

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/547

G01N 33/543 G01N 33/566

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01815263.5

[43] 公开日 2003 年 10 月 29 日

[11] 公开号 CN 1452720A

[22] 申请日 2001.8.16 [21] 申请号 01815263.5

[30] 优先权

[32] 2000. 9. 6 [33] JP [31] 2000 - 270775

[32] 2001. 6. 27 [33] JP [31] 2001 - 195573

[86] 国际申请 PCT/JP01/07065 2001.8.16

[87] 国际公布 WO02/21131 日 2002.3.14

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.6

[71] 申请人 东洋钢钣株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 丹花通文 冈山浩直 冈村浩

江原启悟 高木研一

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

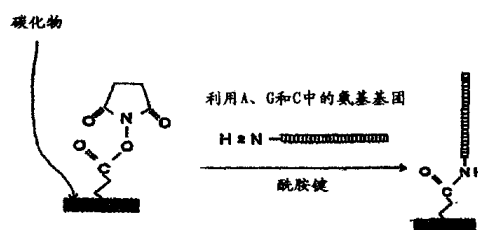
代理人 程 泳

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称 具有在其上形成的表面处理层的固体支持体

[57] 摘要

为了通过将生物材料如 DNA 或蛋白质经由共价键而牢固地固定在底物上,从而克服常规技术在基因分析过程(例如杂交)中点的脱离问题,本发明提供了一种具有在其表面形成的碳化钨、碳化铌、碳化硅、碳化钽、碳化钽、碳化钛、碳化铀、碳化钨或一碳化锆表面处理层的固体支持体,以使得能够在其表面固定寡核苷酸或 DNA 片段;一种在其表面处理层的膜上固定寡核苷酸或 DNA 片段的固体支持体;以及一种通过在这样的固体支持体表面固定基因而分析基因的方法。



ISSN 1008-4274

1. 一种具有在其表面形成的碳化铪、碳化铌、碳化硅、碳化钽、碳化钿、碳化钛、碳化铀、碳化钨、一碳化锆、碳化钼、碳化铬和一碳化钒表面处理层的固体支持体。

2. 根据权利要求 1 的固体支持体，其中表面处理层的厚度为 1 nm 到 1,000 nm。

3. 根据权利要求 1 或 2 的固体支持体，其中寡核苷酸或 DNA 片段是固定在表面处理层的膜上的。

4. 一种通过将基因固定于根据权利要求 1 到 3 的任何一项的固体支持体表面而分析生物材料如基因或蛋白质的方法。

具有在其上形成的表面处理层的固体支持体

技术领域

本发明涉及固体支持体，以用于生物材料如用作基因分析、诊断和治疗的基因和蛋白质的分析，本发明也涉及用该固体支持体分析生物材料如基因或蛋白质的方法。

发明背景

就固体支持体在基因分析中的应用而言，具有处理过的表面以在其上安放基因如 10,000 或更多 DNA 片段（DNA 探针）的玻璃芯片之类的支持体已被广泛应用。

倘若想要利用如上所述的芯片来阐明某一个 DNA 样品的核苷酸序列，准备几万个 DNA 片段，其核苷酸序列已预先阐明且各不相同，使其结合到固体支持体上以使得它们的位置可以被鉴定，然后让荧光标记的 DNA 样品在结果所得的固体支持体上流过，DNA 样品中的 DNA 片段与结合到固体支持体上的 DNA 片段（DNA 探针）中的互补序列可进行杂交。杂交的位点可以通过在固体支持体上测定荧光而以点的形式被鉴定。因而，DNA 样品中 DNA 片段的序列即可得以阐明。

如上所述，某一个 DNA 的核苷酸序列可很容易地在这样的固体支持体上被鉴定以进行基因分析。因此，这样的固体支持体可被用于生物基因组的分析、基因表达的监控和例如基因组错配的基因分析，且又可被用于基因诊断，例如癌基因突变的探测，和药物产品的开发。

通过让荧光标记的 DNA 样品利用固体支持体进行杂交以进行基因分析，并随后在固体支持体上进行荧光照射从而分析结果所得的点，就可以测定 DNA 样品。

因为用于基因分析的常规固体支持体需要预处理，例如为进行

点分析的玻璃漂洗，然而，在点上的 DNA 片段被漂洗掉了，导致对点的不清楚的探测。

本发明的一个目的是克服基因分析中常规固体支持体上荧光探测的这样的含糊不清。

发明内容

与本发明一致，已经发现通过在固体支持体如玻璃、塑料和硅氧烷上形成表面处理层以作为底物，并进一步对固体支持体进行化学修饰，结果所得的底物就可以牢固地使点样的 DNA 片段得以固定，即使在固体支持体被漂洗后，DNA 片段也不会被漂洗掉。另外，荧光照射之后的荧光点更加明显。本发明是基于这样的发现的。

