



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2011111081/15, 04.09.2009**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.09.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.09.2008 JP 2008-252329(43) Дата публикации заявки: **27.09.2012** Бюл. № 27(45) Опубликовано: **10.09.2013** Бюл. № 25(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **EP 1221839 B1, 26.05.2004. IN 200400578 I2, 16.11.2007. WO 1995033553 A1, 14.12.1995. JP 8155420 A, 18.06.1996.**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **23.03.2011**(86) Заявка РСТ:
JP 2009/065508 (04.09.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/038579 (08.04.2010)Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент"

(72) Автор(ы):

**ИТИМУРА Мари (JP),
МАТИДА Кензо (JP),
КИСИИ Нориюки (JP),
ТАНАКА Масанобу (JP)**

(73) Патентообладатель(и):

СОНИ КОРПОРЕЙШН (JP)**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБУСИН И МИКРОБУСИНЫ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к способу получения микробусин и самим микробусинам и может использоваться для биохимических исследований. Указанный способ включает стадию S_1 - формирование гидрофильного слоя, выполненного из гидрофильного органического материала на субстрате, стадию S_2 - ламинирование на гидрофильном слое тонкой пленки, которая может отслаиваться в виде микробусин, стадию формирования S_3 тонкой пленки в заданную

конфигурацию методом фотолитографии, стадию S_6 - образование твердой фазы заданного вещества на сформованных тонких пленках, и стадию отслаивания от субстрата S_7 сформованных тонких пленок, которые уже образовали твердую фазу с веществом, по меньшей мере, наряду с частью гидрофильного слоя, чтобы получить микробусины. Группа изобретений обеспечивает высокую аналитическую точность биохимических исследований. 2.н. и 12 з.п. ф-лы, 8 пр., 9 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)**A61K 9/62** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011111081/15, 04.09.2009**(24) Effective date for property rights:
04.09.2009

Priority:

(30) Convention priority:
30.09.2008 JP 2008-252329(43) Application published: **27.09.2012 Bull. 27**(45) Date of publication: **10.09.2013 Bull. 25**(85) Commencement of national phase: **23.03.2011**(86) PCT application:
JP 2009/065508 (04.09.2009)(87) PCT publication:
WO 2010/038579 (08.04.2010)

Mail address:

**109012, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent"**

(72) Inventor(s):

**ITIMURA Mari (JP),
MATIDA Kenzo (JP),
KISII Norijuki (JP),
TANAKA Masanobu (JP)**

(73) Proprietor(s):

SONI KORPOREJShN (JP)**(54) METHOD OF OBTAINING MICROBEEDS AND MICROBEEDS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method includes stage S_1 - formation of hydrophilic layer, made from hydrophilic organic material on substrate, stage S_2 - lamination of thin film, which can separate in form of microbeeds on hydrophilic layer, stage S_3 of thin film formation into specified configuration by methodof photolithography, stage S_6 -formation of solid phase of the given substance on formed thin films, and stage of separation from substrate S_7 of formed thin films, which have already formed solid phase with substance, at least, with part of hydrophilic layer to obtain microbeeds.

EFFECT: high analytical accuracy of biochemical research.

14 cl, 8 ex, 9 dwg

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу получения микробусин, а также к микробусинам. Более конкретно, изобретение относится к способу получения микробусин, на поверхности которых сформирована твердая фаза вещества заданного типа с использованием метода фотолитографии на субстрате, и тому подобного.

Уровень техники

В биохимических испытаниях нуклеиновых кислот, белков и тому подобного до сих пор используются гранулированные носители, названные "микробусины". Например, в испытаниях нуклеиновых кислот применяются микробусины, в которых зондирующая цепь нуклеиновых кислот, имеющая комплементарную последовательность оснований относительно цепи нуклеиновых кислот мишени, образует твердую фазу на их поверхности. Цепь нуклеиновых кислот мишени выделяется на основе взаимодействия между цепью нуклеиновых кислот мишени и зондирующей цепью нуклеиновых кислот. В испытаниях белков, микробусина, на поверхности которой сформирована твердая фаза антитела относительно белка мишени, применяется для того, чтобы изолировать белок мишени подобным образом.

В биохимических испытаниях с использованием этих микробусин в настоящее время требуется повышенная производительность, для достижения которой были разработаны методики реализации высокоскоростных испытаний.

Например, в патентном документе 1 (публикации патента Японии №3468750) описан "Способ детектирования веществ, определяемых при анализе (аналит), среди ряда аналитов в образце, упомянутый первым аналит распознается с помощью соответствующих аналитических реагентов, при этом способ включает этапы: (а) приведение в контакт с образцом, ряда совокупностей флуоресцентных частиц, причем эти совокупности, соответственно, имеют различные флуоресцентные сигналы и различные аналитические реагенты, где аналитический реагент специфически связывается с одним аналитом в образце, и на поверхности каждой флуоресцентной частицы имеется, по меньшей мере, одна наночастица, меченая каждым соответствующим флуоресцентным красителем, (b) добавление меченого реактива к образцу, (с) детектирование метки с целью анализа флуоресцентных частиц, демонстрирующего связывание аналитического реагента с аналитом и (d) одновременное определение совокупностей флуоресцентных частиц, связанных с соответствующими аналитами, по функции различных флуоресцентных сигналов, связанных с соответствующими совокупностями" (смотрите пункт 23 формулы изобретения).

В "Технологии матричной суспензии", разработанной фирмой Luminex Trading, Inc. на основе этого способа, микробусины метят двумя типами флуоресцентных красителей, которые передают изменение цвета излучения, и таким образом, удается различать друг от друга максимум до 100 типов микробусин. Согласно "Технологии матричной суспензии," когда на 100 типах микробусин сформирована твердая фаза с различными зондирующими цепями нуклеиновых кислот и антител, соответственно, становится возможной одновременная изоляция и детектирование 100 различных типов цепей нуклеиновых кислот и белков в ходе одного испытания.

В указанном выше документе изложено, что "совокупности флуоресцентных частиц дополнительно определяются в зависимости от их размеров и форм" (смотрите пункт 25), причем описано, что в качестве дополнительных параметров для различения микробусин, могут быть использованы размер и форма бусин (смотрите

абзацы 0037 и т.п. в этом документе). Кроме того, в непатентном документе 1 (Multifunctional encoded particles for high- throughput biomolecule analysis». Science, 2007, Mar. 9; 315(5817): 1393-6. (Многофункциональные кодированные частицы для производительного биомолекулярного анализа)) описан способ получения ряда
 5 микробусин различной формы с использованием фотолитографии в потоке. В соответствии с указанным способом, обеспечивается возможность получения более чем одного миллиона типов микробусин.

Краткое раскрытие изобретения

10 Техническая проблема

Чрезвычайно большое разнообразие микробусин, описанных в патентном документе 1 и непатентном документе 1 и имеющих различные характеристики флуоресценции и формы, соответственно, сформированы в твердой фазе с зондирующей цепью нуклеиновых кислот или антител, отличающихся друг от друга и
 15 смешанных для использования в качестве набора бусин. Этот набор бусин и образец, содержащий цепи нуклеиновых кислот мишени, смешивается и промывается, с последующим детектированием соответствующих микробусин и захваченных на их поверхностях цепей нуклеиновых кислот мишени с помощью оптических, или
 20 магнитных, или электрических сигналов.

С целью достижения высокой аналитической точности необходимо, чтобы в наборе бусин находилось известное число микробусин. Например, в простейшем случае, когда сопоставляются интенсивности сигналов двух типов микробусин между собой, если
 25 число обоих типов микробусин (численность), содержащихся в наборе бусин, не является определенным, то результирующие интенсивности сигналов нельзя сравнивать между собой. В этом случае, для точного сопоставительного анализа интенсивности сигналов желательно, чтобы оба типа микробусин присутствовали в равном количестве, или в случае их неравенства, необходимо, чтобы было известно
 30 соотношение числа обоих типов микробусин.

До сих пор численность в наборе бусин регулировалась путем количественного определения соответствующих микробусин после приготовления на основе определения массы и оптической плотности и их смешивания. Однако с помощью
 35 этого метода невозможно точно регулировать число соответствующих типов бусин и, таким образом, вызываются изменения численности, что приводит к затруднениям при получении высокой аналитической точности.

Следовательно, главная цель настоящего изобретения заключается в разработке способа получения микробусин, способного обеспечить снабжение набора бусин,
 40 содержащих большое разнообразие микробусин, в котором численности соответствующих типов бусин являются определенными.

Техническое решение

С целью решения указанной выше проблемы, в изобретении разработан способ получения микробусин, который включает следующие стадии: формирование
 45 гидрофильного слоя, выполненного из гидрофильного органического материала на субстрате, ламинирование на гидрофильном слое тонкой пленки, которая способна отслаиваться в виде микробусин, формирование тонкой пленки в заданную форму с помощью фотолитографии, причем вещество заданного типа образует твердую фазу
 50 на сформованных тонких пленках, отслаивание сформованных тонких пленок, образовавших твердую фазу с веществом из субстрата, по меньшей мере, наряду с частью гидрофильного слоя, чтобы получить микробусины. Согласно указанному способу получения микробусин, могут быть получены микробусины с произвольной

разнообразной морфологией, в произвольном количестве, соответственно, путем конструирования формы фотошаблона, применяемого в фотолитографии.

В этом способе получения микробусин гидрофильный органический материал, растворенный в растворителе, наносится на субстрат и сушится с образованием гидрофильного слоя. Впоследствии, на стадии отслаивания используется растворитель, имеющий заданную температуру, при которой гидрофильный органический материал может быть растворен снова, с целью растворения части гидрофильного слоя, или сформованная тонкая пленка отслаивается, по меньшей мере, наряду с частью гидрофильного слоя с помощью обработки ультразвуком, и таким образом, образуются микробусины. Таким образом, могут быть получены микробусины, которые имеют пространственную конфигурацию, в которой предусмотрены практически параллельные противостоящие грани, и в которой вещество заданного типа образует твердую фазу только на одной из граней, при этом другой грани, по меньшей мере частично, придается гидрофильность.

В этом случае гидрофильный слой образуется из одного или нескольких гидрофильных органических материалов, которые выбирают из поливинилового спирта, крахмала, декстрина, амилозы, желатина, агара, каррагенана, пектина, смолы рожкового дерева и светочувствительных гидрофильных смол.

Способ получения микробусин дополнительно может включать стадию формирования расходуемого слоя на субстрате. В этом случае гидрофильный слой наслаивается на расходуемый слой. На стадии отслаивания расходуемый слой подвергается физической или химической эрозии с целью отслаивания сформованной тонкой пленки наряду с гидрофильным слоем, чтобы получить микробусины. Таким образом, также как в вышеупомянутом случае, могут быть получены микробусины, обладающие пространственной конфигурацией, в которой предусмотрены две практически параллельные противостоящие грани и где вещество заданного типа образует твердую фазу только на одной из граней, при этом другой грани, по меньшей мере, частично придается гидрофильность.

В этом случае гидрофильный слой образуется из одного или нескольких гидрофильных органических материалов, которые выбирают из светочувствительных гидрофильных смол, поливинилового спирта, крахмала, декстрина, амилозы, желатина, агара, каррагенана, пектина и смолы рожкового дерева.

Расходуемый слой может быть сформирован из фторсодержащего органического материала или полиимидного органического материала, или может быть сформирован из гидрофильного органического материала того же типа, что используется для гидрофильного слоя, или из гидрофильного органического материала другого типа.

Когда расходуемый слой формируется с использованием фторсодержащего органического материала, этот расходуемый слой, выполненный из фторсодержащего органического материала, сублимируется или растворяется с использованием фторсодержащего растворителя на стадии отслаивания, таким образом, обеспечивается возможность того, что сформованная тонкая пленка будет отслаиваться от субстрата наряду с гидрофильным слоем, чтобы получить микробусины.

Когда расходуемый слой формируется с использованием полиимидного органического материала, расходуемый слой, выполненный из полиимидного органического материала, растворяется в апротонном растворителе на стадии отслаивания, таким образом, обеспечивается возможность того, что сформованная

тонкая пленка будет отслаиваться от субстрата наряду с гидрофильным слоем, чтобы получить микробусины.

Когда расходуемый слой формируется с использованием гидрофильного органического материала того же типа, что используется для гидрофильного слоя, или
 5 другого типа гидрофильного органического материала, расходуемый слой, выполненный из гидрофильного органического материала, растворяется в растворителе, нагретом до температуры, при которой гидрофильный органический материал способен растворяться снова, на стадии отслаивания, или проводится
 10 обработка ультразвуком таким образом, что обеспечивается возможность того, что сформованная тонкая пленка будет отслаиваться от субстрата наряду с гидрофильным слоем, чтобы получить микробусины.

В этом способе получения микробусин, предпочтительно, стадия формирования твердой фазы должна быть осуществлена путем химического синтеза вещества на
 15 тонкой пленке. Более конкретно, что касается вещества, один или несколько биополимеров, выбранных из заданных последовательностей нуклеиновых кислот или пептидов и сахаридных цепочек, образуют твердую фазу. Предпочтительно, области среди сформованных тонких пленок подвергаются водоотталкивающей обработке
 20 после стадии формирования, но до стадии формирования твердой фазы. За счет водоотталкивающей обработки можно предотвратить просачивание растворов через поверхность сформованной тонкой пленки и их перемешивание между собой, таким образом, обеспечивается образование твердой фазы веществ желательного типа на соответствующих микробусинах.

В способе получения микробусин тонкая пленка удобно образуется с использованием фоторезиста или диоксида кремния.

В смысле настоящего изобретения "вещество," которое образует твердую фазу на тонкой пленке, то есть на микробусине, в широком смысле, включает те вещества,
 30 которые способны взаимодействовать с нуклеиновой кислотой мишени или белком мишени, что представляет собой цель анализа при биохимическом испытании с использованием микробусин. Предпочтительно это вещество является биополимером, выбранным из заданных последовательностей нуклеиновых кислот или пептидов и сахаридных цепочек, и должно включать молекулы, которые способны
 35 взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами мишени или тому подобное. Когда "биополимер" нацелен на нуклеиновую кислоту, эта нуклеиновая кислота должна быть кислотой, имеющей заданную последовательность оснований. Термин "взаимодействие" означает образование дуплекса между нуклеиновыми кислотами,
 40 имеющими комплементарные последовательности оснований. Когда "биополимер" нацелен на пептид, указанный пептид должен быть пептидом с заданной последовательностью аминокислот. В этом случае "взаимодействие" означает, например, связывание белка с белком, такое как связывание между акцепторным белком и лигандным белком или связывание между антигеном и антителом. Кроме
 45 того, если биополимер нацелен на сахаридную цепочку, указанная сахаридная цепочка должна быть сахарид-связывающей цепочкой или указанная связывающая цепочка дополнительно связана с липидом или белком и представляет собой олигосахарид, сахарный липид или сахарный белок. Кроме того, указанное "вещество" включает в
 50 себя множество соединений в виде небольших молекул. Эти соединения способны связываться с нуклеиновой кислотой мишени или с белком мишени, которые представляют собой цель биохимического анализа и которые способны промотировать или препятствовать функционированию нуклеиновой кислоты или

белка и становятся так называемыми "затравочными соединениями" в области поиска лекарственных препаратов. Следует отметить, что используемый здесь термин "нуклеиновая кислота" включает в себя, кроме ДНК и РНК, аналоги нуклеиновых кислот (например, LNA (заблокированная нуклеиновая кислота)), полученная путем

5 модифицирования структур их рибозных фрагментов.

Преимущества изобретения

Согласно изобретению разработан способ получения микробусин, который может обеспечить набор бусин, содержащий разнообразные микробусины, где численности

10 соответствующих микробусин являются определенными.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 представляет собой схематичный чертеж, где показаны микробусины и набор бусин, полученный в соответствии со способом получения микробусин

15 изобретения.

Фигура 2 представляет собой схему последовательности операций, где показаны стадии способа получения микробусин согласно одному варианту осуществления изобретения.

Фигура 3 представляет собой вид в перспективе, где схематично показана конфигурация на субстрате, на стадии формирования пленки S_1 до стадии

20 формирования S_3 и стадии отслаивания S_7 способа получения микробусин согласно первому варианту осуществления изобретения.

