

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-534654

(P2009-534654A)

(43) 公表日 平成21年9月24日(2009.9.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
GO 1 N 33/552 (2006.01)	GO 1 N 33/552	
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/545 Z	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 0 2	
	GO 1 N 33/543 5 2 5 C	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁)		

(21) 出願番号 特願2009-506517 (P2009-506517)
 (86) (22) 出願日 平成19年4月14日 (2007.4.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年12月16日 (2008.12.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/009103
 (87) 国際公開番号 W02008/085185
 (87) 国際公開日 平成20年7月17日 (2008.7.17)
 (31) 優先権主張番号 11/407,882
 (32) 優先日 平成18年4月19日 (2006.4.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

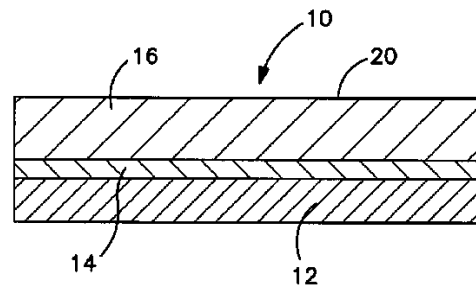
(71) 出願人 598123677
 ゴア エンタープライズ ホールディング
 ス, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, デラウェア 19714
 -9206, ニューアーク, ポスト オフ
 イス ボックス 9206, ペーパー ミ
 ル ロード 551
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100111903
 弁理士 永坂 友康

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子を結合させるための機能性多孔性基板

(57) 【要約】

微孔性微細構造と、その微細構造の少なくとも一部の上にある中間層と、その中間層に付着した機能層とを備えていて、その機能層が、少なくとも50ナノモル/cm²の密度の機能部位を有する基板。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

微孔性微細構造と、その微細構造の少なくとも一部の上にある中間層と、その中間層に付着した機能層とを備えていて、その機能層が、少なくとも50ナノモル/cm²の密度の機能部位を有する基板。

【請求項 2】

上記機能部位が少なくとも100ナノモル/cm²の密度である、請求項1に記載の基板。

【請求項 3】

上記機能部位が少なくとも250ナノモル/cm²の密度である、請求項1に記載の基板。

【請求項 4】

上記機能部位が少なくとも500ナノモル/cm²の密度である、請求項1に記載の基板。

【請求項 5】

上記機能部位が少なくとも1000ナノモル/cm²の密度である、請求項1に記載の基板。

【請求項 6】

機能部位の密度が2500～150,000ナノモル/cm³であるという特徴をさらに有する、請求項1に記載の基板。

【請求項 7】

延伸ポリテトラフルオロエチレンを含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 8】

ナイロンを含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 9】

超高分子量ポリエチレンを含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 10】

ポリプロピレンを含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 11】

ガラスを含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 12】

ポリフッ化ビニリデンを含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 13】

ポリテトラフルオロエチレンを含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 14】

上記中間層がゾル-ゲル・コーティングを含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 15】

上記中間層がポリビニルアルコールを含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 16】

上記機能部位がヒドロキシル基を含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 17】

上記機能部位がアミン基を含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 18】

上記機能部位がカルボキシル基を含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 19】

上記機能部位がアルデヒド基を含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 20】

上記機能部位がエポキシド基を含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 21】

上記機能層が有機シランを含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 22】

上記基板が延伸ポリテトラフルオロエチレンを含み、上記中間層がゾル-ゲル・コーティングを含み、上記機能層が有機シランを含む、請求項1に記載の基板。

【請求項 23】

10

20

30

40

50

- 上記機能部位に結合した生体分子をさらに含む、請求項1に記載の基板。
- 【請求項24】
上記生体分子が核酸を含む、請求項23に記載の基板。
- 【請求項25】
上記生体分子がタンパク質を含む、請求項23に記載の基板。
- 【請求項26】
上記生体分子がペプチドを含む、請求項23に記載の基板。
- 【請求項27】
上記生体分子がオリゴヌクレオチドを含む、請求項23に記載の基板。
- 【請求項28】 10
上記生体分子が抗体を含む、請求項23に記載の基板。
- 【請求項29】
上記生体分子が細胞を含む、請求項23に記載の基板。
- 【請求項30】
上記生体分子が酵素を含む、請求項23に記載の基板。
- 【請求項31】
上記生体分子が病原体を含む、請求項23に記載の基板。
- 【請求項32】
マイクロアレイの一構成要素として使用される、請求項1に記載の基板。
- 【請求項33】 20
活性フィルタの一構成要素として使用される、請求項1に記載の基板。
- 【請求項34】
プロッティング面の一構成要素として使用される、請求項1に記載の基板。
- 【請求項35】
診断装置の一構成要素として使用される、請求項1に記載の基板。
- 【請求項36】
機能化された製品を製造する方法であって、
(1) 微細構造を有する微孔性基板を用意するステップと、(2) その微細構造の上に中間層を堆積させるステップと、(3) その中間層に機能層を付着させて、上記製品の機能部位の密度が少なくとも50ナノモル/cm²になるようにするステップを含む方法。 30
- 【請求項37】
機能部位の密度が2500~150,000ナノモル/cm³であるという特徴をさらに有する、請求項36に記載の方法。
- 【請求項38】
多孔性微細構造と、その微細構造の少なくとも一部の上にある中間層と、その中間層に付着した機能層とを備えるポリテトラフルオロエチレン基板に隣接した支持層を備えていて、上記機能層が、少なくとも50ナノモル/cm²の密度の機能部位を有する製品。
- 【請求項39】
上記基板が延伸ポリテトラフルオロエチレンである、請求項38に記載の製品。
- 【請求項40】 40
上記延伸ポリテトラフルオロエチレンのフィブリル長が0.5~5μmである、請求項39に記載の製品。
- 【請求項41】
上記延伸ポリテトラフルオロエチレンのフィブリル長が0.5~3μmである、請求項39に記載の製品。
- 【請求項42】
上記延伸ポリテトラフルオロエチレンのフィブリル長が0.5~2μmである、請求項39に記載の製品。
- 【請求項43】 50
上記ポリテトラフルオロエチレン基板の厚さが約250μm未満である、請求項38に記載

の製品。

【請求項 4 4】

上記ポリテトラフルオロエチレン基板の厚さが約125 μm 未満である、請求項38に記載の製品。

【請求項 4 5】

上記ポリテトラフルオロエチレン基板の厚さが約75 μm 未満である、請求項38に記載の製品。

【請求項 4 6】

上記機能部位が少なくとも100ナノモル/ cm^2 の密度である、請求項38に記載の製品。

【請求項 4 7】

上記機能部位が少なくとも200ナノモル/ cm^2 の密度である、請求項38に記載の製品。

【請求項 4 8】

上記機能部位が少なくとも250ナノモル/ cm^2 の密度である、請求項38に記載の製品。

【請求項 4 9】

上記機能部位がアミン基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 5 0】

上記機能部位がヒドロキシル基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 5 1】

上記機能部位がカルボキシル基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 5 2】

上記機能部位がアルデヒド基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 5 3】

上記機能部位がエポキシド基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 5 4】

上記機能部位がチオール基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 5 5】

上記機能部位が無水物基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 5 6】

上記機能部位がアクリレート基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 5 7】

上記機能部位がメタクリレート基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 5 8】

上記機能部位がエステル基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 5 9】

上記機能部位がアジド基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 6 0】

上記機能部位がスルホネート基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 6 1】

上記機能部位がホスホネート基を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項 6 2】

上記ポリテトラフルオロエチレン基板が接着剤によって上記支持層に付着されている、請求項38に記載の製品。

【請求項 6 3】

上記ポリテトラフルオロエチレン基板が熱硬化性接着剤によって上記支持層に付着されている、請求項38に記載の製品。

【請求項 6 4】

上記ポリテトラフルオロエチレン基板が熱可塑性接着剤によって上記支持層に付着されている、請求項38に記載の製品。

【請求項 6 5】

上記ポリテトラフルオロエチレン基板が感圧性接着剤によって上記支持層に付着されて

10

20

30

40

50

いる、請求項38に記載の製品。

【請求項66】

上記ポリテトラフルオロエチレン基板が、その基板または上記支持層の一部にだけ堆積された接着剤によってその支持層に付着されている、請求項38に記載の製品。

【請求項67】

上記支持層がガラスを含む、請求項38に記載の製品。

【請求項68】

上記支持層が石英を含む、請求項38に記載の製品。

【請求項69】

上記支持層がステンレス鋼を含む、請求項38に記載の製品。

10

【請求項70】

上記支持層がプラスチックを含む、請求項38に記載の製品。

【請求項71】

マイクロアレイ用基板である、請求項38に記載の製品。

【請求項72】

自己蛍光のレベルが532 μm において約1000 RFU未満であるという特徴をさらに有する、請求項71に記載の製品。

【請求項73】

自己蛍光のレベルが532 μm において約1000 RFU未満であり、機能部位の密度が50ナノモル/ cm^2 よりも大きいという特徴をさらに有する、請求項71に記載の製品。

20

【請求項74】

自己蛍光のレベルが635 μm において約100 RFU未満であるという特徴をさらに有する、請求項71に記載の製品。

【請求項75】

自己蛍光のレベルが635 μm において約100 RFU未満であり、機能部位の密度が50ナノモル/ cm^2 よりも大きいという特徴をさらに有する、請求項71に記載の製品。

【請求項76】

Cy5染料に関する平均信号対雑音比が130よりも大きいという特徴をさらに有する、請求項71に記載の製品。

【請求項77】

Cy5染料に関する平均信号対雑音比が150よりも大きいという特徴をさらに有する、請求項71に記載の製品。

30

【請求項78】

Cy3染料に関する平均信号対雑音比が90よりも大きいという特徴をさらに有する、請求項71に記載の製品。

【請求項79】

Cy3染料に関する平均信号対雑音比が110よりも大きいという特徴をさらに有する、請求項71に記載の製品。

【請求項80】

1.5倍精度レベルが少なくとも99%であるという特徴をさらに有する、請求項71に記載の製品。

40

【請求項81】

1.2倍精度レベルが少なくとも76%であるという特徴をさらに有する、請求項71に記載の製品。

【請求項82】

安定性の向上が20%未満である、請求項71に記載の製品。

【請求項83】

安定性の向上が10%未満である、請求項71に記載の製品。

【請求項84】

多孔性微細構造と、その微細構造の少なくとも一部の上にある中間層と、その中間層に

50

付着した機能層とを備えるポリテトラフルオロエチレン基板に隣接した支持層を備えていて、上記機能層の機能部位の密度が少なくとも50ナノモル/cm²であり、その機能部位に生体分子が結合する製品。

【請求項 8 5】

上記生体分子が核酸である、請求項84に記載の製品。

【請求項 8 6】

上記生体分子がタンパク質である、請求項84に記載の製品。

【請求項 8 7】

上記生体分子がオリゴヌクレオチドである、請求項84に記載の製品。

【請求項 8 8】

上記生体分子がペプチドである、請求項84に記載の製品。

【請求項 8 9】

上記生体分子が抗体である、請求項84に記載の製品。

【請求項 9 0】

上記生体分子が酵素である、請求項84に記載の製品。

【請求項 9 1】

上記生体分子が細胞である、請求項84に記載の製品。

【請求項 9 2】

生体分子を測定する方法であって、

(a) 支持層を用意するステップと、

(b) 必要に応じてその支持層を機能化するステップと、

(c) その支持層の少なくとも一部に接着剤を載せるステップと、

(d) その支持層に、ノードとフィブリルを含む微細構造を有する微孔性ポリテトラフルオロエチレン基板を接着剤を介して付着させるステップと、

(e) その微孔性ポリテトラフルオロエチレン基板を機能化して機能部位を形成するステップと、

(f) その機能部位に生体分子を結合させるステップと、

(g) 機能化したその層に結合した生体分子の量を検出するステップを含む方法。

【請求項 9 3】

マイクロアレイ用基板を作る方法であって、

(a) 支持層を用意するステップと、

(b) 必要に応じてその支持層を機能化するステップと、

(c) その支持層の少なくとも一部に接着剤を載せるステップと、

(d) その支持層に、ノードとフィブリルを含む微細構造を有する微孔性ポリテトラフルオロエチレン基板を接着剤を介して付着させるステップと、

(e) その微孔性ポリテトラフルオロエチレン基板を機能化するステップを含む方法。

【請求項 9 4】

自己蛍光のレベルが635 μmにおいて約100 RFU未満であり、機能部位の密度が50ナノモル/cm²よりも大きいマイクロアレイ用基板。

【請求項 9 5】

自己蛍光のレベルが532 μmにおいて約1000 RFU未満であり、機能部位の密度が50ナノモル/cm²よりも大きいマイクロアレイ用基板。

【請求項 9 6】

Cy5染料に関する信号対雑音比が130よりも大きいマイクロアレイ用基板。

【請求項 9 7】

Cy5染料に関する上記信号対雑音比が150よりも大きい、請求項96に記載のマイクロアレイ用基板。

【請求項 9 8】

Cy3染料に関する信号対雑音比が90よりも大きいマイクロアレイ用基板。

【請求項 9 9】

10

20

30

40

50

Cy3染料に関する上記信号対雑音比が110よりも大きい、請求項98に記載のマイクロアレイ用基板。

【請求項100】

1.5倍精度レベルが少なくとも99%であるマイクロアレイ用基板。

【請求項101】

1.2倍精度レベルが少なくとも76%であるマイクロアレイ用基板。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、機能性多孔性基板に関するものであり、より詳細には、生体分子を検出するためのマイクロアレイの用途に使用されるそのような基板に関する。

10

【背景技術】

【0002】

マイクロアレイは高スループット・スクリーニングの能力を持つため、ヘルスケア産業と医薬産業において研究者が疾患を診断したり新しい薬を発見したりするのに不可欠なツールとなっている。さらに、農業や国防に関わる企業がマイクロアレイを用いて有害な病原性細菌の存在に関する情報を発見している。このような同時スクリーニングは、プローブとしての生物分子（すなわち核酸の断片、抗体、ペプチド、タンパク質、病原体、細胞など）の多数の微視的スポット（一般にサイズが10~250 μ m）を同じ基板上に印刷してアレイを形成することによって可能になる。研究の目的で開発された高密度マイクロアレイは、一般に、プローブとなる所定の規則的なパターンに配置された1000~50000個のスポットを基板上に備えているため、スポットの密度は約50スポット/cm²~2500スポット/cm²になる。基板はさまざまなサイズが可能だが、一般に1インチ×3インチの顕微鏡用スライド・ガラスのサイズである。基板の表面が反応性であってプローブである配列が既知の生体分子と結合できることが極めて重要である。使用するときには、マイクロアレイは配列が既知の標的生体分子とハイブリダイズし、アレイの表面にスポットとなっているさまざまなプローブとその標的の応答が同時に検出される。一般に、標的は蛍光染料で標識し、たいていは蛍光に基づく検出技術を利用して、ハイブリダイゼーション後のプローブに対する標的生体分子の応答を定量化する。マイクロアレイ基板上にスポットになっているすべてのプローブに対する標的の複合的な定量的応答が、マイクロアレイ実験から得られるデータである。

