[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03157324.X

[45] 授权公告日 2006 年 10 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1281953C

[22] 申请日 2003.9.18 [21] 申请号 03157324.X

[71] 专利权人 中国科学院力学研究所
地址 100080 北京市海淀区北四环西路 15 号
[72] 发明人 王战会 靳 刚
审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司
代理人 王凤华

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种生物芯片的制作方法

[57] 摘要

本发明一种生物芯片制作方法，该方法包括以下步骤：首先制作硅胶印章：然后把用来格式化固体表面的聚乙二醇衍生物 A 涂在步骤一制作的印章表面后，再盖在备用的固体表面上，就把聚乙二醇衍生物 A 按照设计的图案转印在固体表面上；最后把已格式化后的固体基片浸泡到聚乙二醇衍生物 B 溶液中，聚乙二醇衍生物 B 就结合在无聚乙二醇衍生物 A 覆盖的空白区域内；用常规的化学方法活化聚乙二醇衍生物 B 上的活性基团，通过机械点样仪把生物样品点在固体表面上被聚乙二醇衍生物 B 覆盖的区域；进行孵育后；再用水冲洗掉未被共价固定在表面上的生物分子后，就得到了分布均匀的生物分子膜层。 该方法操作简单、重复性好；并且制备的生物芯片点的形状大小均一，每个点内生物分子分布均匀。

1．一种生物芯片的制作的方法，其特征在于：包括以下步骤：

（1）首先制作硅胶印章：把光刻胶涂布在硅片上，通过常规光刻技术刻出所需的图案，就制作出了模具；

（2）把一种聚甲氧基硅氧烷的硅胶倒在模具上，待聚甲氧基硅氧烷的硅胶凝固后，再从模具取下就得到了具有所需图案的硅胶印章；

（3）把用来格式化固体表面的聚乙二醇衍生物A涂在步骤（2）制作的硅胶印章表面后，再盖在待用的固体基片表面上，就把聚乙二醇衍生物A按照设计的图案转印在固体基片表面上，得到格式化的固体基片；其中聚乙二醇衍生物A包括 $Cl_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_3$，$HS(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OH$，$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_3$，）；

（4）把步骤（3）已格式化的固体基片浸泡到聚乙二醇衍生物B溶液中，聚乙二醇衍生物B就结合在无聚乙二醇衍生物A覆盖的空白区域内；

其中聚乙二醇衍生物B包括 $Cl_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_2COOCH_2CH_3$，$HS(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_7OCH_2COOH$，$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCHO$，$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3CH_2NH_4$；

（5）用常规的化学方法活化聚乙二醇衍生物B上的活性基团，通过机械点样仪把生物样品点在固体表面上被聚乙二醇衍生物B覆盖的区域；进行孵育后，再用水冲洗掉未被共价固定在表面上的生物分子后，就得到了分布均匀的生物分子膜层。

2．按权利要求1所述的生物芯片的制作的方法，其特征在于：所述的固体材料包括：硅片、玻璃片、金属片或塑料片。

3．按权利要求1所述的生物芯片的制作的方法，其特征在于：所述的硅胶印章的图案指所有适合于生物芯片点样的图案，图案尺寸可小至一微米，大至一毫米。

4．按权利要求1所述的生物芯片的制作的方法，其特征在于：所述的步骤（4）中进行孵育，其中孵育时间长短根据不同的蛋白质和不同的浓度按常规来决定的。

一种生物芯片的制作方法

技术领域

本发明涉及一种生物芯片制作方法，特别是涉及一种在生物芯片表面上制作的样品点形状大小均匀一致，单个点内生物样品分布均匀的生物芯片的制作方法。

背景技术

生物芯片已经成为目前生物技术中蓬勃发展的领域。在生物学研究、疾病诊断、环境监测等方面，生物芯片具有巨大的潜在应用前景。生物芯片的制作已经有多种方法。目前，使用最广泛，也是最简单的方法是机械点样法，把生物样品用加样器点加到基片上，并以矩阵的形式排列在基片上。点样法又可以分为两类，接触式和非接触式点样。尽管机械点样法可以精确地控制每一点的生物样品量，但点在基片上的点无法做到形状大小均匀一致。由于点样后，基片不清洗，点在基片上的生物分子就堆积在点内，分布不均匀，凹凸不平如参考文献 1：Gavin MacBeath, Stuart L. Schreiber, Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination, Science, 289(2000)1760-1763 所述的。如果清洗，就会造成点与点之间区域的污染，整个表面都有生物分子，无法区分，所以一般不清洗。这种点样方法的结果使目前的生物芯片仅能用于定性或半定量测量，实现精确定量十分困难。

