

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/48 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680046313.4

[43] 公开日 2008 年 12 月 17 日

[11] 公开号 CN 101326438A

[22] 申请日 2006.12.6

[21] 申请号 200680046313.4

[30] 优先权

[32] 2005.12.9 [33] US [31] 11/275,099

[86] 国际申请 PCT/US2006/046564 2006.12.6

[87] 国际公布 WO2007/070310 英 2007.6.21

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.10

[71] 申请人 3M 创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

[72] 发明人 库尔特·J·霍尔沃森

马克·F·舒尔茨

杰拉尔德·K·拉斯穆森

保罗·D·格雷厄姆

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 郭国清 樊卫民

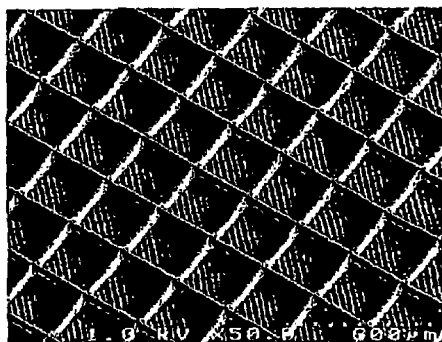
权利要求书 7 页 说明书 27 页 附图 1 页

[54] 发明名称

微复制型微阵列

[57] 摘要

本发明公开一种微阵列，所述微阵列包含微结构化表面和设置在所述微结构化表面的至少一部分上的附连化学层，所述微结构化表面包含具有壁的主要微结构化元件。



1. 一种微阵列，其包括微结构化表面和设置在所述微结构化表面的至少一部分上的附连化学层，所述微结构化表面包含具有壁的主要微结构化元件。

2. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述附连化学层为所述微结构化表面上的涂层。

3. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述附连化学层为所述微结构化表面上的官能化部分。

4. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述微结构化表面包含聚烯烃。

5. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述壁具有介于约 1 和约 50 微米之间的厚度。

6. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述壁具有介于约 5 和约 200 微米之间的高度。

7. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述主要微结构化元件的间距介于约 1 和约 1,000 微米之间。

8. 根据权利要求 7 所述的微阵列，其中所述主要微结构化元件的间距介于约 20 和约 200 微米之间。

9. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述主要微结构化元件具有介于约 1 至约 20,000pL 之间的体积。

10. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述主要微结构化元件为立方体元件。

11. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中基础表面在所述主要微结构化元件的壁之间延伸，并且所述基础包含具有 x-方向维度的次要微结构化元件。

12. 根据权利要求 11 所述的微阵列，其中所述次要微结构化元件的 x-方向维度比所述主要微结构化元件的壁的高度小至少约 5 微米。

13. 根据权利要求 12 所述的微阵列，其中所述次要微结构化元件的 x-方向维度比所述主要微结构化元件的壁的高度小至少约 50 微米。

14. 根据权利要求 11 所述的微阵列，其中所述次要微结构化元件从一个壁延伸至第二个壁。

15. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述附连化学层包含连接试剂。

16. 根据权利要求 15 所述的微阵列，其中所述连接试剂包含吡内酯部分。

17. 根据权利要求 1 所述微阵列，其中所述附连化学层包含含有至少一种吡内酯官能共聚物的交联水凝胶。

18. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述附连化学层具有离子表面。

19. 根据权利要求 18 所述的微阵列，其中所述附连化学层包含一种或多种离子聚合物、包括水解吡内酯部分的水凝胶、连接到水凝胶上的双官能分子、或具有一种或多种离子聚合物外敷层的水凝胶。

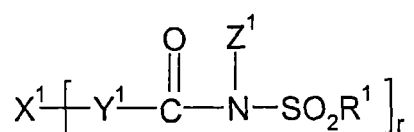
20. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述附连化学层为含硅层。

21. 根据权利要求 20 所述微阵列，其中所述附连化学层能够甲基硅烷化，使得连接试剂可以被共价地链接至所述附连化学层。

22. 根据权利要求 20 所述的微阵列，其中将所述含硅层用偶联剂或用官能化的聚合物涂层进行官能化。

23. 根据权利要求 20 所述的微阵列，其中所述附连化学层为类金刚石玻璃膜。

24. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述附连化学层包含连接到所述微结构化表面上的系链基团，所述系链基团包含所述微结构化表面上的互补官能团 G 与具有化学式 I 的化合物的反应产物，



I

其中

X^1 为基底反应性官能团，该基底反应性官能团选自羧基、卤代羧基、卤代碳酰氧基、氰基、羟基、巯基、异氰酸酯基、卤代甲硅烷基、烷氧基甲硅烷基、酰氧基甲硅烷基、叠氮基、氮丙啶基、卤代烷基、叔氨基、伯芳族氨基、仲芳族氨基、二硫化物、烷基二硫化物、苯并三唑基、磷酰基、偶磷基酰胺基、磷酸根、或烯属不饱和基团；

Y^1 为单键或二价基团, 所述二价基团选自亚烷基、杂亚烷基、亚芳基、羰基、羧基、羧基亚氨基、氧代、硫代、 $-NR^d-$, 其中 R^d 为氢或烷基、或它们的组合;

Z^1 为烷基、芳基或 $-(CO)R^a$, 其中 R^a 与 R^1 以及它们所连接的基团一起形成含有氮杂原子和硫杂原子的四元至八元杂环或杂二环基团, 其中所述杂环或杂二环基团可与可选的芳族基团、可选的饱和或不饱和环基、或可选的饱和或不饱和二环基稠合;

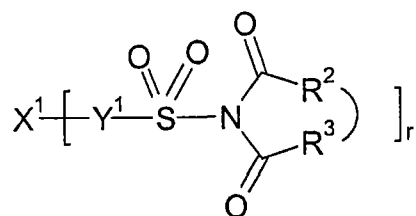
R^1 为烷基、氟代烷基、氯代烷基、芳基、 $-NR^bR^c$, 其中每个 R^b 和 R^c 为烷基或与它们所连接的氮原子一起形成四元至八元环基, 或 R^1 与 R^a 以及它们所连接的基团一起形成四元至八元杂环或杂二环基团, 所述杂环或杂二环基团可与可选的芳族基团、可选的饱和或不饱和环基、或可选的饱和或不饱和二环基稠合;

当 X^1 为一价基团时, r 等于 1, 或当 X^1 为二价基团时, r 等于 2;

G 为能够与 X^1 反应以形成离子键、共价键或它们的组合的互补官能团; 并且

所述系链基团是未取代的或被卤素、烷基、烷氧基、或它们的组合取代。

25. 根据权利要求 1 所述的微阵列, 其中所述附连化学层包含连接到所述微结构化表面上的系链基团, 所述系链基团包含所述微结构化表面上的互补官能团 G 与具有化学式 II 的化合物的反应产物,



II

其中

X^1 为基底反应性官能团, 该基底反应性官能团选自羧基、卤代羰基、卤代碳酰氧基、氰基、羟基、巯基、异氰酸酯基、卤代甲硅烷基、烷氧基甲硅烷基、酰氧基甲硅烷基、叠氮基、氮丙啶基、卤代烷基、叔氨基、伯芳族氨基、仲芳族氨基、二硫化物、烷基二硫化物、苯并三唑基、膦酰基、偶磷基酰胺基、磷酸根或烯属不饱和基团;

Y^2 为单键或二价基团, 所述二价基团选自亚烷基、杂亚烷基、亚芳基、羰基、羰氧基、羰基亚氨基、氧代、硫代、或 $-NR^a-$ 、或它们的组合, 其中 R^a 为氢、烷基、或芳基;

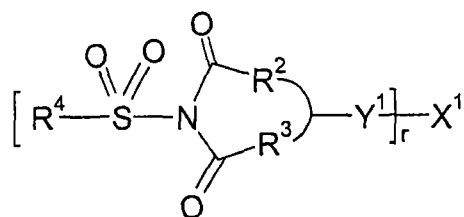
R^2 与 R^3 以及它们所连接的二羧酰亚胺基团一起形成四元至八元杂环或杂二环基团, 所述杂环或杂二环基团可与可选的芳族基团、可选的饱和或不饱和环基、或可选的饱和或不饱和二环基稠合;

当 X^1 为一价基团时 r 为 1, 或当 X^1 为二价基团时, r 等于 2;