20

30

【0003】

マイクロアレイ実験を利用し、所定の生物（すなわちヒト、マウス、植物、細菌など）のさまざまな遺伝子またはタンパク質の発現レベルを検出することができる。多く発現する遺伝子またはタンパク質は検出がはるかに簡単である。なぜなら所定のサンプル中の濃度が最大であることがしばしばあるからである。しかし発現レベルが低いときやサンプル数が少ないときには、感度がよくて信頼性のある検出技術が極めて重要になる。タンパク質-タンパク質相互作用やタンパク質の生化学的活性を研究するのにこのタイプの検出技術がますます重要になっている。というのも、タンパク質の濃度を酵素反応（例えばポリメラーゼ連鎖反応）で増幅することはできないからである。

40

【0004】

その結果、マイクロアレイの業界では、少量のタンパク質および/または核酸を信頼性よく検出することがますます必要とされている。研究者は、マイクロアレイ実験でこのような低レベルの測定または検出を正確に行なうときには、感度と全体的な信号対雑音比を最大にするシステム構成要素を用いる必要がある。多数の方法を利用して感度と信号対雑音比に影響を与えることができる。そのうちの一般的な3つは、（1）走査装置の感度または検出限界の改善、（2）標識法を利用した蛍光信号の増幅率増大、（3）高感度基板の使用である。本発明では、高感度マイクロアレイ基板を用いて信号対雑音比を増大させることに焦点を当てる。

【0005】

50

信号強度の増大は、単位面積当たりの結合部位の数（機能部位の密度）を増やすことによって実現できる。それが最終的に、固定化された生体分子プローブの保持と、蛍光標識された標的分子とハイブリダイズしたときの増大した信号の発生に影響を与える。信号対雑音比は、検出に用いる材料および/またはシステムの固有自己蛍光を減らすことによって大きくすることができる。これらの方法は、信号強度の増大および/または雑音の低減によって最終的に対雑音比に影響を与えるであろう。いくつかの従来法がこれまで試みられてきた。

【0006】

高密度マイクロアレイの製造に利用されている多くの一般的な方法では、興味の対象であるサンプルを結合させるための機能部位を含む非多孔性二次元ガラス基板が用いられている。ガラスが好ましいのは、不活性で固有自己蛍光が少ないからである。固有自己蛍光が少ないと、通常は蛍光に基づいて検出される信号に対する雑音が少なくなる。市販されているこのような基板の例は、UltraGAPS II（登録商標）スライド（コーニング社、ライフ・サイエンス、オネオンタ、ニューヨーク州）、Nexterion（登録商標）スライド（ショット・ノース・アメリカ社、ルイスヴィル、ケンタッキー州）、Array-It（登録商標）スライド（テレケム・インターナショナル社、サニーヴェイル、カリフォルニア州）である。非多孔性ガラスを使用する際の1つの欠点は、機能部位の密度が非常に低いため信号が比較的弱く、特に発現が少ない遺伝子またはタンパク質を検出しようとするときに興味の対象となるサンプルの検出が非常に難しいことである。その影響は、興味の対象となるサンプルの体積または濃度を大きくすることによって最小にできるが、この方法が可能なのは、利用できるサンプルが十分に大きいときだけである。研究者は、与えられるサンプルの量、濃度、体積が非常に限られていることがしばしばある。機能部位の密度を大きくする一般的な1つの方法は、機能部位を含む表面積を大きくするために多孔性基板を用いることであった。Tannerら（アメリカ合衆国特許第6,750,023号）は、多孔性無機層を非多孔性無機下部構造に付着させることにより、生物的分析物または化学的分析物のアレイを付着させるための機能性材料を形成する方法を教示している。

【0007】

機能性材料として有機ポリマーを用いる別の方法も試みられてきた。Haddadら（WO 01/66244）は、配向したポリマー膜から作った繊維状の非多孔性機能性材料を用いてアレイを製造することを教示している。多孔性有機ポリマーも以前からマイクロアレイ基板で使用されており、市販されているそのような材料は、Vivid Microarray（登録商標）スライド（パル社、イースト・ヒルズ、ニューヨーク州）とCAST（登録商標）スライド（シュライヒャー&シュエル・バイオサイエンス社、キーン、ニュー・ハンプシャー州）であり、両方とも多孔性ナイロン膜を使用している。

【0008】

マイクロアレイ用基板としてこのような膜を利用することは、Solomonらのアメリカ合衆国特許出願公開2003/0219816と、Andreoliらのアメリカ合衆国特許出願公開2004/0157320に詳細に記載されている。さまざまな微孔性材料が文献で議論されているが、そのうちでナイロンとニトロセルロースが最も一般的である。ナイロンは、容易に微孔性にできてそのままDNAに対する親和性を有するという利点を持っている。同様に、ニトロセルロースは、タンパク質を結合させるのに有効であることが知られている。ナイロンとニトロセルロースの場合には、DNAおよび/またはタンパク質との結合は、ナイロンまたはニトロセルロースのポリマー骨格に存在する固有の官能基が何であるかによって異なる。したがってこれらの材料で利用できる機能部位の密度は制限される。さらに、転相膜の孔のサイズは、スポットが横に広がるのを阻止するのに十分な小ささではない可能性がある。するとクロストークが起こり、アレイの密度が制限される。ナイロンやニトロセルロースなどの有機ポリマーを用いる際の一般的な別の問題は、これらの材料が大きな固有自己蛍光を持っていることである。蛍光に基づく検出は、ハイブリダイズした標的分子を定量化する際に最も一般的に用いられている技術であるため、自己蛍光が多いと背景雑音が多くなり、その結果として蛍光信号の明確さに悪い影響がある。別の方法として、Montagu

10

20

30

40

50

(WO 2004/018623) が教示しているように、背景雑音は、薄い(約5 μm 未満)機能性材料を用いて減らすこともできる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

製造が容易で、機能部位の密度が大きく、自己蛍光が少ないために信号対雑音比が最大になるアレイ用基板が要求されている。本発明は、こうしたすべての要求に応えらるとともに、非常に高い精度を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明により、微孔性微細構造と、その微細構造の少なくとも一部の上にある中間層と、その中間層に付着した機能層とを備えていて、その機能層が、少なくとも50ナノモル/cm²の密度の機能部位を有する基板が提供される。

【0011】

別の特徴では、本発明により、機能化された製品を製造する方法であって、(1)微細構造を有する微孔性基板を用意するステップと、(2)その微細構造の上に中間層を堆積させるステップと、(3)その中間層に機能層を付着させて、上記製品の機能部位の密度が少なくとも50ナノモル/cm²になるようにするステップを含む方法が提供される。

【0012】

さらに別の特徴では、本発明により、微孔性微細構造と、その微細構造の少なくとも一部の上にある中間層と、その中間層に付着した機能層とを備えるポリテトラフルオロエチレン基板に隣接した支持層を備えていて、上記機能層が、少なくとも50ナノモル/cm²の密度の機能部位を有する製品が提供される。

【0013】

さらに別の特徴では、本発明により、微孔性微細構造と、その微細構造の少なくとも一部の上にある中間層と、その中間層に付着した機能層とを備えるポリテトラフルオロエチレン基板に隣接した支持層を備えていて、上記機能層の機能部位の密度が少なくとも50ナノモル/cm²であり、その機能部位に生体分子が結合する製品が提供される。

【0014】

さらに別の特徴では、本発明により、生体分子を測定する方法であって、

- (a) 支持層を用意するステップと、
- (b) 必要に応じてその支持層を機能化するステップと、
- (c) その支持層の少なくとも一部に接着剤を載せるステップと、
- (d) その支持層に、ノードとフィブリルを含む微細構造を有する微孔性ポリテトラフルオロエチレン基板を接着剤を介して付着させるステップと、
- (e) その微孔性ポリテトラフルオロエチレン基板を機能化して機能部位を形成するステップと、
- (f) その機能部位に生体分子を結合させるステップと、
- (g) 機能化したその層に結合した生体分子の量を検出するステップを含む方法が提供される。

【0015】

さらに別の特徴では、本発明により、マイクロアレイ用基板を作る方法であって、

- (a) 支持層を用意するステップと、
- (b) 必要に応じてその支持層を機能化するステップと、
- (c) その支持層の少なくとも一部に接着剤を載せるステップと、
- (d) その支持層に、ノードとフィブリルを含む微細構造を有する微孔性ポリテトラフルオロエチレン基板を接着剤を介して付着させるステップと、
- (e) その微孔性ポリテトラフルオロエチレン基板を機能化するステップを含む方法が提供される。

【0016】

10

20

30

40

50

別の特徴では、本発明により、自己蛍光のレベルが635 μm において約100 RFU未満であり、機能部位の密度が50ナノモル/cm²よりも大きいマイクロアレイ用基板が提供される。

【0017】

別の特徴では、本発明により、自己蛍光のレベルが532 μm において約1000 RFU未満であり、機能部位の密度が50ナノモル/cm²よりも大きいマイクロアレイ用基板が提供される。

【0018】

別の特徴では、本発明により、Cy5染料に関する信号対雑音比が130よりも大きい(150よりも大きいことが好ましい)マイクロアレイ用基板が提供される。

【0019】

別の特徴では、本発明により、Cy3染料に関する信号対雑音比が90よりも大きい(110よりも大きいことが好ましい)マイクロアレイ用基板が提供される。

【0020】

別の特徴では、本発明により、1.5倍精度レベルが少なくとも99%であるマイクロアレイ用基板が提供される。

【0021】

別の特徴では、本発明により、1.2倍精度レベルが少なくとも76%であるマイクロアレイ用基板が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

本発明は、官能基の密度が大きくて自己蛍光が少ない改良された機能性多孔性基板と機能性微孔性基板に関するものであり、生物を分析するための検出にマイクロアレイ用基板として用いたとき、高い精度レベルでこれまでに得られたことのない大きな信号対雑音比が得られる。これらの属性は、多孔性材料および微孔性材料の選択と、これらの材料を機能化する方法の独自の組み合わせに由来する。マイクロアレイは、ゲノムに含まれる情報を選別して分析するのに用いられるツールと定義することができる。このツールは、基板に化学的に結合させたさまざまな生体分子(核酸、タンパク質、細胞など)プローブを含んでいる。基板としては、マイクロチップ、スライド・ガラス、サイズが小さな球形ビーズが可能である。以下の説明では、“多孔性材料”は、全断面を貫通する複数の孔を有するために流体が透過する材料を意味する。多孔性材料は、一般に平均孔径によって特徴づけられる。あるいは多孔性材料は、孔の最大サイズの1つの指標であるバブル・ポイントによっても特徴づけられる。平均孔径とバブル・ポイントの両方とも、圧力流試験によって測定することができる。微孔性材料は多孔性材料の部分集合であり、平均孔径が約1 μm 未満、またはバブル・ポイントが約10psi超である。

【0023】

本発明の多孔性材料は平坦であり。膜またはシートの形状にすることができる。本発明の多孔性基板には全断面を貫通する相互に接続された複数の孔が存在しているため、流体が透過する。この微細構造の表面積は、同じ体積の非多孔性材料の表面積よりもかなり大きい。本発明ではこの微細構造とそれに伴う大きな表面積/体積比を利用して官能基の密度が大きな基板を作り出す。この内部表面積(比表面積と呼ぶほうがよい)は、多孔性材料の孔のサイズと関係している。多孔性材料の孔のサイズの平均値が小さくなると、表面積が大きくなる。一般に、多孔性材料の比表面積は、標準的なガス吸着法で測定して少なくとも0.1m²/gである。この値は1m²/gよりも大きいことが好ましく、10m²/gよりも大きいことが最も好ましい。

【0024】

この明細書では、“機能部位”は、多孔性基板の外表面または内面に位置する部位である。機能部位は、この明細書に記載した表面改変技術を利用して生成させることができる。機能部位は、生体分子を結合させることのできる結合部位を提供するのに役立つ。好ましいいくつかの実施態様では、機能部位に結合する生体分子は、標的生体分子(一般に溶液中の分析物)が共有結合または非共有結合することのできるプローブ分子として機能する。本発明で考慮する生体分子の例として、核酸、オリゴヌクレオチド、抗体などが挙げら

れる。この明細書では、“官能基”は、1つの単位として反応して機能部位の性質を決定する一群の原子である。機能性基板は、微細構造の表面に存在する機能部位を有する多孔性基板である。“機能化する”という用語は、1つまたは複数の官能基を多孔性基板の微細構造に結合させるプロセスを意味する。

【0025】

固有の大きな表面積/体積比を持つ多孔性材料は、非多孔性基板（例えば非多孔性ガラス）よりも機能化された面積が大きい。すでに述べたように、マイクロアレイの用途でこのような機能性多孔性基板を用いることは、従来の文献（例えばAndreoliのアメリカ合衆国特許出願公開2004/0157320、Tannerのアメリカ合衆国特許第6,750,023号）に教示されている。彼らの教えでは、多孔性微細構造によって増大した内部面積が活用されているが、結合部位に関しては多孔性材料の固有官能基密度に依存している。例えばAndreoliは、ナイロン分子の化学構造内のアミド基が提供する機能を持つ多孔性ナイロンを基板として利用することを教示している。それに対してTannerは、多孔性ガラスを利用することを教示しているが、シラン処理を通じたその後の機能化に関しては、ガラス表面にヒドロキシル基が存在することに依存している。

10

【0026】

本発明では、マイクロアレイの用途で官能基高密度基板を作るのに新しい方法を用いる。本発明の方法は、官能基を作り出すのに材料に固有の化学的性質に依存しない多孔性材料から出発する。そうではなく、多孔性材料の微細構造を、反応性官能基（例えばヒドロキシル基）を含む中間層で実質的に覆う。次に、適切な機能性化学物質を中間層のヒドロキシル基と反応させて機能性基板を作り出す。したがって基板の機能化には、多孔性微細構造の上に中間層を堆積させるステップが含まれる。この方法では、多孔性材料ではなくて中間層の選択が、官能基の密度を決める。本発明の教えに従ってあとから機能化した従来のあらゆる材料は、官能基の密度がはるかに大きくなった。

