

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101156062 B

(45) 授权公告日 2012. 02. 22

(21) 申请号 200580045725. 1

(22) 申请日 2005. 11. 18

(30) 优先权数据

10/992, 456 2004. 11. 18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 07. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/042243 2005. 11. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02006/055943 EN 2006. 05. 26

(73) 专利权人 康比麦崔克斯有限公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 K·莫勒

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 顾敏

(51) Int. Cl.

G01N 27/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6045678 A, 2000. 04. 04, 第 7 栏 17-25 行.

US 20030113713 A1, 2003. 06. 19, 【0004】—【0007】, 【0014】, 【0104】—【0106】, 【0110】, 【0115】, 【0188】.

US 20040197801 A1, 2004. 10. 07, [0066].

US 20030113713 A1, 2003. 06. 19, 【0004】—【0007】, 【0014】, 【0104】—【0106】, 【0110】, 【0115】, 【0188】.

CN 1243952 A, 2000. 02. 09, 全文.

审查员 李明瑞

权利要求书 6 页 说明书 27 页 附图 34 页

(54) 发明名称

具有连接了接头部分的吸附多孔反应层的电极阵列装置

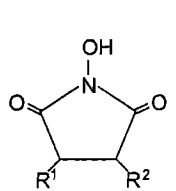
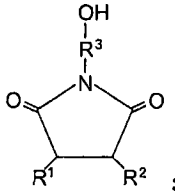
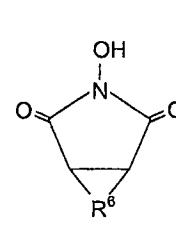
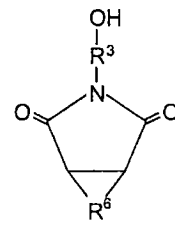
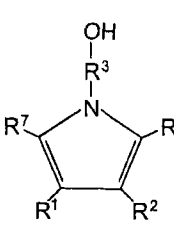
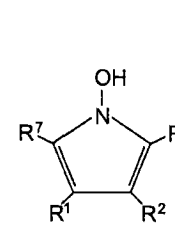
(57) 摘要

公开了具有吸附多孔反应层的电极阵列装置, 所述反应层连接有接头来提高合成质量。所述阵列在基板上包含多个电极, 其中所述电极与计算机控制系统电子连接。所述阵列在多个电极上具有连接了接头的吸附多孔反应层, 其中所述吸附多孔反应层含有至少具有一个羟基的化学物质。在优选的实施方式中, 反应层是具有 DNA 构成的离子接头的蔗糖。在另一优选实施方式中, 反应层是具有 DNA 构成的离子接头的蔗糖、果糖和葡萄糖。

1. 一种具有吸附多孔反应层的电极阵列,所述反应层连接了用于合成的接头,其包含:

(a) 基板上的多个电极,其中所述多个电极的每个与计算机控制系统电子连接,其中所述多个电极的每个电极具有一表面;和

(b) 吸附到所述多个电极的每个电极表面上的多孔反应层,其中所述多孔反应层含有化学物质或化学物质的混合物,其中所述化学物质选自:单糖、二糖、三糖、聚乙二醇、聚乙二醇衍生物、N-羟基琥珀酰亚胺、式 I、式 II、式 III、式 IV、式 V、式 VI、式 VII 和它们的

的组合,其中式 I 是  式 II 是  式 III 是 $\text{HOR}^4(\text{OR}^5)_m\text{R}^7$; 式 IV 是  式 V 是  式 VI 是  式 VII 是  其中各式中 m 是 1-4 的整数;

R^1 、 R^2 、 R^7 和 R^8 独立选自:氢以及取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、多环基团、卤素、酰胺、烷氧基、酰基、酰氧基、氧基羰基、酰氧基羰基、烷氧基羰氧基、羧基、氨基、仲氨基、叔氨基、胍基、叠氨基、烷氧化偶氮基、氰基、异氰基、氰氧基、异氰氧基、氰硫基、雷酸酯基、异硫氰基、异硒氰基、氰硒基、羧基酰氨基、酰基亚氨基、亚硝基、氨氧基、碳亚氨基、胂基、肟、酰基胍基、脒基、硫化物、亚砷、硫代亚砷、砷、硫代砷、硫酸酯基、硫代硫酸酯基、羟基、甲酰基、羟基过氧基、氢过氧基、过氧酸、氮甲酰基、三甲基甲硅烷基、硝基、亚硝基、草酰基、五唑基、氨基硫羰基、硫代卡巴胂基、硫代卡巴二胂基、硫代碳酰胍基、硫代羧基、硫醛基、硫酰基、氰硫基、氨基硫脲基、硫代亚磺基、硫代磺基、硫脲基、三氮烷基、三氮烯基、三嗪基、三硫代磺基、亚磺酰亚氨酸、磺基亚氨酸、亚磺基胂酸、磺基胂酸、亚磺基羟肟酸、磺基羟肟酸和磷酸酯;

R^3 选自:杂原子团、羰基以及取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、多环基团;

R^4 和 R^5 独立选自:亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基和亚己基;

R^6 与琥珀酰亚胺的两个碳形成环结构,其选自:取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环和多环基团;

R^7 选自氨基或羟基;和

(c) 与吸附多孔反应层相连的接头基团,所述接头基团包含:

(i) 结合端,其中所述结合端共价连接于吸附多孔反应层;

(ii) 合成端,其中所述合成端具有反应基团;和

(iii) 连接结合端和合成端的中间区段,其中所述中间区段包含最多 100 个共价相连

的单体,其中所述共价相连的单体在水性介质中基本上具有离子电荷,其中与所述反应基团相连的后续基团在水性介质中基本上溶剂化。

2. 如权利要求 1 所述的电极阵列,其特征在于,所述单糖选自:阿洛糖、阿卓糖、阿拉伯糖、脱氧核糖、赤藓糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、古洛糖、艾杜糖、来苏糖、甘露糖、阿洛酮糖、L-鼠李糖、核糖、核酮糖、景天庚酮糖、D-山梨醇、山梨糖、sylulose、塔格糖、塔罗糖、苏糖、木酮糖和木糖。

3. 如权利要求 1 所述的电极阵列,其特征在于,所述二糖选自:直链淀粉、纤维素二糖、乳糖、麦芽糖、蜜二糖、帕拉金糖、蔗糖和海藻糖;如权利要求 1 所述的电极阵列,其中所述三糖选自棉子糖或松三糖。

4. 如权利要求 1 所述的电极阵列,其特征在于,所述聚乙二醇衍生物选自:二甘醇、四甘醇、具有伯氨基的聚乙二醇、2-(2-氨基乙氧基)乙醇、乙醇胺、二(乙二醇)单烯丙基醚、二(乙二醇)单甲苯磺酸酯、三(乙二醇)单烯丙基醚、三(乙二醇)单甲苯磺酸酯、三(乙二醇)单苄基醚、三(乙二醇)单三苯甲基醚、三(乙二醇)单氯单甲基醚、三(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、三(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、四(乙二醇)单烯丙基醚、四(乙二醇)单甲基醚、四(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、四(乙二醇)单甲苯磺酸酯、四(乙二醇)单苄基醚、四(乙二醇)单三苯甲基醚、四(乙二醇)单 1-己烯基醚、四(乙二醇)单 1-庚烯基醚、四(乙二醇)单 1-辛烯基醚、四(乙二醇)单 1-癸烯基醚、四(乙二醇)单 1-十一碳烯基醚、五(乙二醇)单甲基醚、五(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、五(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、五(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、六(乙二醇)单烯丙基醚、六(乙二醇)单甲基醚、六(乙二醇)单苄基醚、六(乙二醇)单三苯甲基醚、六(乙二醇)单 1-己烯基醚、六(乙二醇)单 1-庚烯基醚、六(乙二醇)单 1-辛烯基醚、六(乙二醇)单 1-癸烯基醚、六(乙二醇)单 1-十一碳烯基醚、六(乙二醇)单 4-二苯甲酮基单 1-十一碳烯基醚、七(乙二醇)单烯丙基醚、七(乙二醇)单甲基醚、七(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、七(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、八(乙二醇)单烯丙基醚、八(乙二醇)单甲苯磺酸酯、八(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、十一(乙二醇)单甲基醚、十一(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、十一(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、十一(乙二醇)单烯丙基醚、十八(乙二醇)单烯丙基醚、八(乙二醇)、十(乙二醇)、十二(乙二醇)、十四(乙二醇)、十六(乙二醇)、十八(乙二醇)、二苯甲酮-4-六(乙二醇)烯丙基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)己烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)辛烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)癸烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-氟二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-氟二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-四(乙二醇)烯丙基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-四(乙二醇)十一碳烯基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-四(乙二醇)烯丙基醚和 4-吗啉代二苯甲酮-4'-四(乙二醇)十一碳烯基醚。

5. 如权利要求 1 所述的电极阵列,其特征在于,所述聚乙二醇分子量约 1,000-20,000。

6. 如权利要求 1 所述的电极阵列,其特征在于,所述电极表面用选自下组的材料制造:铂、金、半导体、氧化铟锡和碳以及它们的组合。

7. 如权利要求 1 所述的电极阵列,其特征在于,所述反应基团选自氨基、羟基或羧基。

8. 如权利要求 1 所述的电极阵列,其特征在于,所述多个共价相连的单体选自:DNA、RNA 和具有离子侧链的氨基酸及它们的组合。

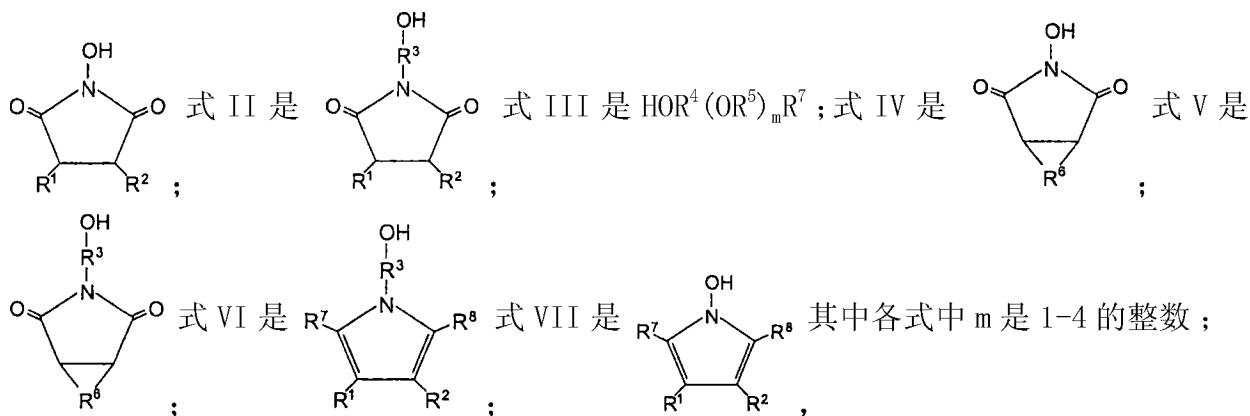
9. 如权利要求 1 所述的电极阵列,其特征在于,所述多个共价相连的单体选自:脱氧腺苷酸、脱氧鸟苷酸、脱氧胞苷酸和脱氧胸苷酸及它们的组合。

10. 如权利要求 1 所述的电极阵列,其特征在于,所述多个共价相连的单体选自:腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸和胸苷酸及它们的组合。

11. 一种形成具有多个电极的电极阵列装置的方法,其中各电极具有一表面和吸附到该表面用于提高合成质量的多孔反应层,所述方法包括:

(a) 在基板上提供多个电极,其中所述多个电极的每个与计算机控制系统电子连接,其中所述多个电极的每个电极具有一表面;和

(b) 在所述多个电极的每个电极的表面上吸附多孔反应层,其中所述多孔反应层包含一化学物质,其中所述化学物质选自单糖、二糖、三糖、聚乙二醇、聚乙二醇衍生物、N-羟基琥珀酰亚胺、式 I、式 II、式 III、式 IV、式 V、式 VI、式 VII 和它们的组合,其中式 I 是



R^1 、 R^2 、 R^7 和 R^8 独立选自氢以及取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、多环基团、卤素、酰胺、烷氧基、酰基、酰氧基、氧基羰基、酰氧基羰基、烷氧基羰氧基、羧基、氨基、仲氨基、叔氨基、胍基、叠氨基、烷氧化偶氮基、氰基、异氰基、氰氧基、异氰氧基、氰硫基、雷酸酯基、异硫氰基、异硒氰基、氰硒基、羧基酰氨基、酰基亚氨基、亚硝基、氨基碳亚氨基、胺基、脞基、酰基胍基、脒基、硫化物、亚砷、硫代亚砷、砷、硫代砷、硫酸酯基、硫代硫酸酯基、羟基、甲酰基、羟基过氧基、氢过氧基、过氧酸、氨甲酰基、三甲基甲硅烷基、硝基、亚硝基、草酰基、五唑基、氨基磺酰基、氨基亚磺酰基、亚磺酰基、氨基亚磺酰基、亚磺基、磺基、磺氨基、巯基、四唑基、氨基硫羰基、硫代卡巴胺基、硫代卡巴二胺基、硫代碳酰胍基、硫代羧基、硫醛基、硫酰基、氰硫基、氨基硫脒基、硫代亚磺基、硫代磺基、硫脒基、三氮烷基、三氮烯基、三嗪基、三硫代磺基、亚磺酰亚氨酸、磺基亚氨酸、亚磺基脲酸、磺基脲酸、亚磺基羟脲酸、磺基羟脲酸和磷酸酯;

R^3 选自杂原子团、羰基和取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、多环基团;

R^4 和 R^5 独立选自亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基和亚己基;

R^6 与琥珀酰亚胺的两个碳形成环结构,其选自取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环和多环基团;

R⁷ 选自氨基和羟基 ;和

(c) 将接头基团与吸附多孔反应层相连,所述接头基团包含 :

(i) 结合端,其中所述结合端共价连接于吸附多孔反应层 ;

(ii) 合成端,其中所述合成端具有反应基团 ;和

(iii) 连接结合端和合成端的中间区段,其中所述中间区段包含最多 100 个共价相连的单体,其中所述共价相连的单体在水性介质中基本上具有离子电荷,其中与所述反应基团相连的后续基团在水性介质中基本上溶剂化。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述单糖选自 :阿洛糖、阿卓糖、阿拉伯糖、脱氧核糖、赤藓糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、古洛糖、艾杜糖、来苏糖、甘露糖、阿洛酮糖、L- 鼠李糖、核糖、核酮糖、景天庚酮糖、D- 山梨醇、山梨糖、sylulose、塔格糖、塔罗糖、苏糖、木酮糖和木糖。

13. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述二糖选自 :直链淀粉、纤维素二糖、乳糖、麦芽糖、蜜二糖、帕拉金糖、蔗糖和海藻糖 ;

14. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述三糖选自棉子糖和松三糖。

15. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述聚乙二醇衍生物选自 :二甘醇、四甘醇、具有伯氨基的聚乙二醇、2-(2-氨基乙氧基)乙醇、乙醇胺、二(乙二醇)单烯丙基醚、二(乙二醇)单甲苯磺酸酯、三(乙二醇)单烯丙基醚、三(乙二醇)单甲苯磺酸酯、三(乙二醇)单苄基醚、三(乙二醇)单三苯甲基醚、三(乙二醇)单氯单甲基醚、三(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、三(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、四(乙二醇)单烯丙基醚、四(乙二醇)单甲基醚、四(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、四(乙二醇)单甲苯磺酸酯、四(乙二醇)单苄基醚、四(乙二醇)单三苯甲基醚、四(乙二醇)单 1-己烯基醚、四(乙二醇)单 1-庚烯基醚、四(乙二醇)单 1-辛烯基醚、四(乙二醇)单 1-癸烯基醚、四(乙二醇)单 1-十一碳烯基醚、五(乙二醇)单甲基醚、五(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、五(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、五(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、六(乙二醇)单烯丙基醚、六(乙二醇)单甲基醚、六(乙二醇)单苄基醚、六(乙二醇)单三苯甲基醚、六(乙二醇)单 1-己烯基醚、六(乙二醇)单 1-庚烯基醚、六(乙二醇)单 1-辛烯基醚、六(乙二醇)单 1-癸烯基醚、六(乙二醇)单 1-十一碳烯基醚、六(乙二醇)单 4-二苯甲酮基单 1-十一碳烯基醚、七(乙二醇)单烯丙基醚、七(乙二醇)单甲基醚、七(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、七(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、八(乙二醇)单烯丙基醚、八(乙二醇)单甲苯磺酸酯、八(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、十一(乙二醇)单甲基醚、十一(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、十一(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、十一(乙二醇)单烯丙基醚、十八(乙二醇)单烯丙基醚、八(乙二醇)、十(乙二醇)、十二(乙二醇)、十四(乙二醇)、十六(乙二醇)、十八(乙二醇)、二苯甲酮-4-六(乙二醇)烯丙基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)己烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)辛烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)癸烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-氟二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-氟二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-四(乙二醇)烯丙基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-四(乙二醇)十一碳烯基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一

碳烯基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-四(乙二醇)烯丙基醚和4-吗啉代二苯甲酮-4'-四(乙二醇)十一碳烯基醚。

16. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述聚乙二醇的分子量约为1,000-20,000。

17. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,吸附多孔反应层的所述步骤还包括:

(b₁) 使处理溶液与微阵列接触约1分钟-约1个月,其中所述处理溶液含有所述化学物质和能溶解所述化学物质的溶剂,其中所述化学物质浓度约为0.001-5摩尔,其中所述处理溶液的温度约为0-90°C。

18. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述多个电极的每个电极的表面选自铂、金、半导体、氧化铟锡和碳及它们的组合。

19. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述反应基团选自氨基、羟基和羧基。

20. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述多个共价相连的单体选自DNA、RNA和具有离子侧链的氨基酸及它们的组合。

21. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述多个共价相连的单体选自脱氧腺苷酸、脱氧鸟苷酸、脱氧胞苷酸和脱氧胸苷酸及它们的组合。

22. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述多个共价相连的单体选自腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸和胸苷酸及它们的组合。

23. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述多个共价相连的单体选自赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、磷酸-丝氨酸、磷酸-苏氨酸、磷酸-酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。

24. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,提供多个电极的所述步骤还包括:

(a₁) 采用等离子清洁方法蚀刻所述电极表面;和

(a₂) 采用化学清洁方法清洁所述电极表面。

25. 如权利要求24所述的方法,其特征在于,所述等离子清洁方法还包括:

(a_{1.1}) 使所述电极微阵列与氩等离子接触约2-6分钟。

26. 如权利要求24所述的方法,其特征在于,所述等离子清洁方法还包括:

(a_{1.1}) 使所述电极微阵列与六氟化硫等离子接触约2-6分钟。

27. 如权利要求24所述的方法,其特征在于,所述等离子清洁方法包括:

(a_{1.1}) 采用约600瓦的功率和约8毫托的压力,利用氩等离子蚀刻所述电极微阵列约2-4分钟;

(a_{1.2}) 采用约500瓦的功率和约50毫托的压力,利用氩等离子蚀刻所述电极微阵列约5-7分钟;和

(a_{1.3}) 采用约600瓦的功率和约8毫托的压力,利用氩等离子蚀刻所述电极微阵列约8-12分钟。

28. 如权利要求24所述的方法,其特征在于,所述化学清洁方法还包括电化学清洁方法,其中所述电化学清洁方法包括:

(a_{2.1}) 使硫酸溶液与所述电极的表面接触,其中所述硫酸溶液的浓度约0.01-5摩尔;

(a_{2.2}) 对第一组电极施加电流脉冲约0.01-60秒,同时第二组电极接地,其中各电极处于所述第一组电极或第二组电极中;

(a_{2.3}) 对第二组电极施加电流脉冲约 0.01-60 秒,同时第一组电极接地;和

(a_{2.4}) 交替进行对第一组电极施加电流脉冲约 0.01-60 秒同时第二组电极接地、以及对第二组电极施加电流脉冲约 0.01-60 秒同时第一组电极接地的操作,累积时间约 1-60 分钟。

29. 如权利要求 24 所述的方法,其特征在于,所述化学清洁方法还包括过氧化氢清洁方法,其包括:

(a_{2.1}) 使过氧化氢溶液与所述电极的表面接触,其中所述过氧化氢溶液的浓度约 0.5-10 体积%,其中接触时间是约 1 分钟 - 约 24 小时,所述过氧化氢溶液的温度是约 20-95°C。

具有连接了接头部分的吸附多孔反应层的电极阵列装置

[0001] 发明技术领域

[0002] 本发明提供具有吸附多孔反应层的电极微阵列,所述反应层上连接有接头部分(linker moiety)。具体地说,本发明提供具有多个电极的电极微阵列,其中各电极具有吸附多孔反应层,而在该反应层上连接有接头部分以提高核酸和肽的合成质量及试验灵敏度。更具体地说,本发明提供计算机控制的具有多个含铂电极的电极微阵列,其中各电极具有吸附多孔反应层,而在该反应层上连接有接头部分,从而显著提高了寡核苷酸、肽和其它聚合化学物质的合成质量,同时提高结合试验灵敏度。

[0003] 发明背景

[0004] 微阵列,特别是核酸微阵列已成为药理学以及生物化学研究和发现中重要的分析研究工具。微阵列是以行和列的形式布置的点或位置的小型化阵列。分子(包括生物分子)在特定连接点连接或原位合成,虽然可用其它形式,但通常采用行和列的形式。微阵列的优点之一是它们能同时进行数百次实验(即使不是数千次)。与顺次实验相比,可利用这种并行性提高分子结构和生物学功能间关系的研究效率,在该关系中化学结构的微小改变可导致深远的生物化学效力。微阵列可以不同形式使用,可具有不同表面化学特征,从而导致连接或合成分子的方法不同。微阵列表面化学的差异可导致提供接纳预先合成的化学物质或原位合成化学物质的表面的制备方法不同。如其名称所提示的,微阵列上的连接点是通常为 1-100 μm 的微米级别。

[0005] 利用微阵列的研究主要集中于脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)相关领域,包括基因组学、细胞基因表达、单核苷酸多态性(SNP)、基因组DNA检测和确认、功能基因组学和蛋白质组学(Wilgenbus和Lichter, *J. Mol. Med.* 77:761, 1999; Ashfari等, *Cancer Res.* 59:4759, 1999; Kurian等, *J. Pathol.* 187:267, 1999; Hacia, *Nature Genetics* 21增刊:42, 1999; Hacia等, *Mol. Psychiatry* 3:483, 1998; 和 Johnson, *Curr. Biol.* 26:R171, 1998)。除了用于DNA/RNA研究的微阵列外,可将微阵列应用于肽(两个或多个连接的天然或合成氨基酸)、小分子(例如,药物化合物)、寡聚物和聚合物的相关研究。

[0006] 就用于DNA相关研究的微阵列而言,制备DNA相关分子的微阵列有许多方法。DNA相关分子包括天然或克隆的DNA及合成DNA。合成的较短单链DNA或RNA通常称为寡核苷酸(寡聚物),该名称与寡脱氧核糖核苷酸同义。微阵列制备方法包括:(1)利用点样机器人将溶液点在制备的平面上;(2)采用喷墨或其它印刷技术来印刷试剂并采用常规亚磷酰胺(phosphoramidite)化学方法进行原位合成;(3)利用电化学产生的用于脱保护的酸和常规亚磷酰胺化学方法进行原位平行合成;(4)无掩蔽光生酸(maskless photo-generated acid)(PGA)控制的原位合成,采用常规亚磷酰胺化学方法;(5)利用光不稳定保护基团(PLPG)的光致断裂进行掩蔽定向(mask-directed)的原位平行合成;(6)利用PLPG和数字光刻蚀法进行无掩蔽原位平行合成;和(7)电场吸引/排斥沉积寡聚物。

[0007] 原位寡聚物合成的光刻蚀技术公开于Fodor等的美国专利5,445,934及其要求优先权的其它专利。电场吸引/排斥微阵列公开于Hollis等的美国专利5,653,939和Heller等的美国专利5,929,208。采用电化学解封闭的原位寡聚物合成的电极微阵列公开

于纳入本文作为参考的Montgomery的美国专利6,093,302 ;6,280,595和6,444,111(分别是Montgomery I、II和III)。采用电化学解封闭在与电极分开和远离的表面上进行原位寡聚物合成的另一种本质上不同的电极阵列(不是微阵列)公开于Southern的美国专利5,667,667。寡聚物微阵列合成的综述见 :Gao等,Biopolymers 2004,73,579。

[0008] 除DNA微阵列以外的微阵列已见诸公开。例如,采用光刻蚀掩蔽技术的肽阵列合成制备在1991年首次报道。在2000年该方法拓展至包括利用光生酸和/或联用于解封闭的光敏剂的可寻址掩蔽技术。采用光不稳定解封闭的肽微阵列合成的综述见 :Pellois, P.J., Wang, W., Gao, X., J. Comb. Chem. 2000,2,355 ;和Fodor, S. P. A., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L, Lu, A. T., Solas, D., Science,1991,251,767。近年来,利用肽阵列的工作使用通过将预先合成的肽或分离的蛋白质点样制造的阵列。蛋白质阵列的综述见 :Cahill和Nordhoff, Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 2003,83 :177。

[0009] 提供能与预先合成的化学物质连接或原位合成化学物质的微阵列表面的制备方法必须提供能接合化学物质以及能提供进行药理学和生物化学研究和发现所需的化学官能团的表面。一种方法是处理表面以提供能与相关化学物质共价接合的反应基团。在这种方法中,反应基团一般通过表面处理或表面涂层而存在。对于DNA相关物质,除非有化学修饰,否则反应基团是羟基。对于肽,除非有化学修饰,否则所需的反应基团是胺基。

[0010] 玻璃是用于微阵列的常用固体基板,使用前必须处理。常规玻璃处理采用硅烷化化学方法使稳定而均匀的表面具有用于寡聚物或其它化学物质连接或原位合成的反应基团(Guo等,1994, Nucl. Acids Res.,22 :5456-5465 ;LeProust等,2001, Nucl. Acids Res., 29 :2171-2180 ;Maskos和Southern,1992, Nucl. Acids Res.,20 :1679-1684 ;Skrzypcznski等,美国专利申请公布号2004/0073017 ;和Southern等,美国专利6,576,426)。用于成批合成的玻璃珠也必须进行硅烷化(Maskos和Southern)。可用硫醇接头化学物质处理金表面(Kelley等的美国专利公布2002/0172963)。类似地,必须氧化处理聚合微阵列支持物,例如聚丙烯,然后引入反应基团,例如端基胺(基团)(Schepinov等,1997, Nucl. Acids Res., 25 :1155-1161)。此外,用聚乙二醇表面处理具有用于成批合成肽的反应性端基的聚苯乙烯珠粒(Merck, Inc. Novabiochem Div. 和Aldrich等,美国专利申请公布20030134989)。最后,必须用表面涂层处理电极微阵列上电极的表面来提供反应基团(Montgomery I、II和III)。对于寡聚物合成,这种表面涂层必须能耐受反复接触合成溶液和电化学解封闭溶液的严苛环境。

[0011] Montgomery I、II和III中公开的电化学合成微阵列以具有行列形式的多个微电极的半导体芯片为基础。该芯片设计采用互补金属氧化物半导体(CMOS)技术来产生微电极的高密度阵列,该阵列具有选择和控制该阵列内各微电极的并行寻址功能。施加电压能“打开”电极,产生能改变小的称为“虚拟瓶(virtualflask)”区域的pH或电极周围容积的电化学试剂(特别是酸性质子)。为在各电极上提供反应基团,可用多孔基质材料涂布微阵列。可在任一电极合成生物分子,这种合成可发生在多孔基质材料中。对于解封闭步骤,通过对电极施加电压以电化学方法降低pH。由于酸性试剂远离电极的能力受限于自然扩散和溶液中的缓冲质,只有电极附近的pH降低。

[0012] 当处理表面时,在处理期间与表面相连的接头(linker)的末端通常有反应基团。

[0013] 接头是使相关物质与固体表面相连的分子。例如,玻璃的接头在一端具有反应基

团,在另一端具有硅烷偶联基团用于和玻璃接合。根据用于形成接头的具体化学物质,接头可以具有许多种长度。除接头外,可给接头连接间隔基团(spacer)以在固体表面和所连接的化学物质之间提供更长的距离。间隔基团可以与接头具有不同化学性质。公开了连接玻璃支持物(Guo等,LeProust等,Maskos等,Skrzypcznski和Southern),胺化聚丙烯支持物(Shepinov等)和聚苯乙烯珠粒(Merck, Inc. Novabiochem Div. 和Aldrich等)与寡聚物的接头和间隔基团。

[0014] 对于电极微阵列上的表面涂层,表面涂层自身提供在该涂层内天然存在的反应基团。Montgomery I、II和III公开了含有以下成分的表面涂层:受控多孔玻璃(CPG);普通聚合物,例如特氟隆、尼龙、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯酸酯(polyacrylate)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚酰胺、聚酰亚胺、聚硅氧烷、聚硅酮(polysilicone)、聚脘、聚电解质、水凝胶、环氧聚合物、蜜胺、氨基甲酸乙酯和这些聚合物与其它聚合物的共聚物和混合物;生物学衍生的聚合物、聚透明质酸、纤维素和甲壳质(chitin);陶瓷,例如氧化铝、金属氧化物、粘土和沸石;表面活性剂;硫醇;自我组装的单层;多孔碳;和富勒烯(fullerene)材料。Montgomery I、II和III还公开了可通过旋涂、浸渍涂布或手工操作或任何其它可接受的涂布形式使表面涂层与电极相连。Montgomery I、II和III还公开了通过硅-碳键与受控多孔玻璃相连的接头分子,该接头分子包括芳基、乙炔、含有2-10个单体单位的乙二醇共聚物、二胺、二酸、氨基酸和它们的组合。在各情况中, Montgomery公开的是涂布了微阵列装置的整个表面,而不只电极表面。

