

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C03C 17/34 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410005810.2

[45] 授权公告日 2006年5月10日

[11] 授权公告号 CN 1255682C

[22] 申请日 2004.1.28

[21] 申请号 200410005810.2

[30] 优先权

[32] 2003.1.28 [33] KR [31] 5486/03

[71] 专利权人 三星电子株式会社

地址 韩国京畿道

[72] 发明人 金宣希 李守祐 林根培 李英善

审查员 石剑平

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 范明娥 张平元

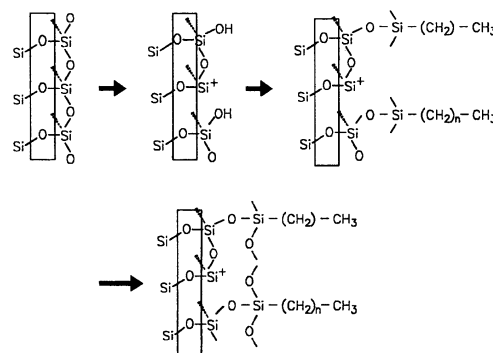
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称

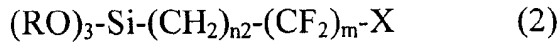
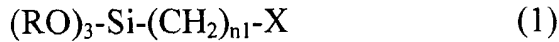
生化反应体系,处理该体系中所用基质表面的方法和处理所述表面的组合物

[57] 摘要

提供了一种处理生化反应体系中所用基质表面的方法,该方法包括通过汽相沉积下式(1)化合物和下式(2)化合物而在所述表面上形成聚合物膜:其中,R是甲基与乙基中的一个,X是甲基与三氟甲基中的一个,n1是1-3的整数,n2是1-10的整数,m是1-10的整数。(RO)₃-Si-(CH₂)_{n1}-X(1);(RO)₃-Si-(CH₂)_{n2}-(CF₂)_m-X(2)。



1. 一种处理生化反应体系中使用基质表面的方法，该方法包括通过汽相沉积按重量计 40 - 60 % 下式(1)化合物和按重量计 40 - 60 % 下式(2)化合物而在所述表面上形成聚合物膜：



其中，R 是甲基与乙基中的一个，X 是甲基与三氟甲基中的一个，n1 是 1-3 的整数，n2 是 1-10 的整数，m 是 1-10 的整数。

2. 权利要求 1 的方法，其中式(1)化合物和式(2)化合物是通过汽化同时沉积。

3. 权利要求 1 的方法，其中式(1)化合物和式(2)化合物是通过汽化相继沉积。

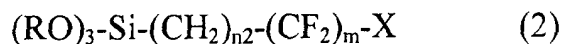
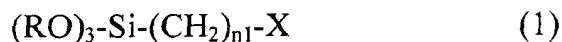
4. 权利要求 1-3 任一项的方法，其中汽相沉积在 60-140°C 的温度下进行。

5. 权利要求 1-3 任一项的方法，其中基质由硅或玻璃制成。

6. 一种生化反应体系，它含有通过权利要求 1-3 任一项的方法进行表面处理的基质。

7. 权利要求 6 的生化反应体系，其为聚合酶链反应体系。

8. 一种用于处理生化反应体系中所用基质表面的组合物，该组合物包括按重量计 40 - 60 % 下式(1)化合物和按重量计 40 - 60 % 下式(2)化合物：



- 其中，R 是甲基与乙基中的一个，X 是甲基与三氟甲基中的一个，n1 是 1-3 的整数，n2 是 1-10 的整数，m 是 1-10 的整数。

生化反应体系，处理该体系中所用
基质表面的方法和处理所述表面的组合物

5

发明领域

本发明涉及一种处理生物反应体系中所用基质表面的方法，更具体而言，涉及用化学方法处理生物反应体系中所用基质的表面以防止生物分子附着到所述表面上的方法。

10

相关技术描述

大多数小型化的片上试验(labs-on-a-chip)由DNA提取或样品制备单元、DNA放大单元和DNA检测单元组成。DNA放大单元包括重复加热和冷却到变性温度、退火温度和伸展温度以使DNA放大的热循环。通常情况下，
15 聚合酶链反应(PCR)体系是由聚丙烯 e-管制造的。近来，在PCR反应器中已越来越多地使用硅或玻璃。单位体积PCR反应器的表面积增加得越来越多，结果是，PCR反应物和产物的非特异性粘接到PCR反应器的表面上的情况也发生得更为频繁，导致PCR反应产率降低。

