

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4106215号
(P4106215)

(45) 発行日 平成20年6月25日(2008.6.25)

(24) 登録日 平成20年4月4日(2008.4.4)

(51) Int. Cl.		F I	
CO8G 61/02	(2006.01)	CO8G 61/02	
C12M 1/00	(2006.01)	C12M 1/00	A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	F
GO1N 33/53	(2006.01)	GO1N 33/53	M
GO1N 37/00	(2006.01)	GO1N 37/00	102

請求項の数 6 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2002-11707 (P2002-11707)
 (22) 出願日 平成14年1月21日(2002.1.21)
 (65) 公開番号 特開2003-212974 (P2003-212974A)
 (43) 公開日 平成15年7月30日(2003.7.30)
 審査請求日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(73) 特許権者 000157887
 K I S C O株式会社
 大阪府大阪市中央区伏見町三丁目3番7号
 (73) 特許権者 591228340
 第三化成株式会社
 東京都中央区日本橋本町4丁目11番2号
 (74) 代理人 100067736
 弁理士 小池 晃
 (74) 代理人 100086335
 弁理士 田村 榮一
 (74) 代理人 100096677
 弁理士 伊賀 誠司
 (72) 発明者 中村 英一
 東京都中央区日本橋本町4丁目11番2号
 岸本産業株式会社内

最終頁に続く

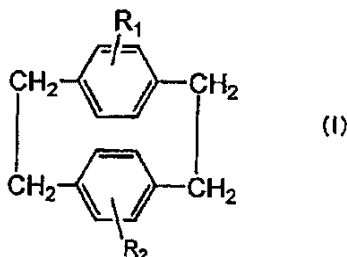
(54) 【発明の名称】 高分子薄膜、高分子薄膜の製造方法、およびバイオチップ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記構造式(I)で表される原料を蒸発させ、加熱してモノマーとした後、所定の真空度の蒸着室に導入して基材上に堆積、重合させた高分子薄膜からなるバイオチップ用の結合剤の製造方法。

【化1】

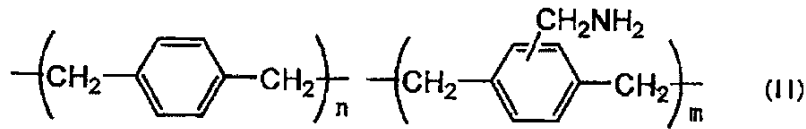


〔上記式(I)において、R₁、R₂は、-CH₂NH₂基、またはHを表し、少なくともR₁、R₂のいずれかは-CH₂NH₂基である。〕

【請求項2】

少なくとも基材上に下記式(II)で表される構造単位を有する高分子薄膜からなるバイオチップ用の結合剤。

【化 2】



n, mは整数を表す

【請求項 3】

基板上に請求項 2 の高分子薄膜を結合剤として有するバイオチップ。

10

【請求項 4】

前記バイオチップの結合剤にはプロ - プ物質が結合している請求項 3 のバイオチップ。

【請求項 5】

前記バイオチップ用結合剤含有層は、蒸着法により形成されている請求項 3 又は 4 のバイオチップ。

【請求項 6】

前記結合剤含有層は、マスキングによりパターン形成されている請求項 3 ~ 5 のいずれかのバイオチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

20

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体検査分野、医療分野などに有用な新規な高分子薄膜からなるバイオチップ用の結合剤、およびその製造方法と、これを利用した遺伝子の発現、遺伝子の変異、遺伝子の多型等の解析に特に有用なバイオチップに関する。

【0002】

【従来の技術】

医療分野等において使用する機器、例えばカテーテル等は、生体内に挿入され使用される。このように、生体内に異物である医療機器を導入することにより、生体免疫機構、生体防御機構などとの適合性が問題となる。

【0003】

30

例えば、血栓症は、血液採集および処理システムのような医療機器の開発、使用において、最も障害となる問題の一つである。血液が異質の表面に接触するときに、体液および細胞の変化が起こる。このような材料の生体適合性を改善するために、抗凝固剤の固定化と、重合体表面上に生物学的に活性な抗凝血性物質を固定化することが必要とされている。

【0004】

一方、細胞や組織における遺伝子発現の様態の解析は、これまで種々の細胞や組織から RNA を調製し、その RNA をメンブレン上に固定し、解析対象の遺伝子の特異的プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うノーザンプロット（もしくは、ドットプロット）法や、解析対象の遺伝子に特異的なプライマを用いた RT - PCR 法などによって行われてきた。

40

【0005】

一方、遺伝子の研究の進展により解析を必要とする遺伝子の数が急速に増加し、さらに、ゲノムプロジェクトの進展や、医療分野への応用などの進行に伴って、多数の遺伝子を一度に解析する必要性が高まっている。

【0006】

このような要望に対して、最近、マイクロアレイ法もしくは DNA チップ法が開発されつつある。これらの技術の特徴は、ガラス製の基板上に、互いに異なる数千種類の DNA 断片を固定し（DNA チップまたはバイオチップという。）、この固定 DNA 断片と極少量の標識されたターゲット DNA 断片とのハイブリダイゼーションを行い、高感度でターゲット DNA 断片を検出することである。

