

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
G01N 33/543

(11) 공개번호 특2002 - 0048425
(43) 공개일자 2002년06월22일

(21) 출원번호 10 - 2002 - 7004096
(22) 출원일자 2002년03월29일
 번역문 제출일자 2002년03월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2000/26725
(86) 국제출원출원일자 2000년09월29일

(87) 국제공개번호 WO 2001/23082
(87) 국제공개일자 2001년04월05일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 브라질, 캐나다, 중국, 일본, 대한민국, 뉴질랜드,
 EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아
 일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

(30) 우선권주장 09/410,368 1999년09월30일 미국(US)

(71) 출원인 나노젠 인코포레이티드
 해리 제이. 레온 하르트
 미국 캘리포니아주 샌디아고 패시픽 센터코트 10398(우편번호:92121)

(72) 발명자 하벤스,존,알.
 미국92122캘리포니아주샌디에고라마스스트리트5628
 오노프리,토마스,제이.
 미국92078캘리포니아주샌마르코스소노마스트리트590
 그리프,찰스,에이치.
 미국92065캘리포니아주라모나오클로드16345
 케보키안,그레고리,제이.
 미국92529캘리포니아주테메쿨라카미노피에드라33490
 크로츠,자인
 미국92126캘리포니아주샌디에고웨스트레이플레이스6913
 리크스타드,크리스티,엘.
 미국92128캘리포니아주샌디에고#309카미니토칸틸레나18622
 레이몬드,다니엘,이.
 미국92129캘리포니아주샌디에고키카코트#28139928
 리이스,하워드,알.
 미국92064캘리포니아주포웨리아파트먼트121오크놀12604
 루니,레지나
 미국92037캘리포니아주라즐라토리파인스로드#3022500
 스콧,존,제이.
 미국47901인디애나주라파엣트사우쓰포스트리트425

(74) 대리인 주성민
 김영

심사청구 : 없음

(54) 마이크로전자 어레이 상의 생체분자 부착 부위

요약

본 발명은 전자적 주소지정 마이크로칩 어레이 투과층의 표면에 화학 잔기의 부착을 증진시키는 것에 관한 것이다. 화학 잔기의 부착은 어레이의 미리 결정된 위치에서 또는 전체 어레이 위에서 일어날 수도 있다. 부착은, 어레이의 포획 부위에서 전자 전위를 사용하여 어레이와 접촉되는 용액의 pH 변화를 유도함으로써 수행될 수도 있거나, 또는 용액의 pH를 비전자적으로 조절함으로써 수행될 수도 있다. 의도되는 화학 잔기는 pH 민감성이고, 어레이에 부착하기 위한 반응 중심부를 형성한다. 또한, 이러한 부착을 위한 신규 그래프팅 방법이 제공된다.

명세서

기술분야

본 발명은 전자적 주소지정 마이크로어레이(microarray)의 투과층과 관련하여 관능기를 혼입시키는 것에 관한 것이다. 더욱 특별하게는, 본 발명은, 마이크로어레이 상의 특정 위치에서 활성화될 수 있고/있거나 생체분자를 부착하기 위해 고 밀도로 중합될 수도 있는 특정한 관능기가 포함되어 있는 마이크로전자 어레이 투과층 및 그의 제조에 관한 것이다.

배경기술

하기 상세한 설명은 본 발명에 관한 정보를 요약한 것이다. 여기에 제공된 어떠한 정보도 특허청구된 본 발명에 대한 선행 기술로서 인정되지 않으며, 또한 참고문헌으로서 구체적 또는 함축적으로 인용된 어떠한 공보도 본 발명에 대한 선행 기술로서 인정되지 않는다.

거시적 및 미시적 어레이에 대한 부착 화학(attachment chemistry) 기술은 최근 많은 주목을 받고 있다. 그러나, 분석 감도 요건이 증가함에 따라, 생체분자의 부착에서 더욱 높은 특이성을 제공할 뿐만 아니라 더욱 높은 밀도의 부착된 생체분자를 제공할 수 있는 부착 화학에 대한 요구가 또한 증가하고 있다.

공유 및 비공유 부착 화학이 상당히 개발되었으나, 전자 마이크로어레이에서 경험하는 일부 근본적인 어려움은 거의 극복하지 못하였다. 예를들면, 현재의 전자 마이크로어레이가 갖는 문제점은, 특정한 포획/검출 부위 밖에서 생체분자가 비 - 특이적으로 결합되는 것과 전자적 주소지정 전, 동안 및 후에 그러한 생체분자의 수동적 결합을 조절할 수 없다는 것이다. 이러한 문제들은 비표적 분자로부터 표적 분자를 이상적으로 구별할 수 없게 만든다. 유사하게, 현재 사용되고 있는 부착 화학은, 포획 부위에 대한 비표적 분자의 바람직하지 못한 수동적 결합 문제에 부딪히지 않으면서, 표적 분자의 다수 부위 또는 연속 부위 주소지정 동안에 사용되지 않은 포획 부위를 조작하는 것을 곤란하게 만든다.

낮은 결합 특이성 및 비표적 부위로부터 표적 부위를 구별하는 문제에 대한 해결책을 제공함에 있어서, 본 발명자들은, 마이크로어레이 상에 표적 결합 부위의 밀도를 상당히 증가시키는 방법에 의해 결합 특이성 뿐만 아니라 포획 부위에서의 표적 구별을 증진시키는, 생체분자를 부착하기 위한 부착 화학을 제공한다. 또한, 이 방법은 마이크로어레이의 전극을 사용하여 표적 결합 부위의 침착을 국소화하는 방법을 제공한다.

마이크로어레이 침착과 관련된 많은 기술들은 결합 특이성을 증진시키기 위한 차폐 기술과 관계되지만, 화학 잔기로 패

턴화하기를 원하는 표면을 전기화학적으로 처리하는 한 가지 방법이 사용되었다. 사우던(Southern)에 의한 PCT 출원 WO 93/22480호에서, 전극 격자를 용액 중에서 패터닝하고자 하는 표면에 근접하게 그리고 전해질과 직접 접촉되도록 위치시키는, 표면을 전기화학적으로 패터닝하는 방법이 개시되어 있다. 전극 격자는, 기질 표면상에서 분자의 침착, 분자의 제거 또는 분자의 화학적 변형을 일으키는 전자 전위를 제공한다. 이러한 전자 처리 과정에 따라 격자가 제거된다. 이러한 방법은 비전자 표면을 패터닝하기 위한 수단을 제공하지만, 이것은 수동적 어레이 형식에만 적용될 수 있다. 추가로, 이 방법은 단지 어레이의 초기 제조에 적용될 수 있고, 능동적인 "요구(on-demand)" 방식의 어레이에는 적용되지 않는다.

다른 기술은 침착 기술을 화학 잔기로 한다. 예를들면, 미국 특허 5,919,523호에서 선드버그(Sundberg)등은 유도체화 유리 슬라이드에 분자를 직접적으로 부착시키기 위해 전형적으로 사용되는 부착 화학을 개시하고 있다. 이러한 화학은 핵산 서열을 부착하고 합성하기 위해 고안되며, 이것의 하나의 유용한 측면은 기질 표면을 습윤성을 필요로 하는 것이다. 더욱이, 이러한 화학은, 본 발명의 전자 마이크로어레이가 본 발명의 부착 및 중합 화학 체계에 참여하는 반응성 잔기를 포함하는 다공성 투과층을 전극 위에서 필요로 한다는 점에서, 본 발명에서 사용되는 화학과는 구별된다.

상기 양쪽 예에서, 전형적인 부착 화학의 경우에서와 같이, 부착된 분자의 결합 수준은 기질 표면 상에 존재하는 반응성 잔기의 수로 제한된다. 따라서, 주요 분자를 기질에 결합시키기 위한 부착 부위가 극적으로 증가되도록, 기질 표면을 유도체화하는 방법이 일반적으로 요구되고 있다. 본 발명자들은 구체적으로 전자적 주소지정 마이크로어레이의 투과층을 포함하는 기질에 관한 방법을 알아내었다.

핵산 프로브를 사용하여 표적 분자를 혼성화하고 검출하는 기술에서 이해되는 바와 같이, 마이크로어레이의 검출 표면에 고 밀도의 포획 프로브 결합을 갖는 것이 중요하다. 종래의 표면 변형 기술에서, 포획 프로브에 결합할 수 있는 작용성 잔기를 포함하도록 표면 위의 이용가능한 기를 유도체화하였다. 포획 프로브 결합은 검출 표면 위의 유도체화 기 또는 결합 부위의 수 및 이용가능성에 의존된다. 전염성 질병 검출, 게놈 연구 등과 같은 많은 적용에서, 매우 낮은 수준의 핵산을 검출하는 능력이 필요하다. 이를 위하여, 본 발명은, 포획 프로브를 결합하기 위한 다수의 부착 잔기를 갖는 관능기의 중합체 (즉, 유도체화 생체분자)가 투과층의 표면에 있는, 신규의 표면 변형 방법을 제공한다. 이러한 이용가능한 부착 잔기는 어레이 위의 미리결정된 위치에 존재할 수도 있다. 이는 마이크로어레이 위에서 생체분자의 특이적 결합과 비특이적 결합을 더욱 잘 구별할 수 있게 한다.

발명의 요약발명의 요약

정의

여기에서 사용된 "유도체화(derivatized) 생체분자"란 시험 샘플 중의 분자 물질과 접촉하고 그의 존재를 검출하기 위해 사용되는 분자를 의미한다. 일반적으로, 이들은 적어도 부분적으로 스트렙타비딘, 바이오틴, 페닐붕산(PBA) 및 살리실히드록삼산(SHA)과 같은 화학 잔기에 부착되는 핵산, 단백질, 펩티드, 효소 및 항체와 같은 분자를 포함한다. 유도체화 생체분자는 또한 산화 리보스, 아민 말단을 함유한 올리고 뉴클레오타이드, 또는 문헌 [Hermanson, G.T. Bio conjugate Techniques copyright 1996, Academic Press, 미국 캘리포니아주 샌디에고] (여기에서 참고문헌으로 포함됨)에 의해 제시된 공지의 생체접합체 쌍의 물질, 및(또는) pRNAs와 같은 대안적인 핵산 구조물 (1999년 8월 13일 출원된 동시계류중인 출원 09/374,338호에 기재된 pRNAs 참조, 여기에서 참고문헌으로 포함됨)을 포함한다. 일반적으로, 생체분자에 화학 잔기를 부착시키는 것은 공유결합을 포함한다. 마이크로어레이에 유도체화 생체분자를 부착시키는 것에 관하여, 이러한 부착은 'A' 또는 R 잔기를 사용할 수도 있고, 공유 또는 비공유 결합을 사용할 수도 있다.

여기에서 사용된 "마이크로어레이"란, 미국 특허 5,632,957호 (여기에서 참고문헌으로 포함됨)에서와 같이 'APEX 칩'으로서 명시된 어레이와 같은 전자적 주소지정 마이크로어레이를 의미한다.

여기에서 사용된 "투과층"이란, 상기 정의된 마이크로어레이와 같은 전자적 주소지정 마이크로칩 위에서 간격을 두고 배치된 전극 어레이를 덮는 다공성 기질 코팅을 의미한다. 투과층은 임의의 수의 물질을 포함할 수도 있다. 바람직한 구현양태에서, 층은 기본 투과층 기질 내에서 공중합되거나 상부층 또는 표면층으로서 존재하는, R 잔기 형태의 생체분자 부착 잔기를 갖는 아가로스 또는 중합된 아크릴아미드 또는 메타크릴아미드 히드로겔과 같은 물질을 포함하는 기본 중합체 층을 포함한다. 이러한 잔기는 티올, 케톤, 알데히드, 말레이미드, 아민, 히드라지드, 히드라진, 메타크릴아미드 - SHA, 할로 - 아세트아미드, 브로모프로필아민, 및 브로모아세틸 - 프로필 - 메타크릴아미드 뿐만 아니라 상기 헤르만슨(Hermanson)의 문헌에 제시된 것들을 포함할 수도 있다. 투과층은 투과층 중합체 기질과 공중합되거나 그 위에 그래프팅되는 관능기를 포함하는 것으로 예상된다. 그래프팅되는 경우, 그래프팅 반응과 동일한 반응에서 기들이 중합되도록 관능기들을 중합 반응에서 그래프팅시킬 수 있거나, 또는 미리 중합된 형태로 그래프팅시킬 수도 있다. 더욱이, 가장 완전한 형태에서, 투과층은 생체분자가 부착되는 것으로 예상된다.

여기에서 사용된 "평균 형광 강도" 또는 MFI란, 검출 카메라 통합 시간을 1초로 표준화할 때, 주요 영역에 걸쳐 형광 검출 동안의 화소 계수 값의 평균을 의미한다. 값의 범위는 투과층의 구성에 따라 변하게 된다. 하나의 실험으로부터 다른 실험으로의 MFI수치는, 광 산란, 필터, 표준화 전의 통합 시간, 광 강도 및 초기 형광단 농도를 포함한 많은 요인에 기인하여, 10,000의 인수만큼 크게 변동될 수 있다. 주어진 일련의 실험내에서 서로 다른 시그널의 비교가 허용되긴 하지만, 하나의 실험으로부터 다른 실험으로 MFI 값을 직접 비교하는 것은 추천되지 않는다.

"관능기"는 화학 변환을 겪을 수 있는 임의의 화학 잔기를 의미한다.

본 발명의 구현양태는, 층의 제조 동안 공중합에 의해 또는 미리형성된 기본 투과층 위로의 그래프팅에 의해 'P-X-R'로 명시된 관능기가 투과층 내로 혼입되는, 전자적 주소지정 마이크로어레이에서 사용하기 위한 투과층 및 투과층 제조 방법을 제공한다. 이러한 관능기들은 변하기 쉽지만 구조가 간단하다. 이들은 일반적으로 별개의 기능을 수행하지만 어떤 경우에는 유사한 기능을 수행할 수도 있는 2개의 반응 중심부(즉, P 잔기 및 R 잔기)를 함유한다.

R 잔기는 유도체화 생체분자에 또는 동일한 화학식 P-X-R의 추가의 관능기에 또는 P 및(또는) R 잔기가 변형된 것 이외에는 동일한 화학식의 관능기에 결합될 수도 있다. R 잔기가 추가의 P-X-R기에 결합하는 경우, R 잔기를 추가된 기의 P 또는 R 잔기와 반응시키는 하기 기재된 용액 또는 슬러리 방법의 중합 반응을 포함한 그래프팅 방법이 제공된다. 추가의 구현양태에서, P 잔기를 첨가된 제2 기의 P 또는 R 잔기와 반응시킬 수도 있다. 첨가되는 관능기는 기본 투과층에 첨가하기 전에 이미 중합된 것일 수도 있다. R 잔기가 유도체화 생체분자에 결합되든지 또는 추가의 관능기에 결합되든지, R 잔기의 화학 구조에 기인하여 R 잔기가 직접적으로 결합될 수도 있고 (다시말해서, R 기는 "활성화"될 필요가 없다) 또는 단지 활성화된 후에만 결합하는 화학적 구조를 가질 수도 있다. 활성화는 비특이적으로 또는 특이적으로 유도될 수도 있다. 활성화가 비특이적으로 개시되는 경우, 마이크로어레이를 덮는 용액 전체에서 pH 변화를 일으킴으로써 R기가 활성화된다. 활성화가 특이적으로 개시되는 경우, 투과층 아래의 전극 위치에 상응하는 마이크로어레이상의 특정 부위 바로 위의 위치에서만 마이크로어레이를 덮는 용액의 pH 변화를 일으킴으로써 R기가 활성화된다.

P잔기는 단일 단량체로서 중합 반응에 참여하거나 또는 추가의 P-X-R의 다른 P 잔기와 함께 중합 반응에 참여하기 위한 것이다. 이들은 기본 투과층 위의 반응 중심부(즉, "A" 잔기)에 결합될 수 있거나 또는 투과층 위에 미리 혼입된 관능기의 R 잔기에 결합될 수도 있다. 이 경우에, 투과층('A' 또는 R)에 부착되는 관능기의 P 잔기가 중합체에 미리 혼입될 수 있지만 R 또는 'A'에 부착하기 위해 이용될 수도 있거나, 또는 중합 반응에 동시에 참여하면서 P 잔기를 부착할 수도 있다.

상기 언급된 R기에 결합시키는 경우에서와 같이, 중합 반응은 용액 또는 슬러리 방법으로 수행될 수도 있고, 이때 P 잔기는 'A' 또는 R 잔기 및(또는) 추가된 관능기의 P 잔기와 반응할 수도 있다. P가 'A' 또는 R 잔기에 부착되는 경우에, 이러한 반응 중심부 'A' 또는 R 잔기는 활성화될 필요가 없는 화학 잔기 또는 대안적으로 활성화를 필요로 하는 화학 잔기를 포함할 수도 있다. P가 다른 P 잔기와의 중합에 관련되는 경우에, 전체 마이크로어레이에 걸쳐 적용될 수 있는 열 및(또는) 복사선에 민감한 '중합 개시제 반응성 분자'를 사용함으로써 용액 또는 슬러리 그래프팅을 비특이적으로 개시할 수도 있다.

중합 개시 뿐만 아니라 'A' 및 R 잔기의 활성화는 상기 나타낸 R 잔기의 경우에서와 같이 특이적 또는 비특이적으로 개시될 수도 있다. 그러나, 특이적 개시에 있어서, 중합은 여러 방법으로 수행될 수도 있다. 예를들면, 하나의 구현양태에서, 열 또는 복사선에 대해서 보다는 마이크로어레이를 덮는 용액중에서 전자적으로 발생된 pH 변화에 민감한 화학개시제가 사용될 수도 있다. 다른 구현양태에서, 중합을 개시하기 위해 자외선이 사용될 수도 있으며, 이때 중합이 전극 위에서만 일어나도록 하기 위해 '직접적' 복사선 사용이 요구된다. 또 다른 구현양태에서, 특이적으로 활성화된 'A' 또는 R 잔기에 중합 P 잔기를 그래프팅함으로써, 미리결정된 부위에서 특이적으로 중합을 일으킬 수 있다.

X 잔기는 다른 화학 잔기 또는 관능기와 통상 반응하지 않는 링커 잔기로서 작용한다. 하나의 구현양태에서, X 잔기가 링커로서 작용하지만, 다른 구현양태에서는 X 잔기가 스페이서 요소로서 작용하고, 또 다른 구현양태에서는 X가 화학 결합일 수도 있다.

당업자에게 이해되는 바와 같이, 하기 기재된 각각의 'A', P, X 및 R은 유도체화 생체분자를 결합하기 위해 이용될 수 있는 고 밀도의 R 잔기를 첨가하며, 이에 의해 전자적 주소지정 마이크로어레이의 특이성 및 감수성을 증가시킨다.

투과층 기술분야의 숙련자에게 이해될 수 있듯이, 전자적 주소지정 마이크로칩의 투과층은 임의의 수의 분자 구조를 포함할 수도 있다. 바람직한 구현양태에서, 이러한 층은 일반적으로 다공성 물질을 포함한 기본 투과층을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위해 적절한 물질은 아가로스, 키토산, 아크릴아미드, 메타크릴아미드로부터 형성된 중합체, 폴리에틸렌 글리콜, 비닐 피롤리돈, 및 졸-겔과 같은 물질을 포함한다. 이러한 물질로 만들어진 기본 투과층은 전자 마이크로어레이에 몇가지 이점을 제공한다. 예를들면, 이들은 전극과 덮는 용액 사이의 절연을 제공한다. 이들은 또한 전극 표면과 덮는 용액 간의 이온 교환을 가능하게 하기 위해 적절한 다공성 기질을 제공한다. 이들은 또한, 단백질 및 핵산과 같은 여러 주요 분자를 부착하기 위한 화학 잔기 (예, 관능기)를 결합하기 위해 사용될 수도 있는 반응 중심부 'A'를 갖는 골격을 제공하고; 1999년 7월 15일 출원된 공동 계류중인 출원 번호 09/354,931호 (여기에서 참고문헌으로 포함됨)에 기재된 것과 같은 기본 투과층을 형성하기 위해 졸-겔과 같은 무기 물질이 사용될 수도 있다. 'A' 및 R 잔기를 도입하기 위하여, 이러한 다공질 유리를 실란 커플링 제와 반응시킬 수도 있다.