G 为能够与 X^1 反应的互补官能团; 并且

所述系链基团是未取代的或被卤素、烷基、烷氧基、或它们的组合取代。

26. 根据权利要求 1 所述的微阵列, 其中所述附连化学层包含连接到所述微结构化表面上的系链基团, 所述系链基团包含所述微结构化表面上的互补官能团 G 与具有化学式 III 的化合物的反应产物,



III

其中

X^1 为基底反应性官能团, 该基底反应性官能团选自羧基、卤代羰基、卤代碳酰氧基、氰基、羟基、巯基、异氰酸酯基、卤代甲硅烷基、烷氧基甲硅烷基、酰氧基甲硅烷基、叠氮基、氮丙啶基、卤代烷基、

叔氨基、伯芳族氨基、仲芳族氨基、二硫化物、烷基二硫化物、苯并三唑基、膦酰基、偶磷基酰胺基、磷酸根或烯属不饱和基团；

R^2 与 R^3 以及它们所连接的二羧酰亚胺基团一起形成四元至八元杂环或杂二环基团，所述杂环或杂二环基团可与可选的芳族基团、可选的饱和或不饱和环基、或可选的饱和或不饱和二环基稠合；

Y^1 为单键或二价基团，所述二价基团选自亚烷基、杂亚烷基、亚芳基、羰基、羧基、羰基亚氨基、氧代、硫代、 $-NR^d-$ ，其中 R^d 为氢或烷基、或它们的组合；

R^4 为烷基、芳基、芳烷基或 $-NR^bR^c$ ，其中每个 R^b 和 R^c 为烷基或与它们所连接的氮原子一起形成四元至八元杂环基团；

当 X^1 为一价时， r 等于 1，或当 X^1 为二价基团时， r 等于 2；

G 为能够与 X^2 反应的互补官能团；并且

所述系链基团是未取代的或被卤素、烷基、烷氧基、或它们的组合取代。

27. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中所述附连化学层适于随后附加选自由下列组成的组的反应物：氨基酸、核酸、碳水化合物和蛋白质。

28. 根据权利要求 27 所述的微阵列，其中所述附连化学层适于随后附加选自由下列组成的组的反应物：DNA、酶和抗体。

29. 根据权利要求 1 所述的微阵列，其中将反应物附加到所述附连化学层上。

30. 根据权利要求 1 所述的微阵列，还包括可以被自动化体系检测到的基准标记。

31. 一种试剂盒，其包括根据权利要求 1 所述的微阵列和覆盖件。

32. 一种用于检测样本中分析物的方法，包括：

- (a) 提供根据权利要求 29 所述的微阵列；
- (b) 将样本沉积入所述微阵列的至少一个主要微结构化元件中，使得所述样本接触所述反应物并且形成复合物；
- (c) 检测任何复合物；和
- (d) 使所述复合物的存在或量与所述样本中分析物的存在或量相关联。

33. 一种用于检测样本中分析物的方法，包括：

- (a) 提供根据权利要求 29 所述的微阵列；
- (b) 将样本沉积入所述微阵列的至少一个主要微结构化元件中，使得所述样本接触所述反应物并且形成复合物；
- (c) 使所述复合物与第二反应物接触以形成三元复合物；
- (d) 检测任何三元复合物；和
- (e) 使所述三元复合物的存在或量与所述样本中分析物的存在或量相关联。

微复制型微阵列

技术领域

本发明涉及可用在（例如）基因测序和组合化学等应用中的微阵列，在另一方面，本发明涉及使用所述微阵列检测分析物的方法。

背景技术

微阵列可以用在多种应用中，诸如基因测序、监测基因表达、基因定位、细菌识别、药物发现、生物标记识别、和组合化学。

微阵列通常在平面基底（例如，硅晶片或玻璃显微镜载片）上生产。通常使用液体沉积技术将微阵列特征印或“点”到基底上。微阵列特征被各特征之间的“未经印刷的”空间隔开。然而，各特征之间的空间量取决于用来制造该微阵列的技术。

一般来讲，使用点样技术生产的微阵列具有较低的特征密度。例如，涉及在阵列表面上点微体积小滴的生产技术一般需要在各特征之间有足够的空间，以使得邻近小滴在制造过程中不互相接触（参见，例如，美国专利 No.6,613,893（Webb））。点大小、形状和干燥图案的控制取决于制造过程中诸如所沉淀的体积、溶液的粘度、溶液在表面上的润湿行为、以及环境条件（例如，温度和湿度）等因素。将液体禁闭到预定区域的努力包括（例如）使用交替层叠的亲水和疏水图案（参见，例如，美国专利 No.5,474,796（Brennan）和 No.6,630,358（Wagner 等人））、将液体放在三维柱的顶面上（参见，例如，美国专利 No.6,454,924（Jedrzejewski 等人））、以及在固态无孔基质中包含具有多孔区域的液体（参见，例如，美国专利 No. 6,383,748（Carpay 等人））。

发明内容

根据上述，我们认识到需要使用点样技术生产的高密度微阵列。

简言之，本发明提供可以使用诸如喷墨、高压、或接触印刷等点样技术生产的高密度微阵列。微阵列包含微结构化表面和设置在微结构化表面的至少一部分上的附连化学层。微结构化表面包含具有壁的主要微结构化元件。

在本发明的微阵列中，壁厚代表各特征之间未经印刷的空间。因此本发明的微阵列在各特征之间具有非常小的空间。此外，本发明的微阵列可以包括通常经由在平面基底（例如，密集填充的正方形）上直接印刷实现不了的特征形状。

在本发明的微阵列中，附连化学层容许反应物随后附加到其上。当期望经由共价键接来附加时，可以将较大体积的反应物放入由微阵列的壁形成的“微隔室”中而不增加特征的大小（即投影面积或“占有面积”）。因此为给定的区域增加了可利用的键合至表面的反应物的量。

本发明的微阵列的另一个优点是使经由使用酶连接的检测方案能够实现较高敏感性的检测。通过将溶液禁闭在微隔室内，防止所得的酶反应产物（例如，低分子量荧光分子）扩散到微隔室壁之外。

此外，本发明的微阵列的一致特征（由壁所限定）简化了微阵列图像的加工。在图像加工过程中最小限度的使用者干预是必需的。

通常，当将微阵列特征点到基底上时，使用点样技术生产的微阵列需要非常精确的配准。本发明的微阵列容许在点样过程中有更多公差。假如小滴沉淀在微隔室内，那么它将在微隔室内散布，但是仍被禁闭在微隔室壁内。小滴在微隔室内所处的准确位置并不重要。

因此，本发明的微阵列满足了使用点样技术生产高密度微阵列的需要。

在另一方面，本发明提供一种包括本发明的微阵列和覆盖件的试剂盒。

在另一个方面，本发明也提供一种用于检测样本中分析物的方法。所述方法包括(a)提供本发明的微阵列，其中反应物被附加到附连化学层上，(b)将样本沉积入微阵列的至少一个主要微结构化元件中，使得样本接触反应物并形成复合物，(c)使复合物与第二反应物接触以形成三元复合物，(d)检测任何三元复合物，和(e)使三元复合物的存在或量与样本中分析物的存在或量相关。

定义

对于本发明而言，以下定义应当具有所述的含义。

对于反应物和附连化学层，“附连”将包括向附连化学层附加反应物的任何模式。所述模式应当不受限制地包括共价键和离子键、诸如用粘合剂粘结、以及附连化学层内的物理捕集。在连接试剂的情况下，可以通过例如用酸洗液官能化表面而产生的连接试剂或通过所涂敷的连接试剂来将反应物附加到附连化学层上。

对于任何分子、化合物、组合物、或复合物，“两性的”是指既具有酸的特征又具有碱的特征。该术语包括既是阴离子又是阳离子的分子、化合物、组合物、或复合物（例如在其等电点的多肽）。

“分析物”是指在所关注的样本中或从所关注的样本中分离出来检测或测定的天然存在的或合成的分子、化合物、组合物、或复合物。分析物不受限制地包括蛋白质、肽、氨基酸、脂肪酸、核酸、碳水化

合物、激素、类固醇、类脂、维生素、细菌、病毒、药物、和代谢物。

“阵列”是指可用于任何化学或生物化学分析并且由隔离的区域或“样本点”构成的以整齐的布置方式提供的工具。阵列可用于例如基因测序、监测基因表达、细菌识别、药物发现、生物标记识别、组合化学等等。“微阵列”通常具有面积小于约 1 平方毫米，有时面积小于约 0.25 平方毫米，或甚至面积小于约 0.04 平方毫米的隔离区域或样本点。

