



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103180735 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 31

(21) 申请号 201280003445. 4

C12N 15/09 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 03. 27

G01N 37/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

2011-070934 2011. 03. 28 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 04. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/057996 2012. 03. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/133450 JA 2012. 10. 04

(73) 专利权人 株式会社 NTT 都科摩

地址 日本东京都

专利权人 国立大学法人东京大学

(72) 发明人 桧山聪 栗林香织 尾上弘晃

竹内昌治

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

11127

代理人 丁香兰 褚瑶杨

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

C12M 1/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6559474 B1, 2003. 05. 06,

US 2010/0108519 A1, 2010. 05. 06,

CN 1576841 A, 2005. 02. 09,

K. Kuribayashi. SEQUENTIAL PARYLENE

LIFT-OFF PROCESS FOR SELECTIVE PATTERNING OF BIOLOGICAL MATERIALS. 《MEMS》. 2007, 第 21-25 页.

Christine P. Tan. Nanoscale

Resolution, Multicomponent Biomolecular

Arrays Generated By Aligned Printing With Parylene Peel-Off. 《Nano letters》. 2010, 第 10 卷第 719-725 页.

B. Ilic. Topographical Patterning of Chemically Sensitive Biological Materials Using a Polymer-Based Dry Lift Off. 《Biomedical Microdevices》. 2000, 第 317-322 页.

审查员 刘迎鸣

权利要求书2页 说明书8页 附图6页

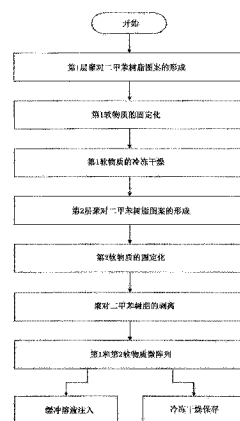
(54) 发明名称

软物质的微阵列制作方法

(57) 摘要

本发明涉及一种制作二种以上软物质的微阵列的方法,其是使用聚对二甲苯树脂剥离法制作二种以上软物质的微阵列的方法,该方法具有下述工序:在基板上蒸镀第1层聚对二甲苯树脂,在第1层聚对二甲苯树脂上形成第1微图案,导入含有第1软物质的溶液,从而得到形成了第1微阵列的基板,接着对第1软物质进行冷冻干燥,由此得到冷冻干燥后的第1软物质的微阵列化基板;在所述的冷冻干燥后的第1软物质的微阵列化基板上蒸镀第2层聚对二甲苯树脂,将第1层和第2层的聚对二甲苯树脂贯穿,在与第1微图案不同的位置形成第2微图案,导入含有第2软物质的溶液,从而在基板上形成第2微阵列;将所述第1层

和第2层的聚对二甲苯树脂剥离,由此在同一基板上形成第1以及第2软物质的微阵列。



1. 一种二种以上软物质的微阵列制作方法,其是制作二种以上软物质的微阵列的方法,其特征在于:

在基板上,

蒸镀第 1 层聚对二甲苯树脂,

在所述聚对二甲苯树脂上形成第 1 微图案,

导入第 1 软物质溶液,从而在所述基板表面上形成第 1 微阵列,

对所述第 1 软物质进行冷冻干燥,形成第 1 软物质的微阵列化基板,

在所述第 1 软物质的微阵列化基板上,

通过蒸镀来层积第 2 层聚对二甲苯树脂,

将所述第 1 层和第 2 层的聚对二甲苯树脂贯穿,在与第 1 微图案不同的位置形成第 2 微图案,

导入第 2 软物质,从而在所述基板表面上形成第 2 微阵列,

将第 1 层和第 2 层的聚对二甲苯树脂同时剥离,

由此形成所述第 1 以及所述第 2 软物质的微阵列化基板,

在所述第 1 以及所述第 2 软物质的微阵列化基板上导入缓冲溶液,从而将所述第 1 软物质溶解,

所述第 1 软物质以及所述第 2 软物质分别为由来自生物或来自非生物分子形成的软物质。

2. 一种二种以上软物质的微阵列制作方法,其是制作二种以上软物质的微阵列的方法,其特征在于:

在基板上,

蒸镀第 1 层聚对二甲苯树脂,

在所述聚对二甲苯树脂上形成第 1 微图案,

导入第 1 软物质溶液,从而在所述基板表面上形成第 1 微阵列,

将所述第 1 层聚对二甲苯树脂从形成了所述第 1 微阵列的基板上剥离,

对第 1 软物质进行冷冻干燥,形成第 1 软物质的微阵列化基板,

在所述第 1 软物质的微阵列化基板上,

通过蒸镀来层积第 2 层聚对二甲苯树脂,

在所述第 2 层聚对二甲苯树脂上,在与第 1 微图案不同的位置形成第 2 微图案,

导入第 2 软物质溶液,在所述基板表面上形成第 2 微阵列,

将所述第 2 层聚对二甲苯树脂剥离,

由此形成所述第 1 以及所述第 2 软物质的微阵列化基板,

在所述第 1 以及所述第 2 软物质的微阵列化基板上导入缓冲溶液,从而将所述第 1 软物质溶解,

所述第 1 软物质以及所述第 2 软物质分别为由来自生物或来自非生物分子形成的软物质。

3. 一种二种以上软物质的微阵列制作方法,其是制作二种以上软物质的微阵列的方法,其特征在于:

在基板上,

蒸镀第 1 层聚对二甲苯树脂，
在所述聚对二甲苯树脂上形成第 1 微图案，
导入第 1 软物质溶液，从而在所述基板表面上形成第 1 微阵列，
对第 1 软物质进行冷冻干燥，形成第 1 软物质的微阵列化基板，
将所述第 1 层聚对二甲苯树脂从形成了所述第 1 微阵列的基板上剥离，
在所述第 1 软物质的微阵列化基板上，
通过蒸镀来层积第 2 层聚对二甲苯树脂，
在所述第 2 层聚对二甲苯树脂上，在与第 1 微图案不同的位置形成第 2 微图案，
导入第 2 软物质溶液，在所述基板表面上形成第 2 微阵列，
将所述第 2 层聚对二甲苯树脂剥离，
由此形成所述第 1 以及所述第 2 软物质的微阵列化基板，
在所述第 1 以及所述第 2 软物质的微阵列化基板上导入缓冲溶液，从而将所述第 1 软物质溶解，

所述第 1 软物质以及所述第 2 软物质分别为由来自生物或来自非生物分子形成的软物质。

4. 如权利要求 1～3 任一项所述的二种以上软物质的微阵列制作方法，其特征在于，进一步，在所述第 1 和第 2 软物质的微阵列化基板上，蒸镀第 3 层聚对二甲苯树脂，从而形成第 3 微图案，导入含有第 3 软物质的溶液，之后将所述第 3 层的聚对二甲苯树脂剥离，由此在同一基板上形成第 1、第 2 以及第 3 软物质的微阵列化基板，在所述第 1、第 2 以及第 3 软物质的微阵列化基板上导入缓冲液，从而将所述第 1 和第 2 软物质溶解，所述第 3 软物质由来自生物或来自非生物分子形成。