20

【0027】

官能基密度が大きな本発明の基板は、多孔性材料から出発して得られる。多孔性材料は、膜やシートなどの平坦な形状であることが好ましい。多孔性材料としては、有機または無機の材料が可能である。そのような有機多孔性材料の例として、ポレックス社が販売している超高分子量ポリエチレン（UHMWPE）、スモール・パーツ社（マイアミ・レイクス、フロリダ州）から入手できるポリプロピレン（PP）またはポリテトラフルオロエチレン（PTFE）などが挙げられよう。有機ポリマーから製造された膜は一般に微孔性であり、市販されている。そのような材料の例は、W.L.ゴア・アンド・アソシエイツ社から入手できる延伸PTFE（ePTFE）膜、パル社からそれぞれBiodyne（登録商標）とBiotrace（登録商標）の商品名で入手できるナイロン膜とポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜、オスモニクス社からPolySep（登録商標）の商品名で入手できるPP膜、ポレックス社からMupor（登録商標）の商品名で入手できるPTFE膜である。無機多孔性材料は、一般に堅固なシートとして入手できる。このような材料は、一般に、無機材料（例えば金属、セラミック、金属酸化物）を焼結させることによって得られる。多孔性ガラスはそのような焼結材料の一般的な一例であり、R&Hフィルタ社（ジョージタウン、デラウェア州）やアドバンスト・ガラス&セラミックス社（ホールデン、マサチューセッツ州）といった企業から入手できる。多孔性材料を適切に選択し、その後に機能化用化学物質を適切に選択することで、本発明の官能基高密度基板も自己蛍光を少なくすることができる。一般に、化学構造の中に共役した結合がない材料は、蛍光が少ない。そのような多孔性材料の例は、PTFE、UHMWPE、PP、ガラスなどの材料から製造したものである。

30

40

【0028】

多孔性材料として、延伸PTFE（ePTFE）が特に好ましい。なぜなら自己蛍光が少なく、化学的に不活性であり、高温で安定だからである。ePTFEの製造方法は、ゴア社に付与されたアメリカ合衆国特許第3,953,566号に記載されている。延伸PTFEはPTFEの微孔性形態であり、不規則な形状の孔からなる。微孔性の延伸PTFE（ePTFE）の表面積/体積比が例外的に大きいことはこの用途に適している可能性があることを示唆しているが、孔の形状

50

が不規則であるために候補にはなりにくい。しかし驚くべきことに、ePTFE構造が不規則で孔が円形ではないことが性能を損なうことはない。実際、ePTFEは最も好ましい多孔性材料である。延伸PTFEの孔は、高温で実施する引き伸ばしによる延伸プロセスによって作り出される。延伸によって微孔性構造が作り出され、細かいフィブリルによってノードが互いに接続される。好ましいePTFE材料は、ゴア社に付与されたアメリカ合衆国特許第4,187,390号の教示内容に従って製造される。

【0029】

孔のサイズの選択は、多孔性材料を選択する際にカギとなる1つの因子である。有効なマイクロアレイ用基板であるためには、孔は、スポッティングの間を通じて溶液が横方向に広がるのを抑制するのに十分な小ささでなければならない。孔が大きすぎると、スポットにする液体があらゆる方向に広がってスポットが互いに混合し、その結果としてクロストークと汚染が起こると考えられる。スポットとスポットの距離を大きくしてこの問題を回避することができる。しかしこのようにすると、所定の面積内に配置できるスポットの数が少なくなる。他方、孔は、生体分子が孔の中に入ることができるとともに、洗浄プロセスの間を通じて試薬が孔を出入りできるだけの大きさである必要がある。バブル・ポイントの測定は、多孔性材料の孔の最大サイズを特徴づけるための標準的な方法である。

【0030】

たいていの多孔性基板を用いてマイクロアレイの用途のための本発明による官能基高密度基板を作り出せるが、バブル・ポイントは少なくとも0.007MPa (1psi) でなければならない (少なくとも0.070MPa (10psi) が好ましい)。好ましいePTFE材料はバブル・ポイントの値が少なくとも0.207MPa (30psi) である。ePTFE材料は、バブル・ポイントの値が少なくとも0.207MPa (30psi) であることが最も好ましい。

【0031】

微孔性ePTFE材料の微細構造は、フィブリルによって互いに接続されたノードからなり、フィブリルの平均長によって特徴づけることができる。フィブリルの長さは、ePTFE膜の表面の走査電子顕微鏡写真を適度な高倍率 (例えば20,000倍) で撮影し、次いでノード間のフィブリルの長さを測定することによって測定できる。フィブリルに関してそのような測定を30回行ない、その測定の平均値をフィブリルの平均長として示す。フィブリルの平均長が長いほど一般にバブル・ポイントは低く、平均孔径は大きくなる。好ましいePTFE材料では、フィブリルの平均長は0.5~5 μm でなければならないと考えられる。この値は0.5~3 μm であることが好ましく、0.5~2 μm であることが最も好ましい。

【0032】

機能部位の密度が大きい本発明の基板は、厚さが5 μm 以上の多孔性材料を用いて形成することができる。より厚くなると官能基が結合する内部表面積が大きくなるため、官能基の密度が大きくなる。しかしマイクロアレイの用途では、多孔性材料の厚さに制限がある。厚すぎる材料は、接触印刷の間にプローブ溶液を過度に吸収して印刷ピンが急速に乾燥し、スポットの明確さに影響が出る可能性があるため、望ましくない。さらに、厚すぎる材料は、特にハイブリダイゼーション後の洗浄ステップのときに処理することが難しい。ハイブリダイゼーション液を材料から洗い流すのが不十分だと、試薬が残って基板の自己蛍光が増える可能性がある。マイクロアレイ用基板に関しては、多孔性材料の好ましい厚さは約250 μm 以下である。この値は約125 μm 以下であることが好ましい。

【0033】

本発明は、官能基が結合する多孔性材料の内面に依存している。内面の面積は、多孔性材料の厚さと比表面積の関数である。予想されるように、比表面積は多孔性材料を選択する際の重要な1つの考慮事項である。しかし比表面積は孔のサイズと関係している。一般に、孔のサイズが小さくなると比表面積が大きくなる。孔のサイズの条件に合わせ、比表面積が任意の値の多孔性材料を本発明の機能部位高密度材料に変換することができる。しかし実用的なマイクロアレイ用基板に関しては、多孔性材料は比表面積が少なくとも1 m^2/g でなければならない。好ましいePTFE材料は比表面積が少なくとも1 m^2/g であり、最も好ましい比表面積は少なくとも10 m^2/g である。

10

20

30

40

50

【0034】

本発明で利用できる多孔性材料は、いかなる添加剤も含まず、特に自己蛍光を増やす可能性のある添加剤を含まないことが好ましい。しかし必要な場合には、多孔性材料は、顔料、充填剤、着色剤、UV吸収材などの添加剤を含んでいてもよい。

【0035】

多孔性材料は、最初にヒドロキシル基含有機能性コーティングを多孔性材料の微細構造全体の上に堆積させ、その後、有機シラン化合物を用いてその中間層のヒドロキシル基と反応させることにより、本発明の官能基高密度多孔性基板に変換される。この変換プロセスの詳細を、主に好ましいePTFE材料に関して以下に説明する。しかしこの変換法は、これまで説明したさまざまな多孔性材料にも同様に適用できる。

10

【0036】

ePTFEには固有の疎水性があるため、極性溶液（例えばマイクロアレイ印刷用緩衝液やハイブリダイゼーション用緩衝液）は基板材料を濡らさない。また、ePTFEの化学構造のために生体分子（例えば核酸、タンパク質）はこの材料にうまく結合しない。したがって生体分子がうまく結合できるようにするには、ePTFEの表面を変化させた後に官能基を結合させる必要がある。有機ポリマーを用いて微細構造を被覆することによってePTFEの表面を変化させて表面を親水性にすることは、Fujimotoに付与されたアメリカ合衆国特許第5,130,024号と、Drumhellerに付与されたアメリカ合衆国特許第5,897,955号に記載されている。無機ゾル-ゲル組成物を用いたePTFEの同様な親水性処理は、日本国特開平08-250101と、Zuckerbrodのアメリカ合衆国特許公開2004/0081886A1に記載されている。

20

【0037】

本発明では、あとでシランと反応することのできるヒドロキシル基を提供する低自己蛍光親水性コーティングを用いて表面を変化させることが好ましい。このような親水性コーティングに適した有機ポリマーの例は、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリグリシドール、ポリ(ビニルアルコール-コ-エチレン)、ポリ(エチレングリコール-コ-プロピレングリコール)、ポリ(酢酸ビニル-コ-ビニルアルコール)などを単独で用いたもの、または組み合わせたものである。場合によっては、適切な架橋剤（例えばアルデヒド、エポキシド、無水物など）を用いてこれらのポリマー・コーティングをその場で共有結合によって互いに架橋させることができる。ポリビニルアルコール(PVOH)は、ePTFEの親水性処理を行なうのに好ましい有機ポリマーである。場合によっては実施する架橋は、アルデヒド（例えばグルタルアルデヒド）を用いて実現することができる。

30

【0038】

以下に説明するゾル-ゲル溶液は、より多くのヒドロキシル基を供給してePTFEの表面をあとで実施する機能化により適した状態にするという意味で、より好ましい溶液である。ゾル-ゲルは、溶液状態からゲル状態になる中間体または中間体混合物を加水分解した後脱水してガラスまたはセラミックにすることによって特殊な金属酸化物ガラスと金属酸化物セラミックを調製するための方法である。ePTFEを親水性にするのに利用するゾル-ゲル処理法に関する詳細は、日本国特開平08-250101に記載されている。

【0039】

好ましいゾル-ゲル・コーティング溶液は、オルトケイ酸テトラエチル(TEOS)またはオルトケイ酸テトラメチルに由来し、ゾル-ゲル・コーティングはケイ酸ナトリウム溶液またはコロイドシリカ懸濁液に由来する。TEOSに由来するゾル-ゲル・コーティング溶液が最も好ましい。上に説明した親水性コーティングは、他の微孔性材料（例えばナイロン、超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)、ポリプロピレン、多孔性PTFE、PVDF、多孔性ガラスなど）の表面を変化させるのにも使用できる。ePTFEその他の微孔性材料の親水性処理は、多数の方法で実現できる。通常は、この処理は、有機ポリマーまたは無機ゾル-ゲルの溶液を一般に知られている方法（例えば浸漬コーティング、スプレー、スピン・コーティング、ブラッシング、ローラー・コーティング、メイヤー・バー・コーティング）で膜に付着させることによって実現される。材料の多孔性を維持しつつ表面を親水性にするのに

40

50

十分なコーティングだけを付着させるように注意せねばならない。過剰量の親水性コーティングを付着させると、基板の自己蛍光も増大するであろう。

【0040】

上に説明した親水性処理ステップでヒドロキシル基含有コーティングを微細構造全体の上に堆積させることにより、ePTFEその他の微孔性材料が親水性になる。次のステップでヒドロキシル基を低自己蛍光有機シランと反応させることで、結合させる個々の生体分子に応じた望む官能基を得る。例えば相補的DNA (cDNA) 分子を基板に結合させる場合にはアミン基が最適であり、その基は、親水化されたePTFE材料を直鎖または分岐鎖の適切なアミノシラン、アミノアルコキシシラン、アミノアルキルシラン、アミノアリアルシランと反応させることによって導入できる。使用できるシランの例は、 γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N-(ベータ-アミノエチル)- γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、N-(ベータ-アミノエチル)- γ -アミノプロピルトリエトキシシランである。このようなアミン基は、有機シランがカップルした dendrimer (例えば dendritec社、ミッドランド、ミシガン州から入手できる) を通じて導入することもできる。この方法を利用して適切な有機シランを選択することで、さまざまな反応性官能基をePTFE基板に結合させることができる。同じ官能基に関しては、表面上の結合部位からの官能基の位置は、選択した有機シランで用いるリンカー分子のサイズによって制御することもできる。結合させることのできる反応性官能基の例は、いくつか挙げるならば、アミン、エポキシド、アルデヒド、カルボキシル、無水物、ヒドロキシル、アクリレート、メタクリレート、エステル、チオール、アジド、スルホネート、ホスホネートなどである。望むのであれば、シランとさまざまな有機官能基の混合物を中間層からのヒドロキシル基と反応させることにより、2つ以上の官能基を基板に堆積させることができる。その官能基をさらに他の化学試薬と反応させ、標的とする最終用途のための望む官能基を作り出すことができる。例えばエポキシド基をジオールとさらに反応させてヒドロキシル基を再び作り出すこと、またはマレイミド (NHSをベースとした架橋剤) の使用によってアミン基をさらに架橋させ、生体分子を有するアミン基 (例えば抗体) と反応できる官能基を作り出すことができる。

10

20

【0041】

シラン処理は、親水性ePTFE材料を、pHが小さな有機溶媒にシランを溶かした希釈溶液で処理することによって実現できる。このようなシラン処理と、有機官能基やリンカーのサイズが異なるシランの詳細は、ジェレスト社 (モリスヴィル、ペンシルヴェニア州) から入手できる冊子『シラン・カップリング剤：境界を超えた結合』から得ることができる。同様の情報と化学物質は、他の企業 (例えばユナイテッド・ケミカル・テクノロジーズ社 (ブリストル、ペンシルヴェニア州)、ダウ・コーニング社 (ミッドランド、ミシガン州)、GEアドバンスト・マテリアルズ社 (ウィルトン、コネティカット州)) からも入手できる。本発明に関しては、シラン処理は、一般的な液体コーティング法 (例えば浸漬コーティング、スプレー、スピン・コーティング、ブラッシング、ローラー・コーティング、メイヤー・バー・コーティング) で実現することができる。あるいはシランは、気相コーティングで膜の微細構造の上に堆積させることができる。材料の多孔性を維持しつつ、ePTFEを機能化するのに十分なシランだけを添加するように注意する必要がある。

30

40

【0042】

本発明の方法は、さまざまな膜の機能を劇的に向上させる。その証拠は、当業者に馴染みのあるアッセイを利用して測定できるアミンの密度の値が顕著に増大することである。最も注目すべき点は、本発明の処理したePTFE膜その他の微孔性膜が、アミン基の密度に関して従来の材料と比べて1桁を優に超える増大を示すことである。これほど改善された機能化膜になるというのは驚きであり、予想外のことであった。