发明内容

本发明的目的在于克服目前所用的机械点样法制作生物芯片的方法存在的不足之处；从而提供一种在生物芯片表面上制作的样品点形状大小均匀一致，单个点内生物样品分布均匀的生物芯片的制作方法。

本发明的目的是这样实现的：

本发明提供的生物芯片的制作方法，包括以下步骤：

一. 首先制作硅胶印章：把光刻胶涂布在硅片上，通过常规光刻技术刻出所需的图案，就制作出了模具；

二. 把聚甲氧基硅氧烷（PDMS）的硅胶倒在步骤一制备的模具上，待硅胶凝固后再从模具取下就得到了具有所需图案的硅胶印章；

三. 把用来格式化固体表面的聚乙二醇衍生物 A 涂在步骤二制作的印章表面后，再盖在待用的固体基片表面上，就把聚乙二醇衍生物 A 按照设计的图案转印在固体基片表面上，得到格式化的固体基片，即固体基片表面上某些区域被聚乙二醇衍生物 A 覆盖；

四. 把步骤三已格式化的固体基片浸泡到聚乙二醇衍生物 B 溶液中，聚乙二醇衍生物 B 就结合在无聚乙二醇衍生物 A 覆盖的空白区域内；

五. 用常规的化学方法活化聚乙二醇衍生物 B 上的活性基团，通过机械点样仪把生物样品点在固体表面上被聚乙二醇衍生物 B 覆盖的区域；常温下孵育一定时间后，其中孵育时间长短根据不同的蛋白质和不同的浓度来定；再用水冲洗掉未被共价固定在表面上的生物分子后，就得到了分布均匀的生物单分子膜层。

所述的固体材料基片包括：硅片、玻璃片、金属片或塑料片等可以用于芯片制作的材料。

所述的硅胶印章的图案指所有适合于生物芯片点样的图案，图案尺寸可小至一微米，大至一毫米。

所述的聚乙二醇衍生物 A 包括：$Cl_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_3$，$HS(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OH$，$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_3$，以及所有能够在固体表面上抑制生物分子发生物理吸附的聚乙二醇衍生物。

所述的聚乙二醇衍生物 B 溶液包括：$Cl_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_2COOCH_2CH_3$，$HS(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_7OCH_2COOH$，$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCHO$，$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3CH_2NH_4$，以及所有既能够在固体表面上抑制生物发生物理吸附，又能够通过化学反应把生物分子共价固定在表面上的聚乙二醇衍生物。

本发明的制备方法的优点在于：

本发明采用的固体基片材料是常规材料，例如：硅片、玻璃片、金属片或塑料片等可以用于芯片制作的材料，因此成本低；采用聚乙二醇衍生物 A 封闭固体基片表面上的指定区域，可以防止生物分子在固体基片表面发生物理吸附的作用，因此清洗不会造成表面污染；聚乙二醇衍生物 B 末端具有活性基团，活化后可以同蛋白质分子上的基团发生化学反应，从而把所需的生物分子共价固定在被

聚乙二醇衍生物B覆盖的区域表面，且每个点内蛋白质是以单分子膜层的形式分布；由于芯片表面上点的数量、形状和大小由硅胶图章上的图案所决定，因此通过这种方法可以制作出点的形状大小均一，每个点内生物分子分布均匀的生物芯片。该制备方法简单，重复性好，并且易于工业化生产。

本发明的制备方法中硅胶印章的图案指所有适合于生物芯片点样的图案，图案尺寸可小至一微米，大至一毫米，因此应用广泛。

附图说明

图1是本发明的制备方法的工艺流程图

具体实施方式

实施例1

参照图1，详细说明一种制备以硅片为基片的甲基聚乙二醇衍生物生物芯片的制作方法

1．首先制作硅胶印章：把光刻胶涂布在硅片上，通过常规光刻技术制作出具有500个圆形图案的模具；

2．把市售的PDMS的硅胶倒在步骤1制作的模具上，待PDMS硅胶凝固后再从模具上取下就得到了具有圆形图案的、直径为20微米的硅胶印章；

3．将步骤2制作的硅胶印章上将聚乙二醇衍生物$Cl_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_3$溶液涂敷在步骤2制作的硅胶印章上，并转印在硅片上；