Фигура 4 представляет собой вид сверху, где схематично показана конфигурация на субстрате, на стадии водоотталкивающей обработки S_4 способа получения

25 микробусин согласно первому варианту осуществления изобретения.

Фигура 5 представляет собой вид в перспективе, где схематично показана конфигурация на субстрате, на стадии формирования твердой фазы S_6 способа

30 получения микробусин согласно изобретению.

Фигура 6 представляет собой вид в разрезе, где схематично показан субстрат (А) после стадии формирования пленки S_1 до стадии формирования твердой фазы S_6 и субстрат (В) после стадии отслаивания S_7 способа получения микробусин согласно

35 первому варианту осуществления изобретения.

Фигура 7 представляет собой схему последовательности операций, где показаны стадии способа получения микробусин согласно второму варианту осуществления изобретения.

Фигура 8 представляет собой вид в разрезе, где схематично показан субстрат (А) после стадии формирования пленки S_0 до стадии формирования твердой фазы S_6 и субстрат (В) после стадии отслаивания S_7 способа получения микробусин согласно

40 второму варианту осуществления изобретения.

На фигуре 9 показаны структуры олиго-ДНК и олиго-ДНК мишени, образовавших твердую фазу на поверхности микробусин в примерах 1 и 3, где (А) соответствует олиго-ДНК-1, (В) олиго-ДНК-2 и (С) соответствует олиго-ДНК-3.

45 Способ осуществления изобретения

Предпочтительные варианты осуществления изобретения описаны со ссылкой на чертежи. Следует отметить, что рассмотренные ниже варианты осуществления представляют собой примеры типичных вариантов изобретения, причем область

50 действия примеров не следует истолковывать для ограничения изобретения.

1. Микробусины

(1) Конфигурация и численность

Фигура 1 представляет собой схематичный чертеж, где показаны микробусины и

набор бусин, полученный в соответствии со способом получения микробусин согласно изобретению.

На фигуре 1, набор бусин, обозначенный позицией номер 1, выполнен из двух типов микробусин, включающих практически цилиндрические микробусины 11 и практически кубические микробусины 12. Микробусины, полученные в соответствии со способом получения микробусин настоящего изобретения, имеют такую пространственную конфигурацию, в которой предусмотрены две практически параллельные противостоящие грани.

Микробусины 11 и микробусины 12 полностью отличаются по форме и их можно распознавать друг от друга с помощью обычного устройства распознавания изображения на основе различия их конфигурации. Указанный набор бусин 1 включает заданное число микробусин 11 и микробусин 12 (по четыре в каждой группе на фигуре 1).

Набор микробусин, полученный в соответствии со способом получения микробусин настоящего изобретения, отличается тем, что включает множество типов микробусин, различающихся по конфигурации, в заданном количестве, которое точно определено.

Количества (численности) соответствующих типов микробусин, присутствующих в наборе бусин 1, может быть установлено произвольно. Для простоты, на фигуре 1 показаны два типа микробусин, практически цилиндрической и практически кубической формы, по четыре бусины каждого типа. В наборе бусин 1 могут присутствовать три или больше типов микробусин, причем число соответствующих типов микробусин может отличаться друг от друга. Конфигурации соответствующих типов микробусин могут быть выбраны произвольно, при условии, что их можно различить с помощью обычного устройства распознавания изображения.

Используемый в изобретении термин "конфигурация", кроме общей конфигурации бусин, включает мелкие детали формы, созданные внутри или на поверхности бусин (обычно так называемый "штрих-код").

(2) Зонд

На поверхности микробусин 11 сформирована твердая фаза биополимера, такого как нуклеиновая кислота или пептид, или сахаридная цепочка, или небольшая молекула (в последующем называется "нуклеиновая кислота или тому подобное"), обозначенная символом P_{11} на фигуре 1. Характерно, что эти вещества образуют твердую фазу только на одной из двух практически параллельных противостоящих граней (на фигуре на верхней грани) среди всех граней микробусин 11.

Нуклеиновая кислота или тому подобное P_{11} могут быть предусмотрены в виде заданной последовательности оснований или последовательности аминокислот, в зависимости от типа аналитического объекта. Кроме того, нуклеиновая кислота или тому подобное P_{11} могут быть предусмотрены в виде сахаридной цепочки или разнообразных соединений. В последующем, главным образом, будет описан случай, когда нуклеиновая кислота или пептид используются в качестве нуклеиновой кислоты или тому подобного P_{11} .

Например, в случае, когда нуклеиновая кислота является аналитическим объектом, цепочка нуклеиновой кислоты, имеющая комплементарную последовательность оснований относительно цепи нуклеиновых кислот мишени, образует твердую фазу в виде нуклеиновой кислоты или тому подобного P_{11} . Это обеспечивает то, что цепь нуклеиновых кислот мишени в образце будет захвачена и изолирована на микробусинах 11 за счет образования гибрида (дуплекса, двойной спирали) с нуклеиновой кислотой или тому подобным P_{11} . Можно отметить, что число (длина

цепи) оснований в цепочке нуклеиновой кислоты или тому подобном P_{11} является произвольным, причем число оснований не имеет значения при условии, что последовательность оснований в цепи нуклеиновых кислот мишени имеет комплементарную последовательность оснований, по меньшей мере, в части цепи, и возможно образование дуплекса. Обычно число оснований в цепочке нуклеиновой кислоты или тому подобном P_{11} составляет от нескольких единиц до десятков, предпочтительно от 10 до 30.

Например, в случае, когда белок является аналитическим объектом, пептид (например, частичная последовательность аминокислот лигандного белка), способный взаимодействовать с белком мишени (например, рецепторный белок), образует твердую фазу как нуклеиновая кислота или тому подобное P_{11} . Это обеспечивает то, что белок мишени в образце будет захвачен и изолирован на микробусине 11 за счет взаимодействия с нуклеиновой кислотой или тому подобным P_{11} .

С другой стороны, нуклеиновая кислота или тому подобное, обозначенная символом P_{12} на фигуре 1, образует твердую фазу на поверхности микробусин 12. Нуклеиновая кислота или тому подобное P_{12} могут быть предусмотрены в виде заданной последовательности оснований или последовательности аминокислот, в зависимости от типа нуклеиновой кислоты или белка, которые являются аналитическим объектом, также как от вида сахаридной цепочки или разнообразных соединений. В микробусинах 12 указанные вещества образуют твердую фазу на одной (верхней грани) из двух граней, которые практически параллельны и находятся напротив друг друга.

Например, когда различные типы веществ, такие как нуклеиновые кислоты или пептиды, имеющие различные последовательности оснований или последовательности аминокислот, предусмотрены в качестве нуклеиновой кислоты или тому подобного P_{11} , которые образуют твердую фазу на поверхности микробусин 11, и нуклеиновой кислоты или тому подобное P_{12} , которые образуют твердую фазу на поверхности микробусины 12, различные типы нуклеиновых кислот мишени или белков мишени могут быть захвачены и изолированы на соответствующих типах микробусин.

Нуклеиновые кислоты мишени или белки мишени, захваченные и изолированные с микробусинами 11, 12, детектируются с помощью меток флуоресцентных красителей, например, путем оптического детектирования, и одновременно микробусины 11, 12 распознаются с помощью устройства распознавания изображения, таким образом, обеспечиваются два типа нуклеиновых кислот мишеней или белков мишени, которые могут быть проанализированы одновременно.

Например, в случае анализа одиночного нуклеотидного полиморфизма (SNP), последовательность оснований нуклеиновой кислоты или тому подобного P_{11} определяется как последовательность оснований, соответствующая одному SNP, а последовательность оснований нуклеиновой кислоты или тому подобного P_{12} определяется как последовательность оснований, соответствующая другому SNP. Этот набор бусин смешивается с образцом, и сигналы на микробусинах 11 (например, интенсивность сигнала флуоресценции) и сигналы на микробусинах 12 сопоставляются между собой, таким образом, обеспечивается возможность определения соотношения между SNP типов нуклеиновых кислот, содержащихся в образце.

(3) Гидрофильность

Из двух практически параллельных противостоящих граней микробусин 11, 12, грани (нижняя грань на фигуре), на которой ни нуклеиновая кислот или тому

подобное P_{11} , ни P_{12} не образует твердую фазу, придается гидрофильность, обусловленная "гидрофильным слоем", описанным в дальнейшем.

Обычно микробусины образуются из гидрофобного материала для того, чтобы сохранить свою конфигурацию в используемом водном растворе. Микробусины 11, 12 настоящего изобретения также образуются из тонкой пленки гидрофобного материала с использованием фотолитографии, описанной в дальнейшем.

Однако когда микробусины образуются из гидрофобного материала, поверхность бусин становится гидрофобной, таким образом, возникает проблема взаимной коагуляции микробусин в результате гидрофобного взаимодействия. Указанная взаимная коагуляция микробусин препятствует образованию твердой фазы нуклеиновых кислот или тому подобного P_{11} , P_{12} . Кроме того, когда микробусины подвергаются анализу, распознавание их конфигураций с помощью устройства распознавания изображения становится невозможной, и эффективный захват и изоляция нуклеиновых кислот мишени или белков мишени практически не может быть осуществлена, поэтому нельзя получить точные результаты анализа.

По этой причине микробусины 11, 12 имеют конфигурацию, в которой придается гидрофильность на одной (нижняя грань на фигуре) из двух практически параллельных противостоящих граней бусин, и таким образом, предотвращается взаимная коагуляция микробусин.

2. Набор бусин

Таким образом, набор бусин 1 составлен из многочисленных типов микробусин, которые имеют различные конфигурации, в которых цепочки нуклеиновых кислот или пептидов, с отличающимися друг от друга последовательностями оснований или последовательностями аминокислот, образуют твердую фазу. Это дает возможность одновременно анализировать множество нуклеиновых кислот или белков мишени, присутствующих в образце.

Как изложено выше, с целью получения высокой точности анализа необходимо, чтобы число соответствующих типов микробусин, содержащихся в наборе бусин, было определенным. Например, в случае указанного выше SNP анализа, если не известна численность микробусин 11, 12 в наборе бусин 1, то невозможно точно определить соотношение между SNP типов нуклеиновых кислот в образце путем сопоставления сигналов, полученных при анализе.

В этой связи, касательно набора бусин 1, когда известны числа многочисленных типов микробусин, имеющих различные конфигурации, количества микробусин 11 и микробусин 12 могут быть тщательно выровнены между собой, таким образом, устанавливается их одинаковое число. Следовательно, сигналы, полученные от обоих микробусин, сопоставляются между собой, и таким образом, может быть получена высокая точность анализа.

3. Способ получения микробусин I (случай гидрофильного слоя, предоставленного в качестве расходного слоя)

Теперь, со ссылкой на фигуру 2, будет описан первый вариант осуществления, относящийся к способу получения микробусин и набора бусин. На фигуре 2 приведена схема последовательности операций, демонстрирующая стадии способа получения микробусин согласно первому варианту изобретения.

(1) Стадия формирования пленки гидрофильного слоя

На фигуре 2, "стадия формирования гидрофильного слоя," обозначенная символом S_1 , представляет собой стадию, на которой "гидрофильный слой" образуется на субстрате таким образом, чтобы придать гидрофильность нижней грани

микробусин. В способе получения микробусин согласно этому варианту изобретения гидрофильный слой играет роль так называемого расходуемого слоя, с которого отслаиваются микробусины.

Используемый субстрат включает, например, стеклянный субстрат, силиконовый субстрат или тому подобное. Материал субстрата не имеет значения, и соответственно могут быть использованы те материалы, которые обычно приняты в технологии фотолитографии.

Термин "расходуемый слой," используемый в изобретении, означает слой материала, который способен подвергаться физической или химической эрозии на стадии отслаивания S₇, описанной в дальнейшем. Тонкая пленка, способная отслаиваться в виде микробусин, формируется на указанном расходуемом слое в виде верхнего слоя и подвергается эрозии расходуемого слоя на стадии отслаивания для того, чтобы получить микробусины.

Предпочтительно расходуемый слой должен быть слоем, который не подвергается эрозии и повреждению в такой степени, чтобы микробусины на субстрате отслаивались под действием химических реагентов, применяемых на стадиях получения бусин до стадии отслаивания, особенно на стадии образования твердой фазы нуклеиновой кислоты или тому подобного.

Предпочтительно расходуемый слой должен обладать способностью подвергаться эрозии на стадии отслаивания, без денатурирования или выделения нуклеиновой кислоты или тому подобного, образовавшей твердую фазу на микробусине. Если нуклеиновая кислота или тому подобное, образовавшая твердую фазу на микробусине, подвергается денатурированию, повреждению, выделению и тому подобному, нуклеиновая кислота мишени или белок мишени не могут захватываться на бусине. Следовательно, используемый расходуемый слой должен обладать способностью подвергаться эрозии при сохранении согласованности действий с нуклеиновыми кислотами мишени или белками мишени, такими как нуклеиновые кислоты или тому подобное, образовавшие твердую фазу на микробусине.

В способе получения микробусин согласно первому варианту изобретения гидрофильный слой, которому придана гидрофильность на нижней грани микробусины, также играет роль так называемого расходуемого слоя. Этот гидрофильный слой формируется с использованием гидрофильного органического материала. Более конкретно, гидрофильный органический материал, растворенный в растворителе, наносится на субстрат и сушится с образованием гидрофильного слоя. Гидрофильный органический материал может быть нанесен методом центрифугирования, покрытия погружением, трафаретной печати, методом разбрызгивания, струйной печати краской или тому подобным.

Сформированный таким образом гидрофильный слой может быть частично растворен с использованием растворителя, нагретого до температуры, при которой гидрофильный органический материал способен растворяться снова на стадии отслаивания S₇, которая будет описана ниже. Поэтому предпочтительно используемый гидрофильный органический материал должен быть материалом, который не растворяется снова, например, приблизительно при комнатной температуре (30°C), но растворяется снова приблизительно при температуре 45°C или выше. Более конкретно, в качестве гидрофильного органического материала, который растворяется снова в горячей или теплой воде, могут быть использованы один или несколько материалов, выбранных из водорастворимых полимеров, таких как поливиниловый спирт, крахмал, декстрин, амилоза и тому подобное. Особенно

предпочтительным для использования в качестве расходуемого слоя является поливиниловый спирт, поскольку после того, как он нанесен на субстрат после растворения в нагретом растворителе и высушен, он не растворяется снова, до повторного нагревания.

Кроме того, в качестве гидрофильного органического материала могут быть выбраны желатин (главным компонентом которого является коллаген), агар (главные компоненты которого включают агарозу и агаропектин), карагенан (главные компоненты которого включают галактозу и ангидрогалактозу), пектин (главные компоненты которого включают галактуроновую кислоту и метиловый эфир галактуроновой кислоты), смола рожкового дерева (главным компонентом которой является галактоманнан), светочувствительные гидрофильные смолы и тому подобное.

(2) Стадия формирования тонкой пленки микробусин

На фигуре 2 "стадия формирования тонкой пленки микробусин," обозначенная символом S_2 , представляет собой стадию формирования тонкой пленки, изготовленной из материала для микробусин, ламинированных на гидрофильном слое, образовавшемся на субстрате.

Формируется тонкая пленка, изготовленная из разнообразных полимеров, диоксида кремния или металла (такого как алюминий, хром, золото, серебро или тому подобное), применяемых в качестве материала микробусин. Образование пленки может быть осуществлено с помощью уже известных приемов, таких как методика покрытия с использованием устройства для нанесения покрытий центрифугированием, или щелевого устройства для нанесения покрытий, или путем выдувания, или осаждения из паровой фазы, такое как физическое осаждение из паровой фазы (PVD) и химическое осаждение из паровой фазы (CVD), хотя это зависит от типа материала для тонкой пленки. Толщина тонкой пленки соответственно устанавливается в зависимости от толщины изготовленных микробусин (смотрите символ h на фигуре 1).

В качестве материала для тонкой пленки предпочтительно используются фоторезисты, в том числе эпоксидные резисты, такие как SU-8, полиимидные резисты, акриловые резисты, новолачные резисты и тому подобное. С использованием полимерной фоторезистивной тонкой пленки, микробусины могут быть изготовлены с меньшими затратами, чем в случае тонкой пленки из диоксида кремния или металлической тонкой пленки, причем получают микробусины с малым удельным весом. В ходе анализа микробусины смешиваются с образцом и диспергируются в жидкой фазе. На этой стадии, когда удельный вес микробусин является большим, невозможно сохранить диспергированное состояние в жидкой фазе в течение длительного периода.

