

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480001916.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 37/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年4月15日

[11] 授权公告号 CN 100478688C

[22] 申请日 2004.1.7

[21] 申请号 200480001916.3

[30] 优先权

[32] 2003.1.7 [33] JP [31] 001577/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2004/000038 2004.1.7

[87] 国际公布 WO2004/061451 日 2004.7.22

[85] 进入国家阶段日期 2005.7.6

[73] 专利权人 日本碍子株式会社

地址 日本爱知县

[72] 发明人 吉田安子 广田寿一 武内幸久

[56] 参考文献

US2002/0155475A1 2002.10.24

JP2002-48797A 2002.2.15

WO0122776A1 2001.3.29

特开平7-75598A 1995.3.20

US5532128A 1996.7.2

特表2001-501301A 2001.1.30

US2001052627A1 2001.12.20

US6055593A 2007.7.18

US5605662A 1997.2.25

JP2002009355A 2002.1.11

审查员 吴江明

[74] 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

代理人 钟晶

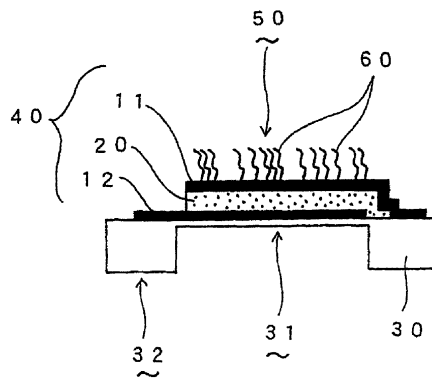
权利要求书2页 说明书17页 附图9页

[54] 发明名称

反应性芯片和利用该芯片的目标物质的结合检测方法

[57] 摘要

提供针对广泛的目标物质的、能够缩短反应时间、有效防止错配结合、可以得到高精度检测结果的反应性芯片。即，本发明的反应性芯片是在基板(30)上整列布置了3个或3个以上的振动面(50)，并在各振动面上固定了与目标物质结合的捕获探针(60)，各振动面具有在第1电极(11)和第2电极(12)间插入压电/电致伸缩元件(20)而成的振动发生部(40)。



1. 一种目标物质的检测方法，其是检测多种目标物质对捕获探针的亲和方法，其特征在于，在使下述反应性芯片的同一列振动面的各振动面以不同的振幅振动的状态下，使多种标识化目标物质与反应性芯片的捕获探针接触，停止振动面的振动，以标识作为指标，检测结合于捕获探针的目标物质对各捕获探针的亲合性程度；所述反应性芯片在基板上整列布置了3个或3个以上的振动面，并在各振动面上固定了与目标物质结合的捕获探针，其中，基板具有薄壁区域和其周围的厚壁区域，并且薄壁区域为振动面；各振动面分别具有在第1电极和第2电极间插入压电/电致伸缩元件而成的振动发生部；将3个或3个以上的振动面整列布置成同一列或将4个或4个以上的振动面整列布置成 $n \times m$ 的格子状，并在同一列的振动面上固定同一种类的捕获探针，其中， n 大于等于2， m 大于等于2。

2. 根据权利要求1所述的检测方法，其特征在于，在使振动面振动的同时使温度经时改变的状态下，使试料与捕获探针接触。

3. 一种目标物质的检测方法，其是检测多种目标物质对捕获探针的亲和方法，其特征在于，在使下述的反应性芯片的同一列振动面以不同的振幅振动的状态下，使目标物质与反应性芯片的捕获探针接触，以振动面的共振频率的变化作为指标，检测结合于捕获探针的目标物质对各捕获探针的亲合性程度；所述反应性芯片在基板上整列布置了3个或3个以上的振动面，并在各振动面上固定了与目标物质结合的捕获探针，其中，基板具有薄壁区域和其周围的厚壁区域，并且薄壁区域为振动面；各振动面分别具有在第1电极和第2电极间插入压电/电致伸缩元件而成的振动发生部；将3个或3个以上的振动面整列布置成同一列或将4个或4个以上的振动面整列布置成 $n \times m$ 的格子状，并在同一列的振动面上固定同一种类的捕获探针，其中， n 大于等于2， m 大于等于2；所述反应性芯片具有测定振动面共振频率的单元。

4. 根据权利要求3所述的检测方法，其特征在于，在使反应性芯片的振动面振动的同时使温度经时改变的状态下，使试料与捕获探针接触，以振动面的共振频率的变化作为指标，经时检测目标物质的有无。

5. 一种目标物质的检测方法，其是检测多种目标物质对捕获探针的亲和方法，其特征在于，在使下述的反应性芯片的同一列振动面的各振动面以不同的振幅振动的状态下，使各种标识化目标物质与反应性芯片的捕获探针接触，在停止振动面的振动后，给作为捕获探针的固定面的第1电极接通一定时间的负直流电流，以标识作为指标，检测结合于捕获探针的目标物质针对各捕获探针的亲合性程度；所述反应性芯片在基板上整列布置了3个或3个以上的振动面，并在各振动面上固定了与目标物质结合的捕获探针，其中，基板具有薄壁区域和其周围的厚壁区域，并且薄壁区域为振动面；各振动面分别具有在第1电极和第2电极间插入压电/电致伸缩元件而成的振动发生部；将3个或3个以上的振动面整列布置成同一列或将4个或4个以上的振动面整列布置成 $n \times m$ 的格子状，并在同一列的振动面上固定同一种类的捕获探针，其中， n 大于等于2， m 大于等于2；所述的反应性芯片的第1电极表面为捕获探针固定面，第1电极以及第2电极除交流电源外，进而还连接了直流电源。

反应性芯片和利用该芯片的目标物质的结合检测方法

技术领域

本发明涉及反应性芯片和利用该芯片的目标物质的检测方法。更详细的说，涉及新的反应性芯片和利用该芯片的目标物质的新的检测方法，其能够排除目标物质和捕获探针的错误杂交，并且能够在短时间内进行正确的检测，还能够选择各种检测方法和对象。

背景技术

旨在对基因结构和基因表达方式进行大量且快速的解析，使用了各种各样的反应性芯片。该反应性芯片构成为，将数千乃至数万个以上的不同捕获探针作为点而整列固定在玻璃片等基板上，以由荧光等标识过的目标物质与捕获探针的结合的有无作为指标，能够对特定的目标物质或样品中的目标物质的量进行定量。固定在芯片上的捕获探针根据待解析的目标物质的种类而有所不同。例如，在 DNA、RNA 成为目标物质的情况，采用可以与之互补结合（杂交）的双链或单链 DNA 片段、聚核苷酸链、寡核苷酸链等作为捕获探针，它们被称为 DNA 芯片（或 DNA 阵列）（参照例如，专利文献 1-4，非专利文献 1, 2）。还有，在蛋白质芯片的情况下，蛋白质或肽键，以及与他们特异结合的受体或抗体，构成目标物质-捕获探针的关系。

在反应性芯片上的目标物质的结合，例如：使含有标识化目标物质的试料（样品溶液）与反应性芯片接触，反应一段时间，使目标物质和捕获探针结合，去掉未结合的物质后，通过检测反应性芯片上的标识位置，来判断目标物质和哪些捕获探针结合。此外，通过测定标识信号的强度，也可以定量目标物质的量。

以往的反应性芯片，为了使样品溶液中的目标物质通过自由扩散与对应的捕获探针接近并结合，而使样品溶液和反应性芯片长时间反应。所以，存在到得到检测结果为止，需要很长时间的问题。

还有，利用反应性芯片对目标物质进行检测的精度依赖于目标物质与捕

获探针的特异性结合。例如 DNA 芯片的情况，目标 DNA 和探针 DNA 相互完全互补结合是所理想的，但实际上通过几个错配，目标 DNA 也可能结合于探针 DNA。尤其是，目标 DNA 在样品溶液中以自由扩散的方式接近探针 DNA 的情况下，这种错配结合（错误杂交）的危险性极大。

作为解决这种问题的 DNA 芯片，已知有专利文献 5 中的发明（纳米芯片）。这种纳米芯片是在电极表面上固定探针 DNA，并在给该电极通正直流电流的情况下，使目标 DNA 和探针 DNA 杂交。由于 DNA 片段（目标 DNA）带负电荷，可在短时间内和带正电荷的探针 DNA 接近并结合。当杂交反应结束后，给电极通负直流电流。这样，探针 DNA 和目标 DNA 都成为带负电荷的状态，与探针 DNA 错配的目标 DNA 将被探针 DNA 排斥，在探针 DNA 上只剩下通过正确互补而结合的目标 DNA。

但是，由于该这种纳米芯片利用了 DNA 通常带负电荷的性质，所以不适用于蛋白质或肽的蛋白质芯片上。

参考文献

专利文献 1：美国专利第 5,474,796 号说明书

专利文献 2：美国专利第 5,605,662 号说明书

专利文献 3：国际公开第 95/251116 号小册子

专利文献 4：国际公开第 95/35505 号小册子

专利文献 5：特表 2001-501301 号公报

非专利文献 1：Sчена, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:10614-10619, 1996.