【0043】

官能基の密度は、基板の単位表面積当たりの官能基のモル数として、または基板の単位体積当たりの官能基のモル数として測定することができる。本発明の方法を利用し、アミン基の密度が0~5ナノモル/cm²の範囲である多孔性材料を、多孔性材料の具体的な化学的

50

性質に応じて官能基の密度が50~1300ナノモル/cm²の範囲である基板に変換した。これら基板の厚さがわかっているため、単位体積当たりの官能基の密度は、2500~150,000ナノモル/cm³と翻訳される。例えばアミノ基がまったくないePTFE材料と微孔性PP材料を、本発明の方法を利用してアミノ基の密度が416ナノモル/cm²と487ナノモル/cm²のアミノ基基板に変換した。本発明の方法では、中間層のコーティング中に堆積されたヒドロキシル基にさまざまな有機シランを反応させることによって機能部位が生成するため、上記の官能基の密度の値はアミン官能基に限定されない。そうではなく、機能部位の密度は、中間層のコーティングで得られるヒドロキシル基の密度に主に依存することが予想される。したがって有機官能基を持つシラン化合物を適切に選択することで、選択する官能基の具体的な性質に関係なく、50ナノモル/cm²超または2500ナノモル/cm³超という機能部位の密度を実現できることが期待される。

10

【0044】

本発明の高機能基板は、マイクロアレイの用途で利用する以外に、他の用途（例えば診断装置、活性フィルタの用途、プロッティングの用途など）において多彩な生体分子をうまく結合させたり捕獲したりすることに利用できる。

【0045】

基板の官能基の密度のこの顕著な増大は、自己蛍光を極めて少なく維持しつつ実現することができる。官能基の大きな密度と少ない自己蛍光のこの組み合わせは、マイクロアレイ用基板にとって非常に望ましい。というのも、ハイブリダイズした標的分子からの蛍光信号が背景雑音に対して最大になるからである。基板の自己蛍光は、生体分子を印刷する前に、いくつかの販売会社（例えばアクソン・インスツルメンツ社（ユニオン・シティ、カリフォルニア州）、パーキン-エルマー社（ウェルズリー、マサチューセッツ州））から市販されているマイクロアレイ用スキャナを用いて基板を走査することによって測定できる。走査は、使用するスキャナのタイプに応じ、興味の対象となる複数の波長で実施することができる。蛍光の平均値は、興味の対象となる波長で走査した基板のデータから計算することができる。走査は、装置の設定（例えばレーザーのパワー、焦点深度、PMT利得）をいろいろ変えて実施できることに注意されたい。信号強度は、これら設定値の関数である。したがって自己蛍光の値には、所定の装置でのスキャナの設定が付随するはずである。

20

【0046】

GenePix 4000Aスキャナ（アクソン社）を用いて本発明による基板の自己蛍光を測定した。レーザーのパワーとこのスキャナの焦点深度はそれぞれ100%と0 μ mに固定し、PMT設定値を350にしてすべての測定を行なった。本発明の方法を利用すると、低蛍光多孔性材料（例えばPTFE、UHMWPE、PP、ガラスなど）に関し、自己蛍光のレベルが532nm（緑）の波長では1000相対蛍光単位（RFU）未満、635nm（赤）の波長では100RFU未満の官能基高密度基板を作ることができる。たいいていの場合にこのような官能基高密度基板の自己蛍光のレベルははるかに低くすることができ、典型的には532nmの波長で100RFU未満、635nmの波長で30RFU未満にできる。

30

【0047】

官能基の密度が大きくて自己蛍光が少ない基板は、信号強度が背景雑音よりも大きいことが期待されるため、マイクロアレイの用途に最も適している。このような基板をマイクロアレイの用途で利用するさまざまな方法がある。基板をそのまま用いること、または基板をインサート成形またはそれ以外の組み立て技術（例えば超音波接合、RF溶接、熱溶接など）によって他のプラスチック製品、セラミック製品、金属製品と組み合わせてカセットまたは顕微鏡用スライド・ガラスの形態に変換することができる。適切な官能基を選択することにより、多彩な生体分子を本発明の官能基高密度基板に結合させることができる。結合させることのできる生体分子の例は、いくつか挙げるならば、核酸、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、抗体、細胞、酵素、病原体などである。

40

【0048】

多くの用途において、取り扱いと印刷を容易にするため、本発明の官能基高密度基板を

50

支持層で支えることが望ましい。この支持層は、可撓性であっても堅固でもよい。可撓性支持層は、プラスチック・フィルムまたは金属ホイルにすることができる。しかし従来のマイクロアレイの用途では、支持層は一般に堅固である。そのような堅固な支持層は、剛性材料から作ることができる。ただしその材料は、ハイブリダイゼーション温度でサイズ安定性が維持されるとともに、典型的なマイクロアレイ実験に含まれる印刷ステップ、ハイブリダイゼーション・ステップ、洗浄ステップ、乾燥ステップの間に使用する試薬の影響を受けないことが条件である。支持層に適した材料の例は、ガラス、金属、セラミック、プラスチックなどである。顕微鏡用スライド・ガラスが支持層として最も一般的に用いられている。

【0049】

本発明の一実施態様では、機能性基板の少なくとも一部を接着剤で堅固な支持体に接合してマイクロアレイ用複合基板を作り出すことができる。接着剤によって得られる接合は、典型的なマイクロアレイ実験に含まれる印刷ステップ、ハイブリダイゼーション・ステップ、洗浄ステップ、乾燥ステップに耐えられるだけの強度がなければならない。したがって接着剤は、適度な耐熱性と化学物質に対する耐性を持つ必要がある。接着剤は、自己蛍光のレベルができるだけ低いことも望ましい。一般に、化学構造の中に共役結合を持たない接着剤は、自己蛍光が少ない傾向がある。選択した接着剤は、堅固な支持体と機能性多孔性層にうまく接合する必要がある。必要な場合には、支持面を処理して接着剤との接合を強くすることができる。有機シランを用いて支持面を処理するというのが、接着力を強くするのに利用できる表面処理の一例である。あるいは接着力強化添加剤（例えばシラン・カップリング剤）を接着剤に添加して接着剤と堅固な支持体の接合をより強くすることができる。機能性多孔性基板で受け入れることのできる接合であるためには、接着剤が多孔性構造の中に侵入する必要がある。この侵入ができるほど接着剤の粘性または表面張力が十分に小さくない場合には、接着剤を粘性率および/または表面張力の小さい溶媒との溶媒和物にしてこの侵入を促進することができる。しかし接着剤が機能性基板の断面に過度に侵入しないように注意する必要がある。というのも、そうすると官能基の利用可能性が低下するとともに、マイクロアレイ用複合基板の自己蛍光のレベルが上昇する可能性があるからである。

【0050】

さまざまな種類の接着剤を使用することができる。接着剤は熱硬化性のものが可能である。そのような接着剤の例として、エポキシ、アクリリクス、シリコーンなどが挙げられる。こうしたタイプの接着剤は、支持層または機能層に付着させ、接合すべき別の面と接触させた後、熱やUV照射などの形態でエネルギーを加えて硬化させることができる。トラ-コン社（ベッドフォード、マサチューセッツ州）から入手できるTRA-BOND FDA2が、使用可能な2部式熱硬化エポキシの一例である。接着剤が液体の形態である場合には、一般に利用されているさまざまな方法（例えばスプレー、ブラッシング、ローラー・コーティングなど）で付着させることができる。接着剤が一部硬化したフィルムの形態である場合には、圧力および/または熱を加えて積層化することができる。接着剤は感圧性のものも可能であり、そのような接着剤はさまざまな化学物質ファミリーに属する。アクリリクス（例えば3M社（セントポール、ミネソタ州）の3M 9461P接着剤転写テープ）とシリコーン（例えばダウ-コーニング社（ミッドランド、ミシガン州）のダウ-コーニング（登録商標）MD 7-4602）が、一般に使用されている感圧性接着剤（PSA）である。この場合、接着剤を支持体または機能性基板に付着させ、圧力および/または熱を加えて別の材料と接合する。接着剤が液体の形態である場合には、上に説明したようにして付着させ、必要な場合には乾燥させて揮発成分をすべて除去した後、相手と接合する。最後に、接着剤は熱可塑性のものも可能である。蛍光が少ない特性を持つそのような接着剤の例は、いくつか挙げるならば、フルオロプラスチック（ダイネオンLLC社（オークデール、ミネソタ州）のDyneon（登録商標）THFフルオロサーモプラスチック）；ダイキン・アメリカ社（オレンジバーグ、ニューヨーク州）のeFEP（登録商標）；テフロン（登録商標）FEP（デュボン・フルオロプロダクツ社、ウィルミントン、デラウェア州）、ティコナ社（チャタム、ニュージ

10

20

30

40

50

ャーギー州)のTopas(登録商標)環式オレフィン・コポリマーである。フィルムの形態になったこれらの材料を用い、積層ステップにおいて熱と圧力を加えることにより、機能層を支持層に接合することができる。熱可塑性材料が樹脂の形態で利用できる場合には、適切な溶媒に溶かし、薄い層として機能膜または支持層に付着させ、乾燥させて揮発性物質を除去した後、相手に接合する。すでに説明したように、多孔性材料層は、機能化前に接着剤で支持体に接合し、次いでその複合体を親水性処理ステップとシラン処理ステップで機能化することができる。

【0051】

図1は、本発明の一実施態様による製品10を示している。接着剤14が支持層12の上に配置されている。微孔性フルオロポリマー(ePTFE)基板層16が接着剤14によって支持層12の上に付着している。

10

【0052】

支持層12は、接着剤を用いて、または接着剤なしで微孔性フルオロポリマー層16を付着させることのできる任意の堅固な面である。支持層12はガラスであることが好ましい。支持層12の表面は、場合によっては、接着剤14と微孔性フルオロポリマー層16を付着させる前に処理する。

【0053】

ePTFE材料の表面20の走査電子顕微鏡写真を図2(A)に示してある。この写真は、フィブリル24によって互いに接続されたノード22の存在を示している。この写真には、この材料の不規則な孔も示されている。

20

【0054】

出発材料としてePTFEを用いた本発明による多孔性基板の表面の走査電子顕微鏡写真を図2(B)と図2(C)に異なる倍率で示してある。多孔性ePTFE材料の微細構造を最初にシリカゾル-ゲルで処理して中間層を作り出し、次いでその中間層をアミノシランと反応させた。微細構造の被覆されたノード26と被覆されたフィブリル28が図2(C)に見られる。

【0055】

本発明の方法を利用し、機能性ePTFE層を有するマイクロアレイ用複合基板を製造した。この複合基板は、官能基の密度が異常に大きくて自己蛍光が異常に少ないという望む特徴を示す。特に、ePTFEの性質に応じ、官能基の密度が少なくとも50ナノモル/cm²である複合基板を作ることができる。この密度は、少なくとも100ナノモル/cm²であることが好ましく、少なくとも250ナノモル/cm²であることが最も好ましい。これは、従来の基板で得られる官能基の密度よりも少なくとも1桁大きい。例えば使用するePTFE材料の具体的な性質に応じ、マイクロアレイ用複合基板で測定されるアミンの密度は、約100~400ナノモル/cm²の範囲である。比較のため、アミノシランで処理した非多孔性スライド・ガラス(Corning UltraGaps(登録商標))と多孔性ナイロン膜をベースとしたVivid(登録商標)マイクロアレイ用スライドで測定したアミンの密度は、それぞれ約4.8ナノモル/cm²と約6.5ナノモル/cm²である。

30

【0056】

本発明のマイクロアレイ用複合基板は、官能基の密度が高いのに低レベルの自己蛍光を維持している。この複合基板の自己蛍光は、生体分子を印刷する前にGenePix 4000Aマイクロアレイ用スキャナをPMTの設定値を350にして基板を走査することによって測定できる。本発明の方法を利用し、機能的ePTFE層を備えていて自己蛍光のレベルが532nm(緑)の波長では1000相対蛍光単位(RFU)未満、635nm(赤)の波長では100RFU未満のマイクロアレイ用複合基板を作ることができる。たいいていの場合にマイクロアレイ用複合基板の自己蛍光のレベルははるかに低くすることができ、典型的には532nmの波長で200RFU未満、635nmの波長で30RFU未満にできる。

40

【0057】

本発明のマイクロアレイ用複合基板は、生体分子を固定化するための多用途の表面を提供する。本発明の基板は、典型的なマイクロアレイ分析の用途以外に、任意のパターンでさまざまな生体分子を結合させた基板として用いることもできる。結合させることのでき

50

る生体分子の例は、いくつか挙げるならば、核酸、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、抗体、細胞、病原体である。

【0058】

ある評価法を実施することにより、マイクロアレイ用複合基板の性能を調べた。この評価法では、まず複合基板を用いてDNAマイクロアレイを作り出した。次にそのマイクロアレイを、異なる2つの波長で蛍光信号を出す2種類の蛍光染料（すなわちCy3とCy5）で標識したcDNAとハイブリダイズさせた。次に、レーザー光源と、検出器としての光増倍管（PMT）を用いたマイクロアレイ用スキャナを利用し、ハイブリダイズしたスライド内の各スポット（とその近傍）からの異なる2つの波長における蛍光信号を検出した。スキャナは、ハイブリダイズしたマイクロアレイ用基板からの蛍光の強度を検出し、そのデータは、カラー・スケールで強度を表わす基板走査画像の形態で記憶される。このようにして得られた生の信号強度のデータを、標準的なマイクロアレイ・データ分析ソフトウェア（例えばアクソン・インストルメンツ社のGenePox（登録商標）Pro、ロビオン・インフォーマティクス社のGenetraffic（登録商標）、パーキン-エルマー社のScanarray（登録商標）Express）を用いて統計的に分析し、性能のカギとなるいくつかの指標（例えば信号対雑音比や精度レベル）を明らかにした。性能に関するこれらの基準は、本発明のマイクロアレイ用複合基板と、従来基板で明らかにした。マイクロアレイのデータ分析に関する詳細は、Ulrike A. Nuber編の『DNAマイクロアレイ』（テイラー＆フランシス社、ニューヨーク、2005年）や、Mark Schenaによる『マイクロアレイ分析』（ジョン・ワイリー＆サンズ社、ホボケン、ニューヨーク州、2003年）などの書籍から容易に入手することができる。