Среди указанных полимеров предпочтительным является SU-8, который представляет собой химически усиленный негативный фоторезист на основе эпоксиды. Полимер SU-8 разработан фирмой IBM (США), для использования в качестве материала для формирования микроструктур в сочетании с методикой формирования резистивной сверхтонкой пленки и методикой фотолитографии.

При использовании SU-8 можно легко регулировать толщину путем формирования пленки методом центрифугирования. SU-8 обладает высокой оптической прозрачностью и обеспечивается хорошей сопротивляемостью к растворению и высокотемпературному действию различных растворителей, кислот и щелочей. Поэтому применение SU-8 позволяет получать микробусины, имеющие различную толщину, простым способом и обеспечивает стабильную работу процесса производства микробусин, а также аналитической процедуры с использованием

микробусин.

(3) Стадия формования

"Стадия формования", обозначенная символом S_3 на фигуре 2, представляет собой стадию, на которой тонкую пленку, образовавшуюся на стадии формирования пленки S_2 , формируют в желаемую форму методом фотолитографии. Эту стадию осуществляют с использованием различных методик (3-1) для пленки из резиста, такого как SU-8 и (3-2) для пленки из диоксида кремния или различных металлов в качестве материала для микробусин.

(3-1) Случай применения резиста, такого как SU-8, в качестве материала для микробусин, который подвергают процессу формирования пленки

Тонкая пленка, образовавшаяся на стадии S_2 формирования пленки, сначала нагревается, в случае необходимости, и затвердевает (предварительное спекание). Затем используется фотошаблон (в дальнейшем называется просто "маска"), имеющий вычерченную конфигурацию микробусин, и подвергается световой экспозиции. Экспонированный субстрат погружают в жидкий проявитель для того, чтобы удалить ненужные области тонкой пленки, с последующей промывкой жидким промывочным агентом (изопропиловый спирт: ИПС) с целью полного удаления ненужных областей. Затем осуществляют последующее спекание, после которого в тонкой пленке, оставшейся на субстрате, появляется конфигурация микробусин.

Когда конфигурация в маске проектируется в зависимости от конфигурации микробусин, которые будут произведены, микробусины, имеющие произвольную конфигурацию, могут быть сформированы на субстрате. Более того, произвольное конструирование маски обеспечивает микробусины, соответственно имеющие различные конфигурации, которые будут произведены в произвольных количествах. С использованием безмасочного экспонирующего устройства, таким же образом может быть получено произвольное число микробусин, имеющих произвольные конфигурации без изготовления фотошаблона.

(3-2) Случай осуществления формирования пленки с использованием диоксида кремния или разнообразных металлов в качестве материала микробусин

Поверхность обычно применяемого резиста сначала покрывают методом центрифугирования тонкой пленкой и, в случае необходимости, предварительно спекают. Затем проводят световую экспозицию с использованием такой маски, как указано выше. Экспонированный субстрат погружают в жидкий проявитель для того, чтобы удалить ненужные области резиста, с последующей промывкой несколько раз жидким промывочным агентом (главным образом, водой высшей степени очистки) с целью удаления ненужных областей и осуществляют последующее спекание. После этого тонкую пленку подвергают структурированию путем травления и резист полностью удаляют. Это обеспечивает появление конфигурации микробусин в тонкой пленке, оставшейся на субстрате.

(4) Стадия модифицирования функциональной группой

"Стадия модифицирования функциональной группой", обозначенная символом S_4 на фигуре 2, представляет собой стадию модифицирования функциональной группой поверхности тонкой пленки, образовавшейся на стадии формования S_3 .

Из тонкой пленки, образовавшейся на субстрате на стадии формирования S_2 , остается только ее часть, служащая в качестве микробусин, на стадии формования S_3 , причем другие части удаляются. На стадии модифицирования функциональной группой S_4 , модифицирование функциональной группой для стадии формирования твердой фазы, показанной в последующем, проводится на поверхности тонкой пленки

в ее частях, играющих роль микробусин.

Модифицирующая функциональная группа может быть, например, гидроксильной группой, аминогруппой, карбоксильной группой, изотиоцианатной группой, эпоксидной группой, малеинимидной группой или тому подобной. В традиционном производстве чипов ДНК или белковых чипов модифицирования функциональной группой на поверхности субстрата проводят с целью введения линкера для образования твердой фазы цепочки нуклеиновой кислоты или пептида на поверхности субстрата. При практическом осуществлении изобретения может быть принята аналогичная методика.

Описан конкретный пример, где поверхность тонкой пленки модифицируется гидроксильной группой. В этом случае поверхность субстрата первоначально обрабатывают аминопропилтриэтоксисилоном и впоследствии погружают в диметилформамид (ДМФ), растворяющий γ -валеролактон, и подвергают взаимодействию, приводящему к модифицированию гидроксильной группой. В качестве альтернативы, поверхность субстрата можно обработать глицидоксипропилтриэтоксисилоном и погрузить в раствор тетраэтиленгликоля, смешанный с небольшим количеством концентрированной серной кислоты для реакции, приводящей к модифицированию.

Указанная стадия модифицирования функциональной группой S_4 и стадия водоотталкивающей обработки S_5 , показанная в последующем, могут быть проведены таким образом, что после осуществления стадии водоотталкивающей обработки S_5 , затем проводится стадия модифицирования функциональной группой S_4 . Следует отметить, что обе указанные стадии не всегда являются существенными стадиями.

(5) Стадия водоотталкивающей обработки

"Стадия водоотталкивающей обработки", обозначенная как S_5 на фигуре 2, представляет собой стадию, на которой области субстрата, включающие образовавшуюся на стадии формования S_3 тонкую пленку, подвергают водоотталкивающей обработке.

Тонкую пленку, образовавшуюся на субстрате на стадии формирования пленки S_2 , обрабатывают на стадии формования S_3 таким образом, что остаются только части, служащие в качестве микробусин, а остальные части удаляются. На стадии водоотталкивающей обработки S_5 , областям субстрата (области субстрата, включающие образовавшуюся тонкую пленку), с которых тонкая пленка уже удалена, придают водоотталкивающие свойства, необходимые для стадии формирования твердой фазы, как показано впоследствии.

Придание водоотталкивающих свойств областям субстрата, с которых тонкая пленка уже удалена, позволяет предотвратить перемешивание друг с другом капель раствора, стекающих с частей тонкой пленки, служащих в качестве микробусин.

Водоотталкивающая обработка может быть осуществлена, например, следующим образом. Сначала части тонкой пленки, которые станут микробусинами, сразу покрывают обычно используемым резистом, и области субстрата, с которых тонкая пленка уже удалена, обрабатывают триэтокси-1Н,1Н,2Н,2Н-тридекафтор-н-октилсилоном. После этого резист удаляют, и таким образом, водоотталкивающие свойства придаются областям субстрата, отличающимся от областей микробусин. В качестве альтернативы, после покрытия резистом, может быть нанесена методом центрифугирования фторидная смола, которую спекают, чтобы обеспечить водоотталкивающие свойства.

Следует отметить, что когда стадию модифицирования функциональной группой S₄ проводят после завершения стадии водоотталкивающей обработки S₅, функциональными группами модифицируются только части тонкой пленки, служащие в качестве микробусин, после водоотталкивающей обработки областей субстрата, с которых тонкая пленка уже удалена.

(6) Стадия формирования твердой фазы

"Стадия формирования твердой фазы", обозначенная символом S₆ на фигуре 2, представляет собой стадию образования твердой фазы нуклеиновой кислоты или пептида на поверхности тонкой пленки, образовавшейся на стадии формирования S₃. Необходимо отметить, что вещество, которое может сформировать твердую фазу, включает, кроме нуклеиновой кислоты или пептида, сахаридную цепочку и различные соединения, которые указаны выше.

На этой стадии на субстрате остаются только тонкие пленки, служащие в качестве микробусин, а другим областям субстрата придаются водоотталкивающие свойства. На стадии формирования твердой фазы S₆, раствор нуклеозида или раствор аминокислоты (в дальнейшем обобщенно называется "раствор мономера") прикалывают на участки поверхности тонкой пленки, служащие в качестве микробусин, причем нуклеиновая кислота или пептид образуют твердую фазу с использованием стадии синтеза на тонкой пленке.

Стадия синтеза нуклеиновой кислоты или пептида может быть осуществлена путем повторения синтетического цикла реакции связывания, где в соответствии с желательной последовательностью оснований или последовательностью аминокислот, раствор мономера, содержащий соответствующее основание или аминокислоту, последовательно прикалывают на тонкую пленку, служащую в качестве микробусин.

Например, когда нуклеиновая кислота образует твердую фазу, раствор мономера, содержащий нуклеозид, прикалывают с использованием пипетки, затем следует взаимодействие с прикалываемым 5-этилтиотетразолом. После промывки и сушки дополнительно прикалывают окисляющий раствор, и происходит превращение триэфира нуклеозидфосфористой кислоты в триэфир нуклеозидфосфорной кислоты. После промывки прикалывают раствор смеси ангидрида уксусной кислоты/тетрагидрофуран, и происходит взаимодействие для того, чтобы закрыть непрореагировавшую гидроксильную группу, введенную на стадии модифицирования функциональной группой S₄. Более того, после промывки и сушки прикалывают дихлорметановый раствор, содержащий дихлоруксусную кислоту, с целью удаления диметокситритильной защитной группы от 5'-гидроксильной группы нуклеозида, связанного с субстратом. Затем проводят промывку и сушку, с последующим повторением указанных выше стадий (а) связывание нуклеозида, (b) промывка, (с) окисление, (d) промывка, (е) удаление диметокситритильной защитной группы и (f) промывка, и в заключение проводят снятие защиты с основного фрагмента нуклеиновой кислоты. Таким образом, может быть сформирована твердая фаза нуклеиновой кислоты, имеющей желательную последовательность оснований.

Когда образуется твердая фаза пептида, прикалывают, например, раствор мономера, содержащий аминокислоту, в которой α-аминогруппа и функциональная группа боковой цепочки соответственно защищены, и повторяют стадию конденсации на тонкой пленке, проведенную в соответствии с различными методами конденсации, и в заключение следует удаление различных защитных групп. Это делает возможным образование твердой фазы пептида, имеющего желательную последовательность аминокислот.

Твердая фаза нуклеиновой кислоты или пептида может быть сформирована путем прикапывания раствора, содержащего заранее синтезированную нуклеиновую кислоту или пептид на части тонкой пленки, служащей в качестве микробусин, и связывания с функциональной группой, введенной на стадии модифицирования функциональной группой S₄.

Раствор мономера и раствор заранее синтезированной нуклеиновой кислоты или пептида может быть введен путем нанесения пробы пипеткой или микродозатором, или устройством струйной печати.

(7) Стадии отслаивания

"Стадия отслаивания", обозначенная символом S₇ на фигуре 2, является стадией отслаивания от субстрата сформировавшейся впоследствии тонкой пленки, на которой образовалась твердая фаза нуклеиновой кислоты или пептида.

В способе получения микробусин согласно первому варианту изобретения, гидрофильному слою придается функция гидрофильности к нижней грани микробусин, а также функция расходуемого слоя. На этой стадии отслаивания S₇, часть гидрофильного слоя растворяется и подвергается эрозии растворителем, нагретым до температуры, при которой гидрофильный органический материал способен растворяться снова. Например, когда водорастворимый полимер, такой как поливиниловый спирт, крахмал, декстрин, амилаза или тому подобное, применяется в качестве гидрофильного органического материала, он растворяется снова в растворителе, температура которого составляет приблизительно 45°C или выше.

Гидрофильный слой подвергается эрозии в результате повторного растворения, после чего тонкие пленки, ламинированные на гидрофильном слое, отслаиваются в виде микробусин. В это время часть гидрофильного слоя не растворяется и остается на поверхности тонкой пленки, на стороне, контактирующей с гидрофильным слоем, и, таким образом, поверхности микробусин придается гидрофильность с помощью этого оставшегося гидрофильного слоя.

Когда гидрофильный органический материал растворен в нагретом растворителе, в большинстве случаев, часть гидрофильного слоя остается на поверхности тонкой пленки. Для того, чтобы придать поверхности бусин удовлетворительную гидрофильность, предпочтительно повторное растворение гидрофильного слоя необходимо проводить в таких условиях, чтобы определенно оставить часть гидрофильного слоя на поверхности тонкой пленки.

На стадии отслаивания S₇ этого варианта осуществления, когда жидкий состав для эрозии гидрофильного слоя применяется в качестве так называемого расходуемого слоя, может быть использован растворитель, нагретый до температуры, при которой гидрофильный органический материал способен к повторному растворению, предпочтительно используется горячая чистая вода. Как указано выше, предпочтительно расходуемый слой должен быть слоем, который может подвергаться эрозии на стадии отслаивания, без денатурирования или выделения нуклеиновой кислоты или тому подобного, находящейся в твердой фазе на микробусинах. В этом варианте осуществления чистая вода используется в качестве жидкого растворителя, что позволяет получить микробусины за счет эрозии расходуемого слоя, при сохранении согласованности действий нуклеиновой кислоты или тому подобного, находящейся в твердой фазе на микробусинах, с нуклеиновой кислотой мишени, белком мишени или тому подобным. Можно отметить, что тонкая пленка также может отслаиваться под действием обработки субстрата ультразвуком, после образования тонкой пленки, чтобы физически эродировать гидрофильный слой.

Предпочтительно указанная обработка ультразвуком должна быть проведена в таких условиях, чтобы часть гидрофильного слоя осталась на поверхности тонкой пленки.

4. Конкретный пример способа получения микробусин I (Случай предоставления гидрофильного слоя в качестве расходуемого слоя)

(1) Стадия формирования гидрофильного слоя до стадии формования

Далее, со ссылками на фигуры 3-5, будут конкретно описаны способы получения микробусин и набора бусин согласно первому варианту изобретения. Фигура 3 представляет собой вид в перспективе, где схематично показана конфигурация на субстрате, на стадии формирования пленки S_1 до стадии формования S_3 и стадии отслаивания S_7 . В качестве материала для микробусин здесь используется SU-8, причем описан пример случая изготовления микробусин и набора микробусин, указанных на фигуре 1.

Сначала, на стадии формирования пленки S_1 , гидрофильный слой 3 наслаивается на субстрат 2 (смотрите (A) на фигуре 3). Затем, на стадии формирования 82, размещают SU-8 на гидрофильном слое 3 (смотрите (B) на фигуре 3), затем, используя метод центрифугирования, формируют тонкую пленку 4 (смотрите (C) на фигуре 3).

На этой стадии регулируется количество SU-8 и скорость вращения устройства центрифугирования для нанесения покрытий (смотрите стрелки на фигуре) для того, чтобы контролировать толщину тонкой пленки 4, таким образом, устанавливается соответствующая толщина получаемых микробусин (смотрите символ h на фигуре 1).

Образовавшуюся на стадии формирования пленки S_1 тонкую пленку 4 подвергают предварительному спеканию, затем подвергают воздействию света с использованием маски M, имеющей конфигурацию микробусин на стадии формования S_3 (смотрите (D) на фигуре 3). Стрелкой на этой фигуре обозначены лучи из источника света.

Экспонированный субстрат 2 погружают в жидкий проявитель для того, чтобы удалить ненужные участки из тонкой пленки 4. Кроме того, субстрат промывают жидким промывочным агентом, таким образом, чтобы микробусины 11, 12 появились в виде тонких пленок 4, оставшихся на субстрате 2 (смотрите (E) на фигуре 3).

Когда конфигурация в маске M создается в зависимости от конфигурации получаемых микробусин, то на субстрате 2 могут образоваться микробусины, имеющие произвольную конфигурацию. Таким же образом, если маска M имеет произвольную конструкцию, могут образоваться микробусины, имеющие различные конфигурации, соответственно в произвольных количествах. Таким образом, в соответствии со способом получения микробусин в этом варианте осуществления, можно эффективно и с низкими затратами производить микробусины таких типов, которые можно отличить в зависимости от различий их конфигурации. Кроме того, в зависимости от конструкции маски, можно получать набор бусин, в котором четко установлены совокупности числа типов микробусин.