非专利文献 2：Heller, R. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:2150-2155 1997.

发明内容

本申请的发明是鉴于以上情况而进行的，其目的在于，提供针对广泛的目标物质，可缩短反应时间，能够有效地防止错配结合、得到高精度的检测结果的新的反应性芯片。

并且本申请的发明的又一目的在于，提供使用了上述反应性芯片的目标物质的新的检测方法。

本申请的第 1 发明是反应性芯片，其特征在于：在基板上整列布置了 3 个或 3 个以上的振动面，并在各振动面上固定有与目标物质结合的捕获探针。

第 2 发明是所述第 1 发明的一种形态，其是各振动面分别具有在第 1 电极和第 2 电极间插入压电/电致伸缩元件的振动发生部的反应性芯片。

第 3 发明是所述第 2 发明的一种形态，是捕获探针的固定面经过包被的反应性芯片。

第 4 发明是所述第 2 或第 3 发明的一种形态，是基板具有薄壁区域和其周围的厚壁区域，并且薄壁区域上方有振动发生部的反应性芯片。

第 5 发明是所述第 2 或第 3 发明的另一种形态，是基板具有薄壁区域和其周围的厚壁区域，并且薄壁区域下方有振动发生部的反应性芯片。

第 6 发明是所述第 2 到第 5 发明的一种形态，是第 1 电极和第 2 电极的各自引线对于每个振动发生部是独立的反应性芯片。

第 7 发明是所述第 2 到第 5 发明的另一种形态，是第 1 电极和第 2 电极中任意一方的引线是共用的反应性芯片。

第 8 发明是所述第 2 到第 7 发明的一种形态，是具有测定压电/电致伸缩元件的共振频率的单元的反应性芯片。

第 9 发明是所述第 2 到第 7 发明的另一种形态，是第 1 电极表面为捕获探针的固定面，在第 1 电极和第 2 电极除交流电源外，进而还接通了直流电源的反应性芯片。

第 10 发明是所述第 2 到第 7 发明的另一种别的形态，是在各振动面固定有各种不同种类的捕获探针的反应性芯片。

第 11 发明是所述第 10 发明的一种形态，是具有测定压电/电致伸缩元件的共振频率单元的反应性芯片。

第 12 发明是所述第 10 发明的另一种形态，是第 1 电极表面为捕获探针的固定面，第 1 电极和第 2 电极除交流电源外，进而还接通了直流电源的反应性芯片。

第 13 发明是所述第 2 到第 7 发明的进而另一种形态，将 3 个或 3 个以上的振动面整列布置成同一列或将 4 个或 4 个以上的振动面整列布置成 n (n 大于等于 2) $\times m$ (m 大于等于 2) 的格子状，并在同一列的各振动面上固定有

同一种捕获探针的反应性芯片。

第 14 发明是所述第 13 发明的一种形态，是具有测定压电/电致伸缩元件的共振频率的单元的反应性芯片。

第 15 发明是所述第 13 发明的另一种形态，是第 1 电极表面为捕获探针的固定面，第 1 电极和第 2 电极除交流电源外，进而还接通了直流电源的反应性芯片。

第 16 发明是第 2 到第 7 发明的进而另一种形态，将 3 个或 3 个以上的振动面整列布置成同一列或将 4 个或 4 个以上的振动面整列布置成 n (n 大于等于 2) $\times m$ (m 大于等于 2) 的格子状，并在同一列的振动面上分别固定有与目标物质不同部位结合的捕获探针的反应性芯片。

第 17 发明是所述第 16 发明的一种形态，是具有测定压电/电致伸缩元件的共振频率的单元的反应性芯片。

第 18 发明是所述第 16 发明的另一种形态，是第 1 电极表面为捕获探针的固定面，第 1 电极和第 2 电极除交流电源外，进而还接通了直流电源的反应性芯片。

第 19 发明是检测与捕获探针结合的目标物质的方法，其特征在于，在使所述第 10 发明的反应性芯片的振动面振动的状态下，使含有标识化目标物质的试料与反应性芯片的捕获探针接触，停止振动面的振动，以标识作为指标，检测结合于捕获探针的目标物质。

第 20 发明是第 19 发明的一种形态，是在使振动面振动的同时，使温度经时变化的状态下，使试料与捕获探针接触的检测方法。

第 21 发明是检测与捕获探针结合的目标物质的方法，其特征在于，在使所述第 11 发明的反应性芯片的振动面振动的状态下，使含有目标物质的试料与反应性芯片的捕获探针接触，以压电/电致伸缩元件的共振频率的变化作为指标，检测目标物质。

第 22 发明是所述 21 发明的一种形态，是在使反应性芯片的振动面振动的同时，使温度经时变化的状态下，使探针与试料接触，将压电/电致伸缩元件的共振频率的变化作为指标，经时检测目标物质的检测方法。

第 23 发明是检测与捕获探针结合的目标物质的方法，其特征在于，在使

所述第 12 发明的反应性芯片的振动面振动的状态下,使含有标识化目标物质的试料和反应性芯片的探针接触,待停止振动面的振动后,给作为捕获探针的固定面的第 1 电极接通一定时间的负直流电,以标识作为指标检测结合于捕获探针的目标物质。

第 24 发明是检测多种的目标物质对捕获探针的亲和方法,该检测目标物质的方法的特征在于,在使所述第 13 发明的反应性芯片的同一列振动面的各振动面以不同的振幅振动的状态下,使多种标识化目标物质与反应性芯片的捕获探针接触,停止振动面的振动,以标识作为指标检测结合于捕获探针的目标物质对各探针的亲和方法。

第 25 发明是所述第 24 发明的一种形态,是在使振动面振动的同时,使温度经时变化的状态下,使试料与捕获探针接触的检测方法。

第 26 发明是检测多种的目标物质对捕获探针的亲和方法,该检测目标物质的方法的特征在于,在使所述第 14 发明的反应性芯片的同一列振动面以不同的振幅振动的状态下,使目标物质与反应性芯片的捕获探针接触,以压电/电致伸缩元件的共振频率的变化作为指标,检测目标物质对各捕获探针的亲和方法。

第 27 发明是所述第 26 发明的一种形态,是在使反应性芯片的振动面振动的同时,使温度经时变化的状态下,使试料与捕获探针接触,以压电/电致伸缩元件的共振频率的变化作为指标,经时检测目标物质的有无的检测方法。

第 28 发明是检测多种目标物质对捕获探针的亲和方法,该检测目标物质的方法的特征在于,在使所述第 15 发明的反应性芯片的同一列振动面以不同的振幅振动的状态下,使各种标识化目标物质与反应性芯片的捕获探针接触,待停止振动面的振动后,给作为捕获探针的固定面的第 1 电极接通一定时间的负直流电流,以标识作为指标检测结合于捕获探针的目标物质对各探针的亲和方法。

