

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4045276号  
(P4045276)

(45) 発行日 平成20年2月13日(2008.2.13)

(24) 登録日 平成19年11月22日(2007.11.22)

(51) Int.Cl.	F I	
<b>GO 1 N 33/547 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/547	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	M
<b>GO 1 N 33/545 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 2 5 U
<b>GO 1 N 33/552 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 2 5 W
請求項の数 35 (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-5638 (P2005-5638)	(73) 特許権者	390019839
(22) 出願日	平成17年1月12日(2005.1.12)		三星電子株式会社
(65) 公開番号	特開2005-201901 (P2005-201901A)		Samsung Electronics
(43) 公開日	平成17年7月28日(2005.7.28)		Co., Ltd.
審査請求日	平成17年1月12日(2005.1.12)		大韓民国京畿道水原市靈通区梅灘洞416
(31) 優先権主張番号	2004-001963	(74) 代理人	100072349
(32) 優先日	平成16年1月12日(2004.1.12)		弁理士 八田 幹雄
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100110995
			弁理士 奈良 泰男
		(74) 代理人	100111464
			弁理士 齋藤 悦子
		(74) 代理人	100114649
			弁理士 宇谷 勝幸
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 表面に活性化されたカルボキシル基を有する固体基板を利用して生体分子を前記固体基板上に高密度で固定化する方法及びそれによって製造されるマイクロアレイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

固体支持体をシラン無水物でコーティングして前記固体支持体表面に無水物官能基を導入する段階と、

前記無水物官能基を加水分解させて、カルボキシル基にする段階と、

前記カルボキシル基をカルボジイミド及びコハク酸イミドと反応させて、前記カルボキシル基を活性化する段階と、

前記活性化されたカルボキシル基を有する固体支持体と生体分子とを接触させて前記生体分子を前記固体支持体上に固定させる段階と、

を含む生体分子を固体支持体上に固定させる方法。

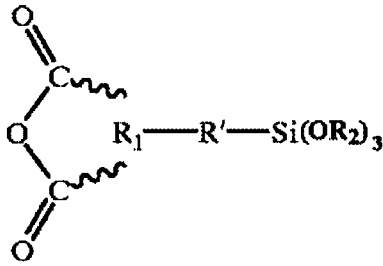
【請求項 2】

前記固体支持体は、ガラス、シリコンウエーハ、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリアクリレート及びポリウレタンよりなる群から選択される少なくとも一種であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記シラン無水物は、下記式(1)で示されることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【化 1】

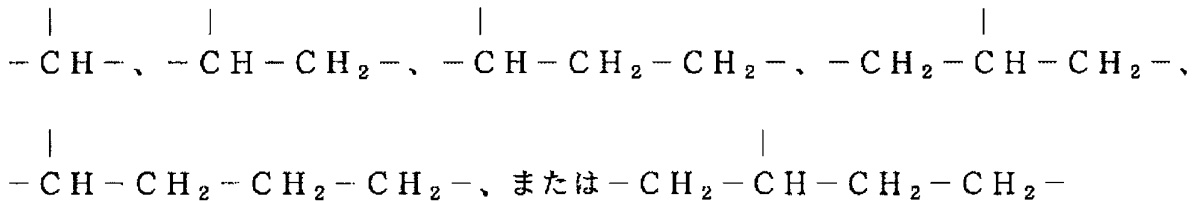


(式中、 $R_1$  は、3 価の直鎖もしくは分岐の脂肪族基または芳香族基であり、 $R'$  は、 $C_{1} \sim C_{20}$  の置換もしくは非置換のアルキレン基、アリーレン基、アリールアルキレン基またはアルキルアリーレン基であり、 $R_2$  は、 $C_{1} \sim C_{20}$  のアルキル基、アリール基、アリールアルキル基、アルキルアリール基または水素原子であり、それぞれの  $R_2$  は、同一であるかまたは異なる。)

## 【請求項 4】

前記  $R_1$  は、

## 【化 2】



であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記シラン無水物は、3 - (トリエトキシシリル) プロピルコハク酸無水物であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

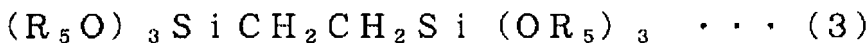
## 【請求項 6】

前記コーティングは、前記シラン無水物を 0.01 質量% ないし 90 質量% 含む溶液を用いて行われることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

前記溶液は、下記式 (3) で示されるシラン化合物をさらに含むことを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

## 【化 3】



(式中、 $R_5$  は、 $C_{1} \sim C_{20}$  の直鎖もしくは分岐のアルキル基、アリール基、アリールアルキル基またはアルキルアリール基、または水素原子である。)

## 【請求項 8】

前記シラン化合物は、前記シラン無水物 100 質量部に対して 0 ないし 0.01 質量部に含まれることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記コーティングは、ディップコーティング法、スピン法、スプレー法、及び化学気相蒸着法よりなる群から選択される少なくとも一種の方法によって行われることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 10】

前記加水分解は、20 ~ 100 の水溶液を用いて行われることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 11】

前記カルボジイミドは、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイ

10

20

30

40

50

ミドまたはN, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミドであることを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

前記コハク酸イミドは、N - ヒドロキシコハク酸イミドまたはN - ヒドロキシスルホコハク酸イミドであることを特徴とする請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

前記カルボジイミドおよび前記コハク酸イミドは、前記カルボジイミドおよび前記コハク酸イミドをそれぞれ  $20 \text{ mmol/l} \sim 200 \text{ mmol/l}$  含む溶液として用いられることを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記生体分子は、アミノ基を有することを特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

前記生体分子は、DNA、RNA、PNA、または蛋白質であることを特徴とする請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法によって製造されるマイクロアレイ。

【請求項 17】

固体支持体をアミノシランでコーティングして前記固体支持体の表面にアミノ官能基を導入する段階と、

前記アミノ官能基をテトラカルボキシル二無水物と反応させて、無水物官能基を固体支持体表面に導入する段階と、

前記無水物官能基を加水分解させて、カルボキシル基にする段階と、

前記カルボキシル基をカルボジイミド及びコハク酸イミドと反応させて、前記カルボキシル基を活性化する段階と、

前記活性化されたカルボキシル基を有する固体支持体と生体分子とを接触させて前記生体分子を前記固体支持体上に固定させる段階と、  
を含む生体分子を固体支持体上に固定させる方法。

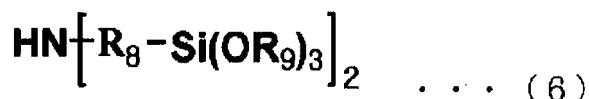
【請求項 18】

前記コーティングは、アミノシラン化合物を  $0.01$  質量%ないし  $90$  質量%含む溶液を用いて行われることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記アミノシラン化合物は、下記式 (5) または (6) で示されることを特徴とする請求項 18 に記載の方法、

【化 4】



(式中、 $\text{R}_8$  は、酸素原子もしくは窒素原子を含んでいてもよい、アルキレン基、アリーレン基、アリーラルキレン基、またはアルキルアリーレン基であり、 $\text{R}_9$  は、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$  のアルキル基、アリール基、アリーラルキル基もしくはアルキルアリール基または水素原子である。)

【請求項 20】

前記溶液は、下記式 (3) で示されるシラン化合物をさらに含むことを特徴とする請求項 18 または 19 に記載の方法。

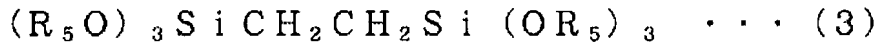
10

20

30

40

## 【化5】



(式中、 $R_5$  は、 $C_1 \sim C_{20}$  の直鎖もしくは分岐のアルキル基、アリール基、アリールアルキル基またはアルキルアリール基、または水素原子である。)

## 【請求項21】

前記シラン化合物は、前記アミノシラン化合物100質量部に対して0ないし0.01質量部で含まれることを特徴とする請求項20に記載の方法。

## 【請求項22】

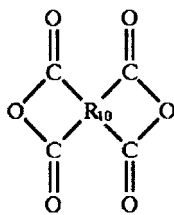
前記コーティングは、ディップコーティング法、スピニング法、スプレー法、及び化学気相蒸着法よりなる群から選択される少なくとも一種の方法によって行われることを特徴とする請求項17~21のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項23】