50

【 0 0 0 7 】

上記の方法を用いることによって、ヒト等のほ乳類や数千個の遺伝子を有する微生物の全遺伝子を数枚のDNAチップ等を用いて解析することができ、標識RNAによる全遺伝子を対象とした発現量の解析を行うこともできる。また、ゲノムDNAを標識することによって遺伝子欠損等の変異の解析も可能である。

【 0 0 0 8 】

DNAチップ等の作製において、「オン・チップ」法（基板表面上に固定するDNA断片を、直接、基板表面上で合成する方法）によらない場合には、DNA断片は、予め調製したものを基板表面に点着し、次いで静電的相互作用あるいは共有結合によって基板表面に固定する。

10

【 0 0 0 9 】

図2は、この従来の方法の原理を説明する図である。図2(a)に示すように、複数種類のプローブDNA 2 1が入っているマイクロプレート 2 2を用意する。一方、図2(b)に示すように、プレート 2 3としてガラス板を用意しておき、図2(c)で示すように、プレート 2 3の表面にpoly-l-Lysine等のDNAとガラスの結合剤 2 4をコーティングする。この後、マイクロプレート 2 2に入っているプローブDNA 2 1をピンに付着させ、表面にDNAとガラスの結合剤 (poly-l-Lysine) 2 4がコーティングしてあるガラスプレート 2 3の上に、ピンに付着させたプローブDNA 2 1を接触させてスポットする。マイクロプレート 2 2に入っている全てのプローブDNA 2 1をスポットし終わるまでこの作業を繰り返し、図2(d)に示すDNAチップを製造していた。このように、従来はプレートに予めDNAとガラスの結合剤を全面コーティングし、その上にDNAをプロットしてDNAチップを製造していた。

20

【 0 0 1 0 】

DNAチップのハイブリダイゼーション工程は、プローブDNAが結合剤でガラスのプレートにスポットされているDNAチップと、蛍光物質で標識したサンプルDNAを、ともにハイブリダイゼーション溶液に入れてハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション溶液は、ホルムアルデヒド、SSC (NaCl, trisodiumcitrate)、SDS (sodium dodecyl sulfate)、EDTA (ethylenediamidetetraacetic acid)、蒸留水などからなる混合液であり、混合比率は使用するDNAの性質により異なる。

【 0 0 1 1 】

このとき、サンプルDNAとDNAチップ上のプローブDNAが相補鎖DNAであれば、両者は二重らせん構造をとり結合する。一方、両者が相補鎖でなければ結合することはなく、蛍光物質で標識したサンプルDNAは、そのままハイブリダイゼーション溶液に残留するか、そのごく一部はガラスのプレート上にコーティングされている結合剤と結合し、ガーベージとして残る場合もある。

30

【 0 0 1 2 】

その後、ガラスのプレート上に残った蛍光物質で標識したサンプルDNAを水槽等の中に入れて洗い流すと、プローブDNAと結合していないサンプルDNAは排出される。その後、プローブDNAと結合しているサンプルDNAに標識している蛍光物質を、所定の光源からの光エネルギーで励起させ、蛍光物質が励起して発光する光をCCDなどの光センサーで検出することでハイブリダイゼーションの検出を行う。

40

【 0 0 1 3 】

しかし、poly-l-Lysine等のDNAとガラスの結合剤は、DNAに対する結合力が十分でないため、上記水洗い工程の際、基板との結合が外れ、ハイブリダイズした資料まで洗い流されてしまう場合があった。このような、不十分な結合に由来するプローブDNAおよびサンプルDNAの損失は、多いときには70%以上にも達し、高価なプローブDNAや、貴重なサンプルDNAを徒に浪費しているのが現状であった。

【 0 0 1 4 】

このような問題を解消すべく、結合材として種々の材料が検討されているが、未だ有効な材料が得られていない。

50

【 0 0 1 5 】

【 発明が解決しようとする課題 】

本発明の目的は、生体適合性を付与するための組織適合剤、免疫、生体反応抑制剤の固定化基質として有用な高分子薄膜と、その製造方法、および水洗い工程等においてプロ-ブ物質、サンプル物質の損失が少なく、これらのプローブ、サンプルを有効に活用することのできるバイオチップを提供することである。

【 0 0 1 6 】

【 課題を解決するための手段 】

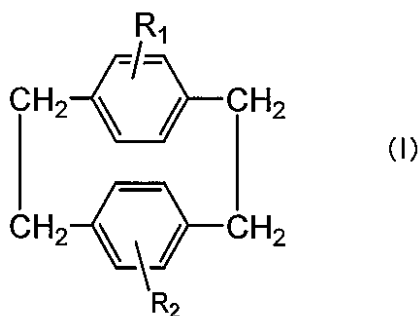
すなわち上記目的は、以下の本発明の構成により達成される。

(1) 下記構造式 (I) で表される原料を蒸発させ、加熱してモノマーとした後、所定の真空度の蒸着室に導入して基材上に堆積、重合させた高分子薄膜からなるバイオチップ用の結合剤の製造方法。