본 발명에 있어서, 하나의 구현양태에서, 화학식 P-X-R을 갖는 작용성 분자와 같은 주요 분자를 부착시키기 위해 기본 투과층 기질의 'A' 잔기로 명시된 반응 중심부가 제공된다. 'A' 잔기는 작용 분자와 직접적으로 반응하고, 그에 부착되어지는 구조를 가질 수 있거나, 또는 이후의 침착 화학에 참여하기 전에 활성화되어야 하는 구조를 가질 수도 있다. 하나의 바람직한 구현양태에서, 어레이 상의 활성화된 'A' 잔기가 침착 화학에 참여할 수 있도록 'A' 잔기를 비특이적으로 활성화시킬 수도 있다. 다른 바람직한 구현양태에서, 침착 화학이 특이적으로 활성화된 부위에서만 일어나도록 하기 위하여, 투과층 기질 아래에 위치한 기초 마이크로전극에 전자 전위를 제공함으로써, 'A' 잔기를 미리 결정된 부위 (즉, 포획 부위)에서 특이적으로 활성화시킬 수도 있다. 'A' 잔기의 특이적 및 비특이적 활성화 양쪽 모두에서, 투과층을 덮는 용액이 (비특이적 활성화의 경우에는 전체 어레이에 걸쳐, 그리고 특이적 활성화의 경우에는 포획 부위에서만) 'A' 잔기의 활성화에 유리한 pH 조건의 변화를 경험하도록 의도된다. 비특이적 활성화의 경우에, 용액 함량을 바꿈으로써 pH 변화가 일어나는 반면, 특이적 활성화의 경우에는 포획 부위에 제공된 전자 전위에 의해 pH 변화가 일어난다.

다른 구현양태에서는, 기본 투과층의 형성 동안에 'A' 잔기를 화학식 P-X-R의 관능기와 반응시킬 수도 있고, 이때 투과층의 형성 후에 추가의 침착 화학에서 이용가능한 'A' 잔기 대신에 P-X-R 잔기가 그 위에서 유도체화된다. 이러한 구현양태에서, P 잔기가 투과층 기본에 부착되고, R 잔기가 추가의 침착 화학에서 이용될 수 있다. 이 구현양태의 하나의 측면에서, R 잔기는 유도체화된 생체 분자 또는 추가의 관능기와 직접적으로 반응하기 위한 구조를 가질 수 있다. 이 구현양태의 다른 측면에서, R 잔기는, 생체분자 및 관능기의 침착 화학에 참여하기 전에 활성화되는 것이 필요한 구조를 가질 수도 있다. 하기 기재된 바와 같이, 하나의 경우에, 생체분자에 부착된 유도체 잔기는 P-X-R 관능기로 간주될 수도 있다. 'A' 잔기에서와 같이, 활성화가 필요한 경우에는 활성화가 특이적 또는 비특이적으로 개시될 수도 있다.

다른 구현양태에서, 침착 화학은, 미리 중합된 상태에서 또는 중합 반응에서, 화학식 P-X-R을 갖는 관능기를 투과층 위에 위치한 'A' 또는 R 잔기에 용액 또는 슬러리 그래프팅하는 것과 연관된다. 첨가된 기가 미리 중합되든지, 또는 그래프팅 과정 동안에 중합되든지 간에, 첨가되는 관능기의 P 잔기와 'A' 또는 R 기 사이에서 그래프팅이 일어난다. 상기 언급된 바와 같이, 'A' 또는 R과 P 사이의 결합은 각각의 화학 구성에 의존하여 'A' 또는 R의 활성화를 필요로 할 수도 있다. 활성화가 필요한 경우, 이러한 활성화는 특이적으로 또는 비특이적으로 개시될 수도 있다. 비특이적 활성화는 마이크로어레이를 덮는 용액중에서 높거나 낮은 pH 변화에 의해 수행될 수도 있다. 특정 포획 부위에서의 pH 변화를 유도하기 위하여 그 부위의 전극을 편향시킴으로써 특이적 활성화가 개시될 수도 있다.

필요하다면, 'A' 또는 R의 활성화와 동시에, 또는 활성화가 필요하지 않은 경우에, 본 발명의 슬러리 또는 용액 방법을 사용하여 'A' 및(또는) R 잔기에 관능기를 그래프팅하는 것을 개시할 수도 있다. 'A' 또는 R 기가 활성화를 필요로 할 수도 있기 때문에, 그래프팅을 특이적 또는 비특이적 방식으로 수행할 수도 있다. 추가로, 그래프팅은 미리 중합된 P-X-R 기질의 그래프팅을 포함할 수도 있거나, 또는 그래프팅과 동시에 관능기를 중합할 수도 있다. 중합이 그래프팅화 동안에 일어나는 경우, 열 또는 복사선에 의해 활성화되는 화학 중합 개시제가 바람직하다. 이는 다양한 그래프팅 방법이 특정 방식으로 수행되도록 한다. 다시말해서, 어레이 위의 특정 위치에서 관능기를 그래프팅하기 위하여, 활성화를 필요로 하는 'A' 또는 R을 특이적으로 활성화시켜 슬러리 또는 용액 그래프팅 반응으로 중합가능한 관능기와 반응되도록 할 수도 있다.

슬러리 그래프팅 방법에서, 관능기를 개시제 분자와 집중된 형태로 어레이 위에 적층시킨다. 적절한 반응 조건하에서, 개시제와 작용 분자의 P 잔기를 반응시켜 투과 기본층에 결합된 작용 분자의 중합체를 형성한다. 용액 그래프팅 방법에서, 개시제 분자 및 작용 분자를 가용성 혼합물로 어레이 위에 적층시킨다. 어느 하나의 경우에, 관능기의 고 밀도 그래프팅이 발생하여 고 밀도 생체분자 부착 부위를 제공한다. 그래프팅은, 포획 부위에 집중된 중합을 위해 전자 편향을 사용하여 특이적으로 수행될 수도 있거나, 또는 전체 어레이 위에서 비특이적으로 수행될 수도 있다.

다른 구현양태에서, 본 발명은 유도체화 생체분자를 마이크로어레이에 부착시킨다. 앞서 언급된 바와 같이, 이러한 분자의 부착은 R 잔기를 통해 일어난다. 어느 하나의 경우에, 부착은 사용된 화학에 의존하여 공유 결합 또는 비공유 결합을 포함할 수도 있다. 관능기는 일반적으로 다수로 첨가되는 것으로 예상되기 때문에, 어레이에 생체분자를 부착시키는 능력은 매우 고 밀도로 급격히 증가한다.

다른 구현양태에서, 투과층의 'A' 또는 R은 pH 불안정한 (높거나 낮은 pH) 티오에스테르 잔기를 포함한다. 이 구현양태에서, P-X-R 관능기 또는 유도체화 생체분자의 결합이 가능하도록 미리 결정된 포획 부위에서 티오에스테르를 활성화시키기 위하여, 특정한 전자적 주소지정 포획 부위를 양성으로 또는 음성으로 편향시킬 수 있다.

투과층 골격 위의 'A' 잔기에 관하여, 일반적으로 'A'는 추가의 관능기를 결합하기 위해 사용될 수도 있는 반응 중심부

를 포함한다. 이것은 자유 라디칼 반응으로 반응하는데 민감한 탄소원자를 중합체 백본(backbone)에 포함할 수도 있거나, 또는 직접적으로 반응하거나 증감화(즉, 활성화)후에 활성화되어지는 3급 탄소와 같은 중합체 백본에 부착된 화학 잔기를 포함할 수도 있다. 당업자에게 이해되는 바와 같이, 생체분자를 함께 결합하기 위해 사용되는 공지된 생체접합체 쌍 (상기 Hermanson의 문헌)이 'A'의 정의에 포함된다.

또 다른 구현양태에서, 투과층의 'A' 또는 R은, 특정한 포획 부위에서 유도체화 생체분자 또는 P-X-R 관능기의 부착을 위한 알데히드 관능기를 얻기 위하여, 산성 용액 또는 전자 편향을 사용하여 가수분해될 수도 있는 아세탈 잔기를 포함한다. 이 측면의 바람직한 구현양태에서, 유도체화 생체분자 또는 관능기와의 반응을 위해 사용될 수도 있는 알데히드기를 제공하기 위하여, 용액 중의 물이 산화되어 아세탈기의 산성 가수분해를 위한 낮은 pH를 발생하도록 포획 부위를 전자 편향시킨다.

또 다른 바람직한 구현양태에서, 그래프팅 중합된 관능기는 투과층 팽윤과 관련된 선행기술의 문제점을 극복한다. 또 다른 구현양태에서, 반응성 잔기의 전자 활성화를 사용하여 결합되거나 또는 비전자 활성화를 사용하여 결합되거나, 중합된 관능기를 사용하면 비중합 기술에 비해 배경 형광성이 저하된다. 본 발명의 방법은, 가스를 낮은 압력에서 전기 방전에 노출시키는 플라스마 그래프팅을 포함한, 다른 그래프팅 방법의 사용을 의도한다. 이어서 이온화된 가스가 그래프팅 및 방출 중합체 상으로의 단량체 중합을 개시시켰다 (더욱 상세한 사항은 문헌 [O'dian, G. Principles of Polymerization 제3판, Copyright 1991, John Wiley and Sons, New York, NY; p232] 및 여기에서 참고문헌으로서 포함된 참고문헌을 참조한다).

또 다른 구현양태에서, 본 발명의 방법은 어레이 상에 고 밀도 생체분자를 부착하는 것을 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1A 및 1B는 어레이 표면에 말레이미드의 부착 후에 프로브 부착 밀도 결과를 나타낸다. 도 1A는 광현미경 사진이며, 여기에서 컬럼 2 및 4는 특이적 결합에 대한 복사이고 컬럼 3 및 5는 비특이적 결합에 대한 복사이다. 컬럼 1은 표지화 프로브가 주소지정되지 않은 제로 결합 대조군이다. 도 1B는 MFI/s로 특이적 및 비특이적 결합 간의 상대적 차이를 나타내는 막대 그래프이다. 이 수준은 1×10^7 결합 밀도에 상응한다.

도 2는 브로모 - 아세토프로필 메타크릴아미드 부착층을 갖는 기본 투과층 (30% 9:1 아크릴아미드/N,N' - 메틸렌 비스 아크릴아미드 비율)을 프로브로 주소지정한 실험결과를 나타내는 막대 그래프이다. 프로브 올리고는 500nm로 존재하고, β - 알라닌은 50mM로 존재하였다. 주소지정 시간은 30초이고, 검출 전에 어레이를 0.2x STE 및 1% SDS로 세척하였다.

도 3A 및 3B는 아크릴레이트 에스테르를 테터드(tethered) 아민 또는 아민 에스테르와 중합한 후의 프로브 부착 밀도 결과를 나타낸다. 도 3A는 광현미경 사진이며, 여기에서 컬럼 1 및 3은 특이적 결합의 복사이고 컬럼 2 및 4는 비특이적 결합의 복사이다. 도 3B는 특이적 및 비특이적 결합의 상대 강도를 나타낸다. 열1에서부터 열5로 증가하는 빛 강도 구배에 기인하여, 강도도 열1에서부터 5로 증가한다.

도 4는 슬러리 그래프팅 기술을 사용한 그래프팅 실험 결과를 나타낸 막대 그래프이다. 그래프는 프로브/패드의 밀도 대 부착층 화합물의 여러 조합의 사용을 나타낸다.

도 5는 여러 플라스마 그래프팅 조건을 사용한 플라스마 그래프팅 방법 후에 프로브의 수동적 부착을 나타낸 막대 그래프이다.

도 6은 플라스마 그래프팅 방법 후의 프로브의 전자 부착을 나타내는 막대 그래프이다. 그래프는 각종 주소지정 조건하에서 프로브 결합 수준을 나타낸다.

도 7은, 높거나 낮은 pH에 의한 티오에스테르 절단이 활성화된 티올기를 생성하고, 이는 다시 생체분자의 부착을 위해 화학 잔기에 결합되거나 또는 중합체의 부착을 위해 화학 잔기에 결합될 수 있음을 나타내는 도식이다.

도 8은, 관능기 부착을 돕기 위하여 전자적으로 발생된 pH 변화 이후에, 포획 부위에서 표지화된 DNA 올리고머의 검출 또는 그의 소실을 나타내는 막대 그래프이다. 그래프는 3개의 상이한 완충액을 사용하여 200, 400 및 600nA에서 1분간 편향시킨 후의 부착 결과를 나타낸다. 사용된 완충액은 0.1M NaPO₄/트리에틸아민, pH6.8; 모르폴리노 에탄 술폰산; 및 아세트산나트륨이었다.

도 9는, 포획 부위(마이크로워치)에서 티오에스테르의 특이적 활성화 후에 이러한 포획 부위에서만 생체분자를 특이적으로 결합하고 비포획 부위 위치에서는 반응되지 않은 기를 캡형성하는 것을 나타내는 개략도이다. 이 도면에서, 침착 화학은, 고 밀도 생체분자 부착을 달성하기 위하여 비전자 침착 및 특이적 전자 편향을 둘다 사용하는 것을 포함하였다.

도 10은, 아세탈 반응 중심부를 사용하는 상이한 부착 반응 체계를 위한 3개의 반응 순서를 나타낸다.

도 11은, 아세탈기를 함유하는 특정한 포획 부위가 활성화되어진 구현양태로부터의 결과를 나타내는 막대 그래프이다 (도 10의 반응식 1).

도 12는, 특정한 포획 부위가 활성화되어진 구현양태로부터의 결과를 나타내는 막대 그래프이다 (도 10의 반응식 2).

도 13 내지 도 16은 표지화 프로브의 특이적 활성화 및 결합의 여러 결과를 나타내는 광현미경 사진이다 (도 10의 반응식 3). 도 13은 전자적으로 탈보호된 패드 위로의 수동적 부착을 구체적으로 나타낸다. 도 14는 아세탈을 알데히드로 충분히 탈보호시키기 위해 필요한 전자 조건을 나타낸다. 도 15 및 도 16은 탈보호된 아세탈 잔기 위에 표지화된 포획 분자의 특이적 및 비특이적 부착을 나타낸다.

도 17A 및 B는 SHA 메타크릴아미드 유도체의 용액 그래프팅 후에 프로브 부착 밀도 결과를 나타낸다. 도 17A는 광현미경 사진이고, 여기에서 컬럼 3은 특이적 결합의 복사이고 컬럼 1 및 5는 비특이적 결합의 복사이다. 도 17B는 특이적 및 비특이적 결합의 상대 강도를 나타낸다.

도 18은 P, X 및 R 잔기의 예를 나타낸다. 이들은 혼합될 수도 있고 임의의 조합으로 조화될 수도 있다.

도 19 및 도 20은 투과층에 P-X-R기를 첨가하는 여러 변경의 개략도를 나타낸다. 도 20은 도 19에 비해 화학구조를 더욱 상세히 나타낸다.

도 21은, 메타크릴아미드가 P이고 X가 화학 결합이고 R이 SHA인, 화학식 P-X-R의 관능기의 부착 화학의 한가지 형태를 나타낸다. SHA 잔기는 PBA 표지된 올리고머 생체분자에 부착된다.

도 22A는, 개시제 AIBN을 용액으로부터 기본층 위에 침전시키고 메타크릴아미드 단량체를 포함한 관능기를 공-침전시키며, 또한 표면 위에서 용액 중에 부분적으로 유지시키는, 슬러리 그래프팅의 개략도를 나타낸다. 반응성 자유 라디칼을 형성하는 AIBN을 반응시키기 위해 열 또는 UV선을 사용한다. 자유 라디칼은, 중합체를 위한 부착 부위를 제공하는 기본 투과층 기질로부터 수소를 제거한다.

도 22B는 도 22A에 나타난 방법을 위한 화학 메카니즘의 세부사항을 나타낸다.

도 23은, 친핵 히드라지드 변형된 기본 투과층을 아크릴로일-NHS 에스테르, 강한 친전자체에 노출시키는, 본 발명의 구현양태를 나타낸다. 반응시에, 아크릴로일 기가 투과층에 고정되고 중합된다.

도 24A 및 B는 선행 기술에 기재된 방법과 같은 브로모아세트아미드 결합을 통한 SHA 부착 후에 프로브 부착 밀도 결과를 나타낸다. 도 24A는 광현미경사진이고, 여기에서 컬럼 1 및 3은 특이적 결합이고, 컬럼 2 및 4는 비특이적 결합이다. 컬럼 5는 주소지정되지 않았다. 도 24B는 특이적 및 비특이적 결합의 상대 강도를 나타낸다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 구현양태에 따르면, 투과층이 고 밀도의 유도체화 생체분자를 부착하기 위한 관능기를 포함하는, 투과층 코팅된 전자 마이크로어레이 및 이러한 마이크로어레이의 제조 방법이 제공된다. 이러한 어레이의 제조에 있어서, 관능기는, 기들이 여러 방식으로 투과층 위에 혼입되어지도록 간단하지만 변경가능한 화학식을 갖는 화학 잔기를 포함한다.

관능기는 화학식 P-X-R을 갖는다.

상기 식에서, P는 반응시키고자 하는 잔기의 성질에 의존하여 변할 수 있는 구조의 화학 잔기를 포함한다. P와 반응되는 것이 바람직한 잔기와는 무관하게, P잔기는 항상, 중합 반응에서 다른 P 반응성 중심부에 대한 결합, 및(또는) 투과층 기질의 'A'로 명시된 반응 중심부에 대한 결합, 및(또는) 다른 관능기의 R 잔기에 대한 결합에 참여할 수도 있는 반응 중심부를 포함한다. P 잔기가 다른 P 잔기 반응 중심부에 결합되는 것을 원하거나 반응 중심부 'A'에 결합되는 것을 원하는 경우, P는, 산소에 이중결합되고 다른 산소, 질소, 황, 할로젠 또는 탄소에 단일 결합되는 탄소에 이중결합이 직접적으로 부착되어 있는 치환 또는 비치환 α, β -불포화 카르보닐; 산소, 질소, 할로젠, 인 또는 황에 이중결합이 단독으로 결합되어 있는 비닐; 산소, 질소, 할로젠, 인 또는 황에 결합된 탄소에 이중 결합이 단독으로 결합되어 있는 알릴; 다른 탄소에 단독으로 결합되고 이어서 산소, 질소, 할로젠, 인 또는 황에 단독으로 결합된 탄소에 이중결합이 단독으로 결합되어 있는 호모알릴; 삼중 결합이 2개의 탄소 원자들 사이에 존재하는 알키닐 잔기를 포함하지만, 이에 한정되는 것이 아닌 알케닐 잔기들로 구성된 군으로부터 선택된다. P 잔기를 R 잔기에 결합시키고자 할 때, P는 치환 또는 비치환 α, β -불포화 카르보닐, 비닐, 알릴 및 호모알릴 기와 알킨으로 구성된 군으로부터 선택된다. 이 구현양태 내에서, P는 아세탈, 에폭시드, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 할로-아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민; 뿐만 아니라 상기 언급된 헤르만슨(Hermanson)등의 문헌에 기재된 것들로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 선택된 P 잔기 및 사용된 반응 조건에 의존하여, P의 반응 중심부는 중합 및(또는) 커플링 반응에 참여하도록 반응성이 될 수도 있다. 하기 실시예에 언급된 바와 같이, 중합 조건은 슬러리 그래프팅 방법 또는 용액 그래프팅 방법의 사용을 포함할 수 있다. 바람직한 구현양태에서, P 잔기는 중합 반응에 참여하는 구조를 가지며, 기질 백본 자체의 성질에 기인하여 ('A'의 경우), 또는 제조 또는 이전의 그래프팅 동안 층으로 공중합되어진 관능기에 기인하여 (R의 경우), 투과 기질내에 미리 혼입되어진 'A' 또는 R 잔기에 결합되어진다.