10

20

【0059】

信号対雑音比（SNR）は、マイクロアレイ用基板の性能のカギとなる1つの指標である。マイクロアレイ内の1つのスポットからの信号の品質は、その直近周辺部（局所的背景雑音としても知られる）と比較した強度に依存する。1つのスポットからの信号強度が局所的背景雑音の強度に近づくにつれ、各測定における誤差が潜在的に大きくなる。所定の波長の1つのスポットのSNRは容易に計算することができる。そのためには、まず最初に、真の信号強度（1つのスポットを表わす全画素の信号強度の中央値（S）と、そのスポットのすぐ外側の領域を表わす全画素の局所的背景雑音の中央値（B）の差である）を明らかにする。背景雑音（NB）は、局所的背景雑音の標準偏差を計算することによって推定する。するとこのスポットのSNRは、

30

$$\text{SNR} = (S - B) / \text{NB}$$

と定義される。ここに、S、B、NBは、相対蛍光単位（RFU）で表わされる。

【0060】

一般にSNRはアレイの個々のスポットについて測定される。SNRの平均値（ASNR）は、アレイ内の個々のスポットに関するSNRをすべて平均した値である。マイクロアレイ・データ分析ソフトウェアを使用すると、典型的なマイクロアレイ内の多数のスポットに関してSNRの計算を自動的に実施することができる。

【0061】

ASNRは大きいことが常に望ましい。というのも、そうなっていると、マイクロアレイ実験で得られるデータの精度に対する信頼性がより大きいからである。本発明のマイクロアレイ用複合基板は、従来基板と比べて著しく大きなASNRを提供する。一般に、本発明の複合基板は、平均して、アミノシラン処理したスライド・ガラスから得られる少なくとも2倍のASNRを両方の波長で示す。例えばスライド・ガラスに接合した機能化ePTFE膜の性能は、従来あらゆる材料の性能よりもはるかに優れている。このePTFE膜のCy5とCy3に関する平均の信号対雑音比は、それぞれ少なくとも191と94である。最も一般的に使用されている従来スライドは、Cy5とCy3に関する信号対雑音比がそれぞれ約110と約62である。

40

【0062】

本発明のマイクロアレイ用複合基板が大きなASNRを与えるだけでなく、得られる蛍光信号を安定化させるのにも非常に有効であるというのは驚くべきことであった。従来からよ

50

く知られているように、Cy5染料からの信号は、特にオゾンの影響下で極めて不安定である。実際、環境中のオゾン・レベルの季節的変動のため、環境中のオゾン・レベルが上昇するときにCy5信号の安定性の低下が見られることは稀でない。機能的ePTFE層を有する本発明のマイクロアレイ用複合基板は、従来の基板で見られるよりもCy5信号の安定化に関してはるかに有効であることが見いだされた。例えば環境中のオゾン・レベルが高かった夏の数ヶ月に、本発明の基板でのCy5のSNRは、アミノシラン処理したスライド・ガラスに関するCy5のSNRの約7.7倍であった。スライド・ガラス上のCy5信号は急激に低下したのに対し、本発明の複合基板上でのCy5信号は相対的により安定であったため、この比は24時間以内に38.9に上昇した。

【0063】

大きなASNR以外に、精度が、性能に関する非常に望ましい別の指標である。マイクロアレイ実験では、同じ標的に異なる2種類の蛍光染料(Cy3とCy5)を標識するとき、両方の波長からの信号が同じ情報を提供することが期待される。言い換えるならば、同じx軸とy軸を持つ1つのグラフ上にCy3の信号強度をCy5の信号強度に対してプロットすると、理想的なデータは、1:1(すなわち45°)の直線上に載らなければならない。現実には、データは一般にこの直線から外れてしまい、この1:1の直線から外れるほど、データの信頼性が低下する。データの精度に関する1つの指標は、データがこの1:1の直線にどれだけ近いかの指標を考案することによって得られる。データ点がM個あって、そのうちのN個のデータ点がZ倍上とZ倍下の境界の外側にあるとすると、Z倍精度レベルは、

$$P_z = Z\text{倍}\% \text{精度レベル} = 100 \times (1 - (N/M))$$

と定義できる。ここに、Z倍上とZ倍下の境界は、Cy3の信号強度がCy5の信号強度のそれぞれZ倍または1/Z倍である関係を表わす。例えば2倍上は、Cy3の信号強度がCy5の信号強度の2倍であることを意味し、2倍下は、Cy3の信号強度がCy5の信号強度の半分であることを意味する。Zがより低いレベルで P_z 値がより大きいというのは、データがより正確でより信頼できることを意味する。本発明のマイクロアレイ用複合基板は、極めて大きな精度レベルを示す。典型値として、 $P_{1.5}$ と $P_{1.2}$ は、本発明の基板に関してそれぞれ少なくとも99%と少なくとも90%であった。比較のため、アミノシラン処理したスライド・ガラスでのそれぞれの値は96%と73%であった。明らかに、この明細書に記載した複合基板は、マイクロアレイ実験で使用するとき極めて正確で信頼できる。

【実施例】

【0064】

試験法

【0065】

厚さの測定

【0066】

Kafer FZ1000/30厚さ測定挟みゲージ(ケーファー・メスーレンファブリック社、ヴィリンゲン-シュヴェンニンゲン、ドイツ国)の2枚のプレートの間に膜を置くことにより、膜の厚さを測定した。その測定の平均値を使用した。

【0067】

バブル・ポイントの測定

【0068】

ASTM F31 6-03の一般的な指示に従い、キャピラリ・フロー・ポロメータ(モデルCFP 1500 AEXL、ポラス・マテリアルズ社、イサカ、ニューヨーク州)を用いてバブル・ポイントと平均孔径を測定した。サンプルの膜をサンプル室の中に置き、表面張力が19.1ダイン/cmのSilWickシリコン流体(ポラス・マテリアルズ社、イサカ、ニューヨーク州)で湿らせた。サンプル室の底部クランプは直径が2.54cm、厚さが3.175mmの多孔性金属円板インサート(40ミクロンの多孔性金属円板、モット・メタリユルジカル社、ファーマントン、コネティカット州)であり、サンプル室の上部クランプには直径が3.175mmの穴があった。Capwinソフトウェア(バージョン6.62.1)を利用し、以下のパラメータを、すぐ下に示した表に指定したように設定した。バブル・ポイントと平均孔径について示した値

10

20

30

40

50

は、2回の測定の平均値である。

【 0 0 6 9 】

【 表 1 】

パラメータ	設定点		パラメータ	設定点
maxflow (cc/m)	200000		mineqtime (秒)	30
bubflow (cc/m)	100		presslew (cts)	10
F/PT (旧気泡時間)	40		flowslew (cts)	50
minbppres (PSI)	0		equiter	3
ゼロ時間 (秒)	1		aveiter	20
v2incr (cts)	10		maxpdif (PSI)	0.1
preginc (cts)	1		masfdif (cc/m)	50
パルス遅延 (秒)	2		sartp (PSI)	1
maxpre (PSI)	500		sartf (cc/m)	500
パルス幅 (秒)	0.2			

10

【 0 0 7 0 】

官能基の密度の測定

20

【 0 0 7 1 】

ニンヒドリンをベースとしたアッセイを利用してアミノ基の密度を調べた。このアッセイは、Sarinら (Sarin, V.K., Kent, S.B.H., Tam, J.P., Merrifield, R.B., 1981年、Anal. Biochem., 第117巻、147~157ページ) の教えに基づいている。このアッセイでは、ニンヒドリンを本発明の基板と反応させた。得られた液体中の反応生成物を分光器で調べると、アミン基の濃度が得られた。このアッセイでは、サンプル基板から得られた約1cm²のサイズのサンプルを使用し、以下の手続きに従った。

【 0 0 7 2 】

試薬A - ビーカーの中で40gのフェノールと10mlの無水エタノールを混合し、透明な液体になるまで温めた。別のビーカーの中で、65mlの水に0.042gのシアン化カリウム (KCN) を溶かした。次に、別の瓶の中で、約2mlのこのKCN溶液を100mlの無水ピリジンで希釈した。“試薬A”の標識を付けた別の容器の中で、6mlのフェノール/エタノール溶液を12.5mlのKCN/ピリジン溶液と混合した。

30

【 0 0 7 3 】

試薬B - 2.5gのニンヒドリンを10mlの無水エタノールに溶かした。

【 0 0 7 4 】

サンプルの分析

【 0 0 7 5 】

試験管の中に800 μlの試薬Aと200 μlの試薬Bを添加した。この試験管を100 に設定した加熱ブロックの上に置き、このブロックを振盪装置の上に置いた。この振盪装置を110rpmで10分間にわたって作動させた。その後、試験管を取り出して水浴の中に入れた。この試験管にエタノールを添加して全体積を2mlにし、得られた溶液をよく混合した。ピペットでこの混合物のアリコートを取って200 μl採取し、ガラス製の96ウエル・プレートに入れた。分光測光器を用いて570nmにおける吸光度を測定した。

40

【 0 0 7 6 】

データの分析

【 0 0 7 7 】

ブランクの状態の吸光度を差し引いた後の吸光度の値を利用し、各サンプルのアミンの密度を以下の関係式から計算した。

アミンの密度 (ナノモル/cm²) = [吸光度_{サンプル} × 体積 (リットル) × 10⁹ (ナノモ

50

ル/モル)] / [Ext. Co.₅₇₀ (M⁻¹cm⁻¹) × 経路長 (cm) × 面積サンプル (cm²)]

ここに、体積= 2ml = 0.002リットル、Ext. Co. = 消滅係数= 15,000M⁻¹cm⁻¹、使用した経路長= 0.4146cmである。

【0078】

各サンプルについて3回の測定を行ない、アミンの密度の値を3つの複製の平均として示した。

【0079】

支持されていない機能性基板の場合には、基板の厚さを直接測定した。この場合、官能基の密度は、

官能基の密度 (ナノモル/cm³) = 官能基の密度 (ナノモル/cm²) / 基板の厚さ (cm) 10
として表現される。

【0080】

自己蛍光の測定

【0081】

Axon Genepix 4000A (アクソン・インスツルメンツ社、ユニオン・シティ、カリフォルニア州) スキャナをPMTの設定値を350、解像度を10μmにして使用し、支持されていない基板の自己蛍光と、機能化した基板を用いて作ったマイクロアレイ用スライドの自己蛍光を測定した。自己蛍光は、635nmと532nmの波長で測定した。スライド・サンプル (堅固なVyxor基板を含む) を、基板を下向きにしてスライド・ホルダの中に置き、自己蛍光を走査した。支持されていない基板 (例えば膜) の場合には、サンプルを無地の顕微鏡用スライド・ガラスの上に載せ、基板を下向きにしてスライド・ホルダの中に置き、自己蛍光を走査した。GenePix Pro 5.0ソフトウェアを使用し、走査した画像を分析した。自己蛍光の値をスライド内の長方形領域の異なる4800箇所記録した。この領域の左上隅は、25.4mm × 76.2mmのサンプルの左端から2.27mm、上端から12.21mmであった。この領域の右下隅は、サンプルの左端から18.04mm、下端から59.82mmであった。2つの波長での自己蛍光の値の平均値を各サンプル・スライドと各基板について記録した。 20

【0082】

信号対雑音比の測定

【0083】

本発明によるマイクロアレイ用スライドの信号対雑音の測定は、大学健康ネットワーク (UHN) (トロント、カナダ国) のマイクロアレイ・センターで実施した。3 × SSCにDNAが0.2μg/mlの濃度で含まれる印刷溶液を用い、ヒト・ゲノムからの1718クローンのセットをスライド上に印刷した。印刷されたこのアレイは、グリッド間の距離が4500μmの8行 × 4列に配置された32個のブロックにされていた。各グリッドには、10行 × 12列に配置された120個の突起が存在していた。各突起のサイズは100μmであり、突起間の距離は200μmであった。印刷している間の湿度レベルは55~60%であった。印刷の後、スライドに印刷されたプローブを95℃にて1時間にわたって乾燥させた後、UV Stratalinker™ 1800 (ストラタジーン社) を用いて2500マイクロジュールのパワーで架橋させた。 30

【0084】

以下の標識化プロトコルを利用し、標識したcDNAを合計10μgのRNAから生成させた。 40

【0085】

逆転写

【0086】

・0.5μlの試験管の中で、8.0μlの5×First Strand緩衝液 (Superscript II、インビトロジェン社) と、1.5μlのAncTプライマー (5'-T₂₀VN、100ピコモル/μl) と、3.0μlのdNTP-dTTP (dATP、dCTP、dGTPをそれぞれ6.67ミリモル) と、3.0μlの2mM dTTPと、3.0μlの2mM AA-dUTP (シグマ社、カタログ番号A-0410) と、4.0μlの0.1M DTTと、1.0μlの対照RNA (人工シロイヌナズナ転写産物 (2~10ng/μl)、なくてもよい) と、0.1~10μgの全RNA (0.1~0.5μgのmRNAまたは5~10μgの全RNA) と、ヌクレアーゼを含まない40μlの水を混合する。 50

【 0 0 8 7 】

・この標識反応物を、65℃にて5分間、次いで（溶液を部分的に冷却するため）42℃で2分間にわたってインキュベートする。インキュベーションを暗所で行なう必要はない。

【 0 0 8 8 】

・2μlの逆転写酵素（Superscript II、インビトロジェン社）を添加し、42℃にて2時間にわたってインキュベートする。

【 0 0 8 9 】

・1Mの水酸化ナトリウムを8μl添加し、65℃にて15分間にわたって加熱してRNAを加水分解する。

【 0 0 9 0 】

・1Mの塩酸を8μlと1Mのトリス-HCl（pH7.5）を4μl添加して溶液を中和する。

【 0 0 9 1 】

アミノアリル-cDNAの精製

【 0 0 9 2 】

CyScribe™ GFX™精製キット（GEアマーシャム社、カタログ番号27-9606-02）を用いて精製した。以下のプロトコルに従い、各サンプルを1つのGFXカラムで精製した。