10

【 0 0 1 7 】

【 化 3 】



20

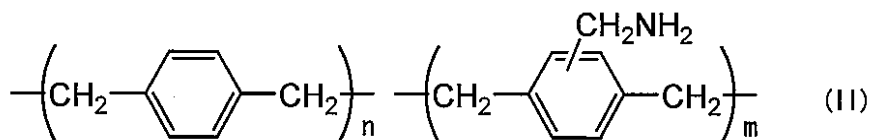
【 0 0 1 8 】

〔上記式 (I) において、 R_1 、 R_2 は、 $-CH_2NH_2$ 基、または H を表し、少なくとも R_1 、 R_2 のいずれかは $-CH_2NH_2$ 基である。〕

(2) 少なくとも基材上に下記式 (II) で表される構造単位を有する 高分子薄膜からなるバイオチップ用の結合剤。

【 0 0 1 9 】

【 化 4 】



30

n, m は整数を表す

【 0 0 2 0 】

(3) 基板上に上記 (2) の高分子薄膜を結合剤として有するバイオチップ。

40

(4) 前記バイオチップの結合剤にはプロ-ブ物質が結合している上記 (2) または (3) のバイオチップ。

(5) 前記バイオチップ用結合剤含有層は、蒸着法により形成されている上記 (2) ~ (4) のいずれかのバイオチップ。

(6) 前記結合剤含有層は、マスキングによりパターン形成されている上記 (2) ~ (5) のいずれかのバイオチップ。

【 0 0 2 1 】

【 発明の実施の形態 】

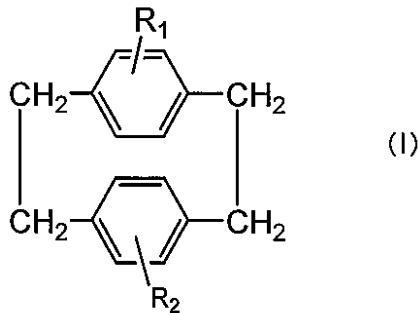
本発明の高分子薄膜は、下記構造式 (I) で表される原料を蒸発させ、加熱してモノマーとした後、所定の真空度の蒸着室に導入して基材上に堆積、重合させて製造することがで

50

きる。

【0022】

【化5】



10

【0023】

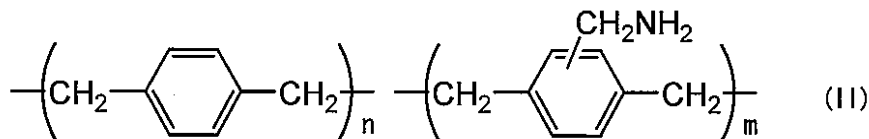
上記式 (I) において、 R_1 、 R_2 は、 $-CH_2NH_2$ 基、または H を表し、少なくとも R_1 、 R_2 のいずれかは $-CH_2NH_2$ 基である。 R_1 、 R_2 は双方とも $-CH_2NH_2$ 基であってもよい。

【0024】

このような原料化合物を用い、これを蒸発させ、基板上に堆積、重合させると、下記構造式 (II) で示されるような構造単位を有する高分子薄膜が得られる。

【0025】

【化6】



20

n, m は整数を表す

【0026】

上記式 (II) において、 n 、 m は整数であり、 $n = 0$ であってもよいが、 $m = 0$ となることはない。 $m / m + n$ は 1 に近いほどフィルム中の $-CH_2NH_2$ 基が多いこととなり、望ましいといえるが、特に限定されるものではない。

30

【0027】

上記高分子薄膜を基材上に形成することにより、生体適合性を付与するための組織適合剤、免疫、生体反応抑制剤の固定化基質として有用に機能し、種々の生化学物質、タンパク、プローブ等を良好に固定することができる。このため、医療機器の表面にこの高分子膜を形成し、免疫抑制剤、血液凝固抑制剤等を固定すれば、生体適合性を有する機器が得られる。

【0028】

さらに、この高分子薄膜を適当な基材、基板上に形成することにより、水洗い工程等においてプロ-ブ物質、サンプル物質の損失が少なく、これらのプローブ、サンプルを有効に活用することのできるバイオチップを得ることができる。

40

【0029】

このようなバイオチップは、基板とプローブ、特に DNA とをより確実に結合させることができ、水洗い工程等でもプローブ、サンプルが基板から流れ落ちることなく、プローブ、サンプルを有効に活用することができる。

【0030】

構造式 (I) で表される化合物は、好ましくは蒸着法、特に CVD 法により、蒸発、分解させて、これを基板上に重合・堆積させることで、ガラス等の基板と良好に接着すると共

50

に、構造式中に存在するアミノ基 (NH_2) がプローブと良好に結合して、プローブを基板上に強固に固定することができる。特に、プローブにDNAを用いた場合、DNA断片のリン酸基 (PO_4) と結合して、プローブDNAを基板上に良好に固定することができる。

【0031】

また、アミノ基がメチレン基 ($-\text{CH}_2-$) を介してキシリレン主鎖に結合しているので、アミノ基が直接結合している場合に比べ塩基性が増し、DNA等との静電結合が強まる。