X는 화학 결합, 탄소수 1-10의 알킬, 탄소수 2-10의 알케닐, 알킬 에스테르, 케톤, 아마이드, 티오에스테르, 알킬 에테르, 아마이드기, 카르보닐 및(또는)는 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 잔기이다.

여기에서 사용된 알킬은 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 네오펜틸, t-펜틸 등과 같은 직쇄 및 분지쇄 탄화수소 잔기를 나타낸다. 이러한 알킬은 히드록시, 옥소, 아미노, 티오, 시아노, 니트로, 술폰 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 각종 치환기로 치환될 수도 있다. 알케닐은 하나 이상의 탄소-탄소 결합이 이중 결합이고 비-이중결합된 탄소가 알킬 또는 치환된 알킬인 탄화수소를 나타낸다. 알케닐 탄화수소기는 직쇄일 수도 있거나 하나 이상의 분지를 가질 수도 있다. 아미노는, 2개의 수소 원자, 알킬 잔기 및 이들의 조합에 결합된 질소 원자를 포함한 잔기를 말한다. 아마이드는, 산소 원자에 이중 결합되고 아미노 잔기에 단일 결합된 탄소 원자를 포함한 잔기를 말한다.

R은 공유결합 또는 비-공유결합으로 생체분자를 부착하거나 P-X-R기에 결합하기 위한 화학 잔기이다. R을 P-X-R 관능기에 결합시키고자 하는 경우, R은 화학결합, 비닐, 알릴, 호모알릴, 아세탈, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 할로-아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민; 뿐만 아니라 상기 헤르만슨(Hermanson)의 문헌에 기재된 것들로 구성된 군으로부터 선택될 수도 있다. R을 유도체화 생체분자에 부착시키고자 하는 경우, R은 화학 결합, 스트렙타비딘, 스트렙타비딘의 일부, 바이오틴, 페닐 봉산, 살리실릭 히드록삼산, 디설파이드, 티오에스테르, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 히드라지드, 히드라진, 아민, 아세탈, 케톤, 알데히드, 디알데히드, 브로모- 또는 요오도-아세트아미드, 및 에스테르 뿐만 아니라 상

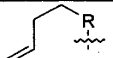
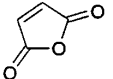
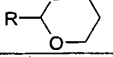
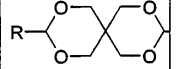
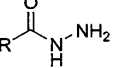
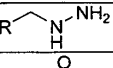
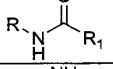
기 헤르만슨(Hermanson)의 문헌에 기재된 것으로 구성된 군으로부터 선택될 수도 있다. R이 생체분자에 부착되든지 또는 관능기에 부착되는지 간에, 선택된 R에 대한 특정한 잔기에 의존하여, R 잔기는 직접적으로 반응할 수도 있거나 또는 부착이 일어나기 전에 활성화를 먼저 필요로 할 수도 있다.

투과층 중합체 백본 위의 'A' 잔기에 관하여, 일반적으로, 'A'는 자유 라디칼 반응에서의 반응에 민감한 탄소 원자를 중합체 백본내에 포함한 반응 중심부를 포함하거나, 또는 직접적으로 반응하거나 또는 증감화 (즉, 활성화) 후에 활성화되어지는 중합체 백본에 부착된 화학 잔기, 예컨대 3급 탄소 또는 아세탈을 포함하며, 이때 활성화는 일반적으로 P 잔기와와의 추가의 반응에 참여하는 중을 형성하는 것을 포함한다. 각각의 P, X 및 R에 대하여, 그 예를 도 18 및 표 I에 나 타낸다.

< 표 I >

부착 반응식에 포함되는 관능 잔기의 일부 리스트

구조	관능기 또는 화학명	카테고리
	아크릴레이트 에스테르	α,β -불포화 카르보닐 또는 에스테르
	아크릴 산	α,β -불포화 카르보닐 또는 산
	아크릴아미드	α,β -불포화 카르보닐 또는 아미드
	단치환 아크릴아미드	α,β -불포화 카르보닐 또는 아미드
	이치환 아크릴아미드	α,β -불포화 카르보닐 또는 아미드
 R = C, N, O, P, S	비닐	알켄

구조	관능기 또는 화학명	카테고리
 $R = C, N, O, P, S$	알릴	알켄
 $R = C, N, O, P, S$	호모알릴	알켄
	시클릭 무수물	α, β -불포화 카르보닐
	티올	티올
	포스포로티올레이트	포스포로티올레이트
	아세탈 단량체	아세탈
	아세탈 이량체	아세탈
	케톤	카르보닐
	알데하이드	카르보닐
	히드라지드	히드라지드
	히드라진	히드라진
	아미드	아미드
	1차 아민	아민
	치환 아민	아민

구조	관능기 또는 화학명	카테고리
	에스테르	에스테르
	브로모- 또는 요오드- 아세트아미드	할로아세트아미드
	티오에스테르	티오에스테르
	디설파이드	디설파이드
	(술포네이트)-N- 히드록시 숙신아미드 에스테르	에스테르
	에테르	에테르
	7개의 탄소로된 알킬쇄	알킬쇄
	에폭시드	에폭시드

관능기와 유도체화 생체분자를 부착시키는 화학은 선택된 각각의 잔기의 특성에 따라 변할 수 있다. 일부 경우에, 'A' 또는 R을 반응시키고 P 또는 유도체화 생체분자에 결합하는데 참여하도록 하기 위하여, 결합이 일어나는 잔기와 직접적으로 접촉시키는 것이 필요하다. 예를들면, 'A' 또는 R이 에스테르를 포함한다면, 유도체화 생체분자는 단지 히드라지드 잔기를 포함하는 것을 필요로 한다. 결합을 위해 활성화를 필요로 하지 않는 잔기는 알데히드, 케톤, 아민, 히드라진, 히드라지드, 할로아세트아미드, 티올, 포스포리티올레이트 모노에스테르 및 에스테르를 포함한다. 이들 각각은 표 II에 나타난 하기 조합으로 반응에서 쌍을 이룰 수도 있다.

< 표 II >

[표 1]

'A' 또는 R 성분	P 또는 생체분자의 유도체와 결합된 잔기
알데히드, 케톤, 에스테르	아민, 히드라지드, 히드라진
요오도 또는 브로모아세트아미드	티올 포스포리티올레이트 모노에스테르
살리실릭 히드록삼산	페닐 봉산
스트렙타비딘	바이오틴

다른 경우에, 결합 또는 부착이 일어나기 위해서는 'A', R, P, 또는 생체분자의 유도체화 부분이 활성화되어야 한다. 이 경우에, 화학 잔기는 디설파이드, 티오에스테르, 3급 탄소, 알켄, 알킬 에테르, 아세탈 및 카르복실산 중 어느 것을 포함할 수도 있다. 활성화를 필요로 하는 이러한 잔기는 하기 표 III에 나타난 것과 같이 쌍을 이룰 수도 있다.

< 표 III >

[표 2]

'A' 또는 R 성분	P 또는 생체분자의 유도체와 결합된 잔기
아세탈	아민, 히드라지드, 히드라진
티오에스테르, 디술파이드	할로 - 아세트아미드
알켄	알켄, 3급 알칸
3급 탄소	알켄
알킬 에테르	알켄
카르복실산	아민, 히드라지드, 히드라진
에폭시드	알콜

미리 활성화하는 것을 필요로 하는 잔기 ('A', R, P 또는 유도체화 생체분자)를 사용하여 부착을 수행하던지 그렇지 않던지 간에, 부착은 공유 결합 또는 비공유 결합을 포함할 수도 있다. 관능기 또는 유도체화 분자의 부착을 위해 활성화가 필요하는 않은 경우, 전체 마이크로어레이의 투과층 위에 존재하는 반응성 잔기를 부착 반응에 참여시킨다. 이것은 어레이의 임의의 부분 위에 생체분자를 추가로 부착하기 위해 관능기의 R 잔기를 고 밀도로 혼입시킨다.

부착을 위해 활성화가 일어나는 것이 필요한 경우, 잔기는 특이적으로 또는 비특이적으로 활성화될 수도 있다. 비특이적 활성화는 일반적으로, 전체 마이크로어레이의 투과층 위에 존재하는 활성화를 필요로 하는 잔기를 활성화시킨다. 다른 한편, 특이적 활성화는 어레이 위에 존재하는 활성화를 필요로 하는 선택된 잔기 만을 활성화시킨다. 바람직한 구현양태에서, 어레이의 미리 선택된 전극에 전자 전위 (양성 또는 음성)를 적용함으로써 특이적 활성화가 수행되고, 그 결과 발생된 전하는 전극의 위에서 직접적으로 용액, 예컨대 마이크로어레이를 덮는 용액의 pH에 직접적인 영향을 미친다. 이러한 방식으로, 활성화를 필요로 하는 잔기 (A 또는 R)가 화학 변형되고, 예를들어 P의 반응 중심부, R 또는 유도체화 생체분자와 같은 잔기에 부착하기 위해 이용될 수 있게 된다. 이러한 특이적 활성화는, 어레이의 특이적 포획 부위가 "요구(on-demand)" 기초 위에서 생체분자를 위한 고 밀도의 결합 능력을 제공할 수도 있다는 점에서, 고도의 가변성을 본 발명에 제공한다.

본 발명의 부착 화학은 또한, 이러한 그래프팅 방법과 함께 상기 기재된 여러 부착 화학을 사용하여 관능기를 투과층 위에 혼입시키는, 신규의 그래프팅 방법을 포함한다. 하나의 구현양태에서, 그래프팅은 슬러리 방법으로 수행된다. 다른 구현양태에서, 그래프팅은 용액 방법으로 수행된다. 슬러리 방법에 의하건 용액 방법에 의하건 간에, 관능기들은 전체 어레이에 걸쳐 또는 단지 미리 선택된 위치에서만 혼입될 수도 있다. 전체 어레이에 걸쳐 부착시키고자 하는 구현양태에 있어서, 일반적으로, 'A' 및(또는) R 잔기는 이전의 활성화를 필요로 할 수도 있거나 그렇지 않을 수도 있다. 단지 미리 선택된 위치에서만 부착시키고자 하는 구현양태에 있어서, 일반적으로 'A' 및(또는) R 잔기는 부착 이전에 활성화될 필요가 있다.

또한, 본 발명의 그래프팅 방법에서 사용되는 부착 화학은, 미리 중합된 관능기의 사용 또는 부착 동안에 관능기의 중합을 가능하게 하는 반응 조건의 사용을 이용한다. 어느 하나의 경우에, 그래프팅은, 관능기가 'A' 또는 R 잔기를 갖는 미리형성된 기본 투과층에 부착되는 것을 내포하며, 이때 'A' 잔기는 투과층의 반응 중심부이고, R 잔기는 각각의 P-X-R 관능기의 '공중합'으로부터 존재하거나, 또는 관능기의 이전의 그래프팅으로부터 각각의 P-X-R기, 미리 중합된 P-X-R기, 또는 그래프팅과 동시에 중합된 P-X-R기의 형태로 존재한다.

상이한 화학 구조를 갖는 단량체들의 기를 중합함으로써 마이크로어레이 위에 투과층을 형성하는 동안에 관능기가 부착되는 것을 '공중합'이라 명시한다. 이 구현양태에서, P의 반응 중심부는 마이크로어레이 위에 투과층을 형성하는 동안 투과층 중합체의 반응 중심부에 부착되어진다. 반응성 P는 중합된 관능기내에 이미 혼입될 수도 있거나, 또는 이것이 투과층 기질에 부착될 때 관능기의 동시 중합에 참여할 수도 있다. 일반적으로, 공중합을 통한 부착은 비특이적 부착 화

학을 사용하고, 투과층 내에 혼입되는 관능기들은 전체 어레이에 걸쳐 부착된다.

미리형성된 투과층 상에 관능기를 부착하는 것을 '그래프팅'이라 명시한다. 하나의 바람직한 구현양태에서, 그래프팅은 슬러리 그래프팅을 사용하여 수행된다. 이 방법에서, 화학식 P-X-R을 갖는 관능기들은, 반응을 유발할 때 (1) 투과층의 반응 중심부(즉, 'A' 또는 R)와 P 잔기의 반응 중심부 사이의 결합 및 (2) P 잔기 위의 반응 중심부를 통한 관능기의 중합을 개시시키는 개시제 분자와 함께, 농축된 슬러리로 투과층과 접촉된다. 관능기가 미리 중합되는 경우, 그래프팅 방법은 주로 투과층에 미리 중합된 기를 부착하는 것이다. 슬러리 그래프팅 방법의 상세한 것을 하기 실시예 2에 나타낸다. 이 방법의 바람직한 구현양태에서, 관능기 및 개시제는 단지 부분적으로 용액 상태이다.

다른 바람직한 구현양태에서, 용액 그래프팅을 사용하여 그래프팅을 수행할 수도 있다. 이 방법에서, 화학식 P-X-R을 갖는 관능기를, 반응을 유발할 때 (1) 투과층의 반응 중심부(즉, 'A' 또는 R)와 P 잔기의 반응 중심부 사이의 결합 및 (2) P 잔기 위의 반응 중심부를 통한 관능기의 중합을 개시시키는 개시제 분자와 함께, 용액중에서 투과층과 접촉시킨다. 관능기가 미리 중합된 경우, 그래프팅 방법은 주로 투과층에 미리 중합된 기를 부착하는 것에 관한 것이다. 용액 그래프팅 방법의 상세한 것을 하기 실시예 3에 나타낸다. 이 방법의 바람직한 구현양태에서, 관능기 및 개시제는 용액중에 완전히 용해된다.

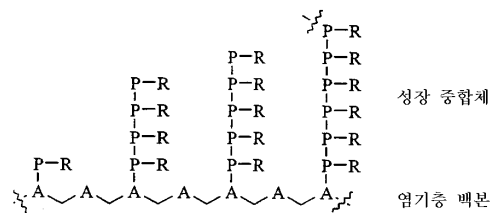
슬러리 그래프팅이 사용되든지 또는 용액 그래프팅 사용되든지, 본 발명의 방법은 비특이적 또는 특이적 방식으로 그래프팅을 가변적으로 수행할 수 있도록 한다. 비특이적 방식이 사용되는 경우, 'A' 및(또는) R 잔기는 활성화를 필요로 하는 잔기를 포함할 수도 있다. 활성화를 필요로 하는 잔기를 위하여, 덮는 용액의 pH 조건을 변화시킴으로써 전체 어레이에 걸쳐 그래프팅을 적용할 수 있다. 그래프팅 동안에 특이적 활성화를 의도하는 경우, 개시제 및 관능기의 사용과 함께 활성화를 필요로 하는 'A' 및(또는) R 잔기를 사용함으로써, 그래프팅이 마이크로어레이의 전극 위에서만 발생하도록 할 수도 있다. 도 19 및 20은 생체분자를 부착하기 위해 다수의 R 잔기를 결합하는 여러 형태를 나타낸다. 도 20은 투과층의 화학 구조를 더욱 상세히 나타낸다. 도 19는 첨가된 P-X-R 기의 여러 변형을 나타낸다. "A"에서, P-X-R기는 투과층에 대해 그래프팅 반응으로 중합되어진다. 그래프팅은 비특이적 또는 특이적일 수도 있다. 도표는 투과층의 일부 반응 중심부가 그래프팅되지 않을 수 있다는 점에서 특이적임을 나타낸다. 이러한 그래프팅이 일단 일어나면, 활성화를 필요로 하지 않는 R 잔기가 존재하는 경우, 유도체화 생체분자가 활성화 없이 직접적으로 부착될 수도 있고, 또는 활성화를 필요로 하는 R 잔기가 존재하는 경우 "C" 및 "D"에 나타난 바와 같이 비특이적 또는 특이적 방식으로 생체분자를 부착하기 위해 R 잔기를 더욱 활성화할 수도 있다. "B"에서, P-X-R기는 각각 투과층내에 공중합되는 것으로 나타나며, 그 후에 이들은 상기 나타난 바와 같이 유도체화 생체분자에 직접적으로 부착될 수도 있거나, 또는 적절한 R 잔기가 존재하는 것으로 가정할 때, 추가의 P-X-R기 또는 유도체화 생체분자의 부착을 위해 비특이적 또는 특이적 방식으로 활성화된다.

공유 결합을 달성하기 위해 그래프팅 단량체를 부착하는 것은 다수의 방법에 의해 개시될 수도 있다. 예를들면, 그래프팅은 개시제의 열 분해 (예, AIBN, 벤조일 퍼옥사이드), 개시제의 광분해 (예, 50% 2,4,6-트리메틸벤조일-디페닐포스핀옥사이드와 50% 2-히드록시-2-메틸-1-페닐-프로판-1-온의 혼합물 (다라쿠르(Daracur) 4265, 시바-스페셜리티 케미칼스 컴퍼니(Ciba-Speciality Chemicals C); 미국 뉴욕주 태리타운) (이하, D4265라 언급함)의 UV 개시), 산화환원 반응 (예, 황산세륨(IV)), 이온화 복사선 (예, α , β , γ 또는 X-선), 플라스마 개시반응 (예, 아르곤, 질소, 산소), 또는 전류를 사용하여 미리선택된 부위 위에서만 그래프팅이 일어나도록 하는, 과염산테트라부틸암모늄을 사용한 전해 개시 반응 [Samal, S.K.; Nayak, B. J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 1988, 21, 1035] (여기에서 참고문헌으로 인용됨)을 사용할 수도 있다. 또한, 반응 이전에 활성화되어야 하는 화학 잔기를 사용함으로써, 그래프팅이 어레이의 미리 결정된 위치에 직접적으로 일어날 수도 있다.

또 다른 구현양태에서, 중합 및 그래프팅을 개시하기 위해 사용되는 개시제의 특성을 사용함으로써 또는 전기화학적 활성화에 의해 부착 특이성이 발생할 수도 있다. 일반적으로, 개시제는 열 또는 복사선과의 접촉에 의해 반응성이 되도록 유도된다. 이러한 구현양태에서, 활성화를 필요로 하는 'A' 또는 R 잔기와 함께이든지 아니든지, 어레이의 미리선택된 위치에 대해서만 복사선의 접촉을 차단시킴으로써, 슬러리 또는 용액 방법을 사용한 그래프팅이 어레이 위의 미리결정된 위치에 특이적으로 일어날 수도 있다. 특이적 활성화의 다른 방법은 전기화학적 구조의 개시제내에 자유 라디칼을 발생시키는 조건하에서 전극을 편향시키는 것이다.

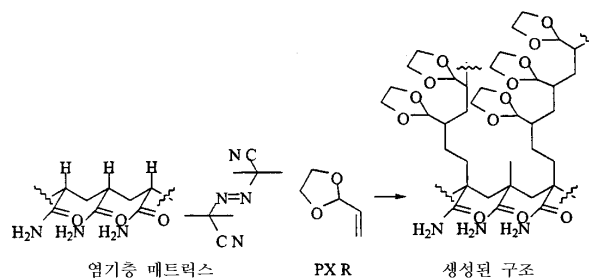
본 발명의 측면들을 더욱 명료히 하기 위하여, 부착 화학의 여러 측면에 관한 설명을 하기에 상세히 나타낸다.

하나의 구현양태에서, 중합 그래프팅 반응에서 관능기 P-X-R이 투과층의 'A'에 부착된다. 이는 다음과 같이 도식으로 나타낼 수 있고, 여기에서 X는 화학 결합이다.

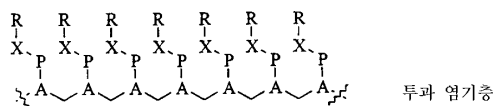


이 도식의 화학 반응의 예는 다음과 같다:

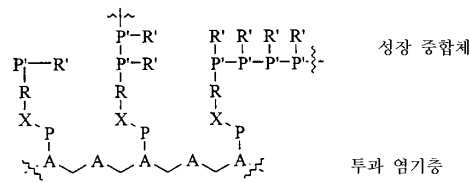
반응식 1



다른 구현양태에서, 관능기들이 'A' 잔기를 통해 투과층 기질내에 공중합되거나 화학적으로 결합되며, R 잔기를 통한 추가의 중합 그래프팅에도 이용될 수 있다. 나타난 도식에서 X는 단순한 화학 결합이 아니다.