【 0 0 9 3 】

・捕獲用緩衝液500μlを各カラムに添加する。

【 0 0 9 4 】

・cDNA産物（約62μl）をカラムに移し、ピペットを数回上下させて混合し、13800×gで30秒間にわたって回転させ、流出物を廃棄する。

【 0 0 9 5 】

・80%エタノールを600μl添加し、1300rpmで30秒間にわたって回転させ、流出物を廃棄する。合計で3回の洗浄に関してこのステップを繰り返す。

【 0 0 9 6 】

・カラムをさらに30秒間にわたって回転させ、確実にすべてのエタノールを除去する。

【 0 0 9 7 】

・GFXカラムを新しい試験管に移し、0.017Mの炭酸水素ナトリウム（pH9）を60μl添加する。

【 0 0 9 8 】

・GFXカラムを室温にて1分間にわたってインキュベートする。

【 0 0 9 9 】

・138000×gで1分間にわたって回転させ、精製された標識付きcDNAを溶離させる。

【 0 1 0 0 】

・Speed Vacを用いてサンプルを完全に乾燥させる。ヌクレアーゼを含まない7μlの水に再度懸濁させる。

【 0 1 0 1 】

単官能反応性シアニン染料と標識の調製

【 0 1 0 2 】

・Alexa 647 / Alexa 555蛍光体（インビトロジェン社）とCy5 / Cy3（アマーシャム社）をこの実験で使用した。両方ともそれぞれCy5およびCy3と呼ぶことにする。Alexa蛍光体は、個別に包装されて販売されている。試験管1つにつき3μlのDMSOを添加して染料を再度懸濁させる。試験管の全内容物をそれぞれの標識反応物に添加する。Cy染料は、5μlのパッケージで売られている。45μlのDMSOを各試験管に添加する。再度懸濁させた3μlの染料をそれぞれの標識反応物に再び添加する。

【 0 1 0 3 】

・7μlのアミノアリルで標識したcDNAに3μlの染料を添加し、ピペットを上下させて混合し、暗所で室温にて1時間にわたってインキュベートする。

【 0 1 0 4 】

・4.5μlの4Mヒドロキシルアミンを添加して共役していない染料の反応を停止させる。

10

20

30

40

50

暗所で室温にて15分間にわたってインキュベートする。

【 0 1 0 5 】

蛍光標識したプローブの精製

【 0 1 0 6 】

・ 35 μ l の水を各反応物に添加して各反応物の体積を約 50 μ l にする。

【 0 1 0 7 】

・ Cy5 で標識したサンプルと Cy3 で標識したサンプルを組み合わせ、同時にハイブリダイズさせる。

【 0 1 0 8 】

・ 500 μ l の捕獲用緩衝液を各カラムに添加する。 10

【 0 1 0 9 】

・ 標識した cDNA 産物 (約 100 μ l) をカラムに移し、ピペットを数回上下させて混合し、13,800 \times g で 30 秒間にわたって回転させ、流出物を廃棄する。

【 0 1 1 0 】

・ 80% エタノールを 600 μ l 添加し、13,800 \times g で 30 秒間にわたって回転させ、流出物を廃棄する。合計で 3 回の洗浄に関してこのステップを繰り返す。

【 0 1 1 1 】

・ カラムをさらに 30 秒間にわたって回転させ、確実にすべてのエタノールを除去する。

【 0 1 1 2 】

・ GFX カラムを新しい試験管に移し、60 μ l の溶離用緩衝液 (キットに付属している) を添加する。 20

【 0 1 1 3 】

・ GFX カラムを室温にて 1 分間にわたってインキュベートする。

【 0 1 1 4 】

・ 13,800 \times g で 1 分間にわたって回転させ、精製された蛍光標識付き cDNA を溶離させる。

【 0 1 1 5 】

・ Speed Vac でサンプルを乾燥させ (高温で ; 乾燥させ過ぎないように注意する) 、ヌクレアーゼを含まない 5 μ l の水に再度懸濁させる。

【 0 1 1 6 】

ハイブリダイゼーション 30

【 0 1 1 7 】

・ ハイブリダイゼーション前のステップは必要ない。

【 0 1 1 8 】

・ すべてのハイブリダイゼーションに十分な量の溶液を作る - スライド 1 つにつき 100 μ l と、ピペット操作の間違いに備えた予備の 100 μ l を作る。

【 0 1 1 9 】

・ 100 μ l の各 DIG Easy Hyb 溶液 (ロッシュ社) に、5 μ l の酵母 tRNA (インヴィトロジェン社 ; 10mg/ml) と 5 μ l の子牛胸腺 DNA (シグマ社 ; 10mg/ml) を添加する。この混合物を 65 $^{\circ}$ C にて 2 分間にわたってインキュベートした後、室温まで冷却する。

【 0 1 2 0 】

・ 調製した 100 μ l のハイブリダイゼーション溶液を、Cy5 と Cy3 で標識した cDNA からなるプールした各ペアに添加する (約 5 μ l) 。 40

【 0 1 2 1 】

・ ハイブリダイゼーション溶液を標識した cDNA と混合し、65 $^{\circ}$ C にて 2 分間にわたってインキュベートした後、室温まで冷却する。

【 0 1 2 2 】

・ 信頼性のある面 (チップ・ボックスの隅がうまくいく) の上にカバー・ガラス (24 \times 60mm、持ち上がらないスリップ) を置き、ハイブリダイゼーション混合物をカバー・ガラスの上にピペットで載せる。スライドを “ アレイ側 ” を下にしてカバー・ガラスの上に載せる (実際にはスライドを下げて単にカバー・ガラスの上に載せるだけではダメであり、 50

スライドが十分に濡れてカバー・ガラスが持ち上がるようになるまでスライドをカバー・ガラスの上で保持する)。カバー・ガラスがくっついた状態でスライドを素早く反転させ、カバー・ガラスがスライドの上になるようにする。

【0123】

・スライドをハイブリダイゼーション用チェンバーの中に注意深く入れる。使用するハイブリダイゼーション用チェンバーは、(湿潤な環境を維持するために)少量のDIG Easy Hyb溶液を底部に含むプラスチック製の顕微鏡用スライド・ボックスである。クリーンな無地の顕微鏡用スライド・ガラスをスライド・ボックスの2番目または3番目ごとのスライド位置に配置して、ハイブリダイゼーション用アレイを上に乗せることのできるレールまたはプラットフォームを作る。それぞれのハイブリダイゼーション用チェンバーには、(スライドを配置する方向に応じて)2枚または3枚のハイブリダイゼーション用スライドを入れることができる。蓋をボックスの上に注意深く載せた後、このボックスをプラスチック製ラップで包む。

10

【0124】

・水平な面の上でインキュベータを37 にて一晚(約16~18時間)にわたってインキュベートする。

【0125】

洗浄

【0126】

・アレイを1×SSCの中に素早く、しかしそっと浸すことによってカバー・ガラスを除去する(カバー・ガラスをそっと滑らせて取り除く; 鉗子でスライドのバー-コード端を保持する)。スライドを染色ラックの中に入れた後、新鮮な1×SSCとともに染色皿(ダイアメド社のEvergreen Scientific、カタログ番号E/S258-4100-000)の中に入れる。

20

【0127】

・すべてのアレイをハイブリダイゼーション用チェンバーから取り出し、あらかじめ温めた(50)1×SSC/0.1%SDSを含むクリーンなスライド染色ボックスの中で、場合によってはわずかに攪拌しながら15分間の洗浄を3回行なう。

【0128】

・洗浄が終了した後、スライドを2回リンスする。すなわち室温の1×SSCで(4~6回浸す)、次いで0.1×SSCでリンスする。

30

【0129】

・ホワットマン紙で内側を覆ったスライド・ボックスの中でスライドを89×gで5分間にわたって回転させる。あるいはスライドは、50mlのファルコン管の中で乾燥させ(89×gで5分間にわたって回転させ)てもよい。

【0130】

・アレイは暗所に保管すべきである。アレイは、洗浄後できるだけすぐに(少なくとも2日以内に)走査することが推奨される。本発明のハイブリダイズしたスライドは、Scana rray(登録商標)4000スキャナ(パーキン-エルマー社、ウェルズリー、マサチューセッツ州)を用い、レーザーのパワーの設定値を65~75の間で変化させ、PMTの設定値を50~55の範囲にして走査した。

40

【0131】

ArrayVision v.8.0(イメージング・リサーチ社)を用いてTIFF画像を定量化した。次に、規格化のためにデータと画像をGeneTraffic(登録商標)(ロビオン・インフォーマティクス社)にロードした。規格化のためにGeneTraffic(登録商標)で“Lowess、サブグリッド”法を選択した。規格化された強度値をGeneTraffic(登録商標)データベースからダウンロードした。S/Nの平均値は、それぞれのタイプのスライドに関してExcelで計算した。各複製の標準偏差は、それぞれのタイプのスライドに関してExcelで計算した。すべてのアレイで各スポットが2回現われるため、1つのアレイしか試験しなかった場合でさえ2つの複製が存在していた。そこで両者の間のS/Nの標準偏差を計算した。より多くのアレイを用いる場合には、S/Nの標準偏差は、すべての複製アレイと複製スポット(1つの

50

アレイに2つ)で計算した。

【0132】

コーニング・ライフ・サイエンス社のUltraGapsスライドに関する信号対雑音比も測定した。その手続きは上に説明したのと同じだが、より少量(80 μ l)のハイブリダイゼーション用緩衝液を使用した点が異なっている。また、これらのスライドにとって最適になるように決めた別の設定値での走査も行なった。具体的には、使用するレーザー出力の設定値を95~100の間で変え、PMTの設定値を70~80の範囲にした。

【0133】

精度レベル

【0134】

Cy5チャンネルとCy3チャンネルの両方で同じRNAサンプルを標識したアレイを用い、精度レベルの測定を実施した。理想的には、スライド上のすべてのデータ点(M)に関して規格化したCy3の信号強度と規格化したCy5の信号強度を対数-対数プロットした散布図において、すべてのデータ点は、原点を通る45°の直線上に正確に載ることになる。このプロットから、Z倍上とZ倍下の境界を外れたデータ点の(N)数を調べた。コンシステンシー・レベル、または特異性レベル、または精度レベルは、以下のように定義される：

$$Z\text{倍精度レベル}(\%) = 100 \times (1 - (N/M))$$

【0135】

機能化した基板の実施例

【0136】

ゾル-ゲル溶液

【0137】

40.7部のテトラエトキシシラン(デグサ社(パーシパニー、ニュージャージー州)が製造しているDinasil A)と、14.1部の脱イオン水と、44.8部のエタノールと、0.4部の塩酸(37%)を65℃にて24時間にわたって反応させて前駆体溶液を調製した。次にこの溶液を冷却し、使用するときまで冷凍庫の中に保管した。

【0138】

シラン溶液

【0139】

2部のアミノプロピルトリエトキシシラン(A0750、ユナイテッド・ケミカル・テクノロジーズ社、ブリストル、ペンシルベニア州)を98部のエタノール/水(95/5(w/w))混合物と混合することによって溶液を調製した。この溶液は使用の直前に調製し、使用前に少なくとも5分間放置した。

【0140】

実施例1

この実施例では、多孔性材料としてのePTFEから出発して得られる本発明の高機能微孔性基板について説明する。本発明の方法と製品の驚くべき利点は、処理していない膜と比べて処理した膜では著しい改善が見られることから明らかになる。

【0141】

材料のタイプ：ePTFE

【0142】

膜

【0143】

アメリカ合衆国特許第4,187,390号の教えに従い、延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)膜を作製した。このePTFE膜は厚さが約74 μ mであり、バブル・ポイントが約0.434MPa(63psi)であった。この膜の表面に水滴が並ぶことから疎水性であることが確認された。

【0144】

ゾル-ゲル処理

【0145】

10

20

30

40

50

取り扱いを容易にするためePTFE膜を刺繍用円形枠の上に載せた後、ゾル-ゲル溶液を同じ重量のエタノールで希釈することによって得られた溶液にこの膜を浸すことにより、この膜を処理した。5分後、膜を取り出し、脱イオン水に5分間浸した。リンス・ステップの後、膜を風乾させ、次いで5分間にわたって150 に加熱した。この段階で膜は親水性になり、膜を水で容易に湿らせることができる。

【0146】

アミノシラン処理

【0147】

この親水性の膜をアミノシランでさらに処理し、微細構造上に機能性アミノ基を供給した。これは、膜を5分間にわたってシラン溶液に浸した後、イソプロピルアルコール (IPA) の中で2分間にわたってリンスし、膜を10分間にわたって110 に加熱することによって実現した。膜をシラン溶液に5分間浸し、IPAの中で2分間リンスし、10分間にわたって110 に加熱するという同じステップを繰り返すことにより、膜を再びシラン処理した。

10

【0148】

最終的な膜

【0149】

得られた機能化されたePTFE膜は厚さが34 μm であった。ニンヒドリン・アッセイにより、アミンの密度は416.4ナノモル/ cm^2 (すなわち121435ナノモル/ cm^3) であることがわかった。機能化されたePTFE膜の自己蛍光の測定値は、635nmで21.2RFU、532nmで30.4RFUであった。比較のため、同じだが処理していないePTFE膜に機能性アミノ基が存在しているかどうかをニンヒドリン・アッセイで調べたところ、アミノ基は検出されなかった。

20

【0150】

実施例2

この実施例でも、多孔性材料としてのePTFEから出発して得られる本発明の高機能微孔性基板について説明する。実施例1を繰り返したが、ゾル-ゲルの代わりにPVOHにした点が異なっていた。ここでも、本発明の製品は、実施例1で説明したのと同じタイプの未処理膜よりも性能がはるかに優れていた。

【0151】

材料のタイプ : ePTFE

【0152】

PVOH処理

【0153】

取り扱いを容易にするためePTFE膜を刺繍用円形枠の上に載せた後、この膜をIPAに5分間にわたって浸し、次いで脱イオン水に2分間にわたって浸し、その後5質量%のポリビニルアルコール (P1180、スペクトラム・ケミカルズ社、ガーデナ、カリフォルニア州) に10分間にわたって浸すことにより、実施例1で用いたePTFE膜を処理した。この膜を取り出し、10分間にわたって脱イオン水に浸した。リンス・ステップの後、膜を周囲条件下で一晩にわたって風乾させた後、10分間にわたって110 に加熱した。この段階で膜は親水性になり、膜を水で容易に湿らせることができる。

30

【0154】

アミノシラン処理

【0155】

この親水性膜をアミノシランでさらに処理して微細構造上に機能性アミノ基を供給した。これは、膜をシラン溶液に5分間にわたって浸し、イソプロピルアルコール (IPA) の中で2分間にわたってリンスし、10分間にわたって110 に加熱することによって実現した。膜をシラン溶液に5分間浸し、IPAの中で2分間リンスし、10分間にわたって110 に加熱するという同じステップを繰り返すことにより、膜を再びシラン処理した。