[0015] Guo等公开了利用23-原子的接头将DNA序列共价连接于玻璃。使玻璃表面与氨基丙基三甲氧基硅烷反应制得接头,从而提供氨基衍生的表面,然后使氨基与过量的对苯(撑)二异硫氰酸酯偶联将氨基转化为氨基反应性苯基异硫氰酸酯基团。然后通过使氨基反应基团与寡核苷酸序列的5'端偶联(得到)5'氨基修饰的寡核苷酸,从而使寡核苷酸共价连接于氨基反应基团。得到的结构是连接有接头的固体表面,寡核苷酸在5'侧与该接头相连。Guo等还公开了在寡核苷酸和接头之间具有最多15-脱氧胸苷酸链的间隔基团。间隔基团具有5'氨基修饰的寡核苷酸,从而能与氨基反应基团相连。间隔基团连接在寡核苷酸的5'端作为该寡核苷酸的一部分,再将该间隔基团-寡核苷酸与接头相连。从玻璃表面的角度观察,最终的结构提供具有接头的玻璃表面,在该接头上连接有5'-3'最初间隔基团-寡核苷酸,其中所述间隔基团-寡核苷酸在它处合成,然后与接头相连。与脱氧胸苷酸单位较少的链相比,发现15-脱氧胸苷酸链的杂交信号最强。

[0016] Maskos和Southern公开了用于玻璃的硅烷偶联接头。接头长度不同,末端具有羟基从而能在玻璃上合成寡核苷酸。接头通过环氧丙氧丙基硅烷键与玻璃结合,具有长度不同的六甘醇中间区段。接头长约8-26个原子,不带任何电荷。Shepinov等公开了将寡核苷酸与胺化聚丙烯偶联的间隔分子。采用亚磷酰胺化学方法构建间隔分子,合成的单体具有二醇作为单体单位的一部分。3'和5'寡核苷酸均基于间隔基团构建。

[0017] LeProust等公开了末端为羟基、酰胺或胺基团的硅烷接头。利用这些接头在载玻片上合成寡核苷酸(脱氧胸苷酸单位)来确定合成的效率/保真度。这些接头是非离子性的。Southern等公开了用于寡核苷酸合成的受控多孔玻璃(CPG)的非离子接头/间隔基团。这些接头通过末端胺(基团)与经硅烷化位于CPG上的基团相连,从而与CPG相连。Skrzypcznski等公开了通过硅烷键与玻璃或溶胶凝胶玻璃涂层偶联的非离子接头/间隔

基团。建议接头 / 间隔基团在紧邻玻璃玻璃处具有疏水性部分,而在 DNA 探针连接处具有亲水性部分。

[0018] 接头和间隔基团有时用于离开微阵列合成肽。具体地说,将显微聚苯乙烯 (PS) 珠用作固体支持物 (Aldrich 等)。这些珠连接有聚乙二醇 (PEG) 间隔基团,而 PEG 与连接基团相连,其中所述连接基团具有用于肽合成的反应基团。合成后,使肽从连接基团上断裂,回收。用于合成的许多 PS-PEG 树脂可从 Merck Company、Novabiochem Division 以及其它来源商品化购得。

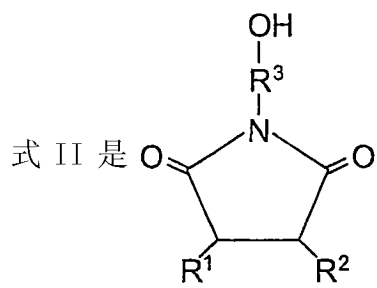
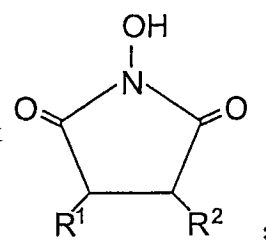
[0019] Montgomery I、II 和 III 所公开的采用电化学方法制得的共聚物微阵列具有寡聚物质量的问题,所述质量可通过解封闭不充分导致序列中脱氧核苷酸碱基缺失来判断。此外,电极上涂层的分层作用可导致质量问题。受控多孔玻璃涂层和多糖琼脂糖涂层均易产生分层质量问题。对于基因表达试验 (即,发现低丰度 mRNA 种类) 和需要检测单碱基改变的单核苷酸多态性 (SNP) 试验的灵敏度,这种质量问题造成得到的共聚物阵列用处不大。在电极微阵列上合成肽也是有问题的。对于玻璃微阵列也发现了类似的质量问题,研究人员发现各种试剂与接近玻璃平板表面的官能团反应不充分 (LeProust 等)。

[0020] 鉴于 (1) 寡核苷酸、肽和其它化学物质的电极微阵列质量问题的以上讨论,和 (2) 需要在电极微阵列上具有反应基团的表面,本领域需要提高原位电化学合成质量从而能提供质量较高的微阵列。本发明着手解决这些需要。此外,对于电极微阵列,需要掺有离子接头的修饰表面涂层,从而能提高合成质量并防止荧光猝灭。

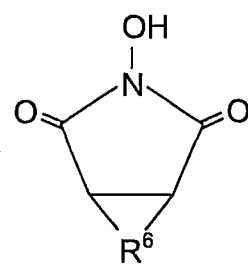
[0021] 发明概述

[0022] 本发明提供具有吸附多孔反应层的电极微阵列,所述反应层连接有接头基团,从而提高了合成质量。微阵列在基板上含有多个电极,其中所述电极与计算机控制系统电子相连。此外,所述微阵列在多个电极上具有吸附多孔反应层,其中所述吸附多孔反应层含有至少具有一个羟基的化学物质。所述化学物质选自单糖、二糖、三糖、聚乙二醇、聚乙二醇衍生物、N- 羟基琥珀酰亚胺、式 I、式 II、式 III、

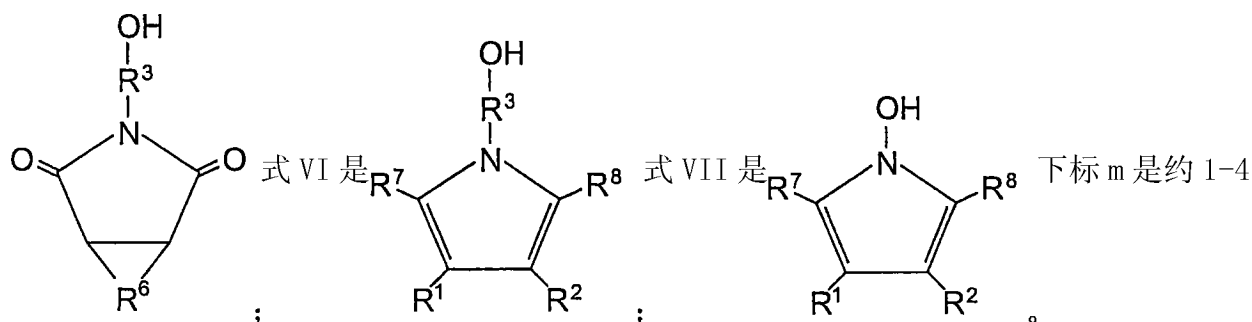
[0023] 式 IV、式 V、式 VI 和式 VII (所示) 及其组合。式 I 是



式 III 是 $\text{HOR}^4(\text{OR}^5)_m\text{R}^7$; 式 IV 是



式 V 是



的整数。聚乙二醇的分子量约为 1,000-20,000 道尔顿。

[0024] R^1 、 R^2 、 R^7 和 R^8 独立选自氢以及取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、多环基团、卤素、酰胺、烷氧基、酰基、酰氧基、氧基羰基 (oxycarbonyl)、酰氧基羰基、烷氧基羰氧基、羧基、氨基、仲氨基、叔氨基、胍基、叠氨基、烷氧化偶氮基 (alkazoxy)、氰基、异氰基、氰氧基、异氰氧基、氰硫基、雷酸酯基、异硫氰基 (isothiocyanato)、异硒氰基 (isoselenocyanato)、氰硒基 (selenocyanato)、羧基酰氨基 (carboxyamido)、酰基亚氨基、亚硝基、氨氧基 (aminoxy)、碳亚氨基 (carboximidoyl)、脞基 (hydrazonoyl)、肼、酰基胍基 (acylhydrazino)、脞基、硫化物、亚砷、硫代亚砷 (thiosulfoxide)、砷、硫代砷 (thiosulfone)、硫酸酯基、硫代硫酸酯基、羟基、甲酰基、羟基过氧基 (hydroxyperoxy)、氢过氧基 (hydroperoxy)、过氧酸、氨甲酰基、三甲基甲硅烷基、硝基、亚硝基、草氨酰、五唑基、氨磺酰基、氨亚磺酰基 (sulfenamoyl)、亚磺酰基 (sulfeno)、氨亚磺酰基 (sulfinamoyl)、亚磺基、磺基、磺氨基、巯基 (hydrothiol)、四唑基、氨基硫羰基、硫代卡巴脞基 (thiocarbazono)、硫代卡巴二脞基 (thiocarbodiazono)、硫代碳酰胍基 (thiocarbonohydrazido)、硫代羧基、硫醛基、硫酰基、氰硫基、氨基硫脞基、硫代亚磺基、硫代磺基 (thiosulfo)、硫脞基、三氮烷基 (triazano)、三氮烯基 (triazeno)、三嗪基、三硫代磺基 (trithiosulfo)、亚磺酰亚氨酸 (sulfinimidic acid)、磺基亚氨酸 (sulfonimidic acid)、亚磺基脞酸 (sulfinohydrazonic acid)、磺基脞酸 (sulfonohydrazonic acid)、亚磺基羟脞酸 (sulfinohydroximic acid)、磺基羟脞酸 (sulfonohydroximic acid) 和磷酸酯。

[0025] R^3 选自杂原子团、羰基以及取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、多环基团。 R^4 和 R^5 独立选自亚甲基、亚乙基、亚丙基 (propylene)、亚丁基 (butylene)、亚戊基 (pentylene) 和亚己基 (hexylene)。 R^6 与琥珀酰亚胺的两个碳形成环结构,其选自取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环和多环基团。 R^7 选自氨基和羟基。

[0026] 接头基团连接于多孔反应层。接头基团包含连接于反应层的结合端、具有反应基团的合成端和连接两端的中间区段,其中所述中间区段包含最多 100 个在水溶液中带离子电荷的单体。反应基团选自:氨基、羟基和羧基以及它们的组合。接头基团的单体选自 DNA、RNA 和具有离子性侧链的氨基酸以及它们的组合。

[0027] 单糖选自阿洛糖、阿卓糖、阿拉伯糖、脱氧核糖、赤藓糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、古洛糖、艾杜糖、来苏糖、甘露糖、阿洛酮糖、L-鼠李糖、核糖、核酮糖、景天庚酮糖、D-山梨醇、山梨糖、sylulose、塔格糖、塔罗糖、苏糖、木酮糖和木糖。二糖选自:直链淀粉、纤维素二糖、乳糖、麦芽糖、蜜二糖、帕拉金糖 (palatinose)、蔗糖和海藻糖。三糖选自棉子糖和松三糖。

[0028] 聚乙二醇衍生物选自：二甘醇、四甘醇、具有伯氨基的聚乙二醇、2-(2-氨基乙氧基)乙醇、乙醇胺、二(乙二醇)单烯丙基醚、二(乙二醇)单甲苯磺酸酯、三(乙二醇)单烯丙基醚、三(乙二醇)单甲苯磺酸酯、三(乙二醇)单苄基醚、三(乙二醇)单三苯甲基醚、三(乙二醇)单氯单甲基醚、三(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、三(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、四(乙二醇)单烯丙基醚、四(乙二醇)单甲基醚、四(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、四(乙二醇)单甲苯磺酸酯、四(乙二醇)单苄基醚、四(乙二醇)单三苯甲基醚、四(乙二醇)单1-己烯基醚、四(乙二醇)单1-庚烯基醚、四(乙二醇)单1-辛烯基醚、四(乙二醇)单1-癸烯基醚、四(乙二醇)单1-十一碳烯基醚、五(乙二醇)单甲基醚、五(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、五(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、五(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、六(乙二醇)单烯丙基醚、六(乙二醇)单甲基醚、六(乙二醇)单苄基醚、六(乙二醇)单三苯甲基醚、六(乙二醇)单1-己烯基醚、六(乙二醇)单1-庚烯基醚、六(乙二醇)单1-辛烯基醚、六(乙二醇)单1-癸烯基醚、六(乙二醇)单1-十一碳烯基醚、六(乙二醇)单4-二苯甲酮基单1-十一碳烯基醚、七(乙二醇)单烯丙基醚、七(乙二醇)单甲基醚、七(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、七(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、八(乙二醇)单烯丙基醚、八(乙二醇)单甲苯磺酸酯、八(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、十一(乙二醇)单甲基醚、十一(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、十一(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、十一(乙二醇)单烯丙基醚、十八(乙二醇)单烯丙基醚、八(乙二醇)、十(乙二醇)、十二(乙二醇)、十四(乙二醇)、十六(乙二醇)、十八(乙二醇)、二苯甲酮-4-六(乙二醇)烯丙基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)己烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)辛烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)癸烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-氟二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-氟二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-四(乙二醇)烯丙基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-四(乙二醇)十一碳烯基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-四(乙二醇)烯丙基醚和4-吗啉代二苯甲酮-4'-四(乙二醇)十一碳烯基醚。

[0029] 本发明还提供具有吸附的多孔反应层从而提高合成质量的电极阵列的制造方法。该方法包括(1)在基板上提供多个清洁的电极，其中所述电极与计算机控制系统电子连接；和(2)在所述多个电极上吸附多孔反应层，其中所述多孔反应层包含至少具有一个羟基的化学物质，其中所述化学物质选自单糖、二糖、三糖、聚乙二醇、聚乙二醇衍生物、N-羟基琥珀酰亚胺、式 I、式 II、式 III、式 IV、式 V 及其组合。糖类、PEG、式 I-V 所示化学物质如本文所提供的。

[0030] 本发明还提供将多孔反应层吸附到多个电极上的方法，包括(1)使处理溶液与微阵列接触约1分钟-约2周，其中所述处理溶液包含吸附到所述各电极上的化学物质和能溶解所述化学物质的溶剂；和(2)洗去所述处理溶液，但保留吸附到所述各电极上的化学物质层。

[0031] 本发明还提供清洁电极微阵列的方法，该方法包括(1)采用等离子清洁方法蚀刻电极微阵列表面；和(2)采用化学清洁方法清洁该电极微阵列。等离子清洁方法优选包括使电极微阵列与氩等离子溅射蚀刻过程(argon plasma sputter etch process)接触约

2-6 分钟,其中等离子功率是 200W,自偏置电压 (selfbias voltage) 是 600-650V,等离子压力是 8mTorr,平行板等离子室中使用 200mm 直径电极。等离子清洁方法优选包括使电极微阵列与六氟化硫等离子接触约 30-60 分钟,其中等离子功率是 300 瓦,等离子压力约为 250-350mTorr,各向同性 (isotropic) 等离子室中气体流速是 124cm³/分钟。等离子清洁方法优选包括采用以下条件用购得的 Reactive Ion Etch Plasma system (反应离子蚀刻等离子系统) (例如,装有 460mm 直径电极的 Oxford Plasmalab 800Plus RIE 系统) 蚀刻电极微阵列:(1) 氩等离子,约 2-4 分钟,RF 等离子功率约 600 瓦,其中压力约为 8 毫托,Ar 气体流速约为 30sccm;(2) 氧等离子,约 5-7 分钟,功率约 500 瓦,其中压力约为 50 毫托,氧气体流速约为 50sccm;或 (3) 氩等离子,约 8-12 分钟,功率约 600 瓦,其中压力约为 8 毫托,Ar 气体流速约为 30sccm。

[0032] 化学清洁方法优选包括电化学清洁方法,包括 (1) 使硫酸溶液与电极微阵列的电极接触,其中所述硫酸溶液浓度约为 0.01-5 摩尔,所述电极与计算机控制系统电子连接;(2) 对第一组电极施加电流脉冲约 0.01-60 秒,同时第二组电极接地;(3) 对第二组电极施加电流脉冲约 0.01-60 秒,同时第一组电极接地;和 (4) 交替进行对第一组电极施加电流脉冲约 0.01-60 秒同时第二组电极接地和对第二组电极施加电流脉冲约 0.01-60 秒同时第一组电极接地的操作,累积时间约 1-60 分钟。化学清洁方法优选包括过氧化氢清洁方法,包括使过氧化氢溶液与电极微阵列的电极接触,其中所述过氧化氢溶液浓度约为 0.5-10% (以体积计),接触时间约为 1 分钟-24 小时,所述过氧化氢的温度约为 20-95℃。

[0033] 附图简述

[0034] 图 1A 和 1B 是电极微阵列的两个电极的横截面示意图。在图 1A 中,吸附的多孔反应层显示吸附于整个微阵列表面。在图 1B 中,吸附的多孔反应层显示主要只吸附在电极表面。反应层显示具有羟基部分作为反应基团。

[0035] 图 2A 和 2B 是电极微阵列的两个电极的横截面示意图,其中连接的接头部分具有用于原位合成的末端反应基团。

[0036] 图 3 是电极微阵列的两个电极的横截面示意图,其中比较了不带电荷的接头/间隔基团与带电荷的接头/间隔基团。

[0037] 图 4 是具有琼脂糖反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0038] 图 5 是具有蔗糖反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0039] 图 6 是显示利用蔗糖反应层的灵敏度研究结果的直方图。

[0040] 图 7 是具有二甘醇反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0041] 图 8 是具有乙二醇反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0042] 图 9 是具有 N-羟基琥珀酰亚胺反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0043] 图 10 是具有三甘醇反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0044] 图 10 是具有棉子糖反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0045] 图 12 是具有松三糖反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0046] 图 13 是具有 Splenda®反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0047] 图 14 是具有菊粉反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0048] 图 15 是具有帕拉金糖反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0049] 图 16 是具有聚乙二醇反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0050] 图 17 是具有水杨苷反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0051] 图 18 是具有核糖反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0052] 图 19 是具有蜜二糖反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0053] 图 20A-E 是电极微阵列的四个电极的横截面示意图,其显示了在电极上合成肽,然后与抗 β 内啡肽抗体(克隆 3-E7,小鼠)和 Cy5 标记的驴抗小鼠抗体接触。两个电极具有离子连接基团,两个电极缺乏离子连接基团。

[0054] 图 21 是电极微阵列的二个电极的横截面示意图,其显示了不用离子接头时用铂电极猝灭荧光标记的试剂。

[0055] 图 22 是电极微阵列截面的顶视图的放大和对比度提高(contrast-enhanced)的图片,其显示当用离子接头连接肽与铂电极重叠层时 Cy5 标记的驴抗-小鼠抗体可见。

[0056] 图 23 是电极微阵列的二个电极的横截面示意图,一个电极显示利用非离子接头能猝灭 Cy5 标记的驴抗-小鼠抗体,这是因为非离子接头溶剂化不佳。另一电极显示利用离子接头能防止 Cy5 标记的驴抗-小鼠抗体猝灭,这是因为离子接头溶剂化良好,从而使得抗体远离铂电极。

[0057] 图 24 是电极微阵列截面的顶视图的放大图片,其显示荧光猝灭随接头/间隔基团从 0 延长至 15 个脱氧胸苷酸单位而降低。接头/间隔基是原位合成的。荧光来自德克萨斯红标记的与共价连接于接头/间隔基团末端的生物素结合的链霉亲和素。

[0058] 图 25 是具有 1-(3-羟丙基)吡咯反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0059] 图 26 是具有 1-己基吡咯反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。

[0060] 图 27 是具有组合反应层的微阵列顶视图的放大部分的图片,其中所述组合包含蔗糖和果糖。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。寡聚物长 35-70 个单体。

[0061] 图 28 是具有组合反应层的微阵列顶视图的放大部分的的照片,其中所述组合包含蔗糖和果糖。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。寡聚物长 35 个单体。

[0062] 图 29 是具有组合反应层的微阵列顶视图的放大部分的的照片,其中所述组合包含蔗糖和果糖。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。寡聚物长 40 个单体。

[0063] 图 30 是具有组合反应层的微阵列顶视图的放大部分的的照片,其中所述组合包含蔗糖和果糖。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。寡聚物长 45 个单体。

[0064] 图 31 是具有组合反应层的微阵列顶视图的放大部分的的照片,其中所述组合包含蔗糖和果糖。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。寡聚物长 50 个单体。

[0065] 图 32 是具有组合反应层的微阵列顶视图的放大部分的的照片,其中所述组合包含蔗糖和果糖。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。寡聚物长 55 个单体。

[0066] 图 33 是具有组合反应层的微阵列顶视图的放大部分的的照片,其中所述组合包含蔗糖和果糖。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。寡聚物长 60 个单体。

[0067] 图 34 是具有组合反应层的微阵列顶视图的放大部分的的照片,其中所述组合包含蔗糖和果糖。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。寡聚物长 65 个单体。

[0068] 图 35 是具有组合反应层的微阵列顶视图的放大部分的的照片,其中所述组合包含蔗糖和果糖。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。寡聚物长 70 个单体。

[0069] 发明详述

[0070] 本文所用化学基团的术语在很大程度上按照“国际纯粹化学和应用化学联合会”, Principles of Chemical Nomenclature: a Guide to IUPAC Recommendations (《化学术语原则: IUPAC 建议指南》), Leigh, G.J.; Favre, H. A. 和 Metanowski, W. V., Blackwell Science, 1998 的建议,其内容纳入本文作为参考。取代结构的形成受限于原子价的要求。

[0071] “寡聚物”表示具有中等相对分子量 (intermediate relative molecular mass) 的分子,其结构基本上包含实际上或在概念上衍生自较低相对分子量分子的少量单位。如果除去某分子的一个或几个单位后,其特性确实显著不同,则该分子可视作具有中等相对分子量。如果该分子的部分或整体具有中等相对分子量,并且基本上包含实际上或在概念上衍生自较低相对分子量分子的少量单位,可将其描述为寡聚的,或用作为形容词使用的寡聚物来描述。寡聚物通常由单体构成。

[0072] 术语“共-寡聚物”表示衍生自多个种类的单体的寡聚物。术语寡聚物包括共-寡聚物。寡聚物的例子有,由脱氧腺苷酸 (A)、脱氧鸟苷酸 (G)、脱氧胸苷酸 (C) 和脱氧胞苷酸 (T) 单位按以下顺序构成的单链 DNA 分子是共-寡聚物,由 10 个 T 单位构成的单链 DNA 分子是寡聚物,然而,二者也都称为寡聚物。

[0073] 术语“单体”表示能发生聚合从而构成大分子,例如寡聚物、共-寡聚物、聚合物或共聚物基本结构的组成单位的分子。单体的例子包括 A、C、G、T、腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸、尿苷酸、氨基酸、氯乙烯和其它乙烯基化合物。

[0074] 术语“聚合物”表示具有高相对分子量的由大分子构成的物质,其结构基本上包含实际上或在概念上衍生自低相对分子量子单位的多次重复。在许多情况,特别是合成聚合物中,如果添加或除去某分子的一个或几个单位对该分子特性的影响可忽略,则该分子可视作具有高相对分子量子。此论点不适合其特性极其取决于分子结构细节的某些大分子。如果该分子的部分或整体具有高相对分子量子,并且基本上包含实际上或在概念上衍生自低相对分子量子单位的多次重复,可将其描述为大分子或多聚的,或用作为形容词使用的聚合物来描述。

[0075] 术语“共聚物”表示自多个种类的单体的聚合物。由两种单体物质共聚合得到的共聚物有时称为二聚物,由三种单体共得到的共聚物称为三聚物,由四种单体共聚合得到的共聚物称为四聚物,等等。术语聚合物包括共聚物。

[0076] 术语“聚乙二醇”(PEG)表示含有由共同重复乙二醇单位 $[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-]_n$ 构成的链的有机化学物质。PEG 通常是可弯曲的、亲水性的、酶作用稳定的和生物学惰性的有机聚合物,但它们在水中不带离子电荷。PEG 通常可分为两类。第一类是分子量为 1000-20,000 以上的聚合 PEG。第二类是分子量小于 1000 的 PEG 样链。聚合 PEG 已用于生物缀合物中,许多综述描述了将此类接头部分与各种分子连接。PEG 已用作接头,而短 PEG-样接头可分为两种类型:均质 $-\text{X}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{X}$ 和异质双功能的 $[\text{X}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n]-\text{Y}$ 间隔基团。

[0077] 术语“PEG 衍生物”表示含有 PEG 共同重复单位的乙二醇衍生物。PEG 衍生物的例子包括但不限于:二甘醇(DEG)、四甘醇(TEG)、具有伯氨基的聚乙二醇、二(乙二醇)单烯丙基醚、二(乙二醇)单甲苯磺酸酯、三(乙二醇)单烯丙基醚、三(乙二醇)单甲苯磺酸酯、三(乙二醇)单苄基醚、三(乙二醇)单三苯甲基醚、三(乙二醇)单氯单甲基醚、三(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、三(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、四(乙二醇)单烯丙基醚、四(乙二醇)单甲基醚、四(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、四(乙二醇)单甲苯磺酸酯、四(乙二醇)单苄基醚、四(乙二醇)单三苯甲基醚、四(乙二醇)单 1-己烯基醚、四(乙二醇)单 1-庚烯基醚、四(乙二醇)单 1-辛烯基醚、四(乙二醇)单 1-癸烯基醚、四(乙二醇)单 1-十一碳烯基醚、五(乙二醇)单甲基醚、五(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、五(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、五(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、六(乙二醇)单烯丙基醚、六(乙二醇)单甲基醚、六(乙二醇)单苄基醚、六(乙二醇)单三苯甲基醚、六(乙二醇)单 1-己烯基醚、六(乙二醇)单 1-庚烯基醚、六(乙二醇)单 1-辛烯基醚、六(乙二醇)单 1-癸烯基醚、六(乙二醇)单 1-十一碳烯基醚、六(乙二醇)单 4-二苯甲酮基单 1-十一碳烯基醚、七(乙二醇)单烯丙基醚、七(乙二醇)单甲基醚、七(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、七(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、八(乙二醇)单烯丙基醚、八(乙二醇)单甲苯磺酸酯、八(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、十一(乙二醇)单甲基醚、十一(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、十一(乙二醇)单甲苯磺酰基单甲基醚、十一(乙二醇)单烯丙基醚、十八(乙二醇)单烯丙基醚、八(乙二醇)、十(乙二醇)、十二(乙二醇)、十四(乙二醇)、十六(乙二醇)、十八(乙二醇)、二苯甲酮-4-六(乙二

醇)烯丙基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)己烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)辛烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)癸烯基醚、二苯甲酮-4-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-氟二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-氟二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-四(乙二醇)烯丙基醚、4-羟基二苯甲酮-4'-四(乙二醇)十一碳烯基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-六(乙二醇)烯丙基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-六(乙二醇)十一碳烯基醚、4-吗啉代二苯甲酮-4'-四(乙二醇)烯丙基醚和4-吗啉代二苯甲酮-4'-四(乙二醇)十一碳烯基醚。

[0078] 术语“具有伯氨基的聚乙二醇”指用取代的伯氨基替代羟基的聚乙二醇。在分子量为 5,000-20,000Da 的商业产品中,取代最多可达 98%。

[0079] 术语“烷基”表示含有最多约 20 个,但优选最多 8 个碳原子的直链或支链烷基。烷基的例子包括但不限于以下:甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、异己基、正己基、正庚基和正辛基。取代的烷基的一个或多个氢原子可用其它基团取代,或其碳可用二价、三价或四价基团或原子替代。虽然按照定义烷基是单价的,但本文所用的烷基包括符合取代的化合价要求的多价基团。

[0080] 术语“烯基”表示具有至少一个碳-碳双键,和最多约 20 个,优选最多 8 个碳原子的直链或支链烷基。烯基的例子包括但不限于:乙烯基、1-丙烯基、2-丁烯基、1,3-丁二烯基、2-戊烯基、2,4-己二烯基、4-(乙基)-1,3-己二烯基和 2-(甲基)-3-(丙基)-1,3-丁二烯基。取代的烯基的一个或多个氢原子可用其它基团取代,或其碳可用二价、三价或四价基团或原子替代。虽然按照定义烯基是单价的,但本文所用的烯基包括符合取代的化合价要求的多价基团。

[0081] 术语“炔基”表示具有至少一个碳-碳三键,和最多约 20 个,优选最多 8 个碳原子的直链或支链烷基。炔基的例子包括但不限于:乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、4-戊炔基、5-己炔基、6-庚炔基、7-辛炔基、1-甲基-2-丁炔基、2-甲基-3-戊炔基、4-乙基-2-戊炔基和 5,5-甲基-1,3-己炔基。取代的炔基的一个或多个氢原子可用其它基团取代,或其碳可用二价、三价或四价基团或原子替代。虽然按照定义炔基是单价的,但本文所用的炔基包括符合取代的化合价要求的多价基团。

[0082] 术语“环烷基”表示形成至少一个环的烷基,其中所述环具有约 3-14 个碳原子。环烷基的例子包括但不限于:环丙基、环丁基、环戊基和环己基。取代的环烷基的一个或多个氢原子可用其它基团取代,或其碳可用二价、三价或四价基团或原子替代。虽然按照定义环烷基是单价的,但本文所用的环烷基包括符合取代的化合价要求的多价基团。

[0083] 术语“环烯基”表示形成至少一个环,并且在该环内具有至少一个碳-碳双键的烯基,其中所述环具有约 3-14 个碳原子。环烯基的例子包括但不限于:环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、1,3-环戊二烯基和环己烯基。取代的环烯基的一个或多个氢原子可用其它基团取代,或其碳可用二价、三价或四价基团或原子替代。虽然按照定义环烯基是单价的,但本文所用的环烯基包括符合取代的化合价要求的多价基团。

[0084] 术语“环炔基”表示形成至少一个环,并具有至少一个碳-碳三键的炔基,其中所述环具有最多约 14 个碳原子。形成具有至少一个三键和至少一个双键的环的基团是环炔基。环炔基的例子包括但不限于:环辛炔。取代的环炔基的一个或多个氢原子可用其它基