除了PCR反应器外，硅和玻璃还可以用作各种生化反应器的材料。相应地，
20 这些生化反应器也会经受到生物分子非特异性地粘接到硅或玻璃表面上并使生化反应产率降低。因此，在其中发生PCR反应的由硅或玻璃制造的生化反应器中，需要对反应器的硅或玻璃表面进行处理以防止生物分子非特性粘结。

用于防止生物分子非特异性粘接到硅结构表面，包括在其中发生生化
25 反应的PCR反应器表面上的示例性的通用建议包括，通过在高温下进行氧化而在硅结构表面上形成SiO₂膜并将可以抑制这种非特异性粘结的聚合物溶液沉积到硅基质的表面上。

美国专利6,475,722公开了在DNA处理体系，包括PCR反应器的硅表面上形成氧化硅膜或氮化硅膜来防止DNA或其他生物分子非特异性吸附到
30 硅表面上。

美国专利6,261,431公开了将牛血清白蛋白(BSA)加入到PCR缓冲液中。

也有人提出了将悬浮液，如吐温 20 与 BSA 一起加入以降低缓冲液的表面能的方法(Lvonne Schneegab 等人, “Miniaturized flow-through PCR with different types in a silicon chip thermocycler”, Lab-on-a-chip, 第 1 卷, 42-49 页, 2001 年)。

- 5 美国专利 6,156,389 公开了处理硅或玻璃表面成为疏水性的方法, 其中通过喷涂或浸涂法在硅或玻璃表面上涂覆一种包含 3-20 个碳原子, 并且在至少一端有三氟甲基基团的氟化单体溶液。但是, 该专利的目的仅在于使表面成为疏水性, 而且从诸多实验数据可以看出, 其导致较表面处理前的 PCR 产率更低, 表面处理的结果是仅仅生成一种氟化烃膜。(Nucleic Acids Research, “Chip PCR. 1. Surface Passivation of Microfabricated Silicon-glass Chips for PCR”, 24, 1996, 375-379)。

- 15 另外, 有一种使用可以抑制这种非特异性吸附的聚合物溶液的方法。该方法包括将所述聚合物溶液注入到小型化的 3D 片结构中以涂覆片表面, 并进行冲洗和干燥工艺。这些过程操作繁杂, 结果难以重现(Nucleic Acids Research, 24, 1996, 375-379, “Chip PCR. 1. Surface Passivation of Microfabricated Silicon-glass Chips for PCR”; Clinical Chemistry, 41, 1995, “Thermal Cycling and Surface Passivation of Micromachined Devices for PCR Chip”, 1367-1368)。

20 发明概述

本发明提供一种处理生化反应体系中所用基质表面, 如聚合酶链反应(PCR)的片表面的方法。

本发明也提供一种用于处理生化反应体系中所用基质表面的组合物。

- 25 在本发明的一个方面, 提供一种处理生化反应体系中所用基质表面的方法, 该方法包括通过汽相沉积下式(1)化合物和下式(2)化合物而在所述表面上形成聚合物膜:



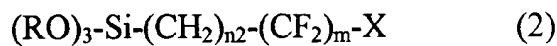
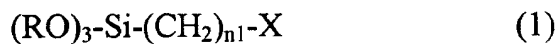
- 30 其中, R 是甲基与乙基中的一个, X 是甲基与三氟甲基中的一个, n1 是 1-3 的整数, n2 是 1-10 的整数, m 是 1-10 的整数。