前記テトラカルボキシル二無水物は、下記式(7)で示されることを特徴とする請求項17~22のいずれかに記載の方法。

## 【化6】



... (7)

20

(式中、 $R_{10}$  は、酸素原子、フッ素原子を含んでいてもよい、4価の芳香族基、複素環基、脂環基または脂肪族基である。)

## 【請求項24】

前記テトラカルボキシル二無水物は、ピロメリット酸二無水物、3,3',4,4'-ビフェニルテトラカルボン酸二無水物、2,2',3,3'-ビフェニルテトラカルボン酸二無水物、2,3,3',4'-ビフェニルテトラカルボン酸二無水物、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸二無水物、3,3',4,4'-ベンゾフェノンテトラカルボン酸二無水物、2,2',3,3'-ベンゾフェノンテトラカルボン酸二無水物、2,3,3',4'-ベンゾフェノンテトラカルボン酸二無水物、ビス(3,4-ジカルボキシフェニル)エーテル二無水物、ビス(3,4-ジカルボキシフェニル)スルホン二無水物、1,4,5,8-ナフタレンテトラカルボン酸二無水物、1,2,5,6-ナフタレンテトラカルボン酸二無水物、2,3,6,7-ナフタレンテトラカルボン酸二無水物、2,2'-ビス(3,4-ジカルボキシフェニル)-ヘキサフルオロプロパン二無水物、シクロブタンテトラカルボン酸二無水物、メチルシクロブタンテトラカルボン酸二無水物、及び1,2,3,4-テトラカルボキシブタン二無水物よりなる群から選択される少なくとも一種であることを特徴とする請求項17~23のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項25】

前記テトラカルボキシル二無水物は、前記テトラカルボキシル二無水物を0.02質量%ないし90質量%含む溶液として用いられることを特徴とする請求項17~24のいずれかに記載の方法。

40

## 【請求項26】

前記溶液における溶媒が、アセトン、メチルエチルケトン、ジメチルホルムアミド及びN-メチルピロリドンから選択される少なくとも一種であることを特徴とする請求項25に記載の方法。

## 【請求項27】

前記加水分解は、20~100の水溶液を用いて行われることを特徴とする請求項17~26のいずれかに記載の方法。

50

## 【請求項 28】

前記カルボジイミドは、1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) カルボジイミドまたは N , N ' - ジシクロヘキシルカルボジイミドであることを特徴とする請求項 17 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 29】

前記コハク酸イミドは、N - ヒドロキシコハク酸イミドまたは N - ヒドロキシスルホコハク酸イミドであることを特徴とする請求項 17 ~ 28 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 30】

前記カルボジイミドおよび前記コハク酸イミドは、前記カルボジイミドおよびコハク酸イミドをそれぞれ  $20\text{ mmol} / \text{l} \sim 200\text{ mmol} / \text{l}$  含む溶液として用いられることを特徴とする請求項 17 ~ 29 のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 31】

前記生体分子は、アミノ基を有することを特徴とする請求項 17 ~ 30 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 32】

前記生体分子は、DNA、RNA、PNA、または蛋白質であることを特徴とする請求項 17 ~ 31 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 33】

請求項 17 ~ 32 のいずれかの方法によって製造されるマイクロアレイ。

## 【請求項 34】

固体支持体をシラン無水物でコーティングする際に、1, 2 - ビス(トリエトキシシリル)エタンをさらに含むシラン無水物溶液で固体支持体をコーティングすることを特徴とする請求項 1 ~ 15 に記載の方法。

20

## 【請求項 35】

固体支持体をアミノシランでコーティングする際に、1, 2 - ビス(トリエトキシシリル)エタンをさらに含むアミノシラン溶液で固体支持体をコーティングすることを特徴とする請求項 17 ~ 32 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

30

## 【0001】

本発明は生体分子をマイクロアレイ用基板に固定する方法及びそれによって製造されるマイクロアレイに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

マイクロアレイは、特定分子が基板上に一定の領域に高密度で固定化されたものを称する。このようなマイクロアレイには、例えば、ポリヌクレオチドまたは蛋白質マイクロアレイが公知である。マイクロアレイについては、例えば、特許文献 1 及び 2 に開示されている。また、前記マイクロアレイの製造方法には、一般的にフォトリソグラフィを利用する方法が知られている。フォトリソグラフィを利用する場合、除去可能な保護基を有する単量体が塗布された基板表面の一定領域をエネルギー源に露出させて保護基を除去し、除去可能な基で保護された単量体をカップリングさせる段階を反復することによって、ポリヌクレオチドのマイクロアレイを製造できる。さらに他の方法では、既に合成されたポリヌクレオチドを一定の位置に固定化させる方法などがある。既に合成されたポリヌクレオチドを一定の位置に固定化させる方法としては、例えば、スポットティング法、インクジェットプリンタのような圧電印刷方式、及びマイクロピペティング法などが利用される。一般的に、既に合成された生体分子を基板上に固定化する方式が、生体分子を自由に配列できるという長所があるため、広く使われている。

40

## 【0003】

ガラスやプラスチックのような基板自体の表面に生体分子を固定化することは一般的に

50

難しく、既に合成された生体分子を固体基板上に固定化するために、基板表面は特定の官能基を有するように処理される。このような官能基の例には、例えば、アミノ基、アルデヒド基、エポキシド、及びエステル基が挙げられる。

【0004】

固体基板を官能基でコーディングし、ここに活性化された生体分子を固定化する方法は、公知のものである。例えば、特許文献3には、ヘパリンまたはラミニンのようなカルボキシル基を有している蛋白質のカルボキシル基をカルボジイミドで活性化させ、これをアミノ基でコーディングされた固体基板と反応させて固定化する方式が開示されている。また、特許文献4には、アミノ基でコーディングされたガラス基板にリン酸イミダゾリドによって活性化されたポリヌクレオチドを基板に固定化する方法が開示されている。しかし、これらの方法はどれもアミノ基でコーディングされた基板を使用しているため、生体分子を活性化しなければならないという短所がある。

10

【0005】

また、特許文献5には、既にカルボキシル基を有しているプラスチックプレートを利用してポリヌクレオチドを固定化する方法が開示されている。例えば、カルボキシル基とアミノ基とを同時に有している“Sumilon”MS-3796F及びMS-3696F（住友ベークライト社）が利用されうるということが開示されている。しかし、前記方法は、既にカルボキシル基を有しているプラスチックプレートを使用しているため、カルボキシル基の密度が適正でないか、または高くないという問題点がある。また、前記方法は、ポリヌクレオチドが固定化された支持体を利用してcDNAを合成する方法に関する。したがって、マイクロアレイのような標的生体分子に関する分析のために、蛍光度を測定する必要性が高くない。したがって、高密度のカルボキシル基を導入する必要性についても言及されていない。

20

【特許文献1】米国特許第5,445,934号公報

【特許文献2】米国特許第5,744,305号公報

【特許文献3】米国特許第5,350,800号公報

【特許文献4】米国特許第5,760,130号公報

【特許文献5】米国特許第5,656,462号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

標的生体分子に対する分析結果から得られる蛍光度のより高い強度を得るために、マイクロアレイ用の基板上に生体分子をより高密度で固定化させることが所望されている。

【0007】

本発明が解決しようとする目的は、活性化されたカルボキシル基を有する基板を利用して生体分子を基板上に高密度で固定化する方法を提供することである。

【0008】

本発明が解決しようとする目的は、また、活性化されたカルボキシル基を有する基板を利用して生体分子を基板上に高密度で固定化する方法によって製造されるマイクロアレイを提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は上記課題に鑑み鋭意検討した結果、カルボン酸無水物を利用することによって、基板上に高密度で生体分子を固定化できることを見出し、本発明をするに至った。