团取代。虽然按照定义环炔基是单价的,但本文所用的环炔基包括符合取代的化合价要求的多价基团。

[0085] 术语“芳基”表示具有单价和约 4-20 个碳原子的芳族碳环基团。芳基的例子包括但不限于:苯基、萘基和蒽基。取代的芳基的一个或多个氢原子可用其它基团取代。虽然按照定义芳基是一价的,但本文所用的芳基包括具有多价的基团,从而能符合取代的要求。芳基可以是稠环结构的一部分,例如 N-羟基琥珀酰亚胺与苯基(苯)结合形成 N-羟基苯邻二甲酰亚胺。

[0086] 术语“杂”或“杂原子”用于化学基团的上下文中时,表示除碳或氢以外的原子。杂原子的优选例子包括氧、氮、磷、硫、硼、硅和硒。

[0087] 术语“杂环”表示具有至少一个环部分的环结构,所述环部分具有至少一个形成该环一部分的杂原子,其中所述杂环具有 4-20 个相连的原子来形成环结构。具有 6 个原子的杂环的例子是具有一个杂原子的吡啶。具有一价的杂环结构的其它例子包括但不限于:吡啶、咪唑、苯并吡喃、咪唑、呋喃、吡咯、喹啉和磷啉(phosphinoline)。杂环结构的例子包括但不限于:氮丙啶、1,3-二硫戊环、1,3-二氮杂环丁烷和 1,4,2-噁唑磷烷(1,4,2-oxazaphospholidine)。单价的杂环结构的例子包括但不限于:稠环的芳族和非芳族结构:2H-呋喃并(furo)[3,2-b]吡喃、5H-吡啶并[2,3-d]-噁嗪、1H-吡啶并[4,3-d]噁唑、4H-咪唑并[4,5-d]噁唑、硒唑并[5,4-f]苯并噁唑和环戊[b]吡喃。杂环可以是符合取代的化合价要求的多价基团。

[0088] 术语“多环”或“多环基团”表示具有多个环的碳环结构,其中所述多环基团具有约 4-20 个形成该环结构的碳并且是单价的。多环基团的例子包括但不限于:双环[1.1.0]丁烷、双环[5.2.0]壬烷和三环[5.3.1.1]十二烷。多环基团可以是符合取代的化合价要求的多价基团。

[0089] 术语“卤代”或“卤素”表示氟、氯、溴或碘。术语“杂原子团”表示一个杂原子或多个杂原子,所述杂原子能结合在一起并具有两个游离化合价从而能在两个原子之间形成共价桥键。例如,氧基(-O-)能在两个甲基之间形成桥键从而形成 $\text{CH}_3\text{-O-CH}_3$ (二甲醚)或能在两个碳之间形成桥键从而形成环氧化物,例如顺式或反式 2,3-环氧丁烷、

$\text{CH}_3\text{-CH}\overset{\text{O}}{\text{---}}\text{CH-CH}_3$ 。除非术语环状桥键与术语“杂原子团”联用来表示正常使用,与正常使用相比,本文所用的术语“杂原子团”表示替代烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基和环炔基中的基团,但不形成环状桥键,例如环氧化物。

[0090] 采用杂桥键(例如,氧桥键)的术语,杂原子团的例子包括但不限于:亚叠氨基(-N=N-HN-)、偶氮(-N=N-)、二亚氨基(-NH-NH-)、桥二氧(-O-O-)、桥二硫基(-S-S-)、桥硫基(-S-)、桥氧硫亚氨基(-S-O-NH-)、桥氧基(-O-)、桥氧亚氨基(-O-NH-)、桥氧次氨基(-O-N=)、桥氧硫基(-O-S-)、桥氧硫氧基(epoxythioxy)(-O-S-O-)、呋喃基(-C₄H₂O-)、亚氨基(-NH-)和次氨基(-N=)。采用形成非环桥键的术语,杂原子团的例子包括但不限于:

桥氧基(-O-)、桥硫基(-S-)、桥硒基(-Se-)、桥二氧(-O-O-)、桥二硫(-S-S-)、λ⁴-磺烷基(sulfano)(-SH₂-)、桥氧硫(-O-S-)、桥氧硫氧基(-O-S-O-)、桥氧亚氨基(-O-NH-)、桥亚氨基(-NH-)、二氮烷基(-NH-NH-)、二氮烯基(-N=N-)、三氮[1]烯基(triaz[1]eno)(-N=N-NH-)、磷烷基(phosphano)(-PH-)、锡烷基(-SnH₂-)、桥氧亚甲基(-O-CH₂-)、桥氧亚乙基

(-O-CH₂-CH₂-)、桥氧丙 [1] 烯基($\text{—O—}\overset{1}{\text{CH}}=\overset{2}{\text{CH}}\text{—}\overset{3}{\text{CH}_2}\text{—}$)。

[0091] 术语“桥”表示某环结构的一部分和该环结构的另一部分之间通过烃桥相连。桥的例子包括但不限于：桥亚甲基 (methano)、桥亚乙基 (ethano)、亚乙烯基、桥亚丙基 (propano)、桥亚丁基 (butano)、2- 丁烯基 (buteno) 和桥亚苯基 (benzeno)。

[0092] 术语“杂桥”表示某环结构的一部分和该环结构的另一部分之间通过一个或多个杂原子团相连, 或通过连接某线形结构的一部分和该线形结构另一部分的杂桥连接形成环。

[0093] 术语“氧基”表示二价基团 -O-。

[0094] 术语“氧代”表示二价基团 = O。

[0095] 术语“羰基”表示基团 $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{—C—}$, 其中碳具有用于键合的两根键。

[0096] 术语“酰胺”或“酰基氨基”表示基团 $\overset{\text{H}}{\text{N}}\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{—C—R}$, 其中氮具有用于键合的一根键,

R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0097] 术语“烷氧基”表示基团 -O-R, 其中氧具有一根键, R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。其中 R 是烷基的烷氧基的例子包括但不限于：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基、己氧基、庚氧基、辛氧基、1, 1- 二甲基乙氧基、1, 1- 二甲基丙氧基、1, 1- 二甲基丁氧基、1, 1- 二甲基戊氧基、1- 乙基 -1- 甲基丁氧基、2, 2- 二甲基丙氧基、2, 2- 二甲基丁氧基、1- 甲基 -1- 乙基丙氧基、1, 1- 二乙基丙氧基、1, 1, 2- 三甲基丙氧基、1, 1, 2- 三甲基丁氧基、1, 1, 2, 2- 四甲基丙氧基。其中 R 是烯基的烷氧基的例子包括但不限于：乙烯氧基、1- 丙烯氧基、2- 丙烯氧基、1- 丁烯氧基、2- 丁烯氧基、3- 丁烯氧基、1- 甲基 - 丙 -2- 烯氧基、1, 1- 二甲基 - 丙 -2- 烯氧基、1, 1, 2- 三甲基 - 丙 -2- 烯氧基和 1, 1- 二甲基 - 丁 -2- 烯氧基、2- 乙基 -1, 3- 二甲基 - 丁 -1- 烯氧基。其中 R 是炔基的烷氧基的例子包括但不限于：乙炔氧基、1- 丙炔氧基、2- 丙炔氧基、1- 丁炔氧基、2- 丁炔氧基、3- 丁炔氧基、1- 甲基 - 丙 -2- 炔氧基、1, 1- 二甲基 - 丙 -2- 炔氧基和 1, 1- 二甲基 - 丁 -2- 炔氧基、3- 乙基 -3- 甲基 - 丁 -1- 炔氧基。其中 R 是芳基的烷氧基的例子包括但不限于：苯氧基、2- 萘氧基和 1- 蒎氧基 (anthyloxy)。

[0098] 术语“酰基”表示基团 $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{—C—R}$, 其中碳具有一根键, R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。酰基的例子包括但不限于：乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、异戊酰基、丙烯酰基、丙炔酰基、甲基丙烯酰基 (methacryloyl)、丁烯酰基、异丁烯酰基、苯甲酰基和萘酰基。

[0099] 术语“酰氧基”表示基团 $\text{—O—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{—C—R}$, 其中氧具有一根键, R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。酰氧基的例子包括但不限于：乙酰氧基、乙基羰氧基、2- 丙烯基羰氧基、戊基羰氧基、1- 己炔基羰氧基、苯甲酰氧基、环己基羰氧基、2- 萘酰氧基、3- 环癸烯基羰氧基。

[0100] 术语“氧基羰基 (oxycarbonyl)”表示基团 $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{—C—O—R}$, 其中碳具有一根键, R 是氢

或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。氧基羰基的例子包括但不限于：甲氧基羰基、乙氧基羰基、异丙氧基羰基、苯氧基羰基和环己基氧基羰基。

[0101] 术语“酰氧基羰基”表示基团 $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ -\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R}, \end{array}$ 其中碳具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0102] 术语“烷氧基羰氧基”表示基团 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{C}-\text{O}-\text{R}, \end{array}$ 其中氧具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0103] 术语“羧基”表示基团 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ，其中碳具有一根键。

[0104] 术语“亚氨基”或“氮宾”表示基团 $=\text{N}-\text{R}$ ，其中氮具有两根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0105] 术语“氨基”表示基团 $-\text{NH}_2$ ，其中氮具有一根键。

[0106] 术语“仲氨基”表示基团 $-\text{NH}-\text{R}$ ，其中氮具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0107] 术语“叔氨基”表示基团 $\begin{array}{c} \text{R}^2 \\ | \\ -\text{N}-\text{R}^1, \end{array}$ R^1 和 R^2 独立选自未取代和取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环和多环基团。

[0108] 术语“1,2-亚肼代”表示基团 $-\text{NH}-\text{NH}-$ ，其中两个氮具有一根与同一原子结合的键。术语“1,2-亚肼基”表示基团 $-\text{NH}-\text{NH}-$ ，其中两个氮具有一根与不同原子结合的键。

[0109] 术语“肼基”表示基团 $\text{NH}_2-\text{NH}-$ ，其中氮具有一根键。

[0110] 术语“亚肼基”表示基团 $\text{NH}_2-\text{N}=\text{}$ ，其中氮具有两根键。

[0111] 术语“羟基亚氨基”表示基团 $\text{HO}-\text{N}=\text{}$ ，其中氮具有两根键。

[0112] 术语“烷氧基亚氨基”表示基团 $\text{R}-\text{O}-\text{N}=\text{}$ ，其中氮具有两根键，R 是未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0113] 术语“叠氮基”表示基团 N_3- ，其中氮具有一根键。

[0114] 术语“氧化偶氮基”表示基团 $-\text{N}(\text{O})=\text{N}-$ ，其中这些氮具有一根键。

[0115] 术语“烷氧化偶氮基”表示基团 $\text{R}-\text{N}(\text{O})=\text{N}-$ ，其中氮具有一根键，R 是未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。氧化偶氮苯是示例性化合物。

[0116] 术语“氰基”表示基团 $-\text{CN}$ 。术语“异氰基”表示基团 $-\text{NC}$ 。术语“氰酰基”表示基团 $-\text{OCN}$ 。术语“异氰酰基”表示基团 $-\text{NCO}$ 。术语“雷酸酯基”表示基团 $-\text{ONC}$ 。术语“氰硫基”表示基团 $-\text{SCN}$ 。术语“异硫氰基”表示基团 $-\text{NCS}$ 。术语“氰硒基”表示基团 $-\text{SeCN}$ 。术语“异硒氰基”表示基团 $-\text{NCSe}$ 。

[0117] 术语“羧酰氨基”或“酰基氨基”表示基团 $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ | \quad \parallel \\ -\text{N}-\text{C}-\text{R}, \end{array}$ 其中氮具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0118] 术语“酰基亚氨基”表示基团 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ =\text{N}-\text{C}-\text{R}, \end{array}$ 其中氮具有两根键，R 是氢或未取代或取

代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0119] 术语“亚硝基”表示基团 $O=N-$ ，其中氮具有一根键。

[0120] 术语“氨基”表示基团 $-O-NH_2$ ，其中氧具有一根键。

[0121] 术语“碳亚氨基 (carboximidoyl)”表示基团 $\begin{array}{c} NH \\ || \\ -C-R, \end{array}$ 其中碳具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0122] 术语“肼基 (hydrazonoyl)”表示基团 $\begin{array}{c} NH-NH_2 \\ || \\ -C-R, \end{array}$ 其中碳具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0123] 术语“肟基 (hydroximoyl)”或“肟 (oxime)”表示基团 $\begin{array}{c} NH-OH \\ || \\ -C-R, \end{array}$ 其中碳具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0124] 术语“胼基”表示基团 $\begin{array}{c} O \\ || \\ R-C-NH-NH-, \end{array}$ 其中氮具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0125] 术语“脞基”表示基团 $\begin{array}{c} NH \\ || \\ -C-NH_2, \end{array}$ 其中碳具有一根键。

[0126] 术语“硫化物”表示基团 $-S-R$ ，其中硫具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0127] 术语“硫基 (thiol)”表示 $-S-$ ，硫具有两根键。巯基表示 $-SH$ 。

[0128] 术语“硫代酰基”表示基团 $-C(S)-R$ ，其中碳具有一根键，R 是氢或取代或未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0129] 术语“亚砷”表示基团 $\begin{array}{c} O \\ || \\ -S-R, \end{array}$ 其中硫具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。术语“硫代亚砷”表示用硫取代亚砷中的氧；当 R 基团的第一个碳被氧基取代，并且亚砷与另一基团的硫原子结合时，该术语包括取代结合在硫和 R 基团之间的氧。

[0130] 术语“砷”表示基团 $\begin{array}{c} O \\ || \\ -S-R \\ || \\ O, \end{array}$ 其中硫具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。术语“硫代砷”表示用硫取代砷中一个或两个位置的氧；当 R 基团的第一个碳被氧基取代，并且砷与另一基团的硫原子结合时，该术语包括取代结合在硫和 R 基团之间的氧。

[0131] 术语“硫酸酯基”表示基团 $-O-\begin{array}{c} O \\ || \\ S \\ || \\ O \end{array}-O-R$ 其中氧具有一根键，R 是氢或未取代或取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。术语“硫代硫酸酯基”表示用硫取代硫酸酯基中一个、两个、三个或四个位置的氧；

[0132] 术语“磷酸酯”表示基团 $R^1R^2PO_4^-$ ，其中氧具有一根键， R^1 选自氢和未取代和取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团， R^2 选自未取代和取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团。

[0133] 化学物质上下文中的术语“取代的”或“取代”表示独立选自：(1) 用单价基团取代至少一个碳上的氢，(2) 用二价基团取代至少一个碳上的两个氢，(3) 用三价基团取代至少一个末端碳（甲基）上的三个氢，(4) 用二价、三价或四价基团取代至少一个碳和相关的氢（例如，亚甲基），和 (5) 它们的组合。取代应符合化合价的要求。取代发生在烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团上，得到取代的烷基、取代的烯基、取代的炔基、取代的环烷基、取代的环烯基、取代的环炔基、取代的芳基、取代的杂环和取代的多环基团。

[0134] 在烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或多环基团上取代的基团独立选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、多环基团、卤素、杂原子团、氧基、氧代、羰基、酰胺、烷氧基、酰基、酰氧基、氧基羰基、酰氧基羰基、烷氧基羰氧基、羧基、亚氨基、氨基、仲氨基、叔氨基、1,2-亚肼代、肼基、亚肼基、羟基亚氨基、叠氮基、氧化偶氮基、烷氧化偶氮基、氰基、异氰基、氰氧基、异氰氧基、氰硫基、雷酸酯基、异硫氰基、异硒氰基、氰硒基、羧基酰氨基、酰基亚氨基、亚硝基、氨基氧基、碳亚氨基、脞基、脞基、酰基肼基、脞基、硫化物、醚硫基、亚砷、硫代亚砷、砷、硫代砷、硫酸酯基、硫代硫酸酯基、羟基、甲酰基、羟基过氧基、氢过氧基、过氧酸、氨甲酰基、三甲基甲硅烷基、次氨基、硝基、酸式硝基、亚硝基、脲亚氨基、草氨酰、五唑基、硒基、硫代(thiooxi)、氨磺酰基、氨亚磺酰基、亚磺酰基、氨亚磺酰基、亚磺基、亚硫酰基、磺基、磺氨基、磺酸盐、磺酰基、磺酰基二氧基(sulfonyldioxy)、巯基、四唑基、氨基硫羰基、硫代卡巴脞基、硫代卡巴二脞基、硫代碳酰肼基、硫代羰基、硫代羧基、氰硫基、硫醛基、硫酰基、氨基硫脞基、硫代亚磺基、硫代磺基、硫脞基、硫代、三氮烷基、三氮烯基、三嗪基、三硫代(trithio)、三硫代磺基、亚磺酰亚氨酸、磺基亚氨酸、亚磺基脞酸、磺基脞酸、亚磺基羟脞酸、磺基羟脞酸和磷酸酯，以及它们的组合。

[0135] 取代的例子有用羟基取代乙烷的氢得到乙醇，用氧取代丙烷中间碳的两个氢得到丙酮（二甲基酮）。另一例子是用氧基（-O-）取代丙烷中间的碳（亚甲基）得到二甲醚（ CH_3-O-CH_3 ）。另一例子是用苯基取代苯的一个氢得到联苯。如上所述，可用杂原子团取代烷基、烯基或炔基内的亚甲基（ CH_2 ），从而形成线形或支链的取代结构，而不是环，或者可取代环烷基、环烯基或环炔基环内的亚甲基，从而得到杂环。另一例子是，可用次氨基（-N=）取代苯的碳之一和相关的氢，从而得到吡啶，或者可用氧基取代从而得到吡喃。

[0136] 术语“未取代的”表示烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基或芳基上没有氢或碳被取代。

[0137] 术语“接头”表示一端与或能与所述固体表面相连，另一端具有反应基团的分子，所述反应基团与或能与相关的化学物质，例如小分子、寡聚物或聚合物相连。接头可已经与固体表面结合和/或其反应基团已连接有相关的化学物质。接头的反应基团可连接有保护基团，其中所述保护基团可用化学或电化学方法除去。接头可含有多个分子，其中所述分子原位共价相连从而形成具有所需反应基团，从固体表面上突起的接头。

[0138] 术语“间隔基团”表示一端与或能与接头的反应基团相连，另一端具有反应基团的分子，所述反应基团与或能与相关的化学物质，例如小分子、寡聚物或聚合物相连。间隔基

团可已经与接头结合和 / 或其反应基团已连接有相关的化学物质。间隔基团的反应基团可连接有保护基团,其中所述保护基团可用化学或电化学方法除去。间隔基团可在接头上原位形成。可先形成间隔基团,再与已连接在固体表面的接头相连。可先在相关的化学物质上外部合成间隔基团,再与已连接在固体表面的接头相连。可将相关的化学物质连接在与接头相连的间隔基团上,然后将整个结构连接于固体表面的反应位点。间隔基团的目的是延长相关分子和固体表面之间的距离。

[0139] 术语“组合接头和间隔基团”表示同时具有接头和间隔基团特性的接头。可原位合成组合接头和间隔基团或可在外部合成,再连接于固体表面。

[0140] 术语“涂层”表示与固体表面化学结合和 / 或物理结合的物质薄层。涂层可通过机械连锁以及范德华力(色散力和偶极力)、电子给体-受体相互作用、金属配位/络合、共价结合或上述的组合与固体表面相连。涂层可提供直接连接相关化学物质、接头、组合接头和间隔基团的反应基团。涂层可在原位聚合和 / 或交联。

[0141] 用于反应性或反应涂层或反应性或反应层的术语“反应性”或“反应”表示在所述层中具有化学物质或结合的基团,所述物质或基团能形成将接头、间隔基团或其它化学物质与所述层或涂层连接起来的共价键。

[0142] 用于多孔反应层或涂层的术语“多孔”表示所述层或涂层内不均匀,从而能使分子物质扩散入并通过所述层或涂层。

[0143] 术语“吸附”或“吸附的”表示通过范德华力(色散力和偶极力)、电子给体-受体相互作用、金属配位/络合或上述作用力的组合发生的化学连接。根据表面、物质和环境条件,吸附后,所述物质可与所述表面共价结合。

[0144] 术语“微阵列”一般指具有特定位点的平面,所述位点通常以行列形式排列,其中各位点可用于某种类型的化学或生物化学分析、合成或方法。微阵列上的这些位点通常小于 100 微米。术语“电极微阵列”指其中所述电极是微阵列上的具体位点的电极微阵列。

[0145] 术语“合成质量”一般指所需或设计的化学或生物化学物质与实际合成的物质之间的平均相似程度。该术语可指合成中的其它问题,例如层或涂层对所达到的合成质量的影响。

[0146] 术语“溶剂化”表示溶剂分子与溶质分子或离子混合而形成某种化合物的化学过程,其中所述化合物通常是通过范德华力(色散力和偶极力)、酸-碱相互作用(电子给体-受体相互作用)、离子相互作用或金属复合物相互作用而不是共价键从而结合在一起的松散结合复合物。在水中,水的 pH 能影响可解离物质,例如酸和碱的溶剂化。此外,盐的浓度以及盐的电荷能影响溶剂化。

[0147] 术语“琼脂糖”表示任何可购得的琼脂糖。琼脂糖是一种多糖生物聚合物,通常从海藻中获得。琼脂糖具有较大数量的羟基而能提供高度水溶性。可购得各种分子量范围和特性的琼脂糖。

[0148] 术语“受控多孔玻璃”表示适合于涂层目的的任何可购得的多孔玻璃材料。受控多孔玻璃(CPG)一般是因大量空隙而具有高表面积无机玻璃材料。

[0149] 术语“单糖”表示未与任何其它糖连接的一个糖分子。单糖的例子包括阿洛糖、阿卓糖、阿拉伯糖、脱氧核糖、赤藓糖、果糖(D-左旋糖)、半乳糖、葡萄糖、古洛糖、艾杜糖、来苏糖、甘露糖、阿洛酮糖、核糖、核酮糖、景天庚酮糖、D-山梨醇、山梨糖、sylulose、L-鼠李

糖(6-脱氧-L-甘露糖)、塔格糖、塔罗糖、苏糖、木酮糖和木糖。

[0150] 术语“二糖”表示两个糖连接在一起形成一个分子。二糖的例子包括:直链淀粉、纤维素二糖(4-β-D-吡喃葡萄糖基-D-吡喃型葡萄糖)、乳糖、麦芽糖(4-O-α-D-吡喃葡萄糖基-D-葡萄糖)、蜜二糖(6-O-α-D-吡喃葡萄糖基-D-葡萄糖)、帕拉金糖(6-O-α-D-吡喃葡萄糖基-D-果糖)、蔗糖和海藻糖(α-D-吡喃葡萄糖基-α-D-吡喃葡萄糖苷)。

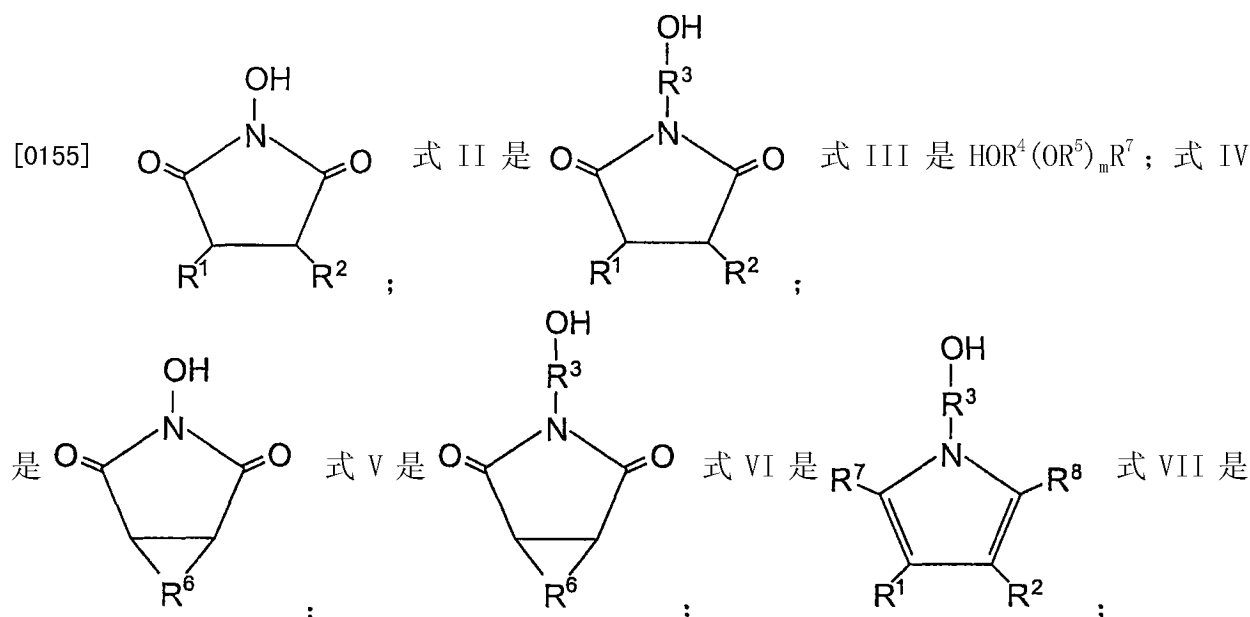
[0151] 术语“三糖”表示三个糖连接在一起形成一个分子。三糖的例子包括:棉子糖(6-O-α-D-吡喃半乳糖基-D-吡喃葡萄糖基-β-D-呋喃果糖苷)和松三糖(O-α-D-吡喃葡萄糖基-(1→3)-β-D-呋喃果糖基-α-D-吡喃葡萄糖苷)。

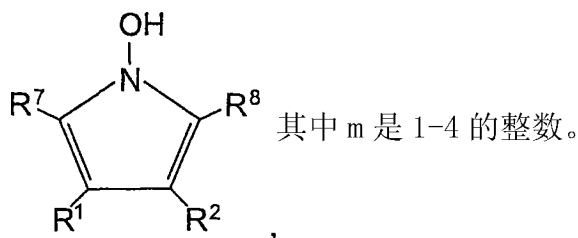
[0152] 术语“多糖”三个以上糖连接在一起形成一个分子,但更精确说表示糖聚合物或寡聚物。多糖的例子包括但不限于:葡聚糖(由葡萄糖亚单位组成的聚合物)、淀粉和纤维素。

具体实施方式

[0153] 本发明的一个实施方式提供具有用于提高合成质量的吸附多孔反应层的电极微阵列。所述微阵列具有连接于基板的多个电极,其中所述电极与能够选择任何单个电极或多个电极作为电极组与计算机控制系统电子相连。图 1A 和 1B 是具有多个电极的这种微阵列 106 的两个电极 108、110 的横截面示意图。在本发明的一个实施方式中,图 1A 所示的吸附层 104A 覆盖了这些电极和连接这些电极的基板。吸附层 104A 具有羟基反应基团 102。反应基团 102 可以是除羟基以外的基团,包括但不限于:胺、羧酸、醛、醚硫、烯、炔、腈、叠氮基或磷化合物。在图 1B 所示的另一实施方式中,吸附层 104B 可以基本上在电极上,但基本上不在基板 106 上。在任一实施方式中,吸附层可以化学封闭并选择性地电化学解封闭,从而将化学反应的位置控制在特定电极,同时防止在非选定的电极和非电极区域上发生化学反应。

[0154] 多个电极上的吸附多孔反应层含有至少具有一个羟基的化学物质,其中所述化学物质选自单糖、二糖、三糖、聚乙二醇、聚乙二醇衍生物、N-羟基琥珀酰亚胺、式 I、式 II、式 III、式 IV、式 V、式 VI 和式 VII 所示化合物及其组合。式 I 是





[0156] R^1 、 R^2 、 R^7 和 R^8 独立选自氢和取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、多环基团、卤素、酰胺、烷氧基、酰基、酰氧基、氧基羰基、酰氧基羰基、烷氧基羰氧基、羧基、氨基、仲氨基、叔氨基、胍基、叠氮基、烷氧化偶氮基、氰基、异氰基、氰氧基、异氰氧基、氰硫基、雷酸酯基、异硫氰基、异硒氰基、氰硒基、羧基酰氨基、酰基亚氨基、亚硝基、氨基氧基、碳亚氨基、脞基、脞基、酰基胍基、脞基、硫化物、亚砷、硫代亚砷、砷、硫代砷、硫酸酯基、硫代硫酸酯基、羟基、甲酰基、羟基过氧基、氢过氧基、过氧酸、氨基甲酰基、三甲基甲硅烷基、硝基、亚硝基、草酰基、五唑基、氨基磺酰基、氨基亚磺酰基、亚磺酰基、氨基亚磺酰基、亚磺基、磺基、磺氨基、巯基、四唑基、氨基硫羰基、硫代卡巴脞基、硫代卡巴二脞基、硫代碳酰胍基、硫代羧基、硫醛基、硫酰基、氰硫基、氨基硫脞基、硫代亚磺基、硫代磺基、硫脞基、三氮烷基、三氮烯基、三嗪基、三硫代磺基、亚磺酰亚氨酸、磺基亚氨酸、亚磺基脞酸、磺基脞酸、亚磺基羟脞酸、磺基羟脞酸和磷酸酯。

[0157] R^3 优选选自杂原子团、羰基以及取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环和多环基团。

[0158] R^4 和 R^5 优选独立选自亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基和亚己基。

[0159] R^6 与琥珀酰亚胺的两个碳形成环结构，其选自取代和未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环和多环基团。 R^7 选自氨基和羟基。

[0160] 单糖优选选自：阿洛糖、阿卓糖、阿拉伯糖、脱氧核糖、赤藓糖、果糖（D-左旋糖）、半乳糖、葡萄糖、古洛糖、艾杜糖、来苏糖、甘露糖、阿洛酮糖、L-鼠李糖（6-脱氧-L-甘露糖）、核糖、核酮糖、景天庚酮糖、D-山梨醇、山梨糖、sylulose、塔格糖、塔罗糖、苏糖、木酮糖和木糖。二糖优选：直链淀粉、纤维素二糖（4- β -D-吡喃葡萄糖基-D-吡喃型葡萄糖）、乳糖、麦芽糖（4-O- α -D-吡喃葡萄糖基-D-葡萄糖）、蜜二糖（6-O- α -D-吡喃葡萄糖基-D-葡萄糖）、帕拉金糖（6-O- α -D-吡喃葡萄糖基-D-果糖）、蔗糖和海藻糖（ α -D-吡喃葡萄糖基- α -D-吡喃葡萄糖苷）。三糖优选：棉子糖（6-O- α -D-吡喃半乳糖基-D-吡喃葡萄糖基- β -D-吡喃果糖苷）和松三糖（O- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃果糖基- α -D-吡喃葡萄糖苷）。

