

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/052097

発行日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(43) 国際公開日 平成15年6月26日(2003.6.26)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 27/414
C 1 2 M 1/00
C 1 2 N 15/09
C 1 2 Q 1/68
GO 1 N 27/00

F I

GO 1 N 27/30 3 O 1 K
C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 Q 1/68 A
GO 1 N 27/00 J
GO 1 N 33/53 Z N A M

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 22 頁) 最終頁に続く

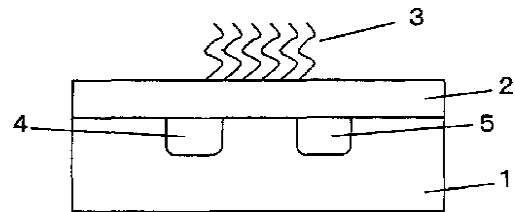
| | | | |
|-------------|---|----------|---|
| 出願番号 | 特願2003-552964 (P2003-552964) | (71) 出願人 | 501387839 株式会社日立ハイテクノロジーズ 東京都港区西新橋一丁目24番14号 |
| (21) 国際出願番号 | PCT/JP2001/011150 | (74) 代理人 | 100091096 弁理士 平木 祐輔 |
| (22) 国際出願日 | 平成13年12月19日(2001.12.19) | (72) 発明者 | 官原 裕二 茨城県ひたちなか市市毛882番地 株式会社 日立ハイテクノロジーズ 設計・製造統括本部 那珂事業所内 |
| (81) 指定国 | EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), CN, JP, KR, US | (72) 発明者 | 保田 健二 茨城県ひたちなか市市毛882番地 株式会社 日立ハイテクノロジーズ 設計・製造統括本部 那珂事業所内 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポテンシオメトリックDNAマイクロアレイ、その製造方法、及び核酸解析方法

(57) 【要約】

低ランニングコスト、低価格でかつ高精度の測定が可能なDNAマイクロアレイシステムである。電界効果トランジスタのゲート絶縁物表面に核酸プローブ(3)を固定化し、ターゲット遺伝子とゲート絶縁物表面でハイブリダイゼーションを行わせ、その際に生ずる表面電荷密度の変化を電界効果を利用して検出する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブを固定化した複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、参照電極とを備えることを特徴とするポテンシオメトリックDNAマイクロアレイ。

【請求項 2】

複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタが形成された基板を備え、前記基板の表面において、各絶縁ゲート電界効果トランジスタのチャンネル部のゲート絶縁物上に直接又は担体を介してそれぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブを固定化したことを特徴とするポテンシオメトリックDNAマイクロアレイ。

10

【請求項 3】

検出すべき核酸の一部と相補的な塩基配列を有する核酸プローブを直接又は担体を介してゲート絶縁物表面に固定化した第1の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、検出すべき核酸のどの部分とも相補的ではない塩基配列を有する核酸プローブを直接又は担体を介してゲート絶縁物表面に固定化した第2の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、前記第1の絶縁ゲート電界効果トランジスタと前記第2の絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力を比較検出する回路とを備えることを特徴とするポテンシオメトリックDNAマイクロアレイ。

【請求項 4】

(a) それぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブがゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して固定化された複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを有する基板上に、少なくとも1種類の核酸を含む試料溶液を導入して、前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、

20

(b) 洗浄液を前記基板上に導入して、未反応の核酸を前記基板上から除去するステップと、

(c) インターカレータ溶液を上記基板上に導入して、二本鎖となった核酸と反応させるステップと、

(d) 洗浄液を前記基板上に導入して、未反応のインターカレータを基板上から除去するステップと、

(e) 緩衝液を前記基板上に導入して、前記絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定するステップとを有することを特徴とする核酸解析方法。

30

【請求項 5】

請求項 4 記載の核酸解析方法において、

(f) 前記基板を加熱して前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイズした核酸を解離させるステップと、

(g) 洗浄液を前記基板上に導入して、前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブから解離した核酸及びインターカレータを除去するステップとを更に有し、

その後、前記ステップ (a) からステップ (e) を反復することを特徴とする核酸解析方法。

【請求項 6】

(a) それぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブがゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して固定化された複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを有する基板上に、荷電粒子を取り込みうる分子で標識された核酸断片を含む試料溶液を導入して、前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、