第 29 发明是检测目标物质变异的方法,其特征在于,在使所述第 16 发明的反应性芯片的同一列振动面振动的情况下,使含有标识化目标物质的试料与反应性芯片的捕获探针接触,停止振动面的振动,通过以标识作为指标检测结合于捕获探针的目标物质,来检测目标物质的变异。

第 30 发明是检测目标物质变异的方法，其特征在于，在使所述第 17 发明的反应性芯片的同一列振动面振动的情况下，使含有目标物质的试料与反应性芯片的捕获探针接触，通过以压电/电致伸缩元件的共振频率的变化作为指标，检测目标物质的有无，来检测目标物质的变异。

第 31 发明是检测目标物质变异的方法，该目标物质的检测方法的特征在于，在使所述第 18 发明的反应性芯片的同一列振动面振动的情况下，使含有标识化目标物质的试料与反应性芯片的捕获探针接触，待停止振动面的振动后，给作为捕获探针的固定面的第 1 电极接通一定时间的负直流电流，通过以标识作为指标，检测结合于捕获探针的目标物质，来检测目标物质的变异。

附图说明

图 1 是表示本发明反应性芯片的基本结构一例的侧面图。

图 2 是表示本发明反应性芯片的基本结构另一例的侧面图。

图 3 是表示本发明反应性芯片的基本结构的又一例的侧面图。

图 4 是表示本发明反应性芯片的一个实施例的侧面图。

图 5 是表示本发明反应性芯片的另一个实施例的侧面图。

图 6 是表示本发明反应性芯片的又一个实施例的侧面图。

图 7 是表示本发明反应性芯片的进而又一个实施例的平面图以及侧面图。

图 8 是表示本发明反应性芯片的进而又一个实施例的平面图。

图 9 是表示本发明反应性芯片中的捕获探针的排列例的模式图，四方形表示振动面，不同的字母表示捕获探针的不同。

图 10 是表示本发明反应性芯片中的捕获探针的另一排列例的模式图，四方形表示振动面，不同的字母表示捕获探针的不同。

图 11 是表示本发明反应性芯片中的捕获探针的又一排列例的模式图（左）和例示利用此反应性芯片检测染色体异常等时正常染色体的结合状态的模式图（右）；四方形表示振动面，横向的贯穿振动面的波状线表示振子，不同的字母以及不同的数字表示捕获探针的不同。

图 12 是表示本发明反应性芯片中的捕获探针的进而又一排列例的模式图，四方形表示振动面，不同的字母以及不同的数字表示捕获探针的不同。

图 13 是图 11 中例示的捕获探针的排列例（左）和例示的利用此反应性芯片检测染色体异常（插入）时的结合状态的模式图（右）；四方形表示振动面，横向的贯穿振动面的波状线表示振子，不同的字母以及不同的数字表示捕获探针的不同。

图 14 是图 11 中例示的捕获探针的排列例（左）和例示的利用此反应性芯片检测染色体异常（缺失）时的结合状态的模式图（右）；四方形表示振动面，横向的贯穿振动面的波状线表示振子，不同的字母以及不同的数字表示捕获探针的不同。

图 15 是图 12 中例示的捕获探针的排列例（左）和例示的利用此反应性芯片检测染色体异常（插入）时的结合状态的模式图（右）；四方形表示振动面，横向的贯穿振动面的波状线表示振子，不同的字母以及不同的数字表示捕获探针的不同。

图 16 是图 12 中例示的捕获探针的排列例（左）和例示的利用此反应性芯片检测染色体异常（取代）时的结合状态的模式图（右）；四方形表示振动面，横向的贯穿振动面的波状线表示振子，不同的字母以及不同的数字表示捕获探针的不同。

其中，

- 11 第 1 电极
- 12 第 2 电极
- 13、14 引线
- 20 压电/电致伸缩元件
- 30 基板
- 31 薄壁区域
- 32 厚壁区域
- 40 振动发生部
- 50 振动面
- 60 捕获探针
- 70 包被层

具体实施方式

本申请的第 1 发明是反应性芯片，其特征在于，在基板上整列布置了 3 个或 3 个以上的振动面，并在各振动面上固定了与目标物质结合的捕获探针。

“基板”是通常用在 DNA 芯片、蛋白质芯片等的玻璃片、陶瓷板、塑料等树脂板、金属板等。“捕获探针”是与目标物质特异结合的生物分子。例如：目标物质是基因组来源的 DNA 片段（例如 cDNA 等）时，捕获探针是基于互补性而与这些 DNA 片段杂交的单链 DNA 片段、RNA 片段、核苷酸链（100 个碱基或其以上的聚核苷酸链或不足 100 个碱基的寡核苷酸）等。还有，目标物质是蛋白质时，捕获探针可以是能与目标物质的氨基酸序列的一部分特异结合的蛋白质（例如受体蛋白质）、肽等，或者与蛋白质的抗原决定簇特异结合的抗体或其 Fab、F(ab')₂、Fv 片段等。此外，具有糖链的复合生物分子、生物组织片、细胞、酵母等微生物也可作为捕获探针。

这些捕获探针可以同以往的 DNA 芯片、蛋白质芯片一样，以公知的方法布置在基板上。比如 DNA 芯片的情况，可以采用在基板上合成 DNA 片段（例如 25mer 左右）的方法、将 DNA 片段按照点样法固定到基板上的方法。点样法优选采用记载在特开 2001-116750 号公报、特开 2001-186881 号公报中的喷点法。点样结束后，同通常的反应性芯片的制造一样，通过对样点添加水分（在湿度~80%左右保持一定时间）、高温干燥结合、药液处理进行固定化处理等，将各样点固定到基板上。进而，在根据点样法的反应性芯片的制造中，还可以进行如记载在特开 2001-186880 号公报中的重叠点样。在固定蛋白质、肽、组织片、细胞等时，可将生物特异性吸附物质、有机高分子等预先包被于固定面，然后将捕获探针固定在该包被层上。

第 1 发明的反应性芯片中的捕获探针各自固定在 3 个或 3 个以上的振动面上。各“振动面”，可以保持间隔 100~1000 μm 左右的距离整列排布在基板上，各振动面的大小是直径为 50~500 μm 左右的圆形或是一边为 50~500 μm 左右的矩形。该振动面是以特定的频率、振幅振动的面。这样的振动面，例如可以通过在基板的探针固定面的下面设置适当的振动发生装置（例如电磁石、低频发生装置）来制作，但本申请中，优选第 2 发明的构造。

第 2 发明是各振动面各自具有在第 1 电极和第 2 电极间插入压电/电致伸缩元件而成的振动部的反应性芯片。这种情况下的振动面可以是如图 1 所述

钨、铈、银、锡、钽、钨、铌、白金、金、铅等金属单体或这些任意组合而得的合金。进一步，还可以使用在这些金属中分散与压电/电致伸缩元件（20）或基板（30）相同的材料而得的金属陶瓷材料。

利用以上材料形成振动发生部（40）及振动面（50）的情形中，例如，若是图 1 的结构，则在基板（30）上形成第 2 电极（12）后，在该第 2 电极（12）上烧成压电/电致伸缩元件（20），最后形成第 1 电极（11）。或者还可以将第 1 电极（11）、第 2 电极（12）及压电/电致伸缩元件（20）整体烧成在基板（30）上而形成。这种根据整体烧成的振动面的成形，在图 2、图 3 的结构的情况下，尤为优选。

第 1 电极（11）、第 2 电极（12）、以及各自引线的与目标物质接触的各处可以进行绝缘被覆。作为该被覆材料，可以使用绝缘性玻璃或树脂。作为树脂，例如可以使用化学稳定性好的氟树脂，例如四氟乙烯树脂类聚四氟乙烯（杜邦（デュポン）株式会社制造的聚四氟乙烯 PTFE）、四氟乙烯-六氟丙烯共聚物树脂类聚四氟乙烯（聚四氟乙烯 FEP）、四氟乙烯-全氟烷基乙烯醚共聚物树脂类聚四氟乙烯（聚四氟乙烯 PFA）、PTFE/PFA 复合聚四氟乙烯等。还有，硅树脂（最好是热固化型硅树脂）、环氧树脂、丙烯酸树脂等也可以根据目的使用。进而优选向绝缘性树脂添加无机·有机充填材料来调整振动面（50）的刚性。