【0010】

すなわち、本発明の一態様は、固体支持体をシラン無水物でコーティングして前記固体支持体表面に無水物官能基を導入する段階と、前記無水物官能基を加水分解させて、カルボキシル基にする段階と、前記カルボキシル基をカルボジイミド及びコハク酸イミドと反応させて、前記カルボキシル基を活性化する段階と、前記活性化されたカルボキシル基を有する固体支持体と生体分子とを接触させて前記生体分子を前記固体支持体上に固定させ

50

る段階と、を含む生体分子を固体支持体上に固定させる方法である。

【0011】

また、本発明の他の一態様は、固体支持体をアミノシランでコーティングして前記固体支持体の表面にアミノ官能基を導入する段階と、前記アミノ官能基をテトラカルボキシル二無水物と反応させて、無水物官能基を固体支持体表面に導入する段階と、前記無水物官能基を加水分解させて、カルボキシル基にする段階と、前記カルボキシル基をカルボジイミド及びコハク酸イミドと反応させて、前記カルボキシル基を活性化する段階と、前記活性化されたカルボキシル基を有する固体支持体と生体分子とを接触させて前記生体分子を前記固体支持体上に固定させる段階と、を含む生体分子を固体支持体上に固定させる方法である。

10

【発明の効果】

【0012】

本発明の生体分子を固体支持体上に付着させる方法によれば、一つの無水物官能基に対して二つのカルボキシル基が生成されるため、生体分子を高密度で固体支持体上に固定化できる。

【0013】

本発明のマイクロアレイによれば、生体分子が高密度で固定化されているため、マイクロアレイを利用した分析の結果、得られる蛍光度をより向上させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明は、固体支持体をアミノシランでコーティングして前記固体支持体の表面にアミノ官能基を導入する段階と、前記アミノ官能基をテトラカルボキシル二無水物と反応させて、無水物官能基を固体支持体表面に導入する段階と、前記無水物官能基を加水分解させて、カルボキシル基にする段階と、前記カルボキシル基をカルボジイミド及びコハク酸イミドと反応させて、前記カルボキシル基を活性化する段階と、前記活性化されたカルボキシル基を有する固体支持体と生体分子とを接触させて前記生体分子を前記固体支持体上に固定させる段階と、を含む生体分子を固体支持体上に固定させる方法を提供する。

20

【0015】

本発明の方法において、前記固体支持体は、特別に制限されず、透明または不透明なものでありうる。望ましくは、前記固体支持体は、環境的に安定的であるか、または耐化学性を有する物質である。望ましい固体支持体の例としては、ガラス、シリコンウェーハ、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリアクリレート及びポリウレタンからなる群から選択される少なくとも一種が挙げられる。

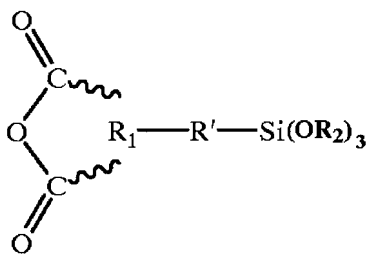
30

【0016】

本発明の方法において、前記シラン無水物は、望ましくは、下記式(1)の構造式を有する。

【0017】

【化1】



40

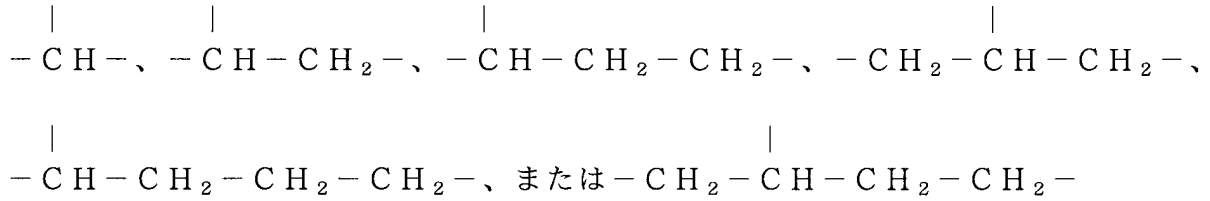
【0018】

(式中、 $R_1$  は、3 価の直鎖または分岐の脂肪族基または芳香族基であり、望ましくは、 $R_1$  は、 $C_{1} \sim C_{20}$  の直鎖または分岐の脂肪族基であり、さらに望ましくは、 $R_1$  は、

【0019】

50

## 【化2】



## 【0020】

であり、R'は、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>の置換または非置換のアルキレン基、アリーレン基、アリーールアルキル基またはアルキルアリーレン基であり、R<sub>2</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>のアルキル基、アリーール基、アリーールアルキル基、アルキルアリーール基または水素原子であり、それぞれのR<sub>2</sub>は、同一または異なる。) 10

さらに望ましくは、前記シラン無水物は、3-(トリエトキシシリル)プロピルコハク酸無水物であり、これはGelest社等から購入可能である。

## 【0021】

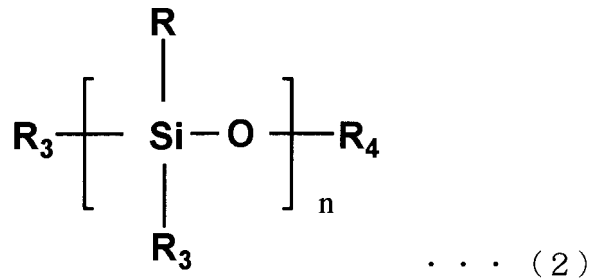
本発明の方法において、前記固体支持体表面をシラン無水物でコーディングするには、シラン無水物を0.01質量%ないし90質量%で含む溶液を用いて行うのがよい。

## 【0022】

前記溶液は、下記式(2)または式(3)で示されるシラン化合物をさらに含むのがよい。 20

## 【0023】

## 【化3】

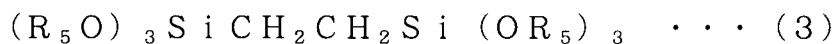


## 【0024】

(式中、RはC<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>の直鎖または分枝のアルキル基、アリーール基、アリーールアルキル基、アルキルアリーール基、または水素原子であり、R<sub>3</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>のアルコキシ基、ヒドロキシ基またはハロゲン原子であり、R<sub>4</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>の直鎖または分枝のアルキル基、アリーール基、アリーールアルキル基またはアルキルアリーール基、またはフッ素化炭化水素官能基であり、nは1～15の整数である。また、前記フッ素化炭化水素官能基は、望ましくは-CF<sub>3</sub>を含むフッ素化炭化水素官能基である。)

## 【0025】

## 【化4】



## 【0026】

(式中、R<sub>5</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>の直鎖または分枝のアルキル基、アリーール基、アリーールアルキル基またはアルキルアリーール基、または水素原子である。また、前記R<sub>5</sub>は、同一であっても異なってもよい。)

前記式3で示されるシラン化合物としては、1,2-ビス(トリエトキシシリル)エタンなどが好ましく挙げられる。

## 【0027】

前記式2または式3で示される前記シラン化合物は、シラン無水物100質量部に対して0ないし0.01質量部で含まれる。 50



## 【0028】

コーティングに使われる前記溶液は、適当な溶媒に化学式1の化合物を混合することにより得られる。また、前記溶液には化学式2または化学式3で示されるシラン化合物がさらに混合されてもよい。前記シラン無水物と化学式2または3で示されるシラン化合物との質量比は、0.01：99.99ないし100：0が望ましい。また、合成されたシランオリゴマーの全組成は、質量比で0.01ないし90%になりうる。前記溶液に使われうる溶媒には、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールのようなアルコール溶媒またはメチルエチルケトン、ジメチルホルムアミド(DMF)、メチルピロリドン(N-メチルピロリドン)またはこれらの混合物などが挙げられる。

## 【0029】

本発明の方法において、前記シラン無水物のコーティングは、従来公知の方法を用いて行えばよい。例えば、ディップコーティング法(自己組織化単分子コーティング法)、スピニング法、スプレイ法、及び化学気相蒸着法よりなる群から選択される少なくとも一種の方法によって行われうる。ディップコーティング法は、1分以上行えばよく、スピニング法は、300rpmないし2,500rpmで行えばよい。このように形成されたシラン無水物コーティング層は、100ないし300ほどの温度で硬化させて3次元の網状構造層を形成させうる。

