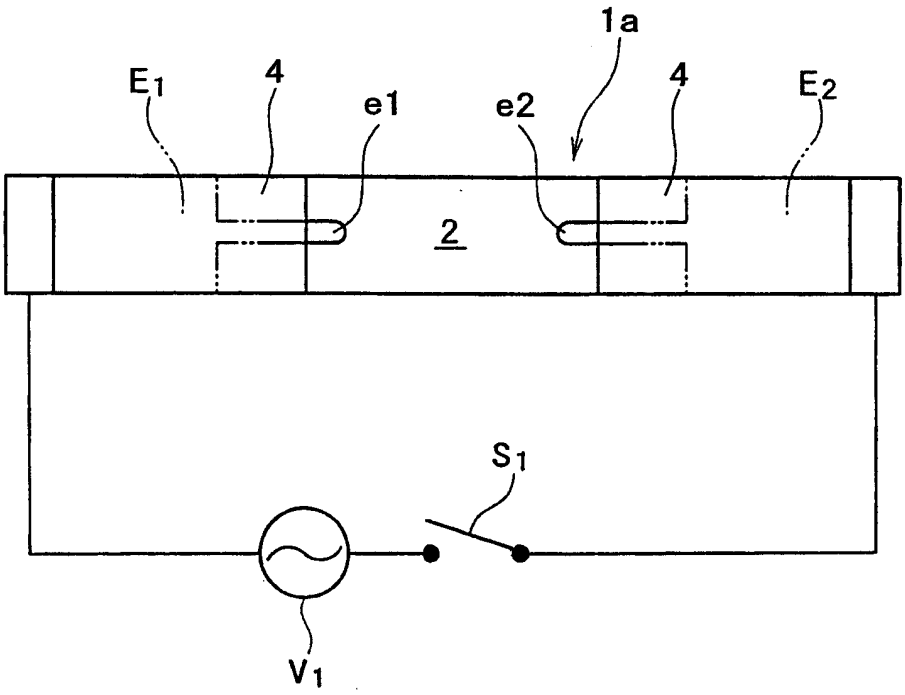


图 1

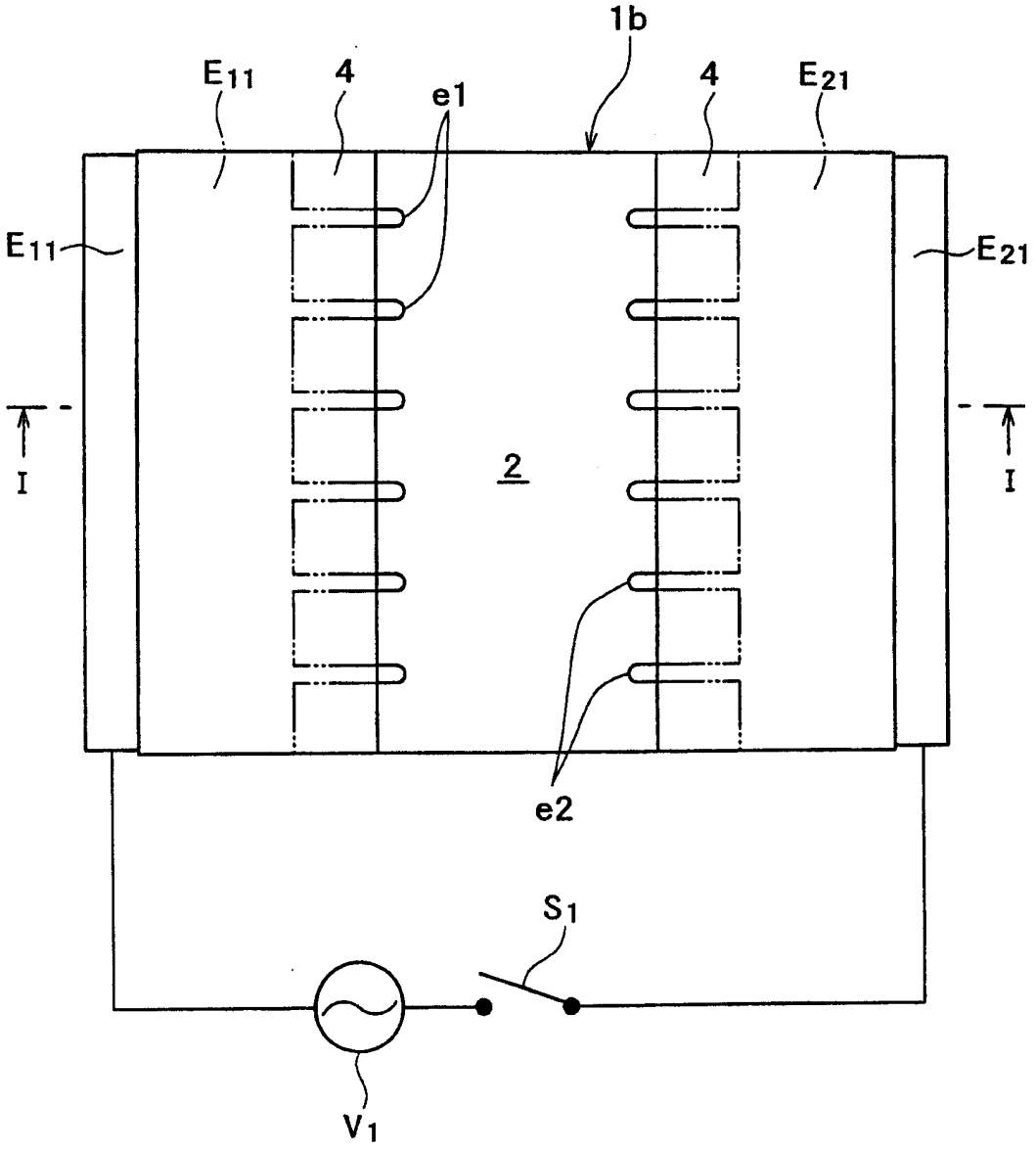