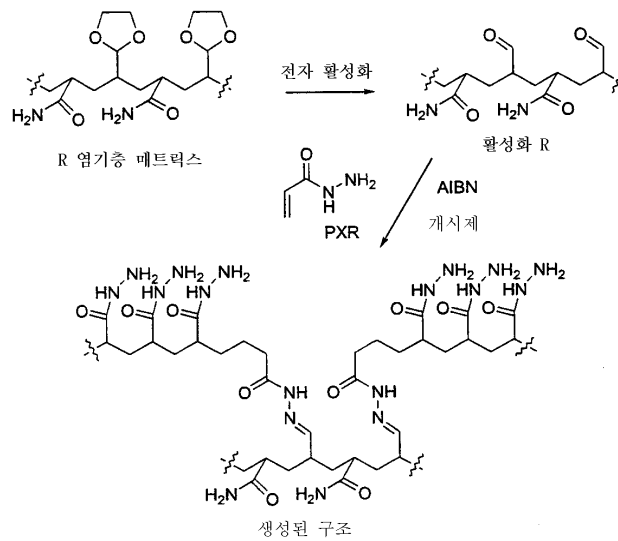


또 다른 구현양태에서, 투과층에 (공중합동안 또는 그래프팅 동안) 미리 결합된 관능기의 R 잔기 (R이 활성화를 필요로 하건 아니건) 상에 추가의 P'-X'-R'기를 중합할 수도 있다. 여기에서, 그 결과를 다음과 같이 도식으로 나타낼 수 있으며, 중합 관능기에서의 X'는 화학 결합이다.

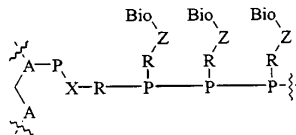


R이 먼저 활성화되어야 하는 잔기를 포함하는 경우에 상기 도식의 화학 반응의 예는 다음과 같다.

반응식 2



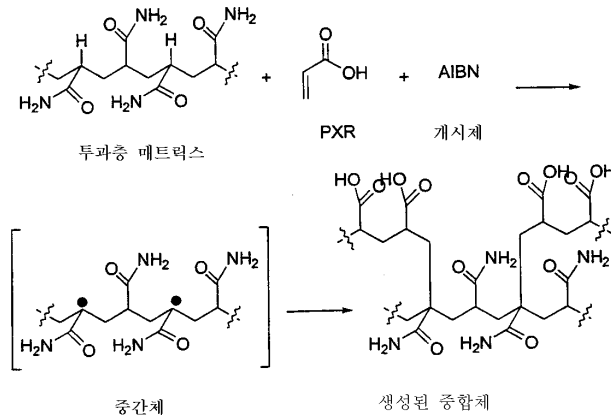
생체분자 (하기 도식에서 Z - bio로 명시됨)를 결합하기 위해 이용될 수 있는 다수의 R 잔기를 함유하는 장쇄 중합체를 형성하는 많은 첨가반응에서 중합체 확장이 계속될 수도 있다.



바람직한 구현양태에서, 생체분자에 부착된 유도체 Z은 화학결합, 스트렙타비딘, 바이오틴, 페닐 붕산, 살리실릭 히드록삼산, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 히드라지드, 히드라진, 아민, 케톤, 알데히드, 디알데히드, 브로모 - 또는 요오도 - 아세트아미드, 및 에스테르 뿐만 아니라 상기 헤르만슨(Hermanson)의 문헌에 기재된 유도체로 구성된 군에서 바람직하게 선택된다. 하나의 구현양태에서, 유도체화 잔기가 여러 개의 R 잔기에 부착될 수도 있다. 이러한 상황을 도 21에 나타내고, 여기에서 PBA 잔기는 각각 R 잔기를 포함하는 SHA 잔기에 부착된다.

그래프팅 동안의 중합의 예를 다음과 같이 나타낼 수 있다.

반응식 3



상기 식에서, P는 단량체의 반응성 이중 결합 잔기이고, X는 알켄과 카르보닐 탄소 사이의 화학 결합이고, R은 생체분자에 부착하기 위해 사용되는 카르복시기이다. 개시제는, 70°C 이상으로 가열될 때, 투과층으로부터 수소를 제거하는 2개의 라디칼 종을 발생시키는 질소 가스를 방출한다. 이러한 라디칼 백본은 단량체의 이중 결합과 반응하여 백본과 단량체 사이에 공유 결합을 형성하고, 또한 새로 결합된 단량체 내에서 3차 라디칼을 발생시킨다. 이 라디칼은 중합 반응을 계속시킬 수 있고 중합체 백본이 얻어진다.

상기 기재된 반응은, 투과층의 표면 위에 중합체를 전개시키는 비전자적 방식으로, 또는 전극의 편향으로부터 활성화된 개시제를 사용하여 어레이의 특정한 포획 부위에서 중합체를 고 밀도로 특이적 배치시키는 전자적 방식으로 개시될 수도 있다. 중합 반응으로 성장하는 중합체에 대한 부착 부위로서 참여할 수 있는 반응성 잔기를 함유한 기본 투과층 존재 하에서 반응이 수행될 때, 그 결과 전체 어레이에 걸쳐 또는 특정한 위치에서 어레이의 표면 위에 성장 또는 중합하는 중합체 사슬 집합체를 포함하는 어레이가 얻어진다. 도 22A 및 B와 도 23은 아크릴아미드 P-X-R (도 22B) 또는 아크릴-NHS 에스테르 (도 23)을 사용하는 그래프팅 중합을 나타낸 도면이다. 도 22B는 도 22A에 나타난 것에 대한 더욱 상세한 메카니즘이다. 나타난 바와 같이, 어느 하나의 경우에 중합 집합체가 투과층의 표면 위에서 형성된다. 본 발명의 다른 구현양태에서, 이러한 성장하는 중합 반응은 비특이적으로 또는 특이적으로 일어날 수 있다.

전자적 주소지정 마이크로어레이의 투과층에 관능기를 첨가하는 여러 실험들이 하기 실시예에 개시되어 있다. 실시예 1에는, 생체분자 부착 수준이 본 발명의 수준에 비해 제한되어진 선행 기술의 부착 화학이 나타나 있다. 이 실시예는 또한, P-X-R기로서 사용되는 본 발명의 부착 잔기가, 선행 부착 화학 방법과 적어도 균등한 수준으로 생체분자의 부착을 제공한다는 것을 나타낸다. 실시예 2는, 본 발명을 위해 개발된 그래프팅 방법이 "슬러리" 방법과 관련되는 부착 체계를 나타낸다. 실시예 3은 투과층에 관능기를 부착하기 위한 용액 그래프팅을 나타낸다. 실시예 4는 "플라스마 그래프팅" 방법의 유용성을 입증하는 실험을 제공한다. 실시예 5는 부착에 앞서 활성화를 필요로 하는 반응 중심부 R을 갖는 투과층을 형성하는 3개의 실험을 제공한다. 추가로, 실시예는, 관능기의 결합이 어레이의 포획 부위에서만 일어나도록, 전자 편향을 사용하여 특이적 부착을 수행하는 가능성을 입증하고 있다. 실시예 6은 유도체화 생체분자의 부착에 앞서 활성화되어야 하는 잔기를 포함하는 반응 중심부 R을 나타낸다.

실시에

실시에 1실시에 1

선행 기술에서 전형적으로 사용된 부착 화학은, 기질 표면 상의 이용가능한 반응 부위의 수에 의해 제한을 받는다. 모든 반응 부위에 대하여, 샘플 내의 표적 종을 검출하는데 관련된 분자 구조를 결합하기 위하여 단지 하나의 잔기만이 부착될 수 있다. 예를들면, 기질 위의 모든 반응성 잔기에 대하여, 단지 하나의 검출 프로브가 결합될 수 있다.

본 발명의 부착 화학에서 사용되는 일부 화학 잔기가 적어도 선행 기술에 공지된 동등한 화학의 수준까지 작용한다는 것을 증명하기 위하여, 생체분자들을 부착하기 위한 화학 기를 마이크로어레이 위에 위치시키고 중합없이 처리하는 3개의 실험을 수행하였다. 그 결과 단지 어레이 위의 각각의 이용가능한 부위에 기인하여 결합이 형성되었다.

a) 실험 1 - 시아노메틸 보호된 살리실릭 히드록삼산 펜틸 말레이미드(SA(OCM) - X - Mal)의 부착

9:0.5:0.5 아크릴아미드/메틸렌 비스 아크릴아미드/N,N' - 비스(아크릴로일)시스타민을 포함하는 기본 히드로겔 투과층과 UV 개시제로서의 D4265로 적층된 마이크로어레이를 말레이미드 링커와 반응시켜, 투과층 위에 부착 기질을 형성하였다. 구체적으로, 어레이를 질소하에서 1 시간동안 0.5M 트리스 - HCl pH8.2중의 20mM DTT 10ml중에서 항온처리하여, N,N' - 비스(아크릴로일)시스타민의 디설파이드 결합을 절단하였다. 어레이를 50mM 아세트산나트륨 pH 6.0으로 3회 세척하였다. 이어서, 2 ml DMF중의 8.5 mg SA(OCM) - X - Mal의 용액을 20 ml 아세트산나트륨 pH 6.0에 첨가하고, 어레이를 아세테이트 용액중에서 45분동안 항온처리하였다. 이어서, 1M NH₂OH (0.1M NaHCO₃, pH 8.5중)을 첨가하고, 3 시간동안 반응시킨 다음, 어레이를 물로 광범위하게 세척하였다.

다수의 PBAs, 특이적 부착 잔기, 및 보디파이 텍사스 레드(Bodipy Texas Red) 형광 염료로 표지화된 T12 프로브 (PBA_n - T12 - BTR, 여기에서 n은 1 내지 8의 수이다)의 전자적 주소지정을 사용하여 결합 분석을 수행하였다 (400 nA/포획 부위에서 2 분동안 50 mM 히스티딘 완충액 중의 50 nm). T12 - BTR을 비특이적 대조군으로서 사용하고, 동일한 조건하에서 주소지정하였다. 도 1A에 나타난 것과 같이, PBA 표지화 프로브가 주소지정된 포획 부위 (컬럼 2 및 4)는 특이적 결합을 나타내었다. 매우 낮은 수준의 비특이적 결합이 컬럼 3 및 5에서 관찰되었다. 도 1B는 도 1A의 결과의 평균을 막대 그래프로 나타난 것이다. 표시된 전체 결합 수준은 패드당 5×10^7 분자의 범위에 연관된다. 이러한 수준은 공지된 선행 기술 부착 화학에 필적하는 것이다.

b) 실험2 - N - 프로필 - 브로모아세트아미드(SA(OCM) - X - BrAc)의 부착

상기 실험 1에 기재된 것과 같은 기본 투과층을 함유하는 마이크로어레이를 0.5M 트리스 - HCl pH 8.2중의 20 mM 디티오프레이톨 (DTT) 100μl와 질소하에서 1 시간동안 항온처리하였다. 이어서, 어레이를 50 mM 아세트산나트륨 pH 6.0으로 3회 세척하였다. 마이크로어레이를, pH=8에서 5.0 mL 트리스 - HCl내로 희석된 11.0 mg의 SA(OCM) - X - BrAc를 함유하는 1.0 mL 용액으로부터의 0.40 mL의 용액을 함유하는 용액으로 처리하였다. 마이크로어레이를 물로 세척하고, 0.1M NaHCO₃ 중의 NH₂OH 1M 용액으로 처리하고, 다시 다량의 물로 세척하였다. 400nA/패드에서 2분동안 50mM 히스티딘 완충액 중의 50nM에서 PBA - T12 - BTR의 전자적 결합을 수행하였다. T12 - BTR을 비특이적 표적으로 사용하고 동일한 조건하에서 주소지정하였다. 주소지정 후에, 칩을 표준 세척 프로토콜로 처리하였다. 도 24A에 나타난 것과 같이 PBA 표지화 프로브가 주소지정된 특정한 포획 부위 (컬럼 1 및 3)는 특이적 결합을 나타내었다. 매우 낮은 수준의 비특이적 결합이 컬럼 2 및 4에서 관찰되었다. 도 24A는 도 24A에서의 결과의 평균을 나타낸 막대 그래프이다. 전체 결합 수준은 5000μm² 패드당 5×10^7 형광단의 범위이다. 이러한 수준은 공지된 선행 기술 부착 화학에 필적하는 것이다.

c) 실험3 - 시아노메틸 보호된 살리실릭 히드록삼산 NHS 에스테르 (SA(OCM) - X - NHS)의 부착

상기 실험 1에 기재된 것과 같은 기본 투과층을 함유하는 마이크로어레이를 1차 아민을 함유하도록 변형시켰다. 어레이를 0.5M 트리스 - HCl pH 8.2중에서 질소하에 1시간동안 10ml의 20mM DTT와 항온처리하였다. 이어서, 8 μ l의 0.5 M 3 - 브로모프로필아민을 37°C에서 질소하에 2 시간동안 첨가하였다. 이어서, 0.5M 트리스 - HCl중의 9 μ l의 2M DTT를 첨가하고, 30분동안 항온처리한 다음, 물로 세척하였다. 어레이를 무수 DMF로 행구고, 무수 DMF중의 25 mM S AOCM - X - NHS 80 μ l로 덮어씌웠다. 트리에틸아민(8 μ l)을 첨가하고, 어레이를 실온에서 2.5시간동안 배양하였다. 이어서, 어레이를 무수 DMF로 3회 세척하고 물로 3회 세척하였다. 마지막으로, 1M NH₂OH (0.1M NaHCO₃ 중, pH 8.5)를 3시간동안 덮어씌운 다음, 칩을 물로 세척하였다.

400nA/부위를 사용하여 2 분동안 50mM 히스티딘 완충액중에서 PBA - T12 - BTR (50nm)의 전자적 주소지정에 의해 결합 분석을 수행하였다. T12 - BTR을 비특이적 대조로서 사용하고 동일한 조건하에서 주소지정하였다. 프로브를 주소지정한 후, 상기 기재된 바와 같이 어레이를 STE중에서 세척하였다. 도 3A는, 특이적 결합(컬럼 1 및 3)이 강한 반면 비특이적 결합(컬럼 2 및 4)은 상당히 낮다는 부착 결과를 나타낸다. 도 3B는, 결합 수준이 전형적인 부착 화학에 필적하는, 특이적 및 비특이적 결합 간의 비율의 막대 그래프를 나타낸다.

상기 실험으로부터, 본 발명자들은 화학 부착 잔기가 본 발명의 전자적 주소지정 마이크로어레이의 투과층의 반응 중심부에 결합될 수 있음을 알아내었다. 또한, 이러한 부착은 기존의 부착 기술에 필적하는 것이다. 본 발명의 방법을 사용하여 부착시키고자 하는 부착 화학 잔기는 작용성이기 때문에, 본 발명자들은 본 발명의 그래프팅 방법 및 특이적 및 비특이적 활성화를 사용하여 그의 부착을 더욱 시험하였다.

실시예 2 실시예 2

이 실험에서, 마이크로어레이 위의 특정 위치에 생체분자를 부착하기 위한 화학 잔기를 미리 형성된 투과층 위에 그래프팅시켰다. 하나의 구현양태에서, 본 발명을 위해 개발된 그래프팅 방법은 "슬러리" 방법과 관련된다. 이 방법은 아크릴아미드 - 기재 히드로겔 투과층 위에 고 밀도로 활성화 잔기 (예, 치환된 아크릴아미드 또는 메타크릴아미드 단량체)를 그래프팅시킨다. 이 방법에서, 고 농도의 열적으로 활성화된 개시제를 사용하여 미리형성된 투과층 위로의 그래프트를 수득한다.

바람직한 구현양태에서, 슬러리는 실온에서 단지 약간 가용성인 중합 개시제 및 부착 단량체로 만들어진다. 슬러리를 마이크로어레이의 기본 투과층에 적용하고, 이때 개시제 및 단량체의 입자들이 미리 형성된 중합체 층의 표면 위에 침강된다. 이어서, 개시제를 활성화시키고 입자들을 용해시키기 위해 온도를 올리고, 그 결과 미리 형성된 중합체 층의 표면 근처에서 고 농도의 개시제 라디칼 및 용해된 단량체가 국소적으로 얻어진다. 단량체의 부착 (즉, 그래프팅) 및 단량체의 중합은 동시에 일어나며, 그 결과 중합된 관능기가 투과층에 공유 결합으로 부착된다. 이러한 방식으로, 생체분자 부착 잔기 (즉, R 잔기)가 주로 중합체 층의 윗 부분에 격리되고, 그 결과 기초를 이루는 전극의 전해 생성물 또는 전극에서의 직접적인 전기화학적 산화에 의해 유발될 수도 있는 유해한 효과로부터 벗어나게 된다.

단지 기질 층 위의 이용가능한 부위로부터 유래된 부착 부위를 갖는 시스템에 비하여, 본 발명의 그래프팅 시스템은 생체분자를 부착하기 위한 부위의 밀도를 상당히 증가시키고, 그 결과 비특이적 결합에 기인한 배경이 감소될 수 있다.

실시예 2의 실험

a) 실험 1

메틸렌 - 비스아크릴아미드와 가교결합된 아크릴아미드를 포함하는 전자적 주소지정 마이크로어레이 위에 기본 히드로 겔 투과층을 형성하였다. 기본층의 형성에 앞서, 아르곤 플라즈마를 사용하여 기본 기질을 광범위하게 세정하였다. 기본층을 UV 중합 (90% 아크릴아미드, 10% 비스, DMSO/H₂O (50/50 v/v), 0.3 mg/ml D4265로 UV 개시)을 사용하여 적층시켰다. 형성 후에, 어레이를 70°C에서 15분동안 건조시키고, 물로 행구고, 다시 15분동안 건조시켰다.

10ml 20% DMSO/80% H₂O중의 메타크릴아미드 - SHA (메트 - SHA) (15 mg/ml) 및 AIBN (30 mg/ml)을 사용하여 부착층을 그래프팅시켰다. 어레이를 이 혼합물과 80°C에서 1시간동안 접촉시킨 다음 DMSO와 물로 행구었다. 동일한 반응 조건을 사용하여 SHA가 존재하지 않는 대조 어레이를 생성하였다. 표 IV는 메트 - SHA 및 AIBN의 몰%를 제공한다. 또한, 10 μM PBA - ATA5 - BTR에 10분간 그래프팅 마이크로어레이를 노출시킨 다음 수득되는 프로브 밀도를 나타낸다.

< 표 IV >

[표 3]

어레이	SHA의 몰	[SHA] (M)	AIBN의 몰	[AIBN] (M)	SHA의 몰%	AIBN의 몰%	프로브 밀도	
시험	2.99×10^{-4}	0.02	1.83×10^{-3}	0.18	14	86	$6.64 \times 10^7 \pm 4.3 \times 10^6$	
대조	0	0	1.83×10^{-3}	0.18	0	100	$7.62 \times 10^5 \pm 1.88 \times 10^5$	

b) 실험 2

이 실험에서, 기본 투과층을 상기 실험 1에서 나타낸 바와 같이 만들었다. 300 μl 33% DMSO/67% 물 중의 5mg 메트 - SHA 및 6mg AIBN의 슬러리 혼합물을 사용하여 부착층을 그래프팅하였다. 100 μl의 슬러리를 어레이 기본 투과층 위에 부하하고, 80°C에서 1 시간동안 가열하였다. 처리된 어레이를 DMSO, 물로 행구고 건조시켰다. 상기 나타낸 바와 같이 SHA를 갖지 않은 대조 어레이를 생성하였다. 표 V는 이러한 구조의 결과를 나타낸다. 이 실험에서, 프로브 밀도는 SHA를 갖지 않은 대조에 비해 약 3배 정도 컸다.