## 【0030】

次に、本発明の方法において、前記シラン無水物の加水分解は、20～100の水溶液を用いて行われうる。このような加水分解は、前記温度で酸性または中性の水などで1分以上処理し、窒素雰囲気下で乾燥させることによって行われうる。加水分解の結果、一つのシラン無水物から二つのカルボキシル基が生成されるため、高密度のカルボキシル基を有する基板が得られる。これにより、高密度の活性化されたカルボキシル基を形成でき、前記活性化されたカルボキシル基に生体分子を高密度で固定できる。例えば、従来から広く用いられている、表面にアミノ基を有する基板にコハク酸無水物を反応させれば一つのカルボキシル基が形成される。しかしながら、本発明の方法によれば、従来の表面にアミノ基を有する基板を利用する場合に比べて2倍ほど多くのカルボキシル基を形成することができる。従って、このような基板を用いたマイクロアレイを利用した分析で、蛍光度が強く検出されうる。

## 【0031】

次に、本発明の方法において、カルボキシル基をカルボジイミドおよびコハク酸イミドと反応させる。

## 【0032】

前記カルボジイミドは、望ましくは、下記式(4)で示される。

## 【0033】

## 【化5】



## 【0034】

(式中、 $R_6$ は、アルキル基またはシクロアルキル基であり、 $R_7$ は、アルキル基、シクロアルキル基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノアルキル基またはシクロアルキルアミノ基でありうる。)

望ましくは、前記カルボジイミドは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)またはN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)である。前記EDCは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩として用いてもよい。また、本発明の方法において、前記コハク酸イミドは、望ましくは、N-ヒドロキシコハク酸イミドまたはN-ヒドロキシスルホコハク酸イミド(Sulfo-NHS)である。

## 【0035】

本発明の方法において、前記カルボジイミドおよび前記コハク酸イミドは、前記カルボジイミドおよびコハク酸イミドを、それぞれ20mmol/l~200mmol/l含む溶液として用いられうる。前記溶液に用いられる溶媒は、特に制限されないが、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールのようなアルコール溶媒またはメチルエチルケトン、ジメチルホルムアミド(DMF)、メチルピロリドン(N-メチルピロリドン)またはこれらの混合物などが挙げられる。反応時間は、特に制限されないが、望ましくは30分以上である。カルボジイミドまたはN-ヒドロキシコハク酸イミドなどの上述した化合物は、Aldrich Chemical社などから購入可能である。

【0036】

カルボキシル基とカルボジイミド及びコハク酸イミドとの反応は次のようなメカニズムによって生じると推定されるが、下記メカニズムに限定されるわけではない。まず、カルボジイミドによって基板表面のカルボキシル基は、アミノ基と反応できる不安定な中間体、すなわち、O-アシルイソウレアエステル結合(O-acylisourea ester bond)を形成し、N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)または水溶性であるN-ヒドロキシルホコハク酸イミド(Sulfo-NHS)によってさらに安定的なスクシンイミジルエステルを形成し、活性化されたカルボキシル基を有する基板になる。

【0037】

本発明の方法において、固定化される生体分子は、活性化されたカルボキシル基に結合可能な官能基を有するものであれば特に制限なく用いられる。前記生体分子はアミノ基を有するものが望ましい。前記生体分子は、具体的には、DNA、RNA、PNA、または蛋白質などが望ましく挙げられる。

【0038】

本発明によって製作された活性化されたカルボキシル基を有する基板に、1級アミノ基のような反応性官能基を有する生体分子を反応させれば、活性化されたカルボキシル基のエステル結合に作用してアミド結合を形成して生体分子が固定化される。このような固定化方式は、ハイブリダイゼーション過程で生じうる標的物質と基板との非特異的結合を大きく減らせるという長所がある。

【0039】

図1は、本発明による表面に活性化されたカルボキシル基を有するマイクロアレイ用基板の製造方法の一例を表す反応式である。まず、固体支持体上にシラン無水物、すなわち、3-(トリエトキシシリル)プロピルコハク酸無水物(TSA)をコーティングして、無水物官能基を固体支持体表面に導入する(a)。次いで、加水分解反応を行って、カルボキシル基を有する基板を製造し(b)、これを1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)及びN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)のようなカルボジイミドならびにN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)及びN-ヒドロキシルホコハク酸イミド(Sulfo-NHS)のようなコハク酸イミド化合物の存在下で反応させて、活性化されたカルボキシル基を有する基板を製造する(c)。

【0040】

本発明はまた、上述した活性化されたカルボキシル基を有する固体支持体表面に生体分子を固定する方法によって生体分子を固定して製造されるマイクロアレイを提供する。このようなマイクロアレイは、従来一般的なマイクロアレイのように、生体分子が固定化されたスポット領域がアレイ状に配列されている。

【0041】

生体分子を上述した活性化されたカルボキシル基を有する固体支持体上に固定化する方法は、公知の方法が用いられる。例えば、接触式のスポットティング、インクジェットプリンタのような圧電印刷方式及びマイクロピペティング法が利用されうる。

【0042】

本発明はまた、固体支持体をアミノシランでコーティングして前記固体支持体の表面にアミノ官能基を導入する段階と、前記アミノ官能基をテトラカルボキシル二無水物と反応

10

20

30

40

50

させて、無水物官能基を固体支持体表面に導入する段階と、前記無水物官能基を加水分解させて、カルボキシル基にする段階と、前記カルボキシル基をカルボジイミド及びコハク酸イミドと反応させて、前記カルボキシル基を活性化する段階と、前記活性化されたカルボキシル基を有する固体支持体と生体分子とを接触させて前記生体分子を前記固体支持体上に固定させる段階と、を含む生体分子を固体支持体上に固定させる方法を提供する。

【0043】

固体支持体としては、上記したのと同様のものが用いられる。

【0044】

本発明の方法において、固体支持体をアミノシランでコーティングするには、アミノシラン化合物を0.01質量%ないし90質量%含む溶液を用いて行われるのが望ましい。

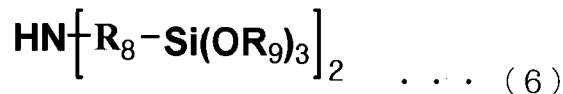
10

【0045】

本発明の方法において、前記アミノシラン化合物は、下記式(5)または(6)で示される。

【0046】

【化6】



20

【0047】

(式中、 $\text{R}_8$ は、酸素原子、窒素原子を含んでいてもよい、アルキレン基、アリーレン基、アリーラルキレン基またはアルキルアリーレン基であり、 $\text{R}_9$ は、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$ のアルキル基、アリール基、アリーラルキル基またはアルキルアリール基または水素原子である。)

望ましくは、前記 $\text{R}_8$ はアルキレン基であり、前記 $\text{R}_9$ はアルキル基であり、さらに望ましくは、前記 $\text{R}_8$ は $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ のアルキレン基であり、前記アルキル基はメチル基、エチル基、プロピル基、またはブチル基である。アミノシラン化合物の具体的な例には、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、2-アミノウンデシルトリメトキシシラン、アミノフェニルトリメトキシシラン、ビス(トリメトキシシリルプロピル)アミン、N-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリエトキシシランなどが挙げられる。

30

【0048】

本発明の方法において、固体支持体表面にアミノシランをコーティングする段階は、化学式(5)または(6)で示される1以上のアミノシラン化合物と、水、エタノール、及びメタノールのようなアルコール溶媒とを混合して溶液を調製し、この溶液を攪拌してアミノシラン化合物を縮合反応させてオリゴマー水和物を得る段階を含む。アミノシラン化合物でコーティングされた基板は、200ないし300ほどの温度で焼成過程を経て3次元の網状構造層を形成させうる。

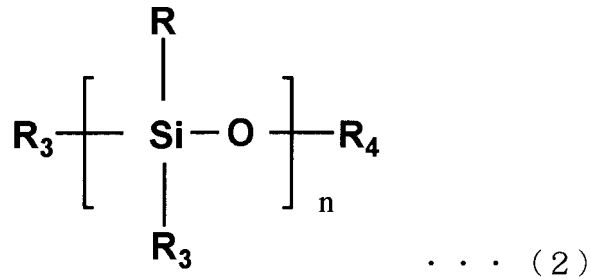
40

【0049】

また、本発明の方法において、固体支持体表面にアミノシランをコーティングする際に用いる前記溶液は、下記式(2)または式(3)で示されるシラン化合物をさらに含んでいてもよい。