如果将振动面（50）的厚度减小，例如在后述的共振频率测定中可以提高灵敏度，但另一方面却产生刚性下降等问题，所以由基板（30）和振动发生部（40）组成的振动面（50）的厚度合计优选为 5~50 μm 。

图 4 是表示第 2 发明反应性芯片的一个实施例的侧截面图。在该图 4 中例示的反应性芯片是在基板（30）表面将第 2 电极（12）、压电/电致伸缩元件（20）、第 1 电极（11）层叠一体化形成的。并且第 1 电极（11）的表面设置了捕获探针（60）。捕获探针（60）可以如图 4 的例中所示，直接固定在振动发生部（40）的表面，或如图 5 的例中所示，先包被振动发生部（40）的表面，然后将捕获探针（60）固定在该包被层（70）上（第 3 发明）。该包被层（70）是为易于固定捕获探针（60）的材料，根据捕获探针（60）的种类，例如可以从，聚核苷酸 L 蓖麻蛋白层、 γ -氨基丙基三乙氧基硅烷等硅烷以及其

衍生物、生物素/抗生物素蛋白等生物特异吸附物质、聚丙烯酰胺、尼龙膜等有机高分子等中适当选择。

图4及图5的例中,基板(30)具有薄壁区域(31)和其周围的厚壁区域(32),薄壁区域(31)形成为,在其上面具有振动发生部(40)而构成振动面(50)(第4发明)。通过设置这种薄壁区域(31)和厚壁区域(32),可以维持反应性芯片整体的刚性,并使得振动面(50)发生适宜的振动。这种薄壁区域(31)和厚壁区域(32)还可以如图6例示的那样,延伸厚壁区域(32)的下端而使薄壁区域(31)的下面形成空洞。这样的结构可以提高基板(30)整体的刚性,因而优选。

此外,本发明的反应性芯片还可以如图7例示的那样,将振动发生部(40)设置在薄壁区域(31)的下方(第5发明)。通过采用这种结构,易于形成表面平整的反应性芯片。并且由于振动发生部(40)不与样品溶液直接接触,提高了芯片的耐久性,还有在后述的测定共振频率时也可排除噪音的影响,得到比较准确的测定。

作为本发明的反应性芯片的另一种形态,如图7中的平面图例示的那样,从各振动发生部(40)引出的第1电极(11)第2电极(12)的各自引线(13)(14)对于每个振动发生部是独立的(第6发明)。这样,各振动面(50)能够以不同的频率或振幅振动。或者作为进而另一种形态,也可以将第1电极(11)和第2电极(12)的任意一方的引线共用(第7发明)。例如,图8中,将第1电极(11)的引线(13)共用,可以简化引线的加工。将4个或4个以上的振动面布置成格子状时,可以把同一列振动面中的电极引线共用,使该同一列的振动面以同一振幅振动。

本申请的第8发明的反应性芯片具有测定振动面的共振频率的单元。该共振频率测定相关的原理和具体方法等,与之前本申请人申请的发明(再表99/034176公报、特开平08-201265号公报)基本一样,可以根据再表99/034176、特开平08-201265号公报中记载的方法构成测定单元。即,该共振频率,具体而言,在有物质从外部附着于振动面时,接触到振动面的样品溶液的比重、粘度发生变化时,可以通过检测包含压电/电致伸缩元件的回路的电气常数的变化来检测振动面的共振频率的变化。

就本申请的第9发明的反应性芯片来说，第1电极表面是捕获探针的固定面，第1电极和第2电极除交流电源外，还接通了直流电源。即，该反应性芯片除可以通过用交流电源向第1电极和第2电极通电，使振动面振动之外，还可以给作为捕获探针固定面的第1电极接通正或负的直流电。这种直流电流的接通可以根据特表2001-501301号公报中的记载。

第10发明是在各振动面固定了各种不同种类的捕获探针的反应性芯片。这种情况下的“不同种类”，例如是DNA片段的情况下、指的是各种碱基序列不同，肽的情况下，指的是氨基酸序列不同。例如，在图9中，在16个振动面上固定了不同的捕获探针A~P。并且该第10发明的反应性芯片可以用在第19发明的目标物质检测方法中。

发明19的方法是检测与捕获探针结合的目标物质的检测方法，特征在于，在所述第10发明的反应性芯片的振动面振动的状态下，使含有标识化目标物质的试料与反应性芯片的捕获探针接触，停止振动面的振动，以标识作为指标，检测结合于捕获探针的目标物质。

本发明的方法的特征在于，在通常的反应性芯片中的目标物质检测中附加了“振动捕获探针的固定面”的工序。即，通过振动，接触到反应性芯片的样品溶液内的目标物质以强于自由扩散的程度扩散，其结果是，促进了目标物质与捕获探针的特异性结合。进而由于在使捕获探针振动的状态下进行杂交，可以排除或者减小错配结合、非特异性吸附。这样，可以通过检测单碱基不同的DNA片段（例如SNPs）、立体结构不同的分子与各自对应的捕获探针的结合对它们进行检测。

振动面的振动的时间间隔，可以根据捕获探针、目标物质的种类来适当的设定，例如DNA芯片的情况下，可以设定成1~32秒。此外，振动面的振动频率可以设定成10~1MHz左右，振幅设定为0.001~10 μ m左右。

在本方法中，目标物质的标识化可根据该物质种类，使用酶、放射性同位素、荧光色素、荧光蛋白质等。酶只要满足转换数（turnover number）大，与抗体结合时稳定、使底物特异着色等条件，就无特别的限制。例如可以使用过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶等。还可使用酶抑制物质、辅酶等。作

为基质，可以根据酶的种类使用公知的物质。例如，将过氧化物酶作为酶使用时，使用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺、将碱性磷酸酶作为酶使用时，使用对硝基苯酚等。作为放射性同位素，可以使用 ^{125}I 、 ^3H 等。作为荧光色素可以利用荧光素异硫氰酸酯 (FITC)、四甲基异硫氰酸罗丹明 (TRITC) 等。此外，荧光蛋白质是一种照射激发光的时候发出荧光的蛋白质，例如发光水母来源的绿色荧光蛋白质 (GFP)、及其突变体 EGFP、EYFP (黄色荧光)、ECFP (蓝色荧光)、DsRed1 (红色荧光)、DsRed2、海肾 (*Renilla reniformis*) 来源的绿色荧光蛋白质 hrGFP 等。如以上所述的标识物质和目标物质，例如可以通过基于氢键、疏水键、离子键、配位键等结合而实现一体化。更进一步，由于编码荧光蛋白质的聚核苷酸序列是已知的，因而，荧光蛋白质标识化 DNA 片段、荧光蛋白质标识化蛋白质或肽等可以通过已知的基因工程学方法容易地制备。

将以上标识作为指标检测结合于捕获探针的目标物质时，例如，酶标识的情况下，添加在酶作用下分解而产生颜色的底物，再通过光学测定底物的分解量而求得酶活性，将其换算成结合目标物质量，通过与标准值比较算出目标物质量。使用放射性同位素的情况下，利用闪烁计数器等来测量放射性同位素发出的射线量。使用荧光色素或荧光蛋白质的情况下，可以利用由荧光显微镜组合而成的测定装置测定荧光量。

第 11 发明的反应性芯片是所述第 10 发明的反应性芯片的一种形态，同所述第 8 发明一样，是具有“测定压电/电致伸缩元件的共振频率的单元”的反应性芯片。该第 11 发明中的反应性芯片可以用在第 20 发明的目标物质检测方法中。