本发明的固体支持体在其表面包括碳化铪、碳化铌、碳化硅、碳化钽、碳化钿、碳化钛、碳化铀、碳化钨、一碳化锆、碳化钼、碳化铬和一碳化钒的表面处理层。

表面处理层膜的厚度优选地为 1 nm 到 1,000 nm。

另外，优选地，表面处理层的膜优选地为化学修饰的，并在其上固定了寡核苷酸或 DNA 片段。

如在权利要求 5 中所叙述的，本发明这样的固体支持体可以通过在固体支持体的表面固定基因而被用于分析生物材料如基因或蛋白质的方法中。

附图简述

图 1 是在固体支持体上固定探针的示意性解释图。

实行本发明的最佳模式

当在其上表面形成了适当的表面处理层的固体支持体如玻璃、塑料和硅氧烷被用作本发明的固体支持体以进行各种分析时，并且同时 DNA 样品被安放在该固体支持体上，对生物材料如基因和蛋白质的亲和力就优选地被提高了。

任何已知的塑料都可被用作固体支持体的塑料。例如，可用到热固性或热塑性的树脂，包括聚酯类树脂如聚对苯二甲酸乙二醇酯或聚对苯二甲酸丁二醇酯、聚乙烯树脂、聚苯乙烯树脂、聚丙烯树脂、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯树脂、尼龙、丙烯酸树脂、氟树脂、聚碳酸酯树脂、聚氨基甲酸酯树脂、甲基戊烯树脂、酚树脂、蜜胺树脂、环氧树脂和氯乙烯树脂。

对于表面处理，优选地用碳化物如碳化钨、碳化铌、碳化硅、碳化钽、碳化钪、碳化钛、碳化铀、碳化钨、一碳化锆、碳化钼、碳化铬和一碳化钒覆盖表面。

此外，上述碳化物与其他材料如金属和无机非金属材料混和物或叠层也是优选的。

换句话说，碳在化学稳定性方面是很好的，且在安放 DNA 探针等时可耐受随后的化学修饰或反应。

理由可以是如下的：当碳化物为了探针的固定而进行化学修饰时，探针以结合形式结合到如图 1 所示的碳化物中的碳上，以使得 DNA 探针可牢固地固定在固体支持体上。

另外，因为固定的探针可被垂直地排列在如图 1 所示的固体支持体上，所以每单位面积固定化的密度可被提高。

没有特定的限制，与本发明一致的碳化物表面处理层的厚度满意地为 1 nm 到 1,000 nm。非优选地，低于 1 nm 时，表面处理层太薄以至于表面处理层的厚度不相同，涉及下面的固体支持体被暴露的部分。相反地，在膜厚度大于 1,000 nm 时，在表面处理层形成时会发生压力，导致非优选地容易发生剥离。在工业生产的立场看，表面处理层的厚度优选地为 10 nm 到 500 nm。更优选地，其厚度为 30 到 200 nm。

至于在固体支持体上形成碳化物表面处理层的方法，可用到已知的方法。这些方法包括如高频喷镀、直流喷镀、弧离子电镀和热化学蒸汽淀积方法。

本发明的固体支持体可在其上安放大量的生物材料如包括 DNA

探针的基因或蛋白质。因而，优选地使用的是具有大量极其小的部分的固体支持体，这些部分在固体支持体上排列以在每一个部分固定许多寡核苷酸片段。没有特定的限制，在每一个极其小的部分都可排列不同类型的 DNA 探针等。依赖于用途，DNA 探针可被适当地进行修饰。

固体支持体的形式包括但不限于如板状型（如那些膜的）或片状型或盘状型。更进一步地，固体支持体的厚度和尺寸没有特别的限制，但可在通常使用的范围内。

玻璃作为固体支持体的底物的特征性质没有特别的限制。考虑到各种性质如与附着在底物表面的反应物的亲和性，可选择具有适当的特征性质的玻璃。

在底物的表面或后面可另外再排列单层 Ti、Au、Pt、Nb 或 WC 或其复合膜作为反射层。反射层的厚度优选地为 100 nm 或更厚，因为这样的反射层均一地覆盖了整体。更优选地，其厚度为 1000 nm 或更厚。

此外，优选地将下面固体支持体的表面有意地修饰为粗糙表面。由于这样的粗糙表面，底物可有利地具有增加的表面积以固定大量的 DNA 探针等（归因于密度增加）。

将表面进行进一步的化学修饰以使得可在底物的表面固定 DNA 和蛋白质。化学修饰的一个实施例是在支持体表面固定一个在其末端通过酰胺键结合到活化的酯上的烃基基团。经由这样的化学修饰，生物材料如 DNA、蛋白质和肽键可更容易地被固定在底物的表面。化学修饰充当了用在其末端具有极性基团的烃基基团对固体支持体的替代，例如羟基、羧基、环氧基、氨基、硫羰和异氰酸盐基团。