(2) Стадия модифицирования функциональной группой до стадии водоотталкивающей обработки

В способе получения микробусин этого варианта осуществления, выполняется модифицирование функциональной группой на поверхности тонких пленок 4 в местах, выполняющих функцию микробусин 11, 12 на стадии модифицирования функциональной группой S_4 . На стадии водоотталкивающей обработки S_5 , области субстрата 2, из которых уже удалена тонкая пленка 4 (то есть, области субстрата среди тонких пленок 4 в местах, выполняющих функцию микробусин 11, 12), подвергаются водоотталкивающей обработке. Впоследствии нуклеиновая кислота или пептид или тому подобное образуют твердую фазу на соответствующей поверхности тонких

пленок на стадии формирования твердой фазы S_6 .

Фигура 4 представляет собой вид сверху, где схематично показана конфигурация на субстрате, на стадии водоотталкивающей обработки S_5 .

В части (А) на фигуре 4 показан случай, где микробусины 11, 12 образуются на субстрате 2, как указано на фигуре 3. Тонкие пленки 4 на субстрате остаются только на участках, выполняющих функцию микробусин 11, 12 в соответствии со стадией формования S_3 , при этом другие участки удаляются (смотрите (Е) на фигуре 3). На стадии водоотталкивающей обработки S_5 , водоотталкивающие свойства придаются областям субстрата, которые обозначены штрихованными линиями и из которых уже удалена тонкая пленка 4 (то есть, области с обнаженным гидрофильным слоем 3). Указанная водоотталкивающая обработка проводится, например, за счет воздействия триэтокси-1Н,1Н,2Н,2Н-тридекафтор-н-октилсилана на области субстрата, обозначенные штрихованными линиями.

Это позволяет предотвратить взаимное перемешивание растворов, введенных на поверхности тонких пленок 4 в местах, служащих в качестве микробусин 11, 12. Соответственно, на стадии формирования твердой фазы S_6 , когда раствор мономера или раствор заранее синтезированной нуклеиновой кислоты или пептида прикалывают на часть поверхности тонкой пленки, служащую в качестве микробусин, такой раствор может надежно располагаться в заданном месте и, таким образом, цепочка нуклеиновой кислоты или тому подобное, имеющая желательную последовательность оснований или последовательность аминокислот, может быть синтезирована и сформирована как твердая фаза. Кроме того, когда сахаридная цепочка и соединение образуют твердую фазу, не происходит их перемешивание.

В части (А) на фигуре 4, водоотталкивающую обработку проводят таким образом, чтобы окружить соответствующие части тонкой пленки, служащие в качестве микробусин. В случае, когда на субстрате образуется множество микробусин одинакового типа, водоотталкивающая обработка может быть осуществлена таким образом, чтобы окружить область, на которой образуются микробусины одинакового типа. Например, когда образуются два типа микробусин 11, 12, в соответствии с заданными количествами, водоотталкивающая обработка проводится в заштрихованных областях, обозначенных в части (В) на фигуре 4. Это позволяет раствор мономера или тому подобное прикалывать коллективно для микробусин одинакового типа (группа микробусин), и раствор, выливаемый (капающий) на другую соседнюю группу микробусин, предотвращается от перемешивания.

Раствор мономера или тому подобное прикалывают путем нанесения пробы пипеткой или микродозатором или устройством струйной печати. При использовании такой системы нанесения проб, микрокапли, ежеминутно имеющие различные физические свойства жидкости и относительно высокую вязкость, выбрасываются в воздух и осаждаются на субстрате. После выбрасывания генерируются распыленные капельки (так называемые "спутники") таким образом, что раствор мономера или тому подобное оказываются осажденными на центрах, отличающихся от намеченных мест.

В способе получения микробусин настоящего изобретения, когда микробусины окончательно отслаиваются от субстрата, отсутствуют какие-либо проблемы, если такой раствор мономера или тому подобное осаждается, в виде "спутников", в областях субстрата, отличающихся от участков, служащих в качестве микробусин.

(3) Стадия формирования твердой фазы

Фигура 5 представляет собой вид в перспективе, где схематично показана

конфигурация на субстрате, на стадии формирования твердой фазы S_6 . Здесь показан случай, в котором, как указано на фигуре 3 и части (А) на фигуре 4, микробусины 11, 12 образуются на субстрате 2 и подвергаются водоотталкивающей обработке, с последующим образованием твердой фазы нуклеиновой кислоты на поверхности микробусин 11, 12 в ходе стадии синтеза. На указанной фигуре микробусины 11, 12 образуются на верхней части гидрофильного слоя 3, как показано с увеличением.

Во-первых, прикалывают раствор мономера, содержащий аденин "А", на части поверхности тонкой пленки 4, которые служат в качестве микробусин 11. На поверхность тонкой пленки 4 вводится линкер на стадии модифицирования функциональной группы S_4 . Подобным образом раствор мономера, содержащий гуанин "Г" прикалывают на части поверхности тонкой пленки 4, которые служат в качестве микробусин 12. После этого проводится реакция связывания с аденином или гуанином в прикапанном растворе мономера (смотрите (А) на фигуре 5).

Во-вторых, раствор мономера, содержащий цитозин "С", прикалывают на части, которые служат в качестве микробусин 11, и раствор мономера, содержащий тимин "Т", прикалывают на части, которые служат в качестве микробусин 12, затем следует вторая стадия реакций связывания (смотрите (В) на фигуре 5). В дальнейшем, стадии синтеза повторяют, пока не получится желательная последовательность оснований.

На стадии водоотталкивающей обработки S_5 , водоотталкивающую обработку проводят во всей области, обозначенной как заштрихованная часть на фигуре, причем раствор мономера прикалывают на части, которые служат в качестве микробусин 11 и раствор мономера, введенный на части, которые служат в качестве микробусин 12, не смешиваются между собой. Таким образом, на поверхности соответствующих микробусин 11, 12 может быть надежно синтезирована и сформирована в твердой фазе цепочка нуклеиновой кислоты, имеющая желательную последовательность оснований.

Для образования твердой фазы на основе такого фотохимического процесса, который применяется для известных чипов ДНК, необходимо провести четыре реакции связывания с использованием четырех фотошаблонов для соответствующих оснований (А, Г, Т и С) для одной стадии процесса. Напротив, согласно изобретению, прикалывают растворы мономеров, содержащие соответствующие основания, в указанном порядке на микробусины, разделенные областями, которые подверглись водоотталкивающей обработке, тем самым одновременно осуществляются реакции связывания. Таким образом, синтез и образование твердой фазы цепочек нуклеиновой кислоты может быть осуществлен с малыми затратами.

(4) Стадия отслаивания

Фигура 6 представляет собой вид в разрезе, где схематично показан субстрат (А), полученный после завершения стадии формирования пленки S_1 , до стадии формирования твердой фазы S_6 , и субстрат (В) полученный после дополнительного завершения стадии отслаивания S_7 . На этой фигуре показано сечение области на субстрате 2, на котором уже сформированы микробусины 11.

На субстрате 2 после завершения стадии формирования пленки S_1 , до стадии формирования твердой фазы S_6 , тонкие пленки 4 (микробусин 11), которые образуют твердую фазу с нуклеиновой кислотой или тому подобным P_{11} на поверхности субстрата, ламинируются внутри гидрофильного слоя 3 с использованием фотолитографии.

На стадии отслаивания S_7 гидрофильный слой 3, функционирующий в качестве так называемого расходоуемого слоя, частично растворяется в растворителе, нагретом до температуры, при которой возможно повторное растворение, или субстрат 2

подвергается обработке ультразвуком, таким образом, обеспечивается отслаивание микробусин 11 (тонкие пленки 4) от субстрата 2 (смотрите (В) на фигуре 6). Таким образом, могут быть получены микробусины 11, 12 и набор 1, содержащий эти бусины, как показано в части (F) на фигуре 3.

Полученные таким образом микробусины 11 имеют пространственную конфигурацию, имеющую две практически параллельные противостоящие грани, обусловленные описанным выше способом изготовления. Более конкретно, указанные две практически параллельные противостоящие грани образуются в результате формирования тонкой пленки 4 на соответствующей стадии формирования S_2 . Расстояние между этими двумя гранями соответствует толщине микробусин (смотрите символ h на фигуре 1), причем его можно произвольно изменять путем регулирования толщины пленки.

Нуклеиновая кислота или тому подобное P_{11} образует твердую фазу на одной из двух практически параллельных противостоящих граней микробусин 11. Другой грани (поверхность на стороне, контактирующей с гидрофильным слоем 3) придается гидрофильность, обусловленная гидрофильным слоем 3, часть которого остается не растворенной.

5. Способ получения микробусин II

(Случай получения расходуемого слоя отдельно от гидрофильного слоя)

Фигура 7 представляет собой схему последовательности операций, где показаны стадии способа получения микробусин согласно второму варианту осуществления изобретения.

В способе получения микробусин, который относится к первому варианту осуществления, образовавшийся на стадии S_1 гидрофильный слой служит в качестве так называемого расходуемого слоя. Микробусины отслаиваются и одновременно их поверхность приобретает гидрофильность за счет эрозии гидрофильного слоя, при этом часть указанного слоя удаляется с поверхности тонкой пленки на стадии отслаивания S_7 . В этом случае необходимо, чтобы гидрофильный слой подвергался эрозии в таких условиях, чтобы часть гидрофильного слоя удалялась с поверхности тонкой пленки и, таким образом, поверхность бусин приобретала удовлетворительную гидрофильность.

Способ получения микробусин, продемонстрированный согласно второму варианту осуществления изобретения, отличается тем, что до образования гидрофильного слоя, "расходуемый слой", функционирующий с целью обеспечения отслаивания микробусин, формируется отдельно. Соответственно в способе получения микробусин указанного второго варианта осуществления гидрофильный слой функционирует с целью придания гидрофильности только нижней грани микробусин.

(1) Стадия формирования расходуемого слоя

На "стадии формирования расходуемого слоя", обозначенной символом S_0 на фигуре 7, расходуемый слой образуется на субстрате с использованием фторсодержащего органического материала, или полиимидного органического материала, или гидрофильного органического материала такого же типа или отличающегося от гидрофильного слоя.

(1-1) Случай, когда расходуемый слой образуется с использованием фторсодержащего органического материала

Когда расходуемый слой образуется из фторсодержащего органического материала, применяются такие фторсодержащие производные, как фторсодержащее

производное триазина, используемого в качестве низкомолекулярного материала, конденсированные ароматические фторсодержащие производные или фторсодержащие производные, например адамантина. В качестве фторсодержащего органического материала, в виде полимерного материала, могут быть упомянуты
 5 фторированные смолы, такие как полностью фторированные смолы, частично фторированные смолы, фторсодержащие светоотверждающиеся смолы и тому подобное. Фторсодержащий органический материал растворяют в растворителе и формируют в виде пленки с использованием метода центрифугирования, сушат или
 10 отверждают светом, чтобы получить пленку.

Поскольку фторсодержащие органические материалы становятся менее растворимыми в воде или органических растворителях при повышении степени фторирования, они могут растворяться только во фторсодержащих растворителях. Следовательно, если расходуемый слой сформирован из фторсодержащего
 15 органического материала, такой расходуемый слой не подвергается эрозии или повреждению химическими реагентами, применяемыми от стадий изготовления бусин до стадии отслаивания и стадии образования твердой фазы нуклеиновой кислоты или тому подобного.

Кроме того, маловероятно, чтобы фторсодержащие растворители могли смешиваться с несущими заряд полимерами и обладали способностью умеренно растворять полимеры, отличающиеся от фторсодержащих полимеров. В этом смысле, когда в качестве расходуемого слоя предусмотрен фторсодержащий органический материал, который подвергается эрозии фторсодержащим растворителем на стадии
 25 отслаивания 87, нуклеиновая кислота или тому подобное, сформированная в твердой фазе на микробусинах, не подвергается денатурированию, повреждению, выделению и тому подобному. Более того, когда низкомолекулярный материал, такой как фторсодержащая производная триазина, специально применяется в качестве
 30 фторсодержащего органического материала, микробусины могут отслаиваться в результате сублимации расходуемого слоя на стадии отслаивания S_7 , что обеспечивает более надежное сохранение согласованности действий нуклеиновой кислоты или тому подобного с нуклеиновой кислотой мишени или белком мишени.

Предпочтительная степень фторирования фторсодержащего органического материала составляет не менее чем приблизительно 30 атомных процентов. Степень фторирования, установленная в указанном численном диапазоне, обеспечивает возможность получения расходуемого слоя, который приобретает стойкость к растворению в отношении таких растворителей, как циклопентанон, 1-метокси-2-пропилацетат или тому подобное, которые применяются, например, на стадии
 40 формирования пленки S_2 .

(1-2) Случай формирования расходуемого слоя с использованием полиимидного органического материала

Когда расходуемый слой формируется из полиимидного органического материала, применяются полиимидные смолы общего назначения. Если расходуемый слой формируется из полиимидного органического материала, то расходуемый слой не подвергается эрозии и повреждению под действием химических реагентов, применяемых от стадий изготовления бусин до стадии отслаивания, а также на стадии
 50 образования твердой фазы нуклеиновой кислоты или тому подобного. Кроме того, если слой на стадии отслаивания S_7 подвергается эрозии апротонным растворителем, таким как N-метил-2-пирролидон или тому подобное, нуклеиновая кислота или тому подобное, образовавшая твердую фазу на микробусинах, не подвергается

денатурированию, повреждению, выделению и тому подобному. Следует отметить, что расходуемый слой может быть сформирован из новолачной смолы, вместо полиимидной смолы.

(1-3) Случай формирования расходуемого слоя с использованием гидрофильного органического материала

Когда расходуемый слой формируется с использованием гидрофильного органического материала, то применяется гидрофильный органический материал такого же (или другого) типа, что используется для гидрофильного слоя, как описано в дальнейшем. В способе получения микробусин согласно этому второму варианту изобретения, материал, используемый для гидрофильного слоя, представляет собой один или несколько гидрофильных органических материалов, выбранных из светочувствительных гидрофильных смол, поливинилового спирта, крахмала, декстрина, амилозы, желатина, агара, карагенина, пектина и смолы рожкового дерева.

Хотя расходуемый слой может быть сформирован с использованием гидрофильного органического материала такого же типа, что указанные материалы для гидрофильного слоя, предпочтительно используется материал другого типа, который отличается от гидрофильного органического материала гидрофильного слоя и обладает высокой способностью к повторному растворению. Это обусловлено следующими соображениями.

Другими словами, расходуемый слой, сформированный из гидрофильного органического материала, растворяется с использованием растворителя, имеющего такую температуру (например, около 45°C или выше), при которой гидрофильный органический материал расходуемого слоя может быть растворен снова на стадии отслаивания S₇. В то же время для того, чтобы образовавшийся на стадии формирования S₁ гидрофильный слой не растворялся, предпочтительно расходуемый слой формируется из материала, для которого вероятность повторного растворения больше, чем для гидрофильного слоя.

Более конкретно, является предпочтительным, чтобы в качестве материала для гидрофильного слоя применялась светочувствительная гидрофильная смола или поливиниловый спирт, а для материала расходуемого слоя использовался гидрофильный органический материал, отличающийся от материала, упомянутого первым. Светочувствительная гидрофильная смола желатинизируется и становится не растворимой в холодной воде после фотосенсибилизации. Когда поливиниловый спирт, растворенный в нагретом растворителе, наносится на субстрат и высушивается, он повторно не растворяется, пока его не нагреют снова. Следовательно, если гидрофильный слой образуется из светочувствительной гидрофильной смолы или поливинилового спирта, и расходуемый слой формируется из гидрофильного органического материала другого типа, только расходуемый слой может подвергаться эрозии, при сохранении гидрофильного слоя. Необходимо отметить, что в случае, когда гидрофильный слой подвергается физической эрозии под действием обработки ультразвуком с целью отслаивания тонкой пленки, по той же причине является предпочтительным, чтобы расходуемый слой формировался из гидрофильного органического материала другого типа, отличающегося от материала гидрофильного слоя, и он с большей вероятностью будет подвергаться эрозии при обработке ультразвуком.