【0032】

式(I)の化合物は、以下の方法により製造することができる。

10

【0033】

まず、[2,2]-パラシクロファンを、塩化メチレン等の溶剤中で、鉄、ヨウ素などの触媒の存在下、臭素を滴下することによって臭素化する。また、必要によって冷却してもよい。反応の進行状況は、ガスクロマトグラフィーで追跡し、所定の組成に達したら反応を終了し、過剰の臭素は亜硫酸ナトリウム水溶液等の中で中和する。その後、溶剤を留去し、残った結晶を再結晶により生成し、プロモ-[2,2]-パラシクロファンを得る。

【0034】

得られたプロモ-[2,2]-パラシクロファンと、当量よりやや過剰のシアン化銅を、N-メチルピロリドン等の溶媒中、200~250 に加熱反応する。その後、アンモニア水を加え、銅化合物を溶解すると共に目的物を沈殿させる。得られた粗結晶を、再結晶あるいは昇華、またはこれらの組み合わせにより精製し、シアノ-[2,2]-パラシクロファンを得る。

20

【0035】

次いで、シアノ-[2,2]-パラシクロファンを、接触還元、あるいはテトラヒドロフラン等の溶媒中で水素化リチウムアルミニウム等の還元剤を用いて還元し、アミノメチル-[2,2]-パラシクロファンを得る。

【0036】

このようにして得られた構造式(I)のアミノメチル-[2,2]-パラシクロファンは、以下の化学蒸着法を用いて、基材上に高分子膜として成膜することができる。

【0037】

まず、図1に示すように、蒸発部11、分解部12、蒸着部13とを有する蒸着装置を用意する。なお、図1において、蒸発部11には蒸発材料を導入する開口部シャッタ11aを有し、さらに蒸発部13にはトラップ14を介して真空ポンプ15が接続されている。

30

【0038】

図示例の蒸着装置において、まず蒸発部11に固体状の蒸発材料モノアミノメチル-[2,2]-パラシクロファンを導入する。蒸発部11の温度を、モノアミノメチル-[2,2]-パラシクロファンが気化する温度、好ましくは80~200、特に100~180 に加熱すると、蒸発材料が気化してダイマーガスとなり、原料ガスが生成する。

【0039】

次いで、原料のダイマーガスを分解部12に導入する。この分解部12では、導入された原料ガスをその分解温度、好ましくは600~750、特に650~700 まで加熱し、原料ガスを熱分解してモノマーガスとする。

40

【0040】

次に、得られた原料モノマーガスを、蒸着室13内に導入する。蒸着室13内は、所定の真空度、好ましくは10~50mTorr、特に20~35mTorrに保持されている。そして、導入された原料ガスが基板に接触すると、その界面で重合し、高分子膜が形成される。

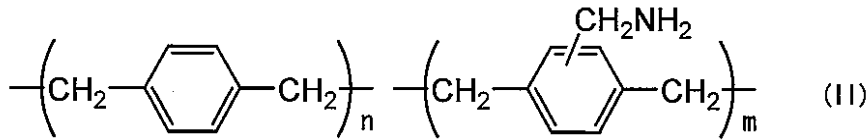
【0041】

このようにして得られた高分子は、下記構造式(II)で表されるものである。

【0042】

【化7】

50



n, mは整数を表す

【0043】

上記式(II)において、m、nは整数であり、nは0であってもよい。

10

【0044】

成膜された、高分子膜はその膜厚が1分子分でもよいが、通常0.05~10μm、好ましくは0.1~1μm程度である。なお、この薄膜は、[2,2]-パラシクロファンあるいはクロロ-[2,2]-パラシクロファンからのフィルムに積層することもできる。

【0045】

また、成膜時に所定パターンマスクを用い、マスク蒸着を行ってもよい。このように、マスク蒸着を行うことにより、精度よく結合剤含有層パターンを形成することができ、不必要な部分にプローブや試料、例えばDNAが付着してガーベージとして残り、S/Nを悪化させることを防止することができる。

【0046】

本発明の高分子膜は、生体適合性を付与するための組織適合剤、免疫、生体反応抑制剤の固定化基質として有用である。また、DNA等のプローブを固定したバイオチップの固定化基質として有用である。組織適合剤、免疫、生体反応抑制剤、プローブとしては具体的にはタンパク、抗原、レセプター、DNA断片、RNA断片等を挙げることができる。なかでも、DNA等の遺伝子を固定化すると優れたバイオチップが得られる。

20

【0047】

本発明で得られた高分子膜の固定化基質、つまり結着層として有するバイオチップは、プローブとの結合が良好であり、水洗い工程等においてもプローブが剥がれ落ちることもなく、原料を有効に活用することができる。

【0048】

基材の材質は、透明なガラス、シリコンまたはポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールA等のポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマーであることが好ましい。なかでもガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや蛍光スキャニング装置による解析の容易さによるものである。シリカ表面層を持つガラスも好ましく用いられる。基板の厚さとしては、100~2000μmの範囲にあることが好ましい。なお、本発明の結着層と基材との結合性を考えると、上記ポリマーなどの樹脂材料も好ましく、さらに結合性を改善するために基材との間にカップリング剤を介在させてもよい。