第 20 发明的方法是检测与捕获探针结合的目标物质的方法，其特征在于，在振动所述第 11 发明的反应性芯片的振动面的状态下，使含有目标物质的试料与反应性芯片的探针接触，以压电/电致伸缩元件的共振频率的变化作为指标，检测目标物质。

即，这种方法是，以由于目标探针和捕获探针结合而产生的振动面的共振频率的变化作为指标，检测目标物质的方法。通过这种方法，不用标识目标物质就可以得到检测结果。还可以实时经时测定目标物质的结合量。更进

一步，可以对目标物质进行标记，与所述第 19 发明的方法一样，将以标识作为指标的检测组合，进行更高精度的检测。

第 11 发明中的反应性芯片还可以用在第 21 发明的目标物质的检测方法中。

第 21 发明的方法是所述第 20 发明的一种形态，是在振动反应性芯片的振动面的同时使温度经时变化的状态下，使试料与探针接触，以压电/电致伸缩元件的共振频率的变化作为指标，经时检测目标物质的方法。例如，DNA 芯片的情况，在振动振动面的状态下，将杂交反应的温度在一定时间内（例如 10 分钟间隔）变化到 38~98℃左右，通过测量在这期间与捕获探针 DNA 杂交的目标 DNA 的质量来检测各标识 DNA 的 T_m （溶解温度）。

第 12 发明的反应性芯片是所述第 10 发明的另一种形态，第 1 电极表面为捕获探针的固定面，第 1 电极和第 2 电极除交流电源外，还接通了直流电源。该反应性芯片可以用在第 22 发明的目标物质的检测方法中。

第 22 发明的方法是检测与捕获探针结合的目标物质的方法，其特征在于，在使所述第 12 发明的反应性芯片的振动面振动的状态下，使含有标识化目标物质的试料和反应性芯片的探针接触，待停止振动面的振动后，给作为捕获探针的固定面的第 1 电极接通一定时间的负直流电流，以标识作为指标，检测结合于捕获探针的目标物质。本方法是将所述第 19 发明的方法和记载在特表平 09-503307 号公报和特表 2001-501301 号公报中的根据纳米芯片的方法组合而得。尤其是用于将所述第 12 发明的反应性芯片作为 DNA 芯片使用的方法。通过将捕获探针固定面的振动与使捕获探针带负电进行组合，能够有效地排除标识 DNA 和探针 DNA 的错配结合。

直流电流可以根据所使用的溶液、振动面的尺寸、DNA 的浓度等适当选择，可以接通 0.1~1000 毫微安、优选 1~30 毫微安的电流 1~180 秒、优选 10~60 秒左右。

第 13 发明的反应性芯片是所述第 2 到第 7 发明的进而另一种形态，是将 3 个或 3 个以上的振动面整列布置成同一列，或将 4 个或 4 个以上的振动面整列布置成 n (n 大于等于 2) \times m (m 大于等于 2) 的格子状，并在同一列的振动面上固定同一种捕获探针的反应性芯片。

这时的“同一种”，例如如果是 DNA 片段，则指的是碱基序列完全相同；如果是肽链，则指的是氨基酸序列完全相同。例如，图 10 的例中，在第 1 列的 4 个振动面上各自固定了相同的捕获探针 (A)，在第 2~4 列上各自固定了相同的捕获探针 (B)、(C)、(D)。并且该第 13 发明的反应性芯片可以用在第 23 发明的目标物质的检测方法中。

第 23 发明的方法是检测多种目标物质对捕获探针的亲和性的方法，其特征在于，在所述第 13 发明的反应性芯片的同一列振动面的各振动面以不同的振幅振动的状态下，使多种标识化目标物质与反应性芯片的捕获探针接触，停止振动面的振动，以标识作为指标，检测结合于捕获探针的目标物质对各种探针的亲和性程度。

即，根据该方法，在使同一列振动面的各振动面以不同振幅振动的状态下，进行目标物质和捕获探针的杂交，通过以标识作为指标，检测结合于捕获探针的目标物质质量，可以从亲合力强的物质开始依次分类。此外，使用了第 14 发明的反应性芯片的第 24 发明的方法中，以根据共振频率的差异所测定的质量作为指标，可以进行经时分类；第 25 发明的方法中，可以测量伴随温度变化的杂交。使用了第 15 发明的反应性芯片的第 26 发明的方法中，通过将捕获探针固定面的振动与使捕获探针带负电荷进行组合，可以进而高精度地检测标识 DNA 和探针 DNA 的亲合性。

第 16 发明的反应性芯片是所述第 2 到第 7 发明的另一种其他形态，是将 3 个或 3 个以上的振动面整列布置成同一列或将 4 个或 4 个以上的振动面整列布置成 n (n 大于等于 2) \times m (m 大于等于 2) 的格子状，并在同一列的振动面上各自固定了与目标物质的不同部位结合的捕获探针的反应性芯片。这时的“与目标物质的不同部位结合”，例如，如果是 DNA 片段，则指的是与其碱基序列的不同区域结合；如果是肽链，则指的是与其全长氨基酸序列的不同区域结合。例如图 11 的例中，将对应于染色体 DNA (A) 的一端开始的顺次 4 个区域的捕获探针 A1~A4 固定在第 1 列的 4 个振动面上，在第 2~4 列上各自固定对应于染色体 (B)~(D) 的 4 个区域的捕获探针。此外，例如，在图 12 的例中，在 4×4 的格子状振动面上，各自固定了对应于染色体 DNA (A) 的一端开始的顺次 4 个区域的各种组合的捕获探针。

并且，该第 16 发明的反应性芯片可以用在第 27 发明的目标物质检测方法中。

第 27 发明的方法是检测目标物质变异的方法，其特征在于，在使所述第 16 发明的反应性芯片的同一列振动面振动的情况下，使含有标识化目标物质的试料与反应性芯片的捕获探针接触，停止振动面的振动，通过以标识作为指标，检测结合于捕获探针的目标物质，检测目标物质的变异。这时的“变异”指的是缺失、取代、插入、扩增、反复等。更具体的说，指的是染色体 DNA 的这些变异、与之对应的 mRNA、cDNA 的变异、或这些的表达产物即蛋白质、肽等的同样的变异。

比如，按照图 11 的构成固定捕获探针时，目标物质（染色体 DNA）如果是正常的，则如图 11 的右所示，目标物质分别与各探针结合。但是，如图 13 所示，当与探针 3 及 4 的结合量变为 2 倍时，可以检测出对应于探针 3 及 4 对应的染色体 DNA 区域的 3-4 发生了扩增。此外，如图 14 所示，与探针 1、2、4 结合，而与探针 3 不结合时，可以检测出对应于探针 3 的染色体 DNA 区域 3 的缺失。

进而，通过以图 12 的构成固定捕获探针，例如可以检测出染色体 DNA 的插入、取代等。例如图 15 左栏所示，目标物质（染色体 DNA）与 A1~A4 单独探针、及 A1+2 和 A3+4 探针结合时，如图 15 右栏所示，可以检测出染色体 DNA 的区域 2 和 3 之间插入了 X 排列。此外，如图 16 左栏所示，染色体 DNA 与 A1~A4 单独探针、A1+2、A2+4，A3+4，A1+2+4 探针结合时，如图 16 右栏所示，可以检测出染色体 DNA 区域 3 和 4 的取代。

此外，在使用了第 17 发明的反应性芯片的第 28 发明的方法中，以根据共振频率的不同所测定的质量作为指标，可以检测出目标物质的变异。例如，图 13 的例中，测出的质量为 6/4 倍，图 14 的例中测出的质量为 3/4 倍。使用了第 18 发明的反应性芯片的第 29 发明的方法中，通过将捕获探针固定面的振动和使捕获探针带负电荷组合，可以更高精度地检测出标识 DNA 中的变异。