40

(b) 洗浄液を前記基板上に導入して、未反応の核酸断片を基板上から除去するステップと、

(c) 前記標識分子と複合体を形成するイオンを含む溶液を前記基板上に導入して、二本鎖となった核酸に標識されている分子と反応させ、前記イオンと前記標識分子との複合体を形成させるステップと、

50

(d) 前記絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定するステップとを備えることを特徴とする核酸解析方法。

【請求項7】

請求項6記載の核酸解析方法において、前記荷電粒子を取り込みうる分子は、1価又は2価の陽イオン又は陰イオンと選択的に複合体を形成する分子であることを特徴とする核酸解析方法。

【請求項8】

請求項6又は7記載の核酸解析方法において、荷電粒子を取り込みうる複数種類の分子をそれぞれ異なる核酸断片に標識し、前記各分子に対応した荷電粒子(イオン)を前記基板上に導入することにより複数種類の遺伝子又は遺伝子多型を同時又は順次に測定することを特徴とする核酸解析方法。

10

【請求項9】

請求項6～8のいずれか1項記載の核酸解析方法において、

(e) 前記基板を加熱して前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイズした核酸断片を解離させるステップと、

(g) 洗浄液を前記基板上に導入して、前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブから解離した核酸断片を除去するステップとを更に有し、

その後、前記ステップ(a)からステップ(d)を反復することを特徴とする核酸解析方法。

【請求項10】

20

絶縁物基板の第1の表面にシリコン膜を形成するステップと、

前記シリコン膜をパターニングして複数のシリコン膜形成領域に分離するステップと、

各シリコン膜形成領域中にそれぞれ電界効果トランジスタのソース・ドレイン領域、ヒーター、温度センサとなる複数のpn接合を形成するステップと、

前記ソース・ドレイン領域の間をチャンネルとし、前記ソース・ドレイン領域から信号配線を形成するステップと、

前記絶縁物基板の前記シリコン膜を形成した面と反対側の第2の表面において、前記電界効果トランジスタのチャンネルに対応する部分に核酸プローブを直接又は担体を介して固定化するステップとを有することを特徴とするDNAマイクロアレイの製作方法。

【請求項11】

30

絶縁物基板の表面にシリコン膜を形成するステップと、

前記シリコン膜をパターニングして複数のシリコン膜形成領域に分離するステップと、

各シリコン膜形成領域中にそれぞれ電界効果トランジスタのソース・ドレイン領域、ヒーター、温度センサとなる複数のpn接合を形成するステップと、

前記ソース・ドレイン領域の間をチャンネルとし、前記ソース・ドレイン領域から信号配線を形成するステップと、

前記信号配線を形成した面の上に絶縁膜を形成するステップと、

前記絶縁膜の表面において、前記電界効果トランジスタのチャンネルに対応する部分に核酸プローブを直接又は担体を介して固定化するステップとを有することを特徴とするDNAマイクロアレイの製作方法。

40

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、遺伝子診断、DNA配列解析、あるいは遺伝子多型解析など、バイオテクノロジーの分野、特に遺伝子検査分野の技術に関し、より詳細には、複数の異なる核酸を高精度に並列的に解析することのできるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイ、その作成方法、及び核酸解析方法に関する。

背景技術

ヒトゲノムプロジェクトをはじめ各種生物のゲノム塩基配列解析プロジェクトが急速に進展し、膨大な塩基配列情報が蓄積されつつある。既にヒトゲノムの全塩基配列が決定されつつある。今後は生体中における遺伝子の機能を明らかにすることにより、各種疾病の診