“附连化学层”是指可以固定、附连或可逆地附连反应物到其上的任何层、表面、或涂层。附连化学层可以为（例如）设置在微结构化表面上的涂层，或者它可以为微结构化表面的官能化部分。

对于任何分子、化合物、组合物或复合物，“双官能的”指含有超过一个官能团。例如，双官能的分子可以含有一个能够与吡内酯部分形成共价键的氨基和一个能够与阳离子形成离子键的阴离子基团。

“结合位点”是指设置在附连化学层上的离散位置，其中反应物可以附连到那里。

“互补官能团”是指能够与所述基团反应以形成离子键、共价键、或它们的组合的基团。例如，互补官能团可以为能够与化学式 I、II 或 III 中的基团 X^I 反应的附连化学层上的基团。

“官能团”是指分子、化合物、组合物、或复合物中的原子的组合，该组合趋于作为单一的化学整体起作用。官能团的实例包括但不限于 $-NH_2$ （胺）、 $-COOH$ （羧基）、硅氧烷、 $-OH$ （羟基）、和吡内酯。

“离子”是指具有形式电荷的任何化学物质，也就是说，在所述

物质的至少一个原子上具有过量（负形式电荷）或不足（正形式电荷）的电子。如果聚合物的表面包含至少一种具有形式电荷的化学物质，那么它就是“离子的”，即使该聚合物涂层与具有相反形式电荷的抗衡离子（例如在溶液中）相关。即使聚合物表面本身具有形式正电荷或负电荷，抗衡离子也可以产生一个具有净电中性的表面。

“连接试剂”是指能够将反应物附加到附连化学层上的任何化学物质。

“微结构化元件”将是指或者突出或者被压低的可识别几何形状。

“主要微结构化元件”是指表面上的微结构化元件，该主要微结构化元件在同一表面上具有最大规模的任何微结构化元件。

“次要微结构化元件”是指在同主要微结构化元件同样的表面上较小规模的微结构化元件。

“反应物”是指任何化学分子、化合物、组合物或复合物，它们或者是天然存在的或者是合成的，能够或者独自或者同一个分子或化合物（帮助将分析物结合至附连化学层，诸如（例如）辅酶）一道结合所关注的样本中的分析物。本发明的反应物可用于化学或生物化学测定、检测或分离。这些反应物的实例不受限制地包括氨基酸、核酸，包括低(聚)核苷酸和 cDNA、碳水化合物、以及诸如酶和抗体等蛋白质。

“系链化合物”是指含有两个活性基团的化合物。基团（即，基底反应性官能团）之一可以与基底表面（例如，微结构化表面或附连化学层与微结构化表面之间的任何居间层）上的互补官能团反应，以形成系链基团。另一个活性基团（即，N-磺酰胺基羰基或 N-磺酰基二甲酰亚胺基）可以与含胺材料反应。系链化合物的两个活性基团的反应导致在基底与含胺材料之间形成连接基团（含胺材料可以被固定在

基底上)。

“系链基团”是指连接到基底上的基团，该基团由含有两个活性基团的化合物（其中在基底表面上有一个互补官能团）与系链化合物的反应而产生。系链基团包括 N-磺酰胺基羰基或 N-磺酰基二甲酰亚胺基。

附图说明

图 1 为 本发明的一个微阵列的剖视图。

图 2 为本发明的另一个微阵列的剖视图。

图 3 为具有制备性实例 1 中所描述的微结构化表面的膜的扫描电子显微照片。

图 4 为具有制备性实例 1 中所描述的微结构化表面的膜中的荧光图案的图像。

具体实施方式

图 1 示出本发明的微阵列的一个实例。微阵列包含微结构化表面 10 和附连化学层 12。微结构化表面 10 包含具有壁 14 的主要微结构化元件 11(在图 1 中描绘为凹陷的微结构化元件)。虽然在图 1 中将附连化学层描绘为覆盖整个微结构化表面，但是实际上可以主要将附连化学层设置在微结构化表面的仅一部分上。

微结构化表面

微结构化表面包含具有壁的主要微结构化元件。壁一般具有介于约 1 和约 50 微米之间；优选介于约 1 和约 30 微米之间；更优选介于约 5 和约 30 微米之间的厚度。

一般来讲，选择主要微结构化元件的几何构造以具有足够的容量来控制包含反应物或分析物的单独滴或某一体积的溶液的放置。在一些实施例中，选择几何构造使得微结构化元件间距（即，微结构化元

件之间的中心至中心距离) 介于约 1 和约 1,000 微米之间; 优选介于约 10 和约 500 微米之间; 更优选介于约 50 和约 400 微米之间。

主要微结构化元件可以具有任何结构。例如, 用于主要微结构化元件的结构可以从具有平行竖直平壁的立方体元件的极端变化到半球状元件的极端, 其中在这两个极端之间存在任何可能的壁的实心几何构造。具体实例包括立方体元件、圆柱体元件、具有有角平壁的锥形元件、具有有角平壁的截平的棱锥元件、蜂巢元件和立体角成型元件。其它可用的微结构化元件在 PCT 专利公开 WO 00/73082 和 WO 00/73083 中有所描述。

外形的图案可以为规则的、无规的、或两者的组合。“规则的”指图案是经过设计的并且是可重复的。“无规的”指微结构化元件的一个或多个特征以不规则的方式变化。变化的特征的实例包括(例如)微结构化元件间距、峰至谷距离、深度、高度、壁角度、边缘半径等等。组合图案可以包括(例如)在一个距任何点具有十个微结构化元件宽度的最小半径的区域上的无规图案, 但是这些无规图案可以在整个图案内较大的距离上重复。本文使用术语“规则的”、“无规的”和“组合”来描述通过其上具有微结构化图案的工具的一个重复距离赋予一段坯料的图案。例如, 当工具为圆筒形轧辊时, 一个重复距离相应于轧辊的一次旋转。在另一个实施例中, 工具可以为板, 并且重复距离将相应于该板的一个或两个尺寸。

主要微结构化元件的体积(即, 由微结构化元件所限定的空隙体积)可以在约 1 至约 20,000 皮升(pL); 优选约 1 至约 10,000pL 的范围内。某些实施例具有约 3 至约 10,000pL; 优选约 30 至约 10,000pL; 更优选约 300 至约 10,000pL 的体积。

描述主要微结构化元件的结构的特性的另一种方式为通过纵横比来描述微结构化元件。“纵横比”是凹陷的微结构化元件的深度与宽

度的比或突出的微结构化元件的高度与宽度的比。凹陷的微结构化元件可用的纵横比通常在约 0.01 至约 2；优选约 0.05 至约 1；更优选约 0.05 至约 0.8 的范围内。突出的微结构化元件可用的纵横比通常在约 0.01 至约 15；优选约 0.05 至约 10；更优选约 0.05 至约 8 的范围内。

主要微结构化元件的总高取决于微结构化元件的形状、纵横比和期望体积。微结构化元件的高度可以在约 5 至约 200 微米的范围内。在一些实施例中，高度在约 20 至约 100 微米；优选约 30 至约 90 微米范围内。

主要微结构化元件间距通常在约 1 至约 1,000 微米范围内。某些实施例具有约 10 至约 500 微米；优选约 50 至约 400 微米。微结构化元件间距可以为一致的，但这并不总是必需的或可取的。在一些实施例中，一致的微结构化元件间距可能没有必要或不可取，所有特征是相同的也可能没有必要或不可取。因此，可出现不同类型的特征，例如，具有不同类型微结构化元件间距的微结构化元件可以包含本发明的微阵列的微结构化表面。各个元件的平均峰至谷距离一般为约 1 至约 200 微米。

如图 2 所描绘，在一些实施例中，本发明的微阵列包含次要微结构化元件 28，该元件可以（例如）改善各微结构化元件内的润湿/一致的液体分配。主要微结构化元件 21 具有在壁 24 之间延伸的基础表面 23。主要微结构化元件基础 23 可以（例如）包括次要微结构化元件 28（优选的是次要微结构化元件从一个壁延伸至第二个壁）。虽然在图 2 中将附连化学层 22 描绘为覆盖整个微结构化表面 20，但实际上可将附连化学层主要设置在主要或次要微结构化元件的仅一部分上。次要微结构化元件在 x-方向（即，大致垂直于基础表面）具有维度，以及长度和宽度。一般来讲，x-方向维度介于约 0.1 和约 50 微米之间；优选介于约 0.1 和约 20 微米之间。在一些实施例中，x-方