< 표 V >

[표 4]

어레이	SHA의 몰	[SHA] (M)	AIBN의 몰	[AIBN] (M)	SHA의 몰%	AIBN의 몰%	프로브 밀도	
시험	6.7×10^{-6}	0.07	1.21×10^{-5}	0.12	36	64	$2.14 \times 10^8 \pm 1.82 \times 10^7$	
대조	0	0	1.21×10^{-5}	0.12	0	100	$5.33 \times 10^5 \pm 6.36 \times 10^4$	

c) 실험 3

기본 투과층을 갖는 마이크로어레이를 상기 기재된 바와 같이 형성하였다. 기본층에 결합되는 부착층의 결합 성질을 시험하기 위하여 어레이 위에 부착층을 구성하였다. AIBN을 사용하지 않은 대조 어레이를 구성하였다 (즉, 300 μ l 33% DMSO/67% 물과 혼합된 5 mg 메트 - SHA, 이 중에서 100 μ l의 슬러리를 어레이 위에 적층시키고 80°C에서 1시간동안 가열하였다). SHA 또는 AIBN을 사용하지 않은 제2 대조 어레이를 생성하였다 (즉, 100 μ l의 33% DMSO/67% H₂O를 80°C에서 1시간동안 가열하였다). 표 VI에 나타난 바와 같이, 프로브 밀도는 상기 V에서와 같이 SHA 및 AIBN이 포함된 경우의 프로브 밀도에 비해 훨씬 낮았다. 따라서, 메트 - SHA의 성공적인 그래프팅을 위해서는 AIBN이 요구된다. 추가로, 결과는 메트 - SHA가 기본층 내로 단순히 확산되는 것이 아니라 그것에 공유 결합된다는 것을 제시한다. 그 결과는 또한, 실험 1 및 2에서 AIBN없이 수득된 비특이적 결합 수준이 잔류 메트 - SHA에 기인하는 것이 아니라 진정한 수동적 비특이적 결합에서 유래된다는 것을 나타낸다. 이러한 제시는, 메트 - SHA 및 AIBN을 갖지 않고 실험 3에서 수득된 수동적 비특이적 결합 수준이, 실험 1 및 2에서 시험된 어레이 위에서 수득된 시그날에 비해 실제로 크다는 사실에서 유래된다.

< 표 VI >

[표 5]

어레이	SHA의 물	[SHA] (M)	AIBN의 물	[AIBN](M)	SHA의 물%	AIBN의 물%	프로브 밀도	
AIBN없음	6.7 $\times 10^{-6}$	0.07	0	0	100	0	1.00 $\times 10^6 \pm 7$. 20 $\times 10^5$	
AIBN 또는 SHA 없음	0	0	0	0	0	0	9.03 $\times 10^5 \pm 1$. 77 $\times 10^5$	

도 4는 상기 실험의 결과를 요약한다. 나타난 바와 같이, 부착 수준은 포획 부위당 10⁸ - 10⁹ 정도로 프로브 밀도를 혼성화시킬 수 있다. 도 4의 표제 3 및 4는 적용된 부착 화학의 안정성을 나타낸다. 표제 3 ("SHA 가짐/AIBN 가짐/40 시간후 침지")은 40 시간동안 물에 침지시킨 후 표제 2의 평균 결합 강도를 나타내고, 이는 단지 약간의 형광 손실을 표시한다. 표제 4는 형광소를 갖는 특정 DNA에 추가로 노출한 후 시그날의 회복을 나타내고, 이는 투과층에의 부착 시스템이 손상되지 않았음을 나타낸다.

d) 실험 4

실험 1에서 상기 기재된 바와 같이 표준 기본 투과층으로 마이크로어레이를 코팅하였다. 이어서, 이들을 개시제로서 AIBN을 사용하여 브로모아세틸 - 프로필 - 메타크릴아미드(BacMac)와 슬러리 그래프팅한 다음 (5 mg BacMac, 5mg AIBN, 80°C 1시간), 표준 조건하에서 격렬히 세척하였다.

말단 티올, 말단 포스포로티오에이트, 비환원 디설파이드로 변형되거나 변형되지 않은 BTR 표지화된 프로브를 사용하여 결합 분석을 수행하였다. 50 mM β - 알라닌중에서, 30초동안 부위당 50, 100, 200, 400 및 800 nA의 전류를 사용하여 포획 부위에 프로브를 전자적 주소지정하였다. 주소지정 후에, 어레이를 0.2x STE, 1% SDS 및 물로 세척한 다음, 영상화하였다. 도 2는, 비환원 디설파이드로 치환된 BTR 표지화 T11 (프로브 6a19)이 결합을 제공하지 않고, 치환되지 않은 BTR 표지화 T11 (RCA7)은 단지 배경을 제공하며, 말단 티올을 갖는 BTR 표지화 T11 (프로브 6a19.b)은 특이적 부착을 제공하고, 포스포로티오에이트로 치환된 BTR 표지화 T11 (프로브 13a1)은 특이적 부착을 제공한다는 것을 막대 그래프로 나타낸다. 특이적 부착 수준은, 그래프팅 중합 기술에서 발생된 다수의 잠재적 결합 부위로 인하여, 실시예 1에 나타난 수준에 비해 월등히 높다.

실시예 3 실시예 3

이 실시예에서, 마이크로어레이 위의 특정 위치에서 생체분자를 부착하기 위한 화학 잔기를 미리 형성된 투과 층 위에 그래프팅시켰다. 하나의 구현양태에서, 본 발명을 위해 개발된 그래프팅 방법은 "용액" 방법과 관련된다. 이 방법은 아크릴아미드 - 기재 히드로겔 투과 층 위에 고 밀도의 활성화 잔기(예, 치환된 아크릴아미드 또는 메타크릴아미드 단량체)

를 그래프팅시킨다. 이 방법에서, 미리 형성된 투과층 위로의 그래프팅을 달성하기 위하여, 고 농도의 열 활성화된 개시제를 사용하였다.

바람직한 구현양태에서, 용액은 실온에서 가용성인 중합 개시제 및 부착 단량체로 만들어진다. 용액을 마이크로어레이의 기본 투과층에 적용한 다음, 온도를 올려 개시제를 활성화시키고, 이에 의해 미리 형성된 중합체 층의 표면 근처에서 국소적으로 고 농도의 라디칼 및 단량체가 얻어진다. 단량체의 부착 (즉, 그래프팅) 및 단량체의 중합이 동시에 발생하여, 중합된 관능기가 투과층에 공유 결합으로 부착된다. 이 방식으로, 생체분자 부착 잔기 (즉, R 잔기)가 중합체 층의 윗 부분으로 주로 분리되고, 그 결과 기초를 이루는 전극의 전해 생성물 또는 전극에서의 직접적인 전기화학적 산화에 의해 유발될 수도 있는 유해한 효과로부터 벗어날 수 있다.

단지 기질 층 위의 이용가능한 부위로부터 유래되는 부착 부위를 갖는 시스템에 비하여, 본 발명의 그래프팅된 시스템은 생체분자를 부착하기 위한 부위의 밀도를 크게 증가시키고, 그 결과 비특이적 결합에 기인한 배경을 감소시킬 수 있다.

공유 결합을 달성하기 위해 그래프팅된 단량체를 부착하는 것은 다수의 방법에 의해 개시될 수도 있다. 예를들면, 그래프팅은 개시제의 열 분해 (예, AIBN, 벤조일 퍼옥사이드), 개시제의 광분해 (예, D4265의 UV 개시), 산화환원 반응 (예, 황산세륨(IV)), 이온화 복사선 (예, α , β , γ , 또는 X-선), 또는 플라즈마 개시 (예, 아르곤, 질소, 산소)를 사용할 수도 있다. 또한, 반응 전에 활성화되어야 하는 화학 잔기를 사용함으로써, 그래프팅 방법이 어레이의 미리결정된 위치에 특이적으로 일어날 수도 있다.

실시예 3: 실험 1

이 실험에서, 실시예 2의 실험 1에서 상기 기재된 바와 같이 기본 투과층을 만들었다. 300 μ l DMSO중의 5mg 메트-S HA 및 6mg AIBN의 용액을 사용하여 부착층을 그래프팅시켰다. 100 μ l의 용액을 어레이 기본 투과층 위에 부하하고, 80°C에서 1시간동안 가열하였다. 처리된 어레이를 DMSO, 물로 헹구고, 건조시켰다.

도 17B는 전자 역 도트 블롯(reverse dot blot) 분석의 결과를 나타낸 막대 그래프이고, 여기에서 500 nA/패트에서 1분동안 포획 프로브를 주소지정한 다음, 400 nA/패트에서 2분동안 특이적 및 비특이적 BTR 표지화 69-mer 표적을 주소지정하였다(500 pM 농도). 영상화에 앞서 칩을 1% SDS 및 0.2x STE로 광범위하게 세척하였다.

컬럼 3을 특이적 표적으로 주소지정하고, 컬럼 1 및 5를 비특이적 표적으로 주소지정하였으며, 컬럼 2 및 4는 주소지정하지 않고 남겨두었다. 도 17A에 나타난 바와 같이, 상기 기재된 것처럼 엄격히 세척한 후에 영상을 기록하였다. 도 17B에 나타난 막대 그래프는, 7×10^7 프로브/패트의 특이적 결합을 갖는 BTR 표지화 표적의 특이적 결합을 고도로 구별할 수 있음을 나타낸다. 상기 실험의 결과는, 생체분자의 부착 뿐만 아니라 다른 관능기의 부착을 위해 각각의 관능기의 주요 층을 적층시키는데 있어서, 용액 그래프팅 방법의 유용성을 증명한다.

실시예 4

"플라스마 그래프팅" 방법이 사용되는 추가의 실험을 수행하였다. 이 구현양태에서, 9:1 아크릴아미드/비스 - 아크릴아미드 (중량/중량)를 포함하는 기본 투과층으로 어레이를 코팅하였다. 이어서, 어레이를 아르곤 플라스마 (50W, 100S CCM)로 처리한 다음, DMSO 또는 1:1 DMSO/H₂O중의 메타크릴아미드 - 살리실히드록삼산(MA - SHA) 용액으로 5 분동안 코팅하였다. 어레이를 물로 세척하고 건조시켰다. 그래프팅된 정도를 PBA - T12 - BTR 프로브의 수동적 또는 전자 부착에 의해 측정하였다. 도 5는 여러 조건하에서 그래프팅된 어레이 위에서 PBA - T12 - BTR 프로브의 수동적 결합을 나타낸다. 구체적으로, 이러한 어레이는, 어레이를 아르곤 플라스마로 1분간 그래프팅시키는 조건하에서 포획 부위당 약 2×10^7 의 프로브 밀도를 제공하였다 (도 5는 상응하는 MFI/s 수준을 나타낸다). 도 6은 아르곤 플라스마로 2 분간 그래프팅시킨 어레이 위에서 여러 전자적 주소지정 조건에 따른 프로브의 결합을 나타낸다. 전자적 주소지정된 어레이에 대한 부착 수준은 포획 부위당 1×10^7 프로브에 근접하였다 (200nA에서 30초동안 전자 편향). 비교로서, 슬러리 그래프팅에 의해서는 부위당 2×10^8 프로브 범위의 부착 수준이 얻어졌다.

실시에 5실시에 5

이 실시예에서, 관능기의 부착에 앞서 활성화되어야 하는 반응 중심부 R을 갖는 투과층을 형성하였다. 추가로, 이 실시예는, 관능기의 결합이 어레이의 포획 부위에서만 일어나도록, 전자 편향을 사용하여 특정한 부착을 수행하는 능력을 입증한다.

3 - 아미노프로필 메타크릴아미드 히드록로라이드(APMA) 메틸렌 비스 - 아크릴아미드(BIS) 및 아크릴아미드(Am)의 수용액 (30% 고형물)으로부터 각각 5 - 5 - 90의 몰% 비율을 사용하여 기본 투과층을 제조하였다. N,N,N',N' - 테트라메틸 에틸렌 디아민(TEMED)를 0.2% v/v의 농도로 첨가한 다음, 0.2% v/v에서 단량체 혼합물에 최종 농도로 0.5 g/ml의 과황산암모늄을 첨가하였다. 7.5 μ l의 용액을 미리 실란화된 (3 - 트리메톡시실릴프로필 메타크릴레이트 또는 TMSPM) 전자적 주소지정 마이크로칩의 어레이 위에 위치시키고, 미리 소수성 실리콘 용액 (예컨대, 미국 오하이오주 클리블랜드 소재의 블루 코랄 - 슬릭 50 리미티드(Blue Coral - Slick 50 Ltd.)에 의해 만들어진 레인(Rain) - XTM)으로 처리된 유리 커버 슬립으로 덮었다. 단량체 용액을 실온에서 90분동안 중합시켰다. 커버 슬립으로부터 코팅된 마이크로칩을 제거하고, 완전히 세척하여 잔류하는 단량체들을 제거하였다. 자유 아민을 포함하는 코팅된 마이크로칩을 DMSO 및 포스페이트 완충액 pH 7.5, 0.1M중의 4 - (N - 히드록시숙신이미드) - 4 - 메르캅토 - (메틸에스테르)부타네이트(SATP) 1.5 mg/ml의 용액과 반응시켰다. 밤새 반응시킨 후, 마이크로칩을 완충액, DMSO, 및 물로 세척하여 결합되지 않은 SATP를 제거하였다. SATP와 아민과의 반응에 의해 티오에스테르가 수득되며, 따라서 투과층이 유도체화된다. 티오에스테르 관능기는 높거나 낮은 pH 조건에 노출된 후에(즉, 활성화) 자유 티올을 함유하는 능력을 갖는 투과층 표면을 제공하였다. 도 7은 자유 티올 생성의 체계를 나타낸다.

티오에스테르의 활성화는 특정한 마이크로전극 위치 (즉, 포획 부위)를 양성 또는 음성 편향으로 편향시킴으로써 달성되었다. 그러나, pH 변화가 전극 위에서 국소화된 상태로 유지되도록 하기 위해서, 편향 조건 동안에 적절한 완충 시스템을 선택하였다. 완충 조건이 너무 강하다면, 전극 위에서의 pH 변화가 최소일 수도 있거나 또는 제거될 수도 있고, 이에 의해 관능기의 활성화가 방해된다. 또한, 완충액이 너무 약하다면, pH 변화가 국소화되지 않게 되고, 이는 포획 부위의 위치 이외의 투과층을 활성화시킬 수 있다. 또한, 편향 절차 동안에 적절한 전류를 선택하였다. 너무 적은 전류는 티오에스테르 결합을 가수분해하기에 필요한 충분한 pH 변화를 발생시키지 않는다. 또한, 전류가 너무 크다면, 완충액이 pH 변화를 국소적으로 유지시키는데 불리한 상태를 갖는다.

실시예에서, 3개의 완충액 조건을 비교하였다. 하나의 실험에서, 완충액은 0.1M 인산나트륨 pH 6.8, 1mM 트리에틸아민을 포함하였다. 포획 부위(80 μ m 직경)를 1분동안 위치당 600 nA의 전류로 편향시켰다. 3' Hex 형광소 및 5' 요오도 아세트아미드, 티올 반응성 관능기를 갖는 20개 염기의 뉴클레오티드를 0.1M 인산나트륨 용액 pH7.5, 1mM EDTA중의 20 μ M 용액으로서 제조하였다. 이어서, DNA 올리고머를 활성화된 마이크로칩 투과층과 수동적으로 반응시켰다. 칩을 완충액 및 물로 여러번 세척한 후에, 형광외 현미경 하에서 마이크로칩을 영상화하였다. 도 8에 나타난 것과 같이, 부착 부위를 편향시키기 위해 600nA/패드를 사용할 때 배경 위에서 매우 높은 비율로 Hex 표지화 DNA가 포획 패드에 부착되었다. 이 결과는, 티오에스테르 절단의 발생과 그 이후의 관능기 부착을 위해 적절한 pH 변화를 발생시키기 위해서는, 요구되는 전류 수준에 대한 민감성과 적절한 완충액 시스템이 필요하다는 것을 나타낸다. 이 시험에서 사용

되는 전류에서 비 - 포스페이트 완충액은 포획 부위에서 국소적인 pH에 유용한 효과를 제공하지 않았다.

도 9는, 특정한 포획 부위에 부착된 티올 기를 갖고 표지화 올리고머와 반응된 마이크로칩을 더욱 처리하여, 캡형성 잔기의 사용을 통해 반응되지 않은 티올기를 불활성으로 만들고, 이에 의해 마이크로칩 포획 부위의 특이성을 더욱 증가시키는, 실시예의 다른 구현양태를 나타낸다.

이 실시예에 따라 사용될 수도 있는 활성화를 필요로 하는 기는 아세탈, 케탈, 이민, TBOC, FMOC, 트리틸, 트리플루오로아세트아미드, 기타 에스테르와 같은 각종 산 불안정성 잔기, 및 제거 또는 가수분해가능한 잔기를 포함한다. 이 구현양태에서 유용한 염기 불안정성 잔기는 에스테르, 아미드, 치환된 포스페이트, 토실, 메실, 트리플레이트, 및 제거 또는 가수분해가능한 β - 시아노에틸 잔기를 포함한다.

단백질의 고유 잔기를 통해 또는 선택된 잔기를 첨가하는 변형을 통해 효소와 같은 단백질을 특이적으로 부착시키기 위하여, 활성화를 필요로 하는 잔기를 사용할 수도 있다.

실시예 6 실시예 6

이 실시예에서는, 반응 중심부 R이 유도체화 생체분자의 부착에 앞서 활성화되어야 하는 잔기를 포함하는 구현양태가 제공된다. 실시예는, 관능기의 P 및 R 잔기가 생체분자를 부착시키는 바람직한 방법에 따라 변할 수 있음을 나타낸다.

활성화될 때, 알데히드가 비 - 포획 부위 어레이 표면을 제외한 포획 부위 위에서 특이적으로 형성되도록, 아세탈 잔기를 히드로겔 형성 내에 포함시켰다. 아세탈 기를 사용하면, 여러 조건하에서 반응될 수 있는 관능기가 제공되고, 이에 의해 각종 화학 시약 및 변형을 사용하여 포획 부위에서 생체분자를 부착시킬 수 있다. 예를들면, 알데히드 반응기와 디히드라지드를 반응시키면 산화 리보스 말단의 올리고뉴클레오타이드가 부착된다. 다른 예는 알데히드와 아민 말단 올리고뉴클레오타이드와의 직접적인 반응이다. 유사하게, 비오틴화 올리고뉴클레오타이드에 결합시키기 위해 스트렙타비딘과 같은 단백질의 아민기를 알데히드와 반응시킬 수 있다.

이 구현양태에서, 아세탈 잔기를 함유하는 반응 중심부 R을 히드로겔 제형내로 혼입하여, 아세탈 관능기를 함유하는 투과층을 얻는다. 이러한 아세탈 관능기를 활성화시키고, 전기화학적으로 발생된 아세탈기의 산 가수분해를 통해 알데히드 관능기로 전환시킬 수도 있다. 물의 전기화학적 산화를 사용하여 아세탈을 가수분해시키기 위해 필요한 산성 조건을 발생시킨다. 이어서, 디히드라지드를 갖는 산화 리보스 올리고뉴클레오타이드, 아민 말단 올리고뉴클레오타이드 및 비오틴화 올리고뉴클레오타이드 및 스트렙타비딘을 사용하는 것과 같은 각종 부착 체계에 의해, P - X - R 관능기를 사용하여 올리고뉴클레오타이드와 같은 생체분자를 투과층에 연결시키기 위해 알데히드 기를 사용하였다.

구체적으로, 이 실시예에서 사용된 것과 같은 아세탈 단량체 (3,9 - 디비닐 - 2,4,8,10 - 테트라옥사스피로[5,5] - 운데칸 및 2 - 비닐 - 1,3 - 디옥솔란)를 가교된 아크릴아미드 히드로겔내의 공중합에 의해 투과층 기질내에 혼입하였다. 그 결과 아세탈 관능기를 함유하는 어레이 상에 코팅된 히드로겔 층이 얻어진다. 아세탈기를 전기화학적으로 발생된 산을 통해 알데히드 기로 가수분해시켰다. 가수분해를 위해 필요한 낮은 pH는, 0.1M KCl 용액중에서 물의 전기화학적 산화에 의해 발생된다. 이어서, P - X - R 관능기 및 결론적으로 올리고뉴클레오타이드 생체분자를 위한 부착 부위로서 알데히드를 사용하였다.