当然，本申请的发明不局限于以上的例子，具体而言还有各种各样的形态。

产业上的利用可能性

如以上的详细说明，根据本申请的发明，可以提供可缩短反应时间，并且有效防止错配结合，可高精度检测广泛的目标物质的新的反应性芯片。还提供了使用这种反应性芯片检测目标物质的方法。通过这种检测方法，以往的反应性芯片无法实现的对目标物质的微小的差异的检测也得以实现。

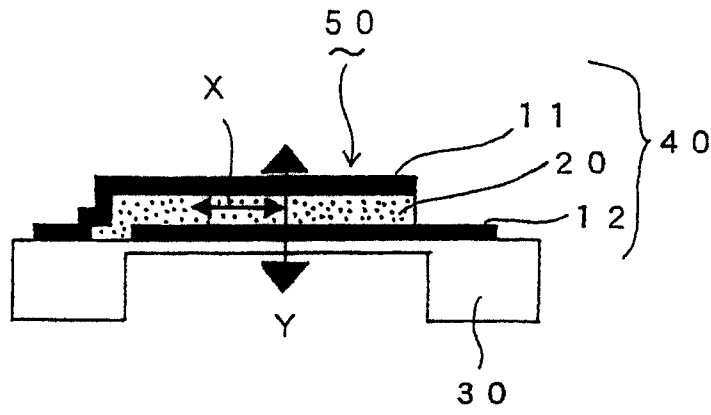


图 1

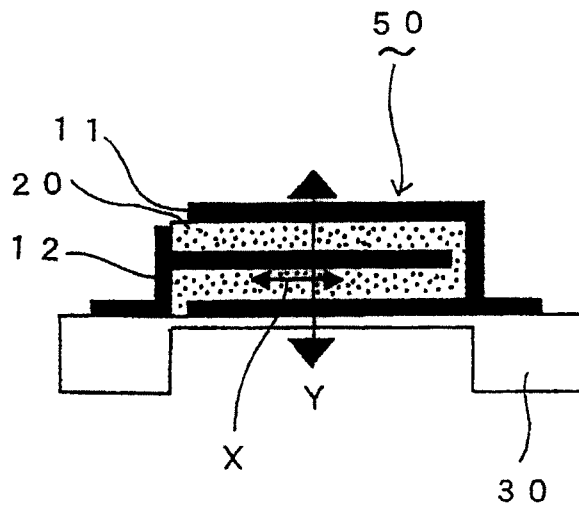


图 2

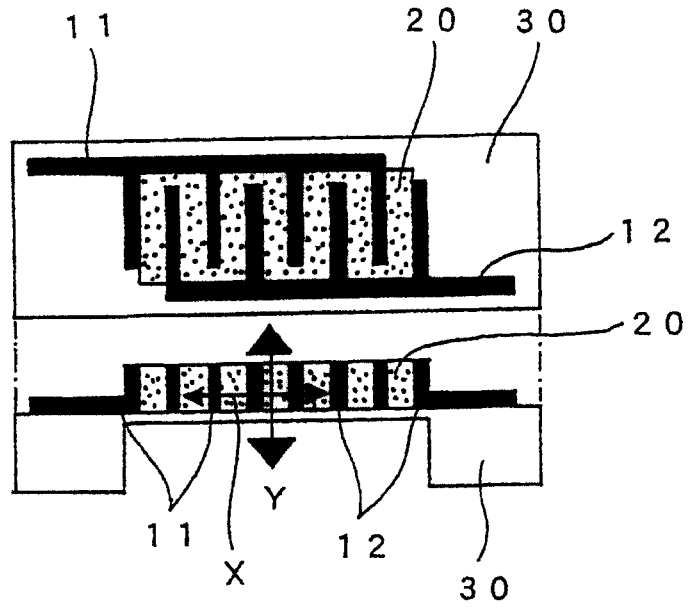


