

發明專利說明書

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※申請案號：91134938 ※IPC分類：C12G1/18 (2006.01)※申請日期：91.12.2

壹、發明名稱

(中文)掃描探針顯微尖端之核酸直接寫入奈米微影沉積

(英文)DIRECT WRITE NANOLITHOGRAPHIC DEPOSITION OF NUCLEIC
ACIDS FROM SCANNING PROBE MICROSCOPIC TIPS貳、發明人(共3人)發明人 1 (如發明人超過一人，請填說明書發明人續頁)

姓名：(中文)薛德 A. 米爾金

(英文)CHAD A. MIRKIN

住居所地址：(中文)美國伊利諾州伊凡頓市克拉克街 633 號西北大學

(英文)C/O NORTHWESTERN UNIVERSITY, 633 CLARK
STREET, EVANSTON, IL 60208, U.S.A.

國籍：(中文)美國 (英文)U.S.A.

參、申請人(共1人)申請人 1 (如申請人超過一人，請填說明書申請人續頁)

姓名或名稱：(中文)美國西北大學

(英文)NORTHWESTERN UNIVERSITY

住居所或營業所地址：(中文)美國伊利諾州伊凡頓市克拉克街 633 號

(英文)633 CLARK STREET, EVANSTON, IL 60208,
U.S.A.

國籍：(中文)美國 (英文)U.S.A.

代表人：(中文)印德尼 姆哈吉

(英文)INDRANI MUKHARJI

發明人 2

姓名：(中文)利奈特 M. 迪摩斯

(英文)LINETTE M. DEMERS

住居所地址：(中文) 美國伊利諾州伊凡頓市克拉克街 633 號西北大學

(英文) C/O NORTHWESTERN UNIVERSITY, 633 CLARK
STREET, EVANSTON, IL 60208, U.S.A.

國籍：(中文) 加拿大 (英文) CANADA

發明人 3

姓名：(中文)大衛 S. 金傑

(英文)DAVID S. GINGER

住居所地址：(中文) 美國伊利諾州伊凡頓市克拉克街 633 號西北大學

(英文) C/O NORTHWESTERN UNIVERSITY, 633 CLARK
STREET, EVANSTON, IL 60208, U.S.A.

國籍：(中文) 美國 (英文) U.S.A.

捌、聲明事項

本案係符合專利法第二十條第一項 第一款但書或 第二款但書規定之期間，其日期為：_____

本案已向下列國家(地區)申請專利，申請日期及案號資料如下：

【格式請依：申請國家(地區)；申請日期；申請案號 順序註記】

1. 美國；2001年11月30日；60/337,598

2. 美國；2002年03月07日；60/362,924

3. _____

主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；日期；案號 順序註記】

1. 美國；2001年11月30日；60/337,598

2. 美國；2002年03月07日；60/362,924

3. _____

主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

【格式請依：申請日；申請案號 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

(1)

玖、發明說明

(發明說明應敘明：發明所屬之技術領域、先前技術、內容、實施方式及圖式簡單說明)

本申請案請求2001年11月30日提出之臨時申請案序號60/337,598 (Mirkin等人之"Patterning of Nucleic Acids by Dip-Pen Nanolithography")之權益，其完整揭示在此併入作為參考。

本發明係在_____授權_____號下獲得政府支持而進行。政府對本發明具有特定之權利。

背景

奈米技術在生物學、生物化學、化學、醫學、基因學、診斷學、及治療學具有許多應用。除了產生完全新穎之技術，奈米技術亦預示進一步造成現有技術縮微至次奈米程度。現在經常將技術限於微米規模。例如，核酸微米陣列已以微米程度商業化用於生物學與基因學應用，包括編錄廣達基因組規模之基因表現(例如，參見A Primer of Genome Science, G. Gibson與S. Muse, 2002, 第3-4章)。目前之微米陣列包括cDNA與寡核酸苷型式。然而，現有將陣列製成更小之奈米規模之強烈商業需求，特別是小於約100奈米之橫向尺寸。換言之，需要具更高之樣品位置密度之核酸奈米陣列，其接近單分子、單層、及小於100奈米尺寸之大小。然而，用以製造微米陣列之製法通常無法製造奈米陣列。此外，現在用於這些陣列之機械人印刷遭受印刷針頭昂貴，易碎，趨於阻塞，均勻性不良，及在核酸自尖端散開時輸送乾果形斑點之趨勢。除了核酸陣列，陣列亦為重要的，而且有時組合之核酸與結構令人感興趣。

(2)

因此，需要達成商業程度奈米陣列製造且將微米陣列縮微化極限推進之新穎奈米技術。特別地，在進入單分子與單層領域時，及在進入商業市場時，在超越小於100奈米障礙時困難更為嚴重。

包括掃描探針顯微術(SPM)尖端之奈米尖端通常用以將奈米規模結構特徵化，但是較少發展其在奈米規模製造之用途。早期之製造嘗試並不成功。現有在奈米規模製造(例如，其包括可應用於生物學與非生物學技藝之奈米陣列製造)更佳地利用奈米SPM尖端之需求。SPM尖端特別令人感興趣，如果其可以分子程度直接寫入及將基材圖樣化。此程度之直接寫入之挑戰對於直接寫入生物化合物(包括核酸)特別重要。其需要可提供，例如，較佳解析度、較高再製力、較佳安定性、與較佳分子辨識與混成保留之改良。特別重要之挑戰為直接寫入單核酸線，其中分子大小與電荷效應為重要之因素，對未帶電之小分子通常較無關。已知直接寫入產生小規模之核酸結構，其中，例如，核酸吸附於現存之微影特點。儘管如此，直接寫入提供優於間接途徑之優點。

一種用於直接寫入奈米微影術之方法為DIP PEN NANOLITHOGRAPHY™印刷及沉積(即，DPN™印刷及沉積)，其進一步敘述於下且由西北大學之Mirkin小組及NanoInk, Inc.(伊利諾州芝加哥)發展。DPN™及DIP PEN NANOLITHOGRAPHY™為NanoInk, Inc.之商標。此方法相當多樣化且可使用易得之裝置進行。其通常不需要複雜之

(3)

沖模及光阻。儘管此技術迄今之成功，其仍需改良。

最後，亦因這些化合物辨識及結合互補核酸線(即，混成)之能力(其可提供功能性材料之"由下至上"奈米規模製造，包括分子電子與光子裝置)，造成產生奈米規模核酸特點之利益。DNA之設計材料合成敘述於，例如，Mirkin之Inorganic Chem., 2000, 39, 2258-2272; Mirkin之MRS Bulletin, 2000年1月，第43-54頁；及Storhoff等人之Chem. Rev., 1999, 99, 1849-1862。核酸之混成亦在表面固定DNA探針陣列之內容中討論，例如，Herne等人之J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 8916-8920; Levicky等人之J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 9787-9792。診斷學應用亦為重要的，例如，如Mirkin等人(Nanosphere, Inc.)之美國專利6,361,944所討論。

概要

在此部份歸納在此揭示之本發明，但是此概要不限制本發明之範圍，其於下進一步詳細敘述及申請。

簡言之，本發明提供一種藉直接寫入奈米微影術將核酸沉積在基材上之方法，其包含相對基材安置至少一個奈米尖端，使得尖端接近基材之步驟，其中將核酸自尖端轉移至基材而產生安定之核酸奈米規模圖樣，其可與互補核酸混成。

簡言之，本發明亦提供一種在基材上產生核酸之奈米規模圖樣之方法，其包含相對基材安置掃描探針顯微尖端，使得尖端在足夠高之相對濕度接近基材，使得將核酸自尖

(4)

端轉移至基材而形成奈米規模圖樣，其中在轉移前修改尖端以使核酸將尖端潤濕，及修改核酸以化學吸附或共價地鍵結至基材。

簡言之，本發明亦提供一種將經修改核酸直接圖樣化至基材上之方法，其包含以經修改核酸將掃描探針顯微尖端上墨，及接近基材安置上墨之尖端，使得足以進行核酸至基材之轉移而形成奈米規模圖樣之步驟，其中核酸係以提供化學吸附或共價地鍵結至基材之官能基修改，及官能基係經間隔基鍵結至核酸。

此外，本發明亦提供一種將經修改核酸直接圖樣化至基材上之方法，其包含安置經修改核酸上墨之掃描探針顯微尖端，及接近基材安置上墨之尖端，使得足以進行核酸至基材之轉移而形成奈米規模圖樣之步驟，其中核酸係經提供共價地鍵結至基材之親電子或親核官能基修改。

此外，簡言之，本發明提供一種在直接寫入奈米微影術時改良核酸自掃描探針顯微尖端至基材之轉移之方法，其包含修改尖端使其帶正電。

簡言之，本發明亦提供一種改良核酸自掃描探針顯微尖端至基材之直接寫入沉積之方法，其包含以一或更多種改良核酸對尖端之黏附性之組合物處理尖端之步驟。

簡言之，本發明亦提供一種組合奈米顆粒形成奈米規模圖樣之方法，其包含以下步驟：(a)藉直接寫入奈米微影術將第一核酸自奈米尖端沉積在基材上而形成具有約1,000奈米或更小之橫向奈米規模特點之沉積；(b)將核酸沉積

(5)

與奈米顆粒混成，其中奈米顆粒係以第二核酸(其為(1)對第一核酸互補，或(2)對將第二核酸鍵聯至第一核酸之鍵聯線之核酸互補)官能化。

此外，本發明亦提供一種組合奈米顆粒形成奈米規模圖樣之方法，其包含將基材上之核酸奈米規模沉積、含第一核酸之沉積、與奈米顆粒混成之步驟，其中奈米顆粒係以第二核酸(其為(1)對第一互補，或(2)對將第二核酸鍵聯至第一之鍵聯線之核酸互補)官能化。

此外，本發明提供一種在基材上之奈米規模核酸圖樣，其包含基材及在基材上之至少一種第一核酸圖樣，其中第一核酸圖樣化學吸附或共價地鍵結至基材，具有1,000奈米或更小之橫向尺寸，及可與對第一互補之第二核酸混成。

本發明提供一種核酸奈米陣列，其包含基材及在基材上之多個核酸圖樣，其中核酸圖樣化學吸附或共價地鍵結至基材，具有1,000奈米或更小之橫向尺寸且彼此分離1,000奈米或更小之距離，具有每平方公分至少100,000個之圖樣密度，及可與互補核酸混成。

此外，本發明亦包括一種物件，其包含其上具核酸之基材、核酸陣列、塗覆核酸之掃描探針顯微(SPM)尖端、用以塗覆SPM尖端之溶液、用於核酸之直接寫入奈米微影術之套件、及其電腦軟體。

本發明之基本及新穎特點(其在以下詳細討論)極多，而且包括此技藝已確立之DPN印刷之優點，其包括不需使用昂貴及可能破壞性之方法(如電子束與照相微影法)直接寫

(6)

入預設奈米規模特點之能力。如果需要，此結構亦可堆積而不使現有之結構退化。其無需複雜之沖模及光阻。亦可觀察到奈米微影術之一致性與安定性之改良。

圖式之簡要說明

圖1描述具己硫醇與聚乙二醇封端單線DNA之氮化矽尖端。

圖2描述DNA互補鍵聯劑線在奈米規模特點上直接顆粒組合之用法。非互補鍵聯劑線或無鍵聯劑線不發生顆粒組合。

圖3描述環形經二硫化物之修改DNA自經塗覆AFM尖端至金基材之運輸。

圖4描述DNA圖樣之橫向力顯微照片。藉由在大氣控制槽中改變相對濕度而完成對DNA圖樣大小之控制。

圖5描述經由指定DNA混成交互作用在圖樣上組合之DPN(線)與13奈米金奈米顆粒，在金上產生之DNA圖樣之穿刺模式AFM照片。

圖6描述藉DPN印刷將DNA直接轉移至金基材上。(A)在多晶金上圖樣化之經己硫醇修改寡核苷酸之穿刺模式AFM照片。尺規表示2微米，及箭頭間之空間為150奈米。(B)在互補鍵聯DNA存在下，藉Watson-Crick基配對結合金上高解析度DNA株之單經寡核苷酸修改金奈米顆粒(直徑13奈米)之穿刺模式AFM照片。尺規表示1微米。

圖7描述在暴露於預混24基鍵聯劑序列(其不與圖樣化DNA互補)之經寡核苷酸修改金奈米顆粒(直徑13奈米)後，

(7)

在多晶金上圖樣化之經己硫醇修改寡核苷酸之穿刺模式AFM照片。

圖8描述經DPN印刷將經己硫醇修改寡核苷酸直接轉移至多晶金基材上。(A)在ODT處理後，圖樣化表面之橫向力原子力顯微照片，(B)在ODT處理後，DNA圖樣之穿刺模式AFM照片。

圖9描述以下之穿刺模式AFM照片：(A)在互補鍵聯DNA(L1)存在下，經Watson-Crick基配對結合C1之DNA株(50奈米寬)之單經G1修改金奈米顆粒(直徑13奈米)，(B)在L1存在下，經混成結合厚DNA株之經G1修改金奈米顆粒。

圖10描述在絕緣基材上之DNA直接DPN轉移。(A)在 SiO_x 表面上與互補寡核苷酸之DPN產生之圖樣混成之經螢光團標記DNA(Oregon Green 488-X)之表面螢光照片。尺規表示12微米。(B)在移除(使用DI水)經螢光團標記DNA後，與第二高解析度圖樣混成之經寡核苷酸修改金奈米顆粒(直徑13奈米)之穿刺模式AFM照片。尺規表示1.5微米，及箭頭間之空間為100奈米。

圖11描述 SiO_x 基材之DPN印刷官能化之略示。(A)矽晶圓係以3-硫醇丙基三甲氧基矽烷處理，(B)塗覆DNA之AFM尖端在短暫接觸時(數秒)將經丙烯醯胺修改DNA輸送至基材。

圖12描述對沉積DNA特點大小之DPN印刷控制。(A)在45%相對濕度以不同之接觸時間沉積在金基材上之經硫醇修改DNA之穿刺模式AFM照片。(B)相對接觸時間平方根繪製之斑點直徑(得自A及複製之實驗)。誤差區係由至少5點

(8)

之標準差計算。

圖 13 進一步描述對沉積特點大小之 DPN 印刷。(A) 在 45% 相對濕度以不同之接觸時間在金基材上噴點之經硫醇修改 DNA 之穿刺模式 AFM 照片(上), 及點直徑相對接觸時間平方根之圖(下)。(B) 與在 45% 相對濕度以不同之接觸時間在 SiO_x 上形成之 DNA 斑點混成之奈米顆粒之穿刺模式 AFM 照片(上), 及點直徑相對接觸時間平方根之圖(下)。(A) 與 (B) 之尺規表示 2 微米。(C) 在不同之相對濕度以每點 10 秒之接觸時間在多晶 Au 上產生之 DNA 斑點之穿刺模式 AFM 照片(上), 及點直徑相對相對濕度之圖(下)。尺規表示 1 微米。所有圖之誤差區係由至少 5 點之標準差計算。

圖 14 描述 DNA 運輸速率之濕度依附性。(A) 由 30-46% 相對濕度 (RH) 以 10 秒/點之接觸時間在多晶 Au 上產生之 DNA 斑點之穿刺模式 AFM 照片(下至上); (B) 與由 50-80% 相對濕度以 10 秒/點之接觸時間產生之 DNA 斑點混成之 13 奈米金顆粒(下至上); (C) A 與 B 中之點之斑點直徑相對相對濕度。

圖 15 描述多 DNA 墨水藉 DPN 印刷之直接圖樣化。(A) 在 SiO_x 基材上藉 DPN 印刷同時與二序列陣列混成之兩種經螢光團標記序列 (Oregon Green 488-X 與 Texas Red-X) 之組合紅-綠表面螢光照片。(B) 在經螢光團標記 DNA 去混成後, 以相同圖樣組合之 5(暗)至 13(亮)奈米直徑金奈米顆粒之穿刺模式 AFM 照片。尺規表示 4 微米。(C) 對角地通過兩個奈米圖樣而取得線圖, 及起點與終點以 (B) 中之箭頭表示。尺規表示 4 微米。