3개의 부착 체계를 평가하였다. 체계 1에서, 아디프산 디히드라지드와의 반응에 이어 산화 리보스 말단 올리고뉴클레오타이드와의 처리를 통해 알데히드가 히드라지드로 전환되었다. 공중합된 2 - 비닐 - 1,3 - 디옥솔란을 통해 아세탈을 도입

하였다. 체계 2에서, 알데히드를 아민 말단 올리고뉴클레오타이드와 반응시켰다. 이 경우에, 2 - 비닐 - 1,3 - 디옥솔란의 공중합을 통해 아세탈을 도입하였다. 체계 3에서, 알데히드를 스트렙타비딘(S)상의 아민기와 반응시키고, 이어서 비오티닐화 올리고뉴클레오타이드에 부착시켰다. 이 체계는 2 - 비닐 - 1,3 - 디옥솔란 또는 3,9 - 디비닐 - 2,4,8,10 - 테트라옥사스피로[5,5]운데칸과 그래프팅된 가교 아크릴아미드 히드로겔에서 사용되었다. 이러한 체계들의 상세한 사항을 하기 에 제공한다 (도 10 참조). 이러한 체계들에서 상이한 관능기를 사용하는 것은, 아세탈 관능기가 화학식 P-X-R의 상이한 관능기에 대해 보편적임을 나타낸다. 또한, 이것은, 부착이 주요한 특정 부위로 제어될 수 있음을 증명한다.

실시에 6 실험실시에 6 실험

a) 체계 1

92.5% 아크릴아미드, 5% 메틸렌 - 비스아크릴아미드 및 2.5% 3,9 - 디비닐 - 2,4,8,10 - 테트라옥사스피로[5,5]운데칸을 포함하는 히드로겔 기본 투과층을 만들었다 (30% 고형물). 히드로겔 층의 중합에 앞서, 히드로겔 코팅된 마이크로어레이를 아르곤 플라즈마(10 분)를 사용하여 광범위하게 세정하였다. UV 개시제로서 3 mg/ml의 VAO44를 첨가하여 중합을 개시하고 UV 광에 노출시켰다. 65°C로 10분동안 연속 가열하여 완전히 경화시켰다. 용매로서 DMSO/H₂O (50/50 v/v)를 사용하였다.

마이크로어레이는 각각 5개 포획 부위의 5개 열을 함유하였다. 열 1,3 및 5를 0.1M KCl중에서 2 분동안 600nA/부위로 편향시키고, 물로 완전히 행구었다. 이어서, 32 mg/ml의 아디프 디히드라지드를 함유하는 1ml 0.1M 포스페이트 pH 7 용액중에 1.5 시간동안 마이크로어레이를 침지시켰다. 물로 완전히 행군 후에, 어레이를 0.1M 포스페이트 완충액 pH 7.4중에서 10 μ M 산화 리보 - U ATA5와 함께 20분동안 항온처리하였다. 어레이를 0.2x STE/1% SDS로 행군 다음, 0.2x STE로 행구어, 임의의 산화 리보 - U ATA5를 제거하였다. 이어서, 어레이를 0.1M 포스페이트/50mM NaCl 완충액 pH 7.4중에서 보디파이 - 텍사스 레드로 표지화된 10 μ M RCA5와 함께 20분동안 항온처리하였다. (ATA5 및 RCA5는 서로 완전한 보체이다). 혼성화 후에, 어레이를 0.2x STE/1% SDS로 행구고, 0.2x STE로 행구어 내어 보디파이 - 텍사스 레드로 표지화된 RCA5를 제거하였다.

3,9 - 디비닐 - 2,4,8,10 - 테트라옥사스피로[5,5] - 운데칸은 낮은 pH에 노출시에 알데히드를 형성하는 아세탈 - 함유 화합물이다. 0.1M KCl 중에서 600nA/부위로 2 분간 특정 부위를 편향시키면, 아세탈기를 가수분해시키는 적절한 수준의 양성자가 발생되었다. 이어서, 이러한 알데히드 기를, 양성으로 편향시킨 포획 부위에서만 알데히드에 부착되는 P-X-R 관능기 (즉, 아디프 디히드라지드)와 반응시켰다. 산화된 ATA5 올리고 (즉, 유도체화 생체분자)는 디알데히드 기를 가지고 있으며, 이어서 R 잔기 히드라지드와 반응시켰다. 도 11은, 선택된 부위에서의 특이적 활성화 후에 또는 특이적 활성화없이(즉, 비특이적 결합), 표지화된 생체분자 RCA5 - BTR을 ATA5에 부착시킨 결과를 나타낸다. 부위당 600nA에서 2분동안 양성 편향의 특이적 활성화를 사용한 경우, 배경위에서 혼성화가 일어났다.

b) 체계 2

이 구현양태에서, 히드로겔 기본 투과층은 85% 아크릴아미드, 5% 메틸렌 - 비스아크릴아미드 및 5% 2 - 비닐 - 1,3 - 디옥솔란으로 구성되었다. 히드로겔의 중합에 앞서, 아르곤 플라즈마 (10분)를 사용하여 마이크로어레이를 광범위하게 세정하였다. UV 개시제로서 0.3 mg/ml의 D4265 첨가에 의해 중합을 개시하고 UV광에 노출시켰다. 70°C에서 30분 동안 연속 가열하여 완전히 경화시켰다. 용매로서 DMSO/H₂O (50/50 v/v)을 사용하였다.

도 12는, R 잔기 아세탈을 알데히드로 활성화시키기 위하여, 선택된 포획 부위를 0.1M KCl중에서 2분동안 600nA/포획 부위로 편향시킨, 생체분자의 특이적 부착 결과를 나타낸 막대 그래프이다. 활성화 후에, 어레이를 물로 완전히 행군다. 마이크로어레이를, 텍사스 레드로 표지화된 10 μ M 아민 말단 ATA7을 함유하는 0.1M 포스페이트 완충액 pH8의

50 μ l 용액으로 덮었다. 30분동안 항온처리 후에, 마이크로어레이를 0.2x STE/1% SDS로 행구고, 0.2x STE로 행구어, 결합되지 않은 아민 말단 텍사스 레드 표지화 ATA7을 제거하였다.

도 12에 나타난 바와 같이, 부착은 단지 600 nA/포획 부위에서 2분동안 편향시킨 전극에서만 발생하였다. 부착 수준은 부위당 약 10⁷ 프로브이었다. 이 실시예는, 전기화학적으로 발생된 아세탈기의 산 가수분해에 의해 형성되는 알데히드기에 아민 말단 올리고뉴클레오타이드가 직접적으로 부착되는 것을 증명하였다.

c) 체계 3

이 구현양태에서, 기본 투과층은 90% 아크릴아미드 및 10% 메틸렌 - 비스아크릴아미드 (1/1 DMSO/H₂O중의 30중량%)를 포함하였다. D4265를 UV개시제로서 사용하고, 샘플을 UV광에 노출시켰다. 어레이를 60°C에서 1시간동안 경화시키고, 행군 다음 60°C에서 건조시켰다.

이 실시예에서, 비닐 아세탈 잔기는 제1 P-X-R 관능기 (여기에서, P는 비닐이고, X는 화학 결합이고, R은 아세탈임)를 포함하는 것으로 간주될 수 있다. 아세탈 잔기는 알켄 잔기의 중합 동안에 "슬러리" 그래프팅을 통해 투과층의 반응 중심부에 결합되었다. 이러한 중합 방법은 슬러리 그래프팅 방법의 적용을 예시하는 것이다.

슬러리 접근법은, 개시제와 관능기가 실온에서 불완전하게 용해되는 용매 시스템을 사용하고, 따라서 개시제와 관능기의 슬러리를 형성한다. 개시제와 관능기의 입자들은 투과 기본층의 표면 위로 침강된다. 온도를 90°C로 증가시킬 때, 개시제는 반응성이 되고, 슬러리 성분들이 용해되어, 미리 형성된 중합체 기본층의 표면 근처에 국소적으로 고 농도의 관능기 및 개시제 라디칼을 발생시킨다. 이에 의해 관능기의 부착 잔기 P가 히드로겔에 공유 결합된다. 이 실시예에서, 비닐 아세탈과 개시제로서 작용하는 AIBN을 동일 중량으로 사용하여, 아세탈 단량체를 투과층 위에 그래프팅시켰다. 5mg의 단량체와 AIBN을 100 μ l DMSO에 용해시킨 다음, 200 μ l의 물을 첨가하여 슬러리내에 침전시켰다. 마이크로어레이 표면 위에 50 μ l의 슬러리를 첨가하여 그래프팅을 달성하고, 90°C에서 1 시간동안 항온처리한 다음 다량의 DMSO 및 물로 세척하였다.

P가 아민이고 X가 화학결합이고 R이 스트렙타비딘인 스트렙타비딘의 형태로 제2 P-X-R 관능기를 첨가하였다. 전자 탈보호 (0.1M KCl중에서 45 - 60초동안 300nA/포획 부위로)에 따라, 이 관능기를 활성화된 부위 (이 경우에, 알데히드를 포함하는 R 잔기)에 연결시켰다. 이 단계는, 주요 포획 부위 위에서 직접적으로 알데히드를 형성하기 위하여, 전기화학적으로 발생되는 아세탈기의 산성 가수분해를 일으켰다. 스트렙타비딘 관능기 (1mg/ml)를 1시간동안 수동적으로 적용한 다음, 시아노붕소소화나트륨으로 세척하였다 (1시간).

이 단계를 시험 마이크로어레이 위에서 수행하였으며, 여기에서 컬럼 1 - 4는 관능기 스트렙타비딘이 첨가되는 알데히드 잔기를 생성하기 위하여 아세탈기와 그래프팅되고 활성화되었다. 컬럼 5는 비 - 특이적 부착을 조사하기 위해 아세탈 표면으로서 남겨두었다. 컬럼 1 및 3을, 2 분동안 전극당 400nA에서 보디파이 텍사스 레드로 표지화된 50nM 비오틴화 T12로 전자적 주소지정하였다. 컬럼 2 및 4를, 보디파이 텍사스 레드로 표지화된 50nM 비 - 비오틴화 T12로 전자적 주소지정하였다. 따라서, 컬럼 1 및 3은 특이적 부착을 제공한 반면, 컬럼 2 및 4는 비 - 특이적 부착을 제공하였다. 이어서, 마이크로어레이를 0.2X STE, 1% SDS에서 적어도 10분동안 세척하고, 행구고, 0.2X STE중에서 추가로 10분동안 침지시켰다. 마지막으로, 어레이를 물로 행구고 히스티딘 완충액중에서 영상화하였다.

도 13은, 전체 어레이를 10 μ M 용액으로서 바이오틴 T12 - BTR에 1시간동안 노출시킨 후, 상기 제조된 마이크로어레이의 결과를 나타낸다. 나타난 바와 같이, 컬럼 1 - 4에서 결합이 일어나지만 컬럼 5에서는 결합이 일어나지 않고, 다 시말해서 특이적으로 활성화된 부위에서만 결합이 발생하였다.

도 14에서, 컬럼 1 및 2를 300nA/부위로 30 초동안 활성화시키고, 컬럼 3 및 4를 60초동안 노출시킨 것 이외에는 상기 기재된 바와 같이 어레이를 제조하였다. 활성화 후에, 어레이를 스트렙타비딘과 반응시키고, 컬럼 1 및 3 위에서 특이적 포획으로 전자적 주소지정한 반면, 컬럼 2 및 4를 비특이적 프로브 (다시 말해서, 비-비오틴화 올리고)로 주소지정하였다. 포획 부위의 형광 분석은, 전자적 활성화의 정도의 표시가 관능기의 결합에 중요하다는 것을 제공하였다. 나타난 바와 같이, 컬럼 1은 컬럼 3에 비해 형광 강도를 갖지 않으며, 이는 컬럼 1의 부위에서 스트렙타비딘의 결합을 나타내는 것이다. 즉, 사용된 조건하에서의 활성화 시간이 컬럼 1 부위에서 완전한 활성화를 제공하기에 충분하지 않았다. 컬럼 1, 2 및 4에 대해 기록된 형광 값들이 도 14에 나타난 바와 같이 서로 유사한 값을 갖는 것이 중요하다. 컬럼 4에서 사용된 올리고는 스트렙타비딘으로의 결합을 위한 바이오틴이 부족한 반면, 컬럼 1 및 2는 충분한 스트렙타비딘이 부족하다는 사실은, 비특이성이 부분적으로 다공질 투과층 내로 올리고를 전류 구동시키는 것에 기인할 수 있다는 것을 제안한다.

비특이적 결합을 더욱 시험하기 위하여, 어레이를 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. 컬럼 1 및 3을 바이오틴 T12 - BTR로 주소지정한 다음, 어레이를 50mM 히스티딘 완충액으로 세척하고, 다시 컬럼 2 및 4를 비오틴화되지 않은 프로브로 주소지정하였다. 도 15에 나타난 바와 같이, 특이적 결합 대 비특이적 결합이 뚜렷이 나타난다. 컬럼 2 및 4에서 일부 배경이 관찰된다는 사실은, 도 16에 나타난 연구에서 바이오틴 T12 - BTR을 컬럼 1,3 및 5에 주소지정한 다음 세척 및 영상화하였음을 암시하는 것이다. 나타난 바와 같이, 컬럼 1 및 3은 예상대로 혼성화된 반면, 컬럼 5는 결코 활성화되지 않고 여백의 배경을 나타내었다. 이러한 데이터는, 수동적 결합 및 올리고 포획이 둘다 발생하여 배경의 여백 수준이 얻어진다는 것을 제안한다.

상기 실험 결과는, 각각의 관능기 (즉, 아세탈)의 1차 층을 적층하고, 제2 관능기 층 (즉, 스트렙타비딘 잔기)을 결합시키는 슬러리 그래프팅 방법의 유용성을 증명한다. 또한, 이 결과는, 완충액에서 전기화학적으로 발생된 pH 변화를 사용하여 마이크로어레이 위의 특이적으로 선택된 부위에서 작용성 잔기를 활성화시키는 유용성을 나타낸다. 또한, 히드로겔 중합체 투과층에 관능기를 그래프팅하고, 올리고뉴클레오타이드를 전자적 주소지정하는 것은, 특이적 및 비-특이적 부착 수준에 대한 정보를 제공한다. 또한, 2-비닐-1,3-디옥솔란 또는 3,9-디비닐-2,4,8,10-테트라옥사스피로[5,5]-운데칸 관능기에 대하여, 특이적 전자 부착 밀도는 부위당 10^8 프로브 정도이고, 비-특이적 밀도는 그 보다 10 내지 100 배 낮았다.

상기 설명은 본 발명의 구현양태를 예증하기 위한 것이고 어떠한 방식으로 본 발명을 제한하는 것이 아니다. 본 발명을 특정한 변형에 관하여 설명하였지만, 그의 상세한 사항이 본 발명을 제한하는 것으로서 해석되어서는 안되고, 본 발명의 의도 및 범위에서 벗어나지 않는 한 여러 균등물, 변화 및 변형이 가능할 수도 있음이 명백하며, 이러한 균등한 구현양태가 본 발명에 포함되는 것으로 이해된다. 각각의 공보 또는 특허 출원이 구체적 및 개별적으로 참고문헌으로서 포함된 것임을 나타낸 것과 같이, 여기에 기재된 모든 공보 및 특허 출원들은 동일하게 참고문헌으로서 포함된 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

마이크로어레이에 생체분자를 부착시키기 위한, 하기 화학식을 갖는 제1 화학기 및(또는) 제2 화학기를 함유하는 투과층을 갖는 전자적 주소지정 마이크로어레이.

< 화학식 >

P - X - R

상기 식에서,

P는 마이크로어레이에 결합하고(하거나) 상기 제2 화학기의 잔기에 결합하는 화학 잔기이고;

X는 화학 결합 또는 연결 화학 잔기이고;

R은 공유결합으로 또는 비-공유결합으로 유도체화 생체분자에 부착하는 화학 잔기, 또는 공유결합으로 상기 제2 화학기의 잔기에 부착하는 화학 잔기이다.

청구항 2.

제1항에 있어서, P가 α, β - 불포화 카르보닐 비닐기, 알릴기 및 호모알릴기를 포함하지만 이에 제한되지 않은 알케닐 잔기, 에폭시드, 화학 결합, 페닐 봉산, 살리실릭 히드록삼산, 아세트알, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 할로 - 아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 마이크로어레이.

청구항 3.

제1항에 있어서, R이 화학결합, 스트렙타비딘, 스트렙타비딘의 일부, 바이오틴, 페닐봉산, 살리실릭 히드록삼산, 비닐, 알릴, 호모알릴, 아세트알, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 할로 - 아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 마이크로어레이.

청구항 4.

제1항에 있어서, R이 유도체화 생체분자 또는 상기 제2 화학기의 잔기에 결합하는 화학 반응에 참여하기에 앞서 활성화되는 화학 잔기인 마이크로어레이.

청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 R이 R을 덮는 용액의 pH 증가 또는 감소에 의해 활성화되는 것인 마이크로어레이.

청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 pH 변화가 전자적 주소지정 마이크로어레이의 전극의 전자적으로 발생된 전위에 의해 제공되는 것인 마이크로어레이.

청구항 7.

제1항에 있어서, P가 화학식 $P' - X' - R'$ 을 갖는 상기 제2 화학기와 결합하고, 제2 화학기의 적어도 한 P' 잔기와도 결합하는 것인 마이크로어레이.

청구항 8.

제7항에 있어서, 상기 제2 화학기가 중합체를 형성하고, 이 중합체의 백본이 서로 연결된 P' 잔기들을 포함하며 $-X' - R'$ 가 각각의 P'에 연결되어 있는 것인 마이크로어레이.

청구항 9.

제8항에 있어서, P'가 P와 동일하고, X'가 X와 동일하고, 및(또는) R'가 R과 동일한 것인 마이크로어레이.

청구항 10.

제1항에 있어서, R이 화학식 $P' - X' - R'$ 을 갖는 상기 제2 화합기와 결합하고, 제2 화합기의 적어도 한 P' 잔기와도 결합하는 것인 마이크로어레이.

청구항 11.

제10항에 있어서, 상기 제2 화합기가 중합체를 형성하고, 이 중합체의 백본이 서로 연결된 P' 잔기를 포함하며, $X' - R'$ 가 각각의 P'에 연결되어 있는 것인 마이크로어레이.

청구항 12.

제11항에 있어서, P'가 P와 동일하고, X'가 X와 동일하고, 및(또는) R'가 R과 동일한 것인 마이크로어레이.

청구항 13.

제1항에 있어서, X가 화학결합, 탄소 원자수 1 - 10의 알킬기, 탄소 원자수 2 - 10의 알케닐기, 알킬 에스테르, 케톤, 아미드, 에테르, 티오에스테르, 아미도기, 카르보닐, 및 이들의 임의의 조합체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 마이크로어레이.

청구항 14.

화학식 $P - X - R$ 을 갖는 제1 화합기와 화학식 $P' - X' - R'$ 을 갖는 제2 화합기를 함유한 투과층을 갖는 전자적 주소지정 마이크로어레이.

상기 화학식에서,

P는 마이크로어레이에 결합하는 화학 잔기이고, 각각의 P 잔기는 상기 제1 화합기를 마이크로어레이의 투과가능한 중합체 및 제2 기의 적어도 하나의 P'에 연결시키고,

각각의 P' 잔기는 상기 제2 화합기의 적어도 하나의 다른 P'잔기에 추가로 연결되어 상기 제2 화합기의 중합체를 형성하며,

X 및 X'는 화학 결합, 탄소 원자수 1 - 10의 알킬기, 탄소 원자수 2 - 10의 알케닐, 알킬 에스테르, 케톤, 에테르 아미드, 티오에스테르, 아미도기, 카르보닐 및 이들의 임의의 조합체로 구성된 군으로부터 선택되는 결합 화학 잔기이고;

R 및 R'는 공유결합으로 또는 비 - 공유결합으로 유도체화 생체분자에 부착하는 화학 잔기이다.