图 3

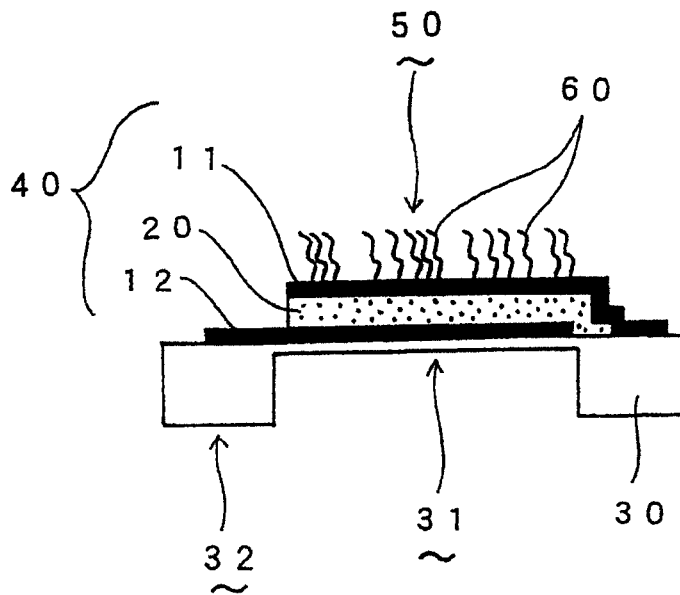


图 4

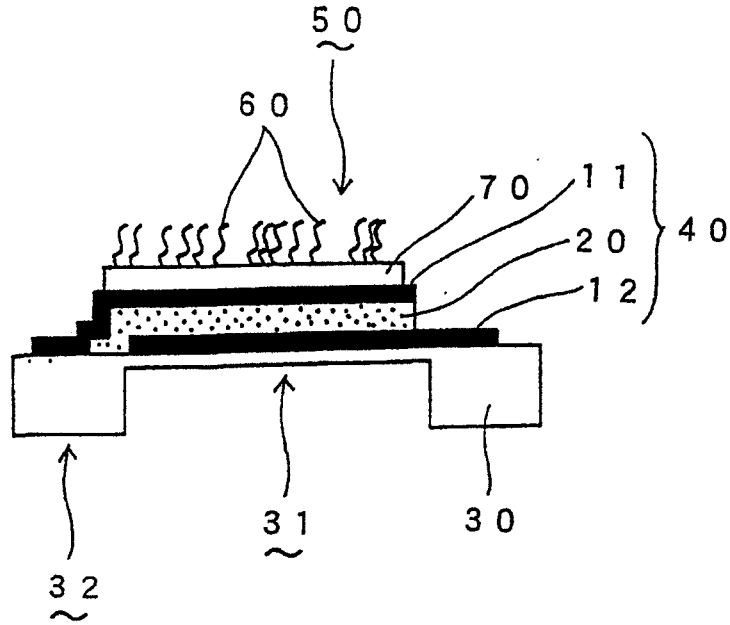


图 5

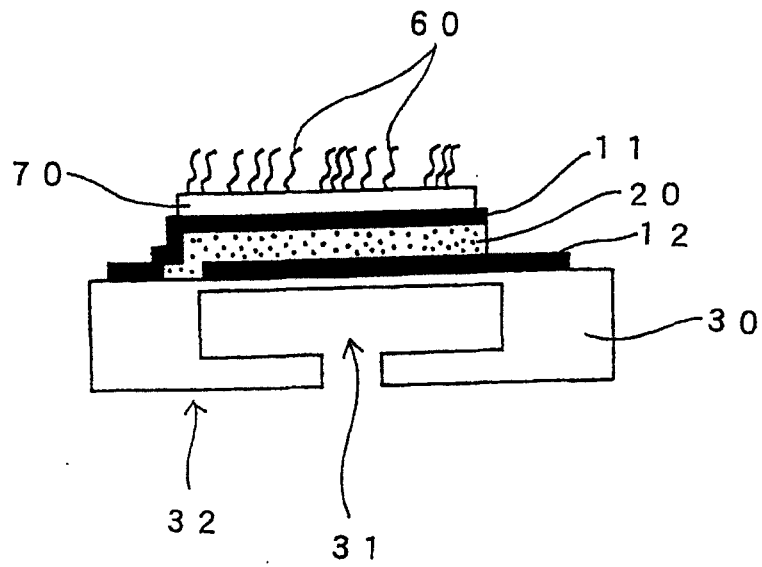


图 6

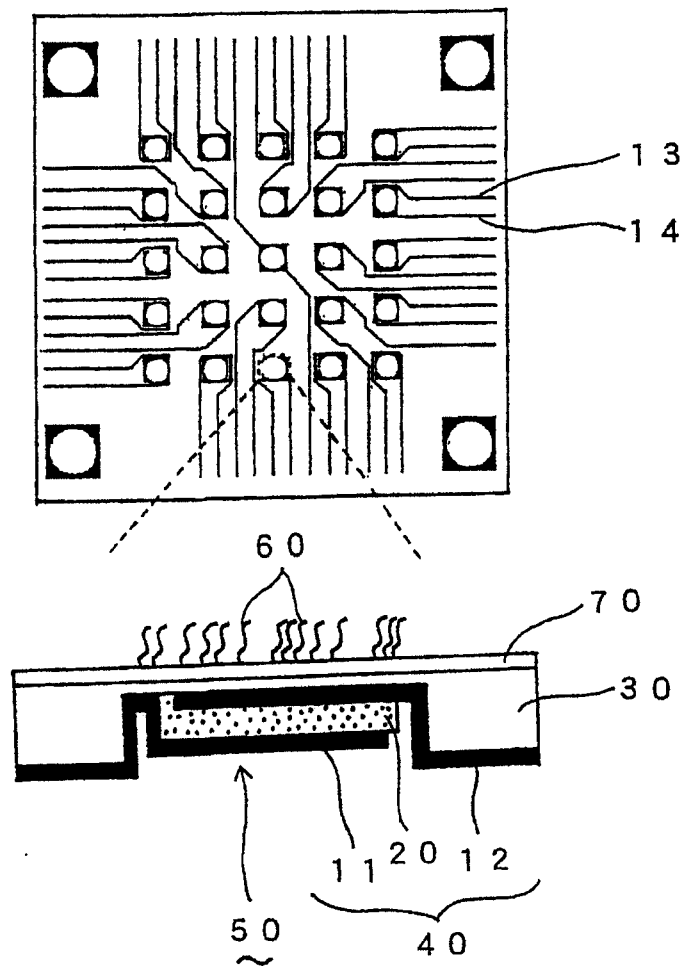


图 7

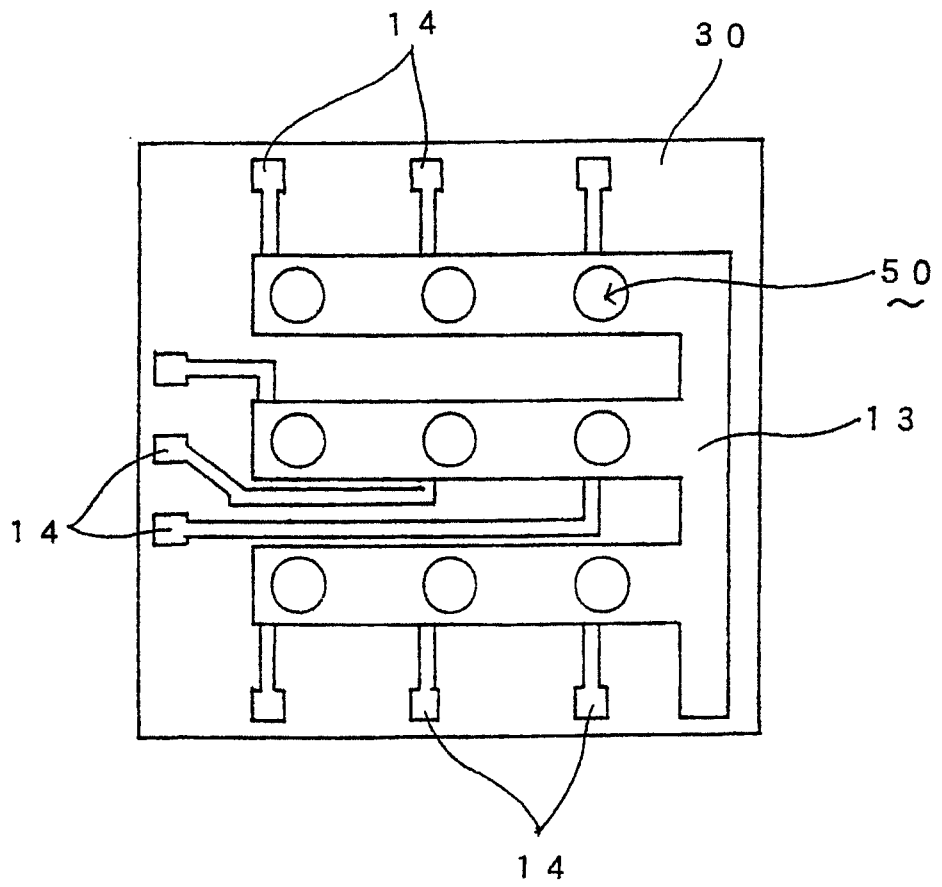


图 8

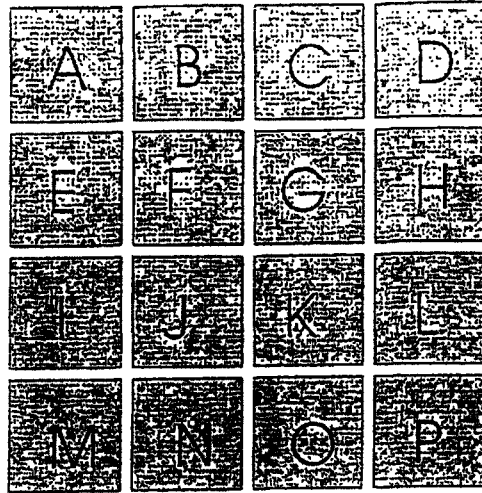


图 9

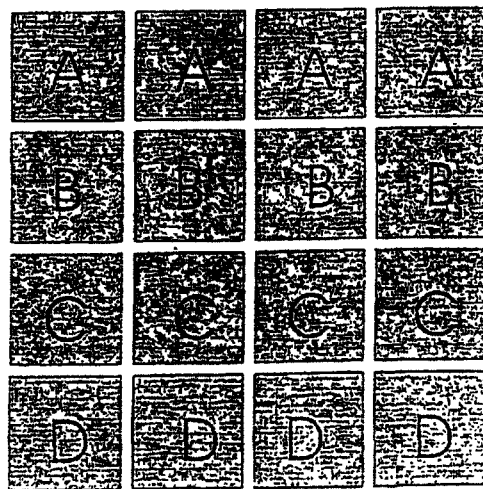