50

断、医薬品の開発、農作物の品種改良など広範囲な分野で遺伝子関連技術の開発が飛躍的に進むものと思われる。これらの新規分野発展の基礎となるのが、塩基配列情報に加えて遺伝子の発現及び機能情報である。遺伝子の機能及び発現解析を大規模に行い、遺伝子検査へ発展させる技術として、DNAチップあるいはDNAマイクロアレイ（以下、両者を総称してDNAマイクロアレイという）がAffymetrix社、Nanogen社などで開発されている。しかし、現状のDNAマイクロアレイの多くは蛍光検出を基本原理としているので、レーザや複雑な光学系が必要となり、システムが大型化し高価である。また、現在開発されている全てのDNAマイクロアレイは、原則として1回のみで使用で廃棄される。洗浄して繰り返し使用できたとしてもせいぜい2回から3回の使用が限度である。このため多くの試料を用いた解析や、検体の数が多い遺伝子診断などの分野ではランニングコストが大きな問題となる。特に医療の分野では医療費抑制の観点からも、高額な検査が広く普及することは困難である。一方では、医療の分野、すなわち遺伝子診断の分野では高い精度、定量性が求められる。したがってコスト低減と高精度化の両方を満足させる技術が求められる。

10

これらの問題を解決する方法として、酸化・還元標識と組み合わせた電流検出方式のDNAマイクロアレイがいくつが報告されている。Clinical Micro Sensors社では分子ワイヤーと称する分子の一端を金属電極上に固定化し、他端に核酸プローブを結合させ、ターゲット遺伝子とのハイブリダイゼーションに基づく酸化・還元標識と金属電極の電子の授受を電流変化として検出し、ターゲット遺伝子を検出する方式を開発している(Nature Biotechnology, vol. 16, (1998) p 27, p. 40)。この方式では高価なレーザや複雑な光学系を必要としないため、簡単に小型のシステムを構築することができる。しかしながら、金属電極上での酸化・還元反応を検出の基本原則としているため、試料中に酸化物質あるいは還元物質（例えばアスコルビン酸）が存在すると、酸化又は還元に基づく電流が流れ、遺伝子検出の妨害となり検出精度が劣化する。また、電流計測に伴い、金属電極上で電極反応が進行する。電極反応は不可逆で非平衡反応であるため電極の腐食、ガスの生成などが生じ、電流測定の実験性が損なわれ、特に繰り返し測定する場合に検出精度が劣化する。

20

そこで本発明は低ランニングコスト、低価格システムでかつ高精度の測定が可能なDNAマイクロアレイとその製造方法、及びそのDNAマイクロアレイを用いた核酸解析方法を提供することを目的とする。

30

発明の開示

本発明は、絶縁物表面に核酸プローブを固定化し、ターゲット遺伝子と絶縁物表面でハイブリダイゼーションを行い、その際に生じる電荷密度の変化を検出するDNAマイクロアレイである。好ましくは、電界効果トランジスタのゲート絶縁物表面に核酸プローブを固定化し、ターゲット遺伝子とゲート絶縁物表面でハイブリダイゼーションを行わせ、その際に生ずる表面電荷密度の変化を電界効果を利用して検出する方式のDNAマイクロアレイである。表面電荷密度の変化を大きくするために、核酸自身が持っている電荷に加えて、インターカレータの導入やイオンなどの荷電粒子と複合体を形成する分子を核酸に標識するなどして、大きな信号/雑音比で表面電位変化のポテンシオメトリック検出が可能なDNAマイクロアレイを実現した。本発明のDNAマイクロアレイを用いた遺伝子解析法は、高価なレーザや複雑な光学検出系を必要とせず、また電流検出（アンペロメトリック）方式と異なり、絶縁物基板に核酸プローブを固定化して平衡状態での表面電位を検出するので、基板の腐食やガスの発生、酸化/還元物質の妨害などによる信号値の不安定性は問題とならず、安定性に優れた高精度の遺伝子検出が可能となる。

40

すなわち、本発明によるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイは、ゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブを固定化した複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、参照電極とを備えることを特徴とする。

本発明によるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイは、また、複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタが形成された基板を備え、基板の表面において、各絶縁ゲート電界効果トランジスタのチャンネル部のゲート絶縁物上に直接又は担体を介してそれぞれ異なる種

50

類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブを固定化したことを特徴とする。

本発明によるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイは、また、検出すべき核酸の一部と相補的な塩基配列を有する核酸プローブを直接又は担体を介してゲート絶縁物表面に固定化した第1の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、検出すべき核酸のどの部分とも相補的ではない塩基配列を有する核酸プローブを直接又は担体を介してゲート絶縁物表面に固定化した第2の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、第1の絶縁ゲート電界効果トランジスタと第2の絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力を比較検出する回路とを備えることを特徴とする。