向维度介于约 0.1 和约 10 微米之间；优选介于约 0.1 和约 5 微米之间。

在一些实施例中，次要微结构化元件的 x-方向维度比主要微结构化壁的高度小至少约 5 微米。例如，次要微结构化元件的 x-方向维度比主要微结构化壁的高度小至少 20 微米。在具体的实施例中，次要微结构化元件的 x-方向维度比主要微结构化壁的高度小至少 50 微米；优选小至少 70 微米。

次要微结构化元件可以形成任何图案，例如平行元件、非平行元件、或平行与非平行元件的任何组合。次要微结构化元件可以在许多点处相交，例如，直的平行元件、和在 90 度角处相交的元件。

在一些实施例中，次要微结构化元件另外具有体积（例如，由在 90 度处相交的次要微结构化元件所限定的体积，或由次要微结构化元件和与主要微结构化壁的交点所限定的体积）。在上述实施例中，主要微结构化元件的体积与一个次要微结构化元件的体积的比介于约 5 和约 2,000,000 之间。例如，该比可以介于约 50 和约 1,000,000 之间；优选介于约 150 和约 150,000 之间；更优选介于约 35 和约 500 之间。

微结构化表面通常包含聚合物，然而它可以包含玻璃或适合于下文所述的涂敷、浇注、或压缩技术的任何其它材料。优选的是，微结构化表面包含不干涉由期望的分析物响应激发能所发出的电磁信号的材料（例如，不传输类似于由期望的分析物响应激发能所发出的电磁信号的激发能或电磁能的材料）。可由分析物发出的电磁信号的实例包括荧光、吸光度、电流、化学发光等等。

可用于微结构化表面的聚合物薄膜的非限制性实例包括热塑性塑料，诸如聚烯烃（例如聚丙烯或聚乙烯）、聚氯乙烯、烯烃的共聚物

（例如，丙烯的共聚物）、乙烯与乙酸乙烯或乙烯醇的共聚物、氟化热塑性塑料，诸如六氟丙烯和其表面改性形式的二元共聚物和三元共聚物、聚对苯二酸乙酯及其共聚物、聚氨酯、聚酰亚胺、丙烯酸聚合物、以及使用诸如硅酸盐、硅石、铝酸盐、长石、滑石、碳酸钙、二氧化钛等填料的上述物质的填充形式。由上文所列材料制成的共挤出膜和层合膜也是有用的。优选的是，微结构化表面包含聚氯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、或它们的共聚物。

可以许多方式来制成微结构化表面，诸如使用浇注、涂敷、或压缩技术。例如，微结构化表面的微结构化可以通过以下方法中的至少任何一种来实现：(1)使用具有微结构化图案的工具浇注熔化的热塑性塑料，(2)将流体涂敷到具有微结构化图案的工具上，固化该流体，然后移除所得薄膜，或(3)使热塑性膜穿过展平辊以紧靠具有微结构化图案的工具压缩。可以使用本领域内的技术人员已知的许多技术中的任何一种来形成该工具，技术的选择部分取决于工具材料和所期望外形的特征。示例性的技术包括蚀刻（例如，经由化学蚀刻、机械蚀刻、或其它烧蚀方式，诸如激光烧蚀或活性离子蚀刻等）、光刻法、立体光照型技术、显微机械加工、压花纹（例如，切削压花纹或酸增强压花纹）、刻痕或切削等。形成微结构化表面的可供选择的方法包括热塑性挤出、固化流体涂敷方法、和压花热塑性层（也可以被固化）。

挤出方法包括使挤出的材料或预成形的基底穿过由冷轧辊和刻有期望微结构的反相图案的浇注轧辊所产生的辊隙。或者，将输入膜进料入挤出涂布机或挤出机中。聚合物层被热熔融涂敷（挤出）到输入膜上。然后将聚合物层形成微结构化表面。

可以在连续方法中使用辊隙完成压延，如膜处理领域所知。在本发明中，使具有合适表面并且具有足以承受期望微结构化图案的厚度的坯料穿过由两个圆筒形轧辊形成的辊隙，其中一个辊具有刻入其表面中的与期望结构反相的图像。表面层在辊隙处接触雕刻的滚筒，以

形成微结构化图案。

附连化学层

本发明的微阵列包括设置在微结构化表面的至少一部分上的附连化学层。附连化学层适于使反应物随后附加到其上。

多种附连化学层可用于本发明的微阵列，前提条件是附连化学层适于附连反应物并且与将在具体微阵列上进行的测定和伴随条件相容。

在一些实施例中，将附连化学层进行官能化，使得它包含连接试剂。连接试剂的选择可以基于将被附加到微阵列上的反应物和该微阵列将被使用的用途。优选的连接试剂包括吡内酯部分，诸如由美国专利 No.4,304,705 (Heilmann 等人)、No.4,451,619 (Heilmann 等人)、No.5,262,484 (Coleman 等人)、No.5,344,701 (Gagnon 等人) 和 No.5,403,902 (Heilmann 等人) 中提出的共聚物提供的那些。特别优选的共聚物为使用诸如丙烯酰胺和丙烯酰胺衍生物、羟基乙基丙烯酸酯和异丁烯酸酯等亲水性或水溶性共聚用单体制备的那些。

除了上文所述的吡内酯共聚物之外，合适的吡内酯官能化合物还包括诸如美国专利 No.4,485,236 (Rasmussen 等人) 和 No.5,149,806 (Moren 等人) 中所公开的那些。

也可以利用吡内酯官能水凝胶涂层，诸如美国专利 No.6,794,458 (Haddad 等人) 中所公开的那些。可以通过首先制备亲水性吡内酯官能共聚物（例如上述吡内酯官能共聚物之一）的溶液来制备吡内酯官能水凝胶。然后将该共聚物与合适的交联剂一起配制，然后将混合物涂敷或应用到微结构化表面上。交联剂与共聚物的吡内酯基团的一部分反应，从而形成多孔的交连水凝胶。然后水凝胶涂层中未反应的吡内酯基团可用于附连功能性材料，用于适当的最终用途。

除了吡内酯连接试剂之外，也可以利用包括其它连接试剂的共聚物。这些连接试剂包括（例如）环氧基、羧酸、羟基、胺、N-羟基琥珀酰亚胺、异-和异硫氰酸酯、酐、醛、以及其它基团，这些都是本领域中熟知的用于固定反应物的。包含连接试剂的共聚物可以通过本领域熟知的步骤增长或链增长聚合方法来制备。

吡内酯部分是可用的，因为这些部分适于同许多反应物（包括低(聚)核苷酸）反应。吡内酯部分一般为水解稳定的，因此当用在本发明的应用中时具有较长的储藏期限。这些部分一般也表现出与多种反应物的较高反应性。

附连化学层也可以为离子涂层，如美国专利 No.6,783,838（Coleman 等人）中所公开。离子涂层可以包括（例如）一种或多种离子聚合物、包括水解吡内酯部分的水凝胶、附加到水凝胶上的双官能分子、或具有一种或多种离子聚合物过敷层的水凝胶。

离子聚合物可以为阳离子的或阴离子的。用于形成阳离子聚合物涂层的合适材料包括但不限于由含胺单体形成的聚合物和共聚物，所述含胺单体诸如 2-乙烯基吡啶、3-乙烯基吡啶、4-乙烯基吡啶、(3-丙烯酰胺丙基)三甲基氯化铵、2-二乙基氨基乙基丙烯酸酯、2-二乙基氨基乙基异丁烯酸酯、3-二甲基氨基丙基丙烯酸酯、3-二甲基氨基丙基异丁烯酸酯、2-氨基乙基异丁烯酸酯、二甲基氨基乙基丙烯酸酯和异丁烯酸酯、2-丙烯酰氧基乙基三甲基氯化铵、二烯丙基二甲基氯化铵、2-甲基丙烯酰氧基乙基三甲基氯化铵、3-甲基丙烯酰氧基-2-羟基丙基三甲基氯化铵、3-氨基丙基甲基丙烯酰胺、二甲基氨基乙基甲基丙烯酰胺、二甲基氨基丙基丙烯酰胺、以及其它类似取代的丙烯酰胺和异丁烯酰胺；4-乙烯基苄基三甲基氯化铵、4-乙烯基-1-甲基溴化吡啶、乙烯亚胺、赖氨酸、烯丙胺、乙烯胺、尼龙和脱乙酰壳多糖。用于形成阴离子聚合物涂层的合适材料包括但不限于不饱和酸的聚合物和共聚物，这些酸诸如丙烯