5. 如权利要求 1～3 任一项所述的二种以上软物质的微阵列制作方法，其特征在于，导入含有最后的软物质的溶液，从而在所述基板表面上形成了最后的微阵列之后，为了使用之前在室温或低温保存，对形成了全部微阵列的每个基板进行冷冻干燥。

6. 如权利要求 4 所述的二种以上软物质的微阵列制作方法，其特征在于，导入含有最后的软物质的溶液，从而在所述基板表面上形成了最后的微阵列之后，为了使用之前在室温或低温保存，对形成了全部微阵列的每个基板进行冷冻干燥。

软物质的微阵列制作方法

技术领域

[0001] 本发明涉及制作软物质的微阵列的方法。特别是本发明涉及在同一基板上制作二种以上软物质的微阵列的方法。

背景技术

[0002] 近年来,在医疗诊断领域或分子细胞生物学研究领域,一直在寻求一种定量、再现性优异的对蛋白质、DNA(脱氧核糖核酸)或细胞等的解析、功能评价或它们的相互作用解析进行迅速测定观察的方法和装置。作为其中的1种技术,提出了各种在玻璃等基板上以微米到纳米规模制作软物质的阵列的技术。此处“软物质”意思泛指由小的分子以各种各样的形式连接(或集合)而成的高分子、凝胶、橡胶、胶体、胶束、液晶、以及各种各样的生物体高分子(DNA、RNA等核酸;蛋白质;糖类;糖蛋白等),其可以来自生物或来自非生物。

[0003] 作为相关联的技术之一,将聚对二甲苯树脂(poly(para-xylylene))制版,由此形成模版(起模版),制作软物质的微阵列的方法引起关注。非专利文献1中公开了一种技术,其中,在真空蒸镀在基板上的聚对二甲苯树脂形成微图案而制成模版,在该模版上注入软物质,之后将聚对二甲苯树脂从基板上剥离,从而在基板上制作软物质的微阵列(即“聚对二甲苯树脂剥离法”)。但是非专利文献1中,公开的是通用且可扩展地在基板上将1种软物质微阵列化的技术,并没有公开在同一基板上将不同的二种以上软物质进行阵列化的技术。

[0004] 另一方面,作为利用聚对二甲苯树脂的技术,已知有几种在基板上将二种以上软物质进行微阵列化的技术。

[0005] 例如,在非专利文献2中公开了一种技术,其中,在真空蒸镀在基板上的聚对二甲苯树脂上形成微图案来作为模版,将二种以上软物质以喷墨打印式喷到该模版上,之后将聚对二甲苯树脂从基板上剥离,从而在同一基板上制作二种以上软物质的微阵列。但是在该技术中,不仅需要能够吐出软物质的高性能点样仪作为附加专用机器,而且存在阵点间隔依赖于点样仪的性能这样的问题。即,为了避免不同种类的软物质之间的污染(不想要的混合),依赖于点样仪的性能,限制了将不同种类的软物质进行阵列化时的阵点间隔。

[0006] 另外,在非专利文献3中公开了一种技术,其中,在真空蒸镀在基板上的2层聚对二甲苯树脂上形成微图案来作为模版,在该模版上注入软物质之后,将2层聚对二甲苯树脂从基板依次一张张地剥离,由此在同一基板上制作不同的二种以上软物质的微阵列。但是,该技术中存在无法排除在不同种类的软物质之间产生污染的可能性的问题。

[0007] 进一步,在非专利文献4中公开了一种技术,其中,在真空蒸镀在基板上的1层聚对二甲苯树脂上形成微图案来作为模版,在该模版上形成多条微流路,每条流路中注入不同种类的软物质之后,将聚对二甲苯树脂从基板上剥离,由此在同一基板上制作二种以上软物质的微阵列。该技术产生污染的可能性较小,但存在如下问题:其是一种在微阵列的各阵点上连接微流路的方法,因此对不同种类的软物质进行阵列化的阵点间隔无法达到期望的大小,进而也难以制造大面积的阵列。

[0008] 现有技术文献

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献 1:B.Ilic,et al., "Topographical Patterning of Chemically Sensitive Biological Materials Using a Polymer-Based Dry Lift Off,"Biomedical Microdevices, vol. 2, pp. 317-322, 2000.

[0011] 非专利文献 2:C.P.Tan,et al., "Nanoscale Resolution, Multicomponent Biomolecular Arrays Generated by Aligned Printing with Parylene Peel-Off,"Nano Letters, vol. 10, pp. 719-725, 2010.

[0012] 非专利文献 3:K.Kuribayashi,et al., "Sequential Parylene Lift-Off Process for Selective Patterning of Biological Materials,"Proc. IEEE MEMS' 07, pp. 501-504, 2007.

[0013] 非专利文献 4:K.Atсутa,et al., "A Parylene Lift-Off Process with Microfluidic Channels for Selective Protein Patterning,"Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 17, pp. 496-500, 2007.

发明内容

[0014] 发明所要解决的课题

[0015] 本发明的课题是提供一种使用聚对二甲苯树脂剥离法来制作软物质的小间隔微阵列的方法,其是在同一基板上制作二种以上软物质的微阵列的方法,并且该方法不会使二种以上软物质污染,可以通用并且可扩展制作二种以上软物质的微阵列。

[0016] 用于解决课题的方法

[0017] 本发明人对用于在同一基板上对二种以上软物质进行阵列化但不存在所述以往技术的问题的方法进行深入研究,结果发现:(i)对(例如通过聚对二甲苯树脂剥离法得到的)基板上的软物质进行(通过冷冻干燥等)不使其变性的脱水,由此对于该基板能够应用一般的聚对二甲苯树脂剥离法,进一步(ii)在软物质上堆积的聚对二甲苯树脂能够平滑地从基板上剥离,不损害软物质的固定状态、结构、功能,从而完成了本发明。

[0018] 即,本发明是一种制作二种以上软物质的微阵列的方法,其中,在基板上蒸镀第 1 层聚对二甲苯树脂,在所述聚对二甲苯树脂上形成第 1 微图案,导入第 1 软物质溶液,从而在所述基板表面上形成第 1 微阵列,对所述第 1 软物质进行冷冻干燥,由此形成第 1 软物质的微阵列化基板,通过蒸镀在所述第 1 软物质的微阵列化基板上层积第 2 层聚对二甲苯树脂,将所述第 1 层和第 2 层的聚对二甲苯树脂贯穿,在与第 1 微图案不同的位置形成第 2 微图案,导入第 2 软物质溶液,从而在所述基板表面上形成第 2 微阵列,将第 1 层和第 2 层的聚对二甲苯树脂同时剥离,由此形成所述第 1 以及第 2 软物质的微阵列化基板,在所述第 1 以及所述第 2 软物质的微阵列化基板上导入缓冲溶液,从而将所述第 1 软物质溶解;或将第 2 软物质进行冷冻干燥,由此在同一基板上制作第 1 和第 2 软物质的微阵列。