图 2

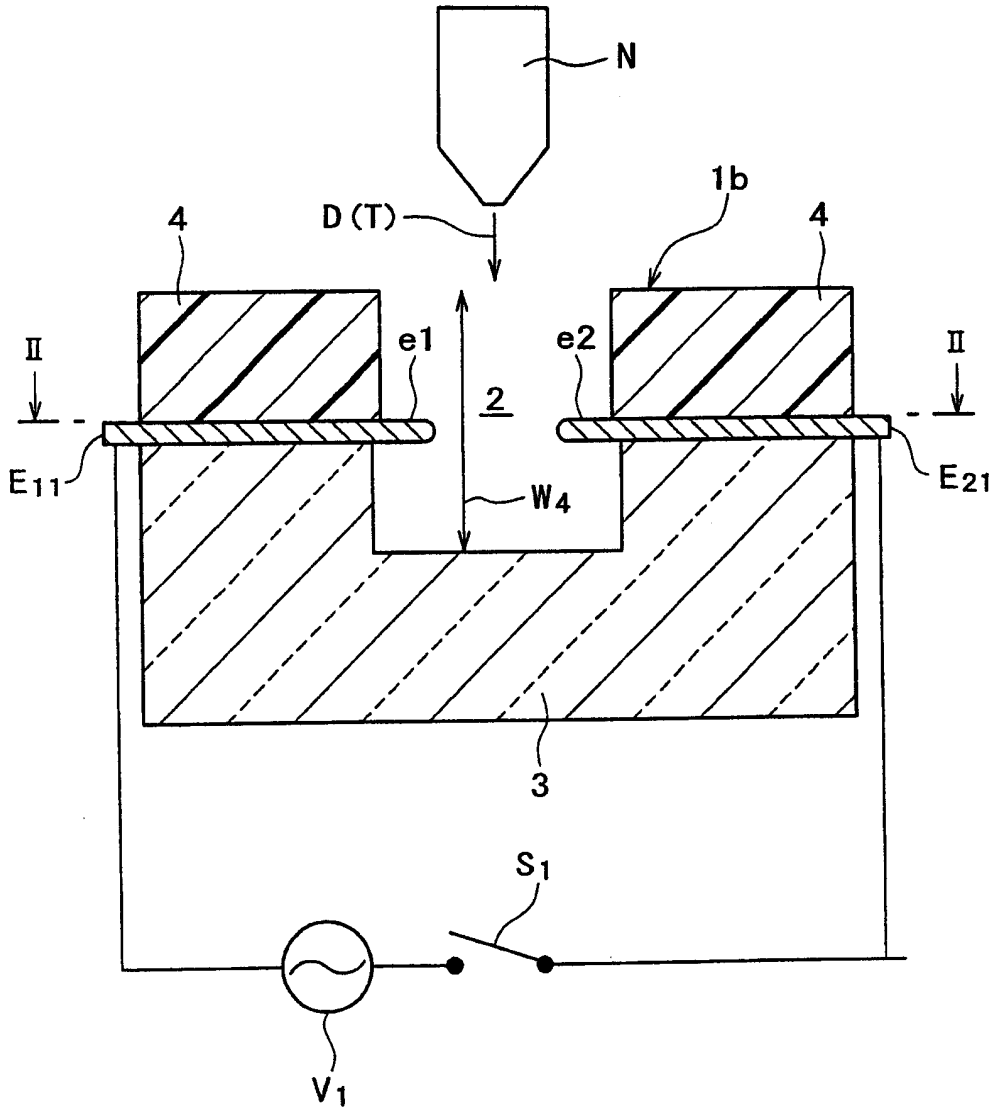


图 3

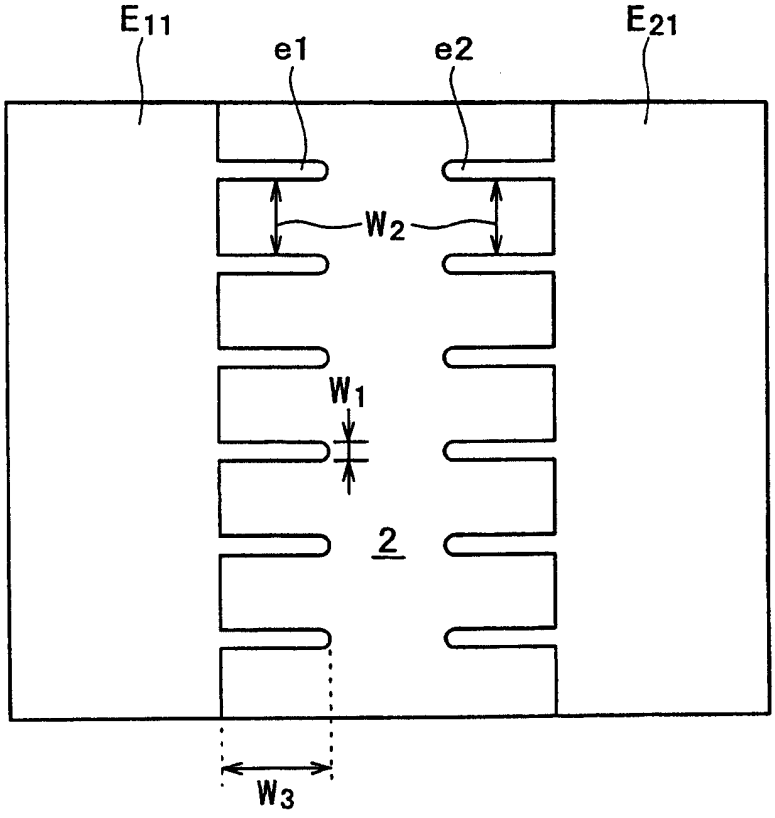