图 10

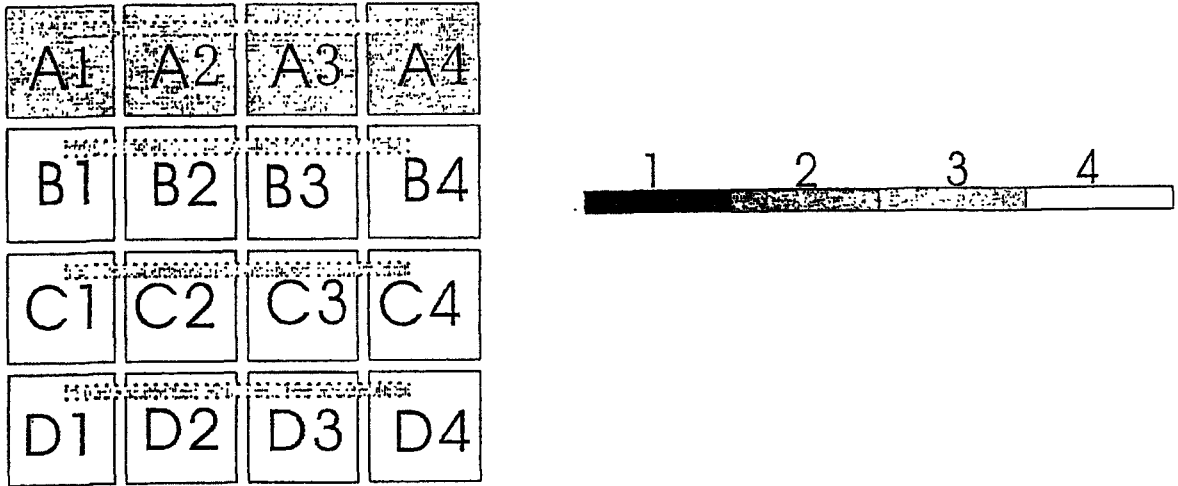


图 11

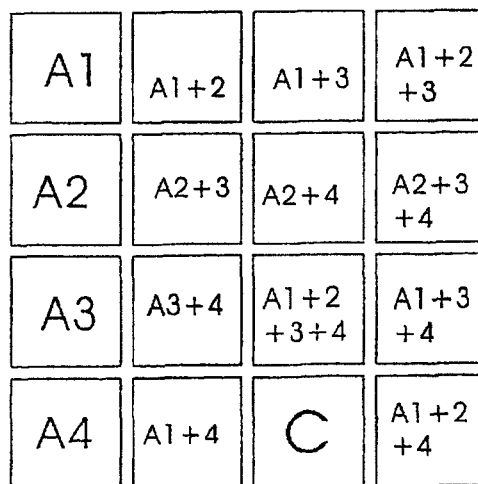


图 12

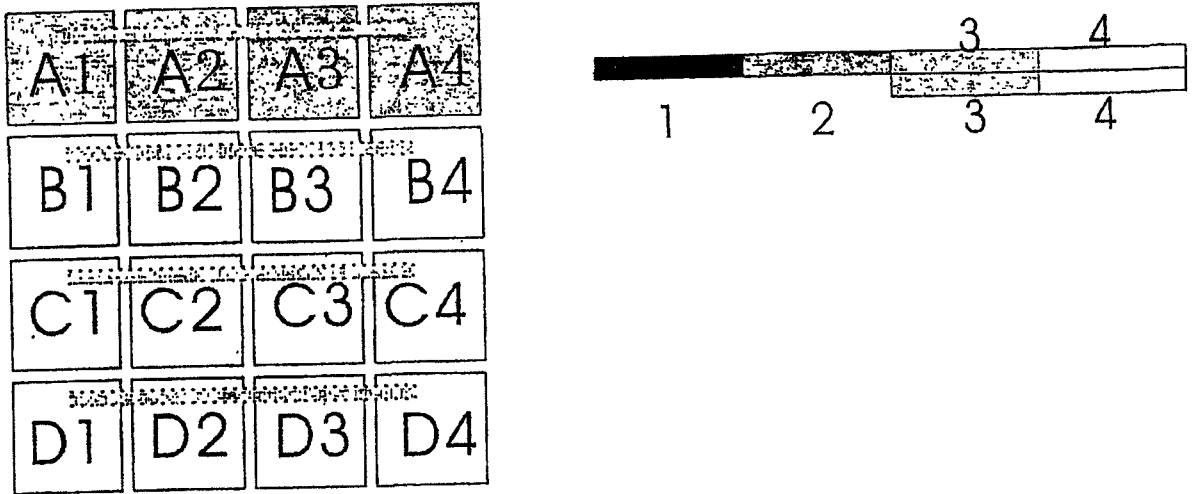


图 13

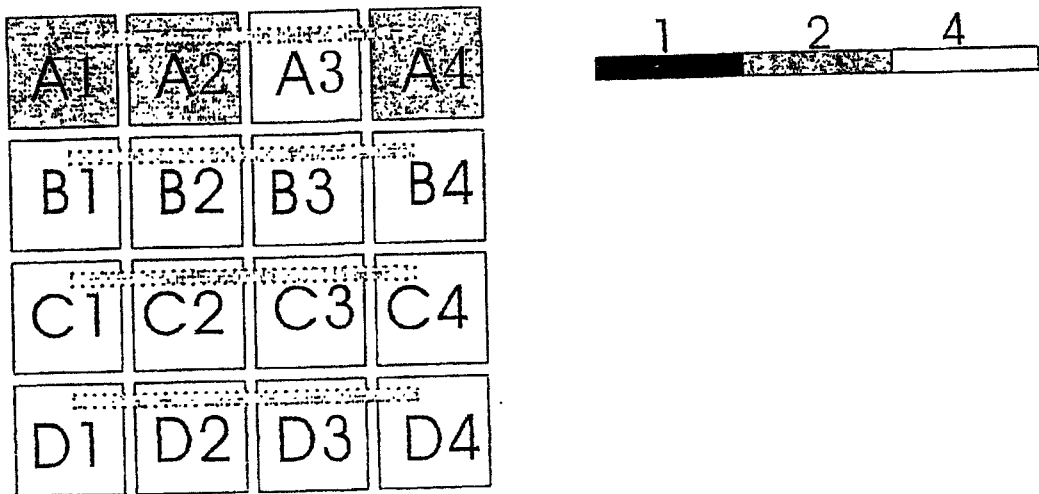


图 14

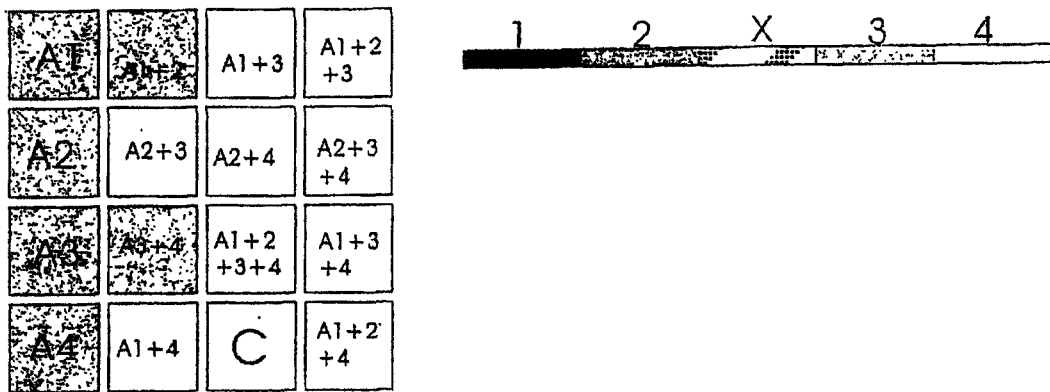


图 15

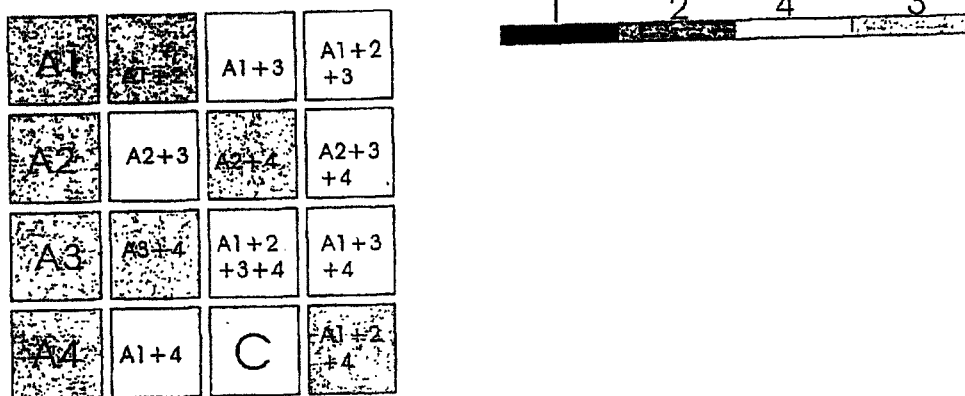


图 16