[0019] 进一步,反复进行本发明的方法,由此能够制造所期望的不同种类的软物质的微阵列。

[0020] 发明的效果

[0021] 根据本发明,能够通过聚对二甲苯树脂剥离法,在同一基板上将二种以上软物质

制作小间隔的微阵列,但不会使二种以上软物质污染,而且不需使用点样仪,并且所形成的微阵列能够通用并且可以扩展。另外,反复进行基于本发明的微阵列制作步骤,能够制作 2 种以上软物质的微阵列而并不仅限于 2 种的软物质的微阵列。进一步,对冷冻干燥后的软物质进行了固定化的微阵列基板能够在室温或低温长期保存、配送,使用者在使用该基板时仅需导入缓冲溶液就能够容易使用。

附图说明

[0022] 图 1 是作为本发明的一个实施方式的软物质的微阵列制作方法的示意图。

[0023] 图 2A 是说明作为本发明的一个实施方式的软物质的微阵列制作方法的详细步骤的示意图。

[0024] 图 2B 是说明作为本发明的一个实施方式的软物质的微阵列制作方法的详细步骤的示意图。

[0025] 图 3 是示出具有不同的碱基序列和荧光色素的单链 DNA 的微阵列制作结果的荧光显微镜观察图像。

[0026] 图 4 是示出进行了冷冻干燥后的单链 DNA 的双链形成能的验证结果的荧光显微镜观察图像。

[0027] 图 5 是示出进行了冷冻干燥后的作为发动蛋白质的驱动蛋白的活性的验证结果的荧光显微镜观察图像。

具体实施方式

[0028] 以下,参照附图对本发明的优选实施方式进行说明,但本发明并不限制于这些实施方式。

[0029] 图 1 是示意性地示出本发明的实施方式涉及的方法的图。本发明的实施方式涉及的制作二种以上软物质的微阵列的方法利用了现有的所谓聚对二甲苯树脂剥离法,包括到目前已知的聚对二甲苯树脂剥离法或其各种各样的应用方法。本发明的实施方式的方法对一般的聚对二甲苯树脂剥离法的条件、材料、装置、反应条件等没有特别限定。

[0030] 如图 1 所示,本发明的实施方式涉及的方法首先包括如下工序:在基板上蒸镀第 1 层的聚对二甲苯树脂,在第 1 层的聚对二甲苯树脂上形成第 1 微图案,导入含有第 1 软物质的溶液,从而得到形成了(固定化的)第 1 微阵列的基板。所述工序是适用现有聚对二甲苯树脂剥离法的工序,得到的基板是在其上形成了(固定化的)第 1 微阵列的基板。此处,本发明的实施方式中对按图案形成的各个微阵列的形状、各个微阵列的尺寸、以及各个微阵列之间的距离(以下称为“形状等”)没有特别限制,可以形成为通过现有的聚对二甲苯树脂剥离法能够设计的形状等。通常可容易地设计为微米尺寸或纳米尺寸。

[0031] 所述的导入的第 1 软物质一般以水溶液或适当的溶液的形式固定在基板上。另外,对于导入方法没有特别限制,可以在基板上导入一部分或全部第 1 软物质的水溶液或其适当溶剂的溶液,从而将软物质固定在基板表面上。之后,可以冲洗未固定的多余的软物质的水溶液等。对于基板表面不需要特别用于促进与软物质结合的修饰,但根据情况也可以进行增强与软物质结合的处理。

[0032] 接着,本发明的实施方式涉及方法中,具有对所述得到的第 1 软物质进行冷冻干

燥,从而得到冷冻干燥后的第 1 软物质的微阵列化的基板的工序。本发明的实施方式中,对固定在基板上的第 1 软物质进行冷冻干燥,但本发明的实施方式中“冷冻干燥”意思泛指“按照使该软物质的结构和功能不发生非可逆性变性的方式将水分从基板上的软物质中除去来进行干燥”。因此,冷却的有无、蔗糖或海藻糖等冷冻缓冲剂的有无、真空操作的有无等可以根据冷冻干燥的基板上的软物质来适当选择。另外,“冷冻干燥”也可以对基板上的软物质的全部或一部分进行,或每个基板进行冷冻干燥。

[0033] 接着,本发明的实施方式涉及的方法中,使用上述得到的第 1 软物质的微阵列化的基板,再次在该基板上蒸镀第 2 层聚对二甲苯树脂,在第 2 层聚对二甲苯树脂上形成第 2 微图案。此处,第 2 层的聚对二甲苯树脂蒸镀在进行蒸镀时也包括固定在基板上的冷冻干燥后的第 1 软物质的表面。该蒸镀可以按照聚对二甲苯树脂蒸镀的一般条件来进行,并且将在下文中进行说明,但尽管如此,不仅第 1 软物质的表面而且内部也未发现由于蒸镀导致的变性等损伤。据认为这是由于在基板上固定的第 1 软物质被充分干燥了。进一步,在第 2 层的聚对二甲苯树脂上形成第 2 微图案时也可以直接应用在上面已经说明了的一般的聚对二甲苯树脂剥离法的条件。此处,对于在第 2 层的聚对二甲苯树脂上形成的第 2 微图案,由于在基板的同一面上设置了第 1 和第 2 软物质的微阵列,因此将第 1 层和第 2 层的聚对二甲苯树脂贯穿,从而在基板上的与第 1 微图案不同的位置形成第 2 微图案。

[0034] 本发明的实施方式涉及的方法中,进一步在得到的第 2 层聚对二甲苯树脂的第 2 微图案中导入含有第 2 软物质的溶液,从而在基板上形成(固定化)第 2 微阵列。该工序可以利用与上述的导入含有第 1 软物质的溶液相同的方法。

[0035] 此处,欲由第 1 和第 2 这两种不同的软物质制造微阵列的情况下,将聚对二甲苯树脂从所述得到的形成了(固定化的)第 2 微阵列的基板上剥离,由此能够在基板的同一面上制造第 1 和第 2 软物质的微阵列。此处,第 1 软物质为干燥的状态,第 2 软物质为溶液(湿润)的状态。

[0036] 根据需要,可以对整体再次进行冷冻干燥,从而使第 1 和第 2 软物质为干燥的状态,或注入缓冲溶液等使第 1 和第 2 软物质为湿润状态。通过对整体进行冷冻干燥,使得其能够在室温或低温下进行保存。

[0037] 虽然图 1 中对于工序是以连续的箭头示出的,但本发明并不是仅如上所述的基于第 1 和第 2 软物质的微阵列,根据需要,进一步反复进行该工序,由此能够制造在同一基板表面上设置有 3 种以上不同的软物质的微阵列。