图 4

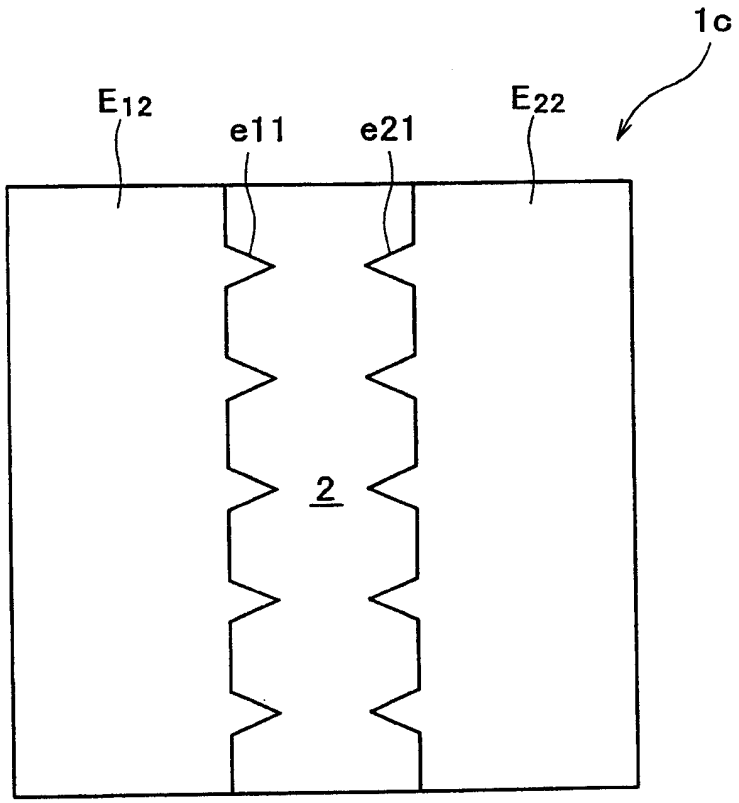


图 5

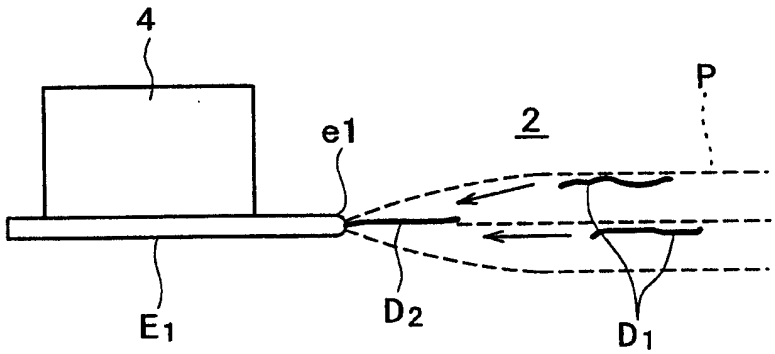