圖 16 描述圖樣化金基材之 AFM 照片。(A) 在 ODT 鈍化後，DNA 圖樣 C1 (正方形點陣列) 及 C2 (三角形點陣列) 之穿刺模式 AFM 照片。(B) 各在 L1 及 L2 存在下，選擇性地與 C1 及 C2 DNA 圖樣混成之 13 奈米及 30 奈米直徑金奈米顆粒之穿刺模式 AFM 照片。(C) 在與 13 及 30 奈米直徑顆粒混成後，顯示橫越 A 中圖樣之高度外形之線掃描。

詳細說明

DPN 印刷、圖樣化、及沉積方法係揭示於，例如，以下得自 Mirkin 小組之參考資料，其在此全部併入作為參考：
(1) Piner 等人之 Science, 283, 1999 年 1 月 29 日，第 661 頁；
(2) Hong 等人之 Science, 286, 1999 年 10 月 15 日，第 523 頁；
及 (3) Hong 等人之 Science, 288, 2000 年 6 月 9 日，第 1808 頁。
此外，技術刊物 Demers 等人之 "Direct Patterning of Modified Oligonucleotides on Metals and Insulators by Dip-Pen Nanolithography", Science, 第 296 卷，2002 年 6 月 7 日，第 1836-1838 頁，亦在此全部併入作為參考，包括其中所列之支持連線材料。核酸之 DPN 印刷與圖樣化，及奈米顆粒核酸探針，已示於以下之參考資料，其在此全部併入作為參考：(1) C.A. Mirkin 之 Mater. Res. Soc. Bull., 25, 43 (2000)，(2) C.A. Mirkin 之 Inorg. Chem., 39, 2258 (2000)。

2001 年 11 月 30 日提出之 Mirkin 等人之臨時專利申請案序號 60/337,598，發明名稱 "Patterning of Nucleic Acid by Dip Pen Nanolithography" 在此全部併入作為參考。

亦在此全部併入作為參考為 L.M. Demers 之西北大學博

士學位論文，2002年6月，"Nanolithography and Biomolecular Recognition as Tools for the Directed Assembly and Study of Particle-Based Materials," 第6章，"Direct-Patterning of DNA via Dip-Pen Nanolithography"。

DPN印刷相關材料、裝置、儀器、軟體、與硬體，及諮詢，亦得自NanoInk, Inc.(伊利諾州芝加哥)。

在此併入作為參考之SPM探針及核酸沉積等相關之其他技術刊物包括：(1) "Meniscus Force Nanografting: Nanoscopic Patterning of DNA," Schwartz, Langmuir, 2001, 17, 5971-5977; (2) "Molecular Transport from an Atomic Force Microscope Tip: A Comparative Study of Dip-Pen Nanolithography," Schwartz, Langmuir, 2002, 18, 4041-4046; 及(3)Mirkin、Schwartz等人之國際PCT公告日期2002年6月6日之WO 02/45215 A2專利，"Nanolithography Methods and Products Therefor and Produced Thereby。" 例如，後者之PCT刊物揭示使用包含核酸與鹽之圖樣化溶液，其包括陽離子界面活性劑與銨化合物，例如，三-十二碳基甲基胺。此溶液亦可為水性或可用以塗覆SPM尖端。

生物分子在材料應用中之角色揭示於以下之參考資料，其此併入作為參考：(1) J.J. Storhoff、C.A.Mirkin之Chem. Rev., 99, 1849 (1999); (2) C.M. Niemeyer之Angew. Chem. Int. Ed. 40, 4128 (2001)。

在2001年5月24日頒發之美國專利09/866,533(亦參見2002年5月30日公告之Mirkin等人之對應美國專利公告US

2002/0063212 A1)中，詳細敘述涵蓋廣泛種類具體實施例之DIP PENTM奈米微影印刷背景及步驟，例如，其包括：

- 背景(第1-3頁);
- 概要(第3-4頁);
- 圖式之簡要說明(第4-10頁);
- 奈米掃描探針顯微尖端之用途(第10-12頁);
- 基材(第12-13頁);
- 圖樣化合物，包括寡核酸、DNA與RNA(第13-17頁);
- 實行方法，例如，包括塗覆尖端(第18-20頁);
- 儀器，包括奈米繪圖機(第20-24頁);
- 多層及相關印刷與微影法(第24-26頁);
- 解析度(第26-27頁);
- 陣列及組合陣列(第27-30頁);
- 軟體及校正(第30-35; 68-70頁);
- 套件及其他物件，塗覆疏水性化合物之尖端(第35-37頁);
- 七個作業例(第38-67頁);
- 對應之申請專利範圍及摘要(第71-82頁); 及
- 圖式1-28。

所有以上之文字，包括上列各細目(包括圖式)，在此全部併入作為參考且形成本揭示之一部份以支持申請專利範圍。

此外，Mirkin等人之美國專利公告20020122873 A1(2002年1月28日提出之申請案序號059,593)(2002年9月5日公告)

亦在此全部併入作為參考。例如，其揭示使用驅動力控制沉積或圖樣化化合物自奈米掃描探針顯微尖端至基材之移動。其亦揭示具有內孔之尖端及限制沉積或圖樣化化合物自尖端至基材之移動之穿孔。沉積或圖樣化化合物通過穿孔之移動速率與程度可藉驅動力控制。核酸可藉此方法沉積或圖樣化，例如，使用吸引帶負電核酸之帶正電基材。可使用奈米微影法及鋼筆奈米微影法如在此所述沉積或將核酸圖樣化。

亦可採用DIP PEN奈米微影印刷及上述步驟、儀器、與作業例，產生改良之核酸及在此進一步所述之DNA物件與奈米陣列。如在此進一步所述，核酸可廣泛地改變，但是特別地，特別感興趣之寡核酸苷為經修改或具有提供對基材表面共價鍵結或化學吸附之化學結構之寡核酸苷。

為了將核酸自奈米尖端轉移至基材成為圖樣或沉積，基材及尖端彼此相對地移動，使得其彼此接近。尖端可朝向基材移動，基材可朝向尖端移動，或尖端與基材均朝向彼此移動。

通常可使用可自尖端至基材輸送、圖樣化或沉積奈米、次微米量核酸圖樣化化合物之奈米、次微米尖端。雖然奈米尖端設計並未特別地限制，奈米尖端可具有尖錐或實質上尖錐端點，其特徵為奈米、次微米程度尺寸而非微米尺寸。例如，可有奈米程度尖端寬度、孔穴、或穿孔直徑。通常可將奈米結構照相及沉積奈米結構之奈米尖端較佳。可使用SPM尖端，及SPM尖端之較佳型式為原子力顯微

(13)

(AFM)尖端。通常可使用設計使得其可在外表面上塗覆墨水之尖端，例如，原子力顯微尖端。或者，尖端可為中空，其包括具有穿孔開口之尖端或NSOM尖端。如果需要，可連續地輸送墨水。可使用尖端陣列，如此技藝所已知，其中如所需個別地控制或整體地操作各尖端。尖端可連接懸臂或其功能等致物。

可使用已知之SPM及AFM法，例如，其包括接觸、非接觸、穿刺、及橫向力模式。

在研究核酸自SPM尖端至基材之直接轉移時，許多因素為重要的，其可促進核酸圖樣化成為一致、高品質圖樣化。這些因素亦在作業例部份中進一步討論。

首先，例如，尖端可完全以塗覆核酸。例如，習知氮化矽AFM懸臂之表面修改可促進核酸墨水對尖端表面之可靠黏附性。例如，參見圖1，可在尖端表面修改尖端以帶正電荷，例如，其包括胺基或銨基之正電荷。可使用單或多步驟方法產生設計用於核酸沉積之尖端。例如，可進行使尖端在後續步驟官能化之預處理步驟。例如，可修改尖端以提供羥化表面，然後進一步將羥基官能化。尖端可經強酸與過氧化物處理，例如，其包括硫酸與過氧化氫。在預處理後可藉由以，例如，矽烷偶合劑(如胺基矽烷偶合劑、3'-胺基丙基三甲氧基矽烷)處理尖端(例如，在1% v/v甲苯溶液中1-2小時)，而完成尖端官能化。

然後以核酸塗覆矽烷化尖端。塗覆可使用包含核酸與鹽之溶液進行。溶劑可為非質子溶劑，如DMF，其更可如所

(14)

需混合水。通常可使用較多之非質子溶劑而非水，例如，使得溶劑之約70%至90%重量比為非質子。鹽可為無機鹽，如第II族鹽或鹵化物鹽，例如，其包括氯化鎂。鹽之濃度可為，例如，約0.01 M至約0.4 M，更特別是約0.1 M至約0.2 M。可改變鹽對核酸之比例以提供良好之沉積條件與良好之奈米結構。核酸之濃度可為，例如，約0.1 mM至約10 mM，而且更特別是約0.5 mM至約5 mM。

尖端可藉由將其浸入核酸尖端塗料溶液中如所需少於1分鐘，例如，約20秒(參見作業例)，然後以壓縮氣體(例如，二氟乙烷)短暫地吹乾而處理。以此方式製備及塗覆核酸之AFM尖端在重新塗覆前可用於此所述之直接寫入印刷實驗數小時。此外，可重新塗覆尖端及再度用於相同之核酸序列。

其次，控制周圍相對濕度可提供一致、高品質之核酸直接寫入圖樣化。相對濕度可控制於高到足以提供核酸自尖端至基材之轉移。通常可使用至少約25%之相對濕度，而且更特別是約25%至約100%，而且更特別是約40%至約100%，而且更特別是約40%至約50%。例如，周圍圖樣化可在 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ， $45 \pm 5\%$ 相對濕度之控制環境手套工作箱中實行。相對濕度可基於其他沉積因素而控制，其包括核酸本性、基材本性、所需圖樣本性(例如，點或線)、用以潤濕尖端之核酸溶液本性、尖端本性等。彎月面之角色對使用SPM尖端之直接寫入奈米微影印刷為重要的，而且彎月面之大小與相對濕度有關。

(15)

除了塗覆尖端及濕度，墨水-基材組合之選擇亦有利於使核酸之直接寫入成為一致、高品質特點。例如，可修改核酸以包括化學吸附或共價地鍵結至基材之官能基。其可使用許多種方法。例如，用於結合基材之官能基可直接鍵結至核酸或可藉相當彈性之間隔基鍵聯核酸。間隔基之實例包括彈性鏈寡聚物，如烷二醇，例如，聚乙二醇或聚丙二醇。例如，其可具有3-20個伸烷氧基重複單位。官能基可為，例如，設計為化學吸附金表面之含硫部份，如硫醇或二硫化物。此步驟可用以將經環形二硫化物修改核酸及經三硫醇修改核酸圖樣化。硫原子可結合烴基，例如，烷基，其包括C₄-C₁₈烷基。官能基可為，例如，設計以反應親核表面之親電子基，或設計以反應親電子表面之親核基。例如，可使用Michael加成反應將核酸鍵結至基材。

例如，可使用經己硫醇、PEG寡核酸苷將具有大小範圍為約50奈米至數微米之特點之金表面直接圖樣化。核酸之己硫醇基可提供對底下Au表面之化學吸附。可使核酸經官能基修改以連接基材之其他具體實施例包括(1)硫代磷酸基(例如，參見美國專利5,472,881)，(2)經取代矽氧烷，其包括胺基矽氧烷與氫硫烷基矽氧烷，(3)美國專利6,361,944所述之具體實施例，其在此併入作為參考。核酸型式及其可行修改亦進一步敘述於下。

基材可經處理，所以其在基材上包含核酸與鈍化劑。例如，在以核酸將基材圖樣化之後，將其鈍化。在一個鈍化具體實施例中，基材之未圖樣化區域可經鈍化劑處理以降

低基材之未圖樣化區域在進一步處理時之反應性。可因許多原因進行鈍化，例如，其包括改良偵測圖樣化核酸之分析。例如，如果需要以互補核酸將核酸混成，則可經鈍化改良核酸圖樣化區域與未圖樣化區域間之交互作用之選擇性。鈍化可藉由將圖樣化基材浸於溶液中，其中溶液含如烷屬烴硫醇之鈍化劑，其可選擇性地吸附於如金之基材之未圖樣化區域。因此，鈍化劑可包含一個提供化學吸附或共價地鍵結未圖樣化區域之反應性官能基，但不具有其他之官能基。例如，鈍化劑可包含長鏈烷基，其在吸附時將甲基暴露於通常對後續處理(如核酸混成)為非反應性之表面。例如，鈍化可使其餘之基材為疏水性。例如，已以核酸圖樣化之金基材可浸於1-十八碳硫醇(ODT, 1 mM)之乙醇溶液中1分鐘。此步驟將未圖樣化金表面塗以疏水性單層，使其在後續混成實驗中對DNA或經DNA修改奈米顆粒之非特定吸附鈍化。

通常鈍化劑可置換圖樣化核酸，如果未將核酸官能化以化學吸附或共價地鍵結至基材。例如，不含硫醇部份之核酸可在ODT處理時自表面置換。

在另一個鈍化具體實施例中，首先以鈍化劑將基材圖樣化，繼而以核酸圖樣化。換言之，基材在圖樣化之前鈍化。例如，基材可經鈍化劑處理，例如，可結合寡核酸苷與其他核酸之抗吸附水凝膠。可使用微米陣列技藝已知之鈍化劑。

例如，在基材鈍化(例如，ODT處理)後，核酸圖樣可藉

(17)

穿透模式AFM照相。此照相可提供高度測量。通常藉AFM或類似技術測量之核酸圖樣之特點高度可為，例如，約100奈米或更小，或更特別是約10奈米或更小。對於寡核酸苷，例如，高度可為約2奈米至約5奈米。

為了證明圖樣化之固定核酸可保留其高特定辨識性質且可混成，可使用核酸圖樣導引包含互補核酸之奈米顆粒之組合(例如，參見圖2)。可經此方法製造微米至小於100奈米長度規模之結構。如此提供之高解析度可控制將個別顆粒置於預設架構形式之表面上。圖樣上之核酸密度亦可高到足以以緊密充填配置結合奈米顆粒。

在顆粒組合中，可應用三成分系統：(1)圖樣化核酸，(2)鍵聯劑核酸，及(3)結合顆粒之核酸，如圖2所述，而且進一步敘述於作業例(以下使用之C、G與L型核酸之簡寫亦參見其中)。在此方中有可遺留或以非互補序列置換鍵聯劑之內建對照實驗。在此對照實驗中，例如，經15體DNA(G1)修改之金奈米顆粒可與30體寡核酸苷L2(其中前15基對結合顆粒之DNA互補)混成。然而，鍵聯劑之自由15基片段不必對圖樣化表面C1上之DNA互補(少於4個連續基重疊)。

經DNA圖樣化表面可在混成條件下(例如，0.3 M PBS，0.025% SDS，3小時，室溫)暴露於非互補顆粒鍵聯劑溶液，但是顆粒僅在最多數處結合圖樣。混成條件在此技藝為已知的且敘述於，例如，美國專利6,361,944，其在此併入作為參考。因為使用此照相模式可得ODT單層、DNA圖樣及金顆粒間之較佳對比，可使用相AFM照片而非地形照片

(18)

。因此，即使無嚴厲(較高溫)清洗，DNA奈米顆粒與經寡核酸苷修改奈米顆粒間之交互作用亦為高選擇性，其排除經非互補DNA修改之顆粒之吸附。相反地，在其中存在正確互補鍵聯劑或寡核酸苷之樣品上可觀察到高顆粒密度。

基材上圖樣化核酸奈米結構之安定性可藉由使用顆粒組合之圖樣化表面，在將其在周圍條件下儲存超過3個月之後測試。重要地，高顆粒吸附比程度表示圖樣大部份原封不動，及一些由於核酸降解或經硫醇修改核酸自表面流失造成之混雜區域。此外，結合晶片之ODT單層區域之奈米顆粒數量有少量增加(新鮮樣品呈現近乎完美之無顆粒背景)。如果將樣品儲存在黑暗之惰性大氣中以使空氣及/或硫醇-Au鍵聯之光氧化最少，則得到顆粒背景之大量減少。