所述式(1)化合物与所述式(2)化合物同时通过汽化来沉积, 或者, 所述式

(1)化合物与下述式(2)化合物可以相继地通过汽化来沉积。汽相沉积可以在60-140℃的温度下进行。

用于基质的非限定性材料包括硅、玻璃等。用上述方法处理的基质可以用于生化反应体系，如PCR片中。

- 5 在本发明的另一方面，提供了一种用于处理生化反应体系中所用基质表面的组合物，该组合物包括下式(1)化合物和下式(2)化合物：



- 其中，R是甲基与乙基中的一个，X是甲基与三氟甲基中的一个，n1是1-3的整数，n2是1-10的整数，m是1-10的整数。

上述组合物可以用于处理在生化反应体系，特别是PCR片中所使用的硅或玻璃基质的表面。

附图简述

- 15 通过参考附图更详细地描述示例性的实施方案，本发明的以上和其他特征及优点将变得更加显而易见，其中：

图1示出通过本发明的表面处理方法在硅基质表面上形成聚合物膜；

图2是根据实施例1进行表面处理后的硅片的聚合酶链反应(PCR)的产率图；

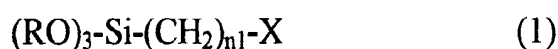
- 20 图3是根据对比例1进行表面处理后的硅片的PCR产率图；

图4是根据对比例2进行表面处理后的硅片的PCR产率图；和

图5是用作对照物的聚丙烯e-管的PCR产率图。

发明详述

- 25 在根据本发明一个实施方案处理生化反应体系中所用基质表面的方法中，通过同时进行下式(1)化合物和下式(2)化合物的汽相沉积而在所述基质上形成聚合物膜，其中这两种化合物中都包含硅烷基。或者，可以通过在基质上依次进行式(1)化合物和式(2)化合物的汽相沉积而形成聚合物膜：



- 30 $(RO)_3-Si-(CH_2)_{n2}-(CF_2)_m-X \quad (2)$

在上式(1)和(2)中，R是甲基或乙基，X是甲基或三氟甲基，n1是1-3

的整数, n_2 是 1-10 的整数, m 是 1-10 的整数。

当式(1)化合物与式(2)化合物通过汽相沉积同时涂覆在所述表面上时, 涂层组合物可以包含 40-60wt% 的式(1)化合物和 40-60wt% 的式(2)化合物。

5 当式(1)化合物与式(2)化合物同时或者依次通过汽相沉积涂覆在由硅或玻璃制成的基质上时, 通过这两种化合物的聚合而形成聚合物膜。汽相沉积可以在 60-140°C 的低温下通过汽化来进行。在沉积式(1)化合物与式(2)化合物之前, 基质表面可以通过紫外光照射进行活化。

用于生化反应体系中要进行表面处理的基质可以是玻璃或硅基质, 但是基质材料并不限于这些材料。

10 如上所述, 在通常包含硅烷基但具有不同链长的烃化合物通过汽相沉积涂覆在基质表面上时, 通过聚合可形成聚合物膜, 该聚合物膜由于烃链端的 $-CF_2$ 或 CF_3 基而具有疏水性表面, 该疏水性表面对于生物物质, 包括 DNA 不具有亲合性。

15 通过本发明的表面处理方法而在硅基质的表面上形成聚合物膜的方法示于图 1 中。

本发明也提供一种使用通过上述方法进行表面处理的基质所制造的生化反应体系。该生化反应体系的代表性的例子是聚合酶链反应(PCR)体系。但是, 本发明的生化反应体系不局限于 PCR 体系, 它可以是处理生化物质, 如核酸、蛋白质等的任何生化反应体系。

20 本发明用于处理生化反应体系中所用基质表面的组合物包含式(1)化合物和式(2)化合物。该组合物可以包含 40-60wt% 的式(1)化合物和 40-60wt% 的式(2)化合物。

以下将参考下列实施例更详细地描述本发明。以下的实施例是为了说明目的而不是用以限定本发明的范围。

25

实施例 1

在臭氧反应器中对含有天然氧化物的硅基质进行预处理以除去杂质并在其表面上形成硅烷醇基。

30 将 Teflon 腔置于温度设定为 85°C 的烘箱中, 在这一温度下具有硅烷基的化合物将会汽化。将包含具有式 $(MeO)_3-Si-(CH_2)-CH_3$ 的化合物(可得自 Aldrich)的容器放到 Teflon 腔中, 并使该化合物汽化以饱和 Teflon 腔。