30

【0049】

プローブとして用いられるDNA断片は、目的によって二通りに分けることができる。遺伝子の発現を調べるためには、cDNA、cDNAの一部、EST等のポリヌクレオチドを使用することが好ましい。これらのポリヌクレオチドは、その機能が未知であってもよいが、一般的にはデータベースに登録された配列を基にしてcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリーあるいは全ゲノムをテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製する(以下「PCR産物」という)。あるいは、PCR法によって増幅しないものも使用することができる。また、遺伝子の変異や多型を調べるには、標準となる既知の配列をもとにして、変異や多型に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成し、これを使用することが好ましい。さらに、塩基配列分析の場合には、4n(nは、塩基の長さ)種のオリゴヌクレオチドを合成し、これを使用することが好ましい。DNA断片の塩基配列は、既知であることが好ましい。

40

50

【 0 0 5 0 】

DNA断片の点着は、DNA断片を水性媒体に溶解あるいは分散した水性液を、プラスチックプレートに分注し、分注された水性液をスポット装置を用いて基板上に滴下して行うことが好ましい。

【 0 0 5 1 】

点着されるDNA断片は、基板表面に対して、 $10^2 \sim 10^5$ 種類/cm² の範囲にあることが好ましい。DNA断片の量は、 $1 \sim 10^{-15}$ モルの範囲にあり、重量としては数ng以下であることが好ましい。点着によって、DNA断片の水性液は、基板表面にドットの形状で固定されるが、そのドット間の距離は、 $0 \sim 1.5$ mmの範囲にあることが好ましく、特に $100 \sim 300 \mu\text{m}$ の範囲にあることが好ましい。1つのドットの大きさは、直径が $50 \sim 300 \mu\text{m}$ の範囲にあることが好ましい。点着する量は、 $100 \text{ pL} \sim 1 \mu\text{L}$ の範囲にあることが好ましく、特に $1 \sim 100 \text{ nL}$ の範囲にあることが好ましい。

10

【 0 0 5 2 】

アミノ基に対するDNAの固定化には、静電相互作用を利用する方法、UVクロスリンカーを用いる方法などがあるが、本発明では何れのものを用いてもよい。

【 0 0 5 3 】

点着後は、必要に応じて乾燥し、固定されなかったDNA断片を洗浄して除去することが好ましい。

【 0 0 5 4 】

前記記載の基板表面上のドットの形状は、ほとんど円形である。形状に変動がないことは、遺伝子発現の定量的解析や一塩基変異を解析するために重要である。

20

【 0 0 5 5 】

上記のようにして作製されたDNAチップの寿命は、cDNAが固定されたcDNAチップで数週間、オリゴDNAが固定されたオリゴDNAチップではさらに長期間である。これらのDNAチップは、遺伝子発現のモニタリング、塩基配列の決定、変異解析、多型解析等に利用される。検出原理は、標識した標的核酸とのハイブリダーゼーションである。

【 0 0 5 6 】

サンプルである標的核酸としては、その配列や機能が未知であるDNA断片試料あるいはRNA断片試料を用いることが好ましい。

【 0 0 5 7 】

標的核酸は、遺伝子発現を調べる目的では、真核生物の細胞や組織サンプルから単離することが好ましい。標的がゲノムならば、赤血球を除く任意の組織サンプルから単離することが好ましい。赤血球を除く任意の組織は、抹消血液リンパ球、皮膚、毛髪、精液等であることが好ましい。標的がmRNAならば、mRNAが発現される組織サンプルから抽出することが好ましい。mRNAは、逆転写反応により標識dNTP(「dNTP」は、塩基がアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)もしくはチミン(T)であるデオキシリボヌクレオチドを意味する。)を取り込ませて標識cDNAとすることが好ましい。dNTPとしては、化学的な安定性のため、dCTPを用いることが好ましい。1回のハイブリダイゼーションに必要なmRNA量は、液量や標識方法によって異なるが、数μg以下であることが好ましい。なお、DNAチップ上のDNA断片がオリゴDNAである場合には、標的核酸は低分子化しておくことが望ましい。原核生物の細胞では、mRNAの選択的な抽出が困難なため、全RNAを標識することが好ましい。

30

40

【 0 0 5 8 】

標的核酸は、遺伝子の変異や多型を調べる目的では、標識プライマーもしくは標識dNTPを含む反応系で標的領域のPCRを行って得ることが好ましい。

【 0 0 5 9 】

標識方法としては、RI法と非RI法とがあるが、非RI法を用いることが好ましい。非RI法としては、蛍光標識法、ビオチン標識法、化学発光法等が挙げられるが、蛍光標識法を用いることが好ましい。蛍光物質としては、核酸の塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素(例えば、CyDyeTMシリーズのCy

50

3、Cy5等)、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N₂-アセチルアミノフルオレン(AAF)、AAIF(AAFのヨウ素誘導体)などを使用することが好ましい。