DPN印刷之重要特點為產生大長度規模範圍(小於100奈米至數微米)之特定化學官能基圖樣，同時呈現精細控制特點大小之能力。使用在此所述之方法，可以與小疏水性分子非常相同之方式將如核酸與寡核酸苷之高帶電巨分子自SPM尖端轉移至基材。

特別地，使用在此所述之方法，圖樣點度可如尖端表面接觸時間之函數而增加，或可因緩慢之繪圖速度而增加線寬。例如，可將相對濕度保持固定於，例如，45%，及可藉由將經C1 DNA塗覆AFM尖端保持在Au基材上之不同處固定之接觸時間(在範圍為0.1秒至100秒之各接觸時間最少5點)而形成核酸斑點。在這些條件下，自AFM尖端至表面之DNA運輸可在圖樣區域依照以理論模擬所預測及對較

小分子所實驗地觀察之接觸時間(斑點直徑 $\sim t^{1/2}$)之相同線性增加。雖然各墨水基材對之速率常數不同，其強調對照之DPN印刷可在許多基材上提供範圍為小分子與鹽至有機帶電巨分子之圖樣化合物。

金基材上之核酸圖樣形成速率可使用在此所述之方法以小心之濕度控制調整。為了描述及將此效應量化，藉由將尖端保持接觸金基材，例如，約10秒，同時在手套工作箱中改變各點之相對濕度(RH)而形成一系列點。例如，濕度可藉由通過水容器將氮起泡且使蒸氣流入箱中而增加。濕度可藉自動控制器保持穩定，其交替地使無水氮或經水飽和氮通過箱。在製造圖樣之前，各點可在置於箱頂及底板之液體比重計讀取相同之值($\pm 0.5\%$)後，使濕度平衡，例如，至少5分鐘。在兩個分別之具體實施例(不同基材不同日數，但是使用相同之AFM尖端及DNA序列C1)，將RH由約30%變動至約46%。因此，特點大小可使用濕度控制在合理時間規模之大動態範圍變動。例如，將AFM尖端保持10秒而製造之斑點直徑可隨50%之RH增加由小於50奈米變動至1000奈米。此外，可完備地界定相對濕度在特定接觸時間對圖樣點度之效應。在約30-80% RH之濕度範圍，圖樣面積可約略地隨相對濕度平方變動(或斑點直徑 $\sim RH$)。應注意，在提高及降低濕度時可觀察到最小滯留。此DNA圖樣化濕度依附性通常關於自AFM尖端至表面之DNA運輸機構，其視尖端與基材間之水彎月面而定。此外，點度相對濕度之繪圖可顯示在室溫有DNA無法在約25°C經DPN印刷直

(20)

接圖樣化之最小濕度(例如，在23°C之x截距~27% RH，如作業例、圖13與14所示)。最後，對於在不同基材及日數上實行之實驗，通過在高與低濕度條件下得到之點繪製之線性迴歸線強調濕度提供之控制。

DPN印刷固有之有利性質之一為以高對位產生多種墨水之奈米規模圖樣之能力。為了證明多核酸墨水能力，可使用DPN印刷製備二成分核酸陣列。為了使兩種不同之經硫醇修改DNA墨水C1與C2之圖樣對齊而不交互污染，例如，首先使用硫醇16-氫硫基十六碳酸(HMA)經DPN印刷在金基材上之兩個不同之位置劃出對齊標記。在圖樣化之前，在低濕度(RH~25%，在這些條件下DNA不運輸)使用經C1塗覆尖端將MHA標記照相以計算相對MHA圖樣之抵消座標。其次提高濕度(例如，45%)，及產生間隔例如約2微米之正方形點(例如，直徑~760奈米)陣列。同樣地，可藉由再度在低濕度以塗覆尖端將MHA對齊標記照相，計算抵消座標，然後提高濕度及圖樣化，例如，100奈米直徑點之三角形陣列，而將由C2組成之第二圖樣對齊第一圖樣。在將核酸與墨水圖樣化之後，基材之未圖樣化區域可藉ODT處理鈍化及藉穿刺模式AFM照相。為了證實圖樣之化學整體性及活性，可將晶片暴露於經13奈米G1修改金顆粒之溶液，其在混成條件下與L1(對C1圖樣互補)混成2小時。然後在45°C以PBS緩衝液及0.025% SDS沖洗基材，然後暴露於經30奈米G1修改金顆粒，其與L2(對C2圖樣互補)混成。顆粒可以正確圖樣選擇性地組合而在DNA斑點或背景無交互污

(21)

染之證據。此具體實施例不僅顯示如何在基於AFM之篩選步驟中使用奈米顆粒作為診斷探針，亦顯示可使用經直接寫入DPN印刷法製造之奈米結構控制奈米顆粒為主架構之組合。

DPN印刷技術經常在金基材上進行，由電子與光學材料應用之觀點，其在某些情形為不希望的。金-硫醇系統提供使用DPN印刷將寡核酸苷圖樣化之有用方法。然而，金基材之導電度妨礙在此表面上組合之奈米結構中電荷運輸及近場光學現象之研究，而且更將來自任何表面結合螢光團之發射消光。為了解決這些議題，及造成組合之奈米結構之電及光學特徵化，可使用DPN印刷將電絕緣表面(例如，氧化矽晶圓)上之核酸圖樣化。

熱氧化晶圓之表面可藉由以官能基矽烷偶合劑(例如，3'-氫硫丙基三甲氧基矽烷(MPTMS))處理而活化。AFM尖端之製備及上墨可如在金表面上將DNA圖樣化而實行，然而，可使用具5'-終端丙烯醯胺基之寡核酸苷(C3與C4)取代具終端己硫醇修改之寡核酸苷。在室溫及45%相對濕度之DPN印刷條件下，丙烯醯胺部份可經Michael加成與MPTMS之側接硫醇基反應，而將核酸共價地鍵聯至表面。此外，氧化矽基材上之核酸圖樣形成顯示如金基材之類似尖端表面接觸時間依附性。在圖樣化之後，基材可藉由與pH 10之緩衝丙烯酸單體(例如，Apogent Discoveries硫醇消光緩衝液)反應而鈍化。圖樣化C3寡核酸苷之生物活性可藉由使表面暴露於含互補經螢光團標記DNA (L3F)之溶液而證實。繼



而藉表面螢光顯微術將圖樣特徵化。使用此步驟在矽上產生之DNA奈米結構亦可用以導引經互補DNA修改金奈米顆粒(經G2修改)之組合。以此技術，可在氧化矽表面上產生DNA斑點且偵測為~200奈米之直徑，其比習知微米陣列小10,000倍(就區域密度而言)。

接受直接寫入奈米微影術之核酸並未特別地限制。例如，核酸可合成地製造，修改以包括，例如，調整化學吸附或共價鍵結至基材之官能基，及自然地發生。其可為低、中、或高分子量，寡聚或聚合。其可為單-、雙-、或甚至三-線。核酸可基於去氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、或其組合。核酸之結構大致敘述於，例如，Calladine與Drew之 Understanding DNA, The Molecule and How it Works，第2版，1997。

可藉DPN印刷圖樣化之核酸之一般型式包括，例如，DNA、RNA、PNA、CNA、RNA、HNA、p-RNA、寡核酸苷、DNA之寡核酸苷、RNA引子之寡核酸苷、引子、A-DNA、B-DNA、Z-DNA、DNA之多核酸苷、RNA之多核酸苷、核酸之T-匯合、非核酸聚合物域-核酸嵌段共聚物、及其組合。核酸之其他一般型式包括，例如，病毒RNA或DNA、結合疾病之基因、細菌DNA、真菌DNA、來自生物基之核酸、多脢鏈反應放大產物之核酸、接觸奈米顆粒之核酸、及雙線及與奈米顆粒上之寡核酸苷混成而產生三線複合物之核酸。

通常，核酸可為在遺傳資訊之儲存及複製、及在此資訊

(23)

經蛋白質合成之表現中扮演中樞角色之細胞及病毒中發現之任何有機物質。嘌呤、嘧啶、碳水化合物、及磷酸通常將核酸之基本有機物質特徵化。嘌呤與嘧啶為核苷，一種其中2-去氧基-D-核糖或D-核糖之第一羥基被正磷酸酯化之核苷。核苷為其中嘌呤或嘧啶基經N-原子結合至C-1取代2-去氧基-D-核糖或D-核糖之羥基，但無任何磷酸基之化合物。生物系統中常見之核苷為腺苷、鳥苷、胞苷、與尿苷(其含核糖)，及去氧腺苷、去氧鳥苷、去氧胞苷、與胸苷(其含去氧核糖)。因此，嘌呤基可為腺嘌呤核苷或鳥嘌呤核苷。嘧啶基可為胸腺嘧啶核苷、胞嘧啶核苷、或尿嘧啶核苷。

核酸之順序可為隨機或特定以將所需之胺基酸結構編碼。例如，三個核苷一組可包含密碼子。一個密碼子包含胺基酸。核酸之編碼區包含密碼子。

核酸可自由地存在，或可結合肽或蛋白質形成不連續束或結構化型式之核蛋白，例如，染色體。核酸亦可以單線或雙線形式存在。核酸亦可為線形、環形或超螺旋。核酸可直接自細胞或細胞器隔離。質體或無性繁殖載體亦為核酸之實例。

核酸可由核苷組成，其各含碳水化合物糖(去氧核糖)、磷酸基、及含氮嘌呤與嘧啶基之混合物。糖可具有環形或非環形形式。DNA僅包含胸腺嘧啶與胞嘧啶而無尿嘧啶。DNA可自細胞隔離成基因組、核、或線粒體DNA，或合成地製造，即，藉化學方法。

(24)

存在於細胞中之基因一般包含由DNA外顯與內含段組成之基因組DNA。外顯段含包含將胺基酸編碼之密碼子之核酸苷，而DNA內含段不含包含將胺基酸編碼之密碼子之核酸苷。嘌呤與嘧啶之核酸苷序列決定此基因指定之蛋白質多肽鏈中之胺基酸序列。

DNA亦可藉RNA-相關DNA聚合酶之作用隔離成由RNA樣板製成之互補或複製DNA (cDNA)。例如，cDNA可為得自PCR放大之約100-800體線。如果以已處理RNA樣板以移除內含子，則cDNA與轉錄RNA之基因不相同。因此，cDNA可包含本性主要為外顯之核酸苷段。

在雙線形式中，兩個DNA線形成雙螺旋。在此螺旋中，單線中之各核酸苷鍵結至另一線之指定核酸苷。因此，在DNA中，腺嘌呤鍵結胸腺嘧啶且鳥嘌呤鍵結胞嘧啶。存在於各線中之核酸苷彼此結合之能力決定線是否互補，例如，對於一條線上之每個腺嘌呤，在另一條線上是否有胸腺嘧啶。

RNA通常類似DNA，但是含糖苷而非去氧糖苷及尿嘧啶基而非胸腺嘧啶。RNA可為單線或雙線且自細胞之DNA轉錄。RNA分子可形成髮簪迴圈或其他之雙線結構。RNA可為樣板RNA、信使RNA (mRNA)、總RNA、或轉移RNA (tRNA)多核糖體。RNA-DNA混成分子可依照本發明沉積。此外，依照本發明亦可使用蛋白質-核酸，或"肽核酸" ("PNA")。

互補核酸苷間呈現之結合性質使核酸可作為結合其他核

酸之探針。可將核酸標記及作為探針。藉由任何線標記技術，核酸探針可用以藉混成偵測另一個核酸。如果標記為，例如，螢光、放射線活性、或酶標記，則此混成可目視化或偵測。因此，本發明之核酸亦可標記或修改以包含可偵測個體，如螢光標記或標籤、金顆粒、鏈親和素、洋地黃毒苷、磁性顆粒、或熟悉此技藝者已知之其他標記。例如，參見Landes之美國專利4,626,501 ("Labeled DNA")，其在此併入作為參考。

亦可修改核酸苷與核酸使得保護其對抗核酸降解。例如，可將核酸封包於脂質體內。或者可藉由取代核酸苷之磷基將硫醇基加入多核酸苷中，如RNA或DNA分子中。在如此加入核酸之"主幹"中時，硫醇可防止DNA在此位置分離，因此改良核酸分子之安定性。

Cook等人之美國專利5,965,721亦併入作為參考，其揭示可圖樣化且可具有改良核酸酶抗性與改良細胞攝取之寡核酸苷。

因此，核酸處理之活體內生物可用性可藉由如所述修改核酸而改良。例如，經修改核酸調配物可具有比未修改核酸增加之半生期及/或長期保留在血漿中。例如，核酸與聚乙二醇之調配物亦可活體內增加核酸之半生期，如同任何已知之緩慢釋放核酸調配物。因此，修改核酸可活體內增加核酸之效果及/或其生物可用性。

核酸之大小範圍可大幅變化，由數個核酸苷至寡核酸苷或探針至多核酸苷、基因、染色體碎片至全部染色體與基

(26)

因組。例如，單-或雙-線核酸長度可為至少10-、20-、30-、40-、50-、60-、70-、80-、90-、或100個核酸苷或基對(bp)。更大為，核酸大小可為至少0.2 kb、0.3 kb、0.4 kb、0.5 kb、0.6 kb、0.7 kb、0.8 kb、0.9 kb、或1.0 kb。事實上，用於本發明之核酸大小可為至少1 kb、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb、或10 kb或更大。一較佳大小之範圍為1-2kb。核酸可為不同核酸苷長度之鏈，而且一般稱為多核酸苷或寡核酸苷。寡核酸苷為通常由核酸苷之線形序列生成之寡聚物。例如，寡核酸苷可包含約2至約100、約2至約20、約10至約90、或約15至約35個核酸苷。在寡核酸苷陣列中可使用約25體寡核酸苷。另一個特定範圍為約60至約80體，其為相當長之寡核酸苷。

微米陣列法，包括核酸之選擇、探索、標記、及偵測，敘述於美國專利6,379,932與6,410,231 (Incyte Genomics)且可使用。這些專利全部併入作為參考。雖然這些參考資料提及DIP PEN奈米微影法，其未如在此所述建議如何或提供如何使用DIP PEN奈米微影法製造改良奈米陣列之指引。

包含單核酸苷之化合物亦可作為墨水。可使用核酸之混合物，而且陣列上之不同斑點可包含不同之核酸。

依照本發明沉積之核酸可在直接寫入沉積於基材表面上前後調配或混合其他元素。因此，除了所需之核酸樣品，本發明之"墨水"可包含用於沉積在基材表面上之其他化學物、化合物、或組合物。如上所述，可使用溶劑與鹽將核酸塗佈於尖端。可使用界面活性劑。例如，蛋白質、多肽

、與肽可隨所需核酸沉積在基材表面上。

核酸陣列及其中使用之核酸型式敘述於，例如，G. Gibson 與 S. Muse之 A Primer of Genome Science, 2002, 第3-4章 (第123-181頁)，其併入作為參考。例如，此參考資料敘述 cDNA微米陣列及寡核酸苷陣列、標記、混成、及統計分析。cDNA陣列可用於同時監測數千個基因表現之相對程度。經 PCR放大 cDNA 碎片 (ESTs) 可針對螢光或放射線標記 cDNA 染色及探索。假設觀察到之信號強度與存在於所研究 RNA 數量中之轉錄量成正比。強度差反映處理間之轉錄程度差異。然後實行統計及生物資訊分析，通常其目標為產生可使用已建立之分子生物方法測試之假設。然而，目前 cDNA 微米陣列具有 15,000 個元素之上限，而且無法表現存在於較高真核基因組之整組基因。寡核酸苷相對 cDNA 微米陣列之優點及缺點敘述於上述之 A Primer of Genome Science, 而且可用於建立在此所述之核酸奈米陣列。