4．把步骤3制作的硅胶印章再浸泡在聚乙二醇衍生物$Cl_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_2COOCH_2CH_3$中改性无聚乙二醇衍生物$Cl_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_3$覆盖的区域；用稀硫酸溶液处理硅片，即常规脱酯反应，脱除羧基保护；再使用N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）处理羧基生成活泼酯衍生物；通过点样仪在聚乙二醇衍生物$Cl_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_2COOCH_2CH_3$覆盖区域内点所要制备的蛋白芯片的蛋白质溶液，本实施例可以在500个圆形区域上点1－500种，常温下孵育30分钟后，去离子水冲洗，即制备出以硅片为基片的甲基聚乙二醇衍生物生物芯片。

实施例2

参照图1，详细说明一种制备以镀金的硅片为基片的羟基聚乙二醇衍生物生

物芯片的制作方法

1．首先制作硅胶印章：把光刻胶涂布在硅片上，通过常规光刻技术制作出具有10000个正方形图案；

2．把市售的PDMS的硅胶倒在步骤1制作的模具上，待PDMS硅胶凝固后再从模具上取下就得到了具有正方形图案的、边长为100微米的硅胶印章；

3.将步骤2制作的硅胶印章上将聚乙二醇衍生物$HS(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OH$溶液涂敷在步骤2制作的硅胶印章上，并转印在硅片上；

4．把步骤3制作的硅胶印章再浸泡在聚乙二醇衍生物$HS(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_7OCH_2COOH$中改性无聚乙二醇衍生物$HS(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OH$覆盖的区域；使用N-羟基琥珀酰亚胺酯（NHS）处理羧基生成活泼酯衍生物；通过点样仪在聚乙二醇衍生物$HS(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_7OCH_2COOH$覆盖区域内点所要制备的蛋白芯片的蛋白质溶液，本实施例可以在10000个正方形区域上点1－10000种，常温下孵育30分钟后，去离子水冲洗，即制备出以镀金的硅片为基片的羟基聚乙二醇衍生物生物芯片。

实施例3

参照图1，详细说明一种制备以玻璃片为基片的甲基聚乙二醇衍生物生物芯片的制作方法

1．首先制作硅胶印章：把光刻胶涂布在硅片上，通过常规光刻技术制作出具有1500个圆形图案的模具；

2．把市售的PDMS的硅胶倒在步骤1制作的模具上，待PDMS硅胶凝固后再从模具上取下就得到了具有圆形图案的、直径为200微米的硅胶印章；

3．将步骤2制作的硅胶印章上将聚乙二醇衍生物$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_3$溶液涂敷在步骤2制作的硅胶印章上，并转印在硅片上；

4．把步骤3制作的硅胶印章再浸泡在聚乙二醇衍生物$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCHO$中改性无聚乙二醇衍生物$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_3$覆盖的区域；用稀硫酸溶液处理硅片，即常规脱酯反应，脱除羧基保护；再使用N-羟基琥珀酰亚胺酯（NHS）处理羧基生成活泼酯衍生物；通过点样仪在聚乙二醇衍生物$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCHO$覆盖区域内点所要制备的蛋白芯片的蛋白质溶液，本实施例可以在1500个圆形区域

上点1－1500种，常温下孵育30分钟后，去离子水冲洗，即制备出以玻璃片为基片的甲基聚乙二醇衍生物生物芯片。

实施例4

参照图1，详细说明一种制备以以塑料片为基片的甲基聚乙二醇衍生物生物芯片的制作方法

1．首先制作硅胶印章：把光刻胶涂布在硅片上，通过常规光刻技术制作出具有800个正方形图案的模具；

2．把市售的PDMS的硅胶倒在步骤1制作的模具上，待PDMS硅胶凝固后再从模具上取下就得到了具有正方形图案的、边长为500微米的硅胶印章；

3．将步骤2制作的硅胶印章上将聚乙二醇衍生物$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_3$溶液涂敷在步骤2制作的硅胶印章上，并转印在硅片上；