【0060】

ハイブリダイゼーションは、プラスチックプレートに分注しておいた、標識した標的核酸が溶解あるいは分散された水性液を、上記で作製したバイオチップ上に点着することが好ましい。点着の量は、1~100nLの範囲にあることが好ましい。ハイブリダイゼーションは、室温~70の温度範囲で、そして6~20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の標的核酸を除去することが好ましい。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが好ましい。

10

【0061】

バイオチップを用いるハイブリダイゼーションの特徴は、標識した核酸の使用量が非常に少ないことである。そのため、基板に固定するDNA断片の鎖長や標識した標的核酸の種類により、ハイブリダイゼーションの最適条件を設定する必要がある。遺伝子発現の解析には、低発現の遺伝子も十分に検出できるように、低い厳密度で長時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。一塩基変異の検出には、高い厳密度で短時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。また、互いに異なる蛍光物質によって標識した標的核酸を二種類用意し、これらを同時にハイブリダイゼーションに用いることにより、同一のバイオチップ上で発現量の比較や定量ができる特徴もある。

20

【0062】

【実施例】

〔実施例1〕

<モノプロモ-[2,2]-パラシクロファンの合成>

[2,2]-パラシクロファン75gと、塩化メチレン3.7Lの溶液に還元鉄3.0gと水0.3gを加え、30以下で、攪拌下、臭素73.5gを滴下した。反応は、ガスクロマトグラフィーで追跡し、未反応の[2,2]-パラシクロファンが3.0%まで減少した時点で、80gチオ硫酸ナトリウム/1.5L水の溶液を加えた。

【0063】

次に、塩化メチレン層を分取し、水酸化ナトリウム水溶液を加え、塩化メチレンを留去した。析出した沈殿を濾取、洗浄、乾燥し、105.5gの粗結晶を得た。これを320gのトルエンに加熱溶解、熱時濾過し、不溶物を除去した。さらに、このトルエン溶液を濃縮し、冷却した。析出した沈殿を濾取、乾燥して、81.0gのモノプロモ-[2,2]-パラシクロファンを得た。

30

【0064】

この化合物の、ガスクロマトグラフィー分析による組成は以下の通りであった。

[2,2]-パラシクロファン	4.0%
モノプロモ-[2,2]-パラシクロファン	94.9%
ジプロモ-[2,2]-パラシクロファン	1.0%

40

【0065】

<モノシアノ-[2,2]-パラシクロファンの合成>

上記化合物35gに、シアン化銅16.4g、N-メチルピロリドン200mlを加え、195~205で20時間攪拌した。その後、10%アンモニア水1.0Lを加え、析出した沈殿を濾取、洗浄、乾燥し、38.9gの粗結晶を得た。これを、30gのアセトンに加熱溶解、熱時濾過して不溶物を除去した。溶液は蒸発乾固して、26.4gの粗結晶を得た。これを昇華精製し、60gのエタノールで再結晶を行い、22.3gのモノシアノ-[2,2]-パラシクロファンを主成分とする化合物を得た。

【0066】

この化合物の、ガスクロマトグラフィー分析による組成は以下の通りであった。

50

[2 , 2] - パラシクロファン	3 . 0 %
モノシアノ - [2 , 2] - パラシクロファン	9 4 . 5 %
ジシアノ - [2 , 2] - パラシクロファン	1 . 8 %

【 0 0 6 7 】

<モノアミノメチル - [2 , 2] - パラシクロファンの合成 >

氷浴中で冷却した、テトラヒドロフラン 5 0 0 g 中に水素化リチウムアルミニウム 1 5 g を加え、2 で得た化合物 1 5 g をテトラヒドロフラン 1 0 0 g に溶解させた溶液を撹拌しつつ、2 0 以下で滴下した。

【 0 0 6 8 】

その後、ガスクロマトグラフィーによる分析で、未反応のモノシアノ - [2 , 2] - パラシクロファンが 1 % 以下になるまで、室温で撹拌を継続した。反応終了後、氷浴中で冷却しながら水 1 0 0 g を加え、析出した不溶分を濾別、除去した。溶液は蒸発乾固した。得られた粗結晶に 3 0 0 g のメタノールを加え、加熱溶解、室温まで冷却後、不溶物を濾別、除去した。この溶液を蒸発乾固して、1 3 . 8 g のモノアミノメチル - [2 , 2] - パラシクロファンを主成分とする化合物を得た。

10

【 0 0 6 9 】

この化合物の、ガスクロマトグラフィー分析による組成は以下の通りであった。

[2 , 2] - パラシクロファン	3 . 0 %
モノアミノメチル - [2 , 2] - パラシクロファン	9 4 . 1 %
ジアミノメチル - [2 , 2] - パラシクロファン	1 . 1 %

20

【 0 0 7 0 】

<高分子薄膜の形成 >

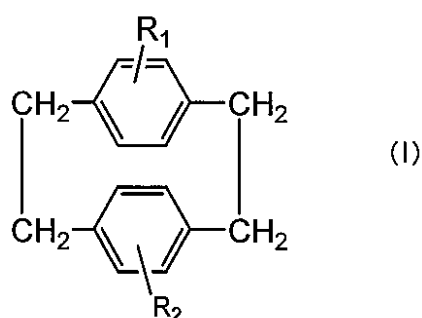
図 1 に示すように、蒸発部 1 1、分解部 1 2、蒸着部 1 3 とを有する蒸着装置を用意した。