[0038] 另外,在上述中,作为第 2 层聚对二甲苯树脂蒸镀的对象,对以固定冷冻干燥有第 1 软物质的基板保持第 1 聚对二甲苯树脂层这样的示例进行了说明,但本发明并不限于此。

[0039] 导入第 1 软物质将其固定在基板上之后,剥离第 1 聚对二甲苯树脂,将如此得到的材料进行冷冻干燥后也是对象,以及导入第 1 软物质将其固定在基板上之后,进行冷冻干燥,之后将第 1 聚对二甲苯树脂剥离而得到的材料也是对象。

[0040] 以下基于实施例对本发明进行详细的说明。

[0041] 实施例

[0042] [微阵列的制作方法]

[0043] 图 2A、2B 是详细地示出在实施例中进行的制作方法的步骤的图。参照图 2A、2B 进行说明。

[0044] 首先,在基板上真空蒸镀第 1 层聚对二甲苯树脂(图 2A(a))。

[0045] 此处,基板只要是能够固定软物质且能够耐受聚对二甲苯蒸镀条件的材质即可。可以举出例如玻璃、有机硅或塑料等。在使用微阵列时,对于测定等目的而优选具有透光性的情况下,优选具有透光性的玻璃。另外,对将软物质固定在基板的表面上的方法没有特别限制,根据情况,为了得到更强的固定性,可以在基板表面上实施促进固定化的处理。

[0046] 另外,对于蒸镀的聚对二甲苯树脂的种类没有特别限定,此处以 Parylene C(日本 Parylene 合同公司生产)为例进行说明。也可以根据需要适当选择其他种类的 Parylene N、Parylene D、或 Parylene HT。(均能够从日本 Parylene 合同公司获得)。对聚对二甲苯树脂的蒸镀厚度没有特别限定,只要是能够形成具有能够在后续工序中充分导入软物质这样结构的图案的厚度即可。具体而言,优选为 $2\mu\text{m}$ 以下。此处,以按照 $1\mu\text{m}$ 的厚度进行蒸镀的示例进行说明。

[0047] 接着,在蒸镀好的聚对二甲苯树脂上层积光致抗蚀剂(图 2A(b))。作为光致抗蚀剂,此处以 S1818(Shipley Far East 公司制造)为例进行说明,但并不特别限于此。另外对于层积方法也没有特别限定,优选通常的方法,例如基于旋涂的方法。

[0048] 接着,隔着绘制有第 1 微图案的玻璃光掩模进行紫外线照射来进行光蚀刻(图 2A(c)),进一步,进行光致抗蚀剂的显像(图 2A(d))。显像液可以与使用的光致抗蚀剂组合选择,例如以 S1818 为光致抗蚀剂的情况下,可以使用 NMD-3(可从东京应化工业株式会社获得)作为显像液。

[0049] 之后,通过氧等离子体进行干法蚀刻,在聚对二甲苯树脂上绘制第 1 微图案(图 2A(e))。此处,以基于紫外线照射的光蚀刻法或基于氧等离子体的干法蚀刻为例进行了说明,但并不限于此,例如也可以是基于电子射线束的蚀刻。

[0050] 接着,使用丙酮和异丙醇对残留的光致抗蚀剂进行冲洗,从而在玻璃基板上形成第 1 微图案(图 2A(f))。

[0051] 接着,为了导入第 1 软物质,在形成了微图案的第 1 层聚对二甲苯树脂上制作流路单元(图 2A(g))。此处,例如使用有机硅橡胶片作为隔板,用盖玻片夹着来制作流路单元。将含有希望制作成微阵列的第 1 软物质的溶液注入在流路单元内,导入到露出的玻璃基板表面上,形成第 1 微阵列。此处,作为示例,依次层积 4mg/mL 的生物素化 BSA(牛血清白蛋白)、 1mg/mL 的链霉亲和素、 $5\mu\text{M}$ 的生物素化单链 DNA(23 碱基长度,荧光色素 FITC(异硫氰酸荧光素)修饰)作为第 1 软物质。

[0052] 导入第 1 软物质之后,将流路单元内的溶液置换为不含盐的溶液,例如为超纯水或蒸馏水。由此完全冲洗掉在流路单元残留的第 1 软物质或是在基板上未固定的游离的第 1 软物质。

[0053] 之后,使用冷冻干燥装置对含有流路单元的基板整个(直接)进行冷冻干燥(图 2A(h))。进一步,使含有第 1 软物质的溶液完全干燥后,对流路单元进行解体(图 2A(h'))。此处,也可以对流路单元进行解体之后对不含流路单元的基板整个进行冷冻干燥。

[0054] 接着,在进行了冷冻干燥的基板上,对第 2 层的聚对二甲苯树脂按照与第 1 层同样的条件、步骤,例如以 $1\mu\text{m}$ 的厚度进行真空蒸镀、层积(图 2B(i)),接着旋涂 S1818 等光致抗蚀剂来进行层积(图 2B(j))。

[0055] 此处,考虑到冷冻干燥后的第 1 软物质的性质(例如热敏性等),光致抗蚀剂的烘

干条件可以选择高温且短时间（例如在 100℃进行 1 分钟）、低温且长时间（例如在 35℃进行 3 个小时）或者对其进行组合的条件。

[0056] 之后,隔着绘制有第 2 微图案的玻璃光掩模照射紫外线来进行光蚀刻（图 2B(k)）,使用 NMD-3 进行光致抗蚀剂的显像（图 2B(l)）。

[0057] 之后,通过氧等离子体进行干法蚀刻,将第 1 层和第 2 层的聚对二甲苯树脂贯穿,在与第 1 微图案不同的位置绘制第 2 微图案（图 2B(m)）。对于将第 1 层和第 2 层的聚对二甲苯树脂贯穿的干法蚀刻条件没有特别限定,根据第 1 层和第 2 层的聚对二甲苯树脂的厚度,可以通过例如调节蚀刻时间来容易地选择。

[0058] 使用丙酮和异丙醇对残留的光致抗蚀剂进行冲洗,从而在玻璃基板上形成第 2 微图案（图 2B(n)）。

[0059] 接着,按照与第 1 层同样的条件,在形成了微图案的第 2 层聚对二甲苯树脂上制作流路单元。（图 2B(o)）。

[0060] 另外,将含有希望制作微阵列的第 2 软物质的溶液注入到流路单元内,在露出的玻璃基板表面上形成第 2 微阵列。此处,作为示例,依次层积 4mg/mL 的生物素化 BSA、1mg/mL 的链霉亲和素、5 μ M 的生物素化单链 DNA (23 碱基长度,荧光色素 TMR (四甲基罗丹明乙酯) 修饰) 作为第 2 软物质。此处,第 1 软物质的按图案形成的位置被第 2 层聚对二甲苯树脂覆盖,因此第 1 软物质与第 2 软物质的污染被完全阻止。之后,对流路单元进行解体（图 2B(o')）。

[0061] 进一步,同时将第 1 层和第 2 层的聚对二甲苯树脂进行剥离（图 2B(p)）。对于第 1 层和第 2 层的聚对二甲苯树脂,利用例如镊子等剥离一部分,由此可容易地同时被剥离。