DIP PEN 奈米微影印刷，特別是平行 DIP PEN 奈米微影印刷，可用於製備核酸微米陣列，特別是組合奈米陣列。陣列為在基材上形成更大圖樣之多個不連續樣品區域或圖樣單位之排列。樣品區域或圖樣可為任何形狀(例如，點、線、圓、正方形、或三角形)且可以任何更大之圖樣排列(例如，不連續樣品區域之行列、晶格、格線等)。圖樣可稱為個別單位或個別單位之較大集合。各樣品區域可含與陣列之其他樣品區域所含為相同或不同之樣品。"組合陣列"為其中各樣品區域或複製樣品區域小組(通常為 2-4 個)含異於

在陣列之其他樣品區域所發現之樣品之陣列。"樣品"為所研究、證明、反應等之材料或材料組合。

DIP PEN奈米微影印刷，特別是平行DIP PEN奈米微影印刷，特別地用於製備次微米規模之奈米陣列及組合奈米陣列。次微米規模或奈米規模之陣列表示樣品區域之橫向尺寸(例如，長度、寬度或直徑)至少之一，除了深度以外，小於1微米。通常在基材之平面中，這些尺寸為橫向尺寸。例如，DIP PEN奈米微影印刷可用以製備直徑約10奈米之點。改良尖端(例如，較尖銳之尖端)可製造達到直徑1奈米之點。次微米規模之陣列可有比目前所使用之微米規模(即，深度以外，具有1-999微米之尺寸)快之反應時間及使用較少之試劑。每單位面積亦可得到更多資訊(即，陣列比目前所使用之微米規模陣列更稠密)。最後，使用次微米陣列提供篩選之新機會。例如，此陣列可以SPM's篩選而尋找圖樣之物理變化(例如，形狀、黏性、高度)及/或證明存在於樣品區域中之化學物，包括將核酸測序。

陣列之各樣品區域可含單一樣品或單一沉積。例如，樣品可為生物材料，如以上廣泛地敘述之核酸(例如，寡核苷酸、DNA或RNA)、蛋白質或肽(例如，抗體或酶)、配位基(例如，抗原、酶基材、受體、或受體之配位基)、或生物材料之組合或混合物(例如，蛋白質或核酸之混合物)。

本發明特別針對核酸、寡核苷酸、及DNA奈米陣列。陣列及使用陣列之方法在此技藝為已知的。例如，此陣列可用於生物及化學篩選以證明及/或將生物或化學材料定量

(例如，免疫陣列、酶活性陣列、基因組、與蛋白組)。例如，可使用自然發生或合成化合物與其他材料(包括細胞)之生物及化學庫證明及設計或精製藥物選擇、酶抑制劑、受體之配位基、與配位基之受體、及基因組與蛋白組。微顆粒與奈米顆粒之陣列可用於許多目的(例如，參見美國專利公告2002/0063212 A1之實例7)。陣列亦可用於結晶、蝕刻(例如，參見美國專利公告2002/0063212 A1之實例5)等之研究。敘述組合陣列與其他陣列及其用途之參考資料包括，例如，美國專利5,747,334、5,962,736、與5,985,356、及PCT申請案WO 96/31625、WO 99/31267、WO 00/04382、WO 00/04389、WO 00/04390、WO 00/36136、與WO 00/46406，其在此全部併入作為參考。最後，對本發明之陣列實行之實驗結果可藉習知方法(例如，螢光、化學發光、生物發光、及放射線活性)偵測。或者，SPM可用於篩選陣列。例如，AFM可用於分子之定量照相及證明，其包括經由使用塗覆化學或生物驗證劑之SPM尖端將化學與生物分子照相及證明。例如，參見Frisbie等人之Science, 265, 2071-2074 (1994); Wilbur等人之Langmuir, 11, 825-831 (1995); Noy等人之J. Am. Chem. Soc., 117, 7943-7951 (1995); Noy等人之Langmuir, 14, 1508-1511 (1998); 及美國專利5,363,697、5,372,93、5,472,881、與5,874,668，其完整揭示在此併入作為參考。

直接寫入奈米微影印刷特別用於製備核酸奈米陣列，其為具有奈米特點之次微米規模陣列，其中在基材上形成多

個點或多條線。多個點可為點晶格，其包括此技藝已知之六角形或正方形晶格。多條線可形成格線，其包括線之垂直及平行排列。

個別圖樣之橫向尺寸(包括點直徑及線寬)可具有奈米規模，例如，約1,000奈米或更小、約500奈米或更小、約300奈米或更小、約200奈米或更小，而且更特別是約100奈米或更小。尺寸之範圍為，例如，約1奈米至約750奈米、約10奈米至約500奈米，而且更特別是約100奈米至約350奈米。可使用約10奈米至約100奈米之小範圍。

對於單一基材，多個圖樣中之圖樣數量並未特別地限制，而且通常希望為高圖樣密度。例如，其為至少10、至少100、至少1,000、至少10,000、甚至至少100,000。正方形排列為可行的，例如，10 X 10陣列。較高密度陣列較佳，通常每平方公分為至少100，較佳為至少1,000，更佳為至少10,000，而且甚至更佳為至少100,000個不連續元素。顯然地，在此所述之奈米技術可用以產生圖樣密度為每平方公分包含超過一百萬，超過100,000,000，而且更特別是甚至超過十億個不連續元素之超高密度奈米陣列。

奈米陣列之個別圖樣間之距離可不同且未特別地限制。例如，圖樣可分離小於1微米或超過1微米之距離。例如，此距離可為約300至約1,500微米，或約500微米至約1,000微米。分離圖樣間之距離可由圖樣中心測量，如點中心或線中間。

特定斑點或沉積中之核酸量並未限制而可為，例如，皮

克或奈克程度，例如，其包括約0.1奈克至約100奈克，而且更特別是約1奈克至約50奈克。如奈米陣列技術所需，亦可使用用於核酸微米陣列技術之染色溶液法。

藉由在此所述之方法，可製備包含基材及基材上之多個核酸圖樣之核酸奈米陣列，其中核酸圖樣係化學吸附或共價地鍵結至基材，具有約1,000奈米或更小之橫向尺寸，及彼此分離1,000奈米或更小之距離，而且可對互補核酸混成。在較佳具體實施例中，核酸奈米陣列包含至少1,000個核酸圖樣，其中圖樣之橫向尺寸為約500奈米或更小，圖樣彼此分離500奈米或更小之距離，及圖樣為點之形式。在另一個較佳具體實施例中，核酸奈米陣列包含至少10,000個核酸圖樣，其中圖樣之橫向尺寸為約200奈米或更小，圖樣彼此分離500奈米或更小之距離，及圖樣為點之形式。

可使用已知用於直接寫入奈米微影術及核酸微米陣列之習知基材(包括玻璃)。除了上述以外，基材包括薄膜、塑膠或聚合凝膠、微井、電極、奈米間隙、及感應裝置。薄膜包括用於目前之核酸微米陣列技術者，其包括硝基纖維素及耐綸薄膜。在將核酸沉積於基材之前，例如，基材可經單層或底層處理。底層可設計成共價地固定核酸。例如，如果使用5'-胺基丙烯酸PCR引子放大ESTs，則可使用鍵聯至核酸分子末端之醛系塗料。其可製成多層架構。

就生物共軛奈米顆粒標記之快速增殖及建立區塊而言，在此所述之方法應可在金屬及絕緣基材上完成廣泛種類之金屬性、半導體性、磁性、及絕緣奈米結構之DPN-及核酸樣

板組合。例示刊物包括(1) M. Bruchez等人之 Science, 281, 2013 (1998), (2) S.R. Nicewarner-Pena等人之 Science, 294, 137 (2001); (3) Y. Cui等人之 Science, 293, 1289 (2001)。這些結構依序可用以解決分子電子、光子、高密度資訊儲存、及生物感應之議題。此方法亦建議調查微米陣列縮微化基本限制之新方式。以在此證明之解析度，可在與習知機械人染色法相近之時間規模，在典型AFM掃描器大小之區域(100微米乘100微米)產生具有~100,000個核酸或寡核苷酸斑點之陣列，因而可調查奈米及微米陣列掃描探針法之製造與讀數。例如，機械人法限於每秒僅數個沉積之染色速率，其表示機械人製備100個含至少5000個繁殖體之微米陣列花費至多2日。

用於本發明實務之奈米顆粒包括金屬(例如，金、銀、銅、與鉑)、半導體(例如，CdSe、CdS、及塗覆ZnS之CdSe或CdS)、及磁性(例如，鐵磁性)、膠體材料。用於本發明實務之其他奈米顆粒包括ZnS、ZnO、TiO₂、AgI、AgBr、HgI₂、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In₂S₃、In₂Se₃、Cd₃P₂、Cd₂As₂、InAs、與GaAs。奈米顆粒之大小較佳為約5奈米至約150奈米(平均直徑)，更佳為約5奈米至約50奈米，而且更佳為約10奈米至約30奈米。製造及使用鍵結至核酸之奈米顆粒之方法敘述於美國專利6,361,944，其在此併入作為參考。

本發明進一步藉以下之作業例描述，其不限制以上詳述及如以下申請專利範圍之本發明範圍。

作業例

本發明進一步藉以下之非限制實驗部份及作業例描述。此外，Mirkin等人之美國專利公告2002/0063212 A1之作業例1-7描述DIP PENTM奈米微影印刷之各種具體實施例，而且在此併入作為參考。

實驗部份

一般方法及材料。自Aldrich(威斯康辛州Milwaukee)購得1-十八碳基硫醇。無進一步純化而使用自IDT(愛荷華州Coralville，經PAGE純化)購得之經硫醇修改15體DNA，其具聚乙二醇間隔基(PEG₆)，相當於固定基與DNA(C1，C2，參見表I)間有18個原子。如前所報告(例如，參見J.J. Storhoff等人之J. Am. Chem. Soc., 120, 1959 (1998); 及Mirkin等人之美國專利6,417,340與6,361,944)，合成用於金基材圖樣化實驗之鍵聯DNA(L1與L2)及結合金奈米顆粒DNA (G1)。

自IDT購得經丙烯酸醯胺(AcryditeTM)修改之12與15體DNA(C3與C4)(經RP HPLC純化)。藉已知方法(例如，參見J.J. Storhoff等人之J. Am. Chem. Soc., 120, 1959 (1998); 及Mirkin等人之美國專利6,417,340與6,361,944)，合成用於氧化矽基材圖樣化實驗之鍵聯DNA(L3與L4)及結合奈米顆粒DNA (G2與G3)。

表I 用於DPN圖樣化、奈米顆粒修改、及顆粒對DNA圖樣化表面之鍵聯之寡核酸苷序列

(34)

發明說明書

線名	序列及末端修改
C1	5'HS(CH ₂) ₆ -PEG ₆ -GAG GGA TTA TTG TTA
C2	5'HS(CH ₂) ₆ -PEG ₆ -AGT CGC TTC TAC CAT
L1	5'AGA GTT GAG CTA TAA CAA TAA TCC CTC
L2	5'AGA GTT GAG CTA ATG GTA GAA GCG ACT
G1	5'TAG CTC AAC TCT A ₂₀ (CH ₂) ₃ SH
C3	5'Acrydite-PEG ₆ -ATC CTT ATC AAT ATT
C4	5'Acrydite-PEG ₆ -CGC ATT CAG GAT
L3	5'GGA TTA TTG TTA AAT ATT GAT AAG GAT
L4	5'TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG
L3F	Oregon Green488X-5'GGA TTA TTG TTA AAT
L4F	Oregon Green488X -5'TAC GAG TTG AGA
G2	5'TCT CAA CTC GTA A ₁₀ (CH ₂) ₃ SH
G3	5'TAA CAA TAA TCC A ₁₀ (CH ₂) ₃ SH

依照先前所報告之步驟(參見L.M. Demers等人之Anal. Chem. 72, 5535 (2000)), 製備單晶矽晶圓上之金薄膜。在藉蒸氣運輸以氫硫基丙基三甲氧基矽烷(MPTMS)矽烷化2小時之前(例如, 參見D.G. Kurth等人之Langmuir, 9, 2965 (1993)), 在piranha溶液(3:1硫酸對30%過氧化氫)中清洗氧化矽基材, 然後其以乙醇沖洗且在80°C在流動N₂下硬化10分鐘。

AFM尖端製備。首先在piranha溶液(1 H₂O₂:3 H₂SO₄)中將習知氮化矽探針晶片(彈簧常數~0.3 Nm⁻¹, 加州Sunnyvale之Thermomicroscope)清潔10分鐘, 以DI水及甲苯沖洗, 然後在玻璃培養皿中浸於3-胺基丙基三甲氧基矽烷(APS)於甲苯之1%體積/體積溶液1-2小時。在矽烷化之後, 晶片以甲苯沖洗, 然後在氮流下乾燥。在典型步驟中, 立即藉由浸於尖端塗料溶液(1 mM DNA, 90%二甲基甲醯胺(dmf), 10%水, 0.3 M MgCl₂)中20秒, 繼而以壓縮二氟乙烷乾燥, 而以經硫醇修改DNA塗覆晶片。如果在矽烷化後立即浸於溶液中, 則將塗覆胺基之尖端完全塗覆DNA之二甲基甲醯胺(DMF)溶液, 但是通常在12小時後塗覆則不良, 推論其係由於尖端表面污染。

DIP-PEN奈米微影印刷實驗。在控制大氣之手套工作箱中使用塗覆DNA之AFM尖端實行DIP-PEN奈米微影印刷(接觸力~2.5 nN)。標示之手套工作箱將溫度及濕度控制在± 5°C及± 5%相對濕度內。所有之DPN印刷實驗均使用具定製DPN印刷軟體界面之Park Scientific Instruments Autoprobe CP AFM實行。

金奈米顆粒組合。藉已知方法(例如, 參見J.J. Storhoff等人之J. Am. Chem. Soc., 120, 1959 (1998); 及Mirkin等人之美國專利6,417,340與6,361,944)以經硫醇官能化DNA修改金奈米顆粒。對於圖樣化金基材上之組合, 將以經硫醇封端DNA修改之奈米顆粒(20微升, 直徑13奈米, 5 nM)混成過夜以在混成溶液(最終濃度0.1 μM DNA, 0.3 M

PBS(0.01 M磷酸鹽緩衝液pH 7, 0.3 M NaCl), 0.025%十二碳基硫酸鈉(SDS))中鍵聯DNA至少12小時。然後將一滴顆粒-DNA溶液置於水平圖樣化基材上且在室溫培養3小時。在培養後,將載物片置於聚丙烯管中,而且在室溫在緩衝液流下沖洗(0.3 M PBS, 0.025% SDS),繼而0.3 M乙酸銨pH 7,以自表面移除鹽而製備AFM照相用載物片。對於經DNA圖樣化SiO_x基材上之組合,藉由加熱至60°C 5分鐘,然後冷卻30分鐘,而將鍵聯劑DNA與經DNA修改奈米顆粒混成(0.5 μM鍵聯劑, 10 nM顆粒,總體積0.2毫升)。繼而以0.3 M PBS, 0.025% SDS將溶液稀釋至1毫升總體積,及如上所述用於對圖樣化基材混成。

照相實驗。使用Digital Instruments(加州Santa Barbara)之Nanoscope IIIa(其具有得自Digital Instruments之矽懸臂,彈簧常數~40 Nm⁻¹),得到DNA圖樣與奈米顆粒之穿次模式地形學及相AFM照片。所有之AFM照片僅應用第一或第二平坦化函數處理。為了螢光照相,在室溫在2X SSPE緩衝液(2 μM DNA, 0.3 M NaCl, 0.02 M磷酸鈉, 0.002 M EDTA, 0.2% SDS, pH 7.4)中將圖樣化基材與螢光標記互補DNA混成30分鐘,以2X SSPE 0.2% SDS沖洗,然後浸於2X SSPE 0.2% SDS中10分鐘。在以具Hg燈白光激發來源之Zeiss Axiovert 100顯微鏡螢光照相之前,基材以0.3 M乙酸銨沖洗,然後以N₂吹乾。

實例1:

藉DIP PEN奈米微影印刷之核酸圖樣化

此實例敘述一種藉DPN印刷將核酸圖樣化之方法，其提供尖端塗覆、基材表面擴散、及後處理步驟時圖樣安定性之改良。此方法使用經胺基矽烷修改氮化矽AFM懸臂-尖端組合、及經環形二硫化物與聚乙二醇修改合成核酸，而在金基材上形成安定之寡核苷酸圖樣，其可以探針(例如，包括奈米顆粒探針)混成。印刷時相對濕度之正確選擇提供印刷特點大小之控制。

1. AFM尖端預處理協定

首先以三甲氧基胺基丙基矽烷(APS)修改習知氮化矽AFM尖端。懸臂在piranha蝕刻液(3:1濃硫酸/30%過氧化氫)中清潔10分鐘，然後在Nanopure水與乙醇中沖洗，及在氮流中乾燥。然後藉由浸於APS於甲苯之1%溶液中1小時而共價地修改尖端，然後以甲苯沖洗。此步驟產生帶負電核酸可黏附之帶正電表面。

2. AFM尖端塗覆

在20微升二甲基甲醯胺(DMF)與1微升1.5 M $MgCl_2$ 於水中，製備經修改合成DNA之1 mM溶液，其含(a)單一己硫醇部份或環形二硫化物表雄酮鍵聯劑，及(b)聚乙二醇(PEG)間隔基(參見圖1與3)。藉由將尖端浸於溶液中20-60秒，及以壓縮空氣或氮吹乾，而以DNA塗覆預處理之AFM尖端。通常DMF扮演溶解DNA之角色且可使塗料溶液將APM尖端潤濕。通常在表面上使用低濃度 $MgCl_2$ 藉由過濾DNA線間之排斥性交互作用而得到高密度DNA圖樣。通常PEG間隔基對於提供DNA至基材之擴散為重要的。

3. 經DPN圖樣化之直接圖樣化

為了將DNA轉移至金基材，將塗覆DNA之AFM尖端相對基材安置且接近基材以接觸基材(參見圖3)。藉DPN印刷軟體控制尖端沿表面之移動。藉由改變大氣控制槽中之相對濕度，得到對圖樣大小之控制。例如，點圖樣之直徑可為在88%相對濕度約780奈米(上列)至在50%相對濕度約430奈米(下列；參見圖4-所有之點均係將AFM尖端保持定位20秒而製造)。二硫化物鍵聯劑對金表面形成鉗合鍵，如此增加結合表面之DNA之安定性。以此方式結合之DNA對抗用於將周圍未圖樣化金鈍化之烷屬烴硫醇(如1-十八碳基硫醇)之置換。DNA圖樣經證明因對已以互補DNA序列修改之金奈米顆粒探針混成，而具有生物活性(參見圖5及參見，例如，Letsinger, R. L., Elghanian, R.; Viswanadham, G.; Mirkin, C. A. 之 *Bioconjugate Chemistry*, 2000, 11, 289-291; 及PCT申請案WO 98/04740)。

實例2與3：

進行使用直接寫入DIP-PEN奈米微影印刷(即，DPN印刷)，在如金(實例2)及絕緣基材(實例3)之金屬導電性基材上產生寡核酸苷之共價地固定奈米規模圖樣。以己硫醇基修改DNA提供金上之圖樣化(實例2)，及帶5'-終端丙烯醯胺基之寡核酸苷在衍生矽石上圖樣化(實例3)。在這些實例中得到範圍為數微米至小於100奈米之特點大小，而且生成之圖樣呈現其所組成之DNA之序列相關結合性質。使用此圖樣導引個別經寡核酸苷修改顆粒在表面上之組合，及證明單一

陣列中多DNA序列之沉積。

DPN印刷用以在金(實例2)及氧化矽(實例3)表面上將寡核酸苷圖樣化。其證明許多利於DNA印刷之關鍵。首先，AFM尖端完全以DNA塗覆。雖然已藉DPN使用未修改氮化矽懸臂沉積許多種疏水性分子，此懸臂可產生具有有時難以控制之特點大小及形狀之DNA圖樣。經由以3'-胺基丙基三甲氧基矽烷表面修改氮化矽AFM懸臂(在甲苯之1% v/v溶液中1小時)，而完成對於DNA圖樣化之改良控制，如此促進DNA墨水對尖端表面之可靠黏附。

矽烷化尖端係藉由將其浸入含1 mM DNA與0.3 M $MgCl_2$ 之90%二甲基甲醯胺/10%水溶液中10秒而塗覆DNA，然後以壓縮二氟乙烷將尖端吹乾。帶正電親水性尖端表面易被此DNA墨水溶液潤濕，及這些AFM尖端在重新塗覆前可用於DPN印刷實驗數小時。此尖端亦因將其塗覆蒸發金層與自動組合單層半胱胺而成功地使用。此外發現控制周圍濕度造成可靠之寡核酸苷之DPN印刷。除非另有指示，所有之圖樣化在 $23 \pm 3^\circ C$ ， $45 \pm 5\%$ 相對濕度之控制環境手套工作箱中實行。

正確選擇墨水-基材組合亦利於DPN印刷法。例如，在實例2中，使用經己硫醇修改寡核酸苷直接將金基材圖樣化而具有大小範圍為50奈米至數微米之特點(圖6-10)。一般相信DNA之己硫醇基化學吸附至底下Au表面(例如，參見T.M. Herne等人之J. Am. Chem. Soc., 119, 8916 (1997))。在基材以寡核酸苷圖樣化之後，將其浸於1-十八碳基硫醇(ODT，

(40)

1 mM)之乙醇溶液中1分鐘。此步驟將未圖樣化金表面塗覆疏水性單層，使其在後續混成實驗中對DNA或經DNA修改奈米顆粒之非特定吸附鈍化。在基材之ODT處理後，藉穿刺模式AFM將寡核酸苷圖樣照相，而且呈現2至5奈米之特點高度(圖6A)。參見R. Levicky等人之*J. Am. Chem. Soc.*, 120, 9787 (1998)。固定之DNA保留其高特定辨識性質，及圖樣可用以導引直徑13奈米之經寡核酸苷修改金奈米顆粒(圖6B)。藉此方法製造長度為數微米至小於100奈米規模之結構，及將個別顆粒以預設架構置於表面上(圖6-9)。DNA奈米圖樣與經寡核酸苷修改奈米顆粒間之交互作用為高選擇性；在無互補鍵聯線下，幾乎無非特定結合(圖7)。

雖然此金-硫醇系統提供使用DPN印刷將寡核酸苷圖樣化之優良方法，金基材之導電度妨礙在此表面上組合之奈米結構中電荷運輸及近場光學現象之研究，而且亦將來自任何表面結合螢光團之發射消光。因此，發展DPN印刷法以在氧化矽晶圓上產生DNA圖樣(圖10)。熱氧化晶圓表面係以3'-氫硫基丙基三甲氧基矽烷(MPTMS)處理而活化。參見D.G. Kurth等人之*Langmuir*, 9, 2965 (1993)。AFM尖端之製備及上墨與在金表面上將DNA圖樣化實質上相同而實行，但是在此情形，使用具5'-終端丙烯醯胺基之寡核酸苷。參見M. Kenney之*Biotechniques*, 25, 516 (1998)。在室溫及45%相對濕度之DPN印刷條件下，丙烯醯胺部份藉Michael加成與MPTMS之側接硫醇基反應而將DNA共價地鍵聯至表面(參見圖11)。在圖樣化之後，基材係藉由與緩衝丙烯

酸單體 pH 10 (Apogent Discoveries 消光溶液，30 毫米) 反應而鈍化。在已將所有之 DNA 斑點及序列圖樣化之後，一般將基材靜置過夜，以在清洗基材及將未圖樣化區域中之未反應硫醇基消光前，形成硫醚加成物。圖樣化寡核酸苷之生物活性係藉由將表面暴露於含互補與非互補螢光標記 DNA 之溶液而證明。繼而藉表面螢光顯微術將圖樣特徵化 (圖 10A)。在所有之情形，僅偵測對應互補目標及圖樣化區域之螢光。相同之 DNA 奈米結構 [藉由以去離子 (DI) 水將單線互補物去混成後] 可用於導引經互補 DNA 修改金奈米顆粒之組合 (圖 10B)。以此技術產生 DNA 斑點且偵測為具有 ~50 奈米之直徑，比習知微米陣列小幾乎 160,000 倍 (就區域密度而言)。

實例 4

DPN 印刷之重要特點為產生大長度規模範圍之特定化學官能基圖樣，同時以預設方式呈現控制特點大小之能力。令人驚奇地，可以如小疏水性分子之非常相同方式將如寡核酸苷之高帶電巨分子轉移至基材。在金及經 MPTMS 修改氧化矽基材上，自 AFM 尖端至表面之 DNA 運輸可在圖樣區域依照理論預測 (參見 J. Jang 等人之 *J. Chem. Phys.*, 115, 2721 (2001))，及在金上觀察烷屬烴 (參見 D.A. Weinberger 等人之 *Adv. Mater.*, 12, 1600 (2000)) 及在砷化矽與砷化鎵上觀察矽氮烷 (參見 Maynor 等人之 *Langmuir*, 17, 2575 (2001)) 所得之接觸時間之相同線性增加 (圖 12 及 13A, B)。雖然各墨水-基材對之速率常數不同，此結果強調控制 DPN 印

刷在各種基材上提供範圍為小分子與鹽至有機巨分子之圖樣化合物。

實例 5

在金及氧化矽上，以小心之濕度控制調整DNA之運輸速率及圖樣大小。因此可在合理之時間規模以大動態範圍改變特點大小。例如，在金上，藉由將AFM尖端保持10秒而製造之斑點直徑隨15%之相對濕度變動由50變為300奈米(圖13C；亦參見圖14)。此濕度依附性通常有關自AFM尖端至表面之DNA運輸機構，其通常視尖端與基材間之水彎月面而定。例如，參見Piner等人之Langmuir, 15, 5457 (1999)。

實例 6

為了證明多DNA上墨能力，在氧化矽基材上使用DPN印刷製備二成分DNA陣列，而且藉由與互補螢光標記探針混成而證明其序列相關活性(圖15與16)。為了進一步證明圖樣之化學整體性，相同之晶片以DI水處理以移除螢光標記DNA，然後暴露於含直徑5與13奈米金奈米顆粒混合物之溶液。各以與第一及第二圖樣互補之DNA修改大及小分子。在適當混成條件下，顆粒在正確之圖樣上選擇性地組合。此實驗不僅證明奈米顆粒可在基於AFM之篩選步驟中作為診斷探針，亦證明如何以直接寫入DPN方式形成奈米結構而控制及製造奈米顆粒為主架構之組合。

肆、中文發明摘要

本發明敘述使用直接寫入奈米微影術在不同之基材上產生核酸之固定奈米規模圖樣，其包括導電性及絕緣基材。以反應性基(如硫醇基)修改核酸(包括寡核苷酸)可提供在適當條件下使用適當之掃描探針顯微尖端圖樣化。反應性基提供對基材表面之化學吸附或共價鍵結。生成之核酸特點(其呈現良好之安定性)可與互補核酸混成，因此使用，例如，以核酸官能化之奈米顆粒探索。圖樣化可藉由選擇尖端處理、相對濕度、及核酸結構而控制。

伍、英文發明摘要

The use of direct-write nanolithography to generate anchored, nanoscale patterns of nucleic acid on different substrates is described, including electrically conductive and insulating substrates. Modification of nucleic acid, including oligonucleotides, with reactive groups such as thiol groups provides for patterning with use of appropriate scanning probe microscopic tips under appropriate conditions. The reactive groups provide for chemisorption or covalent bonding to the substrate surface. The resulting nucleic acid features, which exhibit good stability, can be hybridized with complementary nucleic acids and probed accordingly with use of, for example, nanoparticles functionalized with nucleic acids. Patterning can be controlled by selection of tip treatment, relative humidity, and nucleic acid structure.

拾壹、圖式

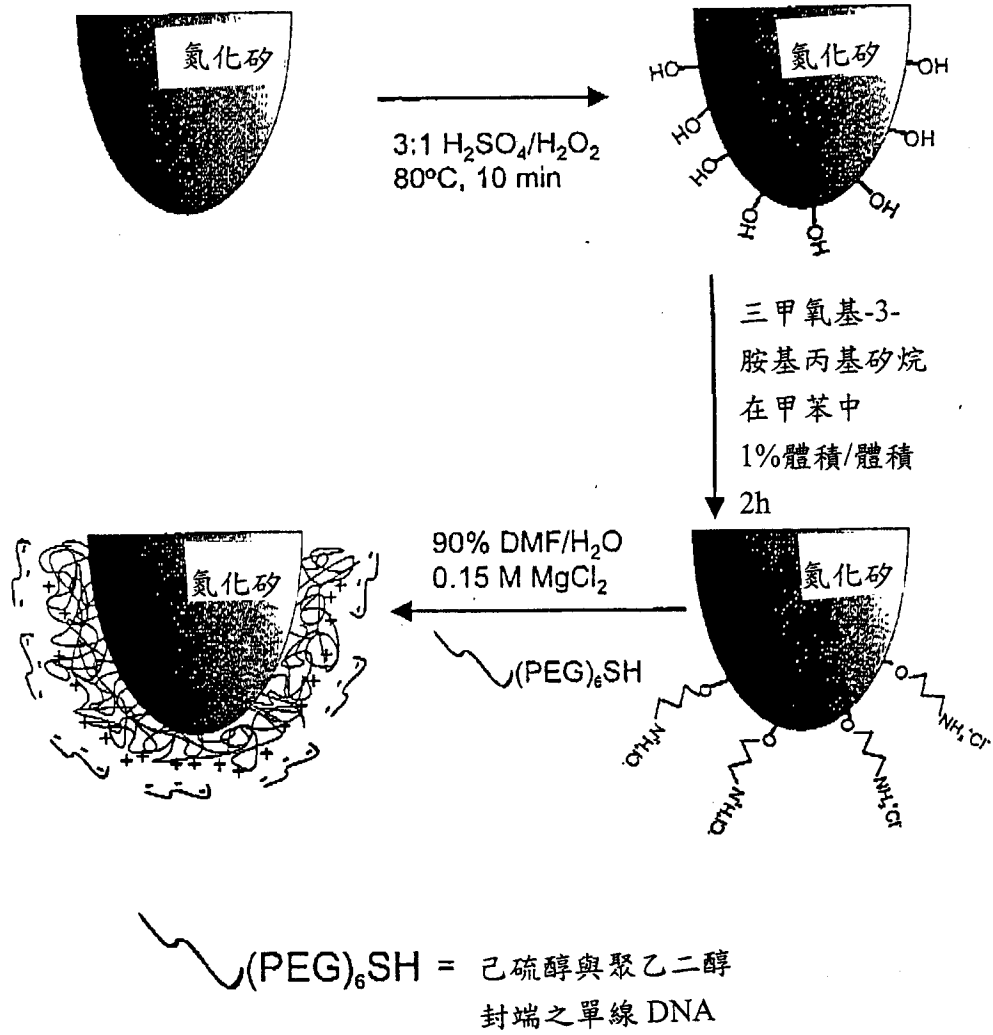
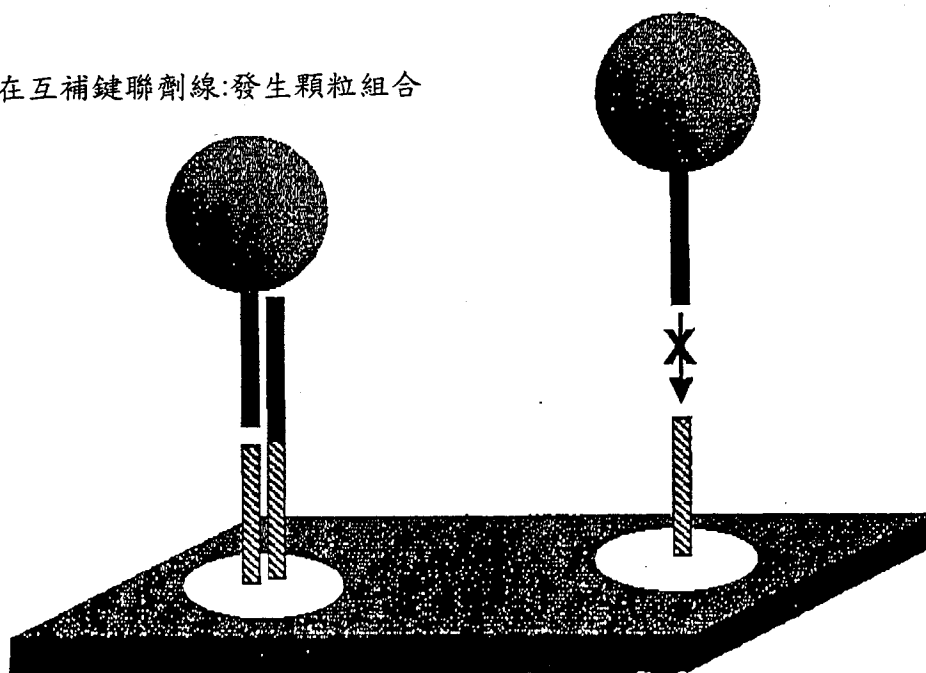