【0050】

【化7】



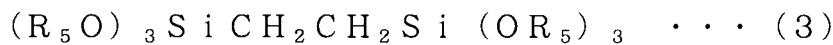
【0051】

10

(式中、RはC<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>の直鎖または分枝のアルキル基、アリール基、アリールアルキル基、アルキルアリール基、または水素原子であり、R<sub>3</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>のアルコキシ基、ヒドロキシ基またはハロゲン原子であり、R<sub>4</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>の直鎖または分枝のアルキル基、アリール基、アリールアルキル基またはアルキルアリール基、またはフッ素化炭化水素官能基であり、nは1～15の整数である。また、前記フッ素化炭化水素官能基は、望ましくは-CF<sub>3</sub>を含むフッ素化炭化水素官能基である。)

【0052】

【化8】



20

【0053】

(式中、R<sub>5</sub>は、C<sub>1</sub>ないしC<sub>20</sub>の直鎖または分枝のアルキル基、アリール基、アリールアルキル基またはアルキルアリール基、または水素原子でありうる。また、前記R<sub>5</sub>は、同一であっても異なってもよい。)

前記式3で示されるシラン化合物としては、1,2-ビス(トリエトキシシリル)エタンなどが好ましく挙げられる。

【0054】

このような式(2)または(3)のシラン化合物は、アミン層の疎水性を調節するために疎水性シラン化合物、または、結着力を向上させるためにシランアルコキシドを混合して使用してもよい。

30

【0055】

前記式(2)または式(3)などで示されるシラン化合物は、アミノシラン化合物100質量部に対して0ないし0.01質量部で含まれることが望ましい。

【0056】

本発明の方法において、前記アミノシランをコーティングする方法は、当業者によく知られているコーティング技術を利用できる。例えば、ディップコーティング法(自己組織化単分子コーティング法)、スピニング法、スプレー法、及び化学気相蒸着法よりなる群から選択される方法によって行われうる。

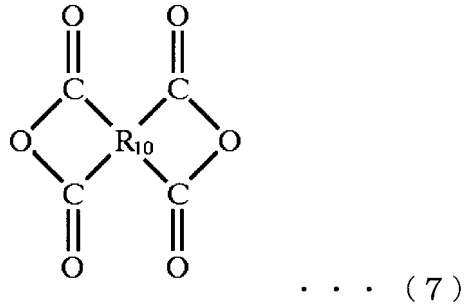
【0057】

本発明の方法において、前記テトラカルボキシル二無水物は、望ましくは下記式(7)で示される。

40

【0058】

## 【化9】



10

## 【0059】

(式中、 $R_{10}$  は、酸素原子、フッ素原子を含んでいてもよい、4価の芳香族基、複素環基、脂環基または脂肪族基などの4価の有機基であることが望ましい。)

さらに望ましくは、前記テトラカルボキシル二無水物は、ピロメリット酸二無水物、3,3',4,4'-ビフェニルテトラカルボン酸二無水物、2,2',3,3'-ビフェニルテトラカルボン酸二無水物、2,3,3',4'-ビフェニルテトラカルボン酸二無水物、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸二無水物、3,3',4,4'-ベンゾフェノンテトラカルボン酸二無水物、2,2',3,3'-ベンゾフェノンテトラカルボン酸二無水物、2,3,3',4'-ベンゾフェノンテトラカルボン酸二無水物、ビス(3,4-ジカルボキシフェニル)エーテル二無水物、ビス(3,4-ジカルボキシフェニル)スルホン二無水物、1,4,5,8-ナフタレンテトラカルボン酸二無水物、1,2,5,6-ナフタレンテトラカルボン酸二無水物、2,3,6,7-ナフタレンテトラカルボン酸二無水物、2,2-ビス(3,4-ジカルボキシフェニル)-ヘキサフルオロプロパン二無水物、シクロブタンテトラカルボン酸二無水物、メチルシクロブタンテトラカルボン酸二無水物、及び1,2,3,4-テトラカルボキシブタン二無水物よりなる群から選択される少なくとも一種が挙げられる。

20

## 【0060】

本発明の方法において、前記テトラカルボキシル二無水物は、前記テトラカルボキシル二無水物を0.02質量%ないし90質量%含む溶液として用いられることが望ましい。前記溶液において、テトラカルボキシル二無水物は、特に制限されないが、望ましくは、アセトン、メチルエチルケトン、ジメチルホルムアミド及びN-メチルピロリドンから選択される少なくとも一種の溶媒に溶解されている。

30

## 【0061】

前記テトラカルボキシル二無水物と固体支持体表面上のアミノ基との反応は、例えば、前記テトラカルボキシル二無水物をアミノ基板上にディップコーティング法(自己組織化分子コーティング法)によって単分子膜を形成させ、10分以上反応させることによって行われうる。このようなテトラカルボキシル二無水物の結合は、アミノ基による親核置換反応によるもの考えられる。反応終了後、反応溶媒を使用して物理的に吸着されている前記テトラカルボキシル二無水物は、洗浄によって除去され、窒素雰囲気下で乾燥されうる。また、残りの洗浄溶媒をオープンなどを用いて窒素雰囲気下で乾燥しても除去できる。

40

## 【0062】

本発明の方法において、前記無水物官能基の加水分解は、20~100の水溶液を用いて行われうる。このような加水分解は、前記温度で酸性または中性の水などで1分以上処理し、窒素雰囲気下で乾燥させることによって行われうる。加水分解の結果、一つの無水物官能基から二つのカルボキシル基が生成されるため、高密度のカルボキシル基を有する基板を形成させうる。これにより、高密度の活性化されたカルボキシル基を形成でき、前記活性化されたカルボキシル基に生体分子を高密度で付着できる。例えば、従来広く使われている、表面にアミノ基を有する基板にコハク酸無水物を反応させれば、一つのカルボキシル基が形成される。したがって、本発明の方法によれば、従来の表面にアミノ基を有する基板を利用する場合に比べて、2倍も多くのカルボキシル基を形成するため、こ

50

のような基板を利用して製作されたマイクロアレイを利用した分析で、蛍光度が強く検出されうる。

【0063】

本発明の方法において、前記カルボジイミドは、望ましくは、下記式(4)で示される。

【0064】

【化10】



10

【0065】

(式中、 $R_6$ は、アルキル基またはシクロアルキル基であり、 $R_7$ は、アルキル基、シクロアルキル基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノアルキル基またはシクロアルキルアミノ基であることが望ましい。)

さらに望ましくは、前記カルボジイミドは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)またはN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)である。前記EDCは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩として用いてもよい。

【0066】

本発明の方法において、前記コハク酸イミドは、N-ヒドロキシコハク酸イミドまたはN-ヒドロキシスルホコハク酸イミド(Sulfo-NHS)であることが望ましい。

20

【0067】

また、本発明において、前記カルボジイミドまたはコハク酸イミドは、前記カルボジイミドおよび前記コハク酸イミドをそれぞれ20mmol/l~200mmol/l含む溶液として用いられうる。前記溶液に用いられる溶媒は、特に制限されないが、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールのようなアルコール溶媒またはメチルエチルケトン、ジメチルホルムアミド(DMF)、メチルピロリドン(N-メチルピロリドン)またはこれらの混合物などが挙げられる。

本発明において、前記生体分子は、活性化されたカルボキシル基と結合できる官能基を有する生体分子であれば特に制限なく用いられる。前記生体分子は、アミノ基を有するものが望ましい。前記生体分子は、DNA、RNA、PNA、または蛋白質などが望ましく挙げられる。