上述的烃基基团优选地为具有 1 到 12 个碳原子的烃基基团，优选地为 1 到 6 个碳原子。烃基基团包括例如一元羧酸如甲酸、乙酸和丙酸；二元羧酸如草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸和延胡索酸；以及多元羧酸如 1, 2, 4-苯三酸。其中草酸和琥珀酸是优选的。

化学修饰方法包括允许在氯气中用紫外线照射支持体以使其表

面氯化的步骤，随后允许在氨气中用紫外线照射支持体以使其氨基化的步骤和用适当的酰基氯或酸酐使表面羧基化的步骤。

在本发明的固体支持体上安置的寡核苷酸或 DNA 片段（探针）包括如具有任何数目的核苷酸（没有特别的限制）的任何单链或双链的 DNA-和 RNA 片段。该寡核苷酸或 DNA 片段可经化学键等被固定在固体支持体的表面上。例如，倘若使用具有形成的碳化物表面处理层的固体支持体，那么表面是活化的，即该表面被修饰以易于化学地结合 DNA，且然后结合到 DNA 的末端核苷酸的氨基基团上。

这种情况中具有形成的表面处理层的固体支持体的修饰或活化的一个实施例如下。允许紫外线在氯气中照射支持体以使碳化物中的碳氯化，并随后在氨气中照射固体支持体以使其氨基化，用适当的酰基氯进行羧基化，并用脱水缩合试剂碳二亚胺、二环己基碳二亚胺或 1-[3-(二甲氨基)丙基]3-乙基碳二亚胺允许末端羧基和 N-羟基琥珀酰亚胺进行脱水缩合，那么通过烃基基团末端的酰胺键与活性酯如 N-羟基琥珀酰亚胺酯基团结合的基团就可被固定，于是表面处理层即可被活化。

例如，当本发明的固体支持体的表面以这样的方式被活化时，几万个具有阐明的核苷酸序列的 DNA 片段（探针）就可在表面固定。

此外，一旦将寡脱氧胸苷酸引物附着到固体支持体上，目标 cDNA 即可经由逆转录反应进行扩充，并同时被固定在固体支持体上。

进一步地，利用 PCR 等可以扩充许多 DNA 链并将它们固定在固体支持体上。

在 DNA 片段以这样的方式被固定后，当荧光标记的 DNA 样品流经该固体支持体时，DNA 样品就可与固定在固体支持体上的 DNA 片段（探针）中具有互补序列的探针进行杂交。然后，DNA 样品的序列即可以以荧光点的形式被鉴定。

以这样的方式，本发明的固体支持体使得对某一个 DNA 核苷酸序列的分析和鉴定远远比用常规技术清楚，尽管使用如同后者的常规

技术的方法。因此，固体支持体可被用于生物基因组的分析、基因表达的监控和基因组错配的基因分析等。另外，固体支持体在基因诊断如癌基因突变的探测以及药物产品的开发中是有用的。

实施例

现在本发明在下面的实施例中更详细地进行描述。

实施例 1

1. 作为固体支持体用于基因分析的聚对苯二甲酸乙二酯树脂是如下面所述而制备的。首先，使用 25 mm（宽）×75 mm（长）×1 mm（厚）的聚对苯二甲酸乙二酯树脂。使用目标碳化物如碳化钎、碳化铌、碳化硅、碳化钽、碳化钛、碳化钨和一碳化锆，然后通过以氢气为工作气体进行高频喷镀，以在聚对苯二甲酸乙二酯树脂表面制备约 10 nm 厚的个别目标碳化物膜，于是即制得了固体支持体。

2. 然后将这些固体支持体的表面进行化学修饰以活化。

特别地，使聚对苯二甲酸乙二酯树脂的表面氯化 1 分钟，随后使其氨基化 10 分钟并直接沉浸在琥珀酰氯中 10 分钟。然后，用超纯水漂洗固体支持体，并随后沉浸在活化溶液中以直接活化。该活化溶液为 1 mL 1,4-二噁烷、25 mg 氨基氰（hydrogen cyanamide）和 150 mg N-羟基琥珀酰亚胺溶液的组合物。结果所得的固体支持体进一步用超纯水漂洗并在 65℃ 干燥以进行活化。将 2μL 浓度为 500 pmol/mL 的 FAMdA17 逐滴（点样）加到如上所述制备的固体支持体表面上。这种情况下，利用超纯水或 10% 的甲酰胺、10% 的甘油或 50% 的 DMSO 作为缓冲液。