(2) Стадия формирования пленки до стадии образования твердой фазы гидрофильного слоя

"Стадия формирования гидрофильного слоя", обозначенная символом S₁ на

фигуре 7, представляет собой стадию образования гидрофильного слоя, ламинированного на расходуемом слое, сформированном на субстрате. Эта стадия S_1 может быть осуществлена таким же образом, как в способе получения микробусин согласно первому варианту осуществления, за исключением того, что гидрофильный

слой наслаивается на расходуемый слой. Однако в этой связи необходимо уделять внимание тому факту, что гидрофильный слой, образовавшийся на стадии S_1 второго варианта изобретения, не функционирует как расходуемый слой, но только придает гидрофильность поверхности микробусин.

Материалы для гидрофильного слоя включают один или несколько из гидрофильных органических материалов, выбранных из светочувствительных гидрофильных смол, поливинилового спирта, крахмала, декстрина, амилозы, желатина, агара, каррагенана, пектина и смолы рожкового дерева. Из этих смол, предпочтительной для формирования гидрофильного слоя является светочувствительная гидрофильная смола или поливиниловый спирт, которые обладают низкой способностью к повторному растворению, с целью эрозии только расходуемого слоя, при сохранении гидрофильного слоя на стадии отслаивания S_7 .

Для светочувствительной гидрофильной смолы может быть использована, например, водорастворимая светочувствительная смола, в которой светочувствительная группа на основе азидной группы подвешена к поливиниловому спирту. Образование пленки из светочувствительной гидрофильной смолы осуществляется путем нанесения смолы, растворенной в растворителе, на субстрат, например, методом центрифугирования или тому подобным, причем смолу подвергают фотосенсибилизации.

Фотосенсибилизацию светочувствительной гидрофильной смолы проводят в таком же светочувствительном диапазоне длины волн и энергии экспонирования, как и для тонкопленочного материала, который обрабатывают с образованием пленки на последующей стадии формирования тонкой пленки S_2 для микробусин, с этой целью может быть использована светочувствительная гидрофильная смола, с такими же положительными и отрицательными характеристиками. В этом случае, когда образовавшаяся тонкая пленка формируется в желательной конфигурации путем фотолитографии на стадии формования S_3 , гидрофильный слой может подвергаться фотосенсибилизации с использованием той же самой маски. Таким образом, может быть повышена эксплуатационная эффективность за счет экспозиции гидрофильного слоя, выполненного из светочувствительной гидрофильной смолы, и тонкой пленки микробусин с использованием той же самой маски одновременно. Только части гидрофильного слоя, находящиеся в контакте с тонкими пленками, сформировавшимися как микробусины, могут подвергаться поперечному связыванию, вызываемому повышенной адгезией гидрофильного слоя к тонким пленкам, служащим в качестве микробусин. Можно отметить, что экспозиции в отношении гидрофильного слоя и тонких пленок микробусин, разумеется, могут быть осуществлены с использованием отдельных масок.

Фотосенсибилизированная светочувствительная гидрофильная смола становится не растворимой в холодной воде за счет желатинизации. Невулканизованная светочувствительная смола может быть удалена путем растворения в горячей воде с температурой 35°C или выше.

Стадии, отличающиеся от стадий, иллюстрированных в описании и включающие стадию формирования тонкой пленки микробусин S_2 , стадию формования S_3 , стадию модифицирования функциональной группой S_4 , стадию водоотталкивающей

обработки S_5 и стадию формирования твердой фазы S_6 , могут быть осуществлены таким же образом, как в способе получения микробусин согласно первому варианту изобретения. Поэтому иллюстрации этих стадий не приведены в описании.

(3) Стадии отслаивания

(3-1) Эрозия расходуемого слоя

"Стадия отслаивания", обозначенная символом S_7 на фигуре 7, представляет собой стадию отслаивания от субстрата сформированной тонкой пленки, образовавшей твердую фазу с нуклеиновой кислотой или пептидом.

Фигура 8 представляет собой вид в разрезе, где схематично показан (А) субстрат, полученный после проведения стадий от стадии формирования пленки S_0 , до стадии формирования твердой фазы S_6 , и (В) субстрат, полученный после дополнительно проведенной стадии отслаивания S_7 . На этих фигурах, соответственно, показаны сечения участков выше субстрата 2, сформированных на субстрате, с микробусинами 11.

Как показано в части (А) на фигуре 8, в способе получения микробусин этого варианта изобретения, расходуемый слой 5 образуется (стадия S_0) в виде расходуемого слоя, на котором наслаиваются гидрофильный слой 3 (стадия S_1) и тонкие пленки микробусин 4 (стадия S_2). На указанной стадии отслаивания S_7 расходуемый слой 5 подвергается физической или химической эрозии с целью отслаивания тонких пленок 4 вдоль гидрофильного слоя 3, чтобы получить микробусины 11.

Более конкретно, когда расходуемый слой 5 образуется из фторсодержащего органического материала, в качестве жидкого растворителя используется фторсодержащий растворитель для того, чтобы эродировать расходуемый слой 5, или фторсодержащий органический материал сублимируется с целью эрозии расходуемого слоя 5. Маловероятно, чтобы фторсодержащий растворитель смешивался с несущими заряд полимера и обладал способностью умеренно растворять указанные полимеры. Следовательно, если фторсодержащий растворитель используется с целью эрозии расходуемого слоя 5, только расходуемый слой 5 может подвергаться эрозии, без повторного растворения гидрофильного слоя 3. Когда в качестве фторсодержащего органического материала слоя используется низкомолекулярный материал, конкретно фторидная производная триазина, то сублимация и удаление могут быть осуществлены при небольшой температуре 100°C или ниже, причем гидрофильный слой не будет поврежден.

Когда расходуемый слой 5 образуется из полиимидного органического материала, то в этом случае применяется апротонный растворитель в качестве жидкого растворителя с целью эрозии расходуемого слоя 5.

При эрозии расходуемого слоя 5, образовавшегося из фторсодержащего органического материала или полиимидного органического материала, слой удаляется путем полного растворения или сублимации, чтобы исключить возможность того, что указанный слой останется на поверхности микробусин 11 после отслаивания. Если расходуемый слой 5 останется на поверхности микробусин, то существует некоторая вероятность того, что образовавшиеся микробусины взаимно коагулируют, вследствие гидрофобности фторсодержащего органического материала или полиимидного органического материала.

Когда расходуемый слой 5 образуется из гидрофильного органического материала, то расходуемый слой 5 подвергается эрозии под действием растворителя, имеющего заданную температуру, при которой гидрофильный органический материал может быть растворен снова, или за счет обработки ультразвуком. В этом случае

расходуемый слой 5 предпочтительно должен быть сформирован из гидрофильного органического материала, который отличается по типу от материала гидрофильного слоя 3, и с большей вероятностью будет подвергаться эрозии. Это дает возможность осуществить эрозию только расходуемого слоя за счет обработки ультразвуком или

обработки горячей водой, при сохранении гидрофильного слоя 3 в исходном виде.

В случае, когда расходуемый слой 5 образуется из гидрофильного органического материала, гидрофильность на поверхности бусин, обусловленная гидрофильным слоем 3, не снижается, даже если расходуемый слой 5, подвергающийся эрозии,

останется на поверхности микробусин 11, без полного растворения указанного слоя.

(3-2) Травление гидрофильного слоя

До эрозии расходуемого слоя 5, предпочтительно гидрофильный слой 3 подвергается травлению. Тонкая пленка 4, образовавшаяся на субстрате на стадии формирования пленки S_2 , обрабатывается на стадии формирования S_3 таким образом, что остаются только части, служащие в качестве микробусин 11, а остальные части удаляются. Гидрофильный слой 3, незащищенный в области субстрата (области субстрата среди сформированных тонких пленок), из которой уже удалена тонкая пленка 4, удаляется за счет травления. Это способствует растворению или сублимации

расходуемого слоя 5, расположенного в местах ниже гидрофильного слоя 3.

Травление осуществляется с использованием, в качестве жидкого агента для удаления, растворителя, имеющего заданную температуру, при которой гидрофильный органический материал может быть растворен снова, и проводится в таких условиях, чтобы гидрофильный слой 3, незащищенный среди уже сформированных тонких пленок 4 (микробусины 11), можно было растворить и удалить. Условия травления должны быть такими, в которых микробусины 11 не отслаиваются под действием избытка растворителя гидрофильного слоя 3.

В этой связи, когда гидрофильный слой 3 образуется из светочувствительной гидрофильной смолы, может быть селективно удалена только необработанная светочувствительная гидрофильная смола, незащищенная среди уже сформированных тонких пленок 4 (микробусины 11), таким образом, можно эффективно предотвратить отслаивание микробусин.

В способе получения микробусин второго варианта изобретения расходуемый слой 5 подвергается эрозии на стадии отслаивания S_7 , в результате, хотя большая часть гидрофильного слоя 3 остается на стороне поверхности, контактирующей с гидрофильным слоем 3 тонкой пленки 4, сформированные тонкие пленки 4 (микробусины 11) могут отслаиваться.

Главным образом, как проиллюстрировано выше, когда гидрофильный слой 3 образуется из светочувствительной гидрофильной смолы, имеющей такие же положительные и отрицательные характеристики и такой же светочувствительный диапазон длин волн и энергии экспонирования, как тонкая пленка 4, и гидрофильный слой и тонкая пленка микробусин подвергаются световой экспозиции с использованием той же самой маски, то усиливается адгезия между сформированными тонкими пленками 4 (микробусины 11) и контактирующим с ними гидрофильным слоем. Таким образом, микробусины могут отслаиваться в таком состоянии, что весь гидрофильный слой 3 сохраняется в исходном виде.

Таким образом, в способе получения микробусин этого варианта изобретения поверхность микробусин может приобрести лучшую гидрофильность, чем в способе второго варианта изобретения, иллюстрированного выше.

Пример 1

1. Изготовление микробусин, в которых в качестве расходного слоя функционирует гидрофильный слой (ПВС)

В этом примере SU-8, образовавшийся на субстрате в виде пленки, формируется методом фотолитографии и подвергается образованию твердой фазы цепочки нуклеиновой кислоты, с последующим отслаиванием, чтобы получить микробусины. При этом гидрофильный слой образуется с использованием поливинилового спирта (ПВС), который функционирует в качестве так называемого расходного слоя, и таким образом, обеспечивается возможность отслаивания тонкой пленки SU-8.

(1) Стадия формирования гидрофильного слоя

ПВС (типа полного омыления со степенью полимеризации 500, произведен на фирме Wako Pure Chemical Industries, Ltd. и использован после регулируемого термического растворения до содержания 10 масс.%) нанесли методом центрифугирования (сначала в течение пяти секунд поддерживают скорость 500 об/мин, и затем в течение 30 секунд 2500 об/мин,) на силиконовый субстрат, который был подвергнут обработке кислородной плазмой (непосредственная плазма, газообразные частицы: O_2 , мощность: 100 Вт, скорость потока: 30 норм. см³, и время: 10 секунд), с последующей сушкой при 85°C в течение 120 минут. При измерении толщины пленки ПВС с помощью контактного толщиномера установлено, что толщина составляет около 600 нм.

(2) Стадия формирования тонкой пленки микробусин

С целью обеспечения адгезии между ПВС и SU-8, покрытый ПВС субстрат был подвергнут обработке кислородной плазмой (непосредственная плазма, газообразные частицы: O_2 , мощность: 100 Вт, скорость потока: 30 норм. см³, и время: 10 секунд) и активирован, с последующим нанесением методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 500 об/мин в течение пяти секунд, и затем 5000 об/мин в течение 30 секунд) 2-(3,4-эпоксидциклогексил)этилтриметоксисилана (произведен фирмой Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.), разбавленного до 30 масс.% толуолом и сушкой при 100°C в течение 90 секунд.

SU-8 (SU-8-3035-N-02, произведен фирмой Kayaku Microchem Corporation и использован после двойного разбавления цикlopентаном) покрывают методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 500 об/мин в течение 15 секунд и затем 1500 об/мин в течение 30 секунд) и сушат при 100°C в течение двух минут.

(3) Стадия формования

С использованием хромовой маски, имеющей вычерченную структуру бусин, проводят экспозицию ИК-излучением (170 мДж/см²) в установке контактной литографии, затем следует сушка при 100°C в течение трех минут. Проводят проявление с использованием проявителя SU-8 (произведен фирмой Kayaku Microchem Corporation) и после промывки изопропиловым спиртом выполняют вторую сушку при 150°C в течение 10 минут, чтобы получить выровненную структуру бусин на субстрате. При измерении толщины пленки SU-8 с помощью контактного толщиномера установлено, что толщина составляет около 3 мкм.

(4) Стадия модифицирования функциональной группой

Субстрат, содержащий структуру бусин SU-8, был подвергнут обработке кислородной плазмой (непосредственная плазма, газообразные частицы: O_2 , мощность: 100 Вт, скорость потока: 30 норм. см³, и время: 10 секунд) и активации, с последующей обработкой 2-(3,4-эпоксидциклогексил)этилтриметоксисилоном (120°C, 10 часов, реакция в газовой фазе).

(5) Стадия формирования твердой фазы

Олиго-ДНК-1 (смотрите последовательность №1 в таблице 1), обозначенная как (А) на фигуре 9, была растворена в буферном растворе 2×SSC, чтобы получить концентрацию 10 мкМ, и несущий бусы субстрат, сопряженный с силаном, подвергали инфльтрации при перемешивании в течение 12 часов. Субстрат удаляют и промывают при перемешивании в буфере 2×SSC, содержащем 0,2 М додецилсульфоната натрия (SDS), в течение 15 минут. Затем, субстрат промывают при перемешивании в течение пяти минут в свежем буферном растворе 2×SSC, содержащем 0,2 М SDS, при нагревании до 90°C. Субстрат промывают проточной водой в течение трех минут и сушат.

Таблица 1		
Олиго-ДНК-1	5'-GACAATGTGTACATCAACATCACCTACCAC-3'	Последовательность №1
Олиго-ДНК-2	5'-GACAATGTGTACATCAACATCACCTACCAC-3'	Последовательность №2
Олиго-ДНК-3	5'-GTGGTAGGTGATGTTGATGTACACATTGTC-3'	Последовательность №3

Здесь, с помощью флуоресцентного микроскопа наблюдается красная флуоресценция, обусловленная цианиновым красителем Cy3, что подтверждает образование твердой фазы олиго-ДНК-1 на бусинах SU-8.

(6) Стадия отслаивания

Силиконовый субстрат, в структуре которого находятся бусины, погружают в ванну с холодной водой, температуру которой постепенно повышают до 45°C, и сливают воду. Затем добавляют холодную воду и толуол, температуру ванны повышают до 65°C, и отслоившиеся бусины подвергают термической фильтрации, затем следует промывка горячей водой и сушка.

После этого полученные микробусины исследуют с помощью флуоресцентного микроскопа, при этом обнаруживают красную флуоресценцию, обусловленную цианиновым красителем Cy3. Интенсивность флуоресценции микробусин не претерпевает никаких изменений, при сравнении с интенсивностью флуоресценции бусин SU-8 до стадии отслаивания; это указывает, что олиго-ДНК-1 не подвергается денатурированию, выделению или тому подобному на указанной стадии отслаивания.

Пример 2

2. Приготовление микробусин, в которых гидрофильный слой (крахмал) выполняет функцию расходуемого слоя

В этом примере используют крахмал для формирования гидрофильного слоя, причем указанный слой выполняет функцию так называемого расходуемого слоя, обеспечивая возможность отслаивания тонких пленок SU-8.

(1) Стадия формирования гидрофильного слоя

Крахмал (произведен из кукурузы на фирме Wako Pure Chemical Industries, Ltd. и приготовлен путем термического растворения до концентрации 4 масс.%) покрывают методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 500 об/мин в течение пяти секунд и затем 2500 об/мин в течение 30 секунд) на силиконовом субстрате, который был подвергнут обработке кислородной плазмой (непосредственная плазма, газообразные частицы: O₂, мощность: 100 Вт, скорость потока: 30 норм. см³, и время: 10 секунд), затем следует сушка при 85°C в течение 120 минут. При измерении толщины пленки крахмала с помощью контактного толщиномера установлено, что толщина в среднем составляет около 150 нм.