【 0 0 7 1 】

図示例の蒸着装置において、蒸発部 1 1 に、式 (I) の構造を有する固体状の蒸着材料モノアミノメチル - [2 , 2] - パラシクロファンを導入した。蒸発部 1 1 の温度を、1 0 0 ~ 1 5 0 に加熱すると、蒸発材料が気化して下記構造のダイマーガスとなり、原料ガスが生成した。

【 0 0 7 2 】

【化 8】



40

【 0 0 7 3 】

上記式 (I) において、 R_1 、 R_2 は、 $-CH_2NH_2$ 基、または H を表し、少なくとも R_1 、 R_2 のいずれかは $-CH_2NH_2$ 基である。 R_1 、 R_2 は、双方とも $-NH_2$ 基であってもよい。

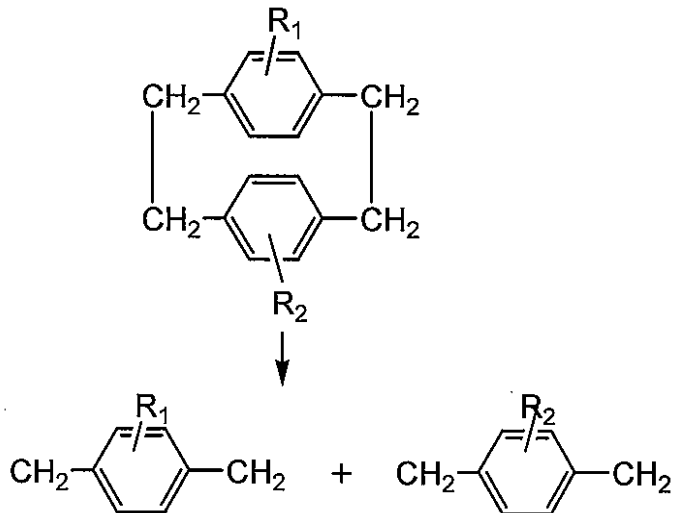
【 0 0 7 4 】

次いで、原料のダイマーガスを分解部 1 2 に導入した。この分解部 1 2 では、下記式に示すように、導入された原料ガスを、その分解温度 7 0 0 まで加熱し、原料ガスを熱分解してモノマーガスとした。

【 0 0 7 5 】

【化 9】

50



10

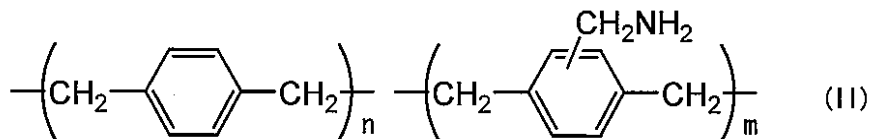
【0076】

次に、得られた原料モノマーガスを、蒸着室13内に導入した。蒸着室13内は、最大30.1mmTorrの真空度に保持されている。そして、導入された原料ガスがガラス基板界面で重合し、下記構造の高分子膜が形成された。なお、このとき高分子膜とガラス基板との結合性を改善するために、ガラス基板表面をシランカップリング剤で処理してもよい。

20

【0077】

【化10】



n, m は整数を表す

30

【0078】

次に、プローブDNAとして、5'末端にCy3またはCy5が標識された30merの合成DNAの100 μ M水溶液を用意した。マイクロプレート22に入っているプローブDNAをピンに付着させ、前記高分子膜が形成されたガラスプレート23の上に、ピンに付着させたプローブDNAを接触させてスポットした。プローブDNAをスポットし終わるまでこの作業を繰り返し、図2(d)に示すようなDNAチップを製造した。

【0079】

アミノ基に対するDNAの固定化は、静電相互作用を利用する方法と、UVクロスリンカーを利用する方法の双方を試みた。静電相互作用を利用する場合、調湿チャンバーにて一晩放置し、その後80 $^{\circ}$ で一晩乾燥し、UVクロスリンカーを用いる場合には、2分間UVクロスリンカー内に放置した。さらに、各サンプルを蒸留水にて一晩洗浄した。

40

【0080】

得られた各サンプルについて、DNA固定化前(スポット時)と、固定化/水洗後の蛍光を観察し、プローブの固定状態を評価した。

【0081】

本発明サンプルは、スポット後、UV照射後に均一なスポットが確認できた。また、洗浄後、過剰なDNAがスポット部位以外にも付着する場合があり、この結着層が容易に、しかも極めて強固にDNAと結合することがわかった。このため、背景の雑音を低減するためには、実際の使用にあたって、スポット部位以外にマスクするか、結着層自体をマスク蒸着するか、蛍光観察領域をスポット部位だけに限定することが望ましい。