40

【0156】

最終的な膜

【0157】

50

得られた膜をニンヒドリン・アッセイを利用してテストした。機能性アミノ基の平均密度は、118.5ナノモル/cm²であることがわかった。

【0158】

実施例3

この実施例では、多孔性材料としての微孔性ナイロンから出発して得られる本発明の高機能微孔性基板について説明する。処理した膜では処理していない膜と比べて著しい改善が見られることから、本発明の方法と製品の驚くべき利点は明らかである。

【0159】

材料のタイプ：微孔性ナイロン

【0160】

膜

【0161】

市販の表面処理した微孔性ナイロン膜 (Hybond N+) をアマーシャム・バイオサイエンス社 (ピスカタウェイ、ニュージャージー州) から入手した。

【0162】

この膜は厚さが約150 μmであり、バブル・ポイントが約12.5psiであった。ニンヒドリン・アッセイにより、販売者から得られた膜の機能性アミノ基の密度は9.7ナノモル/cm² (すなわち638ナノモル/cm³) であることがわかった。

【0163】

ゾル-ゲル処理とアミノシラン処理

【0164】

実施例1に概略を説明したステップを利用してこの膜を機能化した。

【0165】

最終的な膜

【0166】

得られた膜は厚さが約147 μmであり、官能基の密度は1093ナノモル/cm² (74199ナノモル/cm³) であった。機能性アミノ基の密度のこの著しい増加は、本発明の方法の結果であった。

【0167】

実施例4

この実施例では、多孔性材料としての多孔性超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) から出発して得られる本発明の高機能微孔性基板について説明する。処理した膜では処理していない膜と比べて著しい改善が見られることから、本発明の方法と製品の驚くべき利点は明らかである。

【0168】

材料のタイプ：多孔性UHMWPE

【0169】

膜

【0170】

市販の多孔性UHMWPEシート (Porex 9619) をポレックス社 (フェアバーン、ジョージア州) から入手した。このシートは厚さが約1524 μmであり、バブル・ポイントは約0.009MPa (1.3psi) であることがわかった。

【0171】

ゾル-ゲル処理とアミノシラン処理

【0172】

実施例1に概略を説明したステップを利用してこの多孔性シートを機能化した。

【0173】

最終的な膜

【0174】

得られたシートは厚さが約1524 μmであり、官能基の密度は426.9ナノモル/cm² (2801ナ

10

20

30

40

50

ノモル/cm³)であった。機能化したこのUHMWPEシートの自己蛍光の測定値は、635nmで31.1RFU、532nmで107.2RFUであった。比較のため、ニンヒドリン・アッセイを利用して市販の多孔性UHMWPEシートに機能性アミノ基が存在しているかどうかを調べた。このアッセイから、膜の機能性アミノ基の密度は1.1ナノモル/cm²(すなわち7.0ナノモル/cm³)であることがわかった。市販のUHMWPEシートの自己蛍光の測定値は、635nmで23.9RFU、532nmで48.7RFUであった。自己蛍光のレベルを著しく増大させることなく機能性アミノ基の密度がこのように著しく増加したのは、本発明の方法が原因である。

【0175】

実施例5

この実施例では、多孔性材料としての微孔性ポリプロピレンから出発して得られる本発明の高機能微孔性基板について説明する。処理した微孔性ポリプロピレン膜では処理していない微孔性ポリプロピレン膜と比べて著しい改善が見られることから、本発明の方法と製品の驚くべき利点は明らかである。

【0176】

材料のタイプ：微孔性ポリプロピレン

【0177】

膜

【0178】

市販の微孔性ポリプロピレン膜(Polysep、0.1μm、カタログ番号M01WP320F5)をGEオスモニクス社(ウォータータウン、マサチューセッツ州)から入手した。この膜は厚さが約86μmであり、バブル・ポイントは約0.135MPa(19.6psi)であることがわかった。

【0179】

ゾル-ゲル処理とアミノシラン処理

【0180】

実施例1に概略を説明したステップを利用してこの膜を機能化した。

【0181】

最終的な膜

【0182】

得られた膜は厚さが約74μmであり、官能基の密度は今度は486.8ナノモル/cm²(66087ナノモル/cm³)であった。比較のため、ニンヒドリン・アッセイを利用して市販の微孔性ポリプロピレン膜に機能性アミノ基が存在しているかどうかを調べた。このアッセイでは、この膜に機能性アミノ基は検出できなかった。

【0183】

実施例6

この実施例では、多孔性材料としての多孔性PTFEから出発して得られる本発明の高機能微孔性基板について説明する。処理した膜では処理していない膜と比べて著しい改善が見られることから、本発明の方法と製品の驚くべき利点は明らかである。

【0184】

材料のタイプ：多孔性PTFE

【0185】

膜

【0186】

市販の多孔性ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)膜(Mupor PM17Y)をボレックス社(フェアバン、ジョージア州)から入手した。この膜は厚さが約152μmであり、バブル・ポイントは約0.044MPa(6.4psi)であることがわかった。

【0187】

ゾル-ゲル処理とアミノシラン処理

【0188】

実施例1に概略を説明したステップを利用してこの多孔性膜を機能化した。

【0189】

10

20

30

40

50

最終的な膜

【0190】

得られた膜は厚さが約152 μm であり、官能基の密度は今度は78.6ナノモル/cm² (5158ナノモル/cm³)であった。処理していない膜では機能性アミノ基が存在していることが予想されなかったため、ニンヒドリン・アッセイを実施しなかった。

【0191】

実施例7

この実施例では、多孔性材料としての微孔性ポリフッ化ビニリデンから出発して得られる本発明の高機能微孔性基板について説明する。処理した膜では処理していない膜と比べて著しい改善が見られることから、本発明の方法と製品の驚くべき利点は明らかである。

【0192】

材料のタイプ：微孔性ポリフッ化ビニリデン膜

【0193】

膜

【0194】

市販の微孔性ポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF-Plus Transfer膜、0.22 μm 、カタログ番号PV2HY320F5) をGEオスモニクス社 (ウォータータウン、マサチューセッツ州) から入手した。この膜は厚さが約152 μm であり、パブル・ポイントは約0.135MPa (19.6psi) であることがわかった。

【0195】

ゾル-ゲル処理とアミノシラン処理

【0196】

実施例1に概略を説明したステップを利用してこの膜を機能化した。

【0197】

最終的な膜

【0198】

得られた膜は厚さが約154 μm であり、官能基の密度は今度は420.6ナノモル/cm² (27146ナノモル/cm³)であった。機能化したこのPVDF膜の自己蛍光の測定値は、635nmで173.4RFU、532nmで526.5RFUであった。処理していない膜では機能性アミノ基が存在していることが予想されなかったため、ニンヒドリン・アッセイを実施しなかった。未処理のPVDF膜の自己蛍光の測定値は、635nmで36.6RFU、532nmで58.2RFUであった。

【0199】

実施例8

この実施例では、多孔性材料としての多孔性ガラスから出発して得られる本発明の高機能微孔性基板について説明する。この実施例では、基板としての多孔性ガラスの利用について説明する。処理した基板では処理していない基板と比べて著しい改善が見られることから、本発明の方法と製品の驚くべき利点は明らかである。

【0200】

材料のタイプ：多孔性ガラス

【0201】

基板

【0202】

Vycor 7930多孔性ガラスから作られた25.4mm x 76.2mm x 厚さ1mmの長方形のスライドをアドバンスト・ガラス&セラミック社 (ホールデン、マサチューセッツ州) から入手した。

【0203】

アミノシラン処理

【0204】

従来技術の教えに従い、実施例1に具体的に示したシラン処理ステップだけを利用して多孔性スライド・ガラスを機能化した。

10

20

30

40

50

【0205】

ゾル-ゲル処理とアミノシラン処理

【0206】

実施例1に概略を説明したゾル-ゲル・ステップとアミノシラン・ステップの両方を利用し、多孔性スライド・ガラスの別のサンプルも機能化した。

【0207】

最終的な基板

【0208】

シラン処理だけを行なったスライドは、アミノ基の密度が1169.6ナノモル/cm²（すなわち12118ナノモル/cm³）であり、自己蛍光のレベルは、635nmで23.9RFU、532nmで93.7RFUであった。比較のため、実施例1に概略を示した本発明の方法（すなわちゾル-ゲルとアミノシランの両方で処理する）を利用して機能化した多孔性スライド・ガラスは、アミノ基の密度が1311.7ナノモル/cm²（すなわち13590ナノモル/cm³）であった。このスライドの自己蛍光は、635nmで36.3RFU、532nmで332RFUであった。処理していない基板では機能性アミノ基が存在していることが予想されなかったため、ニンヒドリン・アッセイを実施しなかった。未処理の多孔性スライド・ガラスの自己蛍光の測定値は、635nmで23.1RFU、532nmで39.4RFUであった。

10

【0209】

マイクロアレイ用複合基板の実施例

【0210】

比較例

20

【0211】

市販のマイクロアレイ用スライドを入手し、ニンヒドリン・アッセイを利用して機能性アミノ基の密度を分析するとともに自己蛍光のレベルを分析した。コーニング社、テレケム社、エリー・サイエンティフィック社からのスライドはすべて、アミノ官能基表面を有する非多孔性スライド・ガラスである。比較用のパル社のVivid（登録商標）マイクロアレイ用スライドは、スライド・ガラスに微孔性ナイロン・ポリマー膜を接着剤で接合したものである。市販のこれらマイクロアレイ用スライドでの結果を表1にまとめてある。

【0212】

【表2】

30

表1

名称	供給元	アミノ基の密度 (ナノモル/cm ²)	635nmでの 平均RFU	532nmでの 平均RFU
UltraGapsスライド	コーニング・ライフ・サイエンシーズ社	4.8	21	23.4
Array-It Superamine 2スライド	テレケム・ インターナショナル社	0.9	21	26.5
アミノ官能基スライド	エリー・サイエン ティフィック社	1.0	-	-
Vividマイクロ アレイ用スライド	パル社	6.5	33.5	176

40

【0213】

実施例9

ePTFE膜をスライド・ガラスに接合した後、機能化した。

【0214】

あらかじめクリーンにした無地の顕微鏡用スライド・ガラス（VWR社、カタログ番号483

50

00) を上に説明した溶液の中に5分間にわたって浸して処理した後、IPAの中で2分間にわたってリンスし、次いで10分間にわたって110 °Cに加熱した。次に、シラン処理したこのスライドをePTFE膜(厚さが74 μm、バブル・ポイントが約0.434MPa(63psi)、フィブリルの平均長が1.2 μm)に接合した。接合は、メチルエチルケトンの中にTRABOND FDA2エポキシ接着剤(トラ-コン社、ベッドフォード、マサチューセッツ州)が40重量%含まれた溶液を、エア-ブラシ・キット(マクマスター-カー社、カタログ番号9546T13)を用い、シラン処理したスライド・ガラスの表面にスプレーすることによって実現した。

【0215】

刺繍用円形枠に固定したePTFE膜の上に、接着剤で処理したスライドを置いた。次に、110 °Cに設定した強制通風炉の中で接着剤を60分間かけて硬化させた。硬化の後、かみそりの刃を用いて過剰なePTFE膜をスライド・ガラスから切り落とした。得られた複合スライドは、表面にePTFE膜の層が付着していた。膜の表面は疎水性であった。ニンヒドリン・アッセイにより、機能性アミノ基が存在していないことがわかった。膜の表面の自己蛍光は、635nmで約21RFU、532nmで約22RFUであることが予想された。

【0216】

次に、複合スライドをスライド・ラック(ホイートン社、カタログ番号900403)の中に置き、スライドのゾル-ゲル処理を、ゾル-ゲル溶液を同じ重量のエタノールで希釈した溶液にスライドを浸すことによって実施した。スライドを5分間浸した後に取り出し、脱イオン水の中で5分間リンスした。リンスしたスライドを風乾させた後、5分間にわたって150 °Cに加熱した。この段階でePTFE膜は非常に親水性になっていた。そのことは、このePTFE膜が水に容易に濡れるという事実によって証明される。ゾル-ゲル処理したスライドをシラン溶液の中に5分間にわたって浸した後、IPAの中で2分間にわたってリンスし、次いで110 °Cに設定した炉の中で10分間にわたって加熱することによってさらに処理した。この段階でスライドのePTFE膜の表面にアミノ基が存在していた。ニンヒドリン・アッセイから、機能性アミノ基の密度は338.6ナノモル/cm²であることがわかった。スライドの膜の表面の自己蛍光レベルの測定値は、635nmで22.7RFU、532nmで191.2RFUであった。

【0217】

これらの結果を表1に示した従来の結果と比べると、本発明により、自己蛍光のレベルを市販製品に基づく多孔性ポリマー膜と同等に維持しつつ、機能性アミノ基の密度が著しく大きいマイクロアレイ用スライドが提供されることがわかる。

【0218】

実施例10

あらかじめクリーンにした無地の顕微鏡用スライド・ガラス(VWR社、カタログ番号48300)をスライドをアセトンでぬぐってきれいにした後、ePTFE膜(厚さが74 μm、バブル・ポイントが約0.434MPa(63psi)、フィブリルの平均長が1.2 μm)に接合した。接合は、メチルエチルケトンの中にTRABOND FDA2エポキシ接着剤(トラ-コン社、ベッドフォード、マサチューセッツ州)が40重量%とエポキシ固体の1.8%の3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシラン(G6720、ユナイテッド・ケミカル・テクノロジー社、プリストル、ペンシルヴェニア州)が含まれた溶液を、エア-ブラシ・キット(マクマスター-カー社、カタログ番号9546T13)を用い、シラン処理したスライド・ガラスの表面に手でスプレーした後、接着剤で処理したこのスライドを、刺繍用円形枠に取り付けたePTFE膜の上に置き、80 °Cの空気循環炉の中で18時間にわたって接着剤を硬化させることによって行なった。硬化の後、かみそりの刃を手にとって過剰なePTFE膜をスライド・ガラスから切り落とした。得られた複合スライドは、表面にePTFE膜の層が付着していた。膜の表面は疎水性であった。ニンヒドリン・アッセイにより、機能性アミノ基が存在していないことがわかった。膜の表面の自己蛍光は、635nmで約21RFU、532nmで約22RFUであることが予想された。

【0219】

次に複合スライドをスライド・ラック(ホイートン社、カタログ番号900403)の中に置き、スライドのゾル-ゲル処理を、ゾル-ゲル溶液を同じ重量のエタノールで希釈した溶液