将具有硅烷醇基的硅基质放到 Teflon 腔中并进行 10 分钟的汽相沉积。把 Teflon 腔中的容器以包含具有式 $(\text{MeO})_3\text{-Si-(CH}_2)_2\text{-(CF}_2)_7\text{-CF}_3$ 的化合物(可得自 Shin-etsu Chemical.)的容器代替,之后再进行 1 小时的汽相沉积。

实施例 2

- 5 以与实施例 1 相同的方法处理硅基质的表面,除了使用 1:1 的 $(\text{MeO})_3\text{-Si-(CH}_2)_2\text{-CH}_3$ 和 $(\text{MeO})_3\text{-Si-(CH}_2)_2\text{-(CF}_2)_5\text{-CF}_3$ 的组合物。

对比例 1

在臭氧反应器中对含有天然氧化物或者人造热氧化物的硅基质进行预处理以除去杂质并在其表面上形成硅烷醇基。

- 10 将 Teflon 腔置于温度设定为 85℃ 的烘箱中,在这一温度下具有硅烷基的化合物可以进行汽化。将包含具有式 $(\text{MeO})_3\text{-Si-(CH}_2)_2\text{-(CF}_2)_7\text{-CF}_3$ 的化合物(可得自 Shin-etsu Chemical.)的容器放到 Teflon 腔中,并使该化合物汽化以饱和 Teflon 腔。将具有硅烷醇基的硅基质放到 Teflon 腔中并进行 1 小时的汽相沉积。

15 对比例 2

将硅基质用硫酸、氟化氢水溶液、然后是去离子水洗涤并干燥。把硅基质放到反应器中,以便在 1000-1100℃ 的温度、1atm 的压力和 4L/min 的氧气流速下在其上形成 5000 埃厚的氧化物膜。

评价方法

- 20 使用 PCR 片进行 PCR,该片是使用实施例 1 与对比实施例 1 和 2 中经表面处理的硅基质制造的。PCR 片是在硅基质(下部基质)中形成通道结构并通过阳极粘结而用玻璃基质(上部基质)对其进行覆盖以在其中形成 PCR 腔而制造。将加热器与传感器连到各个硅基质的外表面上。在加热器上连接外部电子控制单元以施加电压,并连接外部电扇以控制 PCR 腔的温度。在各个上玻璃基质中均形成用于注入 PCR 反应物的入口和用于排放 PCR 产物的出口。

- 25 在各个 PCR 片中,在通过变性、退火和伸展的温度循环而放大 MODY3 基因。PCR 反应物中不含添加剂,如牛血清白蛋白(BSA)。

作为对照,使用聚乙烯 e-管在与上述 PCR 片相同的条件下进行 PCR。

- 30 使用 Labchip(得自 Agilent Co.)分析来自于各个 PCR 片和聚乙烯 e-管的 PCR 产物。

结果示于图 2-5 和表 1,其中图 2 是实施例 1 硅基质的结果,图 3 是对

比例 1 硅基质的结果，图 4 是对比例 2 硅基质的结果，图 5 是聚乙烯 e-管的结果。

表 4

实施例	表面处理方法	PCR 产率(ng/μL)
实施例 1	根据本发明,用两种含硅烷的化合物进行处理	40.1
对比例 1	用一种氟化烃进行处理	5.1
对比例 2	用氧化物处理	20.5
对照	聚丙烯 e-管	40.2

5

对氧化物处理的硅片(对比例 2),其 PCR 产率约为聚丙烯 e-管(对照)PCR 产率的一半。用一种含硅烷基作为连接基并且在一端具有三氟甲基基团的氟化烃处理的硅片(对比例 1),其 PCR 产率大大低于聚丙烯 e-管的 PCR 产率。但是,根据本发明表面处理的硅片,其 PCR 产率几乎与聚丙烯 e-管的 PCR 产率相同。

10

如上所述,根据本发明,当生化反应体系所用的硅或玻璃基质,如 PCR 片的表面用式(1)化合物和式(2)化合物处理时,可以抑制生物分子非特异性粘到硅或玻璃基质上,从而提高了生化反应,包括 PCR 的产率。

15

另外,根据本发明,所述组合物在低温下通过汽相沉积涂覆于基质上,从而不再需要使用昂贵的等离子体增强的化学汽相沉积(PECVD)体系。而且,在本发明中没有一系列繁杂的过程,如液态涂层组合物流到微小的 3D 片结构中、用洗液洗涤片结构以及干燥过程,从而节省了用于这种过程所需的时间。