4．把步骤3制作的硅胶印章再浸泡在聚乙二醇衍生物$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3CH_2NH_4$中改性无聚乙二醇衍生物$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OCH_3$覆盖的区域；通过点样仪在聚乙二醇衍生物$(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3CH_2NH_4$覆盖区域内点核酸溶液，本实施例可以在800个正方形区域上点1－800种，常温下孵育30分钟后，去离子水冲洗，即制备出以塑料片为基片的甲基聚乙二醇衍生物生物芯片。

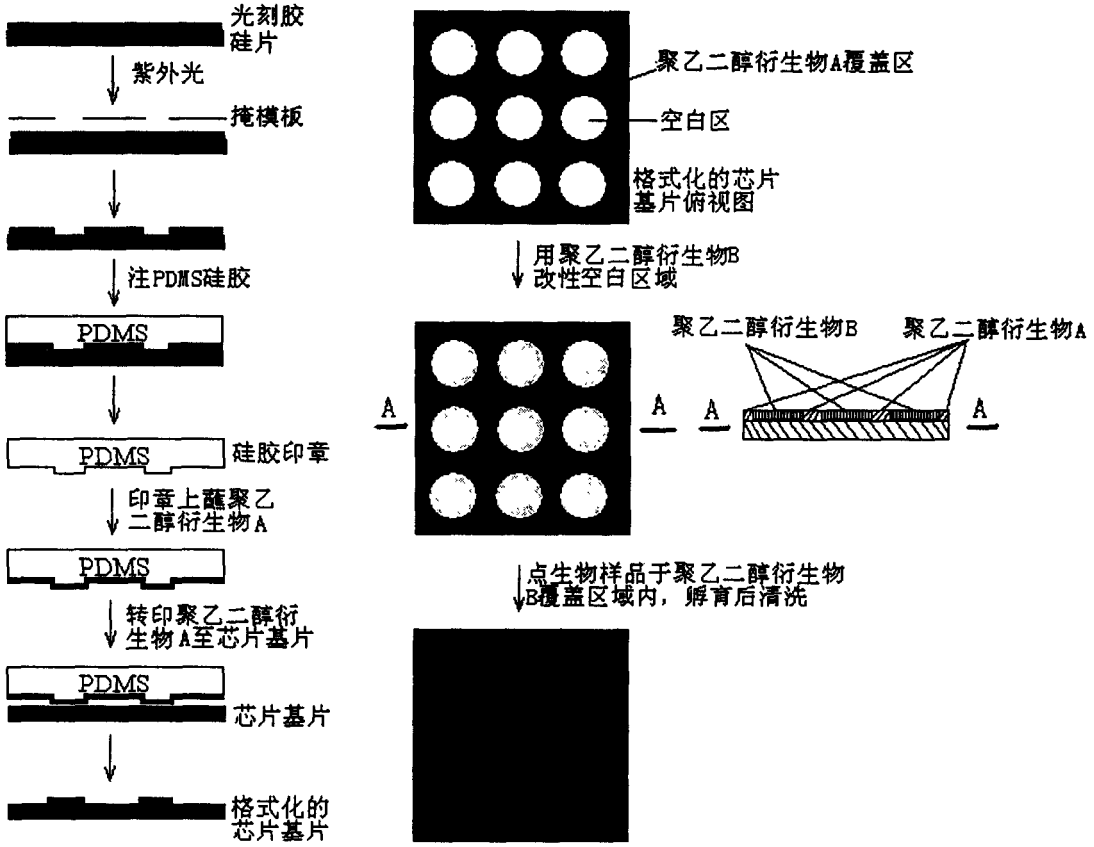
光刻胶
硅片
紫外光
掩模板
注PDMS硅胶
PDMS
PDMS
硅胶印章
印章上蘸聚乙
二醇衍生物A
PDMS
转印聚乙二醇衍
生物A至芯片基片
PDMS
芯片基片
格式化的
芯片基片
聚乙二醇衍生物A覆盖区
空白区
格式化的芯片
基片俯视图
用聚乙二醇衍生物B
改性空白区域
聚乙二醇衍生物B
聚乙二醇衍生物A
A
A
A
A
点生物样品于聚乙二醇衍生物
B覆盖区域内，孵育后清洗

图 1