酸、异丁烯酸、马来酸、富马酸、衣康酸、乙烯基苯甲酸、N-丙烯酰氨基酸或 N-异丁烯酰氨基酸；2-羧乙基丙烯酸酯；乙烯基磷酸；乙烯基膦酸；单丙烯酰氧基乙基磷酸酯；磺乙基异丁烯酸酯；磺基丙基异丁烯酸酯；3-磺基丙基二甲基-3-甲基丙烯酰胺丙基铵内盐；苯乙烯磺酸；2-丙烯酰胺-2-甲基-1-丙烷磺酸(AMPS)；磺化多糖，诸如肝素、硫酸皮肤素和硫酸葡聚糖；羧化聚氯乙烯；以及羧化多糖，诸如艾杜糖醛酸、羟甲基纤维素或藻酸。

在另一个实施例中，离子涂层可以包括水凝胶。如本文所用，水凝胶意指含水的凝胶；即，亲水的并且将吸收水，然而不溶于水的聚合物。水凝胶可以形成能够在水中吸收（例如）三至五倍其干重的多孔表面涂层。这会提供适于进行大量生物学、化学和生物化学测定的亲水性环境。

在某些实施例中，离子涂层可以包括连接试剂。可用的连接试剂包括上述的那些。如果需要，可以使用超过一种类型的连接试剂。当存在时，连接试剂可以为离子涂层的整体组分，或可以在后续的步骤中附连到离子表面涂层上。本领域中已知的许多方法可用于引入将被附加到离子涂层上的连接试剂。应当理解，附加模式可以根据所采用的连接试剂而变化。

在可供选择的实施例中，离子涂层包括设置在上述离子涂层（“离子表面涂层”）之一上的离子聚合物涂层（“离子聚合物外敷层”）。离子聚合物外敷层可以为阳离子的、阴离子的、或两性的。可能期望包括离子表面的离子聚合物外敷层与反应物形成离子键，以使得分析物随后可以被检测或测定。

离子聚合物外敷层可用于同任何表面涂层结合。例如，离子聚合物外敷层可以被应用到包括含吡内酯共聚物的水凝胶的非离子表面涂层上。在这样的一个实施例中，离子聚合物涂层具有将与吡内酯聚合

物共价反应的官能团会是有利的。作为另外一种选择,离子聚合物外敷层可以被应用到包括非吡内酯离子聚合物的离子表面涂层上。在这样的一个实施例中,具有表面涂层和相反形式电荷的外敷层会是有利的。这样,各涂层上的形式电荷将在表面涂层与外敷层之间形成离子键。另外,可以有多重外敷层。上述可用于非吡内酯离子聚合物表面涂层的材料同样适用于离子聚合物外敷层。这些材料中的任何一种可以在离子聚合物外敷层中交连。可以选择离子聚合物外敷层来提供具体应用所需的特殊质量。例如,可对于其中将附连一种或多种阴离子多肽(例如蛋白质)的应用选择阳离子外敷层。

在本发明的又一个实施例中,离子表面涂层可以包括附加到连接试剂上的双官能小离子分子,诸如氨基官能离子分子。就氨基官能离子分子的情况来说,该胺与(例如)表面涂层的连接试剂中的吡内酯部分形成共价键。分子的离子部分为离子表面涂层提供离子特征。离子特征的程度由选择用于使用的具体离子分子决定。这样,离子表面涂层具有离子特征而不需要聚合物外敷层。也含有与连接试剂的任何部分反应的官能团的任何离子分子都可适用于本发明。合适的胺官能离子分子包括但不限于氨基酸(例如,. α .-、. β .-、. γ .-等氨基酸,诸如甘氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、. β .-丙氨酸、. γ .-氨基丁酸和12-氨基月桂酸);氨基磺酸,诸如2-氨基乙烷磺酸(牛磺酸)和3-氨基-1-丙烷磺酸;氨基膦酸或磷酸,诸如2-氨基乙烷膦酸、2-氨基乙基二氢磷酸酯、2-氨基乙基硫代磷酸钠盐和氨基丙基膦酸;以及聚胺,诸如N,N-二甲基氨基乙胺、N,N-二乙基氨基丙胺、N-氨基丙基吗啉、2-(2-氨基乙基)吡啶、2-氨基乙基三甲基氯化铵、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、四亚乙基五胺、2-氨基乙基哌啶和N-(2-氨基乙基)1,3-丙烷二胺。

附连化学层也可以为含硅层,如美国专利 No.6,881,538 (Haddad 等人)中所公开。可用于本发明的含硅层优选能够甲基硅烷化,使得连接试剂可以共价地键接至该层。据信,甲基硅烷化可以进行是因为Si-OH基团的存在,但这不是必需的条件。此类连接试剂可以为传统

用于官能化硅石（例如玻璃）表面的那些。该材料适用于反应物随后附加到其上，但未必需要连接试剂来将反应物附连到含硅层上。可以通过（例如）用偶联剂官能化含硅层，或通过在其上涂敷官能化聚合物（例如，吡内酯官能聚合物）来提供连接试剂。

官能化的类型将取决于反应物的类型。使硅石材料的表面具有化学活性的多种传统方法是已知的，并且可以用在本发明中，优选的是，利用这些方法在含硅层上产生用于随后附加反应物的连接试剂。这些方法还包括使用硅烷偶联剂，诸如氨基硅烷以提供氨基官能团、羧基硅烷以提供羧基官能团、环氧硅烷以提供环氧官能团、巯基硅烷（例如，具有化学式 HS-L-Si(X)(Y)(Z) 的那些，其中 L 为二价有机连接基团，X 为可水解的基团，诸如烷氧基、酰氧基、胺或氯，Y 和 Z 为可水解或不可水解的基团）以提供巯基官能团、羟基硅烷以提供羟基官能团等等。这些甲基硅烷化反应（即，硅烷化反应）的条件一般是本领域的技术人员已知的。其它甲基硅烷化反应的实例在 Van Der Voort 等人, *J. Liq. Chrom. & Rel Technol.*, 第 19 期, 第 2723 至 2752 页（1996 年）；Sudhakar Rao 等人, *Tet. Lett.*, 第 28 期, 第 4897 至 4900 页（1987 年）；Joos 等人, *Anal. Biochem.*, 第 247 期, 第 96 至 101 页（1997 年）；Aebersold 等人, *Anal. Biochem.*, 第 187 期, 第 56 至 65 页（1990 年）；以及 PCT 专利公开 WO 98/39481 中有所描述。

含硅层可以为薄膜或涂层。薄膜通常包括等离子和/或蒸汽沉淀的含硅原子的材料，诸如氧化硅膜、氮化硅膜、氮氧化硅膜、等离子聚合的聚硅氧烷膜、加氢和非加氢的非晶态含硅膜、掺硅杂质的类金刚石碳膜等等。参见例如美国专利 No.6,696,157（David 等人）和 No.6,795,636（Cronk 等人）以及 J.Mort & F.Jansen 编辑的 *Plasma Deposited Thin Films*, CRC Press, Boca Raton, Fla.（1986 年）。涂层通常包括由液体沉淀的含硅原子的材料，诸如聚硅氧烷、由水解反应形成的氧化硅等等。此类含硅层会形成可以在反应性方面模仿硅石（例

如玻璃)基底并且与连接试剂和反应物交互作用的表面。

优选的含硅层包括类金刚石玻璃膜。如本文所用,术语“类金刚石玻璃膜”是指包括碳、硅、和氧的基本或完全非晶态膜。薄膜可以为共价耦合的或互相贯穿的。本发明的非晶态类金刚石膜可以包含原子的簇,该簇给出短距离的排序但基本没有导致微观或宏观结晶度的中长距离排序,该结晶度反过来可以分散具有 180nm 至 800nm 的波长的光化学辐射。类金刚石玻璃(DLG)包括含有基本量的硅和氧(像在玻璃中一样)的非晶态碳体系,但是仍保留类金刚石的特性。在这些膜中,在无氢的基础上,有至少约 30% 碳、大量的硅(至少约 25%)和不超过约 45% 氧(本文所涉及的组合物百分比是指原子百分比)。相当高量的硅与显著量的氧和大量的碳的独特组合使这些膜高度透明并且柔韧(不像玻璃)。

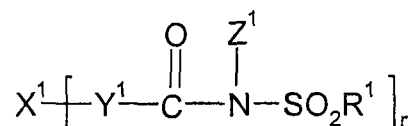
如果需要,包括含硅层的本发明的微阵列也可以包括聚合物涂层(通常在含硅层的上面)。此类聚合物涂层可以在含硅层上提供多种连接试剂。作为另外一种选择,可以将它们应用到已经包括连接试剂的含硅层上。