청구항 15.

제14항에 있어서, R 및 R'가 스트렙타비딘, 스트렙타비딘의 일부, 바이오틴, PBA, SHA, 비닐, 알릴, 호모알릴, 아세탈, 에스테르, 카르복실산, 아미드, 할로 - 아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 마이크로어레이.

청구항 16.

제15항에 있어서, R이 R'와 동일한 것인 마이크로어레이.

청구항 17.

제14항에 있어서, 상기 P 또는 P'와 R 또는 R'가 화학 반응에 참여하기에 앞서 활성화되는 화학 잔기이고, 활성화가 동일하거나 서로 다른 조건하에서 일어나며, 이때 상기 화학 반응이 P와 P', R과 유도체화 생체분자, 및(또는) P'와 다른 제2 기의 P'의 임의의 조합체 사이에 일어나는 반응인 마이크로어레이.

청구항 18.

제17항에 있어서, 상기 P, R, P' 또는 R'가 상기 마이크로어레이를 덮는 반응 용액의 pH 증가 또는 감소에 의해 활성화되는 것인 마이크로어레이.

청구항 19.

제18항에 있어서, 상기 pH 변화가 전자적 주소지정 마이크로어레이의 전극의 전자적으로 발생된 전위에 의해 제공되는 것인 마이크로어레이.

청구항 20.

제14항에 있어서, P가 상기 단량체의 중합을 포함하는 화학 반응에서 자유 P' - X' - R' 단량체에 결합하기 위해 활성화되어 상기 자유 단량체의 적어도 하나의 P' 잔기에 있는 반응 중심부에 결합하고, 상기 P' 잔기의 각각이 다른 단량체의 적어도 하나의 다른 P'에 결합하는 것인 마이크로어레이.

청구항 21.

화학식 P - X - R을 갖는 제1 화합기와 화학식 P' - X' - R'을 갖는 제2 화합기를 갖는 투과층을 함유하는 전자적 주소지정 마이크로어레이.

상기 식에서,

P는 마이크로어레이에 직접적으로 결합하는 화학 잔기이고, 상기 각각의 P 잔기는 상기 제1 화합기를 마이크로어레이의 투과가능한 중합체에 연결시키고,

R은 상기 제2 기의 적어도 하나의 P'에 연결되는 화학 잔기이고,

각각의 P' 잔기는 상기 제2 화합기의 적어도 하나의 다른 P' 잔기에 추가로 연결되어 상기 제2 화합기의 중합체를 형성하며,

X 및 X'는 화학 결합, 탄소 원자수 1 - 10의 알킬기, 탄소 원자수 2 - 10의 알케닐, 알킬 에스테르, 케톤, 아미드, 에테르, 티오에스테르, 아미도기, 카르보닐 및 이들의 임의의 조합체로 구성된 군으로부터 선택되는 결합 화학 잔기이고;

R'는 공유결합으로 또는 비 - 공유결합으로 유도체화 생체분자에 부착되는 화학 잔기이다.

청구항 22.

제21항에 있어서, R 및 R'가 스트렙타비딘, 스트렙타비딘의 일부, 바이오틴, 페닐붕산, 살리실릭 히드록삼산, 비닐, 알릴, 호모알릴, 아세탈, 에스테르, 카르복실산, 아미드, 할로 - 아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 마이크로어레이.

청구항 23.

제22항에 있어서, R이 R'와 동일한 것인 마이크로어레이.

청구항 24.

제21항에 있어서, 상기 P 또는 P'와 R 또는 R'가 P와 P', R과 P', 및 P'와 다른 제2 기의 P'의 임의의 조합 사이에서 일어나는 화학 반응에 참여하기에 앞서 동일하거나 서로 다른 조건하에서 활성화되는 화학 잔기인 마이크로어레이.

청구항 25.

제24항에 있어서, 상기 P, R, P' 또는 R'가 상기 마이크로어레이를 덮는 반응 용액의 pH 증가 또는 감소에 의해 활성화되는 것인 마이크로어레이.

청구항 26.

제25항에 있어서, 상기 pH 변화가 전자적 주소지정 마이크로어레이의 전극의 전자적으로 발생된 전위에 의해 제공되는 것인 마이크로어레이.

청구항 27.

제21항에 있어서, R이 상기 단량체의 중합을 포함하는 화학 반응에서 자유 P' - X' - R' 단량체에 결합하기 위해 활성화되어 상기 R이 상기 자유 단량체의 적어도 하나의 P' 잔기에 있는 반응 중심부에 결합하고, 상기 P' 잔기의 각각이 다른 단량체의 적어도 하나의 다른 P'에 결합되는 것인 마이크로어레이.

청구항 28.

생체분자에 부착되어 있으며 화학식 P' - X' - R'을 갖는 제2 화학 잔기를 포함하는 중합된 단량체 단위 및(또는) 생체분자에 부착되어 있고 화학식 P - X - R을 갖는 제1 화학 잔기를 갖는 투과층을 포함하며, 상기 생체분자가 산성 및(또는) 염기성 pH 조건하에서 적어도 하나의 상기 제1 및(또는) 제2 화학 잔기가 활성화된 후에 상기 제1 화학 잔기 또는 상기 중합된 단위에 부착되는 것인 전자적 주소지정 마이크로어레이.

상기 화학식에서,

P는 상기 투과층 및(또는) 상기 제2 화학 잔기의 P'에 부착하기 위해 활성화를 필요로 하는 화학 원소이고,

X 및 X'는 비반응성 화학 원소를 포함하고,

R 및 R'는 상기 생체분자 또는 다른 제2 화학 잔기의 P'에 부착하기 위해 P 및 P'와는 상이한 활성화를 필요로 하는 화학 원소를 포함한다.

청구항 29.

제28항에 있어서, 상기 투과층이 아크릴아미드, 비스아크릴아미드, 메타크릴아미드, N - 알킬 아크릴아미드, 관능화 에틸렌 글리콜 유도체, N - 비닐 피롤리디논, 비스 - 시스타민, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 및 알킬이 탄소쇄인 아크릴로니트릴로 구성된 군으로부터 선택되는 단량체로부터 중합된 중합체를 포함하는 것인 마이크로어레이.

청구항 30.

제28항에 있어서, 상기 생체분자가 비닐, 알릴, 호모알릴, 아세탈, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 할로 - 아세트아미드, 티올, 포스포티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 화학 잔기로 유도체화된 것인 마이크로어레이.

청구항 31.

제28항에 있어서, 상기 P 및 P'가 알케닐 잔기, α, β - 불포화 카르보닐, 비닐, 알릴 및 호모알릴 기, 아세탈, 티오에스테르, 디설파이드, 에폭시드, 알킬 에테르 및 카르복실산으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 마이크로어레이.

청구항 32.

제28항에 있어서, 상기 X 및 X'가 화학결합, 1 내지 10 탄소 원자로 구성된 탄소쇄, 에테르, 폴리에테르, 아미드 및 에스테르로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 마이크로어레이.

청구항 33.

제28항에 있어서, 상기 R 및 R'가 알케닐 잔기, α, β - 불포화 카르보닐, 비닐, 알릴, 호모알릴, 아세탈, 에스테르, 카르복실산, 티오에스테르, 디설파이드, 에폭시드 및 알킬 에테르로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 마이크로어레이.

청구항 34.

제33항에 있어서, 상기 R이 R'와 동일한 것인 마이크로어레이.

청구항 35.

제28항에 있어서, pH의 조절이 완충액의 pH를 낮추거나 올림으로써, 및(또는) 상기 전자적 주소지정 어레이의 전극을 양성 또는 음성 전자 전위로 편향시킴으로써 개시되는 것인 마이크로어레이.

청구항 36.

제28항에 있어서, 상기 P, P', R 및(또는) R' 각각이 티오에스테르인 마이크로어레이.

청구항 37.

제28항에 있어서, 상기 P, P', R 및(또는) R' 각각이 아세탈 잔기인 마이크로어레이.

청구항 38.

제28항에 있어서, 상기 R이 아민, 유도체화 아민, -살리실히드록삼산, 브로모아세트아미드, 살리실릭 히드록삼산, 말레이미드, 스트렙타비딘, 바이오틴, 비닐, 알릴, 호모알릴, 아세탈, 에스테르, 카르복실산, 아미드, 할로 - 아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 마이크로어레이.

청구항 39.

제35항에 있어서, 상기 전자 전위가, 활성화시키고자 하는 마이크로어레이 상의 부위에서 $50\text{nA}/5000\mu\text{m}^2$ 내지 $5\mu\text{A}/5000\mu\text{m}^2$ 의 전류 밀도로 30 내지 600초동안 인가되는 것인 마이크로어레이.

청구항 40.

a. 화학식 P - X - R을 갖는 화합기를 상기 마이크로칩의 투과층에 결합시키는 단계 (여기서, 상기 화학식의 P는 상기 화합기를 상기 투과층에 부착시키기 위한 화학 잔기를 나타내고, X는 비반응성 잔기이고, R은 상기 생체분자를 부착하기 위한 화학 잔기임);

b. 상기 화학식의 R로 표시되는 제1 화학 잔기를 활성화시켜, 상기 제1 잔기에 부착될 제2 화학 잔기를 갖는 생체분자와 상기 제1 잔기를 반응시키고 그에 부착시키는 단계;

c. 상기(b)의 활성화된 제1 잔기를 상기 생체분자의 제2 잔기와 접촉시키는 단계를 포함하는, 전자적 주소지정 마이크로칩 상에 생체분자의 마이크로어레이를 형성하는 방법.

청구항 41.

제40항에 있어서, 상기 P 화학 잔기가 알케닐 잔기, α, β - 불포화 카르보닐, 비닐, 알릴 및 호모알릴기, 아세탈, 에폭시드, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 할로아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 42.

제40항에 있어서, 상기 R 화학 잔기가 활성화되어 반응성 티올로 되는 티오에스테르인 방법.

청구항 43.

제40항에 있어서, 상기 R 화학 잔기가 활성화되어 알데히드로 되는 아세탈 단량체인 방법.

청구항 44.

제40항에 있어서, 상기 X 화학 잔기가 화학 결합, 아마이드, 1 내지 10개의 탄소 원자로 구성된 탄소쇄, 에스테르, 에테르 및 폴리에테르로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 45.

제40항에 있어서, 상기 R 화학 잔기가 바이오틴, 스트렙타비딘, 페닐붕산, 살리실릭 히드록삼산, 비닐, 알릴, 호모알릴, 아세탈, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 할로 - 아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 46.

제40항에 있어서, 상기 생체분자의 제2 잔기가 바이오틴, 스트렙타비딘, 페닐붕산, 살리실릭 히드록삼산, 비닐, 알릴, 호모알릴, 아세탈, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 할로 - 아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 47.

a. 화학식 P - X - R을 갖는 화학기의 중합체를 마이크로칩의 투과층에 결합시키는 단계 (여기서, 각각의 기의 P는 중합체 백본을 형성하는 제1 화학 잔기이므로 각각의 기의 P는 적어도 하나의 다른 P 잔기에 부착되고 상기 P 중 하나는 상기 중합체를 상기 투과층에 결합시키기 위해 사용되며, X는 비반응성 잔기임);

b. 상기 화학식의 R로 표시되는 제2 화학 잔기를, 공유결합으로 또는 비공유결합으로 상기 제2 화학 잔기에 결합하는 유도체 잔기를 갖는 생체분자와 접촉시키는 단계

를 포함하는, 전자적 주소지정 마이크로칩 상 생체분자의 마이크로어레이를 형성하는 방법.

청구항 48.

제47항에 있어서, 상기 P 화학 잔기가 알케닐 잔기, α, β - 불포화 카르보닐기, 비닐기, 알릴기 및 호모알릴기, 아세탈, 에폭시드, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 할로아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 49.

제47항에 있어서, 상기 R 화학 잔기가 활성화되어 반응성 티올로 되는 티오에스테르인 방법.

청구항 50.

제47항에 있어서, 상기 R 화학 잔기가 활성화되어 알데히드로 되는 아세탈 단량체인 방법.

청구항 51.

제47항에 있어서, 상기 X 화학 잔기가 화학 결합, 아마이드, 1 내지 10개의 탄소 원자로 구성된 탄소쇄, 에스테르, 에테르 및 폴리에테르로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 52.

제47항에 있어서, 상기 R 화학 잔기가 바이오틴, 스트렙타비딘, 페닐붕산, 살리실릭 히드록삼산, 비닐, 알릴, 호모알릴, 아세탈, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 할로 - 아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 53.

제47항에 있어서, 상기 생체분자의 유도체화 잔기가 바이오틴, 스트렙타비딘, 페닐붕산, 살리실릭 히드록삼산, 비닐, 알릴, 호모알릴, 아세탈, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 할로 - 아세트아미드, 티올, 포스포로티올레이트 모노에스테르, 티오에스테르, 디설파이드, 알데히드, 케톤, 히드라지드, 히드라진 및 아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 54.

a) 화학식 P - X - R을 갖는 중합가능한 단량체 및 활성화가능한 개시제를 포함하는 그래프팅 슬러리와 상기 투과층을 접촉시켜 중합 및 그래프팅을 개시하는 단계 (여기서, 상기 단량체의 P는 상기 투과층에 결합하거나 다른 단량체의 P 잔기와 중합될 수 있도록 하는 화학 잔기를 포함하며, 상기 단량체의 R은 상기 R에 결합하는 데 민감한 잔기를 갖는 생체분자에 공유결합으로 또는 비공유결합으로 결합될 수 있도록 하는 화학 잔기를 포함하고, 상기 X는 화학 결합, 아마이드, 1 내지 10개의 탄소 원자로 구성된 탄소사슬, 에테르 및 폴리에테르로 구성된 군으로부터 선택됨);

b) 상기 개시제를 활성화시켜, 상기 단량체의 중합과 상기 투과층 상으로의 그래프팅을 개시시키는 단계; 및

c) 상기 생체분자가 상기 R 잔기에 결합되도록, 상기 R 잔기에 결합하는 화학 잔기를 갖는 생체분자들을 상기 R 잔기와 접촉시키는 단계

를 포함하는 단계로 수행되는 그래프팅에 의해 화학식 P - X - R을 갖는 화학 잔기를 전자적 주소지정 마이크로어레이의 투과층 위에 그래프팅시키는 것을 포함하는, 전자적 주소지정 마이크로칩 상에 생체분자의 마이크로어레이를 형성하는 방법.

청구항 55.

제54항에 있어서, 상기 개시제가 AIBN; 과황산암모늄 및 TEMED; 과산화벤조일; D4265; 황산세륨(IV); α , β , γ 또는 X - 선; 전자 비임 조사; 및 아르곤, 질소 및 산소로 구성된 군으로부터 선택되는 플라즈마에 의한 개시로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 56.

제54항에 있어서, 상기 투과층이 히드로겔인 방법.

청구항 57.

제56항에 있어서, 상기 히드로겔이 중합된 아크릴아미드를 포함하는 방법.

청구항 58.

제54항에 있어서, 상기 중합가능한 단량체가 알케닐 잔기, α, β - 불포화 카르보닐 비닐, 알릴 및 호모알릴기로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 59.

제54항에 있어서, 상기 R이 상기 생체분자와의 결합에 앞서 활성화되어야 하는 잔기인 방법.

청구항 60.

제54항에 있어서, 상기 투과층이 졸 - 겔인 방법.

청구항 61.

a) 화학식 P - X - R을 갖는 중합가능한 단량체, 및 중합 및 그래프팅을 개시하기 위해 활성화를 필요로 하는 개시제를 포함하는 그래프팅 용액과 상기 투과층을 접촉시키는 단계 (여기서, 상기 단량체의 P는 상기 투과층에 결합할 뿐만 아니라 다른 단량체의 P 잔기와 중합될 수 있는 화학 잔기를 포함하며, 상기 단량체의 R은 상기 R에 결합하는 데 민감한 잔기를 갖는 생체분자에 공유결합으로 또는 비공유결합으로 결합될 수 있는 화학 잔기를 포함하고, 상기 X는 화학 결합, 아마이드, 1 내지 10개의 탄소 원자로 구성된 탄소사슬, 에테르 및 폴리에테르로 구성된 군으로부터 선택됨);

b) 상기 개시제를 활성화시켜, 상기 단량체의 중합과 상기 투과층 상으로의 그래프팅을 개시시키고;

c) 상기 생체분자가 상기 R 잔기에 결합되도록, 상기 R 잔기에 결합하는 화학 잔기를 갖는 생체분자들을 상기 R 잔기와 접촉시키는 단계

를 포함하는 단계로 수행되는 그래프팅에 의해 화학식 P - X - R을 갖는 화학 잔기를 전자적 주소지정 마이크로어레이의 투과층 상에 그래프팅시키는 것을 포함하는, 전자적 주소지정 마이크로칩 상에 생체분자의 마이크로어레이를 형성하는 방법.

청구항 62.

제61항에 있어서, 상기 투과층이 히드로겔인 방법.

청구항 63.

제62항에 있어서, 상기 히드로겔이 중합된 아크릴아미드를 포함하는 것인 방법.

청구항 64.

제61항에 있어서, 상기 개시제가 AIBN; 벤조일 퍼옥시드; D4265; 황산세륨(IV); α, β, γ 또는 X - 선; 및 아르곤, 질소 및 산소로 구성된 군으로부터 선택되는 플라즈마에 의한 개시로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 65.

제61항에 있어서, 상기 중합가능한 단량체가 알케닐 잔기, α, β - 불포화 카르보닐 비닐, 알릴 및 호모알릴 기로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

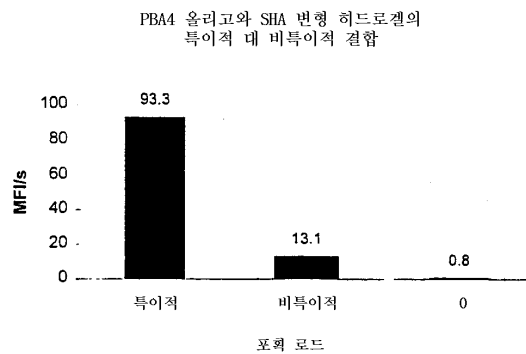
청구항 66.

제61항에 있어서, 상기 R이 상기 생체분자와의 결합에 앞서 활성화되어야 하는 잔기인 방법.