[0161] 聚乙二醇的分子量优选介于约 1,000-约 20,000 之间，更优选介于约 5000-约 15,000 之间，最优选介于约 7,000-约 10,000 之间。

[0162] 聚乙二醇衍生物优选选自：二甘醇、四甘醇、具有伯氨基的聚乙二醇、2-(2-氨基乙氧基)乙醇、乙醇胺、二(乙二醇)单烯丙基醚、二(乙二醇)单甲苯磺酸酯、三(乙二醇)单烯丙基醚、三(乙二醇)单甲苯磺酸酯、三(乙二醇)单苄基醚、三(乙二醇)单三苯甲基醚、三(乙二醇)单氯单甲基醚、三(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、三(乙二醇)单烯丙基单甲基醚、四(乙二醇)单烯丙基醚、四(乙二醇)单甲基醚、四(乙二醇)单甲苯磺酰基单烯丙基醚、四(乙二醇)单甲苯磺酸酯、四(乙二醇)单苄基醚、四(乙二醇)单三苯甲基醚、四(乙二醇)单 1-己烯基醚、四(乙二醇)单 1-庚烯基醚、四(乙二醇)单 1-辛

烯基醚、四（乙二醇）单 1- 癸烯基醚、四（乙二醇）单 1- 十一碳烯基醚、五（乙二醇）单甲基醚、五（乙二醇）单烯丙基单甲基醚、五（乙二醇）单甲苯磺酰基单甲基醚、五（乙二醇）单甲苯磺酰基单烯丙基醚、六（乙二醇）单烯丙基醚、六（乙二醇）单甲基醚、六（乙二醇）单苄基醚、六（乙二醇）单三苯甲基醚、六（乙二醇）单 1- 己烯基醚、六（乙二醇）单 1- 庚烯基醚、六（乙二醇）单 1- 辛烯基醚、六（乙二醇）单 1- 癸烯基醚、六（乙二醇）单 1- 十一碳烯基醚、六（乙二醇）单 4- 二苯甲酮基单 1- 十一碳烯基醚、七（乙二醇）单烯丙基醚、七（乙二醇）单甲基醚、七（乙二醇）单甲苯磺酰基单甲基醚、七（乙二醇）单烯丙基单甲基醚、八（乙二醇）单烯丙基醚、八（乙二醇）单甲苯磺酸酯、八（乙二醇）单甲苯磺酰基单烯丙基醚、十一（乙二醇）单甲基醚、十一（乙二醇）单烯丙基单甲基醚、十一（乙二醇）单甲苯磺酰基单甲基醚、十一（乙二醇）单烯丙基醚、十八（乙二醇）单烯丙基醚、八（乙二醇）、十（乙二醇）、十二（乙二醇）、十四（乙二醇）、十六（乙二醇）、十八（乙二醇）、二苯甲酮-4- 六（乙二醇）烯丙基醚、二苯甲酮-4- 六（乙二醇）己烯基醚、二苯甲酮-4- 六（乙二醇）辛烯基醚、二苯甲酮-4- 六（乙二醇）癸烯基醚、二苯甲酮-4- 六（乙二醇）十一碳烯基醚、4- 氟二苯甲酮-4'- 六（乙二醇）烯丙基醚、4- 氟二苯甲酮-4'- 六（乙二醇）十一碳烯基醚、4- 羟基二苯甲酮-4'- 六（乙二醇）烯丙基醚、4- 羟基二苯甲酮-4'- 六（乙二醇）十一碳烯基醚、4- 羟基二苯甲酮-4'- 四（乙二醇）烯丙基醚、4- 羟基二苯甲酮-4'- 四（乙二醇）十一碳烯基醚、4- 吗啉代二苯甲酮-4'- 六（乙二醇）烯丙基醚、4- 吗啉代二苯甲酮-4'- 六（乙二醇）十一碳烯基醚、4- 吗啉代二苯甲酮-4'- 四（乙二醇）烯丙基醚和 4- 吗啉代二苯甲酮-4'- 四（乙二醇）十一碳烯基醚。

[0163] 至少具有一个羟基的吸附多孔反应层化学物质更优选蔗糖、帕拉金糖、果糖、乳糖、DEG、TEG 和分子量约 8,000 的 PEG。至少具有一个羟基的吸附多孔反应层化学物质最优选蔗糖。对于较长的 DNA 链，反应层最优选是蔗糖、果糖和葡萄糖的混合物。

[0164] 本发明一实施方式将接头基团连接于反应层。接头基团包含连接于反应层的结合端、具有反应基团的合成端和连接这两端的中间区段，其中所述中间区段包含最多 100 个在水溶液中带离子电荷的单体。在本发明一实施方式中，反应基团选自氨基、羟基和羧基以及它们的组合。在本发明一实施方式中，接头基团的单体选自 DNA、RNA 和具有离子侧链的氨基酸以及它们的组合。在本发明另一实施方式中，所述单体选自脱氧腺苷酸、脱氧鸟苷酸、脱氧胞苷酸和脱氧胸苷酸以及它们的组合。在本发明另一实施方式中，所述单体选自腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸和胸苷酸以及它们的组合。在本发明另一实施方式中，单体选自赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、磷酸丝氨酸、磷酸-苏氨酸、磷酸-酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺以及它们的组合。

[0165] 本发明一实施方式提供了先清洁电极微阵列，然后在该微阵列上吸附多孔反应层的方法。在清洁微阵列的一个优选实施方式中，先采用等离子清洁方法，然后用电化学清洁方法清洁微阵列。在清洁微阵列的另一优选实施方式中，先采用等离子清洁方法，然后用过氧化氢清洁方法清洁微阵列。

[0166] 在本发明一实施方式中，电极微阵列上的多个电极选自铂、金、半导体、氧化铟锡和碳以及它们的组合。铂是优选的实施方式。

[0167] 在一个实施方式中，等离子清洁方法包括使电极微阵列与惰性气体接触以物理清洁（溅射蚀刻）电极阵列表面。惰性气体优选氩，溅射蚀刻方法最好进行约 2-6 分钟，其中

等离子功率是 200 瓦,自偏置电压是 600-650V,等离子压力是 8 毫托,平行板等离子室中使用 200mm 直径电极。在另一实施方式中,等离子清洁方法包括使电极微阵列与化学反应性气体接触,从而通过化学反应方法清洁该电极阵列表面。反应性气体优选氧、六氟化硫、三氟甲烷、四氟化碳或其它化学反应性气体物质。

[0168] 在一优选实施方式中,利用具有 460mm 电极直径的 Oxford InstrumentsPlasmalab 800Plus RIE 系统实施等离子方法,其中等离子清洁方法包括三步等离子处理。第一步,以约 600 瓦的 RF 等离子功率、约 8 毫托的设定压力和约 30sccm 的 Ar 气体流速,用氩等离子蚀刻微阵列约 3 分钟。第二步,以约 500 瓦的 RF 等离子功率、约 50 毫托的设定压力和约 50sccm 的氧气流速,用氧等离子蚀刻微阵列约 6 分钟。最后一步,以约 600 瓦的 RF 等离子功率、约 8 毫托的设定压力和约 30sccm 的 Ar 气体流速,用氩等离子蚀刻微阵列约 10 分钟。不受蚀刻程度的限制,蚀刻所除去的材料量估计约等于 300-400 Å 的等离子增强化学气相沉积 (PECVD) 的氮化硅膜。

[0169] 等离子清洁方法优选包括使电极微阵列与六氟化硫等离子接触约 30-60 分钟,其中等离子功率是 300 瓦,等离子压力是约 250-350 毫托,各向同性 (isotropic) 等离子室中气体流速是 124cm³/分钟。等离子清洁方法优选包括采用以下条件用购得的 Reactive Ion Etch Plasma system(反应离子蚀刻等离子系统)(例如,装有 460mm 直径电极的 Oxford Plasmalab 800Plus RIE 系统)蚀刻电极微阵列:(1) 氩等离子,约 2-4 分钟,RF 等离子功率约 600 瓦,其中压力约为 8 毫托,Ar 气体流速约为 30sccm;(2) 氧等离子,约 5-7 分钟,功率约 500 瓦,其中压力约为 50 毫托,氧气流速约为 50sccm;或 (3) 氩等离子,约 8-12 分钟,功率约 600 瓦,其中压力约为 8 毫托,Ar 气体流速约为 30sccm。

[0170] 在一优选实施方式中,电化学清洁方法包括将电极微阵列置于硫酸溶液中,然后对具有交替脉冲/活性电极和接地电极模式的各列电极施加脉冲。第一次脉冲后,活性电极变为接地电极,接地电极变为活性电极。对于每次后续脉冲,电极列在活性列和接地列之间转换。在清洁期间,电极列在活性和接地之间转换。硫酸的浓度介于约 0.01-5 摩尔之间,更优选介于约 0.1-1.5 摩尔之间,最优选介于约 0.4-0.6 摩尔之间。清洁持续时间介于约 1-60 分钟之间,更优选介于约 5-15 分钟之间,最优选介于 8-12 分钟之间。脉冲时间(活性电极列时间)介于约 0.01-60 秒之间,更优选介于约 0.05-0.5 秒之间,最优选介于约 0.08-0.12 秒之间。清洁优选在约 0°C -50°C 之间,最优选在约室温至 30°C 之间进行。接触硫酸溶液和电脉冲后,用蒸馏水洗涤微阵列。在一优选实施方式中,硫酸浓度是 0.5 摩尔,清洁时间是 10 分钟,脉冲时间是 0.1 秒,温度是室温。

[0171] 在一优选实施方式中,过氧化氢清洁方法包括将电极微阵列置于含过氧化氢的溶液中。过氧化氢的浓度介于约 0.5-10 过氧化氢%之间,更优选约 1-5 过氧化氢%之间,最优选介于约 2-4 过氧化氢%之间。溶液的温度优选介于约室温至 95°C 之间,更优选介于约 35°C -80°C 之间,最优选介于约 60°C -70°C 之间。处理时间优选介于约 1 分钟 -24 小时之间,更优选介于约 30 分钟 -12 小时之间,最优选介于约 45 分钟 -2 小时之间。在最优选的实施方式中,过氧化氢的浓度是 3%;处理时间是 1 小时;溶液的温度是 65°C。与过氧化氢溶液接触后,用蒸馏水清洗微阵列。

[0172] 本发明一实施方式提供将吸附多孔反应层化学物质连接到清洁电极微阵列上的吸附方法。将电极微阵列置于含有能形成反应层的化学物质的溶液中。不希望受理论的束

缚,化学物质对于清洁的微阵列具有天然亲和力,从而吸附到其表面。处理时间介于约1分钟至1个月之间,更优选介于约30分钟至1周之间,最优选介于约1小时至24小时之间。用于配制溶液的溶剂优选水。其它合适的溶剂包括醇、乙腈、二甲基甲酰胺和二氯甲烷以及其它实验室常用溶剂或这些溶剂不常用的等价物。其它非常规溶剂也合适。能溶解化学物质的任何溶剂均合适。溶液中化学物质的浓度介于约0.001-5摩尔之间,更优选介于0.1-2摩尔之间,最优选介于0.2-0.5摩尔之间。处理期间溶液的温度优选介于约0-99℃之间。在一优选实施方式中,溶液是0.25摩尔的蔗糖水溶液;处理1小时;温度是室温。在另一优选实施方式中,溶液是0.25摩尔的蔗糖水溶液;处理48小时;温度是37℃。处理后,利用处理溶液的溶剂清洗微阵列。清洗后,空气干燥微阵列。

[0173] 本发明另一实施方式提供具有吸附多孔反应层的电极微阵列,所述反应层上连接有用于提高合成质量的组合接头和间隔基团(接头/间隔基团)。微阵列具有连接于基板上的多个电极,其中所述电极与能够选择任何单个电极或多个电极作为电极组的计算机控制系统电子相连。一个实施方式在吸附多孔反应层上原位合成接头/间隔基团。一优选实施方式在含有蔗糖的吸附多孔反应层上原位合成接头/间隔基团。

[0174] 图2A和2B提供了本发明的实施方式,二者是具有多个电极的电极微阵列206的两个电极208、210的横截面示意图。如图2A所示,在一个实施方式中,微阵列206在其整个表面连接有吸附多孔反应层204A,所述反应层具有反应的羟基202(反应后以醚键显示)。封闭基团(P)212显示在非电极位置与反应层204A相连。封闭基团212防止在非电极位置合成。如图2B所示,在另一实施方式中,微阵列205具有吸附多孔反应层204A,所述反应层具有反应的羟基202(反应后以醚键显示),其中所述反应层基本上只与电极208、210相连。在两种实施方式中,电极208、210均在反应层204A、204B上连接有接头/间隔基团214。接头/间隔基团214通过醚键202相连。所述接头/间隔基团具有用于原位合成的末端反应基团216。

[0175] 在本发明一实施方式中,接头/间隔基团是原位合成的寡聚物,其在水溶液中基本上带电荷。在一优选实施方式中,接头/间隔基团是原位合成的DNA序列。图3显示了具有多个电极的电极微阵列306的两个电极308、310的横截面。吸附多孔反应层304显示与微阵列306相连。电极310显示在具有阳离子的水溶液320中具有负电荷318的DNA接头/间隔基团316,其中所述接头/间隔基团通过醚键302与吸附多孔反应层304相连,并在接头/间隔基团316的一端连接有伸入水溶液320中的连接基团312。在一优选实施方式中,接头/间隔基团含有原位合成的15-单位脱氧胸苷酸DNA链。电极308显示通过醚键302与非离子接头/间隔基团314相连,其末端连接有连接基团312。

[0176] 不希望受理论的束缚,由于非离子接头/间隔基团314因缺乏离子电荷而溶剂化不佳,非离子接头/间隔基团314可能会使连接基团312接近微阵列306。不希望受理论的束缚,接头/间隔基团316上的电荷可能因电荷排斥而阻止接头/间隔基团316自身折叠进而提高其在水性介质320中的溶剂化。电荷排斥阻止接头/间隔基团316与同一电极上其它毗邻的带电荷接头/间隔基团相互作用。此外,是水性介质中可能形成溶剂化结构,从而尽可能减少带电荷的接头/结构基团与固体表面的侧链接触。不希望受理论的束缚,预计良好溶剂化的接头/结构基团能使放入溶液中的后续基团更好地接近接头/结构基团一端的反应基团,同时阻止与后续基团或后续基团链相连的荧光标记物的荧光猝灭。

[0177] 提供以下实施例只是为解释、说明和澄清本发明,不是限制本发明的范围或应用。本领域技术人员不难知晓属于本发明范围的相似实施方式和应用。

[0178] 实施例 1

[0179] 本实施例描述了利用不同微阵列上选择的吸附多孔反应层制备的核苷酸微阵列。采用本文各自公开的等离子清洁方法和电化学清洁方法或采用等离子清洁方法和过氧化氢清洁方法清洁各微阵列。清洁后,各微阵列与含有用于形成本文所述吸附多孔反应层的化学物质的溶液接触。实验所用的化学物质包括琼脂糖、二甘醇、乙二醇、N-羟基琥珀酰亚胺、三甘醇、棉子糖、松三糖、Splenda®、菊粉、分子量 8000 的聚乙二醇、水杨苷、核糖和蜜二糖。

[0180] 制备了具有多孔反应层的各微阵列后,在各微阵列上原位合成 15 个单体(如图 11-19、25 和 26 所示)或 35 个单体(如图 5-10 所示)的不同核苷酸。合成后,35 个单体的核苷酸微阵列与具有掺加对照转录物的复合物背景杂交。从荧光标记的胎盘 DNA 制备复合物背景样品。掺加对照是标记的噬菌体 λ 核酸。将各种用量的掺加对照转录物与复合物背景混合。15 个单体的微阵列与标记的 15 个单体的 DNA 寡核苷酸杂交。从噬菌体 λ 核酸制备 15 个单体的寡核苷酸。与复合物背景中的掺加对照转录物或 15 个单体的标记寡核苷酸杂交后,使各微阵列成像来观察微阵列上微电极的荧光量和荧光质量。当电极上荧光环的荧光量均匀而在该环边缘荧光急剧丧失时,可认为质量“良好”。此外,另一质量参数是除电极外荧光量最小的位置。

[0181] 在图 27-35 中,将蔗糖与其它糖类混合形成吸附多孔反应层。含该混合物的溶液含有 50mM 蔗糖、100mM 果糖和 100mM 葡萄糖。在各微阵列的不同象限上合成长度为 35、40、45、50、55、60、65 和 70 个单体的核苷酸。图 27 显示了具有不同长度的各种 DNA 寡核苷酸的某微阵列截面。图 28-35 显示了放大的图 27 所示各象限。通过标记的随机 9 单体(序列:NNN NNN NNN,其中 N = A、G、C 或 T)杂交评估合成质量。不希望受理论的束缚,猜测用于形成吸附多孔反应层的单糖和二糖混合物能降低在各电极上合成的 DNA 量。此外,不希望受理论的束缚,每个位点制备的 DNA 量随寡聚物长度的增长而增加,DNA 可能对剪切力敏感,当单独利用蔗糖时可能会从电极上脱落。葡萄糖和果糖在各电极上提供的 DNA 合成密度较低。因此,认为混合蔗糖与葡萄糖和果糖能降低每个电极的 DNA 量。利用本发明提供的混合物能更好地控制各电极上合成的 DNA 的数量以及间距。

[0182] 图 4-19、25、26 和 27 是具有不同吸附多孔反应层的各微阵列一部分的顶视图放大照片。在图 4 中,反应层是琼脂糖。电极 402 显示荧光不均匀,表明合成的质量低。质量低可能是因琼脂糖与电极分离造成。可以以通断电极的棋盘模式进行合成,其中电极 404 是关闭的电极。该结果表明琼脂糖不适用作多孔反应层。

[0183] 在图 5 中,反应层是蔗糖。电极 502 显示电极上荧光的均匀性良好,表明合成质量高以及反应层稳定。电极 504 上有一定数量的斑点(spottling);然而,大体上蔗糖作为多孔反应层使用良好。

[0184] 图 6 显示了蔗糖反应层的灵敏度研究的结果。用和不用转录掺加物进行杂交。采用对照以确保微阵列如设计的进行合成。比较掺加和未掺加样品的结果,当蔗糖用作多孔反应层时,微阵列显示的灵敏度约 1 皮摩尔。

[0185] 在图 7 中,反应层是二甘醇。电极 704、706、708 显示均匀性有问题,在电极的边缘

丧失清晰度。此外,还有大量的随机斑点 702。在图 8 中,反应层是乙二醇。电极 802 和 804 显示有一些合成的迹象;然而缺少合成和大量的随机斑点造成总体质量非常低。在图 9 中,反应层是 N-羟基琥珀酰亚胺。电极 904 显示均匀性和电极边缘的清晰度可接受。然而,电极 902 和 906 显示有一些随机斑点。在图 10 中,反应层是三甘醇。电极 1002 显示质量良好。电极 1004 显示有一些斑点。电极 1006 显示一些光圈效应(halo effect),该电极的中间部分显示荧光丧失,表明反应层丧失。

[0186] 在图 11 中,反应层是棉子糖。虽然有合成发生,但是电极 1102、1104 和 1106 显示了相当量的不均匀性和随机斑点。在图 12 中,反应层是松三糖。电极 1202 上的合成迹象极少(即使存在的话)。有一些随机斑点。在图 13 中,反应层是 Splenda[®],一种改性的蔗糖。电极 1302 和 1304 显示均匀性相当好。电极 1306 显示有一些不均匀性和随机斑点。在图 14 中,反应层是菊粉,一种果糖聚合物。电极 1402 和 1404 表明有斑点合成。元件 1406 显示有大量随机斑点。

[0187] 在图 15 中,反应层是帕拉金糖。电极 1502 和 1504 显示均匀性和边缘清晰度良好。元件 1506 显示有一些随机斑点。在图 16 中,反应层是分子量约 8000 道尔顿的聚乙二醇。电极 1602 和 1604 显示均匀性和边缘清晰度极好。此外,随机斑点极少。在图 17 中,反应层是水杨苷。电极 1702 和 1704 显示斑点很多且合成不均匀。在图 18 中,反应层是核糖。电极 1802 和 1804 显示斑点合成极少。有一些随机斑点。在图 19 中,反应层是蜜二糖。电极 1902 和 1904 显示合成不均匀。

[0188] 在图 25 中,反应层是 1-(3-羟丙基)吡咯。这些电极显示合成相当均匀,从而使得 1-(3-羟丙基)吡咯成为用作吸附多孔反应层的良好候选对象。在图 26 中,反应层是 1-己基吡咯。电极显示合成相当均匀,从而使得 1-己基吡咯成为用作吸附多孔反应层的良好候选对象。图 27 是具有组合反应层的微阵列的顶视图放大部分的照片,其中组合(反应层)含有蔗糖、果糖和葡萄糖。较亮的点是原位合成 DNA 寡聚物后,与阵列杂交的荧光标记核苷酸的荧光。寡聚物长 35-70 个单体。图 28-35 显示了图 27 所示各象限。

[0189] 实施例 2

[0190] 本实施例描述了具有和不具有在铂电极的电极微阵列上合成的组合接头和间隔基团的肽阵列,所述铂电极具有含蔗糖的吸附多孔反应层。组合接头和间隔基团是原位合成的 16T 单位。合成组合接头和间隔基团后,在其上原位合成肽阵列。利用荧光试剂对肽成像,但只在具有组合接头和间隔基团的电极上的图像可见。

[0191] 所用的电极微阵列是 CombiMatrix Corporation (CUSTOMARRAY) (Dill 等, Anal. Chem. 2001, 73, 444-449 和 Montgomery I, II 和 III) 制造的可商业购得的微阵列。微阵列由具有 16×64 模式的 1024 个单独串行可寻址 92-微米直径铂电极阵列的半导体硅芯片构成。先用蔗糖涂布这些电极使之能通过吸附的蔗糖与化学物质共价结合,再使用该微阵列。使铂电极与蔗糖水溶液接触吸附蔗糖,然后用水洗涤除去剩余的蔗糖。通过与装有合适的控制软件的个人计算机相连将这些电极设定在特定电压。软件能控制微阵列上的各电极从而在连续合成小分子、寡聚物和聚合物(包括寡聚物和肽)中进行电化学解封闭。

[0192] 采用步骤亚磷酰胺化学方法在 4 个电极上(图 22)合成 15-单位的脱氧胸苷酸链。对于电化学解封闭步骤,利用标准的乙腈/甲醇解封闭溶液施加 1.8 伏,60 秒的电压。第 15 个脱氧胸苷酸解封闭后,将具有 5' 氨基乙氧基乙基改性剂的脱氧胸苷酸连接于具有

15 个脱氧胸苷酸单位的电极和不具有 15 个脱氧胸苷酸单位的电极上 (图 22)。改性的脱氧胸苷酸购自 Glen Research, Inc。然后用标准的化学解封闭取代电化学解封闭使微阵列完全脱保护。

[0193] 在 65°C 使微阵列与 1 : 1 的乙二胺和乙醇的溶液接触 1 小时,然后在室温与 Deblock T® (Burdick and Jackson) 接触 30 分钟来实现化学解封闭。将亮氨酸 (L) 与 8 个电极偶联。将微阵列与含有溶解于 1 毫升 N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 的以下成分的溶液接触 :t-BOC 保护的 L(120 毫克,0.52 毫摩尔)、六氟磷酸 O- 苯并三唑 -1- 基 -N, N, N', N' - 四甲基脲鎓 (190 毫克,0.50 毫摩尔) (HBTU)、N- 羟基苯并三唑 (67 毫克,0.50 毫摩尔) (HOBT) 和二异丙基乙胺 (261 微升,1.50 毫摩尔) (DIPEA)。

[0194] 与亮氨酸偶联后,用 DMF(1 毫升)和二氯甲烷 (1 毫升)连续洗涤微阵列。洗涤后,重复亮氨酸偶联步骤以确保用 t-BOC 保护的亮氨酸完全覆盖电极。第二 L 偶联步骤后,用 DMF(1 毫升)和二氯甲烷 (1 毫升)连续洗涤微阵列,然后用乙醇除去任何残留的 DMA 或二氯甲烷。然后空气干燥微阵列。

[0195] 干燥后,用溶解于二氯甲烷 (10 毫升)的 1,2- 二苯肼 (200 毫克,1.1 毫摩尔)和六氟磷酸四丁铵 (400 毫克,1.0 毫摩尔)溶液覆盖微阵列。利用计算机控制系统驱动 8 个选择的电极使这些电极成为活性电极,从而只解封闭活性电极上的 L。解封闭除去了活性电极上 L 的 t-BOC 保护基团。活性电极维持于相对于铂反电极 3.0 伏的电压,维持 60 秒。解封闭后,除去微阵列的解封闭溶液。用乙醇清洗微阵列除去任何残留的电化学解封闭溶液,然后空气干燥。

[0196] 通过使用 t-BOC- 苯丙氨酸 -OH(F) (图 22) 的步骤模式重复合成方法。此步骤后,进行电化学解封闭。通过两轮 boc- 甘氨酸 -OH(G) 和 Boc- 酪氨酸 (叔丁基)-OH(Y) 重复合成方法来构建离开固体表面观察时到序列为 LFGGY 的肽。该肽序列通常写作 YGGFL。

[0197] 一旦构建了微阵列,不采用电化学解封闭,而是依次利用二氯甲烷配制的 40% 三氟乙酸 (TFA) (30 分钟) 和 90% TFA 水溶液 (30 分钟) 对整个微阵列进行化学解封闭。解封闭后,用乙醇洗涤微阵列,然后用酰化牛血清白蛋白 (ABSA) 封闭来消除抗体的背景结合。用于封闭的溶液含有 2×PBS 和 0.05% TWEEN 20™ 配制的 2mg/ml ABSA。封闭反应可进行 30 分钟。封闭后,微阵列与第一抗 -β- 内啡肽抗体一起培育。所用的抗体是克隆 3-E7 (单克隆,小鼠),用含 0.05% TWEEN 20™ 的 2×PBS 稀释 1000 倍。2×PBS 和 TWEEN 20™ 购自 Chemicon International, Inc。抗 -β- 内啡肽抗体选择性吸附在合成了肽序列 YGGFL 的电极上。培育后,微阵列与能选择性吸附到抗 -β- 内啡肽抗体上的 Cy5™ 标记的驴抗 - 小鼠抗体接触。Cy5™ 标记的驴抗 - 小鼠抗体购自 IntegratedDNA Technologies。最后,利用 Array Works® Imager (Applied Precision, Issaquah, WA) 使微阵列成像来定位具有 Cy5™ 标记的驴抗 - 小鼠 (抗体) 的电极。

[0198] 图 20A-20E 是电极微阵列 2006 上的 4 个电极 2008、2009、2010、2011 的横截面示意图。显示了在两个电极 2010、2011 上合成组合接头和间隔基团 2016、2018、2020A、2020B,然后合成肽 2024 以及标记 2030、2032、2034 的步骤次序。图 20A 是电极微阵列 2006 合成前的示意图。涂层 2004 显示覆盖了该微阵列。涂层 2004 只覆盖了铂电极 2008、2009、2010、2011。涂层 2004 显示具有羟基作为反应基团 2002A。也可使用其它反应基团。对于本实验,涂层 2004 是蔗糖吸附层,因此,反应基团是羟基。步骤 2012 是图 20B 中将组合接头和间隔

基团连接于两个电极 2010、2011 使用的步骤次序。两个电极 2008、2009 显示不具有组合接头和间隔基团,但其反应基团按照上述方法通过改性的 T2014、2018 连接改变为胺 2020A。如图 20C 所示,步骤 2022 是通过将 L 加到反应性胺基 2020B 上来构建肽 2024 的第一步。如图 20D 所示,步骤 2026 是在所有 4 个电极 2008、2009、2010、2011 上构建肽链 2024 的多个步骤。如图 20E 所示,步骤 2028 是按照上述方法吸附克隆 3-E7 抗体 2030,然后吸附 Cy5TM 标记的驴抗-小鼠 2032、2034 的两步骤。两个电极 2008、2009 上的 Cy5TM 标记的驴抗-小鼠 2034 以阴影显示,表明铂电极使荧光猝灭,这是因为电极和标记之间的距离不足以防止猝灭。相比之下,电极 2010、2011 上的 Cy5TM 标记的驴抗-小鼠 2032 未以阴影显示,表明荧光可见,这是因为组合接头和间隔基团在标记和电极之间提供了足够的距离以防止猝灭。虽然每个电极只显示了一个合成单位,但是实际上每个电极上有许多单位;然而为说明目的只显示了一个单位。

[0199] 图 21 是图 20 所示具有和不具有组合接头和间隔基团的两个电极的示意图。图 21 显示了电极微阵列 2106 的横截面,其显示了两个电极 2108、2110 和具有反应性羟基 2102 的涂层 2104。涂层 2104 是蔗糖,只存在于铂电极上。图 21 显示了组合接头和间隔基团 2116 对 Cy5 标记的驴抗-小鼠抗体 2132、2134 和铂电极 2108、2110 之间距离的影响,和对防止猝灭的伴随作用。电极 2108 上的标记 2134 的荧光猝灭,电极 2110 上的标记 2132 的荧光因为电极 2110 和标记 2132 之间的额外距离而未猝灭。此外, T 单位 2114、2116 显示具有负电荷 2136,这提高了在具有离子 2138 的水性介质 2140 中的溶剂化。抗衡阴离子未显示。所显示的离子只是溶液中可能存在的任何类型离子的代表。显示水合氢离子代表 T 单位上磷酸 OH 基团解离产生的酸性物质。