圖 1

非互補或無鍵聯劑線:不發生顆粒組合

存在互補鍵聯劑線:發生顆粒組合



 鍵聯劑 DNA 線

圖 2

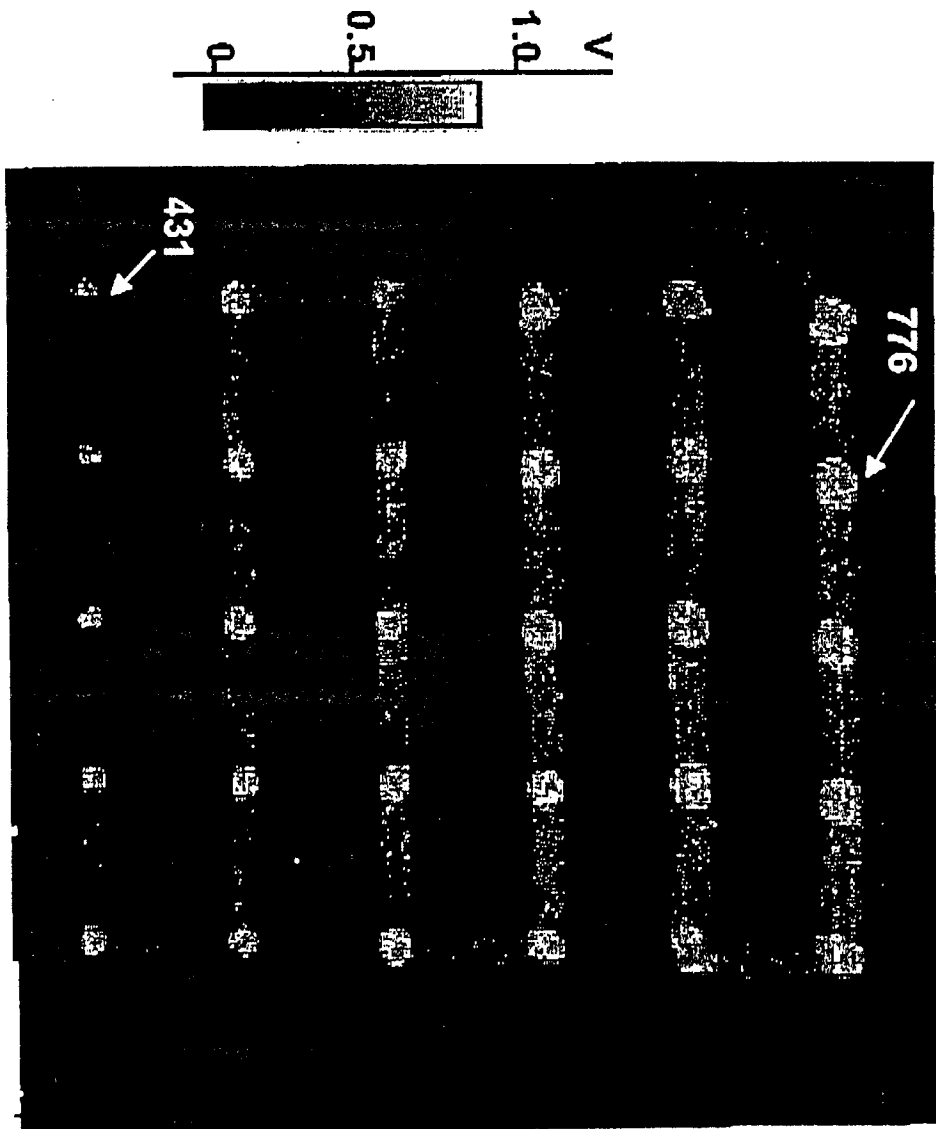
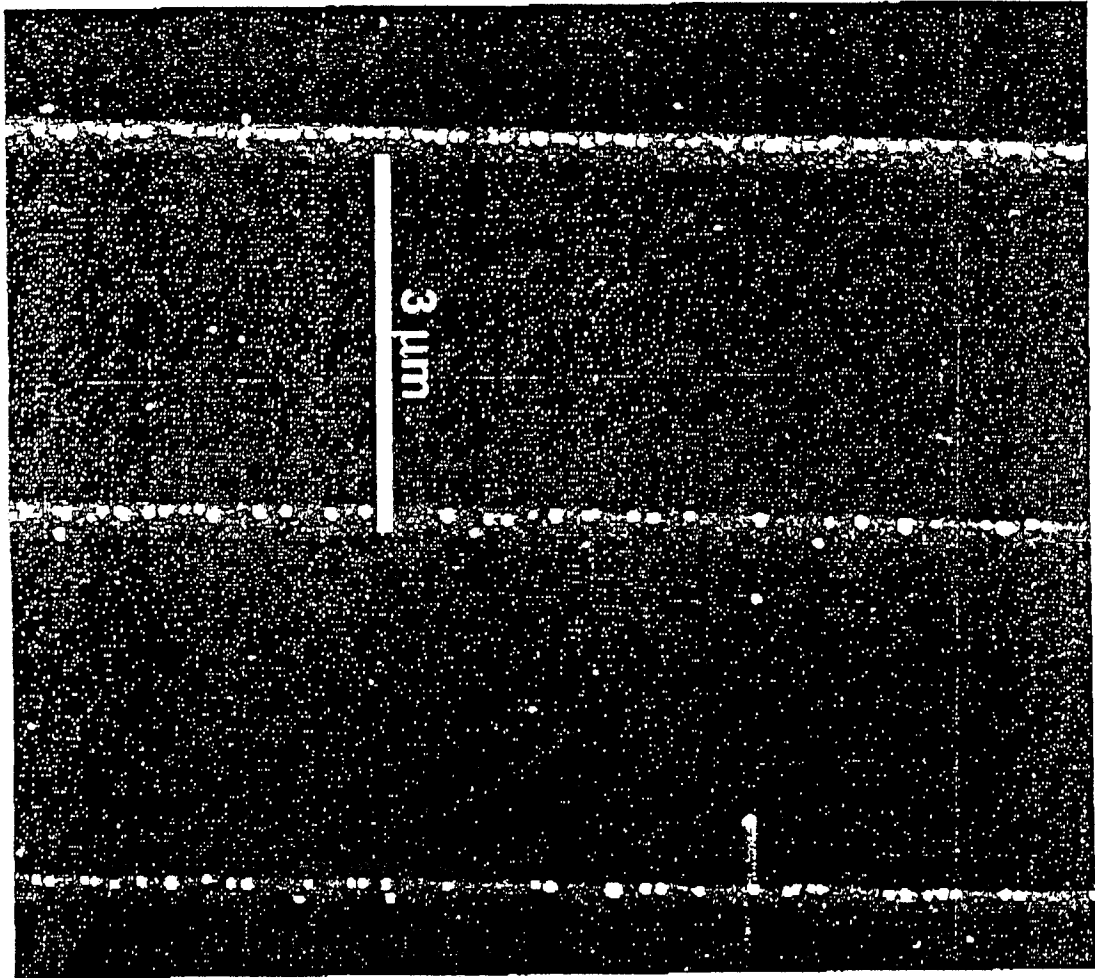


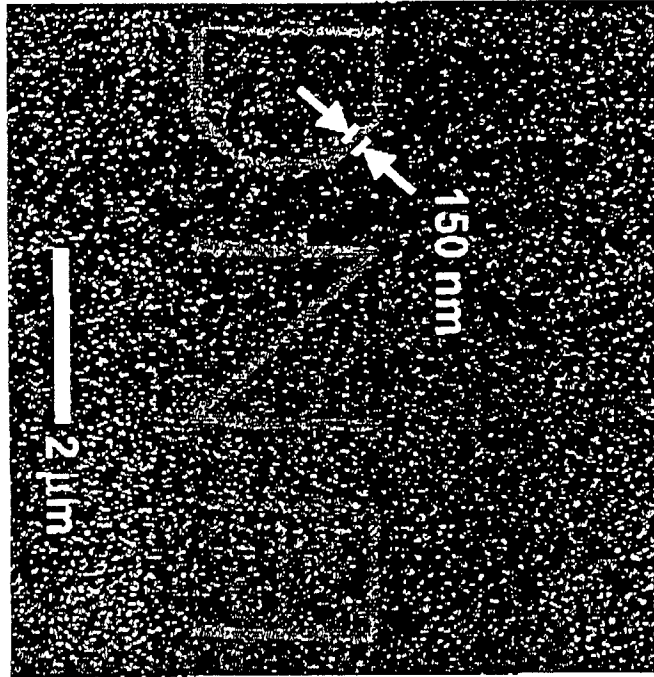
圖 4



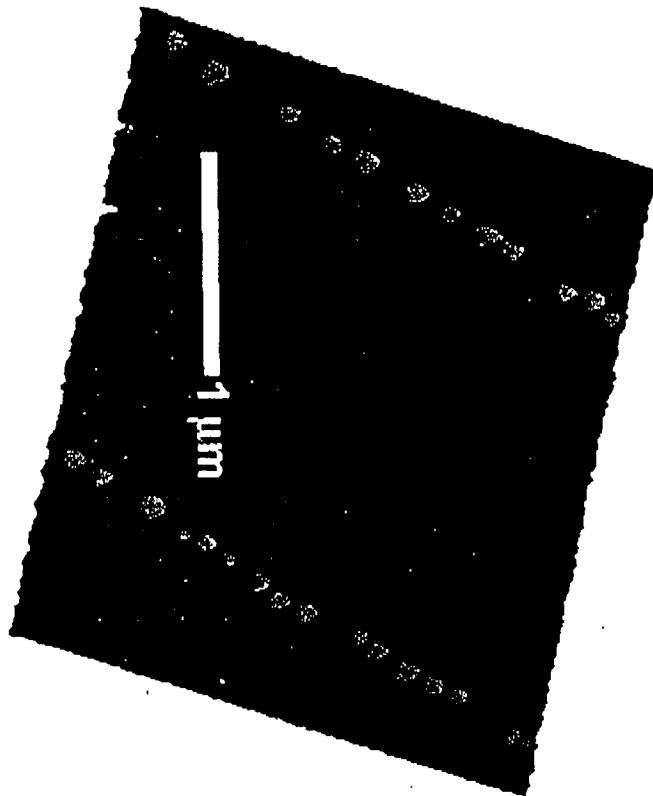
圖

5

A



B



圖

6

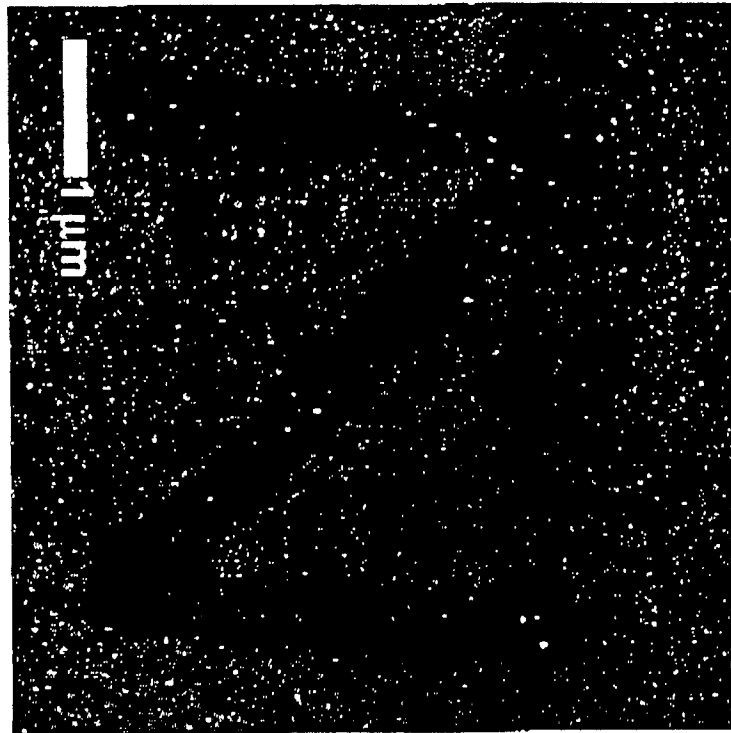


圖 7

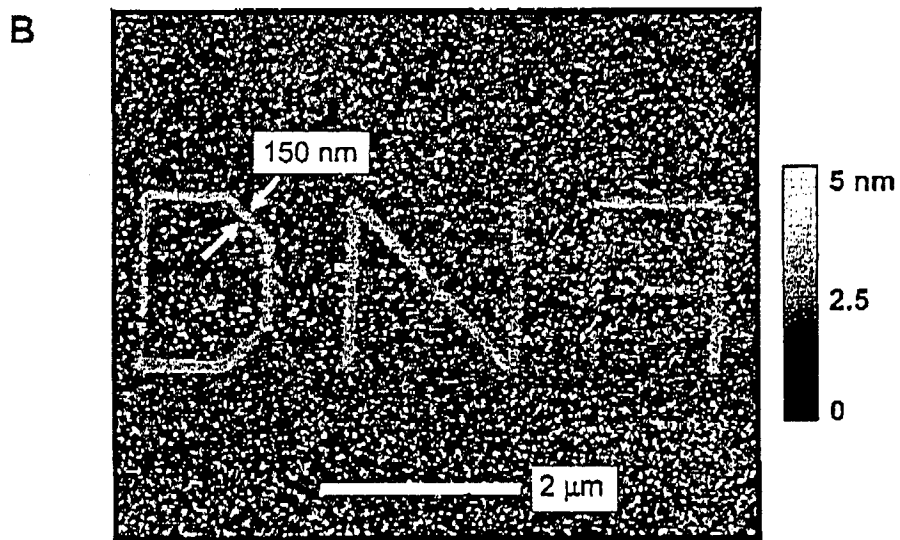
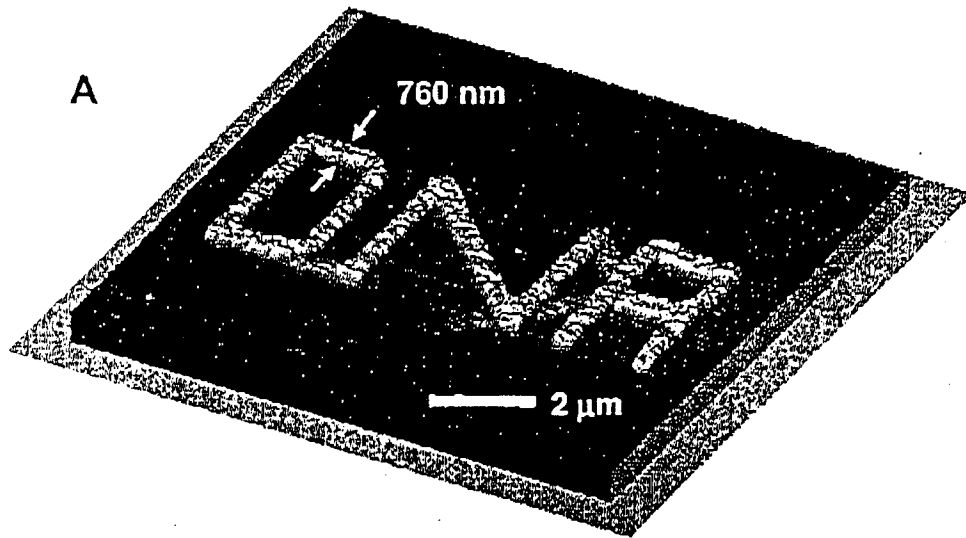