图 6

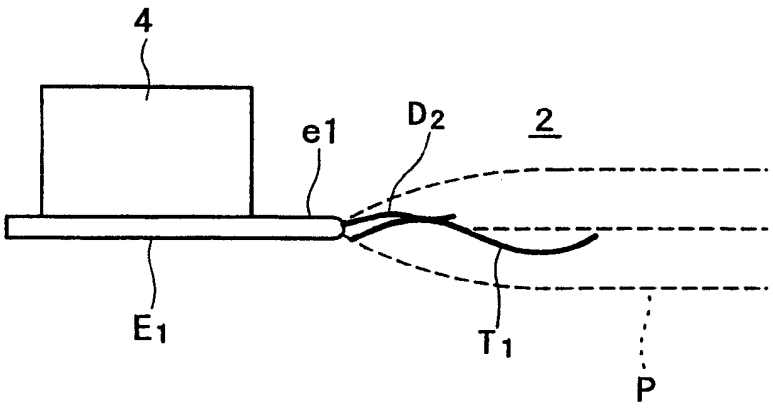


图 7

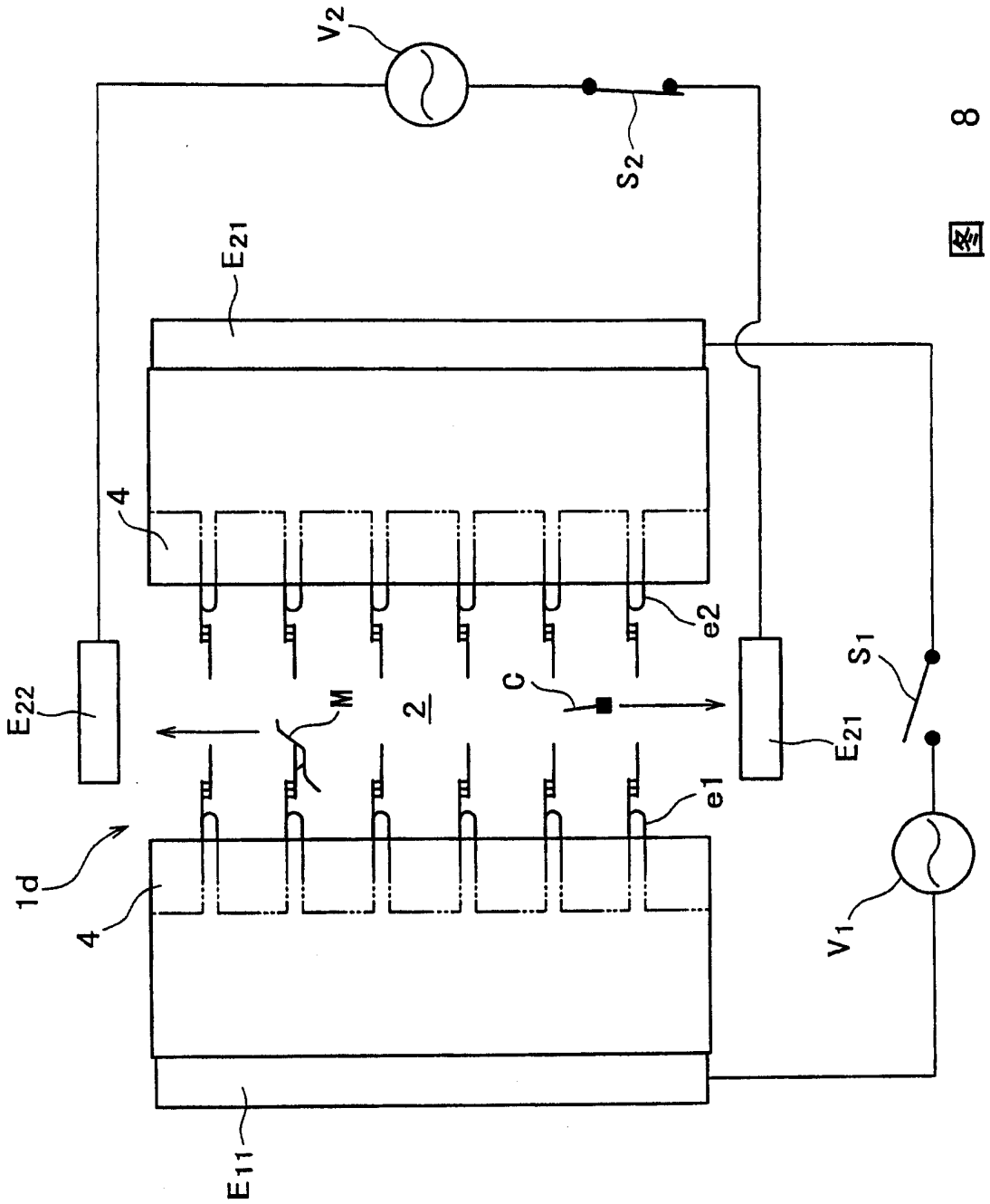