[0062] 最后在基板上制作流路单元（图 2B(q)）,注入缓冲溶液,由此将冷冻干燥的第 1 软物质进行再溶解,在同一基板上制作第 1 和第 2 软物质的微阵列。

[0063] [制作的微阵列的评价]

[0064] 图 3 示出了按照上述步骤制作的微阵列的荧光显微镜观察结果的示例。图 3 明显示出以下结果:(i) 首先,对于以下各种各样的处理,玻璃基板上的 2 种不同的软物质被固定地充分。(ii) 进一步,2 种不同的软物质（组合各自二种以上蛋白质的功能而构筑的标识性蛋白质）发挥功能,未发生变性。(iii) 没有发生 2 种不同的软物质的污染。即,作为第 1 软物质的 FITC 修饰单链 DNA 与作为第 2 软物质的 TMR 修饰单链 DNA 无污染地在同一基板上被微阵列化。(iv) 阵列化为微米规模,并且形成阵列的阵点间的间隔十分清楚地分离开。

[0065] 但是,虽然在这次的图 3 的示例中示出的是使用按照微米规模的阵列化的条件、装置,以微米规模的阵列化为目的的示例,但如果有必要,使用一般的以纳米规模的阵列化为目的的装置,例如通过电子射线束进行平版印刷等,则可以进行纳米规模的阵列化。

[0066] 图 4 是示出对根据本发明微阵列化的单链 DNA (软物质) 能否保持双链形成能进行验证的试验的结果的荧光显微镜观察图像。

[0067] 该试验中,依次层积 4mg/mL 的生物素化 BSA、1mg/mL 的链霉亲和素、5 μ M 的生物素化单链 DNA (23 碱基长度,荧光色素 FITC 修饰、碱基序列 A) 作为第 1 软物质。依次层积 4mg/mL 的生物素化 BSA、1mg/mL 的链霉亲和素、5 μ M 的生物素化单链 DNA (23 碱基长度,荧

光色素 FITC 修饰、碱基序列 B) 作为第 2 软物质。确认到通过 FITC 的荧光滤波片观察到该微阵列制作结果 (图 4a), 通过 TMR 的荧光滤波片未观察到该微阵列制作结果 (图 4b)。

[0068] 根据图 4 确认了根据经过冷冻干燥过程的本发明实施方式涉及的方法微阵列化的单链 DNA 保持了其双链形成能, 可知其未被变性等。

[0069] 即, 确认了若注入经过冷冻干燥过程的碱基序列 A 的单链 DNA 的互补链 ($5\mu\text{M}$ 的胆固醇修饰的单链 DNA, 23 碱基长度, 荧光色素 TMR 修饰, 碱基序列 $\overline{\text{A}}$), 则互补链仅在碱基序列 A 的单链 DNA 固定化的阵点特异性地结合 (图 4c), 经过冷冻干燥过程的单链 DNA 保持了双链形成能。

[0070] 图 5 是示出根据本发明的实施方式得到的微阵列化的蛋白质是否保持了其功能性的验证试验的结果的荧光显微镜观察图像。

[0071] 此处, 作为功能性蛋白质的示例, 使用了作为发动蛋白质的驱动蛋白。即, 依次层积 4mg/mL 的生物素化 BSA、 5mg/mL 的酪蛋白、标识了荧光色素 TMR 的 1mg/mL 的链霉亲和素、 $100\mu\text{g/mL}$ 的生物素化驱动蛋白作为第 1 和第 2 软物质, 对聚对二甲苯树脂进行剥离, 从而制作了驱动蛋白的微阵列。另外, 驱动蛋白的阵点外的玻璃基板表面利用 5mg/mL 的酪蛋白进行涂布, 抑制了非特异性的吸附。此处, 若投入标识了荧光色素 TMR 的微小管, 则微小管仅特异性地落着 (land) 在固定化了驱动蛋白的阵点上, 形成了微小管的微阵列 (图 5a)。

[0072] 接着确认了下述的现象: 若注入含有 ATP (三磷酸腺苷) 的缓冲溶液, 则落着在驱动蛋白上的微小管开始滑走运动, 若微小管滑走至阵点外, 则与驱动蛋白的结合消失, 在溶液中游离, 偏离到显微镜的焦点外而无法观察到。

[0073] 根据图 5 可知: 在本发明的实施方式涉及的制造工序中进行冷冻干燥处理而得到的软物质 (驱动蛋白) 保持了与微小管结合的能力, 而且具有使微小管在玻璃基板上滑走运动的活性。

[0074] 如以上说明可知, 本发明的实施方式涉及的微阵列的制作方法能够适用于 DNA 或蛋白质。但是, 本发明的实施方式并不限于 DNA 或蛋白质, RNA (核糖核酸) 或脂类、微珠等, 只要能够进行微阵列化, 什么样的软物质均可。

[0075] 进一步, 本发明的实施方式涉及的制造方法中具有对软物质进行冷冻干燥的工序, 但并不是说本发明的实施方式排除了对难以进行冷冻干燥的软物质的应用。例如, 软物质中存在具有脂质双分子膜结构的脂质体或细胞等不适于冷冻干燥的软物质, 利用单链 DNA、生物素或抗体等对这些物质表面进行化学修饰, 由此也能够制作微阵列。对脂质体或细胞进行 DNA 修饰的方法在以下参考文献 1、2 中有记载, 进行生物素修饰的方法在参考文献 3 中有记载, 进行抗体修饰的方法在参考文献 4 中有记载。即, 利用根据本发明的实施方式涉及的微阵列的制作方法, 只要预先形成单链 DNA 或蛋白质的微阵列, 即使将聚对二甲苯树脂进行剥离后, 也可以利用 DNA 的双链形成反应、生物素-抗生物素蛋白结合、抗原抗体结合等对脂质体或细胞进行特异性的微阵列化。

[0076] 参考文献:

[0077] 1. S. Hiyama, et al., "Biomolecular-motor-based autonomous delivery of lipid vesicles as nano-or microscale reactors on a chip," Lab on a Chip, vol. 10, pp. 2741-2748, 2010.

[0078] 2. S. C. Hsiao, et al., "Direct cell surface modification with DNA for the

capture of primary cells and the investigation of myotube formation on defined patterns, "Langmuir, vol. 25, pp. 6985-6991, 2009.

[0079] 3. D. Stamou, et al., "Self-assembled microarrays of attoliter molecular vessels, "Angewandte Chemie International Edition, vol. 42, pp. 5580-5583, 2003.

[0080] 4. A. Ito, et al., "Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2immuno-liposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia, "Cancer Letters, vol. 212, pp. 167-175, 2004.