(2) Стадия формирования тонкой пленки микробусин до стадии образования

твёрдой фазы

Таким же образом, как в примере 1, SU-8 покрывают методом центрифугирования, подвергают структурированию, проявлению и активации путем обработки плазмой O₂, с последующей обработкой (3-глицидоксипропил)триэтоксисиланом.

Аналогично, формируют твёрдую фазу олиго-ДНК-1 (смотрите последовательность №1 в "таблице 1"), обозначенную как (A) на фигуре 9. С помощью флуоресцентного микроскопа наблюдается красная флуоресценция, обусловленная цианиновым красителем Cy3, что подтверждает образование твёрдой фазы олиго-ДНК-1 на SU-8 бусинах.

(3) Стадия отслаивания

Силиконовый субстрат, на котором имеется структура бусин, погружают в ванну с холодной водой, температуру которой постепенно повышают до 45°C, и сливают воду. Затем, добавляют холодную воду и толуол в ванну, температуру которой постепенно повышают до 65°C, затем следует термическая фильтрация отслоившихся бусин, промывка горячей водой и сушка.

После этого полученные микробусины исследуют с помощью флуоресцентного микроскопа, при этом обнаруживают красную флуоресценцию, обусловленную цианиновым красителем Cy3. Интенсивность флуоресценции микробусин не претерпевает никаких изменений, при сравнении с интенсивностью флуоресценции бусин SU-8 до стадии отслаивания; это указывает, что олиго-ДНК-1 не подвергается денатурированию, выделению или тому подобному на указанной стадии отслаивания.

Пример 3

3. Приготовление микробусин, в которых гидрофильный слой (агар) выполняет функцию расходуемого слоя

В этом примере, агар используется с целью формирования гидрофильного слоя, причем этот слой выполняет функцию так называемого расходуемого слоя, обеспечивая возможность отслаивания тонких пленок SU-8.

(1) Стадия формирования гидрофильного слоя

Агар (Kanten Para, произведен фирмой Ina Food Industry Co., Ltd. и приготовлен путем термического растворения до концентрации 8 масс.%) наносят методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 500 об/мин в течение пяти секунд, и затем 2500 об/мин в течение 30 секунд) на силиконовый субстрат, который был подвергнут обработке кислородной плазмой (непосредственная плазма, газообразные частицы: O₂, мощность: 100 Вт, скорость потока: 30 норм. см³, и время: 10 секунд), затем следует сушка при 85°C в течение 10 минут. При измерении толщины пленки агара с помощью контактного толщиномера установлено, что толщина составляет около 100 нм.

(2) Стадия формирования тонких пленок микробусин до стадии образования твёрдой фазы

Таким же образом, как в примере 1, SU-8 покрывают методом центрифугирования, подвергают структурированию, проявлению и активации путем обработки плазмой O₂, затем следует химическое осаждение из паровой фазы 2-(3,4-эпоксидциклогексил)этилтриметоксисилана.

Аналогично, формируется твёрдая фаза олиго-ДНК-1 (смотрите последовательность №1 в "таблице 1"), обозначенной как (A) на фигуре 9. С помощью флуоресцентного микроскопа наблюдается красная флуоресценция, обусловленная цианиновым красителем Cy3, что подтверждает образование твёрдой фазы олиго-ДНК-1 на SU-8 бусинах.

(3) Стадия отслаивания

Силиконовый субстрат, в котором имеется структура бусин, погружают в ванну с холодной водой, температуру которой постепенно повышают до 45°C, и сливают воду. Затем, добавляя холодную воду и толуол в ванну, температуру которой

5 постепенно повышают до 65°C, затем следует термическая фильтрация отслоившихся бусин, промывка горячей водой и сушка.

После этого полученные микробусины исследуют с помощью флуоресцентного микроскопа, при этом обнаруживают красную флуоресценцию, обусловленную

10 цианиновым красителем Су3. Интенсивность флуоресценции микробусин не претерпевает никаких изменений, при сравнении с интенсивностью флуоресценции бусин SU-8 до стадии отслаивания; это указывает, что олиго-ДНК-1 не подвергается денатурированию, выделению или тому подобному на указанной стадии отслаивания.

Пример 4

15 4. Приготовление микробусин, в которых расходуемый слой (фторидная смола) предусмотрен отдельно от гидрофильного слоя (ПВС)

В этом примере расходуемый слой формируется с использованием аморфной фторидной смолы и подвергается эрозии, обеспечивая возможность отслаивания

20 тонкой пленки SU-8, и таким образом, получают микробусины.

(1) Стадия формирования расходуемого слоя

Супор (CTX-809AP2, произведен фирмой Asahi Glass Co., Ltd., и применяется путем разбавления исходного раствора перфтортрибутиламином до концентрации 80%) наносят методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 700 об/мин, в течение трех секунд и затем 4000 об/мин, в течение 20 секунд) на силиконовый

25 субстрат, который был подвергнут обработке кислородной плазмой (непосредственная плазма, газообразные частицы: O₂, мощность: 100 Вт, скорость потока: 30 норм. см³, и время: 10 секунд), затем следует сушка при 50°C в течение 30 минут, затем при 80°C в течение 60 минут и окончательно при 200°C в течение 30 минут. При измерении толщины пленки Супор с помощью контактного толщиномера установлено, что толщина составляет около 400 нм.

С целью улучшения смачиваемости Супор и адгезии в отношении ПВС, который впоследствии будет обработан с образованием пленки, проводят реактивное O₂-ионное травление (RIE) (газообразные частицы: O₂, мощность: 70 Вт, давление: 18 Па, скорость потока: 10 норм. см³, и время: 15 секунд) и обработку плазмой O₂ (непосредственная плазма, газообразные частицы: O₂, мощность: 100 Вт, давление: 3

35 Па, скорость потока: 30 норм. см³, и время: 15 секунд).

40 (2) Стадия формирования гидрофильного слоя до стадии модифицирования функциональной группой

Таким же образом, как в примере 1, в качестве гидрофильного слоя образуется ПВС, и наносят 2-(3,4-эпоксидциклогексил)этилтриметоксисилан методом центрифугирования, затем следует нанесение SU-8 методом центрифугирования,

45 формирование изображения и проявление.

Подобным образом, субстрат, содержащий структуру бусин SU-8, активируют, проводя обработку плазмой O₂, с последующей обработкой 2-(3,4-эпоксидциклогексил)этилтриметоксисиланом (120°C, 10 часов, реакция в газовой фазе).

50

(3) Стадия формирования твердой фазы

Олиго-ДНК-2 (смотрите последовательность №2 в "таблице 1"), обозначенную как (В) на фигуре 9, растворяют в буфере 2×SSC, чтобы получить концентрацию 10 мкМ, затем происходит инфильтрация несущего бусы субстрата, сопряженного с силаном,

при перемешивании в течение 12 часов. Субстрат удаляют и промывают в буфере 2×SSC, содержащем 0,2 М SDS, при перемешивании в течение 15 минут. Затем субстрат промывают в буфере 2×SSC, содержащем 0,2 М SDS, при перемешивании в течение пяти минут, при нагревании до 90°C. Субстрат промывают проточной водой в течение трех минут и сушат.

(4) Стадия отслаивания

Силиконовый субстрат, модифицированный олиго-ДНК-2, погружают в ванну с холодной водой, температуру которой постепенно повышают до 45°C, и выдерживают в течение пяти минут, затем сливают воду и проводят травление гидрофильного слоя.

Силиконовый субстрат, содержащий структуру бусин, выдерживают в фторсодержащем промывочном реагенте (Novec HFE7300, произведен фирмой Sumitomo 3M Limited) в течение 24 часов, обеспечивая возможность отслаивания бусин, затем следует выделение бусин путем фильтрации, промывка реагентом Novec HFE7300, имеющем нормальную температуру, и сушка.

(5) Выделение цепи нуклеиновых кислот мишени

Затем олиго-ДНК-3 (смотрите последовательность №3 в "таблице 1"), обозначенную как (C) на фигуре 9, выделяют и детектируют как цепь нуклеиновых кислот мишени.

Концентрацию цепи олиго-ДНК-3 нуклеиновых кислот мишени доводят до 2 мкМ (1×SSC, водный раствор) и смешивают с микробусинами, на которых уже сформирована твердая фаза олиго-ДНК-2, при перемешивании в течение 12 часов, при температуре 50°C. Бусины выделяют путем фильтрации и промывают буфером 1×SSC, содержащим 0,2 М SDS, при перемешивании в течение 20 минут. Бусины, выделенные путем фильтрации и диспергированные на диапозитивном стекле, исследуют с помощью флуоресцентного микроскопа, при этом обнаруживают красную флуоресценцию, обусловленную цианиновым красителем Cy3.

Пример 5

5. Приготовление микробусин, в которых расходуетый слой (полиимидный резист) предусмотрен отдельно от гидрофильного слоя (ПВС)

В этом примере, используют Omnicoat™ (произведен фирмой Kayaku Microchem Corporation), который представляет собой алифатический полиимидный резист, для формирования расходуетого слоя, который подвергается эрозии, обеспечивая возможность отслаивания тонких пленок SU-8, и таким образом, получаются микробусины.

(1) Стадия формирования расходуетого слоя

Omnicoat (произведен фирмой Kayaku Microchem Corporation) наносят методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 500 об/мин в течение пяти секунд и затем 3000 об/мин в течение 30 секунд) на силиконовый субстрат, который был подвергнут обработке кислородной плазмой (непосредственная плазма, газообразные частицы: O₂, мощность: 100 Вт, скорость потока: 30 норм. см³, и время: 10 секунд), затем следует сушка при 200°C в течение одной минуты.

С целью улучшения смачиваемости Omnicoat, а также улучшения адгезии к ПВС, который впоследствии будет сформирован, проводят активирующую обработку плазмой O₂ (непосредственная плазма, газообразные частицы: O₂, мощность: 100 Вт, скорость потока: 30 норм. см³ и время: 10 секунд).

(2) Стадия формирования гидрофильного слоя до стадии формования

Таким же образом, как в примере 1, ПВС образуется в качестве гидрофильного

слоя, наносят методом центрифугирования 2-(3,4-эпоксициклогексил)этилтриметоксисилан, затем следует центрифугирование SU-8, формирование изображения и проявление.

Здесь экспозицию осуществляют с использованием маски, в которой созданы два различных типа конфигураций и разделены на две области (в дальнейшем называются областями бусин), причем в каждом типе имеется множество конфигураций.

(3) Стадия модифицирования функциональной группой

Силиконовый субстрат, в котором имеется структура бусин, погружают в ванну с холодной водой, температуру которой постепенно повышают до 45°C, и выдерживают в течение пяти минут, затем сливают воду и проводят травление гидрофильного слоя.

Таким же образом, как в примере 1, субстрат, содержащий структуру бусин SU-8, активируют, проводя обработку плазмой O₂, с последующей обработкой 2-(3,4-эпоксициклогексил)этилтриметоксисиланом путем химического осаждения из паровой фазы.

Этот субстрат погружают в смешанный раствор 800 мл тетраэтиленгликоля и 3 мл концентрированной серной кислоты и проводят реакцию при 80°C в течение восьми часов, при перемешивании, чтобы вызвать модифицирование гидроксильной группой.

(4) На стадии водоотталкивающей обработки две области бусин, А и В, покрывают однократно резистом, а другие области субстрата подвергают обработке триэтокси-1Н,1Н,2Н,2Н-тридекафтор-н-октилсиланом (120°C, 10 часов). Удаление резиста обеспечивает придание водоотталкивающих свойств областям субстрата, отличающимся от областей бусин А и В.

(5) В областях бусин А и В для стадий синтеза нуклеиновых кислот, указанные стадии синтеза нуклеиновых кислот проводят в соответствии с последовательностью оснований, указанной в "Таблице 2."

Таблица 2		
Область бусин А	5'-GAGAACGATCTTCAGGGTGC-3'	Последовательность №4
Область бусин В	5'-CGATCTAGGTACTGCAAGTA-3'	Последовательность №5

Готовят соответствующие нуклеозид-фосфороамидиты, чтобы получить 0,1 М раствор в пропиленкарбонате. Кроме того, готовят 5-этилтиотетразол, чтобы получить 0, 5 М раствор в пропиленкарбонате.

Растворы нуклеозид-фосфороамидитов прикалывают на области бусин с помощью пипетки, и впоследствии прикалывают с помощью пипетки раствор 5-этилтиотетразола в равном количестве. Взаимодействие осуществляют в атмосфере азота в течение 60 секунд, промывают ацетонитрилом, чтобы удалить избыток реагентов, и сушат. Затем прикалывают окисляющий раствор (0,02 М раствор йода, приготовленный с использованием смешанного раствора пиридин/тетрагидрофуран/вода) и проводят взаимодействие в течение 30 секунд, таким образом, превращая образовавшийся триэфир нуклеозида фосфористой кислоты в триэфир нуклеозида фосфорной кислоты. После этого следует промывка ацетонитрилом, прикалывание раствора ангидрида уксусной кислоты в тетрагидрофуране, и проводят взаимодействие в течение 30 секунд, чтобы обеспечить блокирование непрореагировавших гидроксильных групп, модифицированных в области бусин. После промывки ацетонитрилом и сушки, прикалывают раствор 2,5% дихлоруксусной кислоты в дихлорметане, и после реакции в течение 60 секунд удаляется диметокситритильная защитная группа от 5'-гидроксильной группы

нуклеозида.

После промывки ацетонитрилом и сушки, указанные выше стадии (а) нуклеозидного сочетания, (b) промывки ацетонитрилом, (с) окисления, (d) промывки ацетонитрилом, (е) защиты диметокситритилом и (f) промывки ацетонитрилом повторяют 19 раз. В заключение субстрат погружают в водный раствор 13% аммиака/20% метиламина при комнатной температуре приблизительно на 1 час для того, чтобы удалить защиту фрагмента основания нуклеиновой кислоты.

(6) Стадия отслаивания

Силиконовый субстрат, в структуре которого находятся бусины, подвергается инфильтрации и перемешиванию в N-метил-2-пирролидоне в течение 10 минут, затем следует выделение бусин путем фильтрации, промывка этанолом и сушка.

Пример 6

6. Приготовление микробусин, в которых расходуемый слой (ПВС) предусмотрен отдельно от гидрофильного слоя (светочувствительная гидрофильная смола)

В этом примере, используют светочувствительную гидрофильную смолу, чтобы сформировать гидрофильный слой, и ПВС (GH-07) используют в качестве расходуемого слоя, причем SU-8 тонкая пленка отслаивается, чтобы получить микробусины.

(1) Стадия формирования расходуемого слоя

GH-07 (Gosenol, частично омылен на 88%, произведен фирмой Nihon Synthetic Chemical Co., Ltd. и использован после термического растворения до концентрации 10 масс.%) наносят методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 500 об/мин, в течение пяти секунд и затем 2500 об/мин, в течение 30 секунд) на силиконовый субстрат, который подвергнут обработке кислородной плазмой (непосредственная плазма, газообразные частицы: O₂, мощность: 100 Вт, скорость потока: 30 норм. см³, и время: 10 секунд), затем следует сушка при 85°C в течение 120 минут.

(2) Стадия формирования гидрофильного слоя

С целью улучшения адгезии между GH-07 и светочувствительной гидрофильной смолой проводят активирующую обработку плазмой O₂ (непосредственная плазма, газообразные частицы: O₂, мощность: 100 Вт, скорость потока: 30 норм. см³ и время: 10 секунд). Светочувствительную гидрофильную смолу (Biosurfine AWP, произведена фирмой Toyo Gosei Co., Ltd. и использована путем растворения в воде до концентрации 3 масс.%) наносят методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 350 об/мин, в течение двух секунд и затем 1000 об/мин, в течение 30 секунд) и сушат при 80°C в течение пяти минут. Затем, с целью улучшения адгезии между светочувствительной гидрофильной смолой и Su-8, наносят методом центрифугирования 3-глицидилоксипропилтриметоксисилан (разбавлен до 30 масс.% толуолом) (сначала поддерживают скорость 500 об/мин, в течение пяти секунд затем 4000 об/мин, в течение 40 секунд и окончательно при 5000 об/мин, в течение 30 секунд), затем следует сушка при 100°C в течение двух минут.