[0200] 图 22 是本实施例所用 8 个电极的放大照片。4 个电极 2202 不具有组合接头和间隔基团,因此由于铂猝灭而不显示 Cy5 标记的驴抗-小鼠抗体的任何可见荧光。4 个电极 2204 具有组合接头和间隔基团,因此显示 Cy5 标记的驴抗-小鼠抗体的荧光。

[0201] 实施例 3

[0202] 如实施例 1 所示制备电极微阵列,但具有一系列长度从 0-15 个 T 单位不等的接头/间隔基团。此外,第一氨基酸(亮氨酸)连接后,不连接后续氨基酸。而是将生物素与具有不同接头/间隔基团长度位置的亮氨酸相连。生物素连接后,用能选择性与生物素复合的德克萨斯红标记的链霉亲和素溶液覆盖微阵列。在微阵列上进行显影分析来观察具有德克萨斯红标记的链霉亲和素的电极。

[0203] 图 24 是微阵列 2400 一部分的顶视图放大照片,显示了行 2402、2404、2406、2408、2410、2412 和 2414。从左向右,行 2402、2408 和 2412 中第一电极上组合接头和间隔基团的长度是 0。从右向左,行 2403、2410 和 2414 中第一电极上接头/间隔基团的长度是 0。行 2406 上不进行任何合成。对于行 2402、2408 和 2412,接头/间隔基团的长度从左向右增加 1 个 T 单位。对于行 2403、2410 和 2414,接头和间隔基团的长度从右向左增加 1 个 T 单位。为进行原位合成,无 T 单位的小室具有实施例 1 和图 21、电极 2108 所示具有胺基的一个改性 T 单位。图 24 显示荧光随着组合接头和间隔基团的长度增长而增加。荧光在约 6-8 个 T 单位显著增加,直至达到荧光最强的具有 15 个 T 单位的最后小室。因此,接头/间隔基团长度增长消除了铂电极的猝灭作用。

[0204] 实施例 4

[0205] 图 23 是电极微阵列 2306 的两个小室 2308、2310 的横截面示意图,所述微阵列具有多个连续和单独可寻址的铂电极。显示了具有羟基反应基团 2302 的涂层 2304。涂层 2304 可以是吸附在铂电极上的蔗糖层,可以只存在于电极上。电极 2308 显示具有非离子组合接头和间隔基团 2314,电极 2310 显示具有本发明的组合接头和间隔基团 2316。可在本发明组合接头和间隔基团合成前后连接非离子接头 2314。在电极 2308 和 2310 上原位合成肽 2324。采用实施例 1 和 2 所述的荧光标记方法标记电极 2308 和 2310 上的肽 2330、2332、2334。

[0206] 非离子组合接头和间隔基团 2314 可以是 PEG 化合物或其它非离子化合物。虽然 PEG 是水溶性的,但其不如本发明多离子组合接头和间隔基团 2316 溶剂化效果好,这是因为负电荷 2318 有助于溶剂化。PEG(或其它非离子物质)上缺乏电荷使其自身能折叠从而接近电极表面,或接近同一电极上邻近的 PEG 链,结果是预计电极 2308 上的荧光弱于 2310 上的荧光,这是因为铂(电极)猝灭和标记物质不易接近肽。利用本发明多离子组合接头和间隔基团 2316 的合成效率较高,因为能更好地接近组合接头和间隔基团 2316 一端的反应基团 420A、420B。

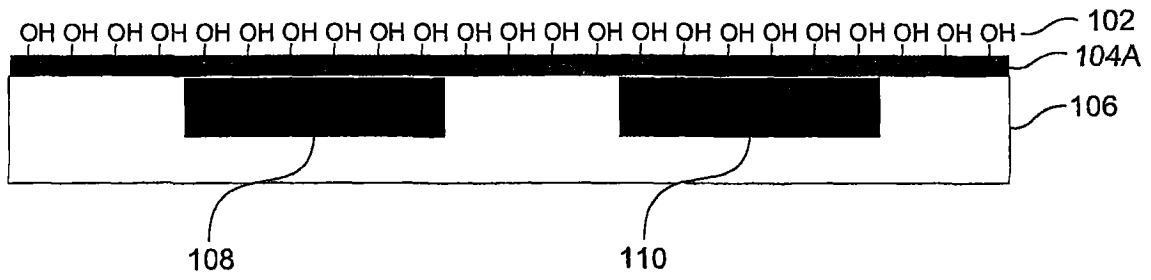


图 1A

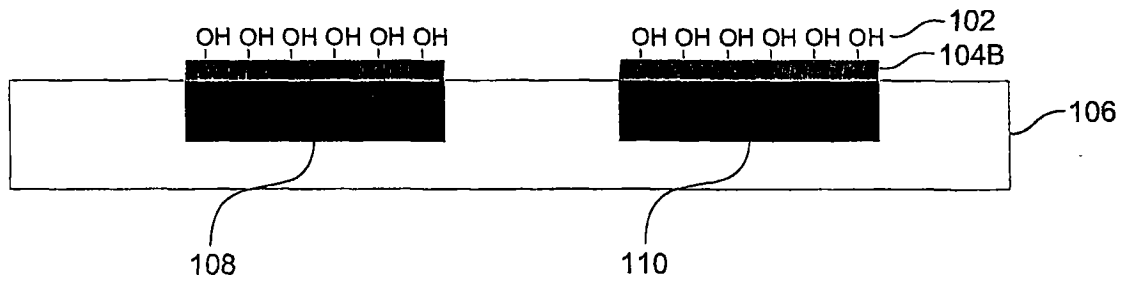


图 1B

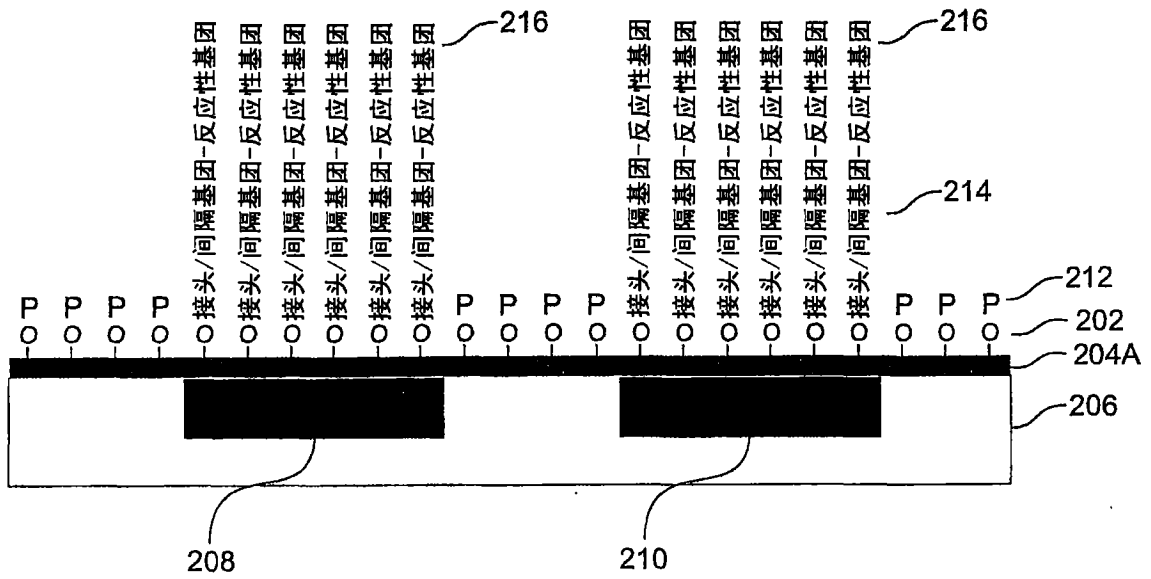


图 2A

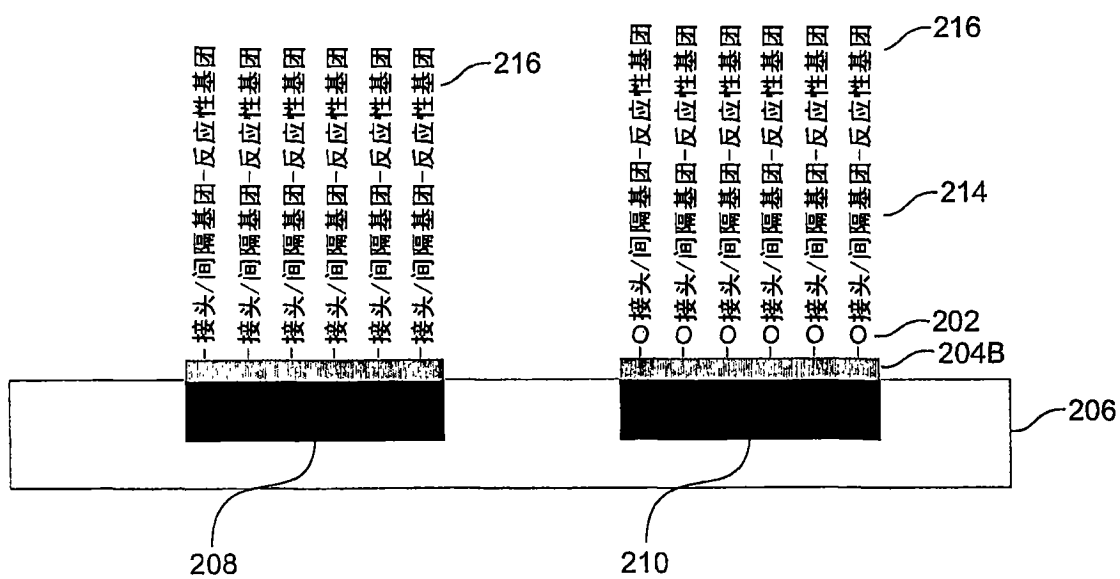


图 2B

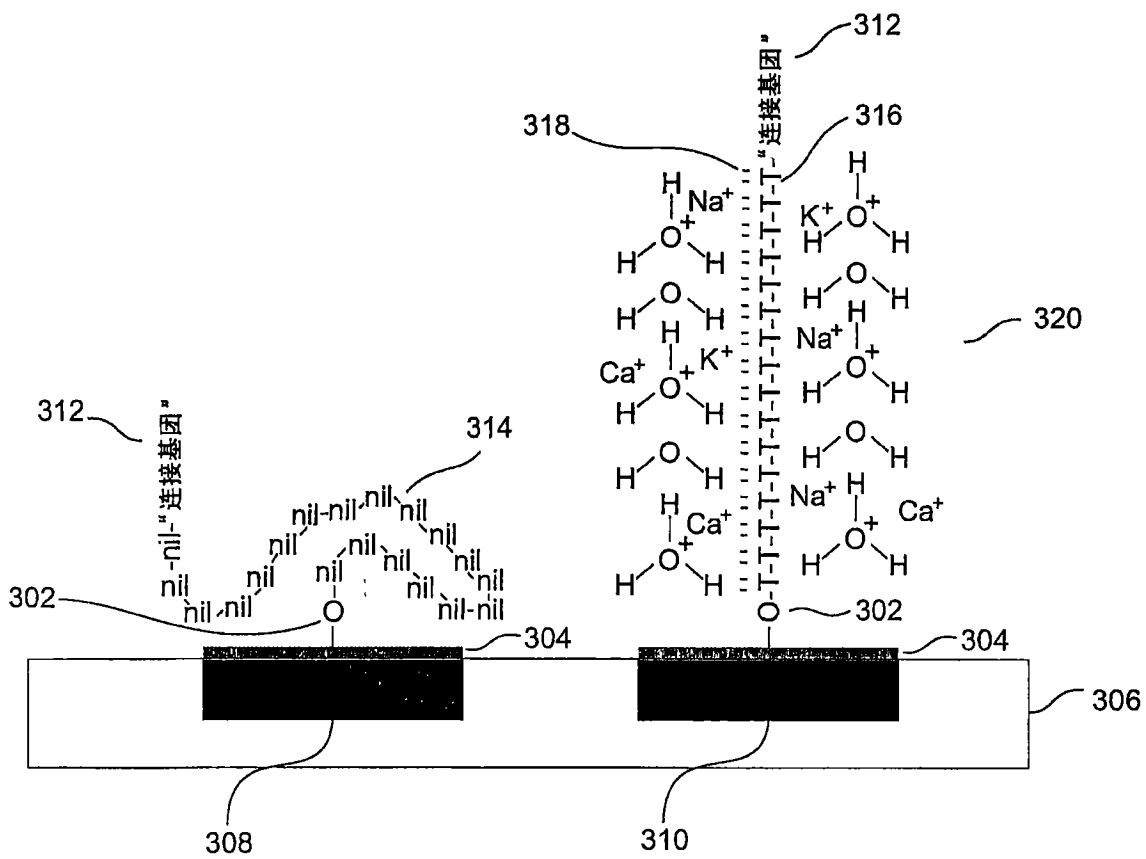
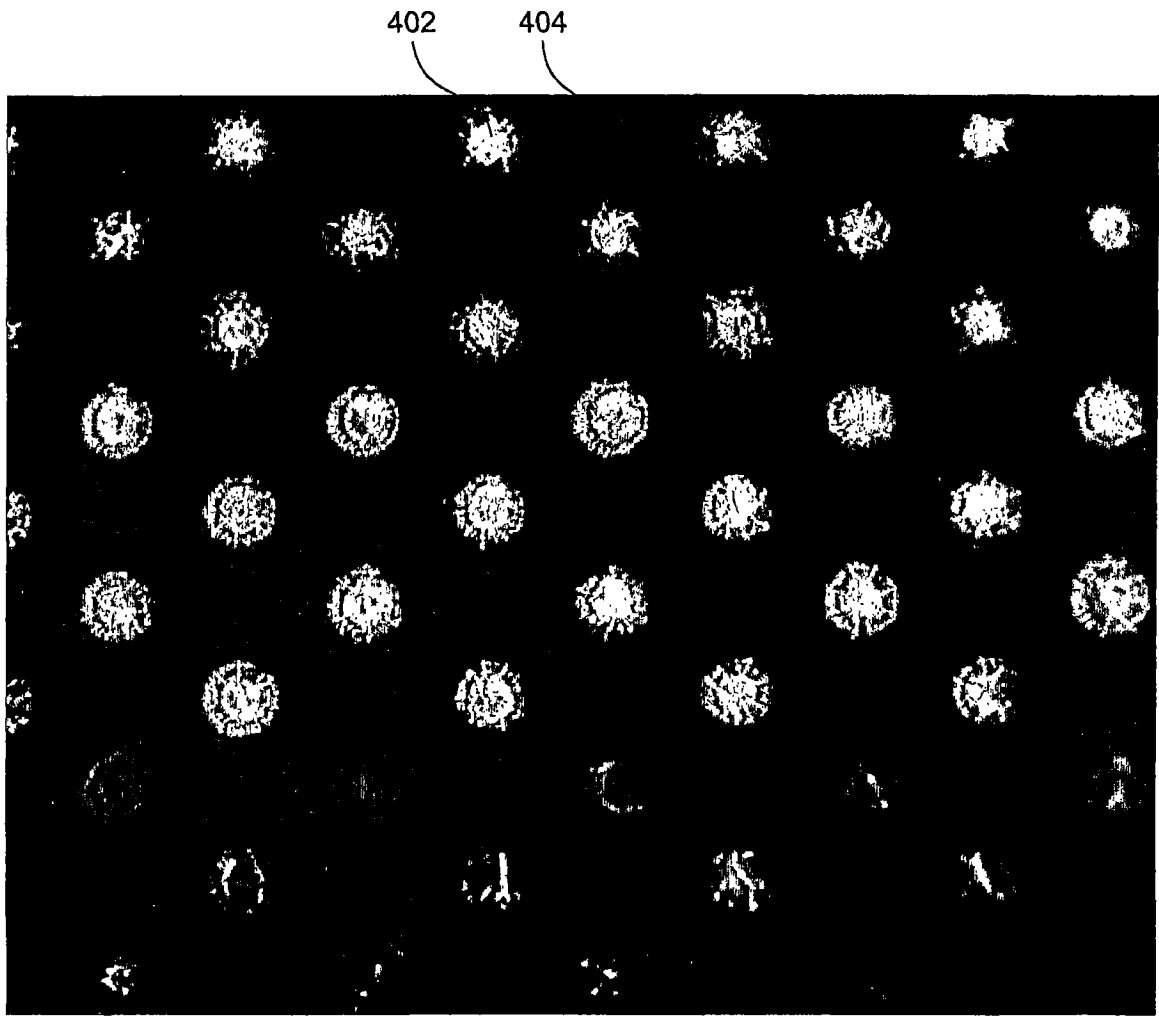
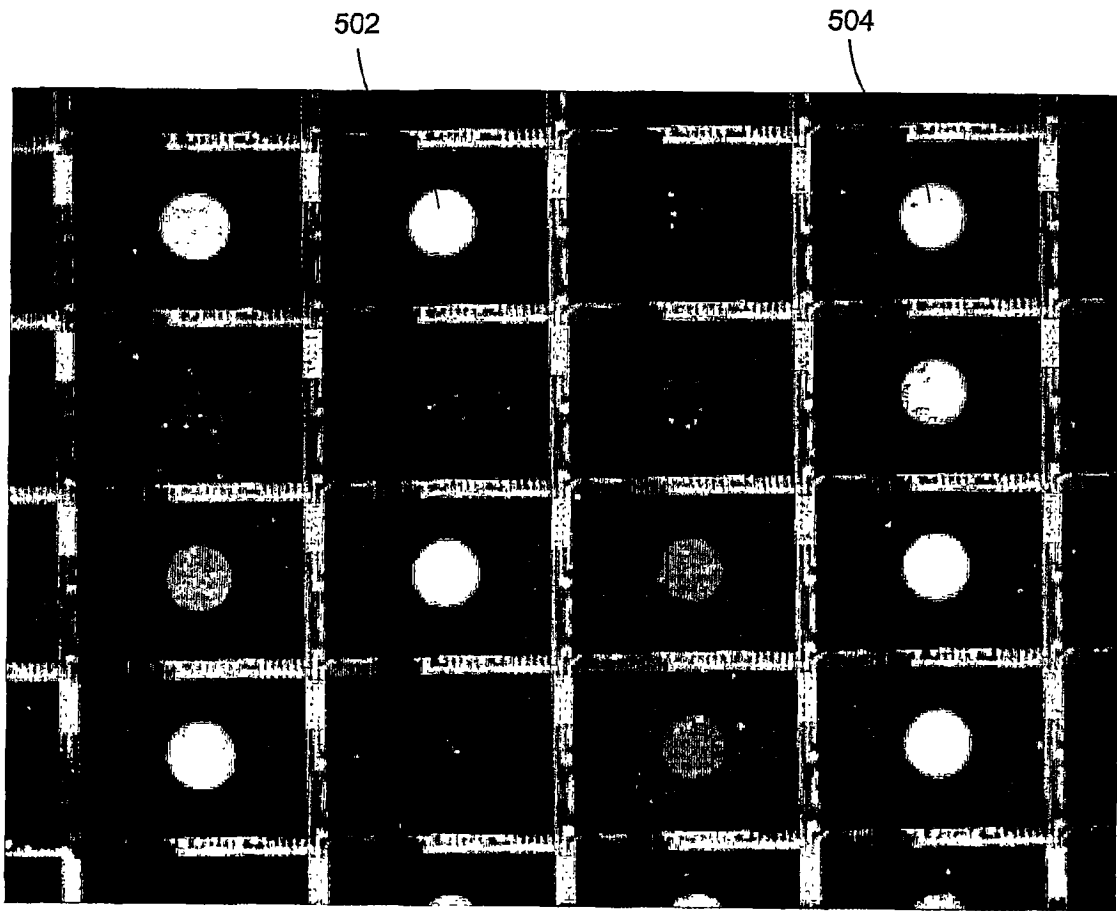


图 3



琼脂糖

图 4



蔗糖

图 5

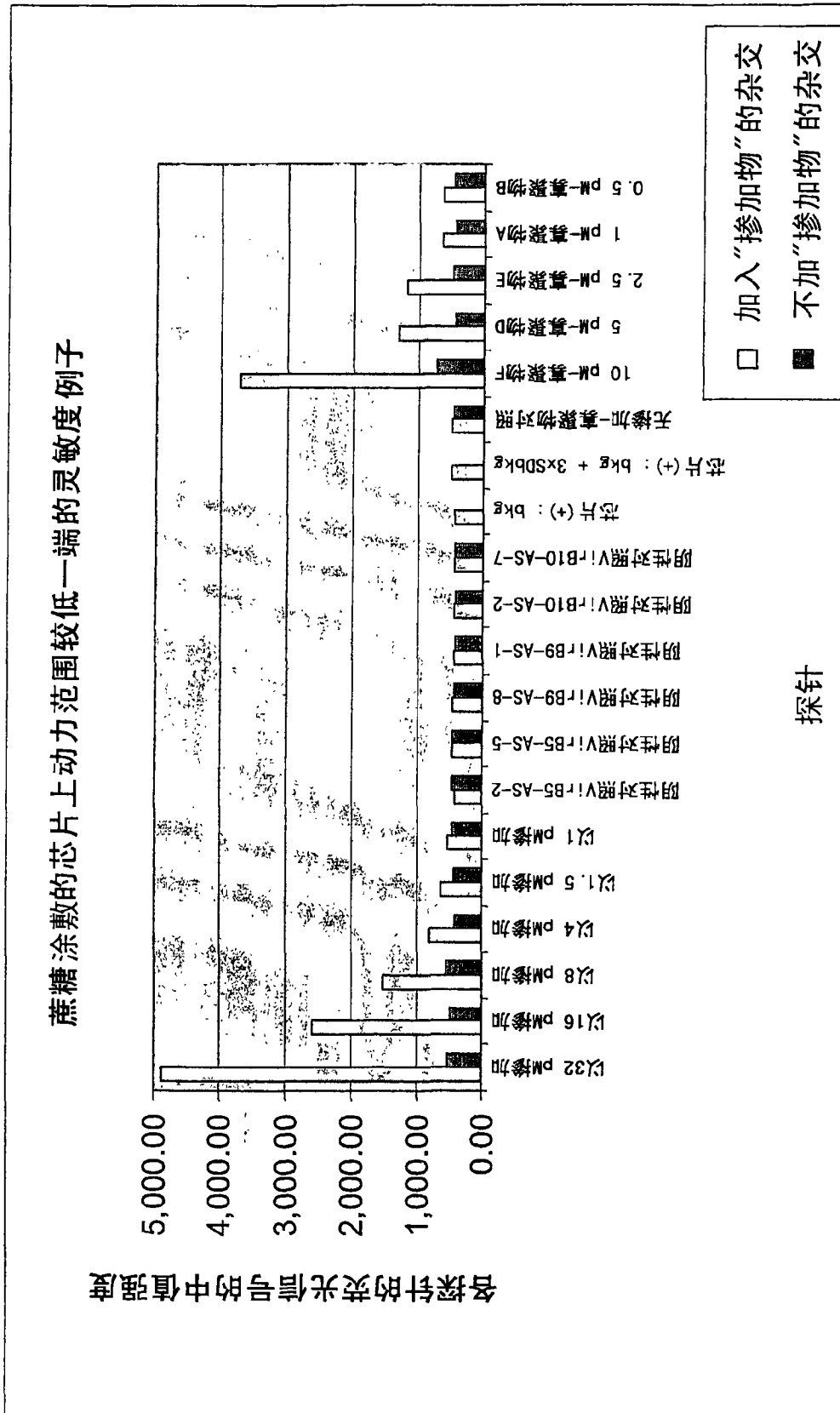
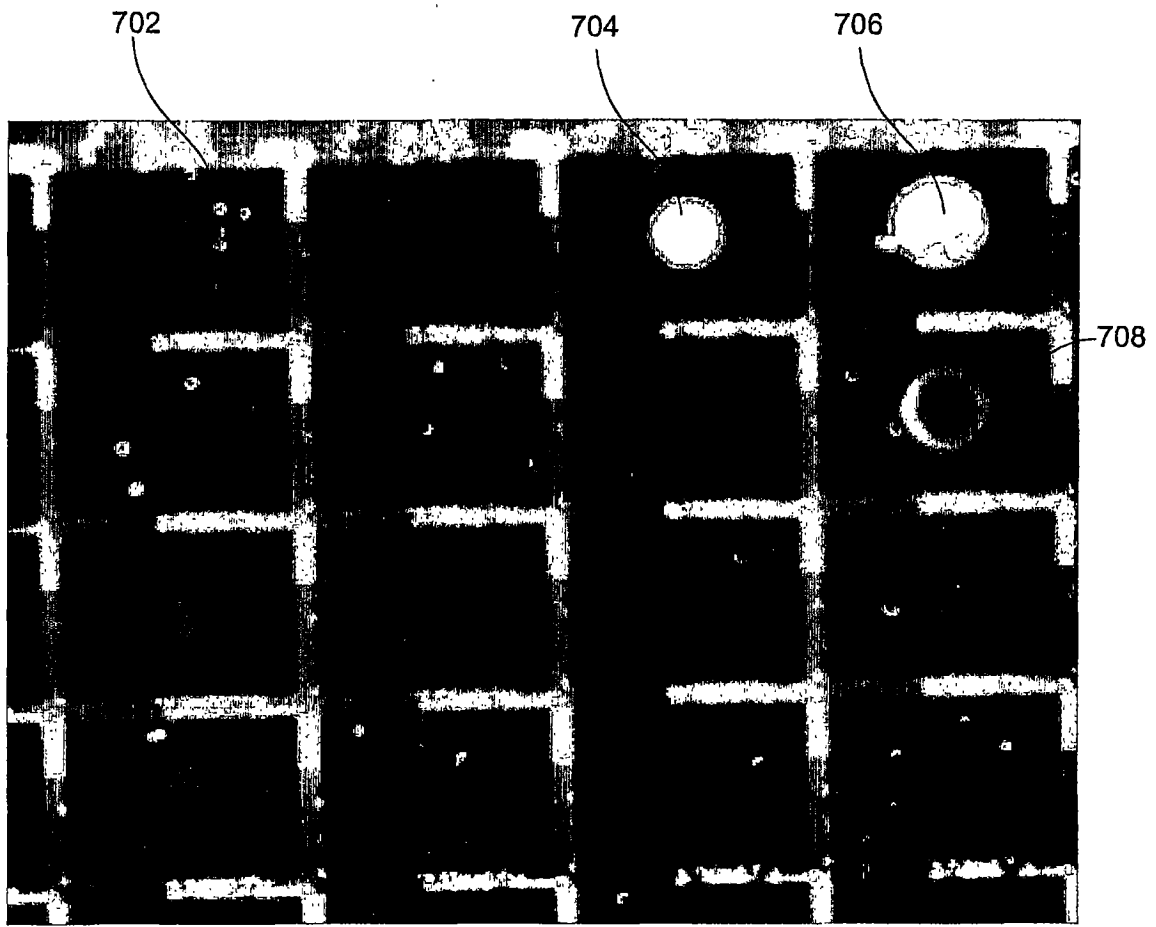