[0081] 本国际申请基于在 2011 年 3 月 28 日申请的日本国专利申请 2011-070934 号主张其优先权, 日本国专利申请 2011-070934 号的全部内容援引于本国际申请中。

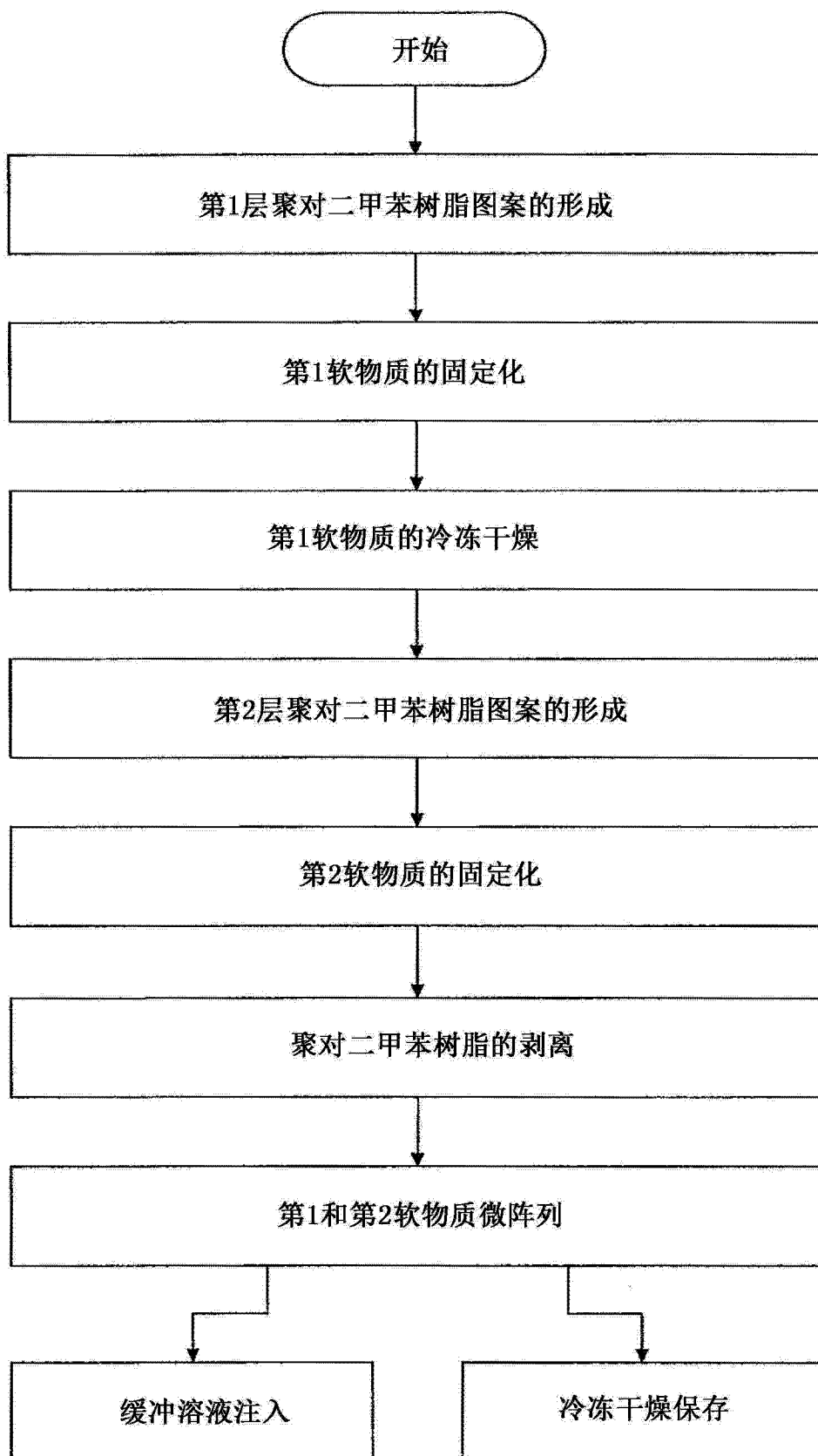


图 1