(3) Стадия формирования тонкой пленки микробусин до стадии формирования твердой фазы

Таким же образом, как в примере 1, SU-8 наносят методом центрифугирования, затем следует экспозиция ИК-излучением (170 мДж/см²) в установке контактной литографии с использованием хромовой маски, имеющей вычерченную структуру бусин, с последующей сушкой при 100°C в течение трех минут. Одновременно с экспозицией SU-8 отверждается указанная выше смола AWP. Проводят проявление с

использованием проявителя SU-8 (произведен фирмой Kayaku Microchem Corporation), потом промывают изопропиловым спиртом, и проводят проявление светочувствительной гидрофильной смолы водой, имеющей температуру 30°C.

Выполняют вторую сушку при 80°C в течение 10 минут, и таким образом, получают выровненную структуру бусин на слое GH-07. При измерении толщины пленки светочувствительной гидрофильной смолы SU-8 с помощью контактного толщиномера установлено, что толщина составляет около 200 нм. После активации поверхности SU-8 путем проведения обработки плазмой O₂, проводят химическое осаждение из паровой фазы 2-(3,4-эпоксидциклогексил)этилтриметоксисилана.

Аналогично, формируется твердая фаза олиго-ДНК-1 (смотрите последовательность №1 в "Таблице 1"), обозначенная как (A) на фигуре 9. С помощью флуоресцентного микроскопа наблюдается красная флуоресценция, обусловленная цианиновым красителем Cy3, что подтверждает образование твердой фазы олиго-ДНК-1 на SU-8 бусинах.

(4) Стадия отслаивания

Силиконовый субстрат, в котором имеется структура бусин, погружают в ванну с холодной водой, температуру которой постепенно повышают до 45°C, и сливают воду. Затем добавляют холодную воду и толуол в ванну, температуру которой постепенно повышают до 65°C, затем следует термическая фильтрация отслоившихся бусин, промывка горячей водой и сушка.

После этого полученные микробусины исследуют с помощью флуоресцентного микроскопа, при этом обнаруживают красную флуоресценцию, обусловленную цианиновым красителем Cy3. Интенсивность флуоресценции микробусин не претерпевает никаких изменений, при сравнении с интенсивностью флуоресценции бусин SU-8 до стадии отслаивания; это указывает, что олиго-ДНК-1 не подвергается денатурированию, выделению или тому подобному на указанной стадии отслаивания.

Пример 7

7. Приготовление микробусин, в которых расходующий слой (фторидная смола) предусмотрен отдельно от гидрофильного слоя (светочувствительная гидрофильная смола)

В этом примере светочувствительная гидрофильная смола используется с целью формирования гидрофильного слоя, причем аморфную фторидную смолу используют в качестве расходующего слоя, и тонкие пленки SU-8 отслаиваются с получением микробусин.

(1) Стадия формирования расходующего слоя

Супор (CTX-809AP2, произведен фирмой Asahi Glass Co., Ltd. и применяется путем разбавления исходного раствора перфтортрибутиламином до концентрации 80%) наносят методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 700 об/мин в течение трех секунд и затем 4000 об/мин в течение 20 секунд) на силиконовый субстрат, который подвергнут обработке кислородной плазмой (непосредственная плазма, газообразные частицы: O₂, мощность: 100 Вт, скорость потока: 30 норм. см, и время: 10 секунд), затем следует сушка при 50°C в течение 30 минут, затем при 80°C в течение 60 минут и окончательно при 200°C в течение 30 минут.

С целью улучшения смачиваемости Супор, а также улучшения адгезии к светочувствительной гидрофильной смоле, которая впоследствии будет сформирована в виде пленки, проводят обработку O₂-RIE, таким же образом, как в примере 4.

(2) Стадия формирования гидрофильного слоя

Светочувствительную гидрофильную смолу (Biosurfine AWP, произведена

фирмой Toyo Gosei Co., Ltd. и использована путем разбавления водой до концентрации 3 масс.%) наносят методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 350 об/мин в течение двух секунд и затем 1000 об/мин в течение 30 секунд) и сушат при 80°C в течение пяти минут. Затем наносят 3-

5 глицидилоксипропилтриметоксисилан (разбавлен до 30 масс.% толуолом) методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 500 об/мин в течение пяти секунд, затем 4000 об/мин в течение 40 секунд и окончательно при 5000 об/мин в течение 30 секунд) и сушат при 100°C в течение двух минут.

10 (3) Стадия формирования тонкой пленки микробусин до стадии формирования твердой фазы

Таким же образом, как в примере 1, SU-8 наносят методом центрифугирования и подвергают экспозиции ИК-излучением (170 мДж/см²) в установке контактной литографии с использованием хромовой маски, имеющей вычерченную структуру бусин, с последующей сушкой при 100°C в течение трех минут. Одновременно с экспозицией SU-8 отверждают указанную выше смолу AWP. Проводят проявление с использованием проявителя SU-8 (произведен фирмой Kayaku Microchem Corporation), промывают изопропиловым спиртом, и потом проводят проявление светочувствительной гидрофильной смолы водой, имеющей температуру 30°C. Выполняют вторую сушку при 80°C в течение 10 минут, и таким образом, получают выровненную структуру бусин на слое Cytop. После активации поверхности SU-8 путем проведения обработки плазмой O₂, проводят химическое осаждение из паровой фазы 2-(3,4-эпоксциклогексил)этилтриметоксисилана.

25 Аналогично, формируется твердая фаза олиго-ДНК-1 (смотрите последовательность №1 в "Таблице 1"), обозначенная как (A) на фигуре 9. С помощью флуоресцентного микроскопа наблюдается красная флуоресценция, обусловленная цианиновым красителем Cy3, что подтверждает образование твердой фазы олиго-ДНК-1 на SU-8 бусинах.

30 (4) Стадия отслаивания

Силиконовый субстрат, в котором имеется структура бусин, выдерживают в течение 24 часов во фторсодержащем промывочном реагенте (Novac HFE 7300, произведен фирмой Sumitomo 3M Limited), обеспечивая возможность отслаивания бусин, затем следует выделение путем фильтрации, промывка реагентом Novac HFE 7300 при комнатной температуре и сушка.

После этого полученные микробусины исследуют с помощью флуоресцентного микроскопа, при этом обнаруживают красную флуоресценцию, обусловленную цианиновым красителем Cy3. Интенсивность флуоресценции микробусин не претерпевает никаких изменений, при сравнении с интенсивностью флуоресценции бусин SU-8 до стадии отслаивания; это указывает, что олиго-ДНК-1 не подвергается денатурированию, выделению или тому подобному на указанной стадии отслаивания.

45 Пример 8

8. Приготовление микробусин, в которых гидрофильный слой (светочувствительная гидрофильная смола) функционирует как расходный слой

В этом примере гидрофильный слой формируется с использованием светочувствительной гидрофильной смолы и также функционирует в качестве так называемого расходного слоя, обеспечивая возможность отслаивания тонких пленок SU-8.

(1) Стадия формирования гидрофильного слоя

Светочувствительную гидрофильную смолу (Bisurfine AWP, произведена

фирмой Toyo Gosei Co., Ltd. и используется путем разбавления водой до концентрации 3 масс.%) наносят методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 350 об/мин, в течение двух секунд и затем 1000 об/мин в течение 30 секунд) и сушат при 80°C в течение пяти минут. Затем, наносят 3-
 5 глицидилоксипропилтриметоксисилан (разбавлен до 30 масс.% толуолом) методом центрифугирования (сначала поддерживают скорость 500 об/мин в течение пяти секунд, затем 4000 об/мин в течение 40 секунд и окончательно при 5000 об/мин в течение 30 секунд) и сушат при 100°C в течение двух минут.

10 (2) Стадия формирования тонкой пленки микробусин до стадии формирования твердой фазы

Таким же образом, как в примере 1, SU-8 наносят методом центрифугирования, и подвергают экспозиции ИК-излучением (170 мДж/см²) в установке контактной
 15 литографии с использованием хромовой маски, имеющей вычерченную структуру бусин, с последующей сушкой при 100°C в течение трех минут. Проводят проявление SU-8 с использованием проявителя SU-8 (произведен фирмой Kayaku Microchem Corporation), потом промывают изопропиловым спиртом и проводят проявление светочувствительной гидрофильной смолы водой, имеющей
 20 температуру 30°C. Выполняют вторую сушку при 80°C в течение 10 минут, и таким образом, получают выровненную структуру бусин на слое AWP. После активации поверхности SU-8 путем проведения обработки плазмой O₂ проводят химическое осаждение из паровой фазы 2-(3,4-эпоксидциклогексил)этилтриметоксисилана.

25 Аналогично, формируется твердая фаза олиго-ДНК-1 (смотрите последовательность №1 в "Таблице 1"), обозначенная как (A) на фигуре 9.

С помощью флуоресцентного микроскопа наблюдается красная флуоресценция, обусловленная цианиновым красителем Cy3, что подтверждает образование твердой фазы олиго-ДНК-1 на SU-8 бусинах.

30 (3) Стадия отслаивания

Силиконовый субстрат, в котором имеется структура бусин, помещают в ванну с водой и подвергают обработке ультразвуком при 95°C в течение 10 минут, затем следует выделение полученных бусин путем фильтрации, промывка водой при
 35 комнатной температуре и затем изопропиловым спиртом и сушка.

После этого полученные микробусины исследуют с помощью флуоресцентного микроскопа, при этом обнаруживают красную флуоресценцию, обусловленную цианиновым красителем Cy3. Интенсивность флуоресценции микробусин не претерпевает никаких изменений, при сравнении с интенсивностью флуоресценции
 40 бусин SU-8 до стадии отслаивания; это указывает на то, что олиго-ДНК-1 не подвергается денатурированию, выделению или тому подобному на указанной стадии отслаивания.

Промышленная применимость

В соответствии со способом получения микробусин изобретения, может быть
 45 предоставлен набор бусин, содержащий множество микробусин с заданными совокупностями. Этот набор бусин может быть использован в различных биохимических анализах с использованием микробусин. Например, в комплексном сравнительном анализе уровней экспрессии генов или уровней экспрессии белков
 50 могут быть получены более надежные результаты сравнительного анализа.

Обозначение ссылочных позиций на чертежах

1: Набор бусин

11, 12: Микробусины

2: Субстрат

3: Гидрофильный слой

4: Тонкая пленка

5: Расходуемый слой

5 М: Фотошаблон (маска)

P_{11} , P_{12} : Нуклеиновая кислота или тому подобное

Формула изобретения

10 1. Способ получения микробусин, который включает стадию формирования гидрофильного слоя, выполненного из гидрофильного органического материала, на субстрате, стадию ламинирования на гидрофильном слое тонкой пленки, которая способна отслаиваться в виде микробусин, стадию формования полученной таким образом тонкой пленки в заданную конфигурацию с помощью фотолитографии, 15 стадию образования твердой фазы заданного вещества на сформованной тонкой пленке и стадию отслаивания сформованной тонкой пленки, образовавшей твердую фазу с указанным веществом из субстрата, по меньшей мере, вместе с частью указанного гидрофильного слоя.

20 2. Способ получения микробусин по п.1, в котором гидрофильный органический материал, растворенный в растворителе, наносят на субстрат и сушат с образованием гидрофильного слоя, после чего на стадии отслаивания используют растворитель, нагретый до температуры, при которой гидрофильный органический материал может 25 быть растворен в нем снова, используют для растворения части гидрофильного слоя, или проводят обработку ультразвуком, обеспечивая возможность отслаивания сформованной тонкой пленки, по меньшей мере, вместе с частью гидрофильного слоя для получения микробусин.

30 3. Способ получения микробусин по п.2, в котором указанный гидрофильный слой образуется с использованием одного или нескольких гидрофильных органических материалов, выбранных из поливинилового спирта, крахмала, декстрина, амилозы, желатина, агара, каррагенана, пектина, смолы рожкового дерева и светочувствительной гидрофильной смолы.

35 4. Способ получения микробусин по п.1, который дополнительно включает стадию формирования расходуемого слоя на субстрате, причем гидрофильный слой ламинируют на расходуемом слое, после чего указанный расходуемый слой подвергают физической или химической эрозии на указанной стадии отслаивания, обеспечивая возможность отслаивания сформованной тонкой пленки вместе с 40 указанным гидрофильным слоем для получения микробусин.

45 5. Способ получения микробусин по п.4, в котором указанный гидрофильный слой образуется с использованием одного или нескольких гидрофильных органических материалов, выбранных из светочувствительной гидрофильной смолы, поливинилового спирта, крахмала, декстрина, амилозы, желатина, агара, каррагенана, пектина и смолы рожкового дерева.

50 6. Способ получения микробусин по п.5, в котором указанный расходуемый слой образуется с использованием фторсодержащего органического материала и указанный расходуемый слой, образованный из фторсодержащего органического материала, сублимируют или растворяют с использованием фторсодержащего растворителя на указанной стадии отслаивания, в результате этого сформованные впоследствии тонкие пленки могут отслаиваться от указанного субстрата вместе с указанным гидрофильным слоем для получения микробусин.

7. Способ получения микробусин по п.5, в котором указанный расходуемый слой образуется с использованием полиимидного органического материала, и на стадии отслаивания указанный расходуемый слой, образованный из полиимидного органического материала, растворяют с использованием апротонного растворителя, обеспечивая возможность отслаивания сформованных тонких пленок от указанного субстрата вместе с указанным гидрофильным слоем для получения микробусин.

8. Способ получения микробусин по п.5, в котором указанный расходуемый слой образуется с использованием гидрофильного органического материала такого же типа или отличающегося от указанного гидрофильного слоя, и указанный расходуемый слой, образовавшийся из гидрофильного органического материала, растворяют при использовании растворителя, нагретого до температуры, при которой гидрофильный органический материал способен растворяться в нем снова, или подвергают обработке ультразвуком на стадии отслаивания для обеспечения возможности отслаивания сформованных тонких пленок от указанного субстрата вместе с указанным гидрофильным слоем для получения микробусин.

9. Способ получения микробусин по любому из пп.3 и 6-8, в котором указанную стадию формирования твердой фазы проводят методом химического синтеза указанного вещества на указанной тонкой пленке.

10. Способ получения микробусин по п.9, в котором один или несколько биополимеров, выбранных из нуклеиновых кислот или пептидов, имеющих заданные последовательности, и сахаридные цепочки, образуют твердую фазу в качестве указанного вещества.

11. Способ получения микробусин по п.10, в котором области среди сформованных тонких пленок подвергают водоотталкивающей обработке после указанной стадии формирования, но до указанной стадии формирования твердой фазы.

12. Способ получения микробусин по п.11, в котором указанные тонкие пленки формируют с использованием фоторезиста или диоксида кремния.

13. Микробусины, полученные по способу получения микробусин, указанному в любом из пп.3 и 6-8.