图 6



二甘醇

图 7

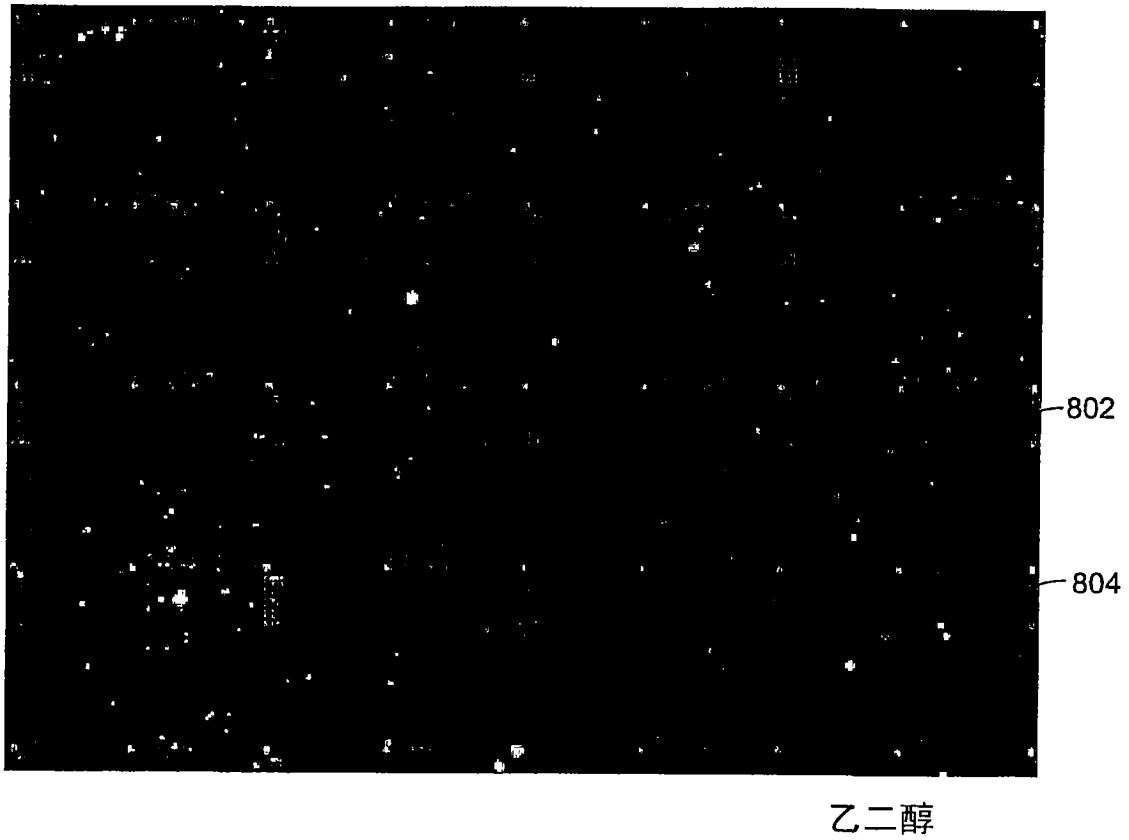
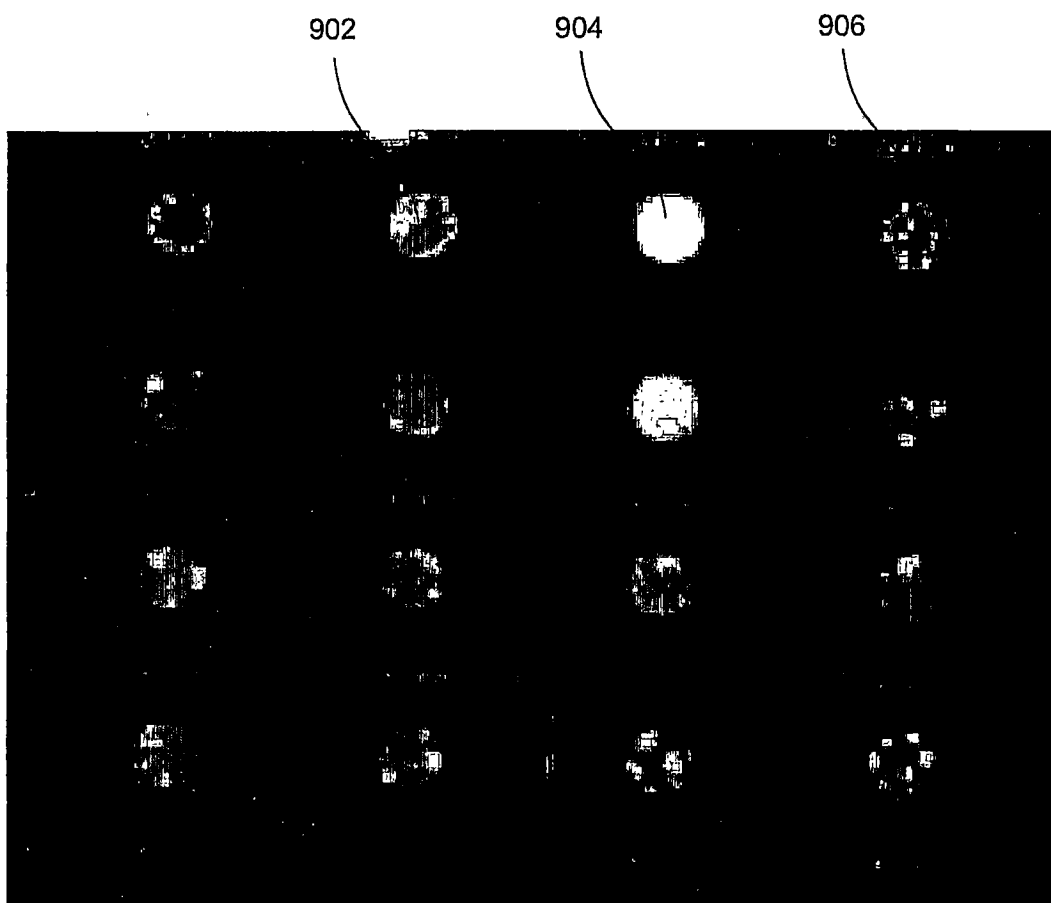
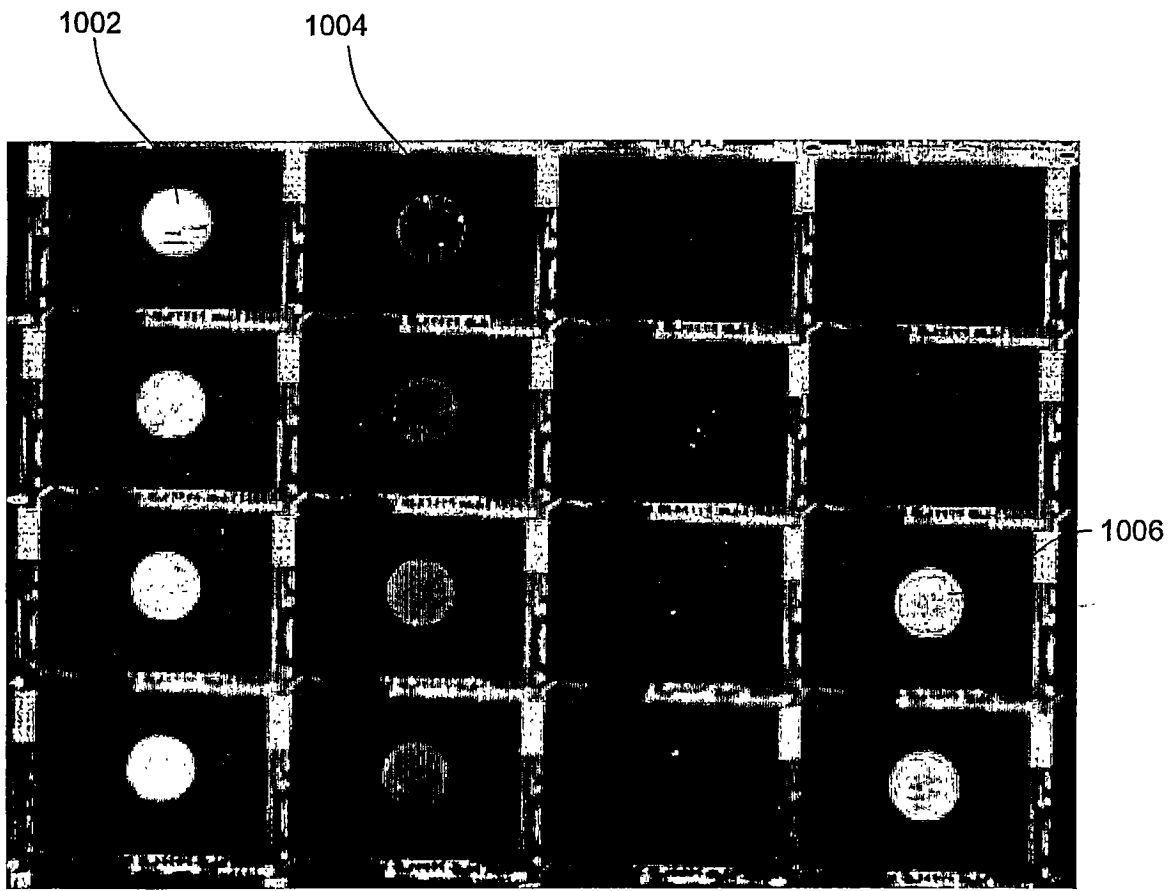


图 8



N-羟基琥珀酰亚胺

图 9



三甘醇

图 10

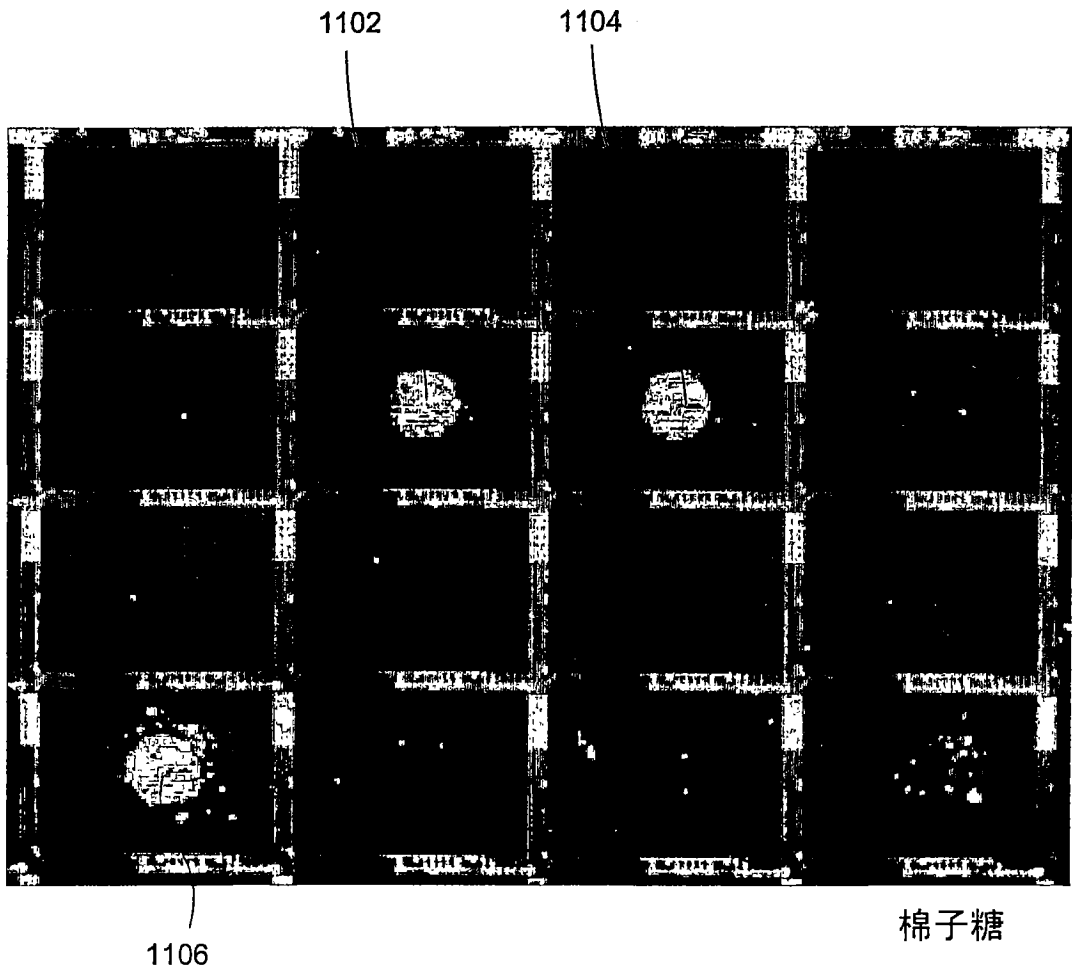


图 11

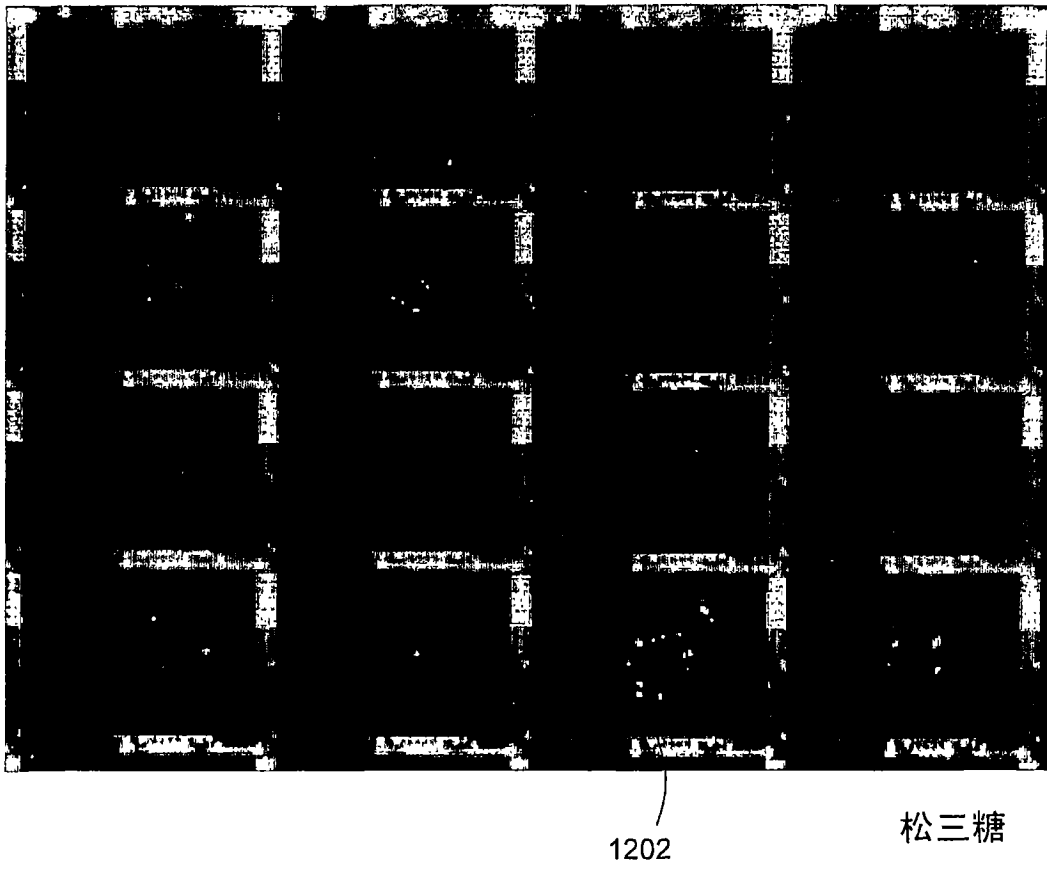


图 12

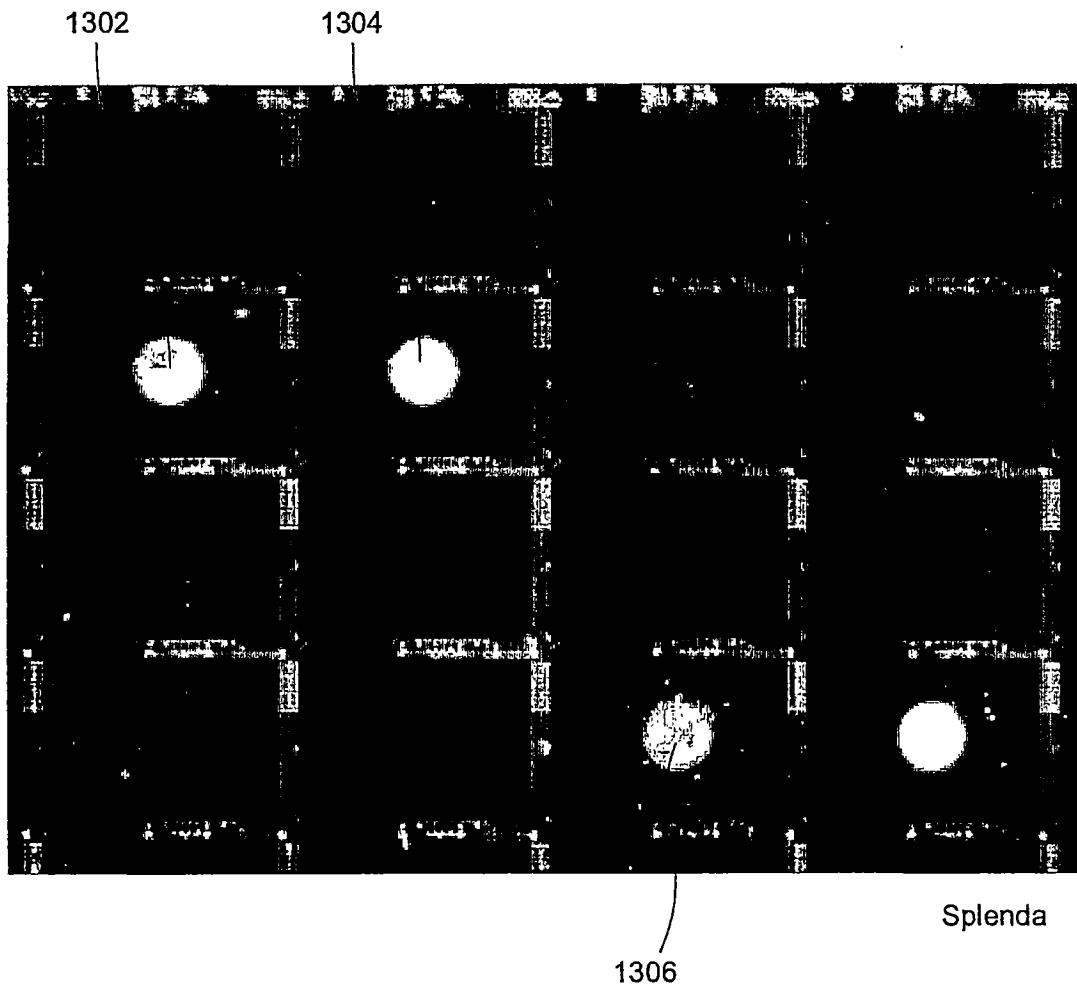


图 13

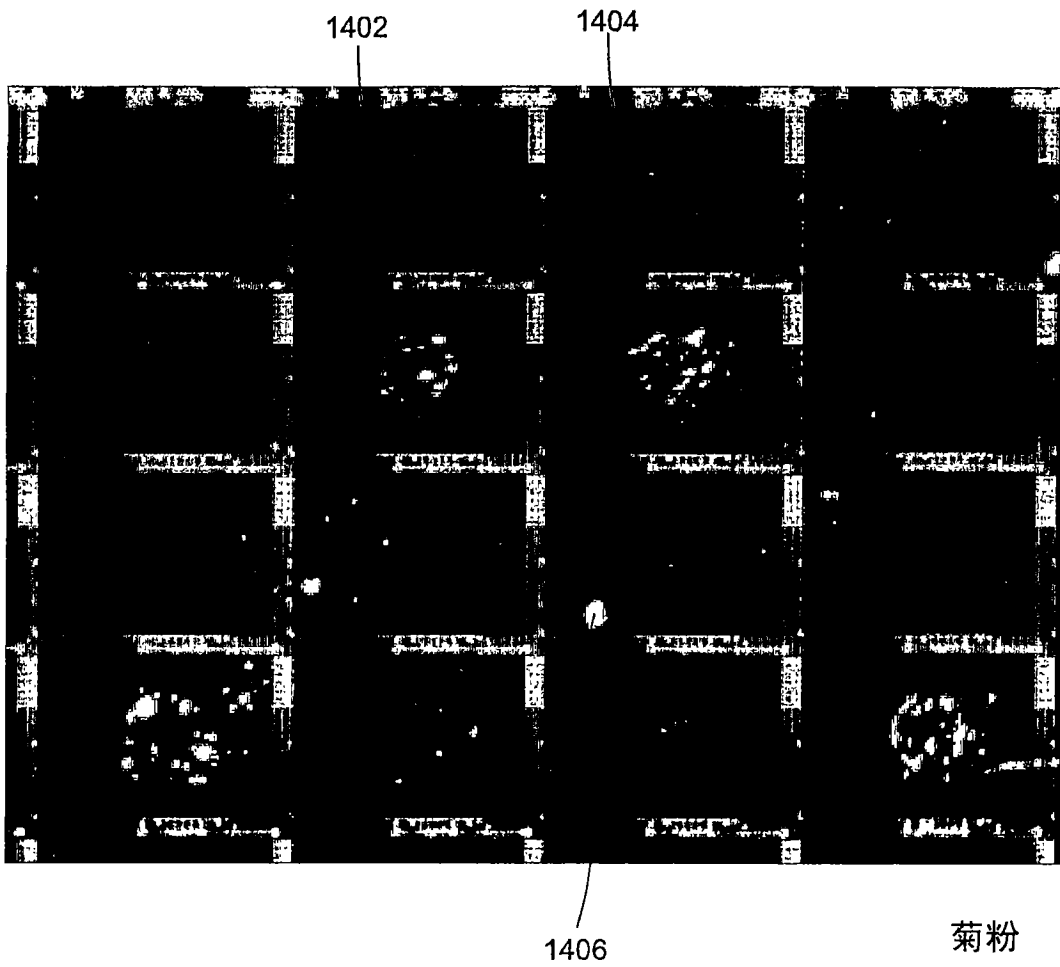
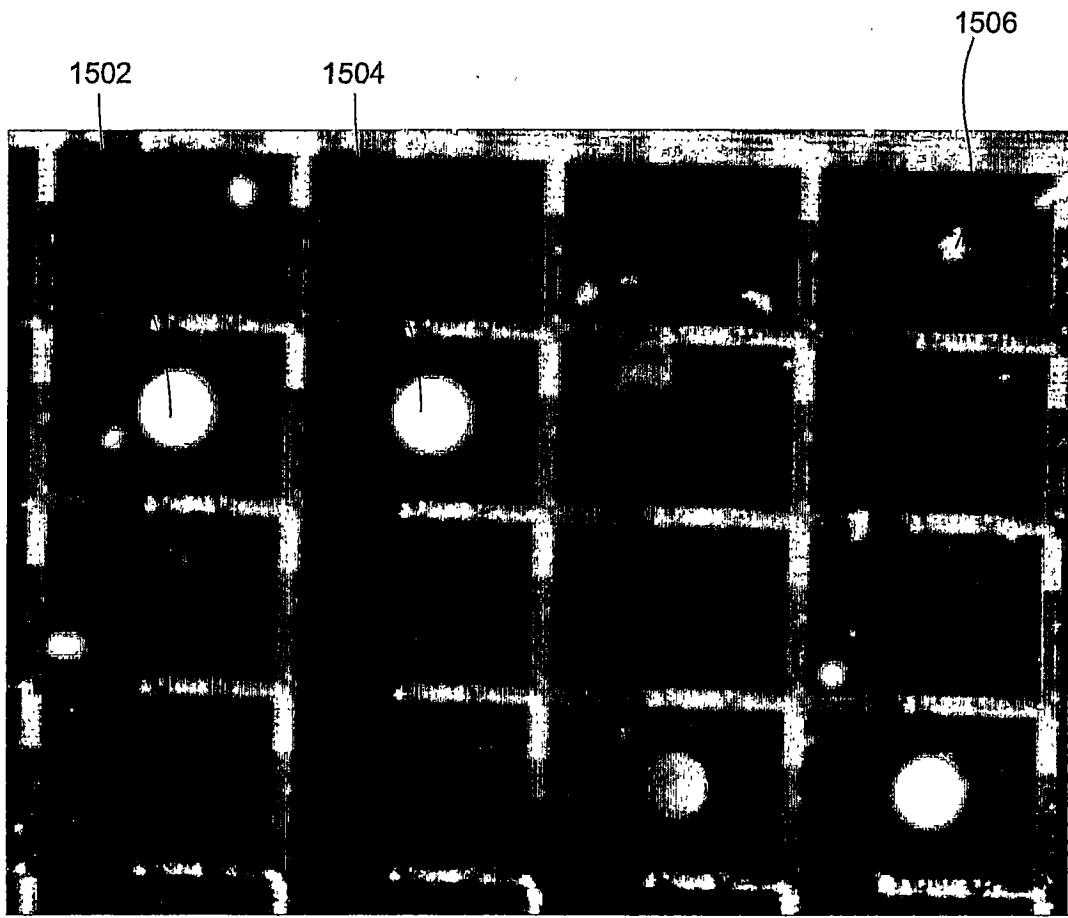
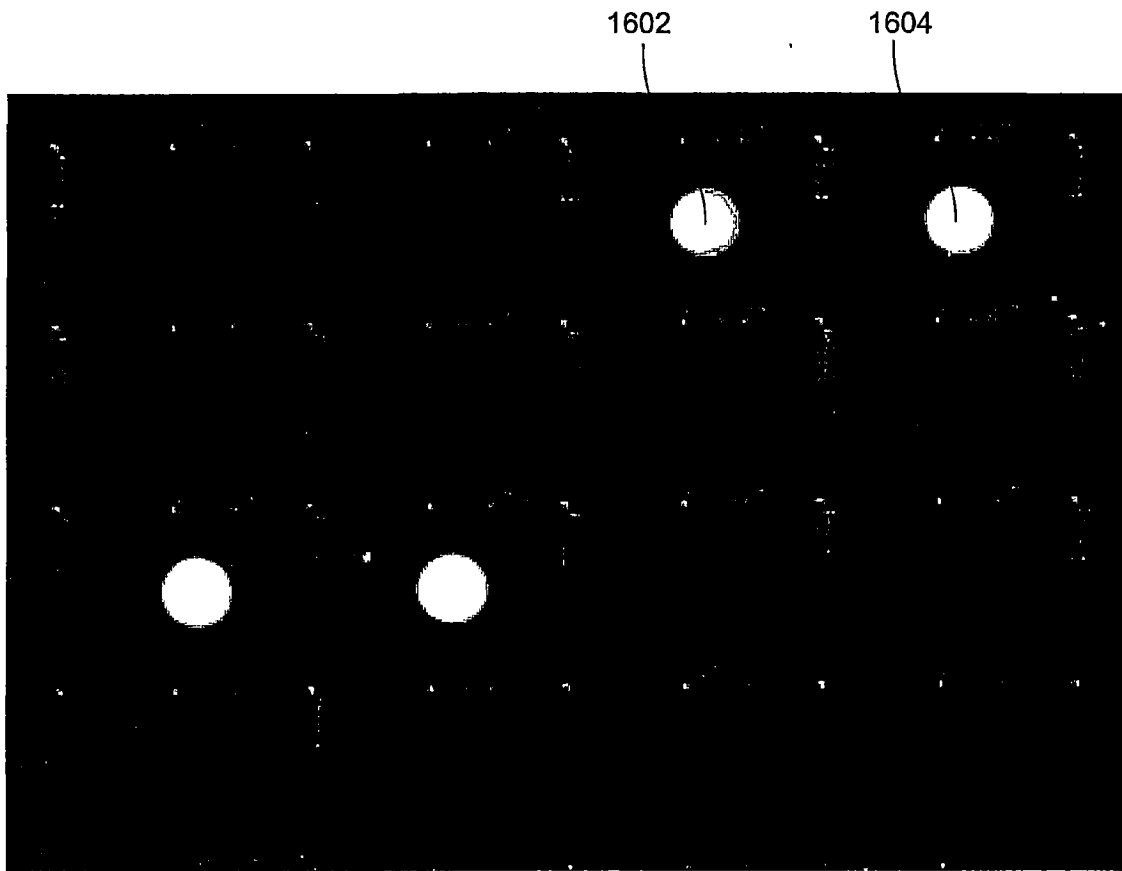