本発明による核酸解析方法は、(a)それぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブがゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して固定化された複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを有する基板上に、少なくとも1種類の核酸を含む試料溶液を導入して、一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、(b)洗浄液を基板上に導入して、未反応の核酸を前記基板上から除去するステップと、(c)インターカレータ溶液を基板上に導入して、二本鎖となった核酸と反応させるステップと、(d)洗浄液を基板上に導入して、未反応のインターカレータを基板上から除去するステップと、(e)緩衝液を基板上に導入して、絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定するステップとを有することを特徴とする。

上記ステップ(a)からステップ(e)に加えて、(f)基板を加熱して一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイズした核酸を解離させるステップと、(g)洗浄液を基板上に導入して、一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブから解離した核酸及びインターカレータを除去するステップとを更に有し、その後、前記ステップ(a)からステップ(e)を反復するようにすると、複数の測定を連続して行うことができる。

本発明による核酸解析方法は、また、(a)それぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブがゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して固定化された複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを有する基板上に、荷電粒子を取り込みうる分子で標識された核酸断片を含む試料溶液を導入して、一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、(b)洗浄液を基板上に導入して、未反応の核酸断片を基板上から除去するステップと、(c)標識分子と複合体を形成するイオンを含む溶液を基板上に導入して、二本鎖となった核酸に標識されている分子と反応させ、イオンと標識分子との複合体を形成させるステップと、(d)絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定するステップとを備えることを特徴とする。

荷電粒子を取り込みうる分子は、1価又は2価の陽イオン又は陰イオンと選択的に複合体を形成する分子、例えば、バリノマイシン、ノナクチン/モナクチン、ビスクラウンエーテル、カリックスアレン誘導體、非環状ポリエーテル誘導體、第4級アンモニウム塩、ポルフィリン、又はこれらの分子の誘導體とすることができる。

このとき、荷電粒子を取り込みうる複数種類の分子をそれぞれ異なる核酸断片に標識し、各分子に対応した荷電粒子(イオン)を基板上に導入することにより複数種類の遺伝子又は遺伝子多型を同時又は順次に測定することができる。

前記ステップ(a)からステップ(d)に加えて、(e)基板を加熱して一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイズした核酸断片を解離させるステップと、(g)洗浄液を基板上に導入して、一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブから解離した核酸断片を除去するステップとを更に有し、その後、前記ステップ(a)からステップ(d)を反復するようにすると、複数の測定を連続して行うことができる。

本発明によるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイの製作方法は、絶縁物基板の第1の表面にシリコン膜を形成するステップと、シリコン膜をパターンニングして複数のシリコン膜形成領域に分離するステップと、各シリコン膜形成領域中にそれぞれ電界効果トランジスタのソース・ドレイン領域、ヒーター、温度センサとなる複数のpn接合を形成するステップと、ソース・ドレイン領域の間をチャンネルとし、ソース・ドレイン領域から信号配線を形成するステップと、絶縁物基板のシリコン膜を形成した面と反対側の第2の表面において、電界効果トランジスタのチャンネルに対応する部分に核酸プローブを直接又は

10

20

30

40

50

担体を介して固定化するステップとを有することを特徴とする。

本発明によるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイの製作方法は、また、絶縁物基板の表面にシリコン膜を形成するステップと、シリコン膜をパターンニングして複数のシリコン膜形成領域に分離するステップと、各シリコン膜形成領域中にそれぞれ電界効果トランジスタのソース・ドレイン領域、ヒーター、温度センサとなる複数のpn接合を形成するステップと、ソース・ドレイン領域の間をチャンネルとし、ソース・ドレイン領域から信号配線を形成するステップと、信号配線を形成した面の上に絶縁膜を形成するステップと、絶縁膜の表面において、電界効果トランジスタのチャンネルに対応する部分に核酸プローブを直接又は担体を介して固定化するステップとを有することを特徴とする。