图 8

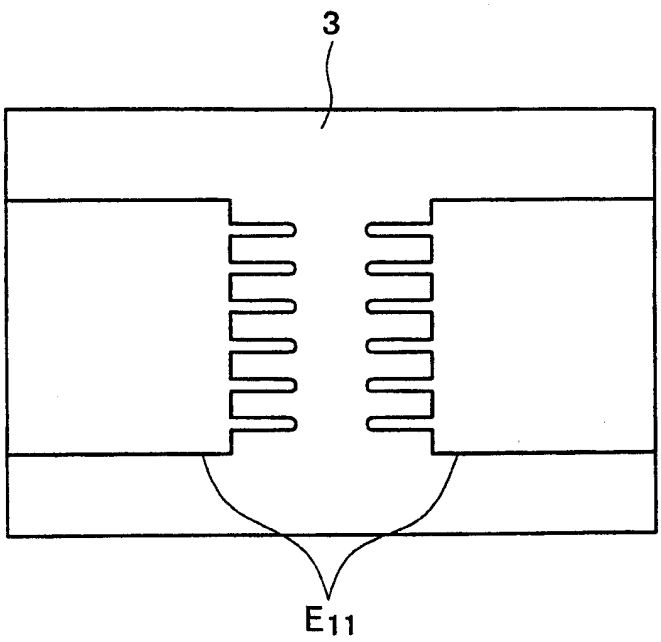


图 9