合适的聚合物涂层包括适用于附连反应物并且与将在具体微阵列上进行的测定和伴随条件相容的那些。实例包括描述于 PCT 专利公开 WO 99/53319 的聚合物涂层。合适的连接试剂为吡内酯部分(诸如上述的那些)、环氧基、羧酸、羟基、胺、N-羟基琥珀酰亚胺、异-和异硫氰酸酯、酐、醛、以及本领域中熟知的用于固定反应物的其它基团。优选的聚合物涂层包含使用诸如丙烯酰胺和丙烯酰胺衍生物、羟基乙基丙烯酸酯和异丁烯酸酯等亲水性或水溶性共聚用单体制备的共聚物。

附连化学层也可以包括含 N-磺酰胺羰基化合物或含 N-磺酰基二甲酰亚胺基化合物,诸如描述于美国专利申请专利公开号 05/0107615

和 05/0227076 的那些。

例如，附连化学层可以包含连接到微结构化表面上的系链基团，该系链基团包含微结构化表面上的互补官能团 G 与具有化学式 I 的化合物的反应产物



I

其中

X^1 为基底反应性官能团，该官能团选自羧基、卤代羰基、卤代碳酰氧基、氰基、羟基、巯基、异氰酸酯基、卤代甲硅烷基、烷氧基甲硅烷基、酰氧基甲硅烷基、叠氮基、氮丙啶基、卤代烷基、叔氨基、伯芳族氨基、仲芳族氨基、二硫化物、烷基二硫化物、苯并三唑基、膦酰基、偶磷基酰胺基(phosphoroamido)、磷酸根、或烯属不饱和基团；

Y^1 为单键或二价基团，该基团选自亚烷基、杂亚烷基、亚芳基、羰基、羰氧基、羰基亚氨基、氧代、硫代、 $-NR^d-$ ，其中 R^d 为氢或烷基、或它们的组合；

Z^1 为烷基、芳基或 $-(CO)R^a$ ，其中 R^a 与 R^1 以及它们所连接的基团一起形成具有氮杂原子和硫杂原子的四元至八元杂环或杂二环基团，其中所述杂环或杂二环基团可与可选的芳族基团、可选的饱和或不饱和环基、或可选的饱和或不饱和二环基稠合；

R^1 为烷基、氟代烷基、氯代烷基、芳基、 $-NR^b R^c$ ，其中每个 R^b 和 R^c 为烷基或与它们所连接的氮原子一起形成四元至八元环基，或 R^1 与 R^a 以及它们所连接的基团一起形成四元至八元杂环或杂二环基团，所述杂环或杂二环基团可与可选的芳族基团、可选的饱和或不饱和环基、或可选的饱和或不饱和二环基稠合；

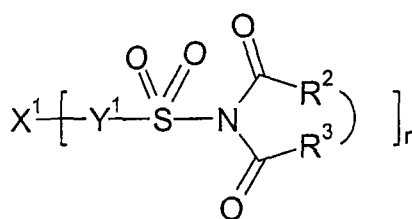
当 X^1 为一价基团时 r 等于 1，或当 X^1 为二价基团时， r 等于 2；

G 为能够与 X^1 反应以形成离子键、共价键、或它们的组合的互

补官能团；并且

系链基团是未取代的或被卤素、烷基、烷氧基、或它们的组合取代。

在另一个实施例中，附连化学层包含连接到微结构化表面上的系链基团，该系链基团包含微结构化表面上的互补官能团 G 与具有化学式 II 的化合物的反应产物



II

其中

X^1 为基底反应性官能团，该官能团选自羧基、卤代羰基、卤代碳酰氧基、氰基、羟基、巯基、异氰酸酯基、卤代甲硅烷基、烷氧基甲硅烷基、酰氧基甲硅烷基、叠氮基、氮丙啶基、卤代烷基、叔氨基、伯芳族氨基、仲芳族氨基、二硫化物、烷基二硫化物、苯并三唑基、膦酰基、偶磷基酰胺基、磷酸根或烯属不饱和基团；

Y^2 为单键或二价基团，该基团选自亚烷基、杂亚烷基、亚芳基、羰基、羰氧基、羰基亚氨基、氧代、硫代、或 $-\text{NR}^a$ 、或它们的组合，其中 R^a 为氢、烷基、或芳基；

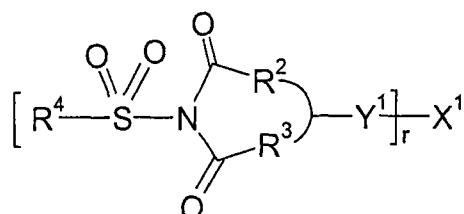
R^2 与 R^3 以及它们所连接的二羧酰亚胺基团一起形成四元至八元杂环或杂二环基团，所述杂环或杂二环基团可与可选的芳族基团、可选的饱和或不饱和环基、或可选的饱和或不饱和二环基稠合；

当 X^1 为一价基团时 r 为 1，或当 X^1 为二价基团时， r 等于 2；

G 为能够与 X^1 反应的互补官能团；并且

系链基团是未取代的或被卤素、烷基、烷氧基、或它们的组合取代。

在本发明的又一个实施例中，附连化学层包含连接到微结构化表面上的系链基团，该系链基团包含微结构化表面上的互补官能团 G 与具有化学式 III 的化合物的反应产物



III

其中

X^1 为基底反应性官能团，该官能团选自羧基、卤代羰基、卤代碳酰氧基、氰基、羟基、巯基、异氰酸酯基、卤代甲硅烷基、烷氧基甲硅烷基、酰氧基甲硅烷基、叠氮基、氮丙啶基、卤代烷基、叔氨基、伯芳族氨基、仲芳族氨基、二硫化物、烷基二硫化物、苯并三唑基、膦酰基、偶磷基酰胺基、磷酸根或烯属不饱和基团；

R^2 与 R^3 以及它们所连接的二羧酰亚胺基团一起形成四元至八元杂环或杂二环基团，所述杂环或杂二环基团可与可选的芳族基团、可选的饱和或不饱和环基、或可选的饱和或不饱和二环基稠合；

Y^1 为单键或二价基团，该基团选自亚烷基、杂亚烷基、亚芳基、羰基、羰氧基、羰基亚氨基、氧代、硫代、 $-\text{NR}^d-$ ，其中 R^d 为氢或烷基、或它们的组合；

R^4 为烷基、芳基、芳烷基或 $-\text{NR}^b\text{R}^c$ ，其中每个 R^b 和 R^c 为烷基或与它们所连接的氮原子一起形成四元至八元杂环基团；

当 X^1 为一价时 r 等于 1，或当 X^1 为二价基团时， r 等于 2；

G 为能够与 X^2 反应的互补官能团；并且

系链基团是未取代的或被卤素、烷基、烷氧基、或它们的组合取代。

一般来讲，附连化学层的官能化类型将取决于所采用的微结构化表面和反应物的类型。本领域内的技术人员将会知道，使聚合物材料的表面具有化学活性的多种方法是已知的，并且可以用在本发明中，使用这些方法在含硅层上产生用于随后附加反应物的连接试剂。

可以通过本领域已知的任何合适方式将附连化学层应用到微结构化表面上。适当的应用方式当然将取决于所采用的附连化学层的类型。

一些附连化学层例如吡内酯层、离子涂层、含 N-磺酰基二甲酰亚胺基化合物和含 N-磺酰胺基羰基化合物可以通过本领域已知的传统方式应用，例如，挤压涂布、模具涂布、浸涂、气刀涂覆、凹版印刷涂覆、淋幕式涂布、喷涂、使用线绕涂覆杆等等。

在一些实施例中，可以（例如）交连或另外处理附连化学层，以使该涂层不溶解、改变其玻璃化转变温度(Tg)、或改变其附着特性。例如，具有低 Tg 的共聚物可以与交联剂一起配制，以便提高结果所得涂层的 Tg。

通常，涂层介于约 0.01 和约 10 微米之间。小于约 1 微米的涂层是优选的，以便最小化在使用较厚涂层时可能产生的扩散困难。所关注的分析物在接触附加到其上的反应物之前可能必须扩散穿过附连化学层。如果涂层较厚，例如大于约 10 微米，那么所需的扩散时间会使分析物/反应物交互作用的动力学减速。