圖 8

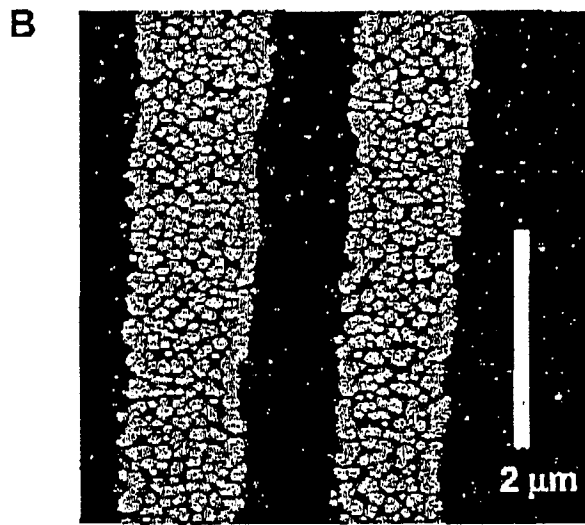
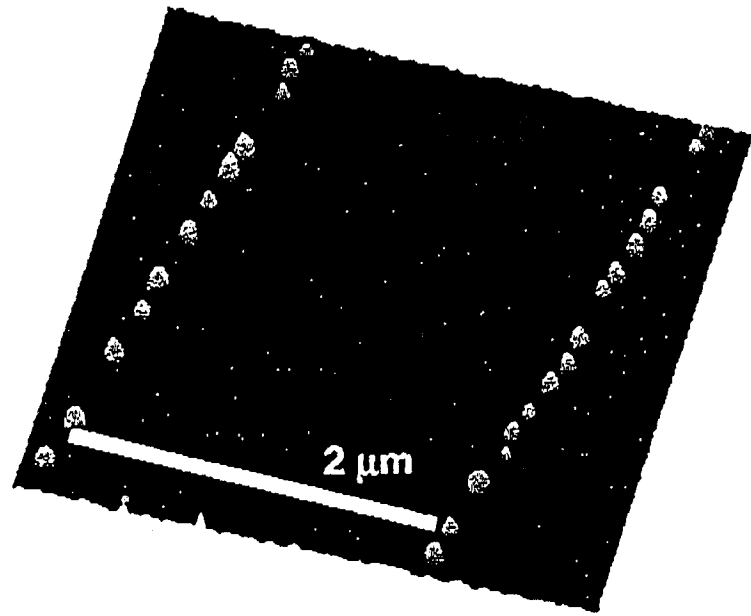


圖 9

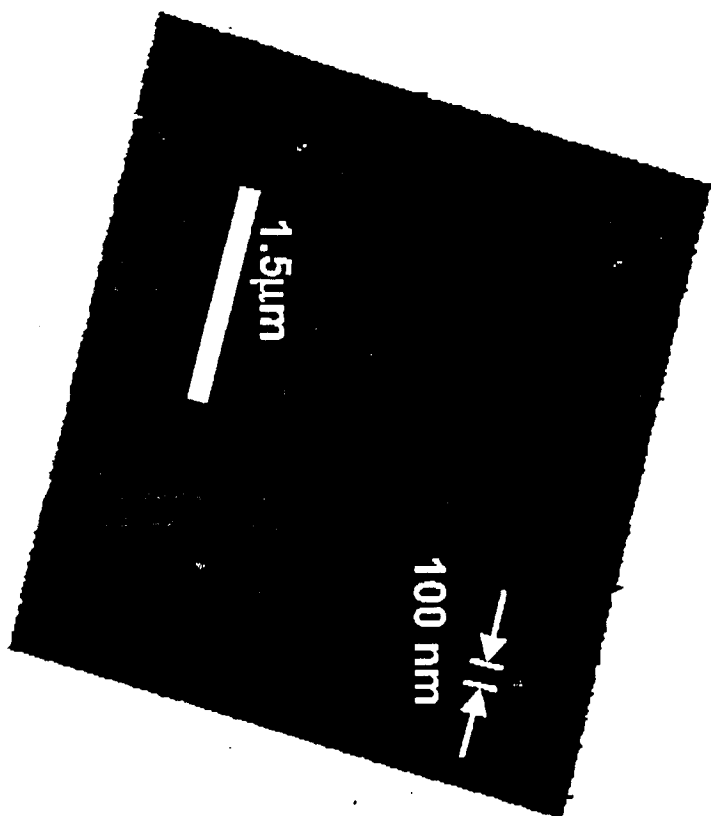
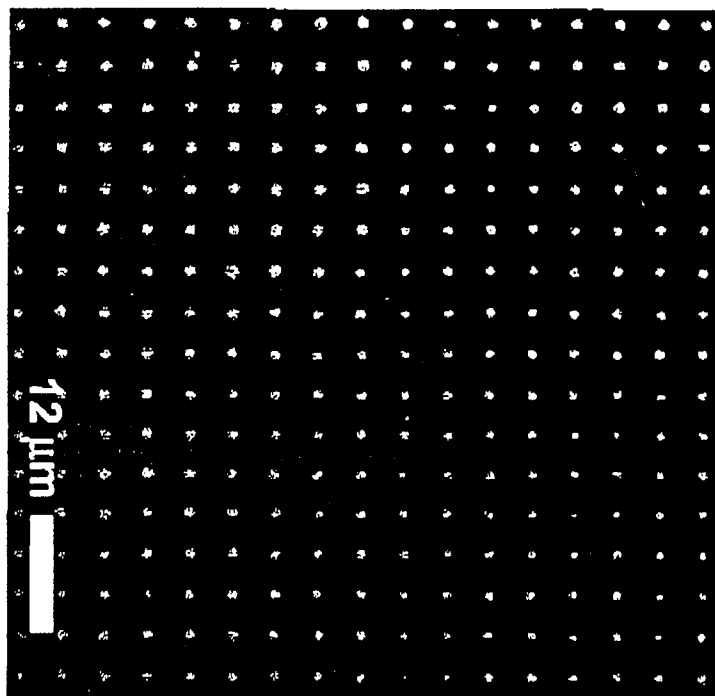
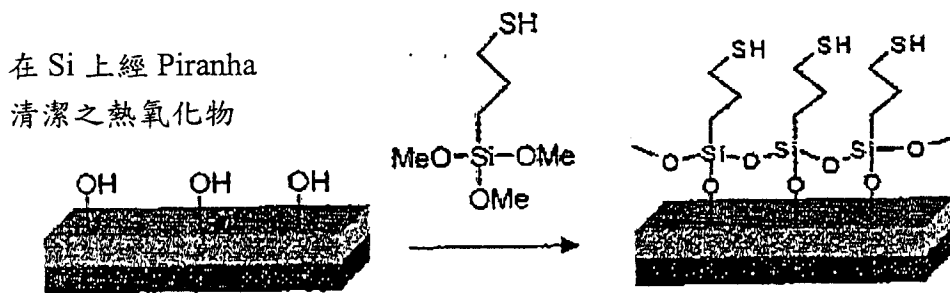


圖 10



2 小時，23°C，來自 H₂O 溶液之
蒸氣塗料 10 min. 在 80°C 硬化

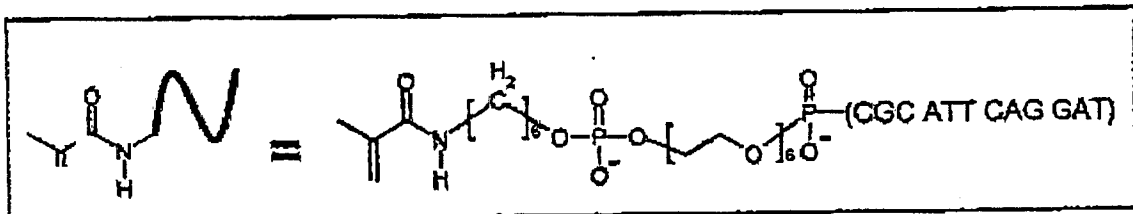
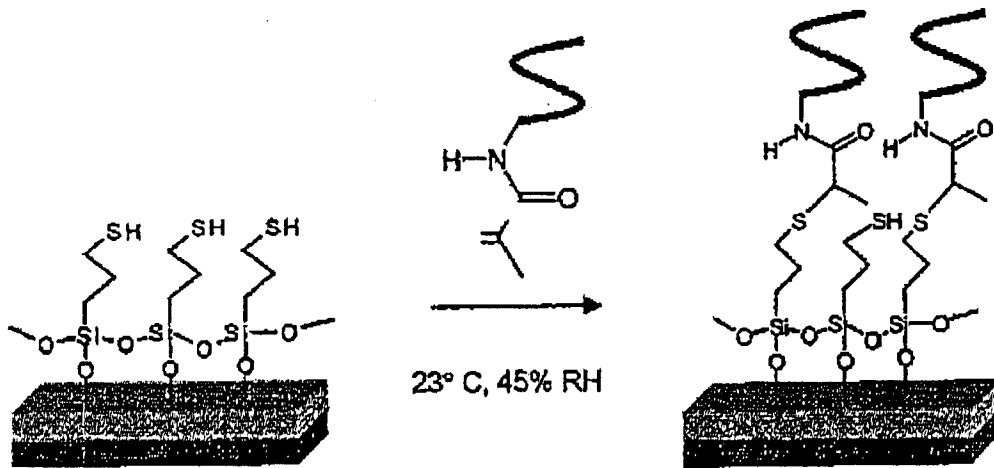


圖 11

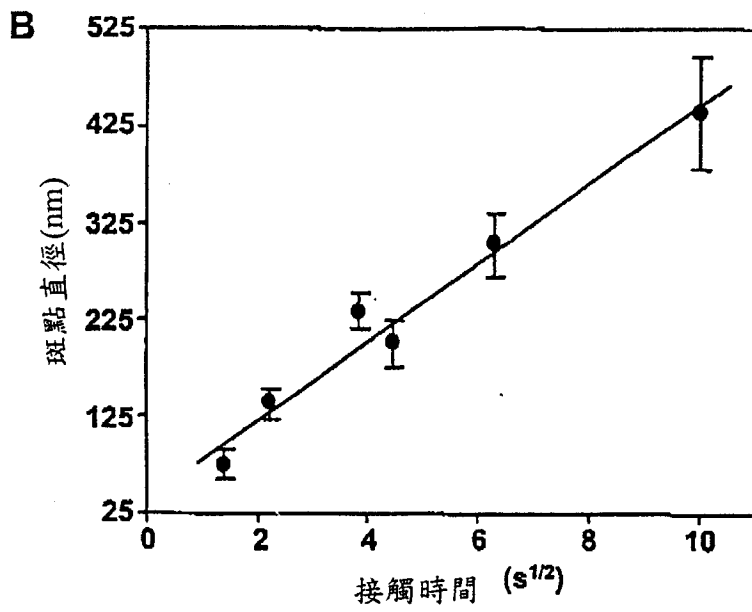
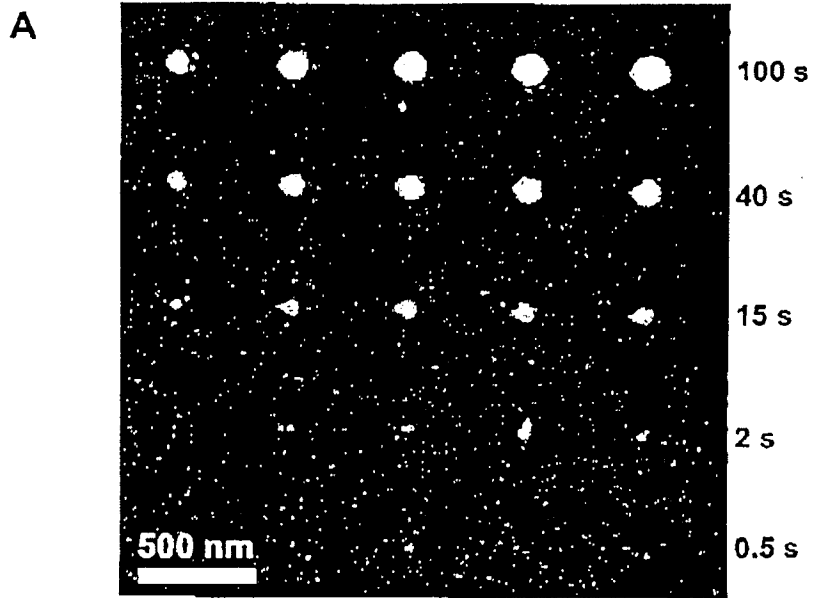