14. Микробусины по п.13, где каждая указанная микробусина имеет пространственную конфигурацию, в которой предусмотрены две практически параллельные противостоящие грани, причем заданное вещество образует твердую фазу только на одной из этих граней микробусины, при этом другая грань, по меньшей мере частично, является гидрофильной.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Sony Corporation

<120> The manufacturing method of microbeads

<130> 0890341001

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> The nucleic acid sequence of the oligo DNA-1

<400> 1

gacaatgtgt acatcaacat cacctaccac

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> The nucleic acid sequence of the oligo DNA-2

<400> 2

gacaatgtgt acatcaacat cacctaccac

30

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> The nucleic acid sequence of the oligo DNA-3

<400> 3

gtggtaggtg atgttgatgt acacattgtc

30

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> The nucleic acid sequence of the oligonucleotide for the region A

<400> 4

gagaacgatc ttcagggtgc

20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

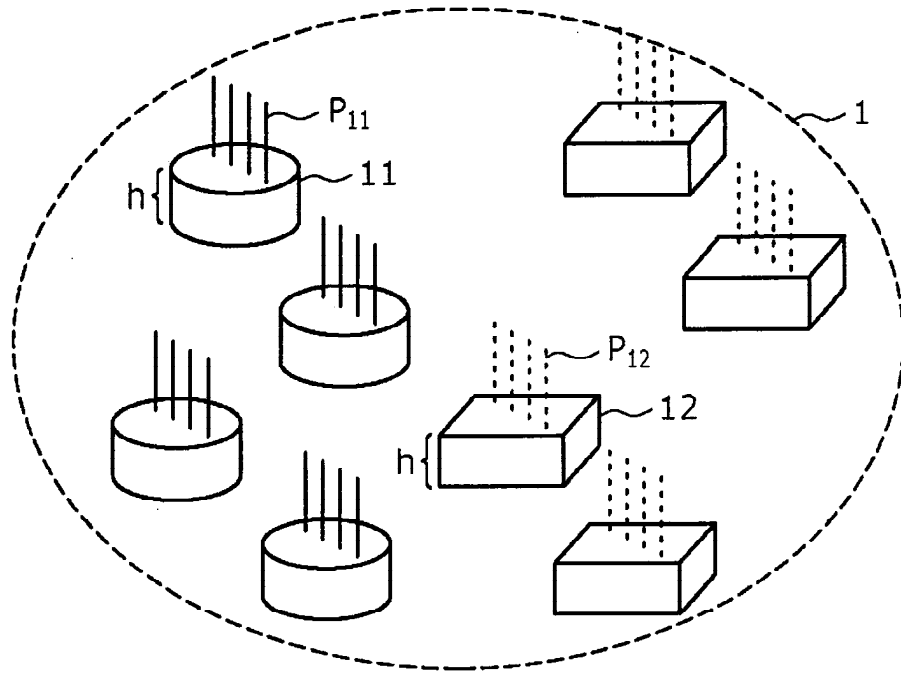
<220>

<223> The nucleic acid sequence of the oligonucleotide for the region B

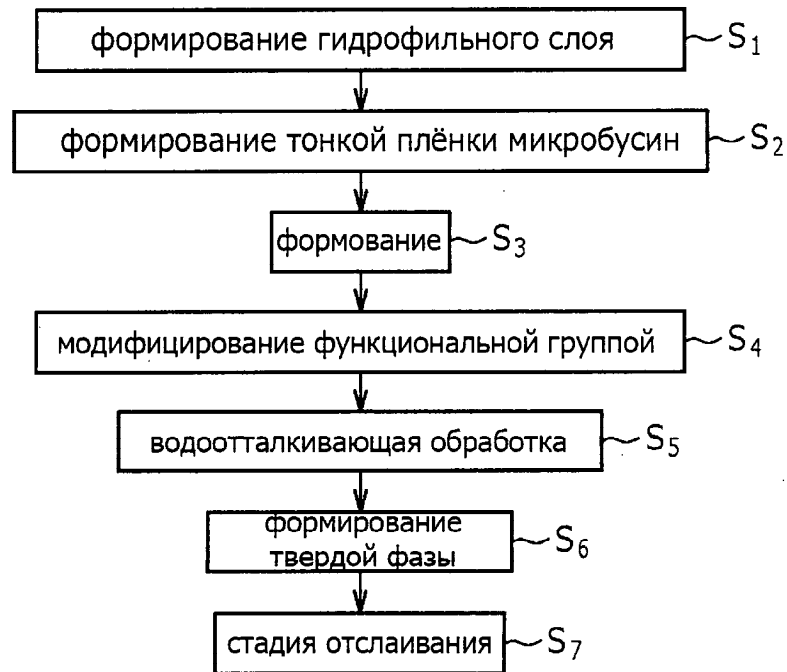
<400> 5

cgatctaggt actgcaagta

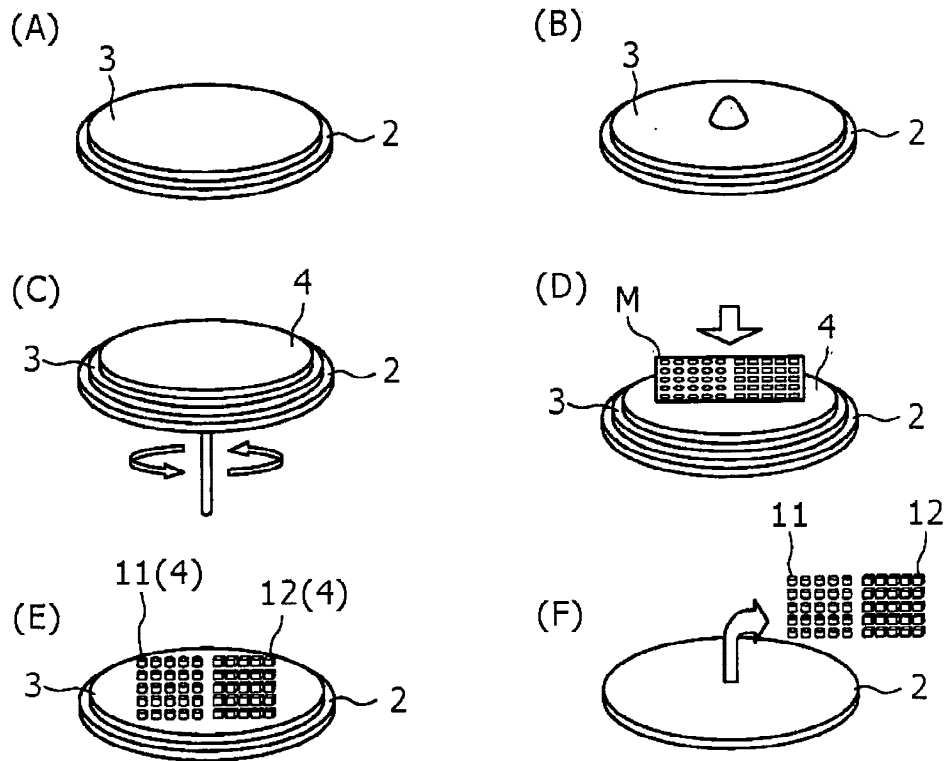
20



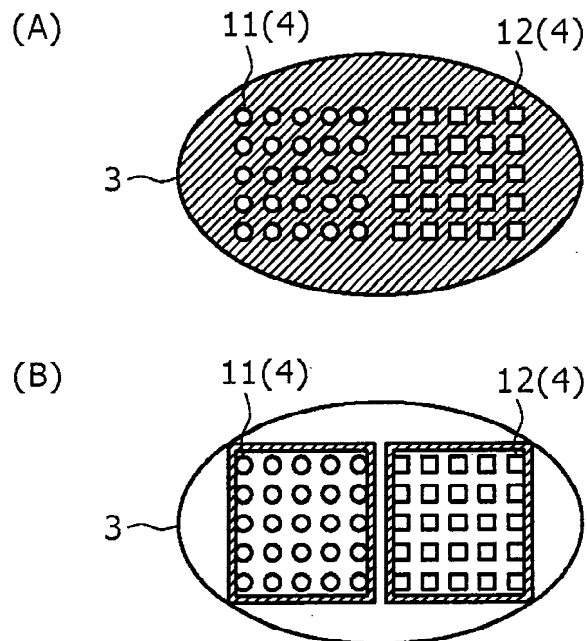
ФИГ. 1



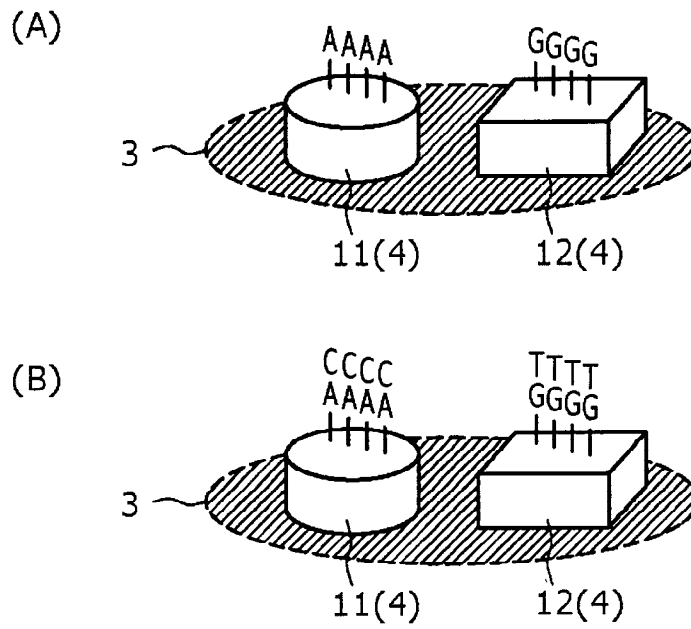
ФИГ. 2



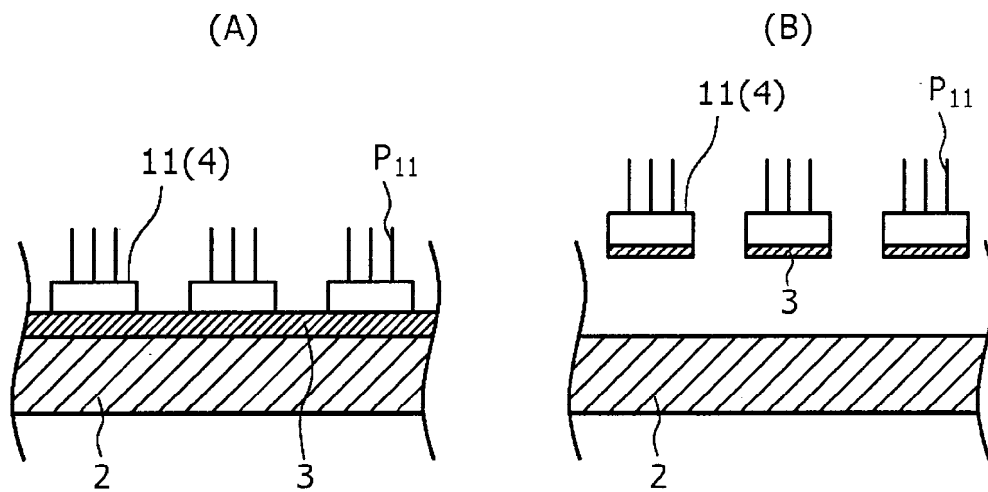
Фиг. 3



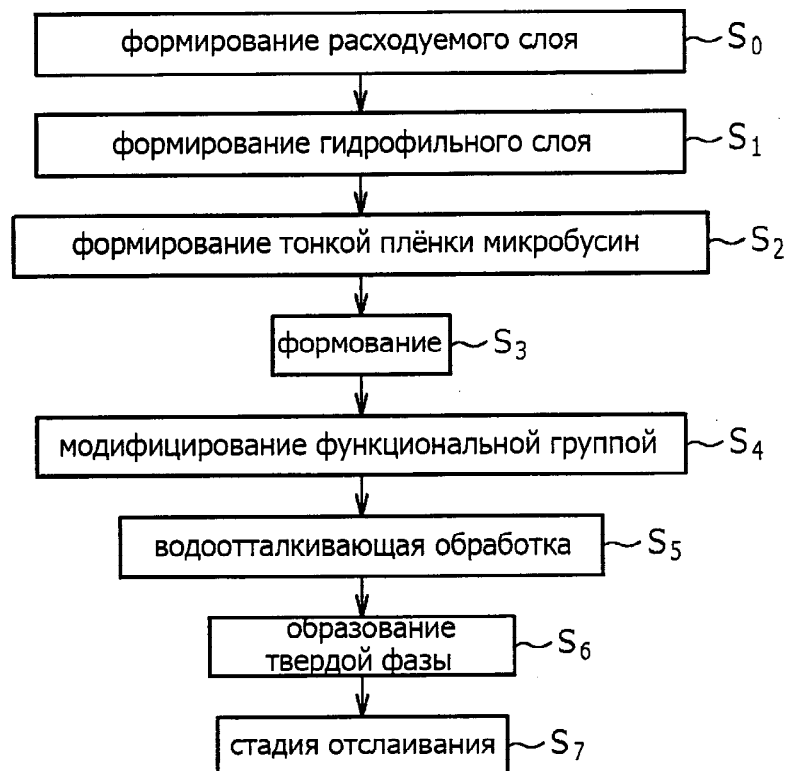
Фиг. 4



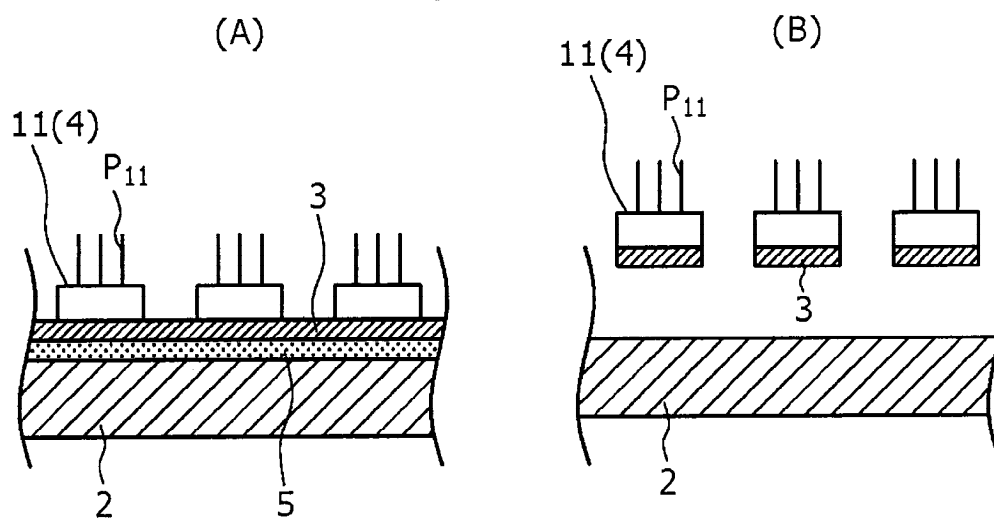
Фиг. 5



Фиг. 6

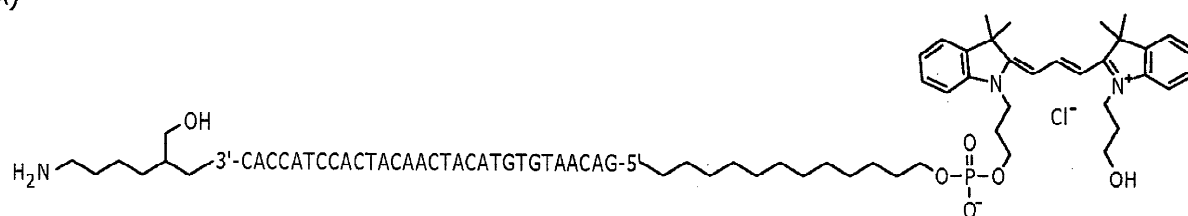


Фиг. 7

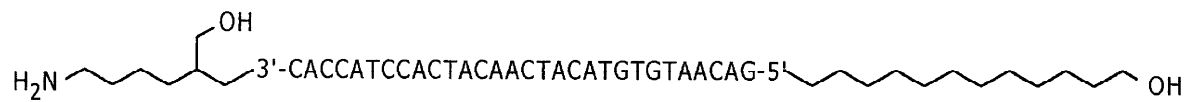


Фиг. 8

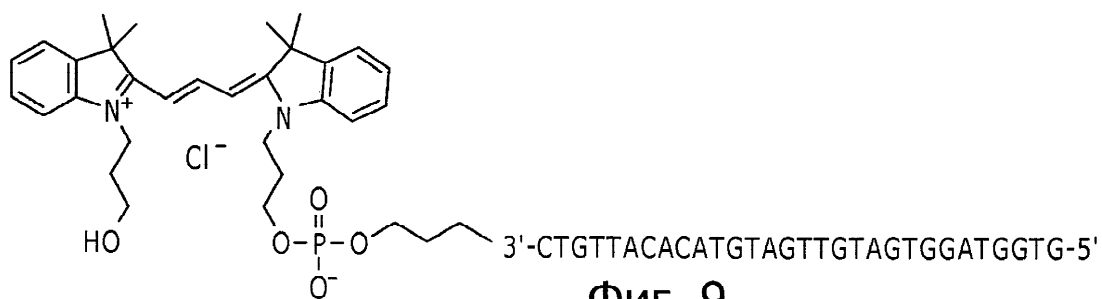
(A)



(B)



(C)



Фиг. 9