50

【 0 0 8 2 】

【 発 明 の 効 果 】

以上のように本発明によれば、生体適合性を付与するための組織適合剤、免疫、生体反応抑制剤の固定化基質として有用な高分子薄膜と、その製造方法、および水洗い工程等においてプロ - プ物質、サンプル物質の損失が少なく、これらのプローブ、サンプルを有効に活用することのできるバイオチップを提供することができる。

【 図 面 の 簡 単 な 説 明 】

【 図 1 】 本発明のバイオチップを製造するための装置の概略構成を示したブロック図である。

【 図 2 】 バイオチップの製造工程を示した模式図である。

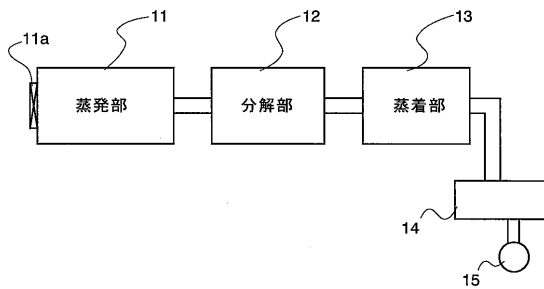
【 符 号 の 説 明 】

- 1 1 蒸発部
- 1 2 分解部
- 1 3 蒸着部
- 1 4 トラップ
- 1 5 真空ポンプ
- 2 1 D N A
- 2 2 マイクロプレート
- 2 3 基板
- 2 4 結合剤含有層

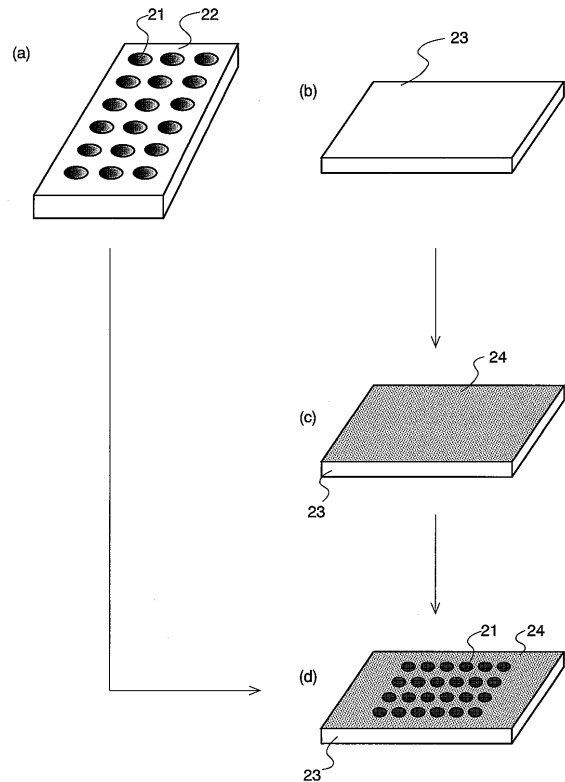
10

20

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 柴山 健一
東京都中央区日本橋本町4丁目11番2号 岸本産業株式会社内
- (72)発明者 丸山 宏
千葉県市原市五井南海岸50番5 第三化成株式会社内
- (72)発明者 井上 崇
千葉県市原市五井南海岸50番5 第三化成株式会社内

審査官 守安 智

- (56)参考文献 特開平01-213385(JP,A)
国際公開第98/058680(WO,A1)
特表2002-504842(JP,A)
特開昭63-259071(JP,A)
特開2002-340916(JP,A)
特開平03-206056(JP,A)
特開平02-131242(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C08G61/00-61/12

专利名称(译)	聚合物薄膜，制备聚合物薄膜的方法和生物芯片		
公开(公告)号	JP4106215B2	公开(公告)日	2008-06-25
申请号	JP2002011707	申请日	2002-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	第三化成株式会社		
申请(专利权)人(译)	Kishimotosangyo有限公司 第三化成株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	KISCO株式会社 第三化成株式会社		
[标]发明人	中村英一 柴山健一 丸山宏 井上崇		
发明人	中村 英一 柴山 健一 丸山 宏 井上 崇		
IPC分类号	C08G61/02 C12M1/00 C12N15/09 G01N33/53 G01N37/00		
FI分类号	C08G61/02 C12M1/00.A C12N15/00.F G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/09.200		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/HA08 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA15 4J032/CA06 4J032/CB01 4J032/CB04 4J032/CC01 4J032/CE01		
代理人(译)	小池 晃		
其他公开文献	JP2003212974A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供可用于组织相容性药物的固定基质的聚合物薄膜和用于免疫反应和生物反应的控制装置以提供生物相容性，其制造方法和生物芯片在洗涤中几乎不损失证明物质和样品物质过程并能够有效地利用证明和样本。 SOLUTION：这种聚合物薄膜的制造方法包括通过蒸发和加热由结构式(1)表示的原料来生产单体(其中R1和R2各自代表a-CH2NH2基团或H和R1或R2中的至少一个是-CH2NH2)然后通过保持在规定的真空的蒸发器中将单体沉积在基板上以聚合来制备聚合物膜。通过使用该方法获得聚合物膜和生物芯片。