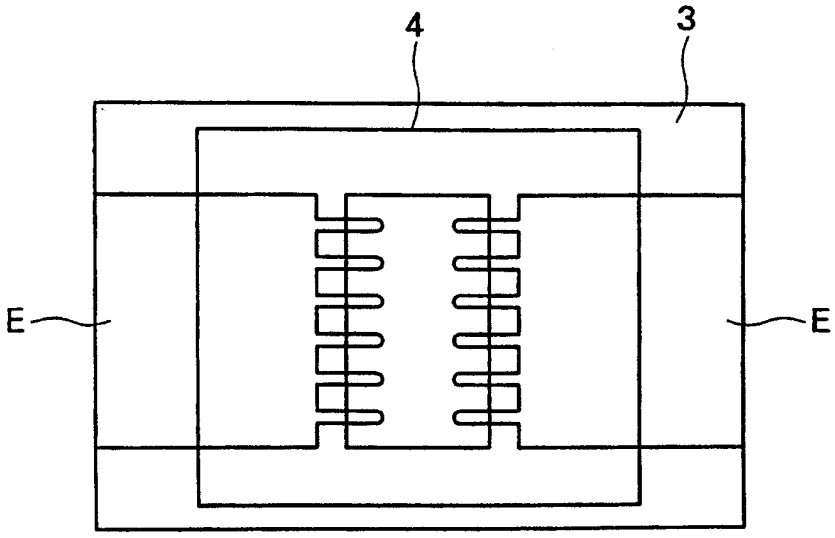


图 10

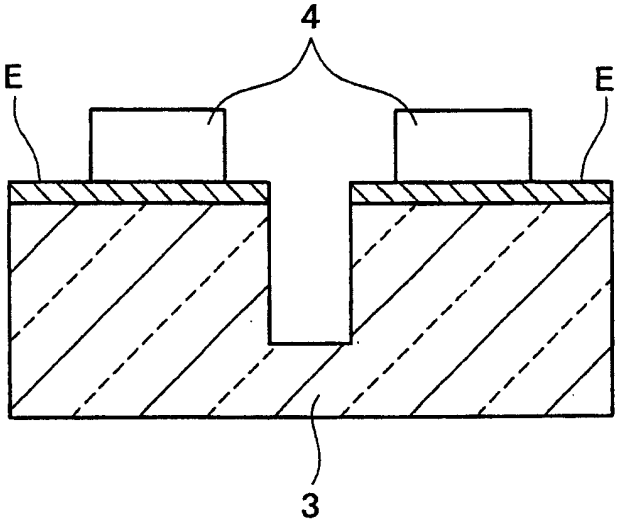


图 11