30

【0068】

図2は、本発明による表面に活性化されたカルボキシル基を有するマイクロアレイ用基板の製造方法の一例を表す反応式である。まず、基板上にγ-アミノプロピルトリエトキシシラン(GAPS)のようなアミノシラン化合物をコーティングして、表面にアミノ基を有する基板を製造する(a)。次いで、表面にアミノ基を有する基板に1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸二無水物のようなテトラカルボン酸二無水物を反応させて、無水物官能基を基板上に導入する(b)。次いで、加水分解反応を行って、基板上にカルボキシル基を形成し(c)、これを1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)のようなカルボジイミドならびにN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)及びN-ヒドロキシスルホコハク酸イミド(Sulfo-NHS)のようなコハク酸イミド化合物の存在下で反応させて、活性化されたカルボキシル基を有する基板を製造する(d)。

40

【0069】

本発明は、また、上述した活性化されたカルボキシル基を有する固体支持体上に生体分子を固定する方法によって製造されるマイクロアレイを提供する。

【0070】

上述した活性化されたカルボキシル基を有する固体支持体表面に生体分子を固定化する方法は、公知の方法が用いられる。例えば、接触式のスポットティング、インクジェット

50

リントのような圧電印刷方式、及びマイクロピペッティング法が利用されうる。

【実施例】

【0071】

以下、本発明を実施例を用いてより詳細に説明する。しかし、これら実施例は、本発明を例示的に説明するためのものであって、本発明の範囲は下記実施例に限定されない。

【0072】

試験例1：活性化されたカルボキシル基を有する基板またはアミノシランでコーディングされた基板に核酸をコーディングする方法。

【0073】

(1) アミノシランでコーディングされた基板の製造

- アミノプロピルトリエトキシシラン (GAPS) をエタノールに溶解させて、0.002 mol/l の - アミノプロピルトリエトキシシラン (GAPS) の溶液を調製した。得られた溶液を洗浄されたスライド状のガラス基板上にディップコーディングによってコーディングし、120 °C で1時間処理して、アミノシランでコーディングされたガラス基板を製造した。

【0074】

(2) 活性化されたカルボキシル基を有する基板の製造

3 - (トリエトキシシリル) プロピルコハク酸無水物 (TSA) をエタノールに溶解させて、0.002 mol/l の 3 - (トリエトキシシリル) プロピルコハク酸無水物 (TSA) の溶液を製造した。得られた溶液を洗浄されたスライド状のガラス基板上にディップコーディングによってコーディングし、120 °C で1時間処理して、シラン無水物でコーディングされたガラス基板を製造した。

【0075】

前記シラン無水物 (TSA) でコーディングされたガラス基板を25 °C の弱酸性の水で3分間洗浄して、無水物官能基を加水分解してカルボキシル基にさせた。得られたカルボキシル基を表面に有する前記ガラス基板を、N - ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) と N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) とをそれぞれ100 mmol/l となるようにしてDMFに溶解させた溶液と1時間反応させて、活性化されたカルボキシル基を有するマイクロアレイ用基板を製造した。反応後、前記基板をエタノールで洗浄した後、窒素容器内で保管した。

【0076】

(3) 核酸の固定及びハイブリダイゼーション実験

配列番号1のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプローブをDMSOと混合した後、スポッタを使用して前記活性化されたカルボキシル基を有する基板またはアミノシランでコーディングされた基板上に固定化してスポットティングした。37 °C、100%の相対湿度で1時間固定化した後、洗浄することにより前記プローブが固定化されたマイクロアレイを製作した。

【0077】

前記マイクロアレイに対して、前記プローブと相補的なヌクレオチド配列を有している標的核酸をハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ条件は、0.1%のSSPET (0.1%のTriton X-100を含む塩水ナトリウムリン酸塩EDTA緩衝溶液) に標的核酸を溶かし、37 °C で14時間反応させた。反応後、マイクロアレイを6 × SSPET と3 × SSPET でそれぞれ5分間洗浄し、窒素雰囲気下で乾燥させた。乾燥させたマイクロアレイをGenePix 4000 Bモデル (Axon社製) を利用してスキャンした。その結果を図3 (A) 及び (B) に表した。ハイブリダイゼーション過程で、アミノシランでコーディングされた基板、すなわち、アミノ基板に対してはコハク酸無水物/NMPプロッキングを行った。

【0078】

図3 (A) 及び (B) に示されるように、本発明の方法によって製作された活性化されたカルボキシル基を有する基板を利用したマイクロアレイは、ハイブリダイゼーション過

10

20

30

40

50

程においてブロッキングを行わなくとも、優れたスポット蛍光度とスポット形状とが得られた。図3(A)及び(B)で、それぞれ左側はプローブ濃度100 $\mu\text{mol/l}$ に対する結果であり、右側は25 $\mu\text{mol/l}$ に対する結果である。図3(A)は、TSAでコーティングされた基板に対する結果であり、図3(B)は、GAPSでコーティングされた基板に対する結果である。図3(A)及び(B)に表した結果を蛍光度の数値を、下記表2に示す。

【0079】

【表1】

DNA濃度( $\mu\text{mol/l}$ )	TSA	GAPS
100	17,000	12,000
25	14,000	11,000

10

【0080】

試験例2：活性化されたカルボキシル基を有する基板、アミノ基板及びアミノ層上で活性化されたカルボキシル基を有する基板を利用した核酸のコーティング

(1) 活性化されたカルボキシル基を有する基板の製造

3-(トリエトキシシリル)プロピルコハク酸無水物と1,2-ビス(トリエトキシシリル)エタンとをエタノールに溶解させて、3-(トリエトキシシリル)プロピルコハク酸無水物(TSA)と1,2-ビス(トリエトキシシリル)エタンとをそれぞれ0.002 $\text{mol/l}$ 含む混合液を得た。前記混合液を洗浄されたスライド状のガラス基板上にディップコーティングによってコーティングし、120 $^{\circ}\text{C}$ で1時間処理して、シラン無水物でコーティングされたガラス基板を製造した。

20

【0081】

前記シラン無水物でコーティングされたガラス基板を25 $^{\circ}\text{C}$ の弱酸性の水で3分間洗浄して、シラン無水物を加水分解してカルボキシル基とした。得られたカルボキシル基を表面に有する前記ガラス基板を、N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)とをそれぞれ100 $\text{mmol/l}$ となるようにDMFに溶解させた溶液に1時間反応させた。反応後、ガラス基板をエタノールで洗浄し、窒素容器内で保管した。以下、このように製作された基板をTSA基板という。

【0082】

(2) アミノシランでコーティングされた基板の製造

3-アミノプロピルトリメトキシシランと1,2-ビス(トリエトキシシリル)エタンをエタノールに攪拌しつつ溶解させて、3-アミノプロピルトリメトキシシランと1,2-ビス(トリエトキシシリル)エタンとをそれぞれ0.002 $\text{mol/l}$ 含む混合液を調製した。この混合液を洗浄されたスライド状のガラス基板上にディップコーティングによってコーティングし、120 $^{\circ}\text{C}$ で1時間処理した。これを、以下“アミノ基板”という。

30

【0083】

(3) 活性化されたカルボキシル基を有する基板の製造

前記アミノ基板をコハク酸無水物または1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸二無水物が0.01 $\text{mol/l}$ となるようにDMFに溶解させた各溶液に浸漬させて、1時間反応させた。反応後、エタノールで洗浄し、窒素容器内で乾燥させた。次いで、コハク酸無水物または1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸二無水物で処理された各基板を25 $^{\circ}\text{C}$ の弱酸性の水で3分間洗浄して、無水物官能基を加水分解してカルボキシル基にさせた。得られたカルボキシル基を表面に有する各基板を、N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)とN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)とがそれぞれ100 $\text{mmol/l}$ となるようにDMFに溶解させた溶液に浸漬させて1時間反応させ、カルボキシル基を活性化させた。反応後、各基板をエタノールで洗浄した後、窒素容器内で保管した。以下、このように製作された基板を、それぞれ“SA(コハク酸無水物)基板”及び“BD(1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸二無水物)基板”という。

40

【0084】

50



## (4) 核酸の付着及びハイブリダイゼーション実験

配列番号1のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプローブをDMSOと混合した後、スポットを使用して基板上に固定化してスポットを形成した。37℃、100%の相対湿度で1時間固定化し、洗浄後処理を行ってプローブが固定化されたマイクロアレイを製作した。