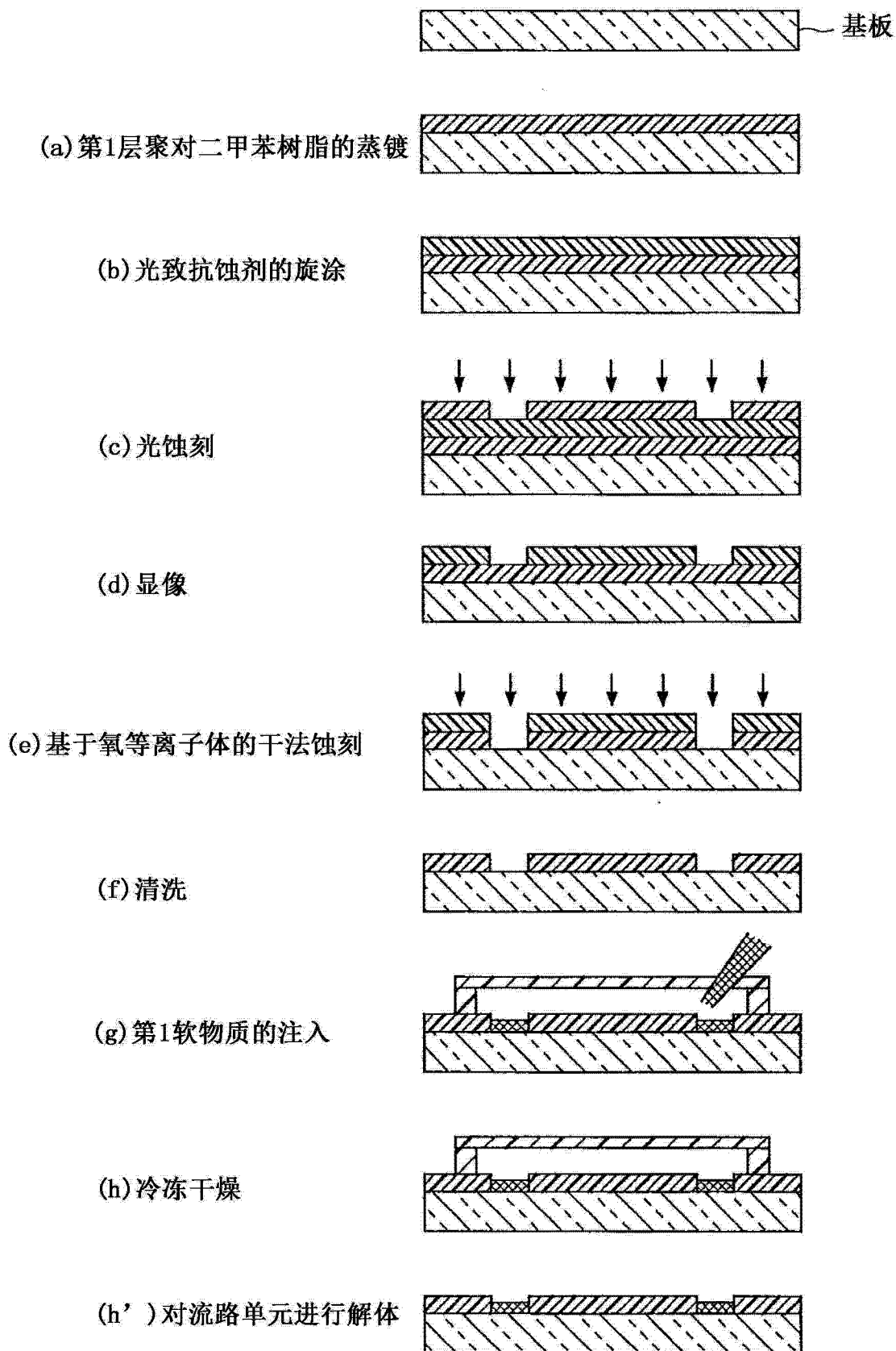


图 2A

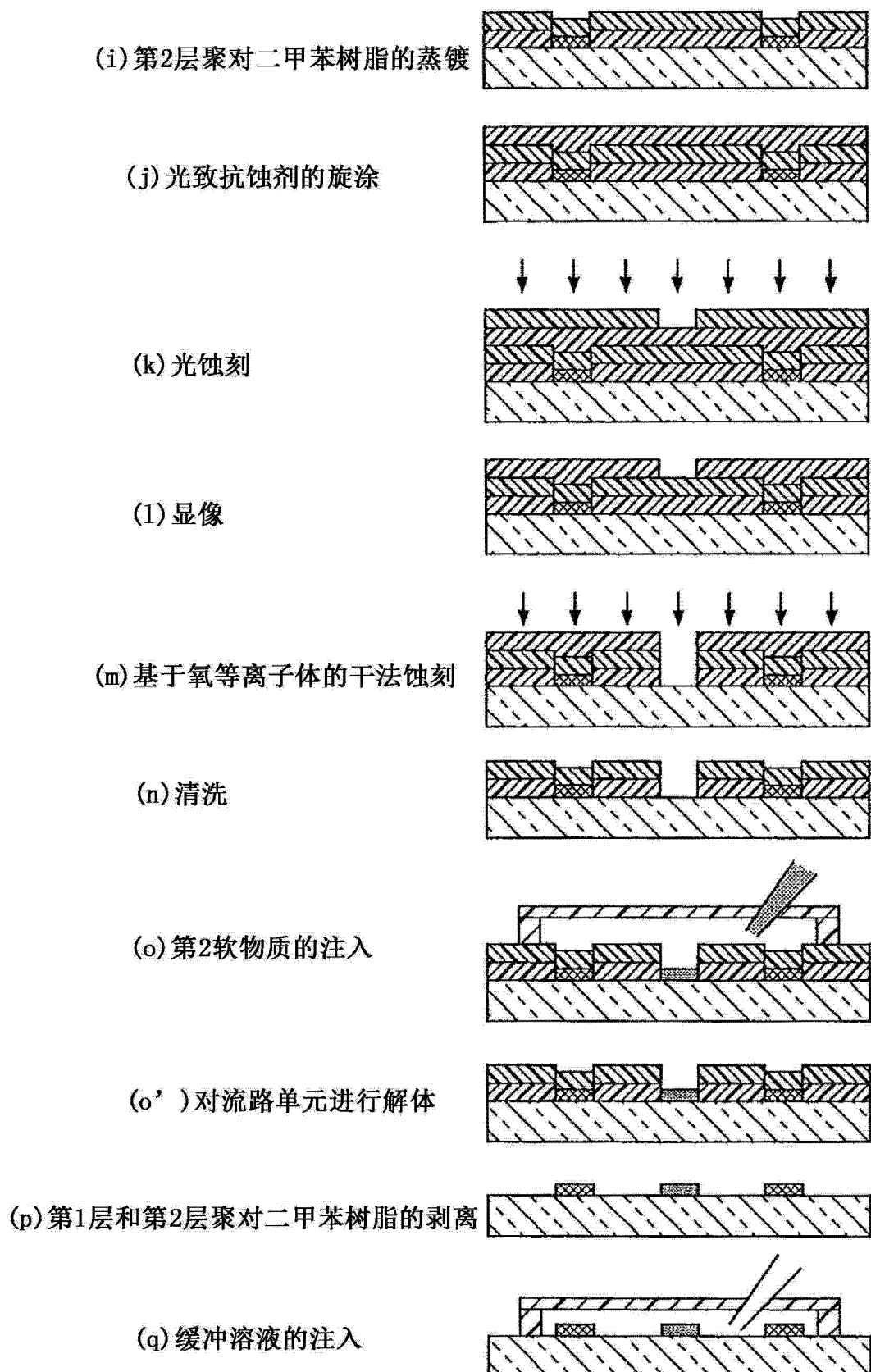


图 2B

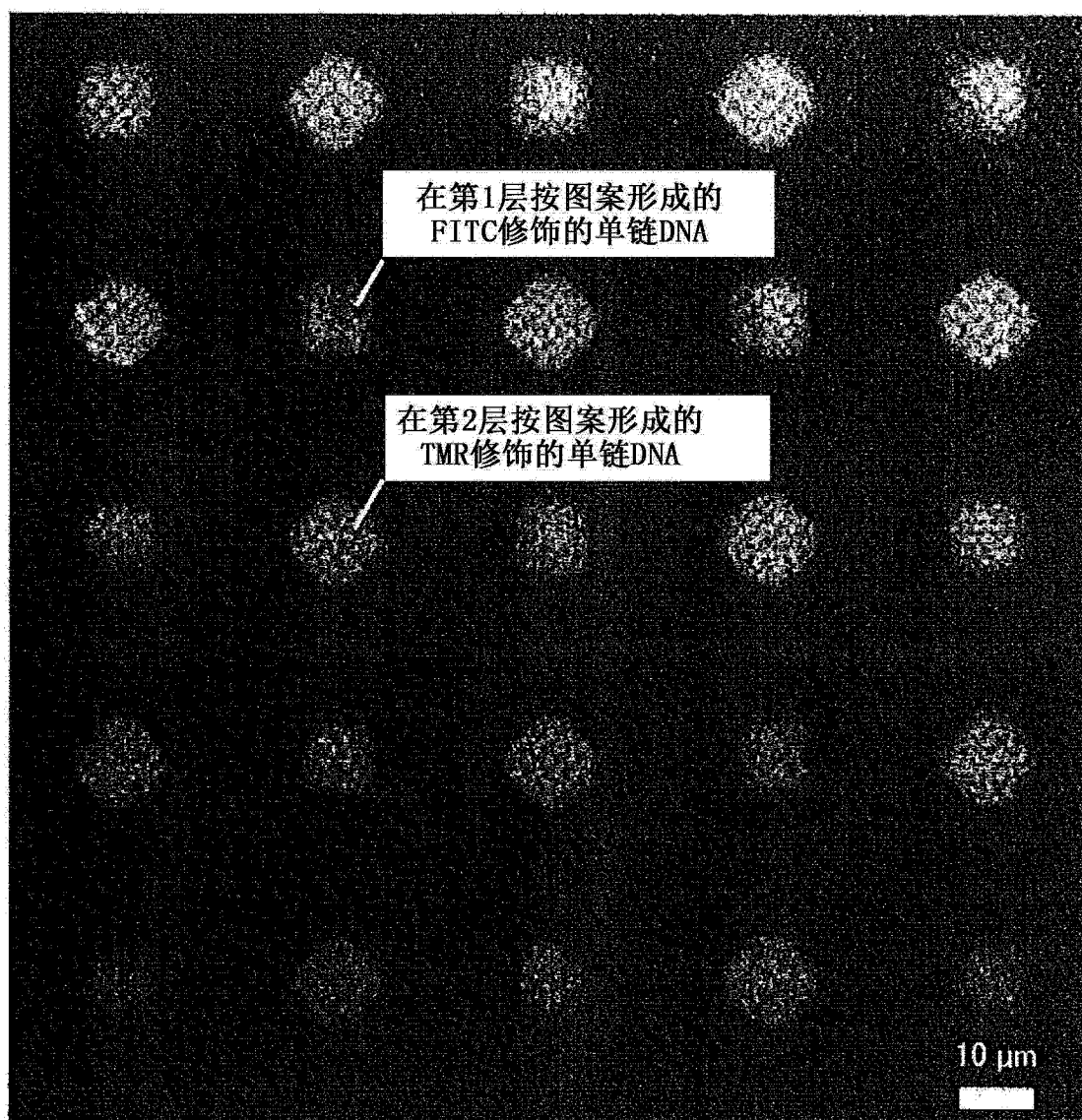


图 3