图 14



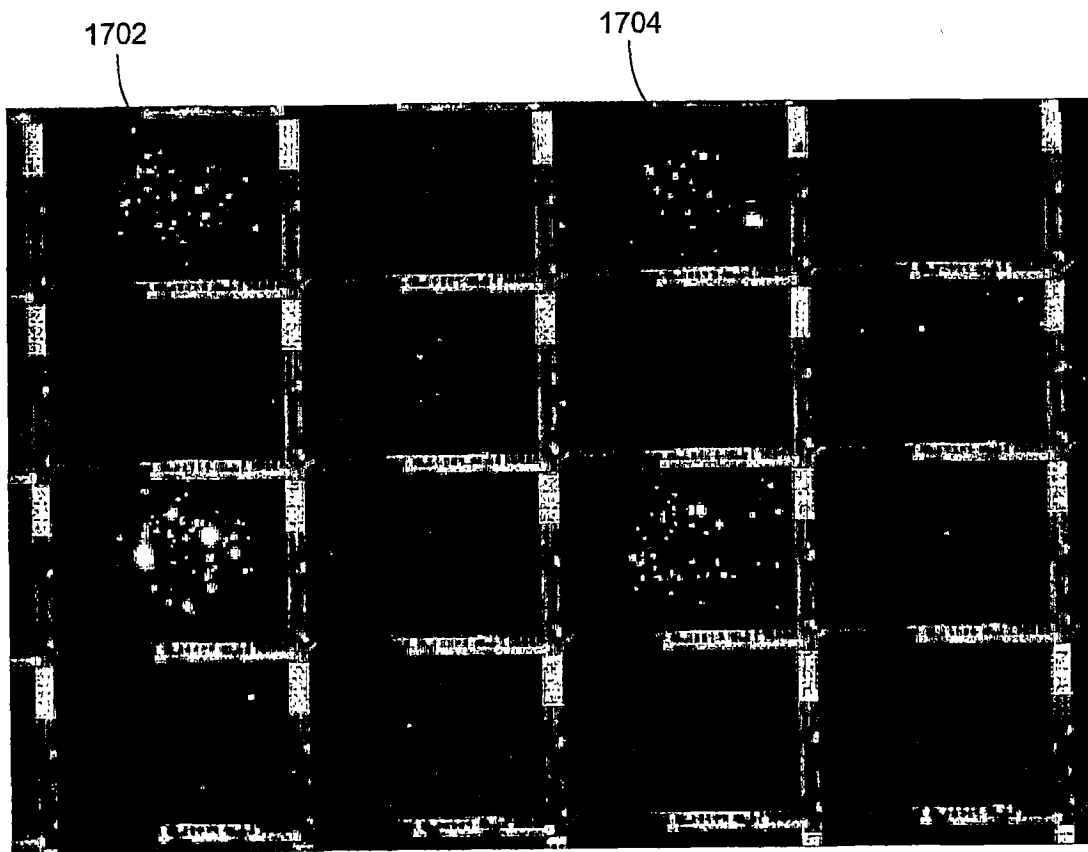
帕拉金糖

图 15



分子量为8000的聚乙二醇

图 16



水杨苷

图 17

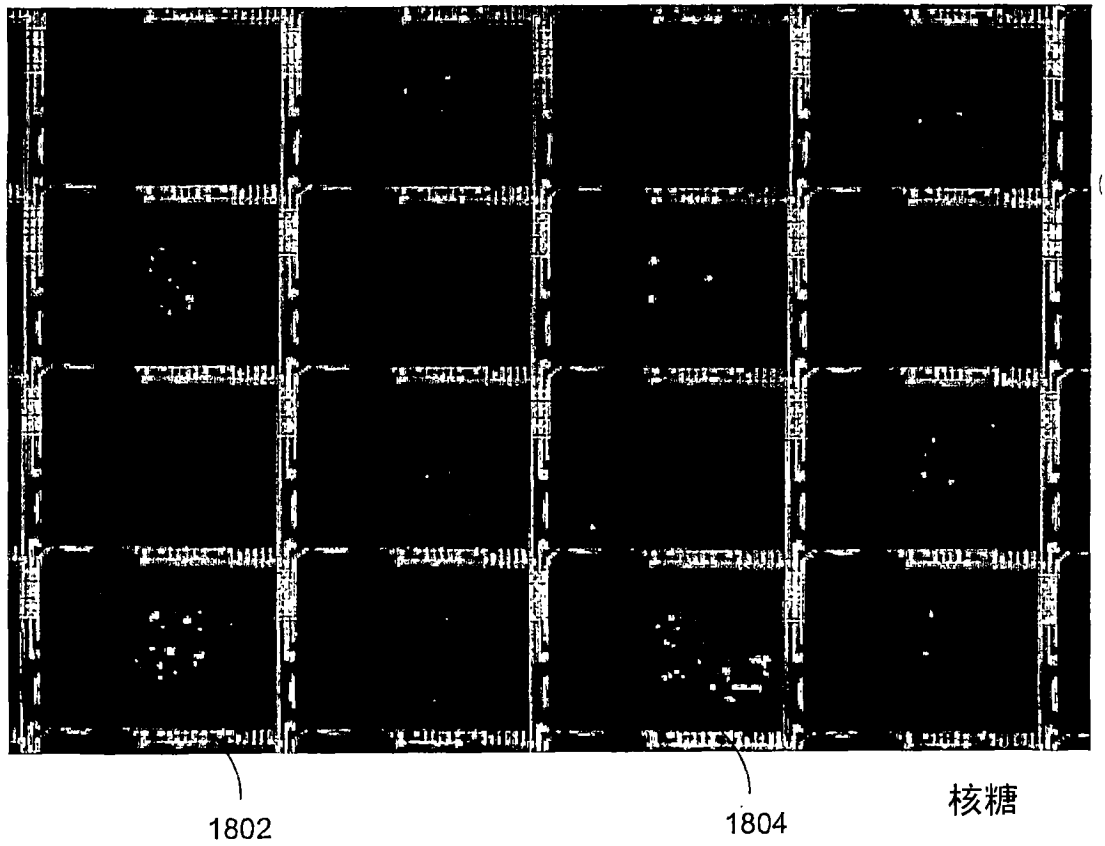
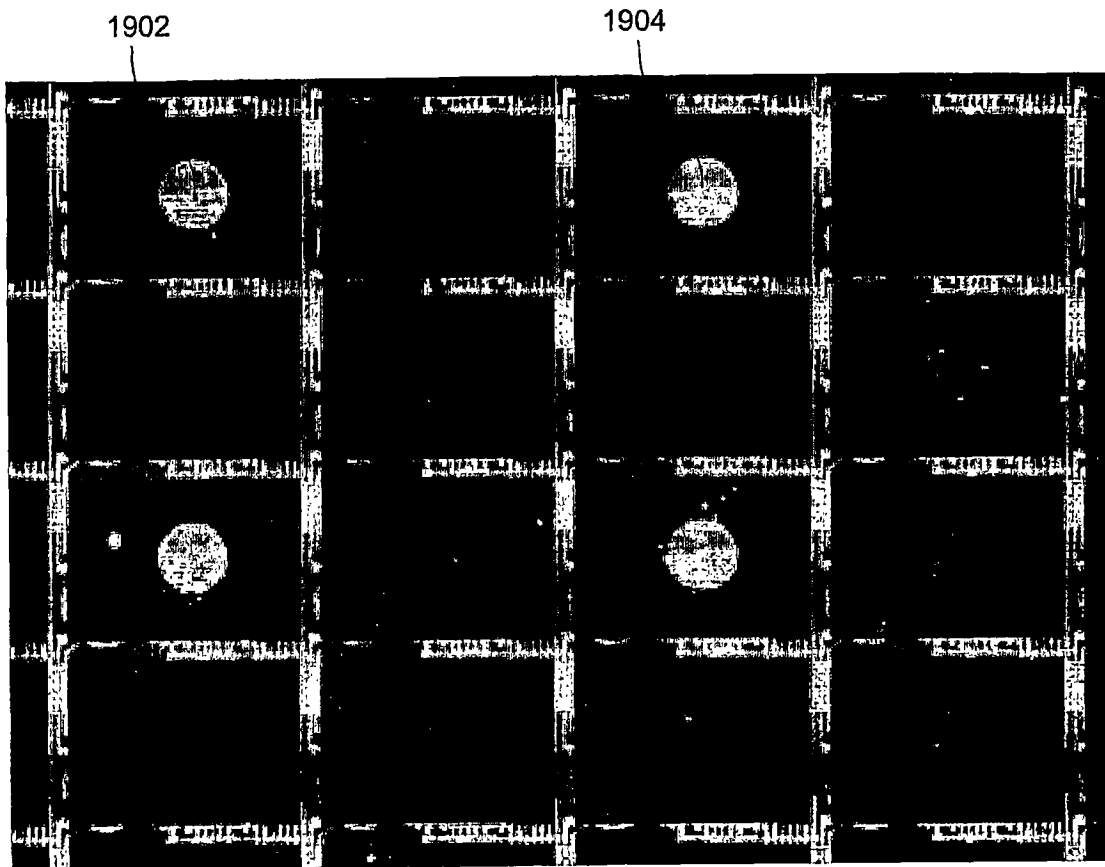
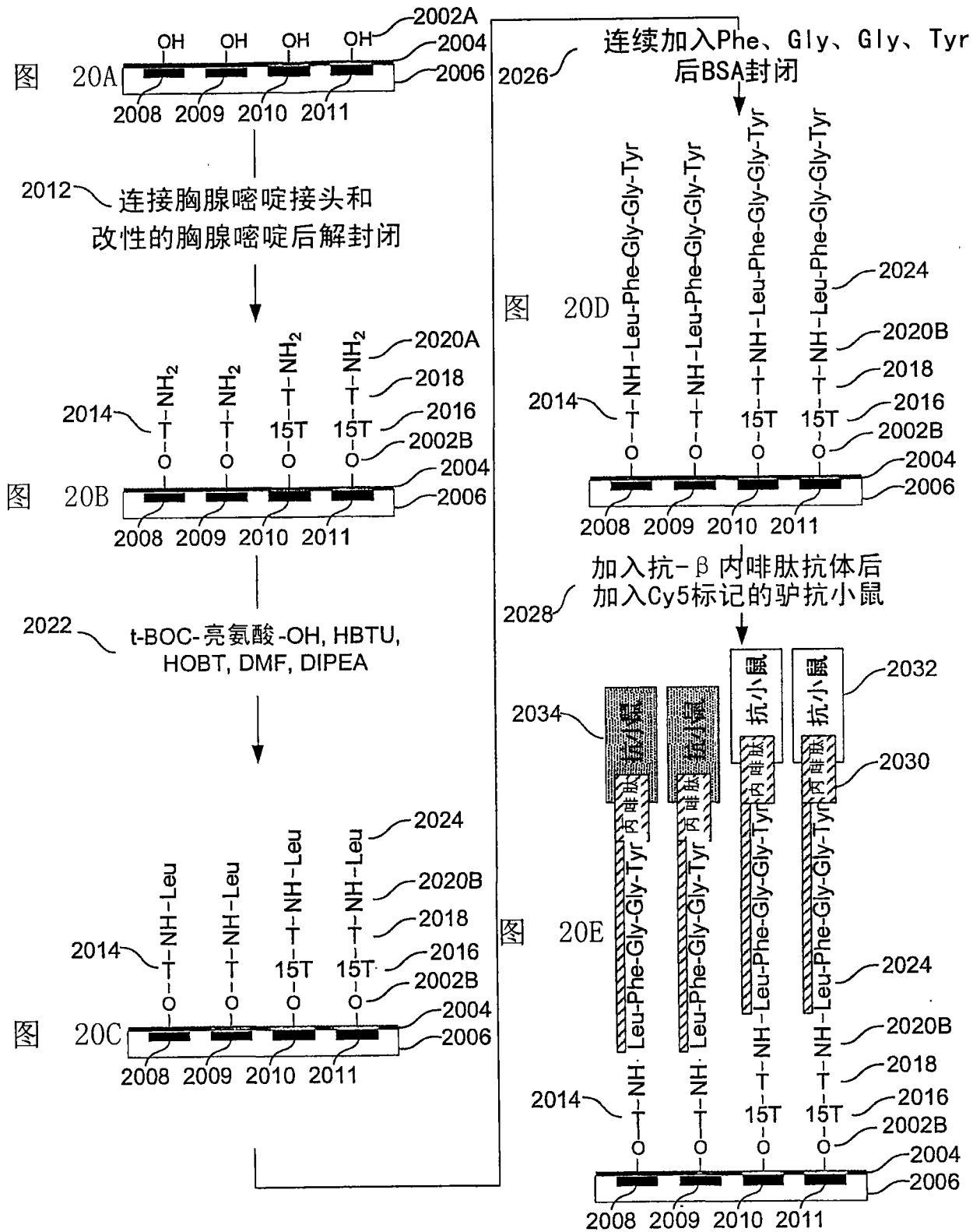


图 18



蜜二糖

图 19



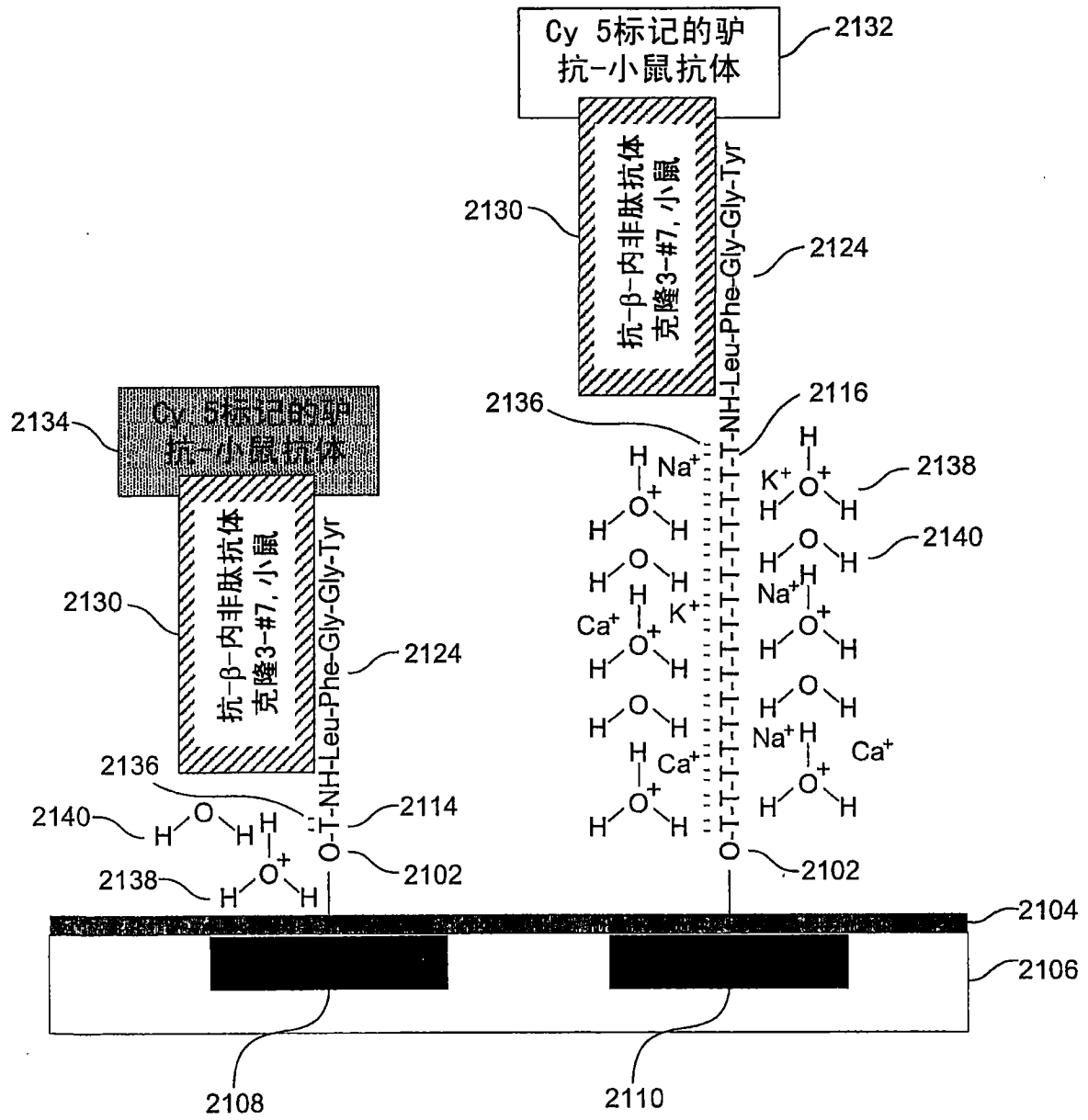


图 21

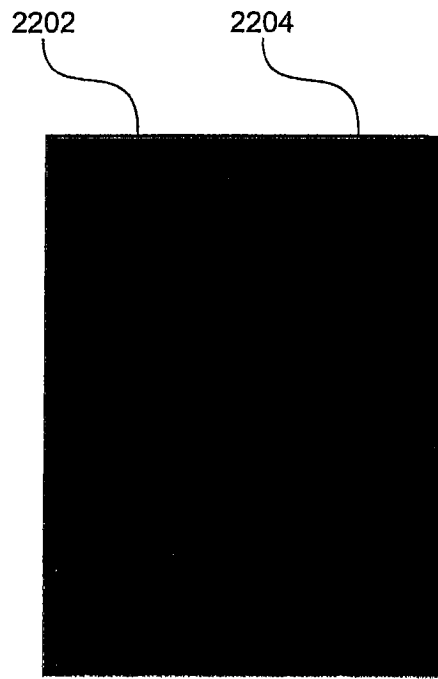


图 22

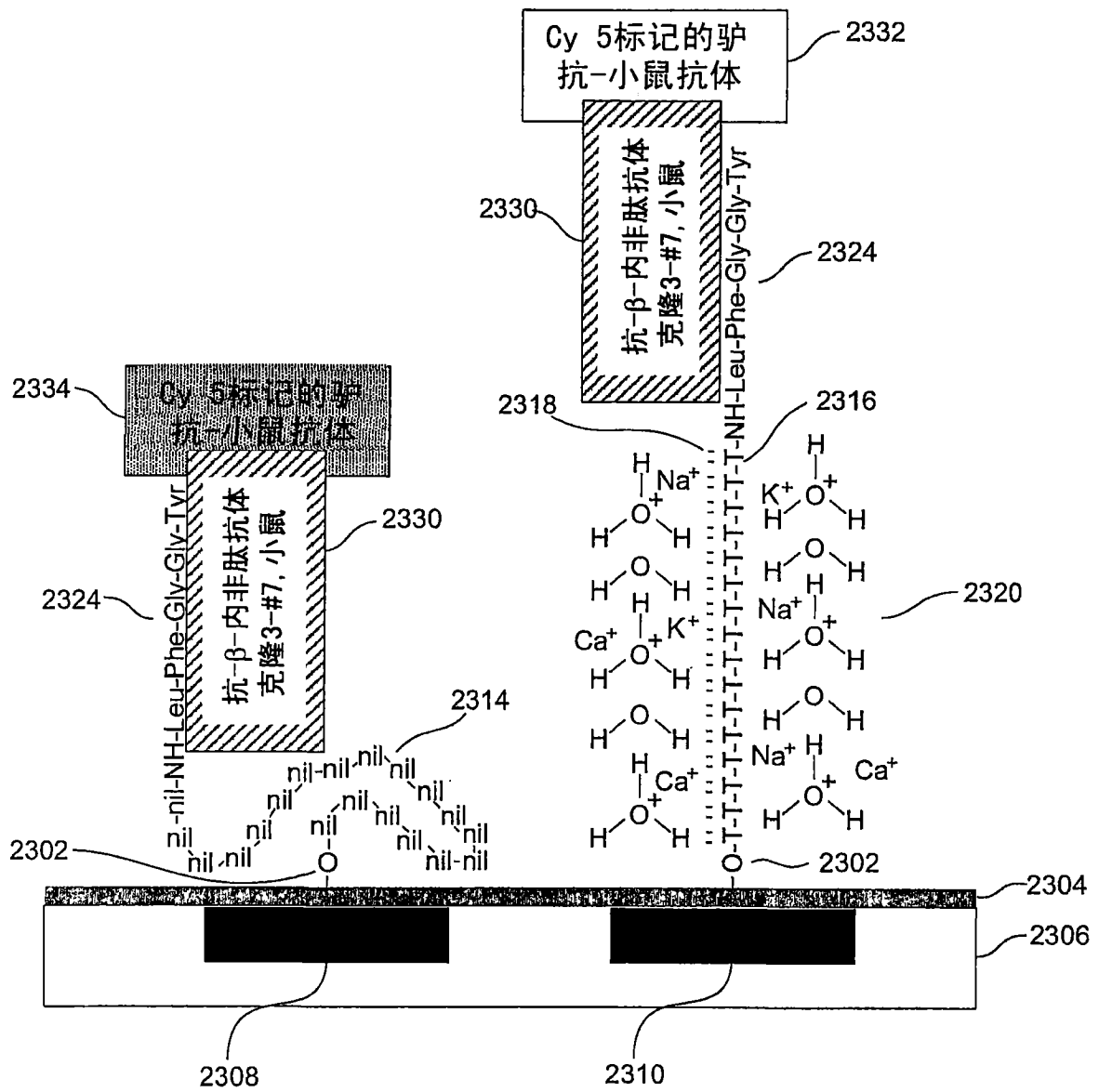


图 23

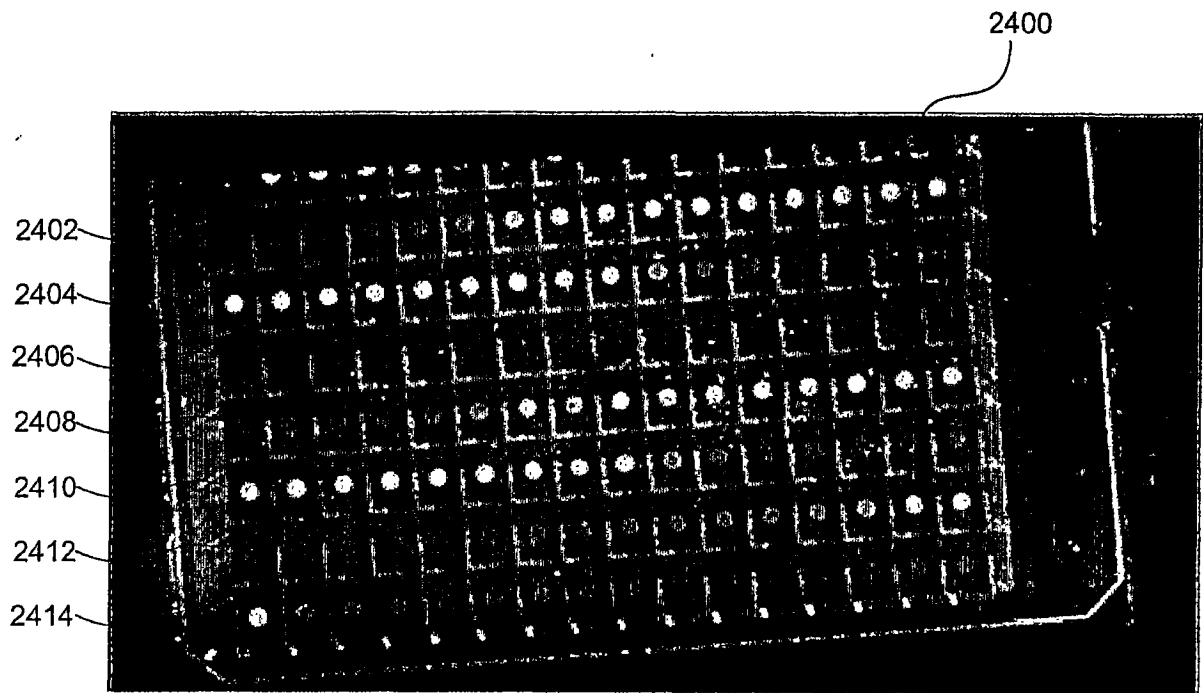
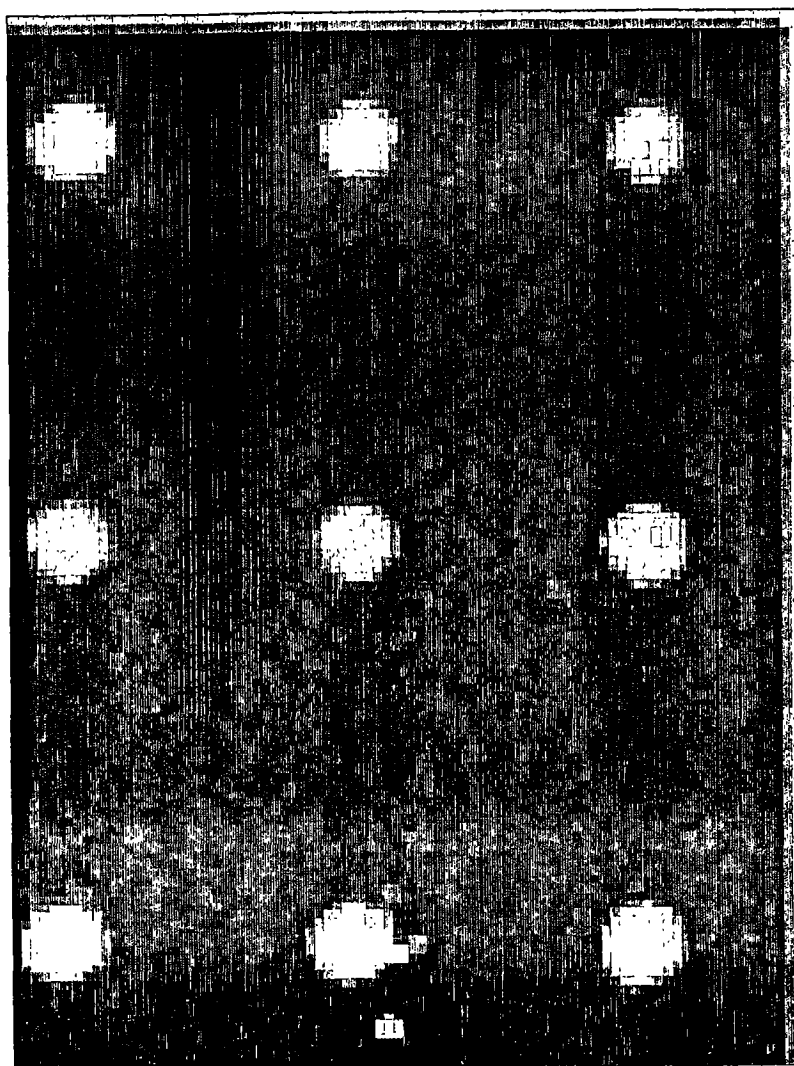


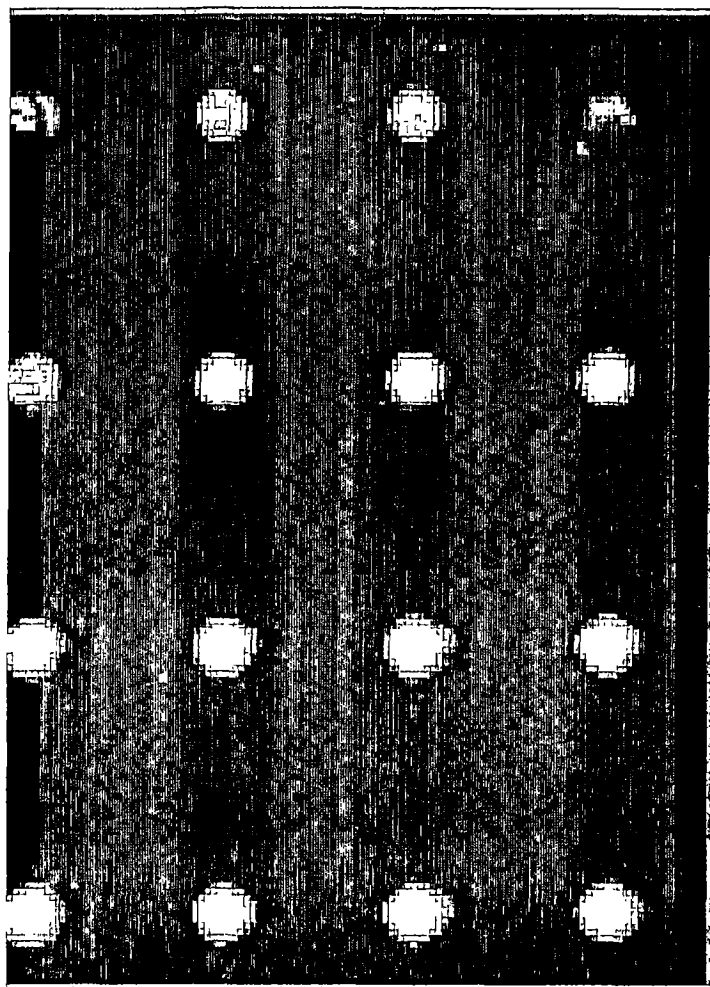
图 24



吸附多孔反应层:1-(3-羟丙基)吡咯

具有荧光标签的DNA杂交

图 25



吸附多孔反应层:1-己基吡咯

具有荧光标签的DNA杂交

图 26

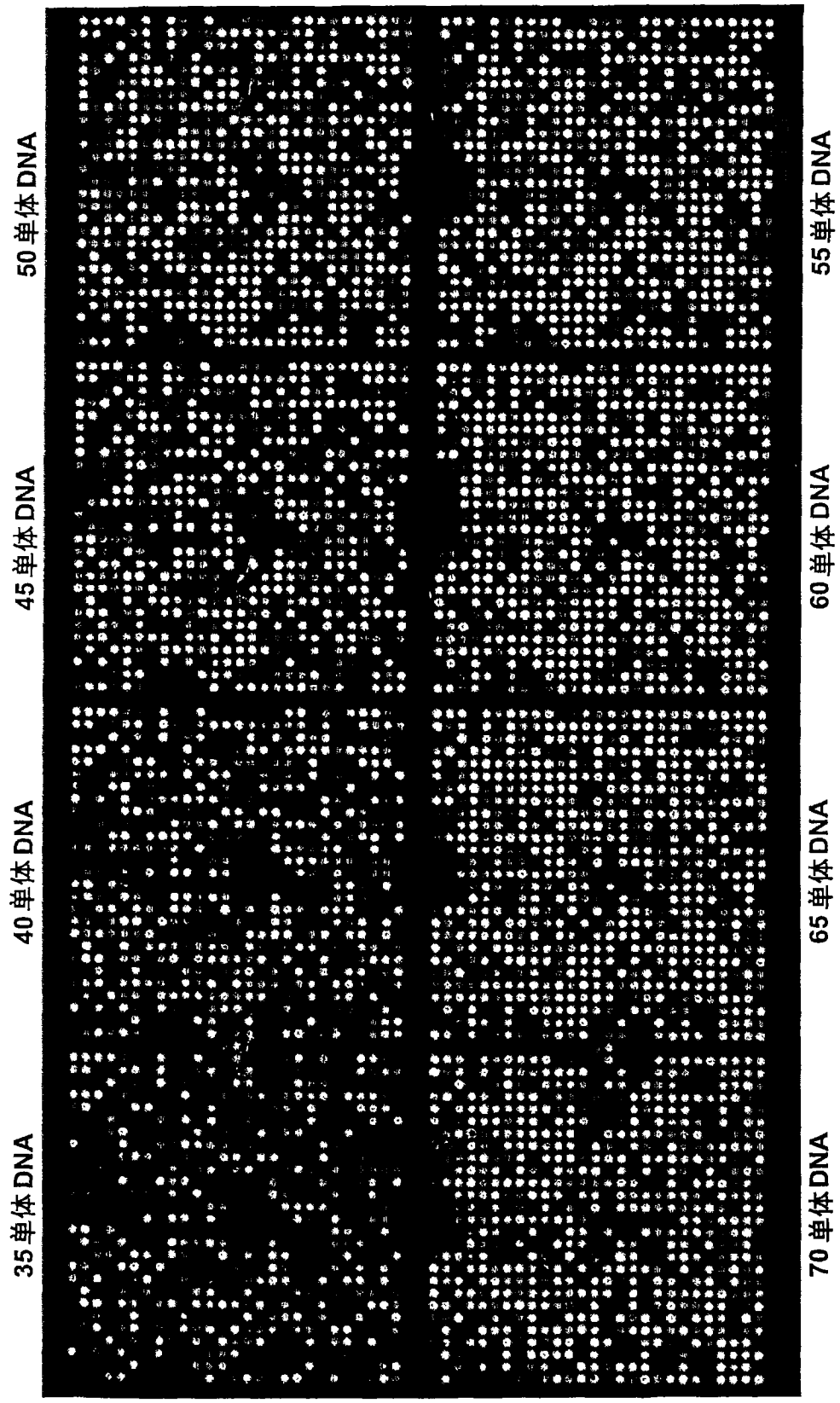
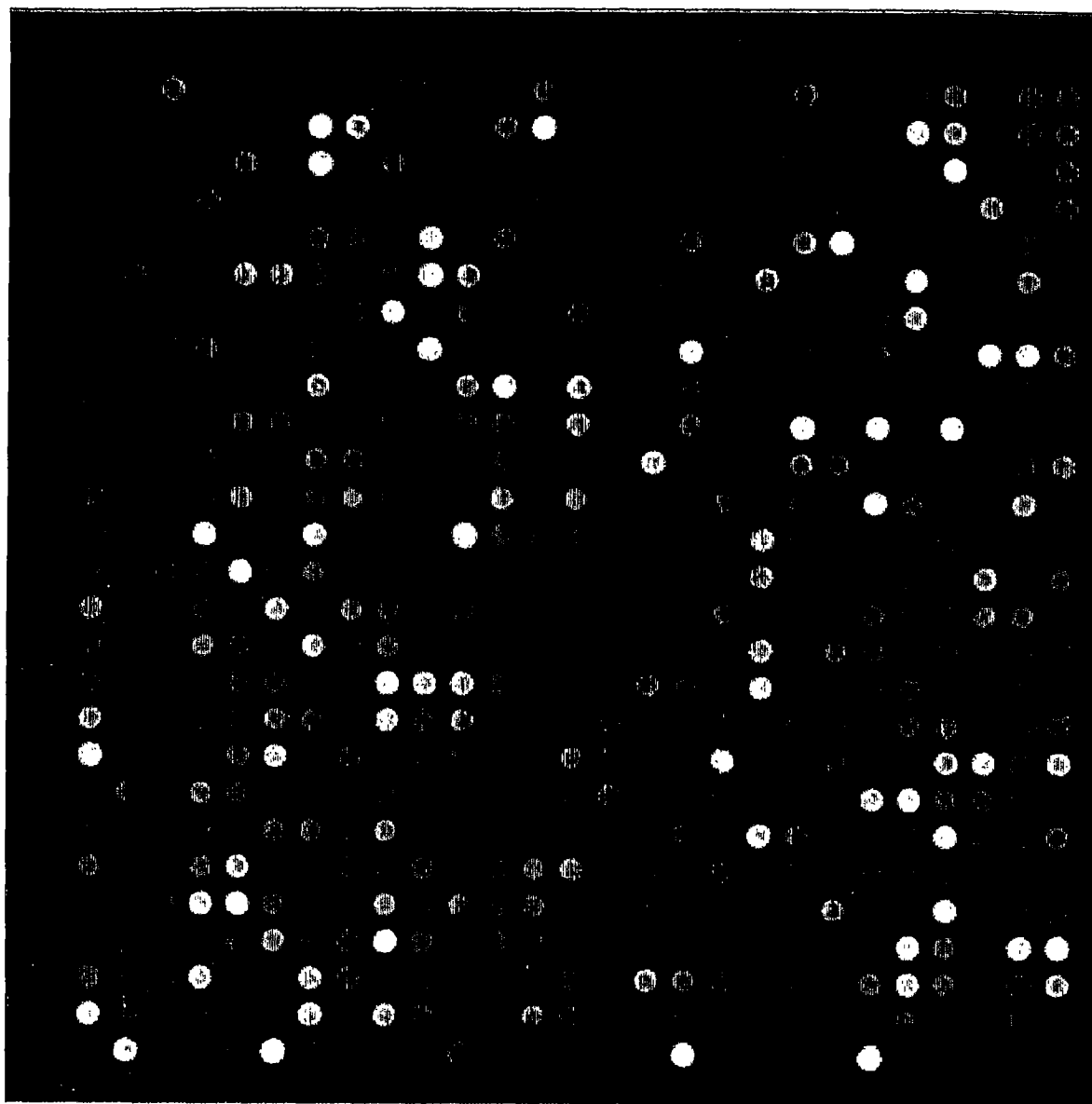