発明を実施するための最良の形態

本発明をより詳細に説述するために、添付の図面に従ってこれを説明する。以下の図において、同じ機能部分には同じ符号を付けて説明する。

10

〔実施例1〕

図1は、本発明による遺伝子検出用電界効果トランジスタの一例を説明する断面模式図である。

絶縁ゲート電界効果トランジスタ1のゲート絶縁物2の表面に核酸プローブ3を固定化した構造である。核酸プローブはオリゴヌクレオチド又はcDNA又は途中で枝分かれしたDNAの断片を用い、通常300個以下の塩基から構成されており、適切な反応条件の下で測定すべきターゲット遺伝子とハイブリダイズでき、オリゴヌクレオチドの場合は80個以下の塩基長の核酸断片であることが望ましい。ゲート絶縁物は酸化シリコン(SiO₂)、窒化シリコン(SiN)、酸化アルミニウム(Al₂O₃)、酸化タンタル(Ta₂O₅)などの材料を単独又は組み合わせて用い、通常はトランジスタ動作を良好に保つため、酸化シリコン(SiO₂)の上に窒化シリコン(SiN)、酸化アルミニウム(Al₂O₃)、酸化タンタル(Ta₂O₅)を積層する二層構造とする。

20

核酸プローブを上記絶縁物表面に固定化するために、核酸プローブの一端をアミノ基(NH₂基)、チオール基(SH基)、ビオチンなどで化学修飾する。アミノ基で化学修飾した核酸プローブを用いる場合は、絶縁物の表面をアミノプロピルエトキシシラン、ポリリジンなどで化学修飾して絶縁膜表面にアミノ基を導入し、グルタルアルデヒドやフェニレンジイソシアネート(PDC)と反応させてアミノ基で化学修飾した核酸プローブを絶縁物表面に固定化する。チオール基で化学修飾した核酸プローブを絶縁物表面に固定する場合は、絶縁物上に金薄膜を形成し、チオール基と金との親和性を利用して核酸プローブを固定化する。また、ビオチンで化学修飾した核酸プローブを固定化する場合には、絶縁物表面にストレプトアビジンを導入し、ビオチンとストレプトアビジンの親和性を利用して、核酸プローブをゲート絶縁物表面に固定化する。実際の固定化に際しては、核酸プローブを含む溶液をFETのチャンネル上のゲート絶縁物表面にのみ滴下又はスポットし、チャンネル部のゲート絶縁物上にのみ核酸プローブを固定化する。

30

一方、FETのゲート絶縁物表面に固定化担体を形成し、核酸プローブを該固定化担体の表面又は内部に間接的に固定化してもよい。固定化担体の材料としては、アガロース、ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート(pHEMA)などを用いることができ、固定化担体をアミノ基やストレプトアビジンなどで化学修飾し、上記したように、それぞれグルタルアルデヒドやPDC、又はアビジンとの親和性を利用して核酸プローブを固定化担体に固定化することができる。このように固定化担体を介して間接的にFETのゲート絶縁物上に核酸プローブを形成することもできる。

40

試料中に測定すべきターゲット遺伝子を含む多数の遺伝子が存在し、上記遺伝子検出用FETのゲート絶縁物上にターゲット遺伝子と相補的塩基配列を有する核酸プローブが固定化されていると、適切な反応条件のもとでターゲット遺伝子と核酸プローブがハイブリダイズして、ターゲット遺伝子と核酸プローブが複合体を形成する。反応に用いるバッファ溶液のpHの適切な条件下では、核酸は負に帯電している。したがって、ハイブリダイズによる複合体形成によりFETのゲート絶縁物近傍で電荷密度が変化し、ゲート絶縁物の表面電位が変化する。この変化がFETのゲート電圧変化と同等の作用となり、チャンネル

50

の導電率を変化させる。したがって、ソース4及びドレイン5の間を流れるドレイン電流変化として複合体の形成、すなわちターゲット遺伝子の存在を検出することができる。

〔実施例2〕

図2は、図1に示した遺伝子検出用電解効果トランジスタ(Genetic FET)を用いた遺伝子検査システムの構成例を示す図である。

この遺伝子検査システムは、図1に示した遺伝子検出用FET1の他に参照FET6を用い、遺伝子検出用FETと参照FETの差動測定を行う。遺伝子検出用FET1のゲート絶縁物表面には試料中のターゲット遺伝子と相補的な塩基配列を有する核酸プローブ3が固定化されている。一方、参照FET6のゲート絶縁物表面にはターゲット遺伝子と相補的な塩基配列とは異なる塩基配列を有する核酸プローブ7が固定化されている。