20

虽然已经参考其示例性实施方案对本发明进行了具体的说明和描述,但本领域普通技术人员将会理解,在不背离以下权利要求所定义的本发明的精神与范围的情况下,可以对其进行形式与细节方面进行各种变化。

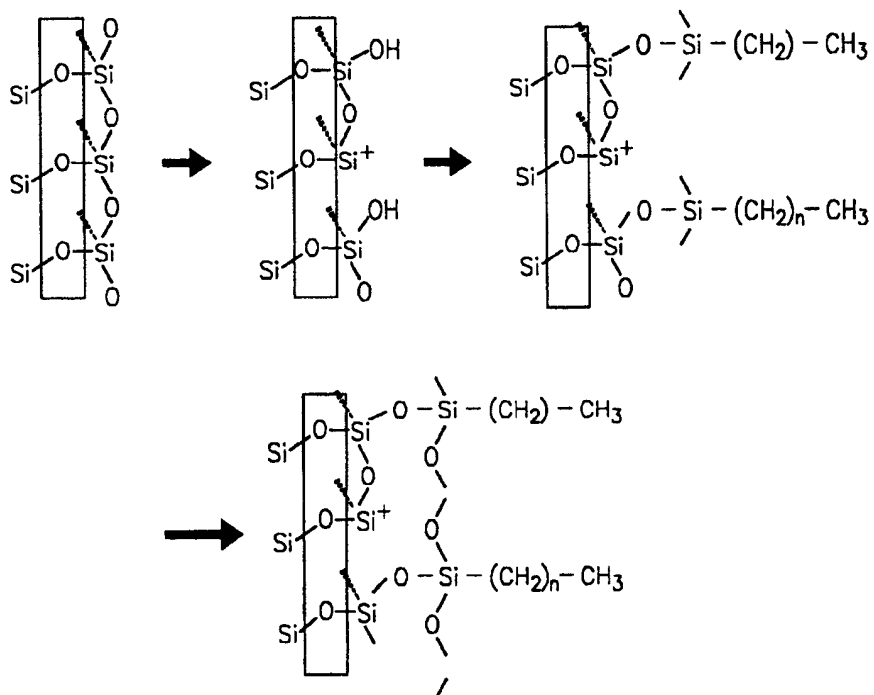


图 1