如果需要，可以通过本领域内的技术人员已知方法中的任何一种来提高涂层对基底（即，微结构化表面或任何居间层）的附着力。这些方法包括多种对微结构化表面的预处理或微结构化表面上的涂层，例如，电晕或等离子处理，或通过应用底漆。合适的底漆可以不受限制地包括聚氮丙啶、聚偏二氯乙烯、诸如描述于美国专利 No.5,602,202 (Groves) 的底漆和无机金属氧化物与二官能硅烷结合的胶状分散体，

诸如美国专利 No.5,204,219 (Van Ooij 等人)、No.5,464,900 (Stofko, Jr. 等人)、和 No.5,639,546 (Bilkadi) 中所述。增大共聚物对聚烯烃微结构化表面的附着力的其它方法公开于美国专利 No.5,500,251 (Burgoyne, Jr. 等人)。

可以通过从气体中等离子沉积来沉淀其它附连化学层, 诸如(例如)类金刚石膜。用于沉积类金刚石膜的方法和装置公开于美国专利 No.6,696,157 (David 等人) 和 No.6,795,636 (Cronk 等人)。

可以将反应物附加到附连化学层上以产生结合位点。本领域中已知的许多方法可用于引入将被附加到附连化学层上的反应物。应当理解, 附加模式可以根据所采用的反应物而变化。

本发明中所用的反应物类型将根据所关注的应用和分析物而变化。例如, 当表征 DNA 时, 低(聚)核苷酸是优选的。当进行诊断测试以确定抗原的存在时, 抗体是优选的。因此, 合适的反应物不受限制地包括氨基酸、核酸(包括低(聚)核苷酸和 cDNA)、碳水化合物、以及诸如酶和抗体等蛋白质。

可以将反应物引入本发明的微阵列的附连化学层中, 用于附加以产生结合位点。附加的模式可以不受限制地包括共价键和离子键、粘结、以及反应物的物理捕集。无论反应物如何附连, 可以使用本领域中已知的许多方法将反应物引入附连化学层中, 包括薄片上或薄片下合成。可以通过毛细管阵列、通过排列的吸移器件、或通过一排设计用于从一盘贮存器转移液滴的柱子将要被附连的含反应物溶液同时引入。

在所关注的样本中检测分析物, 可以通过以下方法: 使样本接触附加到附连化学层上的反应物, 并且检测由分析物与反应物的结合而形成的任何复合物。可以将复合物的存在或量与样本中分析物的存在

或量相关联。

在样本中检测分析物，也可以通过以下方法：使样本与附加到附加化学层上的反应物接触以形成复合物，然后使复合物与第二反应物接触（例如，酶连接的能够产生多重报告基因分子的抗体）以形成三元复合物。可以检测该三元复合物，并且可以将三元复合物的存在或量与样本中分析物的存在或量相关联。可以通过例如荧光、吸光度、电流、化学发光等等来检测复合物。一般来讲，通过添加包含用于酶的基底的溶液来完成这种检测。基底上酶的作用产生报告基因分子，所述分子可以通过上文所列技术中的任何一种进行测定。

优选的是，容许样本与基底溶液一起培养，培养所花的时间应足以获得该基底的多重周转，从而增加每个微结构化特征内所产生的报告基因分子的量。本发明的微阵列的微结构化元件在培养期间禁闭样本，并且防止样本扩散到该微结构化元件之外。因此本发明的微阵列提供了比使用平面微阵列可获得的更高的敏感性，其中在平面微阵列中，报告基因分子往往从其被沉淀的特征处扩散开去。

可选的层和特征

本发明的微阵列可以布置在基底上。该基底可以在制造和/或使用过程中支承微阵列。可用的基底材料包括有机和无机材料。例如，基底可以包括无机玻璃、陶瓷材料、聚合材料、填充的聚合材料、或纤维材料。可以使用任何合适的方式（例如，使用粘合剂）将微阵列连接到基底上。

在一些实施例中，本发明的微阵列还可以包含位于微阵列上或内的一个或多个预定位置的参考或“基准”标记。基准标记可以被自动化体系检测到，以便在制造过程中提供微阵列位置的实时监测能力。基准标记也可以帮助在图像加工过程中识别微结构化元件的位置。基准标记可以为（例如）激光蚀刻的区域、刻印的几何形状或印记、光

学信号或荧光标记。

在某些实施例中，本发明的微阵列可以包括可选层。可选层可以包括（例如）遮盖层，以减少或防止激发能穿过遮盖层传输至下面的层或基底，如 PCT 专利公开 WO 01/16370 中所报告。对于其它应用，遮盖层可用于减少或防止电磁能从分析物之下传输，该传输类似于由期望的分析物响应激发能所发出的电磁信号。在任一种情况下，只要有遮盖层在位，从微阵列的表面发出的电磁信号一般可归因于在微阵列上而不是在下面的层或基底上捕获的分子的激发。

作为另外一种选择，可选层可以包括对电磁能敏感的材料，该材料可以与遮盖层的材料（如果存在）相同或不同。包括对电磁能敏感的材料的可选层可以采取多种形式，如美国专利 No.6,482,638(Patil 等人) 中所报告。一些合适材料的实例包括但不限于美国专利 No.5,278,377(Tsai)、No.5,446,270(Chamberlain 等人)、No.5,529,708(Palmgren 等人)和 No.5,925,455(Bruzzone 等人)中所报告的那些。可选层可以与微结构化表面直接接触，或在可选层与微结构化表面之间设置一个或多个居间层。

对于一些应用来说，将覆盖件与本发明的微阵列一起使用是有利的。覆盖件可以（例如）保护样本远离环境（例如，灰尘）和/或阻止样本蒸发。

实例

下面的实例对本发明的目标和优势作了更进一步的说明，但这些实例中列举的具体材料和用量以及其它条件和细节不应当被理解为对本发明的不当限制。

除非另外指明，所有试剂均得自或可得自 Sigma-Aldrich Corp., St.Louis, MO)。

如本文所用,

“CHES 缓冲液”是指 2-(环己基氨基)乙磺酸的水溶液;

“SA-HRP”是指与辣根过氧化物酶共轭的链酶亲和素, 得自 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA;

“ABTS”是指 2,2'-吡啶-二-(3-乙酰苯基噻唑-6-磺酸盐), 以试剂盒的形式得自 KPL Inc., Gaithersburg, MD;

“TWEEN 20”是指聚环氧乙烷(20)山梨糖醇单月桂酸酯;

“SDS”是指十二烷基硫酸钠。

制备性实例 1

具有微结构化表面的薄膜的制备

具有微结构化表面的薄膜由以下方法制备: 挤出 DOW 7C50 树脂(DOW 7C50, 由 The Dow Chemical Co., Midland, MI 制造), 然后在两个大约 30.5 厘米(12 英寸)直径的圆柱形展平辊之间拉延熔化的挤出树脂。上面的展平辊为橡胶涂覆的辊, 下面的展平辊为表面上刻有重复图案的金属辊。

该重复图案包括两套, 每套均有主要和次要槽, 其中每套中的两个槽互相平行。在该主要套内, 其中槽的两个构件之间相距大约 250 微米(0.0098 英寸)。两套中的主要槽互相垂直。第一和第二套主要槽分别具有大约 32 微米(0.00126 英寸)和 36 微米(0.00142 英寸)的深度, 并且每个槽的底部具有大约 18 微米(0.00071 英寸)的宽度, 每个槽的顶部具有大约 27 微米(0.00106 英寸)的宽度。次要槽内的两个构件相距大约 25 微米(0.00098 英寸)。第一和第二套次要槽互相垂直。第一和第二套次要槽分别具有大约 3 微米(0.00012 英寸)和 5 微米(0.00019 英寸)的深度, 并且在每个槽的底部具有大约 5 微米(0.000019 英寸)的宽度, 每个槽的顶部具有大约 7 微米(0.00027 英寸)的宽度。

DOW 7C50 树脂用以下设备挤出：Killion 单螺杆挤出机（可得自 Davis-Standard Killion, Pawcatuck, CT），该机具有 3.18 厘米（1.25 英寸）的直径，30 比 1 的长度与直径比，以及五个受热区域，各区域的温度分别被设定为 124℃、177℃、235℃、243℃、和 249℃。挤出模具温度设定为 249℃。将模具放在接近展平辊的地方，以使得熔化的挤出树脂从模具中一出来即在展平辊之间拉延。将上面的橡胶涂覆辊的温度设定为 10℃，将下面有雕刻的金属辊的温度设定为 66℃。坯料速度大约为 2.7 米（8.8 英尺）每分钟。有雕刻的金属展平辊的图案被转移到挤出的聚丙烯膜上，使得该膜的表面被刻在辊上的图案的反相微结构化。该膜具有主要微结构，该结构对应于有雕刻的金属展平辊上的主要槽；该膜的次要微结构则对应于有雕刻的金属展平辊上的次要槽。主要微结构的取向相对于该膜的长轴大约 45°（即，相对于坯料方向大约 45°）。次要微结构的取向相对于主要微结构大约 45°。膜具有大约 142 微米（0.0056 英寸）的厚度。膜的表面的一部分的扫描电子显微图示于图 3 中。