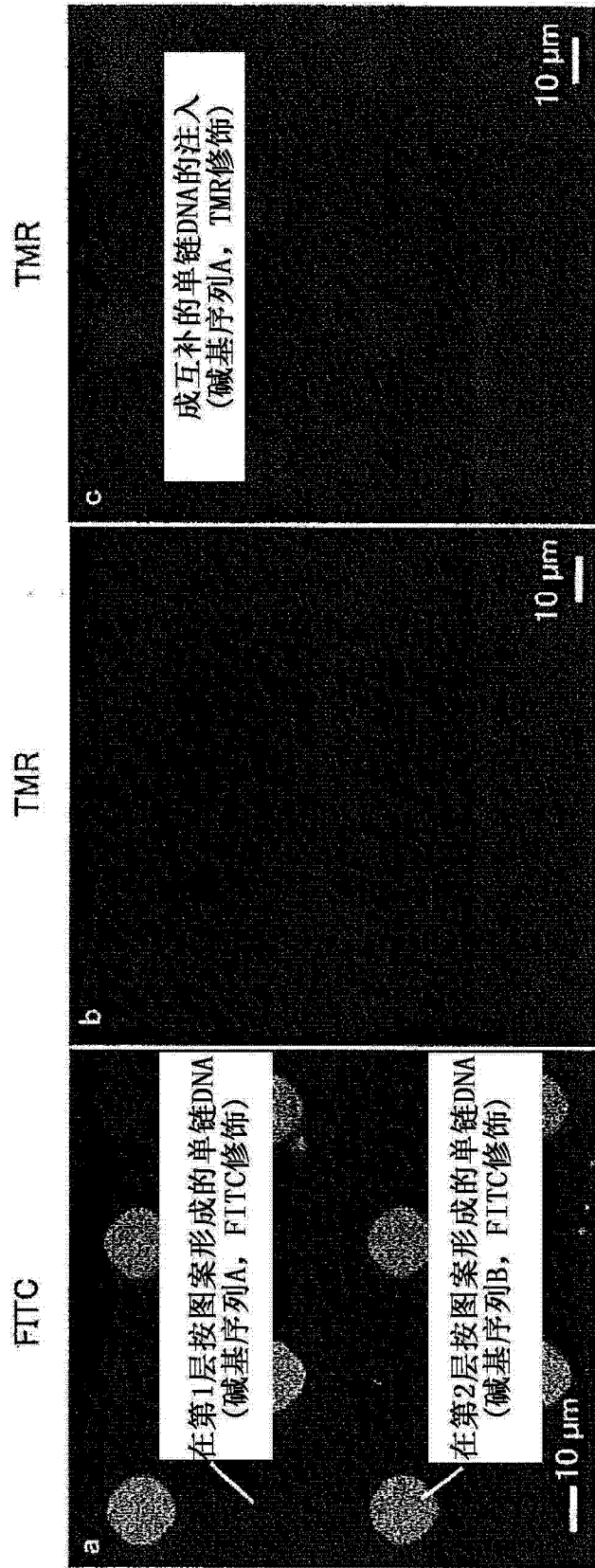


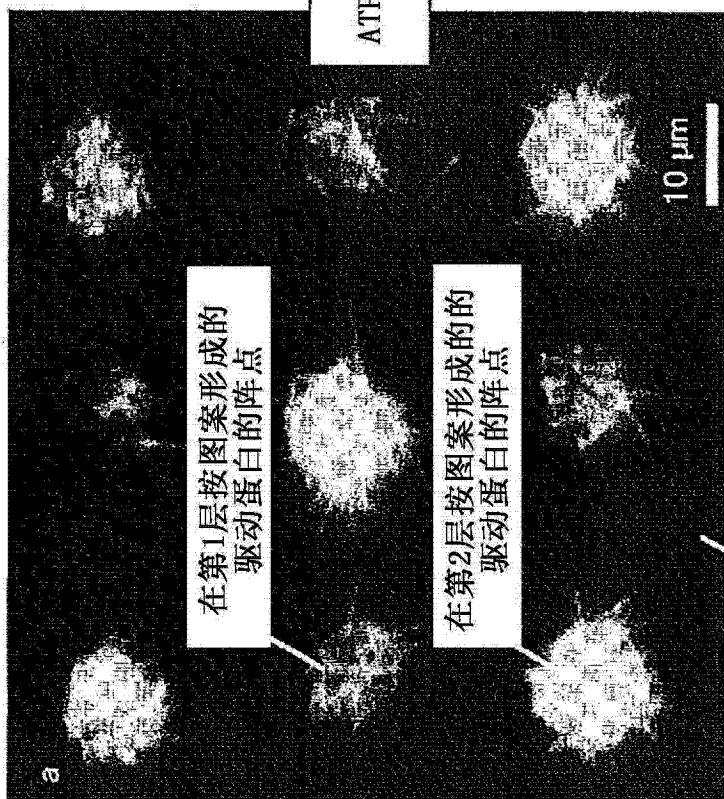
图 4

微小管的滑走运动试验 (3分钟后)



ATP注入

微小管的落着试验 (0分钟)



驱动蛋白的阵点外用酪蛋白涂布

图 5