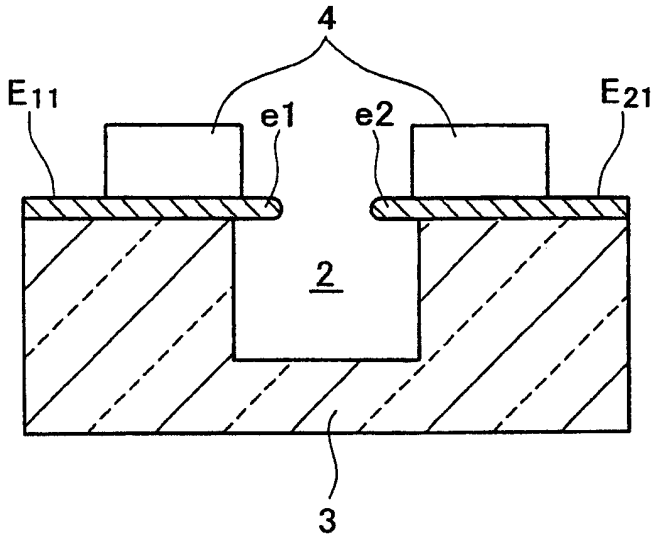


图 12

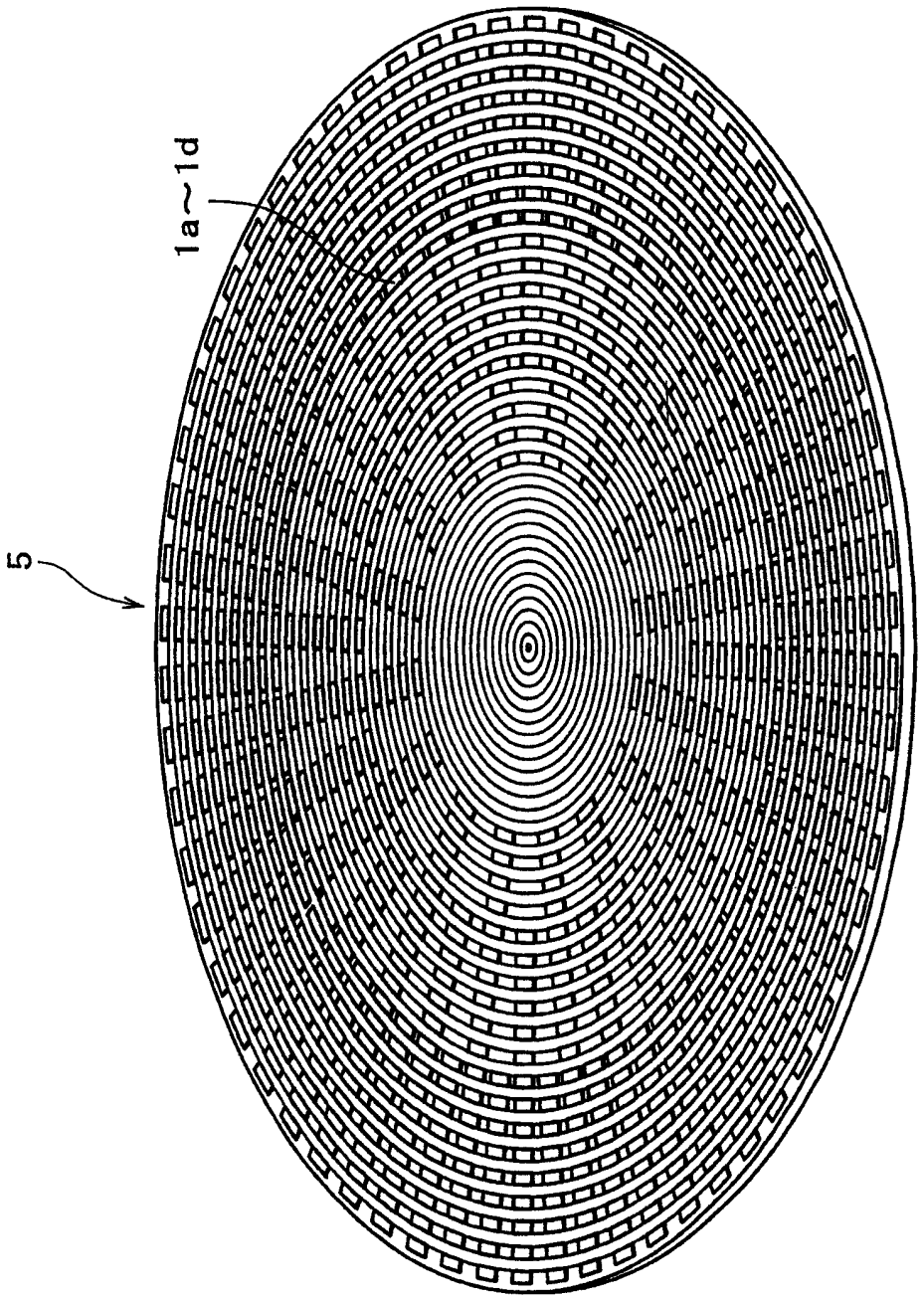


图 13