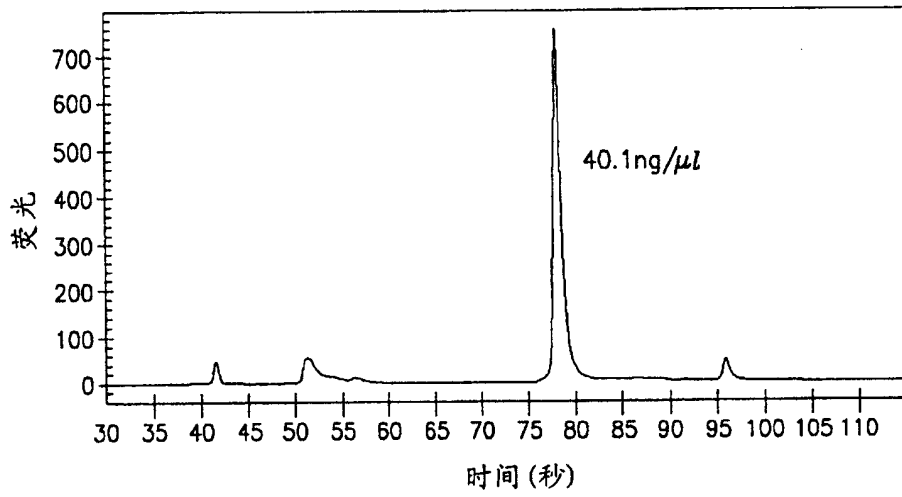


图 2

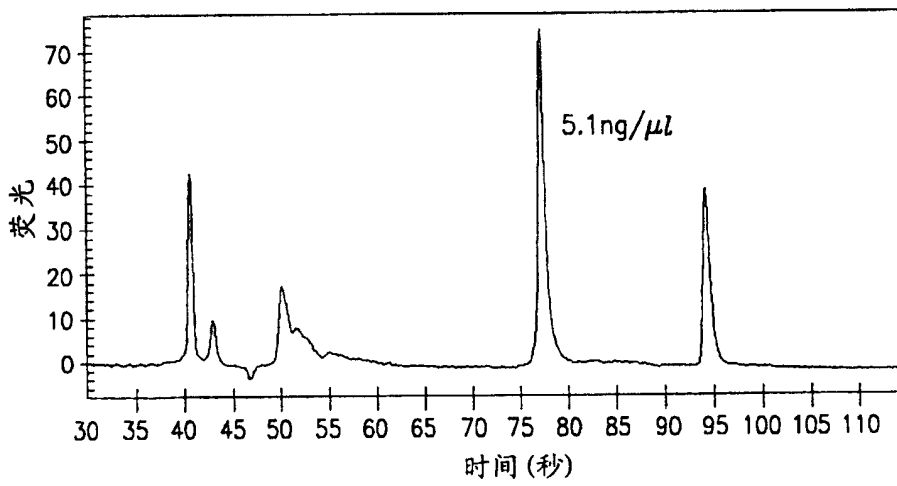


图 3

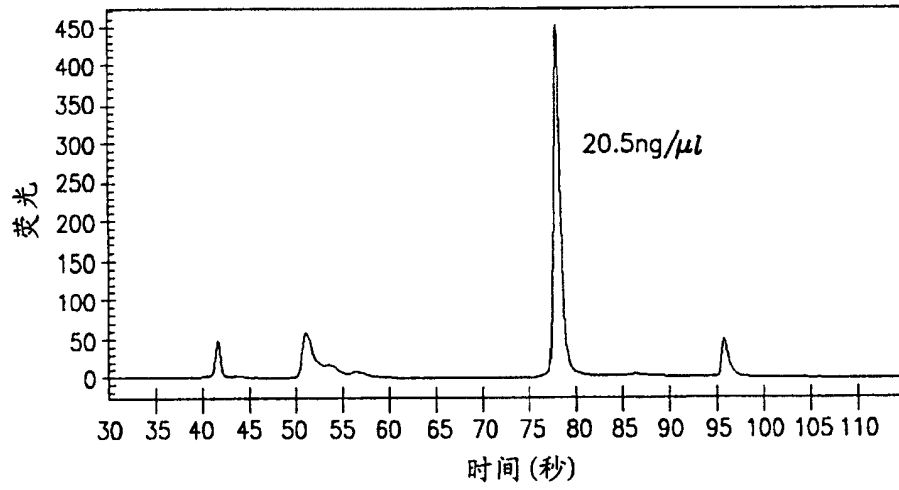


图 4

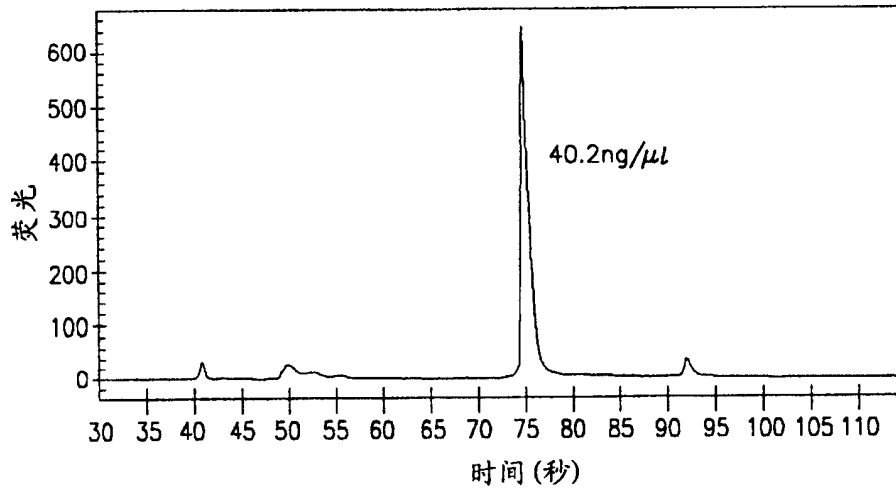


图 5