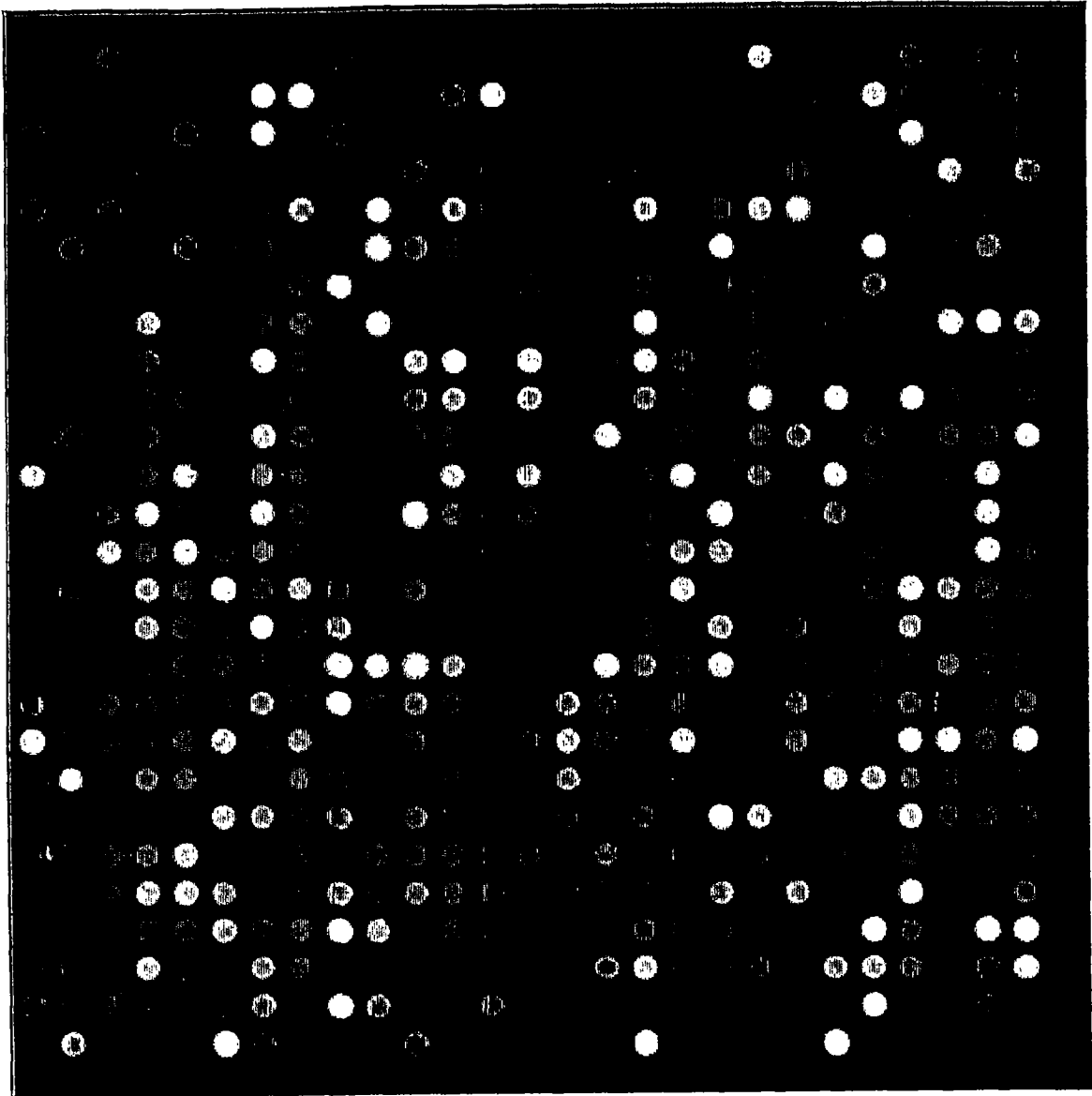
图 27



吸附多孔反应层：
蔗糖、果糖和葡萄糖混合物

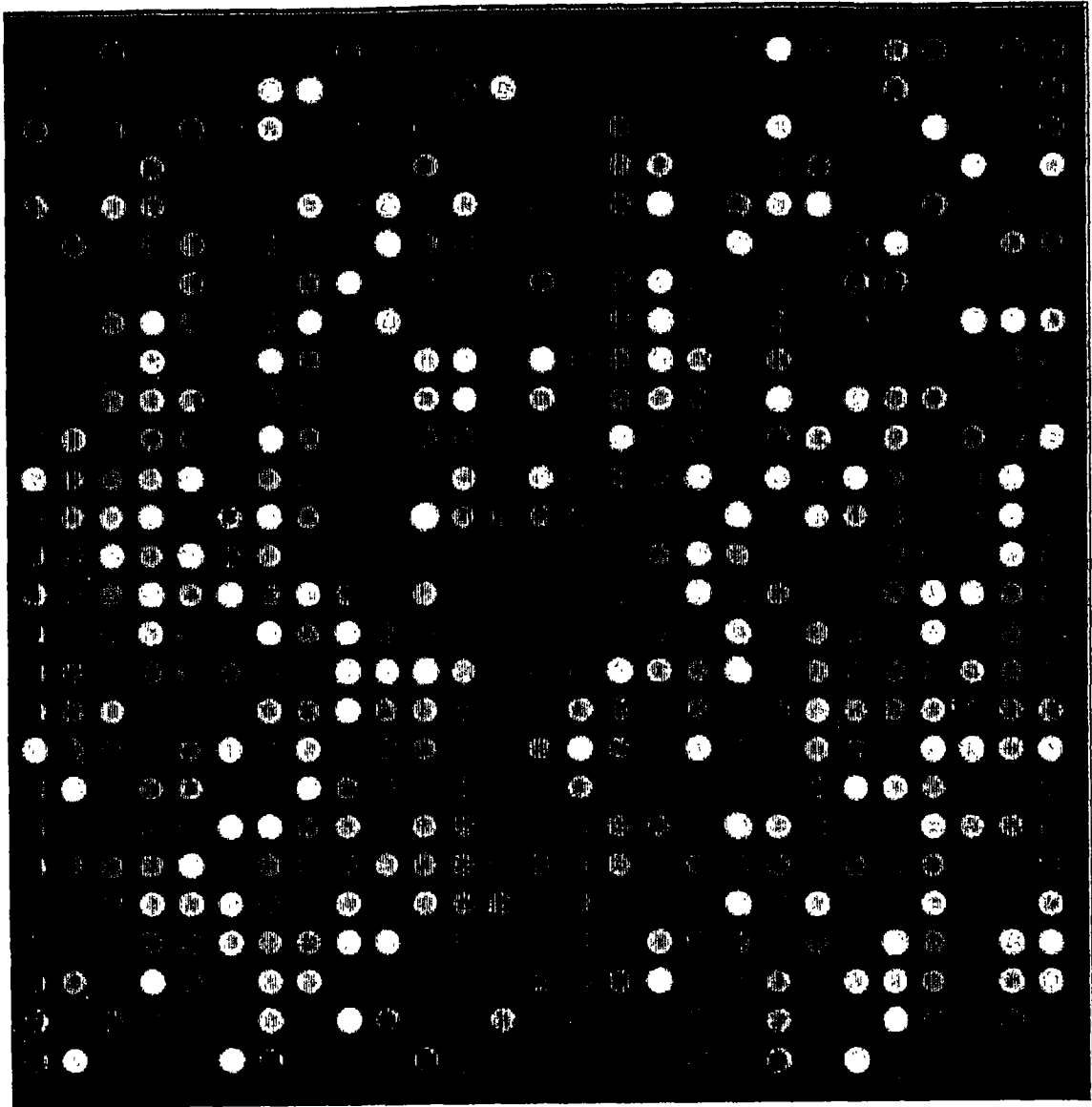
具有荧光标签的9-单体DNA杂交
阵列上35个单体

图 28



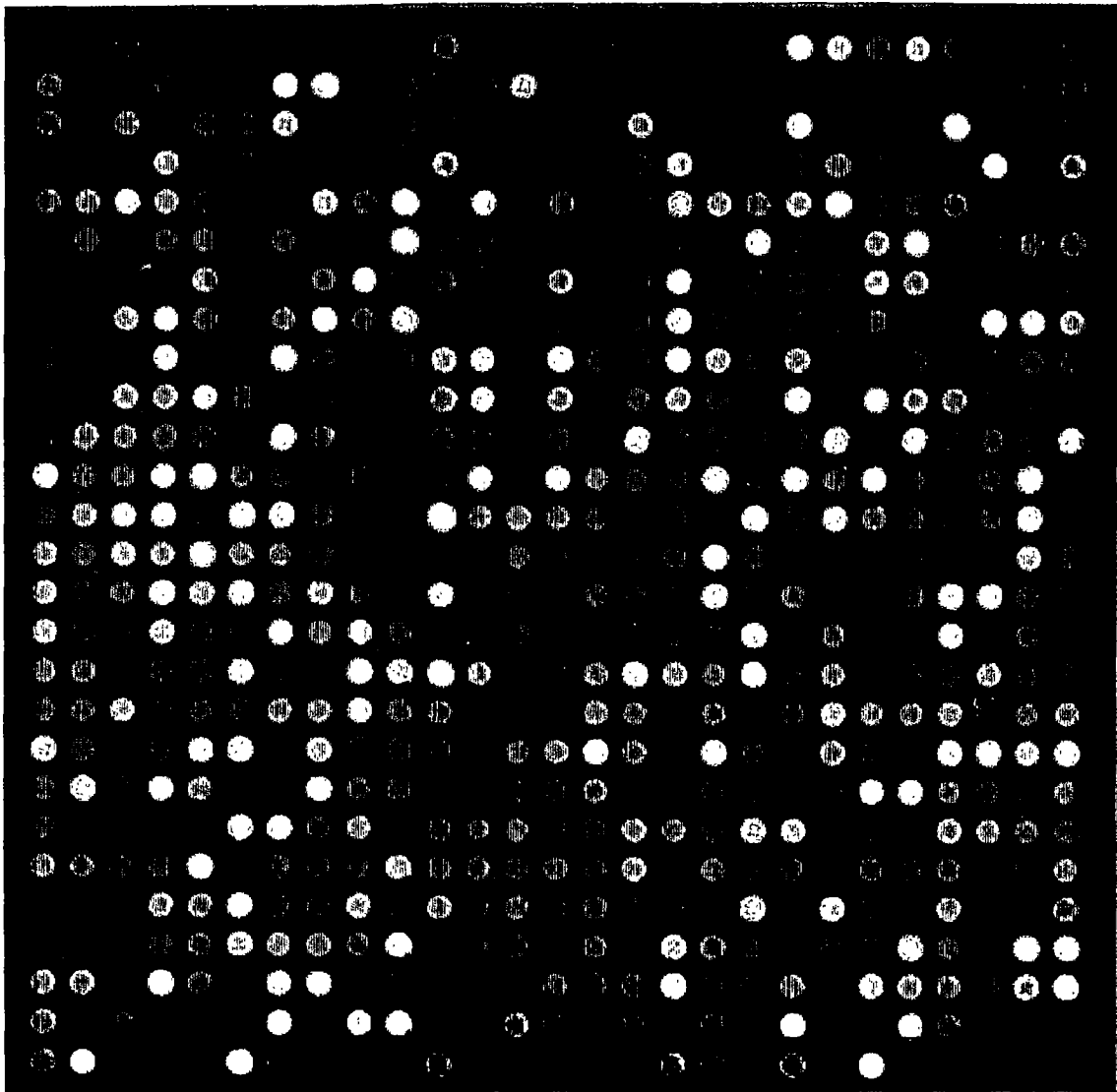
吸附多孔反应层：
蔗糖、果糖和葡萄糖混合物
具有荧光标签的9-单体DNA杂交
阵列上40个单体

图 29



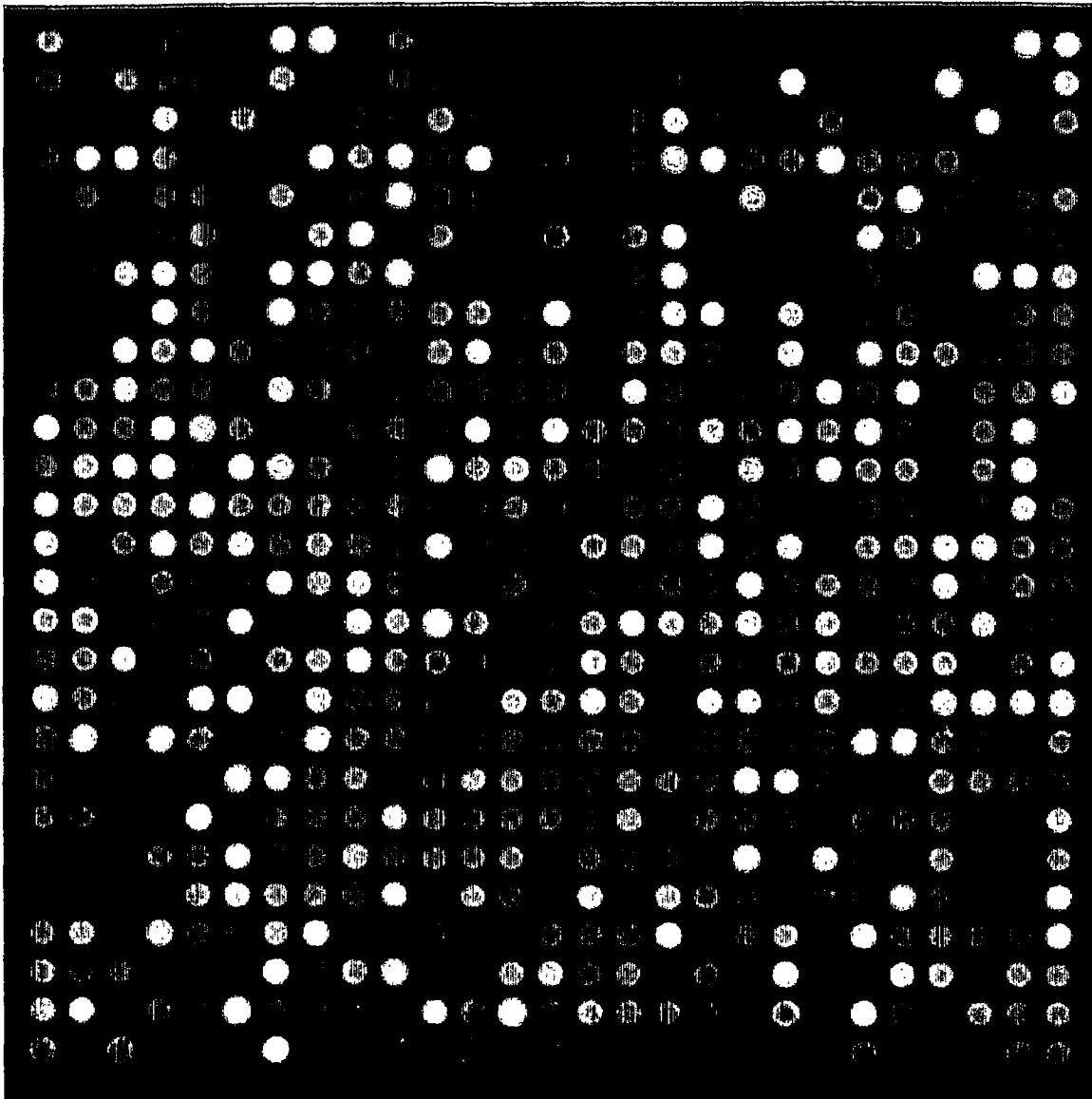
吸附多孔反应层：
蔗糖、果糖和葡萄糖混合物
具有荧光标签的9-单体DNA杂交
阵列上45个单体

图 30



吸附多孔反应层：
蔗糖、果糖和葡萄糖混合物
具有荧光标签的9-单体DNA杂交
阵列上50个单体

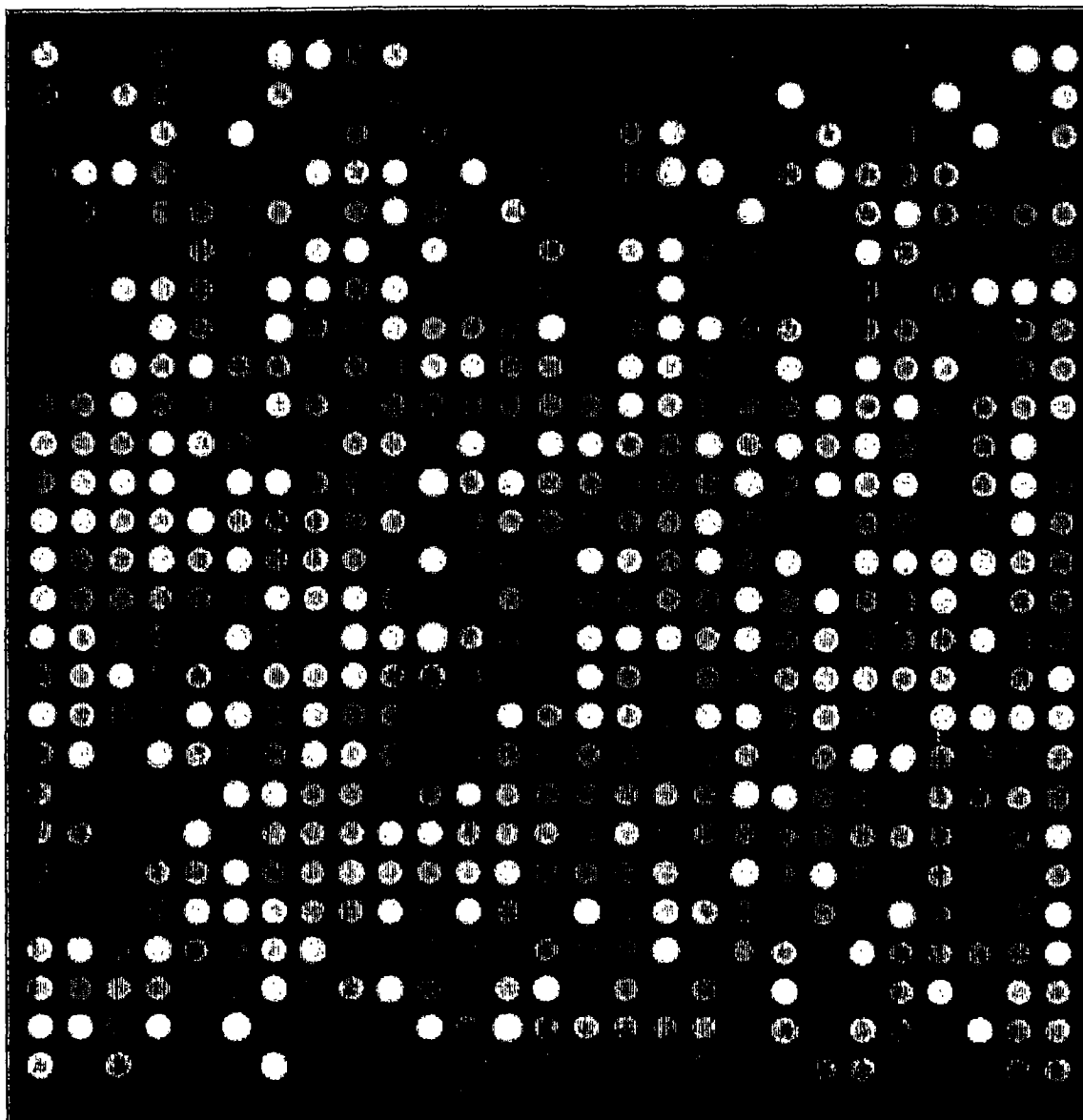
图 31



吸附多孔反应层：
蔗糖、果糖和葡萄糖混合物

具有荧光标签的9-单体DNA杂交
阵列上55个单体

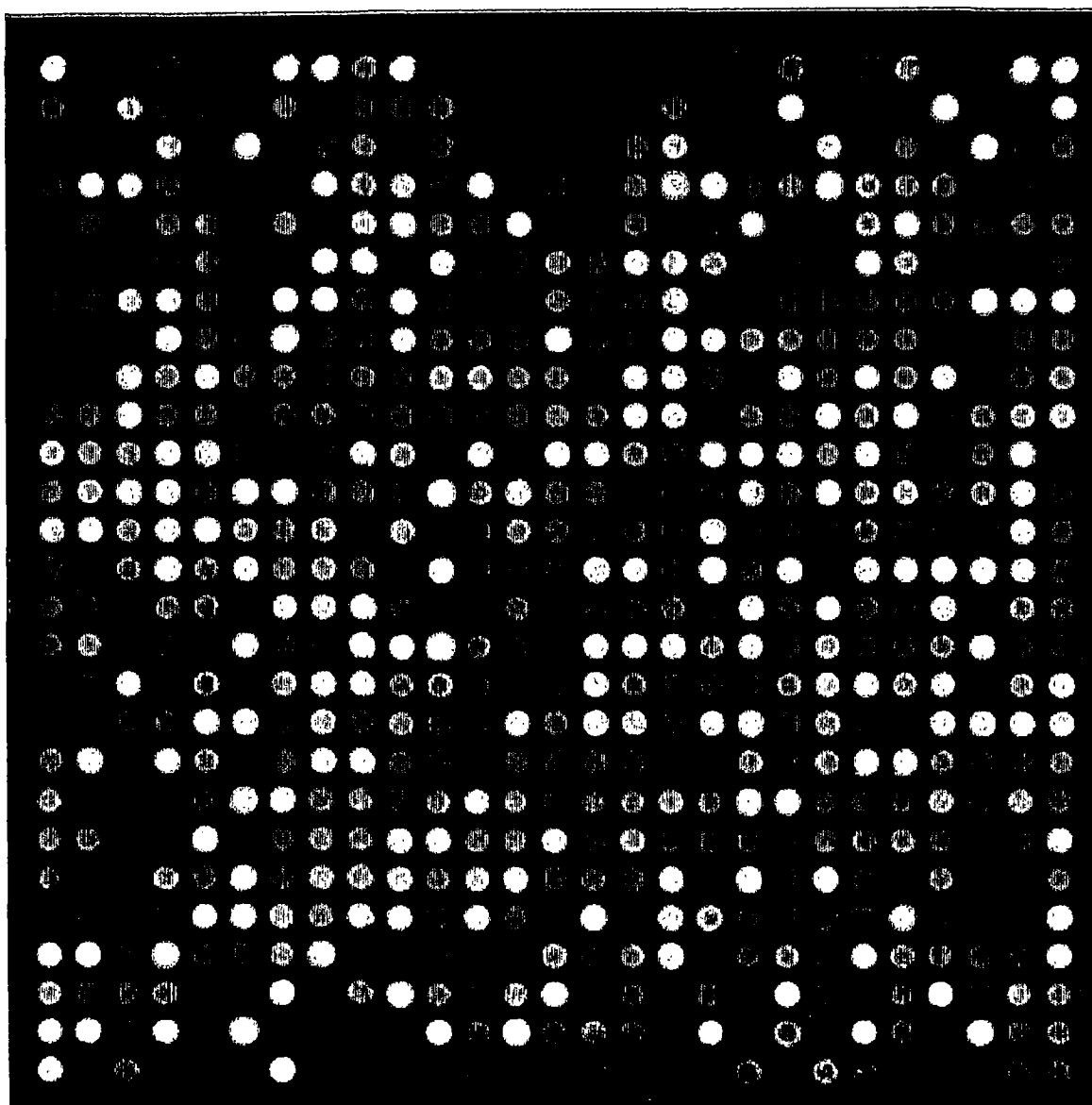
图 32



吸附多孔反应层：
蔗糖、果糖和葡萄糖混合物

具有荧光标签的9-单体DNA杂交
阵列上60个单体

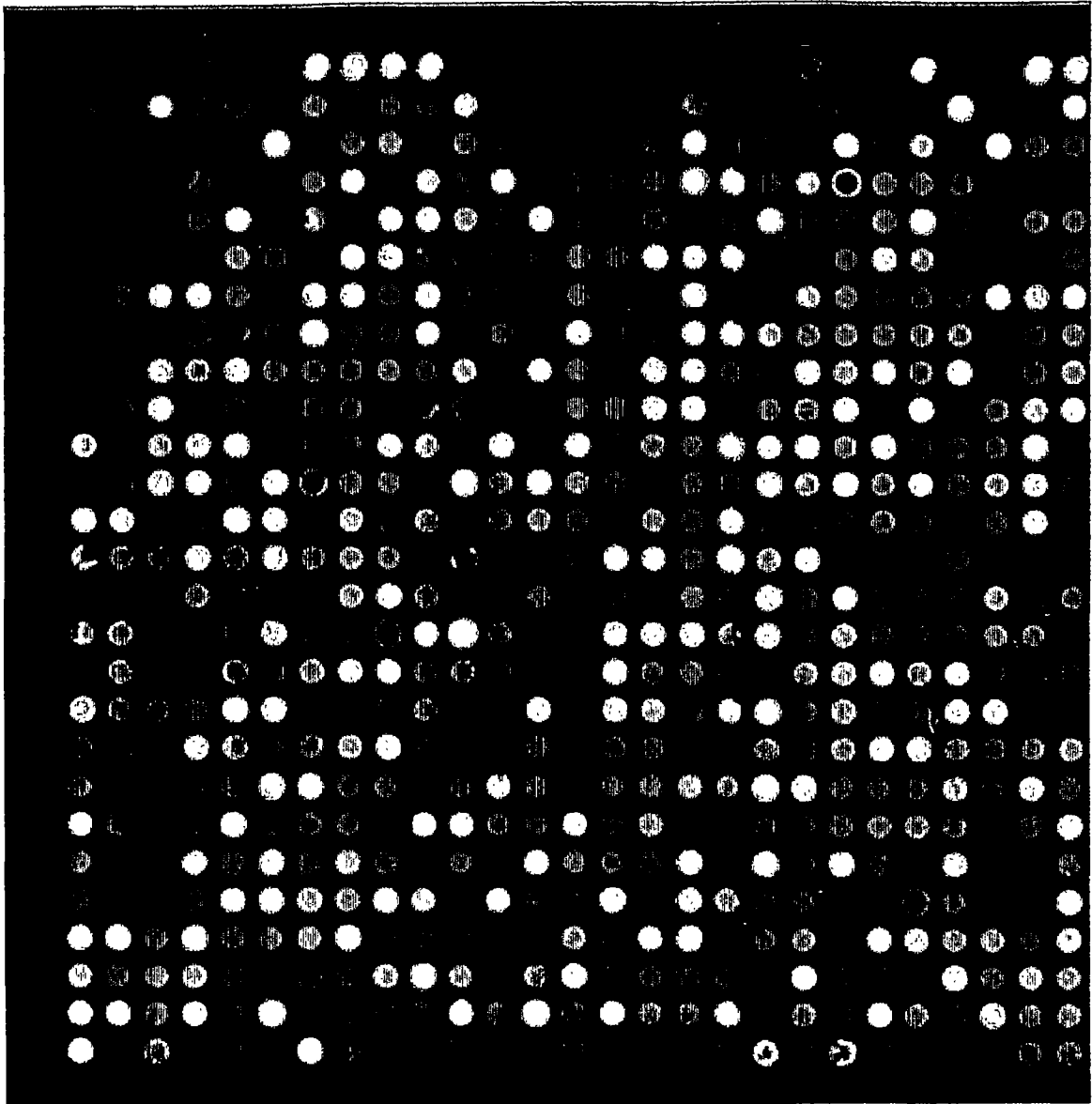
图 33



吸附多孔反应层：
蔗糖、果糖和葡萄糖混合物

具有荧光标签的9-单体DNA杂交
阵列上65个单体

图 34



吸附多孔反应层：
蔗糖、果糖和葡萄糖混合物

具有荧光标签的9-单体DNA杂交
阵列上70个单体

图 35