随后，进行温育。条件为在 65℃ 的空气中水/甲酰胺=1/1 持续 1 小时（干燥）。

测量了这样恢复以用于基因分析的固体支持体的荧光亮度。测量的时间为 1 分钟，采用仪器 LAS-1000 Plus。在点样和干燥（65℃）后，测量了荧光的亮度。所有结果所得的亮度都高于那些在常规技术

的固体支持体上恢复的。

本发明的所有固体支持体在点样和干燥后比那些常规技术的固体支持体在点样和干燥后显示更强的荧光亮度。换句话说，在任何情况下生物材料片段如点样的 DNA 或蛋白质从来不会从任何本发明的固体支持体上被漂洗掉，而是保留在其上，以使得点可以被清楚地探测。

作为选择地，生物材料片段如点样的 DNA 或蛋白质无论如何都将从常规技术的固体支持体上被漂洗掉，以至于点不可以被清楚地探测。

实施例 2

使用 25 mm (宽) × 75 mm (长) × 0.5 mm (厚) 的硅氧烷作为底物。在硅氧烷底物的表面，使用目标碳化钽，然后通过以氢气为工作气体进行高频喷镀而制备厚度约为 10 nm 的碳化物膜。

然后，将硅氧烷底物的表面进行化学修饰以活化。用紫外线在氯气中照射 1 分钟以使得硅氧烷底物的表面被氯化，随后在氯气中使其氨基化 10 分钟并直接沉浸在琥珀酐溶液中 20 分钟。琥珀酐溶液是通过将琥珀酐和四硼酸钠 (pH8) 分别在 N-甲基-2-吡咯烷酮溶解为 140 mM/L 和 0.1 M/L 而制备的。

然后，通过将硅氧烷底物沉浸在活化溶液中而使其直接活化。该活化溶液是通过将 115mg N-羟基琥珀酰亚胺和 959 mg 1-[3-(二甲氨基)丙基]3-乙基碳二亚胺在 200-mL 的烧杯中溶解于 50 mL 的磷酸盐缓冲液 (pH6) 中而制备的。将硅氧烷底物沉浸在活化溶液中进行反应。然后漂洗结果所得的硅氧烷底物。

将 DNA 点样于活化的底物上。点样溶液是通过将 DNA 样品溶解于 50% 的 DMSO 溶液中 (点样缓冲液) 至浓度为 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 而制备的。然后使用点样仪器，将 DNA 溶液挤压到载玻片上。大量 DNA 样品以这样的方式附着在载玻片的表面。

随后，温育载玻片以使 DNA 固定。首先，将水和甲醛以 1: 1 混和在一起的溶液置于密封盒中，该密封盒是调整过湿度的容器。然后，将硅氧烷底物置于该湿度经过调整的容器中，避免与溶液相接

触。然后使硅氧烷底物在其中放置 3 小时。随后，用漂洗溶液（ $2 \times$ SSC、0.2% SDS）漂洗硅氧烷底物两次，并另外用 0.1% 的 SSC 和无菌水漂洗以离心和干燥。

然后，用预杂交溶液（50%甲酰胺、 $5 \times$ Denhardt 溶液）封闭硅氧烷底物。封闭溶液是逐滴地加至底物的，在其上轻轻地盖上盖玻片以避免气体的渗透。随后，将底物置于湿度经过调整的容器中，在 60°C 封闭 1 小时。然后用 $0.1 \times$ SSC 漂洗掉盖玻片，随后为用无菌水漂洗 15 分钟及随后的离心和干燥。

其后，利用荧光标记试剂盒用荧光对 DNA 样品进行标记。然后使标记的 DNA 碱变性。用于标记的标记物是溶解于杂交缓冲液（20% SSC、20%甲酰胺、0.5% SDS）中的，调整浓度到 $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。结果所得的溶液即定义为杂交溶液。

在其上固定了 DNA 的硅氧烷底物在热水中沉浸 5 分钟之后，将杂交溶液逐滴地加到底物上，在其上轻轻地盖上盖玻片以避免气体的渗透。随后，使 DNA 在湿度经过调整的容器中杂交 12 小时。

其后，用 $0.1 \times$ SSC 漂洗掉盖玻片。用漂洗溶液（ $2 \times$ SSC、0.2% SDS）漂洗硅氧烷底物两次，并另外用 0.1% 的 SSC 和无菌水漂洗以离心和干燥。

用 Fuji Film fluoroimage 分析器 FLA-8000 观察结果所得的底物。与本发明相一致，荧光亮度为 1352，比在常规技术中的值 845 高。

工业的适用性

本发明的固体支持体使得对某一个 DNA 核苷酸序列的分析和鉴定远远比用常规技术清楚，尽管使用如同后者的常规技术的方法。因此，固体支持体可被用于生物材料如基因或蛋白质的分析，包括生物基因组的分析、基因表达的监控和基因组错配的分析。另外，固体支持体在基因诊断如癌基因突变的探测以及药物产品的开发中是有用的。

图1