に浸すことによって実施した。スライドを5分間浸した後に取り出し、脱イオン水の中で5分間リンスした。リンスしたスライドを風乾させた後、5分間にわたって150 に加熱した。この段階でePTFE膜は非常に親水性になっており、水に容易に濡れた。ゾル-ゲル処理したスライドをシラン溶液の中に5分間にわたって浸した後、IPAの中で2分間にわたってリンスし、次いで10分間にわたって110 に加熱することによってさらに処理した。この段階でスライド上のePTFE膜の表面の自己蛍光レベルの測定値は、635nmで27.4RFU、532nmで350.8RFUであった。

【0220】

実施例11

実施例10で説明したマイクロアレイ用複合スライドを2005年にUHNで処理し、信号対雑音比の平均値を明らかにした。比較のため、UltraGapsマイクロアレイ用スライド（コーニング社）もそのときに処理した。Vividマイクロアレイ用スライド（バル社）を用いて同じプロトコルで同様の比較を試みた。しかしこの明細書で用いる接触印刷法を利用して完全なアレイをこれらのスライドに印刷することはできなかった。

10

【0221】

周囲のオゾン・レベルがCy5チャネルの信号の安定性に大きな影響を与えることはよく知られている。夏の数ヶ月に測定する従来のサンプルは、寒い数ヶ月に測定する同じサンプルよりも信号対雑音比はるかに低い。すでに説明した本発明のサンプル（実施例9）と、この実施例の従来のサンプルも2005年3月にテストしていた。

20

【0222】

信号対雑音比を表2に示す。

【0223】

【表3】

表2

スライドの説明	使用したスライドの数	信号対雑音比の 平均値、Cy5	信号対雑音比の 平均値、Cy3
12月に試験した 本発明のサンプル	2	205.8	116.1
12月に試験した UltraGapsサンプル	5	110.1	81.35
3月に試験した 本発明のサンプル	2	191.5	93.7
3月にテストした UltraGapsサンプル	2	87.8	40.2

30

【0224】

このデータから、本発明の製品は、同じ時期にテストした従来の製品と比べると信号対雑音比が著しく大きいことがわかる。このデータから、スライドの性能に対する季節の影響もわかる。本発明のマイクロアレイ用基板からのCy5信号は、従来の基板よりも季節の影響はるかに少ない。本発明のサンプルは約7%の変動を示すのに対し、従来のサンプルは約25%の変動を示す。したがって本発明のサンプルは、（上記の条件下での変動が20%未満、好ましくは10%未満と定義される）安定性が向上している。

40

【0225】

図3(A)と図3(B)は、2005年12月にテストしたこの実施例のそれぞれ本発明のサンプルと従来（UltraGaps）のサンプルの散布図を示している。これらの図には、いろいろな精度レベルを計算する元になった2倍の境界、1.5倍の境界、1.2倍の境界も示してある。精度レベルの値を表3にまとめてある。

50

【 0 2 2 6 】

【 表 4 】

表 3

スライドの説明	テストした スライドの数	P ₂ 、2倍精度 レベル、%	P _{1.5} 、1.5倍精度 レベル、%	P _{1.2} 、1.2倍精度 レベル、%
本発明のサンプル	2	100	99.99	99.92
従来サンプル	5	99.88	98.88	92.73

10

【 0 2 2 7 】

データから、本発明のマイクロアレイ用スライドでは、倍数の境界を小さくするほど精度レベルが著しく大きくなることがわかる。すなわち倍数の境界をきつくしていくにつれ、本発明の製品の精度レベルは極めて高い精度レベルを維持するのに対し、従来製品の精度は著しく低下することがわかる。したがって本発明の基板は、所定のマイクロアレイ実験に関して従来基板よりも有用なデータを生み出す。また、本発明の基板では精度レベルがより高いため、マイクロアレイのデータの信頼性がより高くなり、その結果としてテストする必要な複製の数がより少なくなる。

【 0 2 2 8 】

実施例 1 2

実施例9に記載した手続きに従って用意した別のマイクロアレイ用複合スライドを2005年3月にUHNで処理し、信号対雑音比を調べた。この場合、マウス・ゲノムに関する7407クロンのセットをプローブとして使用した。比較のため、UltraGapsマイクロアレイ用スライド（コーニング社）も同時に処理した。信号対雑音比を調べ、その結果を表4にまとめている。

20

【 0 2 2 9 】

【 表 5 】

表 4

スライドの説明	使用したスライドの数	信号対雑音比の 平均値、Cy5	信号対雑音比の 平均値、Cy3
本発明のサンプル	2	75.8	54.5
UltraGapsサンプル	2	34.5	34.1

30

【 0 2 3 0 】

本発明のマイクロアレイは、従来マイクロアレイと比較して両方の波長ではるかに大きな信号対雑音比を示した。

【 0 2 3 1 】

この実施例の本発明のサンプルと従来サンプル（UltraGaps）について規格化したCy5の信号強度とCy3の信号強度の散布図も作った。この散布図から2倍の境界、1.5倍の境界、1.2倍の境界を計算した。精度レベルの値を表5にまとめている。

40

【 0 2 3 2 】

【表 6】

表 5

スライドの説明	テストした スライドの数	P ₂ 、2倍精度 レベル、%	P _{1.5} 、1.5倍精度 レベル、%	P _{1.2} 、1.2倍精度 レベル、%
本発明のサンプル	2	99.98	99.91	97.87
UltraGapsサンプル	2	99.47	96.09	73.12

【0233】

10

このデータから、本発明のマイクロアレイ用スライドでは、倍数の境界を小さくするほど精度レベルが著しく大きくなるのがわかる。すなわち倍数の境界をきつくしていくにつれ、本発明の製品の精度レベルは極めて高い精度レベルを維持するのに対し、従来の製品の精度は著しく低下することがわかる。したがって本発明の基板は、所定のマイクロアレイ実験に関して従来の基板よりも有用なデータを生み出す。また、本発明の基板では精度レベルがより高いため、マイクロアレイのデータの信頼性がより高くなり、その結果としてテストする必要な複製の数がより少なくなる。

【0234】

実施例 13

実施例9に記載した手続きに従って用意したマイクロアレイ用複合スライドを2005年6月にUHNで処理し、信号対雑音比を調べた。この場合、ヒト・ゲノムからの19008クローンのセットをプローブとして用いた。比較のため、UltraGapsマイクロアレイ用スライド（コーニング社）も同時に処理した。信号の安定性を調べるため、同じスライドを連日走査した。信号対雑音比を調べ、その結果を表6にまとめてある。

20

【0235】

【表 7】

表 6

	本発明の サンプル	本発明の サンプル	UltraGaps サンプル	UltraGaps サンプル
染料のタイプ	Cy5	Cy3	Cy5	Cy3
テストした スライドの数	3	3	3	3
1日目の平均S/N比	88.9	54.8	11.5	25.6
2日目の平均S/N比	58.3	38.1	1.5	20.6
3日目の平均S/N比	53.3	30.7	1.05	20.9

30

【0236】

40

データから、本発明のマイクロアレイ用基板は、より長期間にわたってCy5信号を維持する上で著しく有効であることがわかる。

【図面の簡単な説明】

【0237】

【図 1】本発明の一実施態様の一端の横断面図である。

【図 2 A】本発明の一実施態様によるマイクロアレイの微孔性表面を機能化する前の走査電子顕微鏡写真である。

【図 2 B】本発明の一実施態様によるマイクロアレイの微孔性表面を機能化した後の走査電子顕微鏡写真である。

【図 2 C】本発明の一実施態様によるマイクロアレイの微孔性表面を機能化した後の走査

50

電子顕微鏡写真である。

【図3A】本発明の一実施態様による基板を用いたマイクロアレイの規格化したCy3信号強度とCy5の信号強度の散布図である。

【図3B】従来の基板を用いたマイクロアレイの規格化したCy3信号強度とCy5の信号強度の散布図である。

【図1】

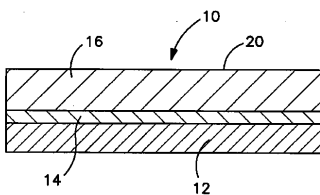


FIG. 1

【図2(B)】

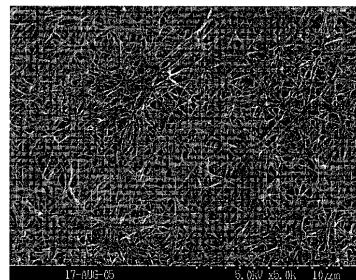


FIG. 2(B)

【図2(A)】

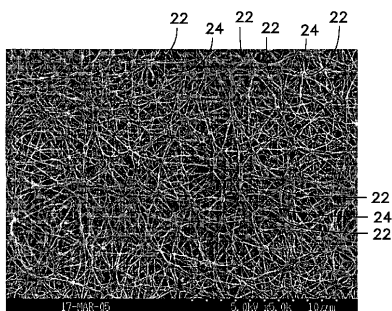


FIG. 2(A)

【図2(C)】

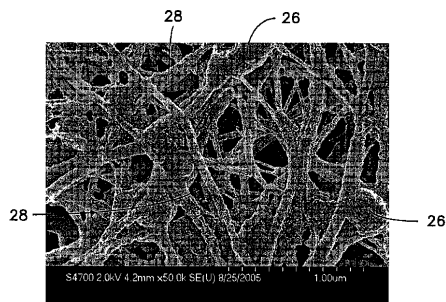


FIG. 2(C)

【 図 3 A 】

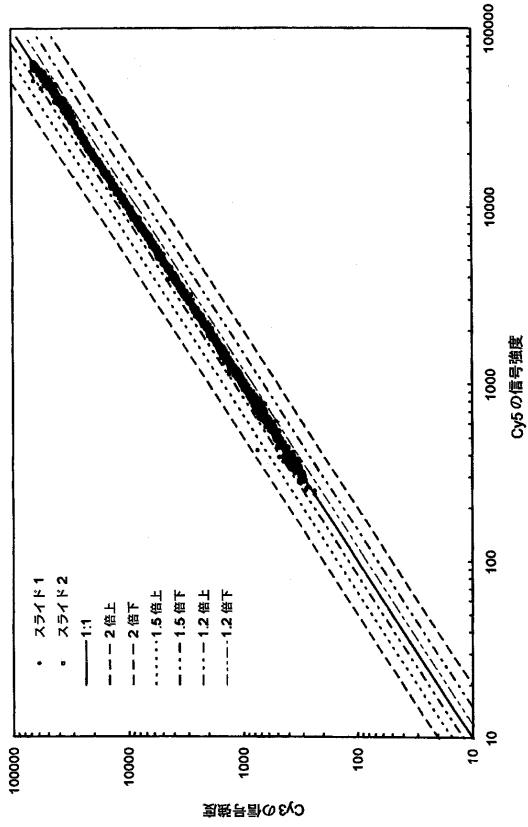


図 3A

【 図 3 B 】

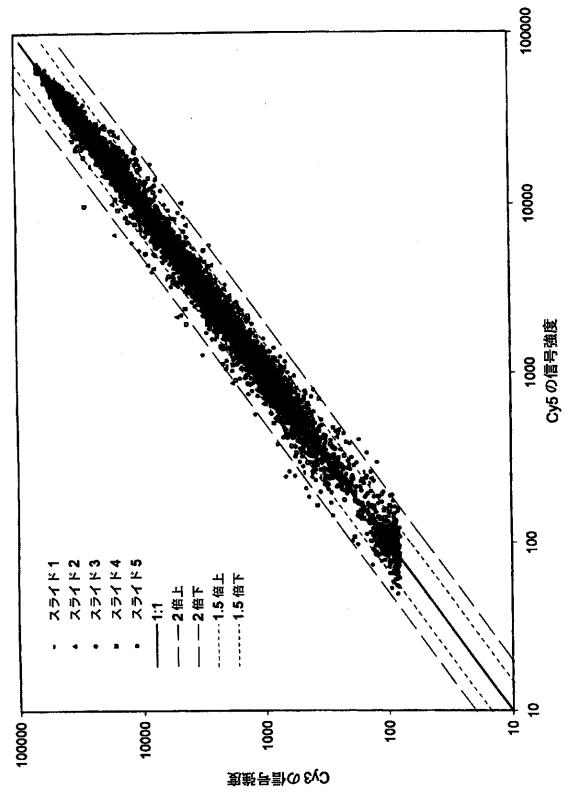


図 3B

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/09103
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12M 1/34(2006.01) USPC: 435/287.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/287.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2003/0049435 A1 (HADDAD et al.) 13 March 2003 (13.03.2003), see entire patent	1-35, 38-91, 94-101
Y	US 2005/0149175 A1 (HUNTER et al.) 07 July 2005 (07.07.2005), see entire document	13, 38-61, 67, 70-75, 84-91, 94-95
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 17 August 2008 (17.08.2008)		Date of mailing of the international search report 09 SEP 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Nelson Yang Telephone No. (703) 308-0198 Jean Procter Paralegal Specialist

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/09103

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos. 1-35,38-91 and 94-101
- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/US07/09103**BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1-35, 38-91, 94-101, drawn to a substrate.

Group 2, claim(s) 36-37, 93, drawn to a method of creating a functionalized article.

Group 3, claim(s) 92, drawn to a method for measuring biomolecules.

The inventions listed as Groups 1-3 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The application contains claims to more than one of the combinations of categories of inventions as set forth by 37 CFR 1.475.

According to 37 CFR 1.475 regarding unity of invention:

(a) An international and a national stage application shall relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept ("requirement of unity of invention"). Where a group of inventions is claimed in an application, the requirement of unity of invention shall be fulfilled only when there is a technical relationship among those inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. The expression "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

The inventions of groups 1-3 are linked together to form a single general inventive concept by the apparatus of group 1. However, the invention is known in the art as shown by Haddad et al. [US 2003/0049435], who teaches azlactone-functional hydrogels (abstract) comprising primers that act as an adhesion-promoting interlayer (para. 0020), and which may constitute embossed or microstructured films (para. 0033). Therefore the inventions do not form a general inventive concept, as they do not share a common special technical feature over the prior art.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100128495

弁理士 出野 知

(74)代理人 100093665

弁理士 蛸谷 厚志

(72)発明者 ドウッタ, アニタ

アメリカ合衆国, デラウェア 19808, ウィルミントン, ブラック ウィロウ コート 4

(72)発明者 フラナリー, ヘイディ

アメリカ合衆国, メリーランド 21009, アピンドン, グレンロス ドライブ 1928

(72)発明者 モーティマー, ウィリアム ピー.

アメリカ合衆国, メリーランド 21901, ノート イースト, ウルマー レーン 21