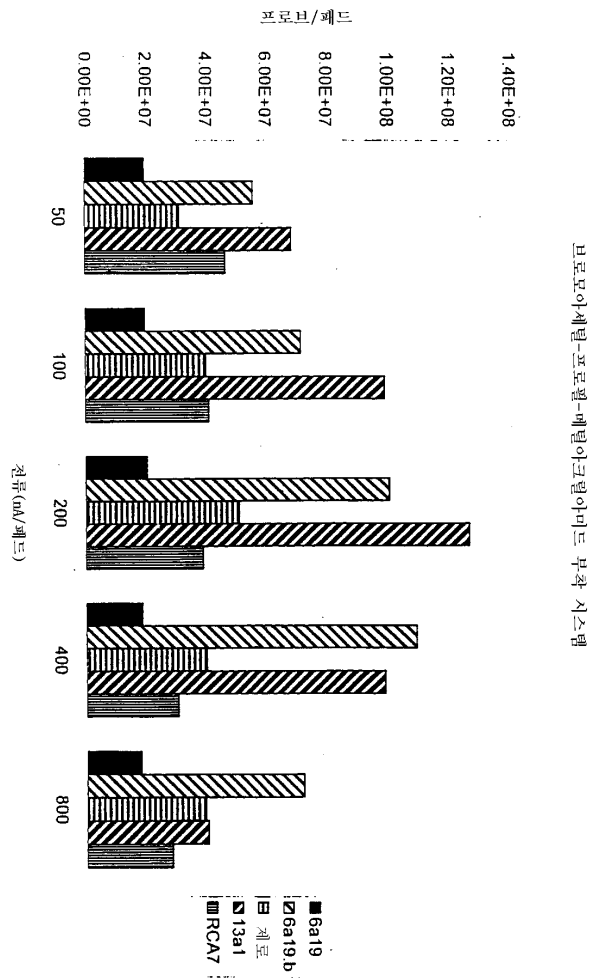
도면 1A



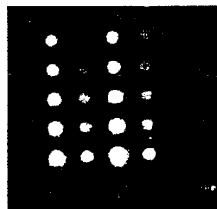
도면 1B



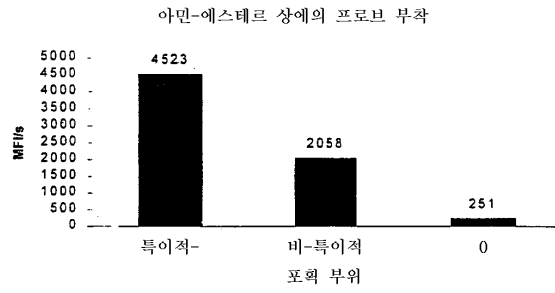
도면 2



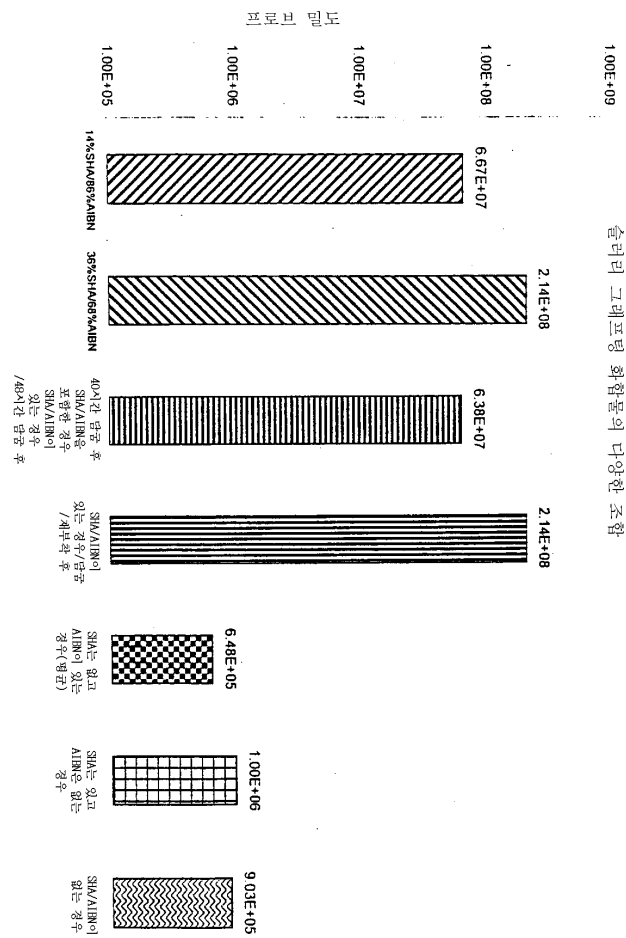
도면 3A



도면 3B

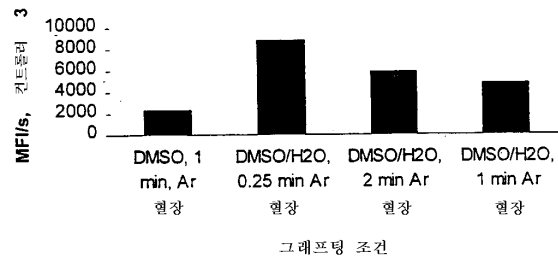


도면 4



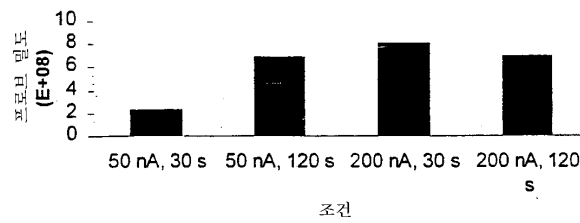
도면 5

수동 부착, 열장 그래프트, 그래프팅 조건의 최적화

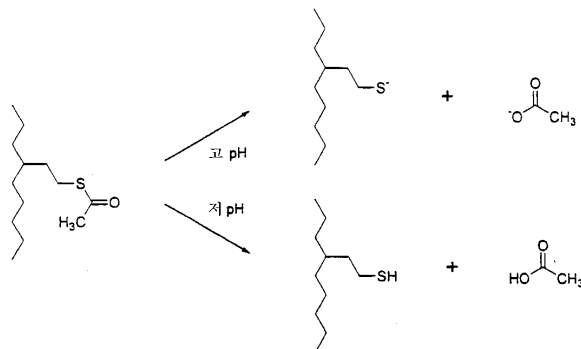


도면 6

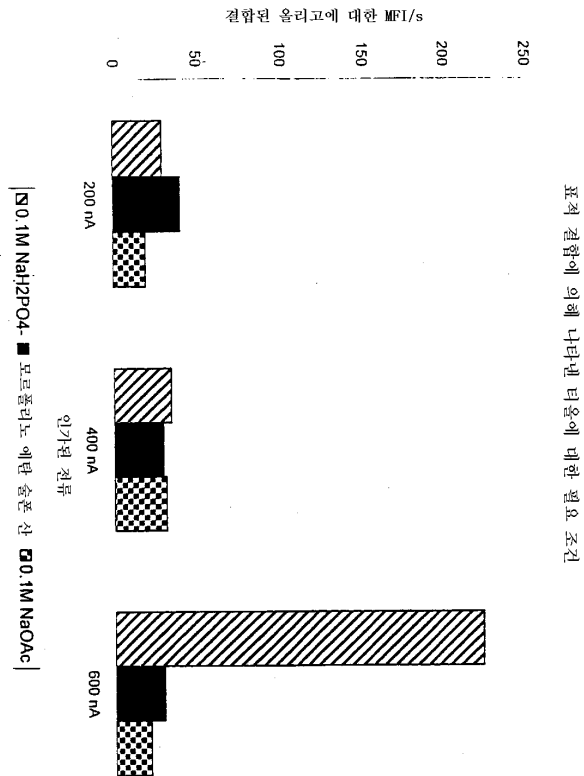
다양한 전하 조건 하의 표적 혼성화; 열장 그래프트



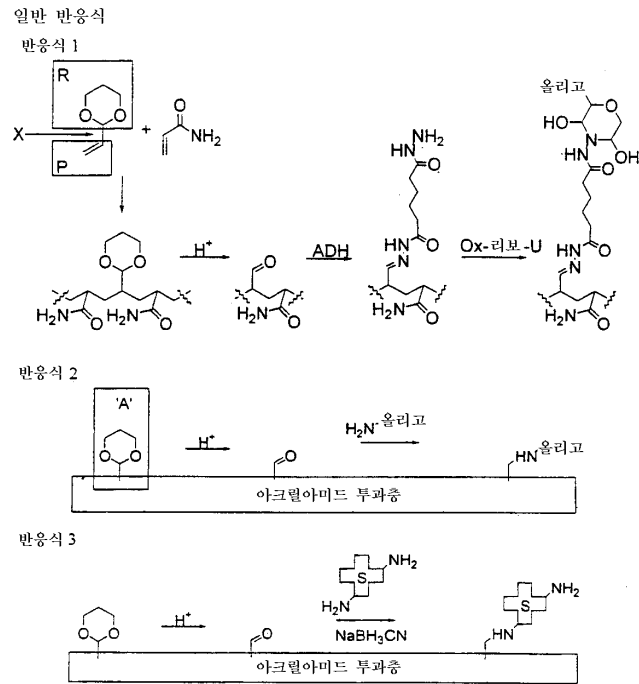
도면 7



도면 8

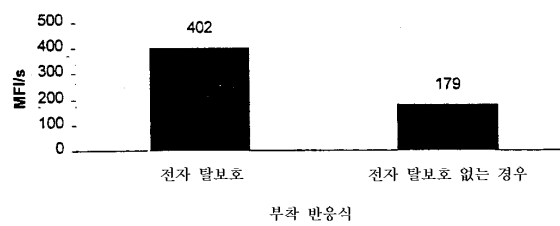


도면 10



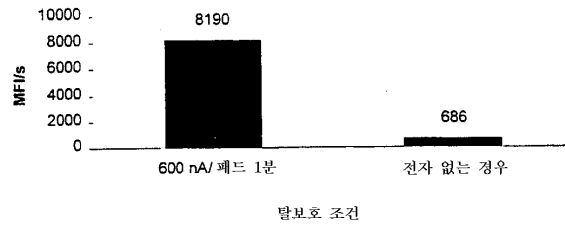
도면 11

전자 탈보호, 디히드라지드 부작,
아세트알 히드로겔의 역 돛 불꽃 분석

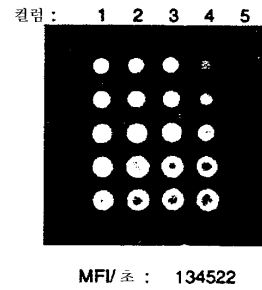


도면 12

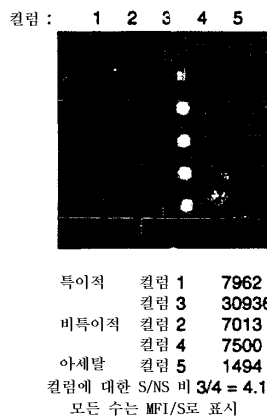
아민 말단화 ATA7-BTR에 의해 검출된
아세탈의 전자 탈보호



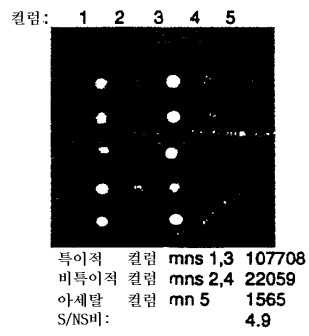
도면 13



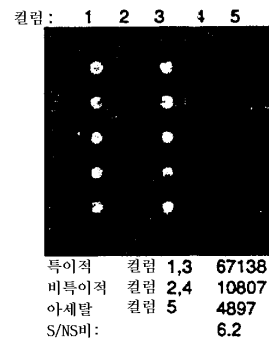
도면 14



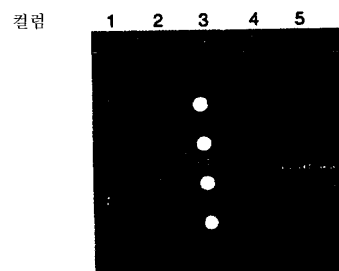
도면 15



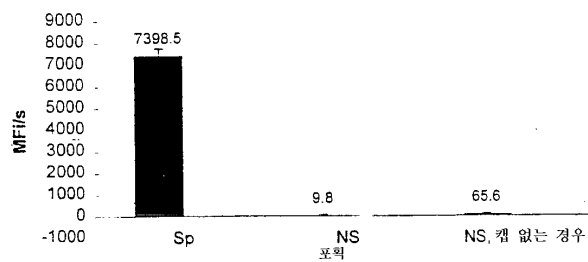
도면 16



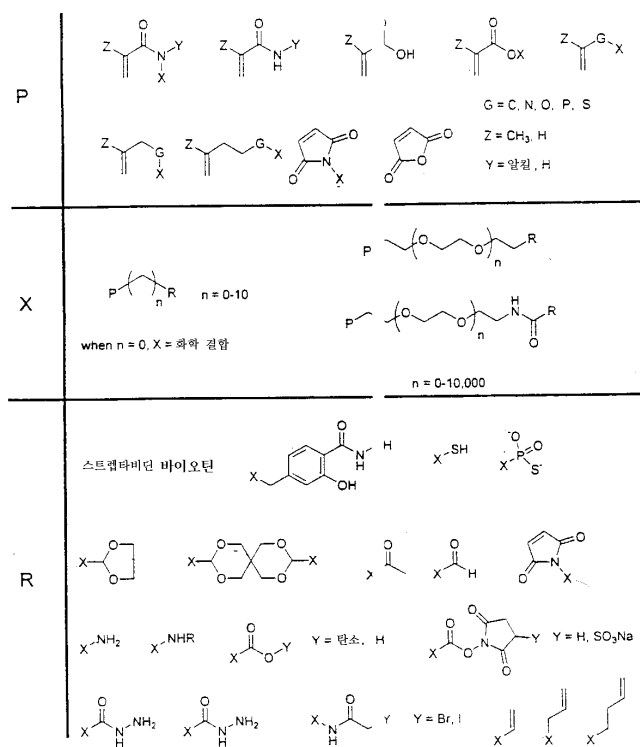
도면 17A



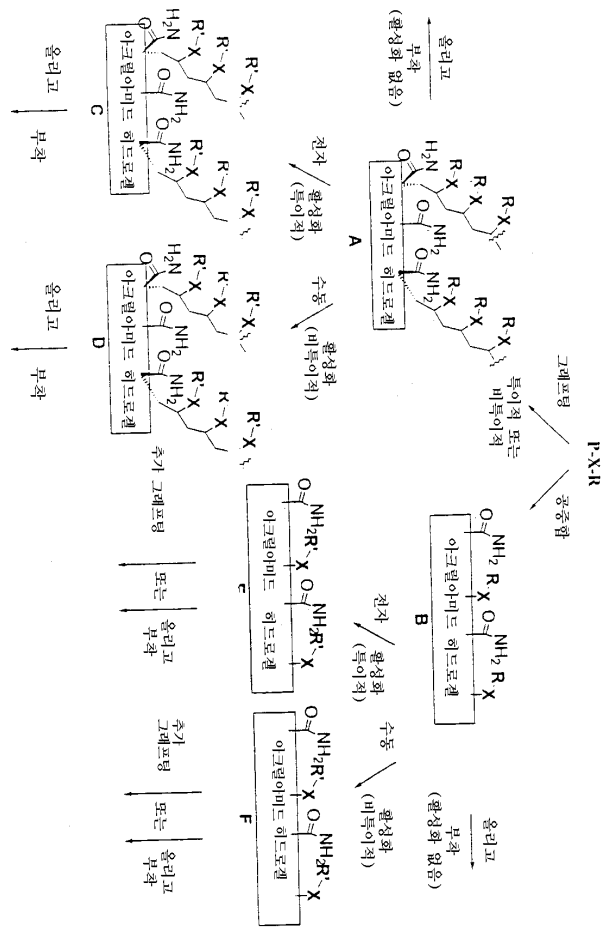
도면 17B

용액 그래프팅 방법으로 인가된 A 포획과
생체 분자의 특이적 및 비특이적 결합

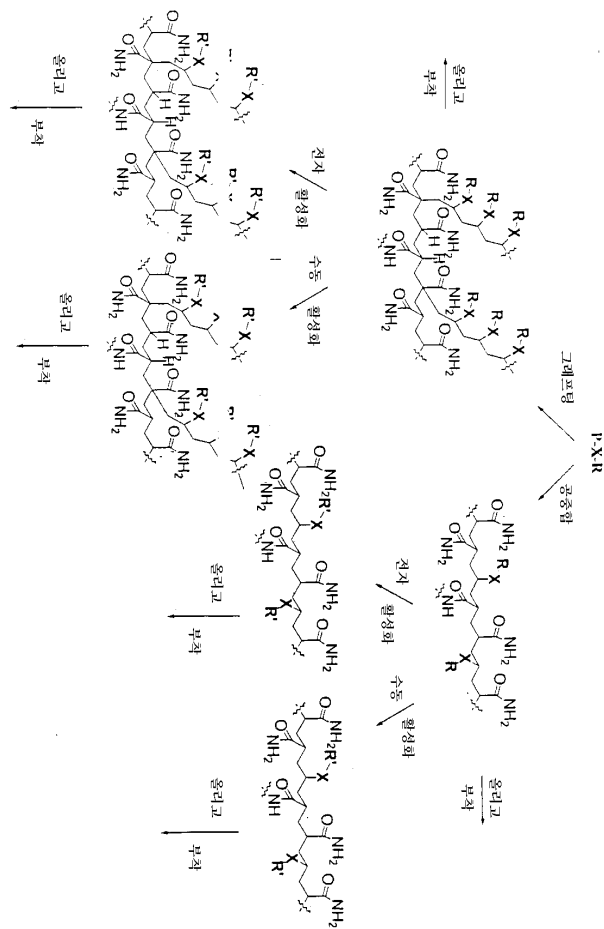
도면 18



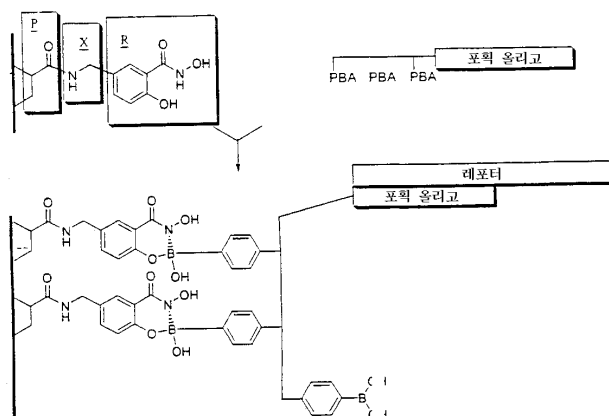
도면 19



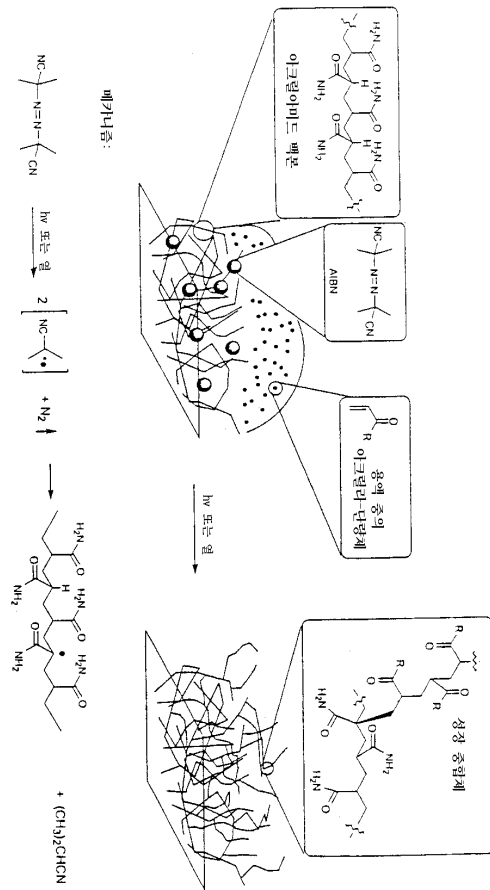
도면 20



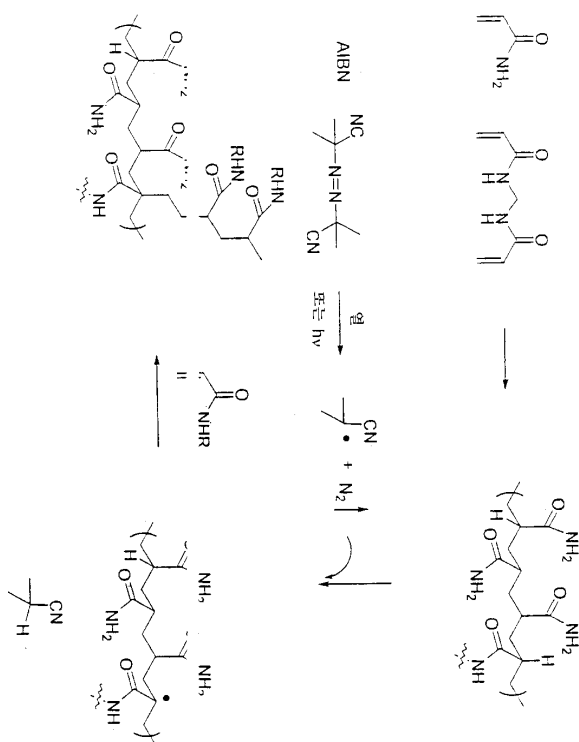
도면 21



도면 22A



도면 22B



도면 24B

프로모아세트아미드-SHA:
BTR 표지 프로브의 전자 부각