## 【0085】

このように製作されたマイクロアレイに対して、前記プローブと相補的なヌクレオチド配列を有している標的核酸をハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ条件は、0.1%のSSPET(0.1%のTriton X-100を含む塩水ナトリウムリン酸塩EDTAバッファ)に標的核酸を溶かし、37℃で14時間反応させた。反応後、マイクロアレイを6×SSPETと3×SSPETでそれぞれ5分間洗浄し、窒素雰囲気下で乾燥させた。乾燥されたチップをAxon社のGenePix 4000Bモデルを利用してスキャンした。その結果を表1及び図4に表す。ハイブリダイゼーション過程で、アミノ基板に対しては、コハク酸無水物/NMP遮断過程を行った。

10

## 【0086】

## 【表2】

基板の種類	TSA	BD	SA	アミノ基板
蛍光度	9588	9612	4811	5294
コハク酸無水物/ NMP遮断過程の有無	×	×	×	○

20

## 【0087】

表1に示されるように、本発明の方法によって製作されたマイクロアレイは、遮断過程が不要であり、スポットも優れた特性を表した。図4は、各マイクロアレイに対して行われたハイブリダイゼーション結果を表す図面である。図4Aないし図4Dは、それぞれ順次にTSA基板、BD基板、SA基板及びアミノ基板を表す。蛍光度は、赤色に行くほど強く、青色に行くほど弱い。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0088】

本発明の生体分子を固体支持体上に付着させる方法は、生体分子を固体に固定化して得られた製品、例えば、ポリヌクレオチドまたは蛋白質マイクロアレイの製造に利用される。

30

## 【0089】

本発明のマイクロアレイは、多様な分析方法、例えば、ポリヌクレオチドまたは蛋白質マイクロアレイを利用した生物学的分析方法に使用される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0090】

【図1】本発明による表面に活性化されたカルボキシル基を有するマイクロアレイ用基板の製造方法の一例を表す図面である。

【図2】本発明による表面に活性化されたカルボキシル基を有するマイクロアレイ用基板の製造方法の一例を表す図面である。

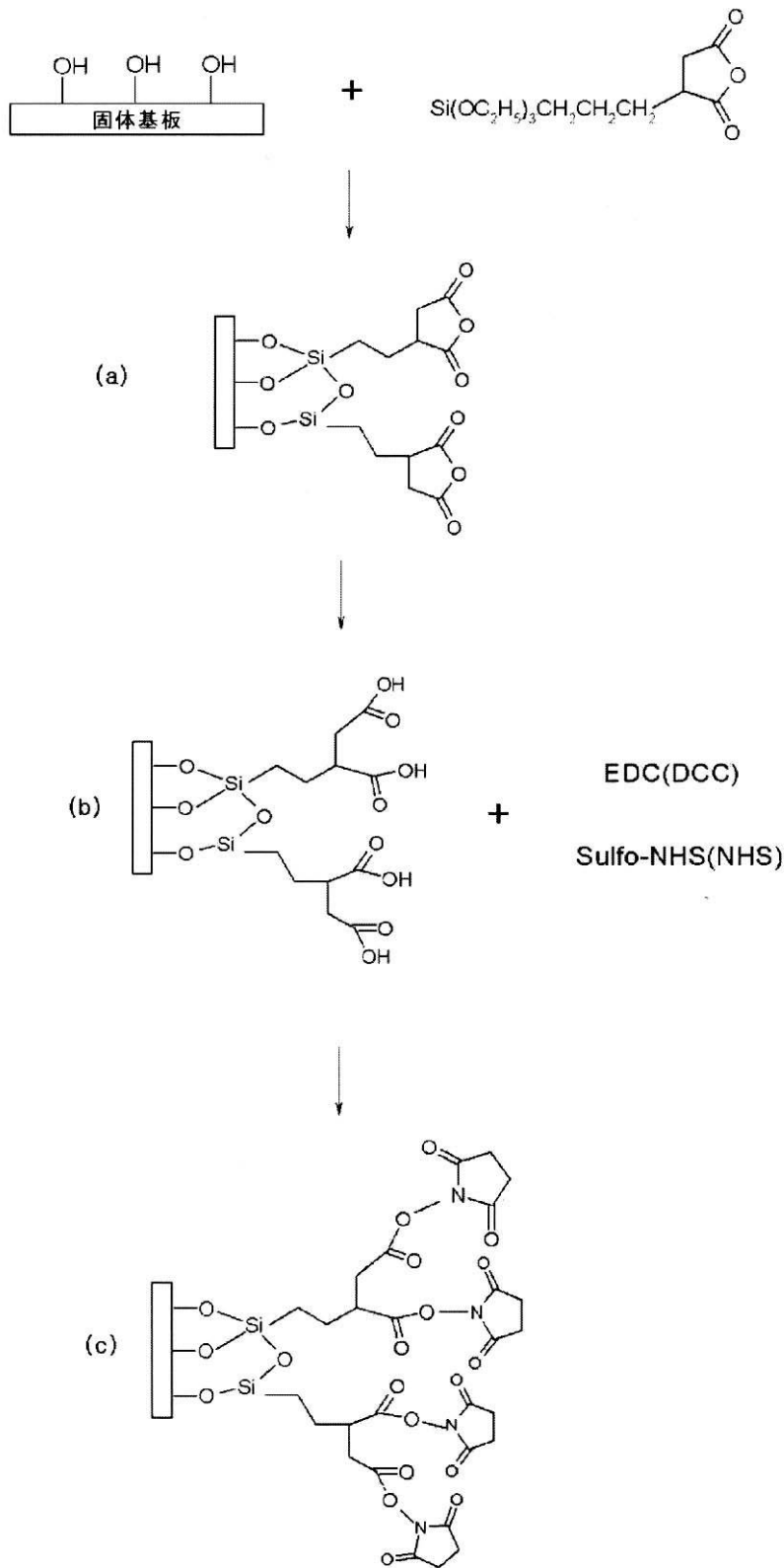
40

【図3】本発明の方法の実施例において製造されたTSAまたはGAPSでコーティングされた各基板に核酸プローブを固定化し、標的核酸とハイブリダイズした後、蛍光で検出した結果を表す図面である(図3(A)はTSAでコーティングされた基板に対する結果であり、図3(B)はGAPSでコーティングされた基板に対する結果である)。