10

このような差動測定を行うことにより、FETの電気的特性の違いによる周囲の温度や光の変化による出力値の変化を補償したり、あるいは試料中の荷電粒子がゲート絶縁物上に非特異的に吸着することによる出力値の変化を相殺して、ターゲット遺伝子と核酸プローブのハイブリダイゼーションによる出力変化のみを精度良く検出することができる。遺伝子検出用FETと参照FETは電気的特性がそろっているのが望ましいので、同じ基板に集積化された一对のFETを用いることが望ましい。

遺伝子検出用FETと参照FETの表面電位を安定に測定するために、電位測定の基準となる参照電極8を設置する。参照電極は通常、所定組成・濃度の内部溶液に銀/塩化銀電極又はかんこう電極を浸漬した電極が用いられ、塩橋又は多孔性材料による液絡部で内部溶液と試料溶液が接触する構成のものを用いる。遺伝子検出用FET1と参照FET6は駆動回路9によりそれぞれの表面電位を計測し、2つの出力は差動測定回路10を介して信号処理回路11に入力される。複数の遺伝子検出用FETを集積化して複数遺伝子を同時計測する場合、参照FETを共通に使用することができ、異なる遺伝子検出用FETと共通の参照FETとの差動測定を行う。

20

〔実施例3〕

図3は、本発明のDNAマイクロアレイとインターカレータを組み合わせた測定システムの説明図である。図示した例のDNAマイクロアレイの場合、3個のGenetic FET12~14が集積化されており、第1のFET12は第1のターゲット遺伝子を検出する遺伝子検出用FET、第2のFET13は第2の遺伝子を検出する遺伝子検出用FET、第3のFET14は参照FETとして用いられる。第1、第2のFETのゲート絶縁物上にはそれぞれ第1、第2の遺伝子と相補的な塩基配列を有する核酸プローブが固定化されている。参照FETのゲート絶縁物表面には第1及び第2の遺伝子の相補的塩基配列とは異なる塩基配列を有する核酸プローブが固定化されている。

30

図3は、第1の遺伝子のみを含有する試料溶液を上記集積化DNAマイクロアレイに導入し、ターゲット遺伝子とハイブリダイゼーションを行わせた後、インターカレータを作用させたときの状態を示している。第1の遺伝子は第1のFET13の核酸プローブとのみハイブリダイズして二本鎖を形成する。インターカレータ15は二本鎖の核酸とのみ反応して結合し、一本鎖の核酸には結合しない。インターカレータ15は電荷を有しているので、第1の遺伝子検出用FET12の表面電荷密度のみが変化してFETの出力信号が変化し、第2の遺伝子検出用FET13及び参照FET14の表面電荷密度は変化しないので出力信号が変化しない。したがって、第1の遺伝子検出用FET12と参照FET14の差動測定、及び第2の遺伝子検出用FET13と参照FET14の差動測定を行うことにより、前者の出力信号のみが変化して第1のターゲット遺伝子が検出される。または、第1の遺伝子検出用FET12と参照FET14の出力比の測定、及び第2の遺伝子検出用FET13と参照FET14の出力比の測定を行うことにより、前者の出力比が変化して第1のターゲット遺伝子が検出される。このように複数のFETの出力を比較することでターゲット遺伝子が検出できる。インターカレータとしてはエチジウムブロマイド、ヘキスト33258(Hoechst 33258)などを用いることができる。

40

具体例について以下に説明する。アルコールデヒドロギナーゼ関連遺伝子には一塩基多型(SNPs)が存在することが知られており、その一塩基多型部位をはさんで前後8塩基

50

を有する 17 塩基長の第 1 及び第 2 の核酸プローブを合成した。その塩基配列を下に示す。

第 1 核酸プローブ：5' - C A T A C A C T A A A G T G A A A - 3'

第 2 核酸プローブ：5' - C A T A C A C T G A A G T G A A A - 3'