圖 12

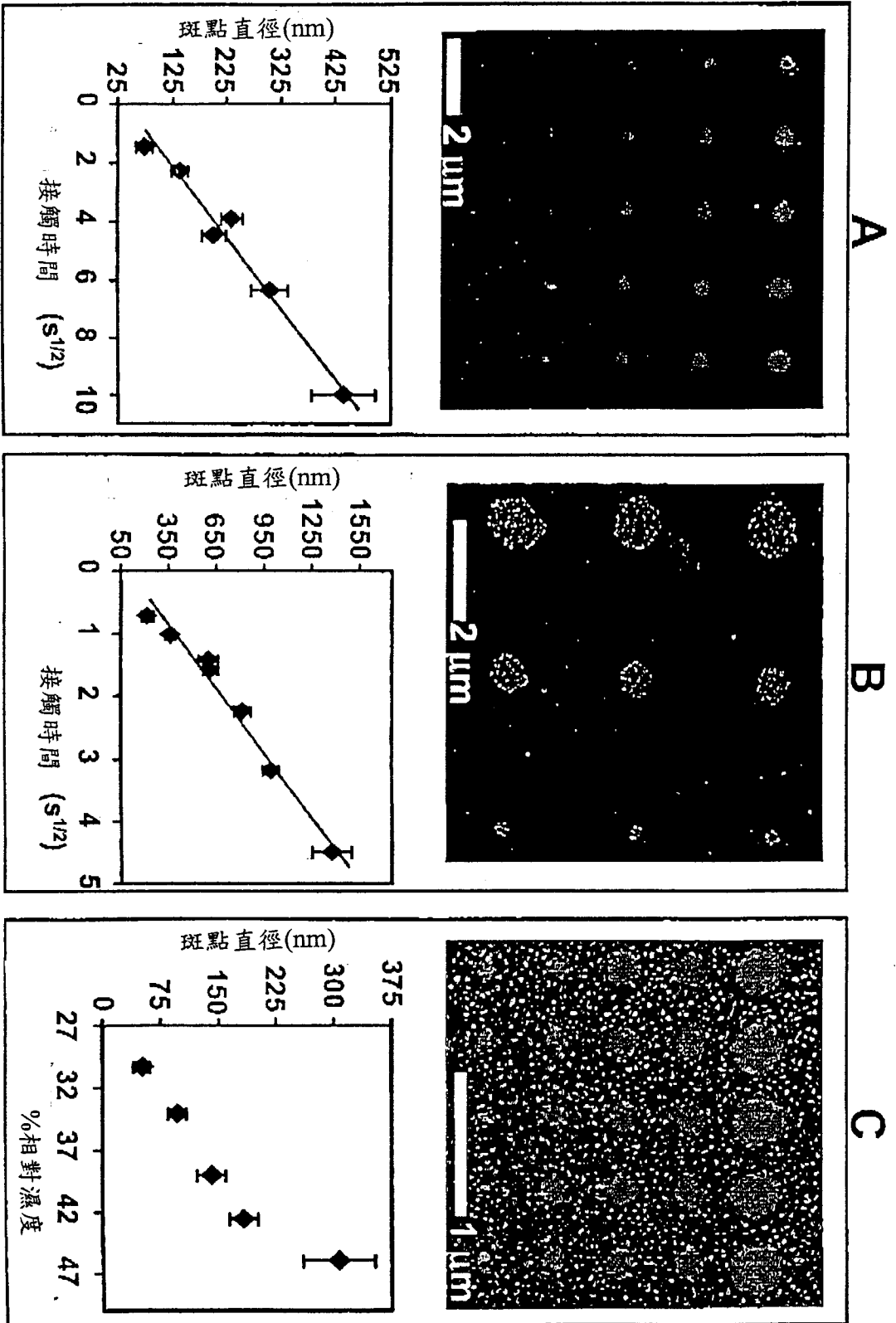


圖 13

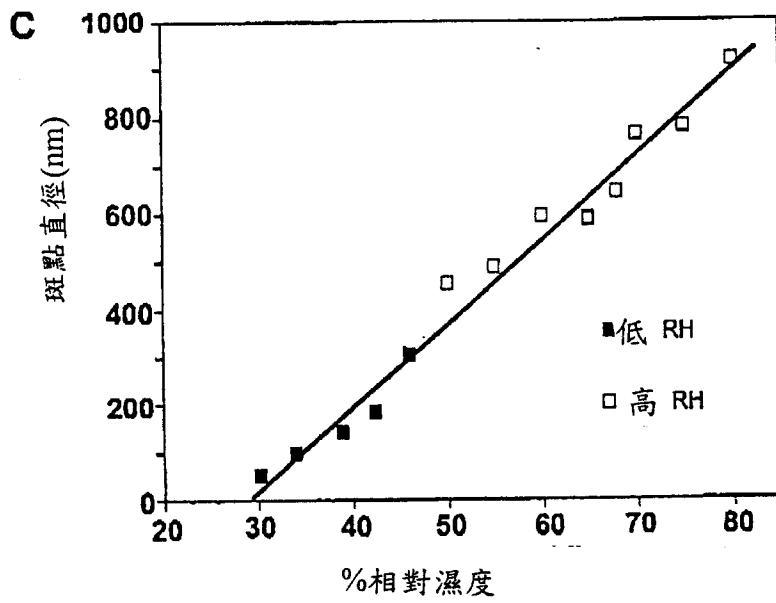
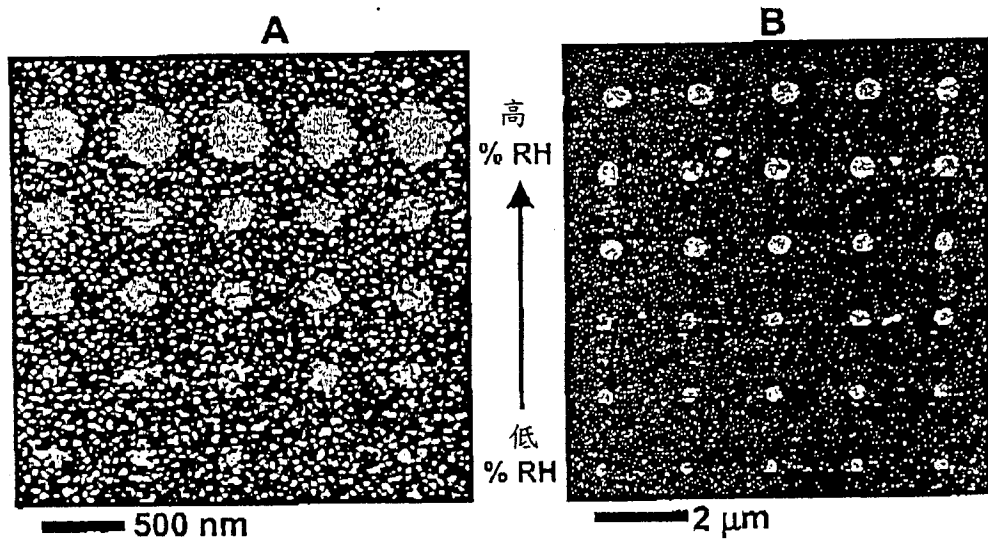


圖 14

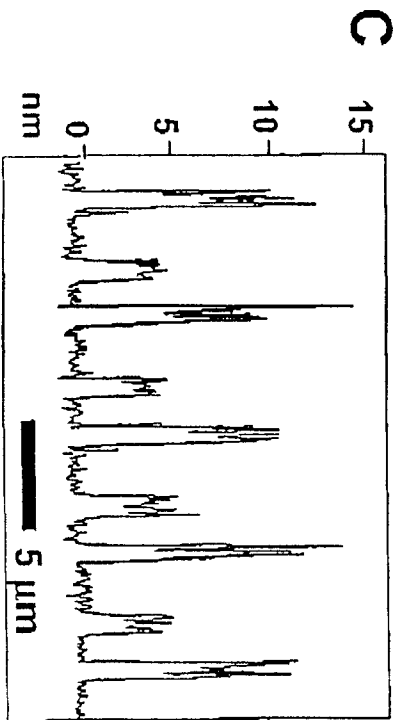
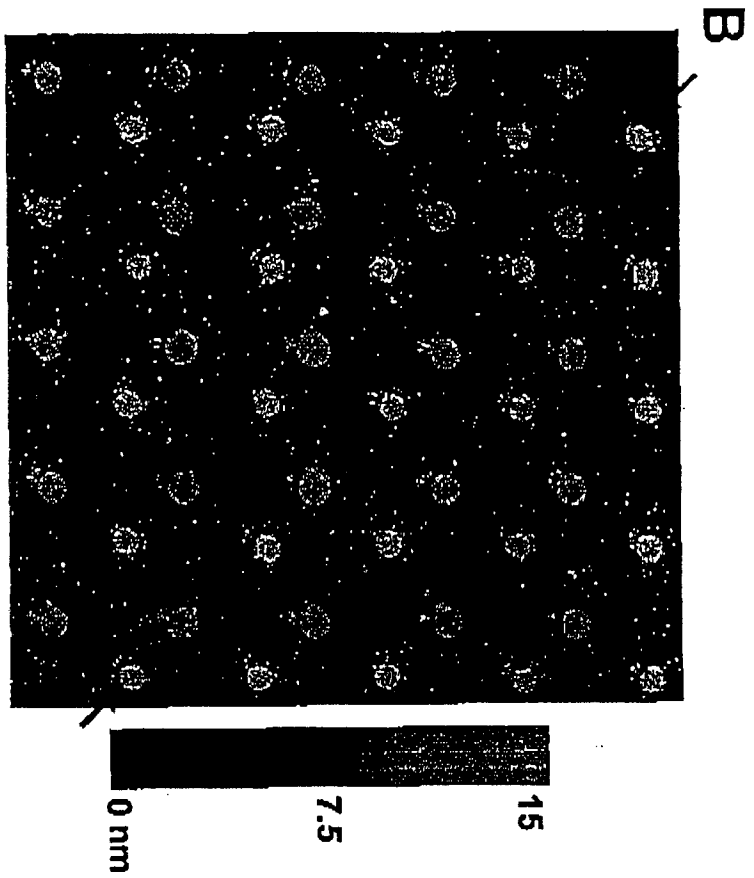
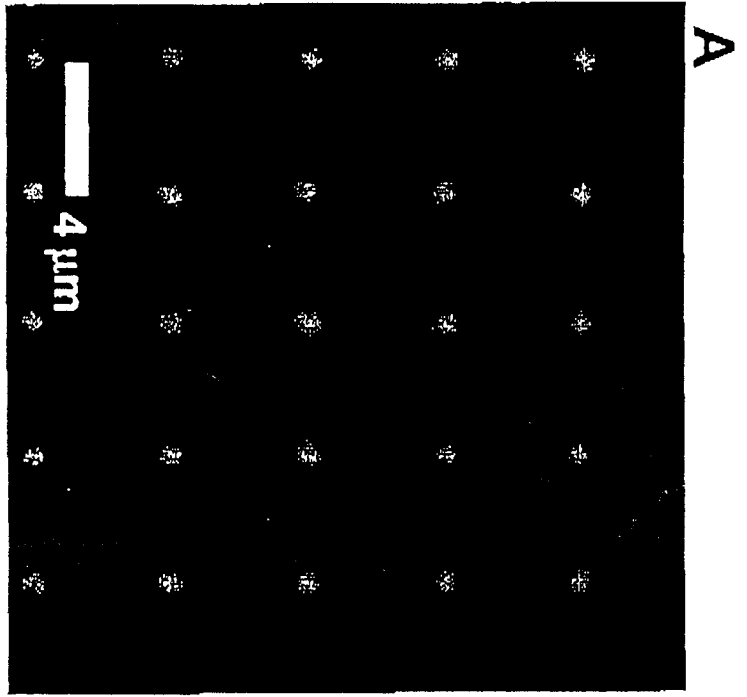


圖 15

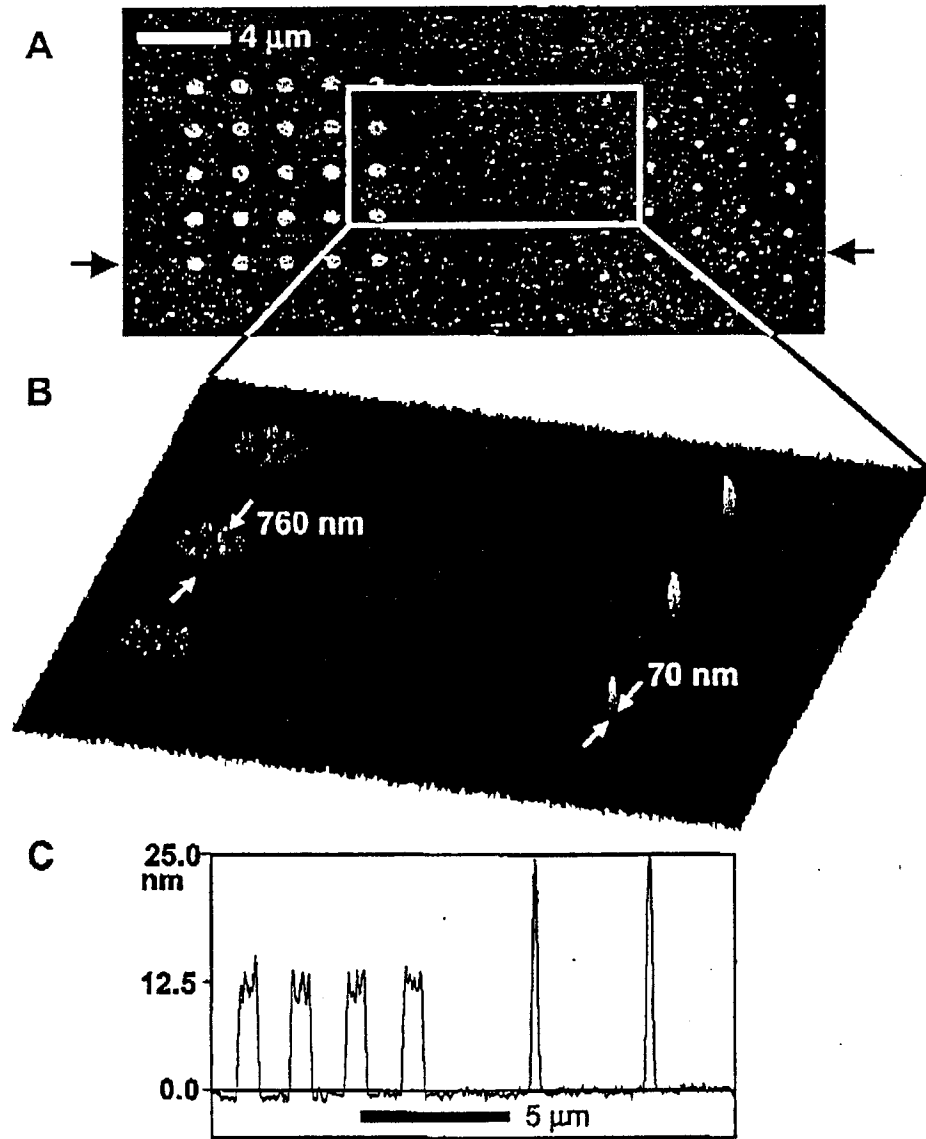


圖 16

陸、(一)、本案指定代表圖為：第 11 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

公告本

98年1月7日修(更)正本

拾、申請專利範圍

1. 一種在基材上產生核酸之奈米規模圖樣之方法，其包含：
修改掃描探針顯微尖端以具有正電荷且形成經修改之尖端；
以包含溶劑、核酸及無機鹽之墨水組合物塗佈該經修改之尖端；
相對基材安置該經修改及塗佈之掃描探針顯微尖端，使得該尖端在足夠高之相對濕度接近基材，使得將核酸自尖端轉移至基材而在基材上形成穩定之奈米規模圖樣。
2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中尖端為原子力顯微尖端。
3. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中尖端為中空尖端。
4. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中修改尖端以具有帶正電荷之胺基。
5. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中相對濕度為至少約25%。
6. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中相對濕度為約40%至約100%。
7. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中核酸為去氧核糖核酸。
8. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中核酸為單線寡核酸苷。
9. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中修改核酸以包含

- 提供化學吸附或共價地鍵結至基材之間隔基及終端基。
10. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中基材為導電體。
 11. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中基材為電絕緣體。
 12. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中圖樣具有約500奈米或更小之橫向尺寸。
 13. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中圖樣具有約200奈米或更小之橫向尺寸。
 14. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中圖樣具有約10奈米至約100奈米之橫向尺寸。
 15. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中核酸圖樣可與互補核酸混成。
 16. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中核酸圖樣可與互補核酸混成，其中互補核酸為探針之一部份。
 17. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中核酸圖樣可與互補核酸混成，其中互補核酸為將核酸圖樣鍵聯至探針之鍵聯劑之一部份。
 18. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中亦將基材鈍化。
 19. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中尖端為原子力顯微尖端，基材為導電體，核酸為去氧核糖核酸，及相對濕度為至少約25%。
 20. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中尖端為原子力顯微尖端，基材為導電體，核酸為去氧核糖核酸，相對濕度為至少約25%，及亦將基材鈍化。
 21. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中尖端為經處理而

- 含正電荷之原子力顯微尖端，核酸為去氧核糖核酸，及相對濕度為約25%至約100%。
22. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中尖端為經修改而帶正電之原子力顯微尖端，基材為導電體或電絕緣體，核酸為含共價鍵結或化學吸附至基材表面之官能基之去氧核糖核酸，相對濕度為約40%至約50%，及亦將基材鈍化。
23. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中尖端為原子力顯微尖端或中空尖端，基材為導電體或電絕緣體，核酸為含共價鍵結或化學吸附至基材表面之官能基之去氧核糖核酸，相對濕度為至少約25%，及亦將基材鈍化。
24. 一種核酸奈米陣列，其包含基材及在基材上之多個核酸圖樣，其中核酸圖樣化學吸附或共價鍵結至基材，具有約1,000奈米或更小之橫向尺寸且彼此分離1,000奈米或更小之距離，具有每平方公分至少100,000個之圖樣密度，及可與互補核酸混成，及其中核酸圖樣係藉根據申請專利範圍第1項之方法形成。
25. 一種方法，其包含：
- 修改掃描探針顯微尖端以具有胺基功能性以形成經修改之尖端；
 - 以包含核酸之墨水組合物塗佈該經修改之尖端；
 - 相對基材安置該經修改及塗佈之掃描探針顯微尖端，使得該尖端在足夠高之相對濕度接近基材，使得將核酸自尖端轉移至基材而在基材上形成穩定之圖樣。

26. 根據申請專利範圍第25項之方法，其中掃描探針顯微尖端為原子力顯微尖端。
27. 根據申請專利範圍第25項之方法，其中以胺基矽烷化合物進行修改。