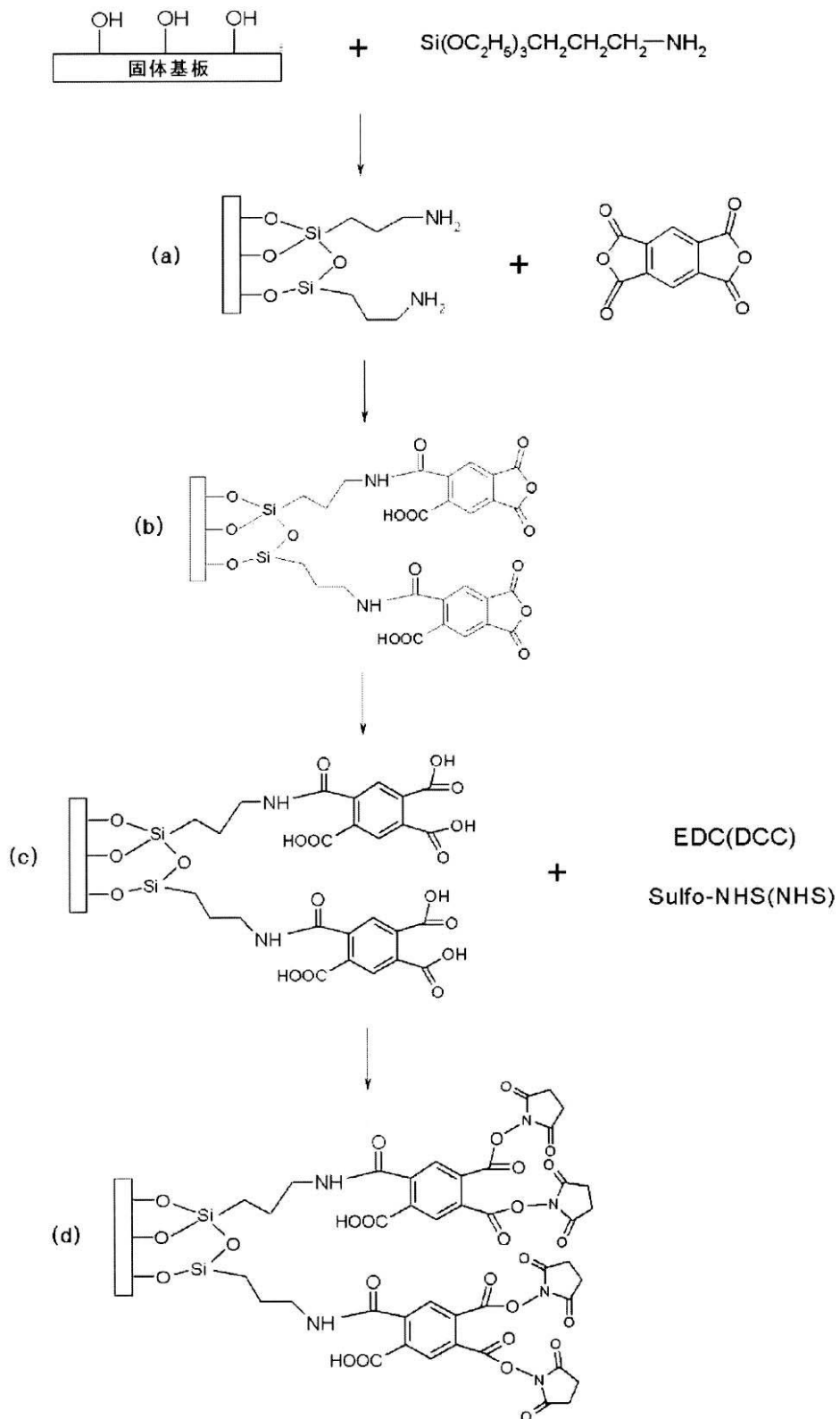
【図4】本発明の方法の実施例において製造されたTSA基板、BD基板、SA基板またはアミノ基板に核酸プローブを固定化し、標的核酸とハイブリダイズした後、蛍光で検出した結果を表す図面である(図4Aないし図4Dは、それぞれ順次にTSA基板、BD基板、SA基板及びアミノ基板に対する結果である)。

50

【 図 1 】

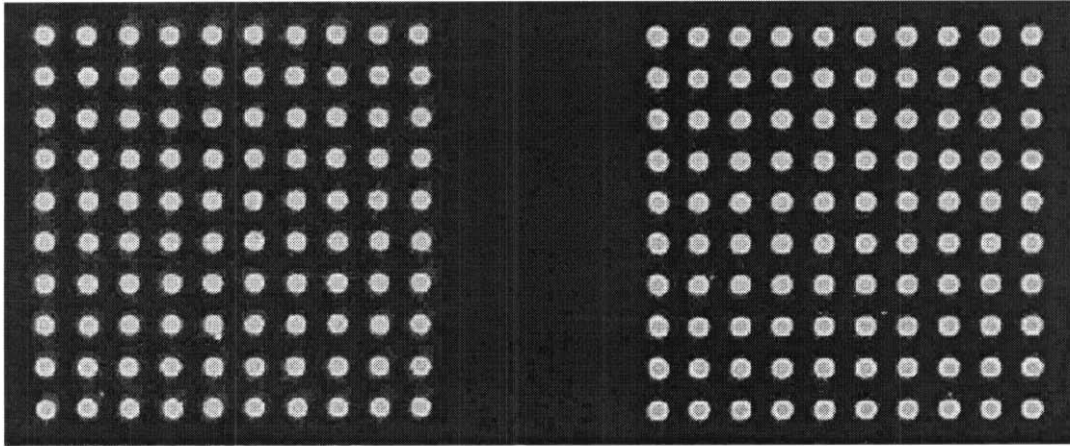


【 図 2 】

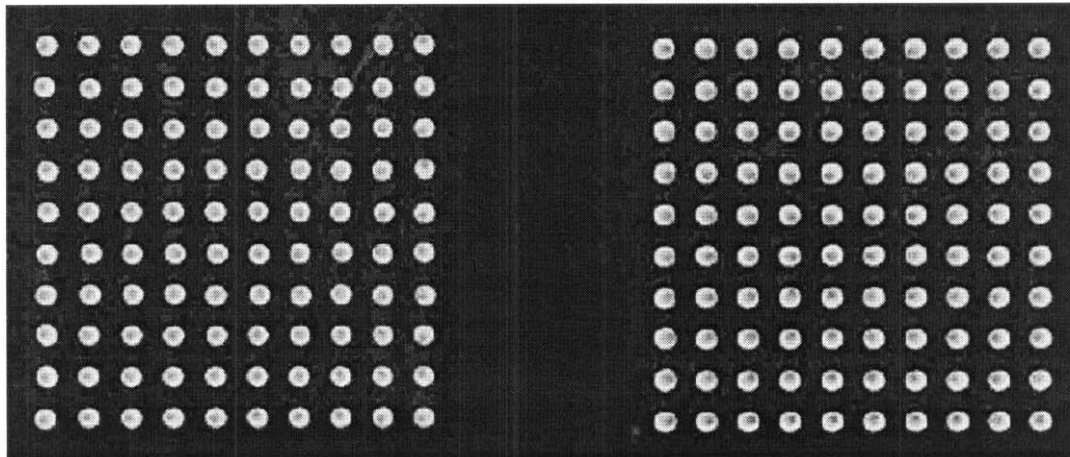


【 図 3 】

( A )

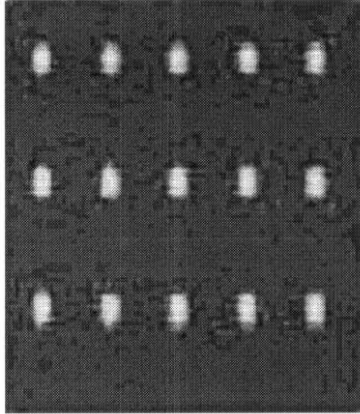


( B )

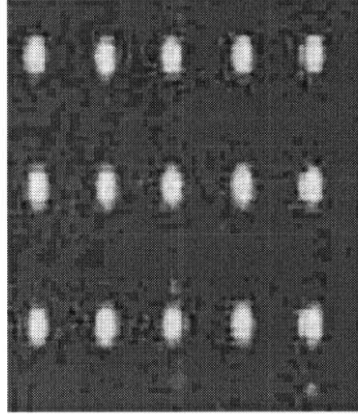


【 図 4 】

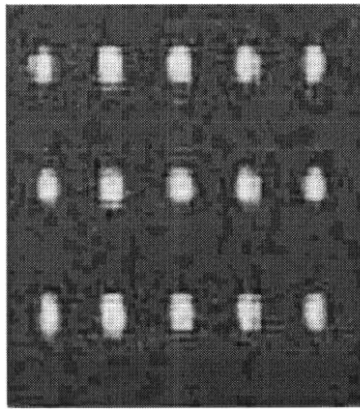
(A)



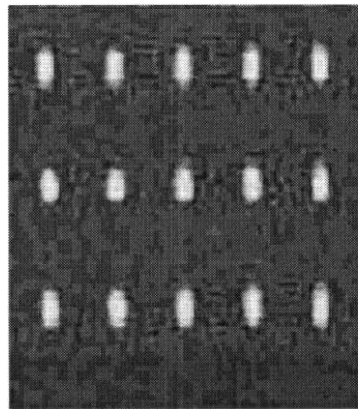
(C)



(B)



(D)



【 配列表 】

0004045276000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 37/00 (2006.01) G 0 1 N 33/545 Z  
C 1 2 N 15/09 (2006.01) G 0 1 N 33/552  
G 0 1 N 37/00 1 0 2  
C 1 2 N 15/00 Z N A F

(72)発明者 黄 奎 淵  
大韓民国仁川広域市富平区富平4洞12-131番地18統6班

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開平01-313760(JP,A)  
特表平09-508532(JP,A)  
特開2003-261823(JP,A)  
特表2003-520570(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8  
G 0 1 N 3 7 / 0 0