将低荧光剥离粘合剂(3M Company, St.Paul, MN) 层合至微结构化聚丙烯膜的未结构化侧面。然后，在立体显微镜的帮助下，对齐切割冲模与膜表面上主要微结构的边缘，然后将其切为 2 厘米（0.79 英寸）乘以 6 厘米（2.36 英寸）的块。然后使膜的粘合剂侧居中在 2.54 厘米（1 英寸）乘以 7.62 厘米（3 英寸）的玻璃显微镜载片上，并且使用小水压机压到载片上。然后将玻璃载片放入自动微阵列器（笛卡尔分配体系，可得自 Genomic Solutions, Ann Arbor, MI）上。

使用与微阵列打点针（200 微米尖端直径，可得自 Genetix USA, Inc., Boston, MA）的接触点样将一重量% 的单反应性荧光染料（CY5，得自 Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ）的水溶液沉淀到基底的微结构化表面上，以在每三个主要微结构中产生三个六乘以六的图案。使沉淀的溶液在室温下干燥，然后将载片放入 LS300 型微阵列扫描仪（得自 Tecan US, Durham, NC）中，并且根据制造商提供的指

导成像。所得的图案示于图 4。

制备性实例 2

包含吡内酯的聚合物的制备

向配有机机械搅拌器、温度计、和回流冷凝器的反应容器中装入 12 重量份的 2-乙烯基-4,4-二甲基-2-恶唑啉-5-酮（乙烯基二甲基吡内酯，可得自 TCI America, Portland, OR）、28 重量份的 N,N-二甲基丙烯酰胺、0.15 重量份的 2,2'-偶氮双异丁腈(AIBN) 和 60 重量份的甲苯。使氮气鼓泡穿过混合物，然后将混合物加热至 55°C，并且在氮气氛下搅拌 24 小时。然后使混合物冷却至室温，并且用另外 60 重量份的 2-丙醇稀释。重量分析显示，产物含有 24.2% 重量的固体内容物。

实例 1

具有微结构化表面和附连化学层的微阵列

用 2-丙醇稀释制备性实例 2 的含吡内酯聚合物溶液，以提供 10 克含有 0.75 重量% 的固体内容物的混合物。使用 #14 线绕涂覆杆将该混合物涂敷到制备性实例 1 的微结构化聚丙烯膜上，以形成约 0.03 毫米的润湿厚度。恰在将混合物涂敷到膜上之前将足以与三分之一吡内酯基团反应的 1,2-乙二胺（10.6 微升）与聚合物溶液混合。使涂敷的膜在 55°C 的鼓风烘箱中干燥大约 30 分钟。通过衰减全反射红外光谱(ATR-IR)分析包括附连化学层的膜的表面，观察到吡内酯羰基（在约 1820cm^{-1} 的弱吸收）和酰胺羰基（在约 1650cm^{-1} 的吸收）的存在。

实例 2

使用具有附连化学层的微复制型微阵列进行酶连接测定

使用与微阵列打点针（200 微米尖端直径，可得自 Genetix USA, Inc., Boston, MA）的接触点样将免疫球蛋白的缓冲溶液（在 CHES 缓冲液中的 20 微克每毫升的抗人小鼠 IgG）沉淀到根据制备性实例 1 中所述制备的膜的微结构化表面上，以在每个主要微结构中产生三个六乘以六的图案（下文称为“加载微结构”）。然后使该微结构化膜

保持不动 60 分钟，然后用含有 0.05 重量% TWEEN 20 的 PBS 缓冲液冲洗三次。然后使该微结构化膜在室温下干燥。然后用 PBS 缓冲液中的 2 重量% 的脱脂奶粉（可以商标“NESTLE CARNATION NONFAT DRY MILK POWDER”得自 Nestle USA, Glendale, CA）填充每个加载微结构。然后使该微结构化膜保持不动 60 分钟，然后用含有 0.05 重量% TWEEN 20 的 PBS 缓冲液冲洗三次。然后向每个加载微结构中沉淀 PBS 缓冲液中的 4 微克每毫升的生物素共轭的人 IgG 的溶液。然后使该微结构化膜保持不动 60 分钟，然后用含有 0.05 重量% TWEEN 20 的 PBS 缓冲液冲洗三次。然后向每个加载微结构中沉淀 PBS 缓冲液中的 0.5 微克每毫升的检测酶 SA-HRP 的溶液。然后使该微结构化膜保持不动 30 分钟，然后用含有 0.05 重量% TWEEN 20 的 PBS 缓冲液冲洗三次。然后将 ABTS 指示剂溶液沉淀入每个加载微结构中，大约 5 分钟之后将一重量% 的 SDS 水溶液沉淀入每个加载微结构中。然后分析该微阵列。

在不偏离本发明的范围和精神的前提下，对本发明的多种修改和更改对于本领域内的技术人员将是显而易见的。应该理解，本发明不旨在被上文所述的示例性实施例和实例所不当限制，上述实例和实施例仅以举例的方式提出，而且本发明的范围仅受以下所附的权利要求书的限制。

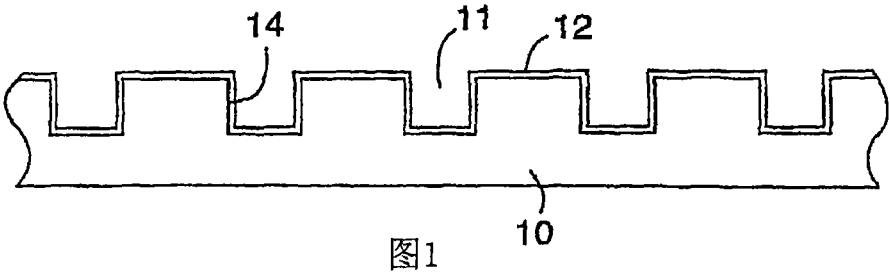


图1

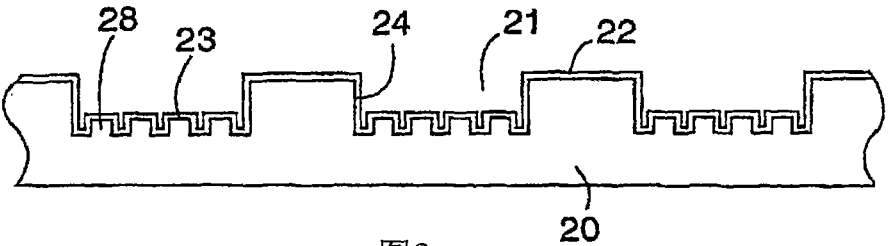


图2

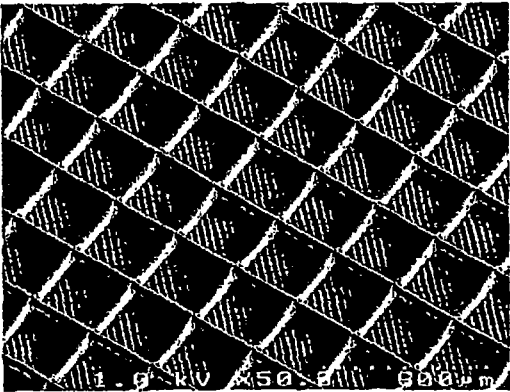


图3

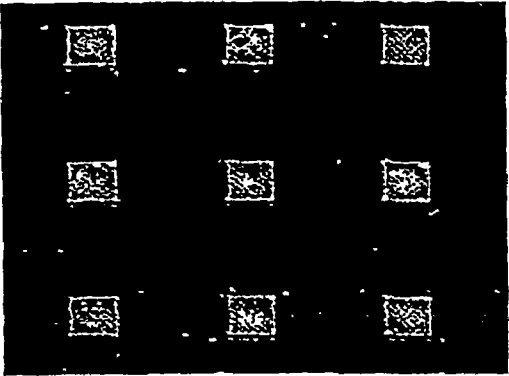


图4