5' 末端から 9 番目の部位が SNP 部位であり、第 1 核酸プローブではその部位の塩基が A、第 2 プローブでは G となっている。この第 1 及び第 2 の核酸プローブをそれぞれ第 1 及び第 2 の FET のゲート上に固定化する。参照用 FET のゲートには第 1、第 2 の核酸プローブと異なる配列を有する核酸プローブ、例えばすべて A から構成される 17 塩基長の核酸プローブを固定化する。参照用 FET のゲート上には核酸プローブを固定化しなくともよい。上記核酸プローブの 5' 末端をアミノ基で修飾する。一方、本実施例の FET のゲート絶縁膜には窒化シリコンが用いられており、その表面を - アミノプロピルトリエトキシシランで化学修飾して窒化シリコン表面にアミノ基を導入する。核酸プローブのアミノ基と窒化シリコンのアミノ基を例えばグルタルアルデヒドのような 2 官能性試薬と反応させ、シッフ塩基による結合を形成することにより、核酸プローブを窒化シリコン表面に固定化する。

10

試料は、血液中の白血球からヒトゲノムを抽出し、上記 SNP 部位を含む 100 塩基長の領域を増幅した後、第 1、第 2 の遺伝子検出用 FET、及び参照 FET に導入して、45 で 8 時間、ハイブリダイゼーションを行わせた。ハイブリダイゼーション後、緩衝液により洗浄して未反応の試料を除去し、インターカレータとしてエチジウムブロマイドを導入した。測定はまず第 1、第 2 の遺伝子検出用 FET、及び参照 FET に緩衝液を導入して、それぞれの FET の出力電圧、第 1 の遺伝子検出用 FET と参照用 FET の差動出力、及び第 2 の遺伝子検出用 FET と参照用 FET の差動出力を測定し、その後、試料を導入、ハイブリダイゼーション、洗浄後、インターカレータを導入し、それぞれの FET の出力電圧、第 1 の遺伝子検出用 FET と参照用 FET の差動出力、及び第 2 の遺伝子検出用 FET と参照用 FET の差動出力を測定した。試料及びインターカレータ導入前後の出力電圧の変化を測定した。

20

第 1 の核酸プローブに対応する塩基配列を有する試料 (Normal) では、第 1 の遺伝子検出用 FET と参照用 FET の差動出力は 5.0 mV であった。一方、第 2 の遺伝子検出用 FET と参照用 FET の差動出力は 0.5 mV であり、有意な差が得られた。これら一連の差動出力測定は同時に行われることが望ましいが、同一検査時間内であれば順次行うこともできる。第 2 の核酸プローブに対応する塩基配列を有する試料 (Mutant) では第 1 の遺伝子検出用 FET と参照用 FET の差動出力は 0.3 mV であった。一方、第 2 の遺伝子検出用 FET と参照用 FET の差動出力は 4.0 mV であり、やはり有意な差が得られた。第 1 と第 2 の核酸プローブに対応する塩基配列を半分ずつ有する試料 (ヘテロ) では第 1 の遺伝子検出用 FET と参照用 FET の差動出力は 2.3 mV、第 2 の遺伝子検出用 FET と参照用 FET の差動出力は 2.0 mV であり、ほぼ 1 対 1 の比が得られた。以上より、本発明による SNP 解析により、Normal / Normal のホモ、Mutant / Mutant のホモ、Normal / Mutant のヘテロの 3 種類の試料を識別することができた。インターカレータ使用の場合は、試料 DNA に標識化合物を化学結合して標識する必要が無い。

30

40

図 2 に示したように、インターカレータを使用せず、ターゲット DNA が本来有している電荷だけで検出する場合には、Normal / Normal あるいは Mutant / Mutant のホモの試料の測定において、遺伝子検出用 FET と参照用 FET の差動出力は 2.2 mV の大きさであった。したがって、インターカレータの使用により、約 2 倍の高感度化を図ることができた。

〔実施例 4〕

図 4 は、本発明の DNA マイクロアレイと標識分子を組み合わせた測定システムの説明図である。図示した例の DNA マイクロアレイの場合、3 個の Genetic FET 12 ~ 14 が集積化されており、第 1 の FET 12 は第 1 のターゲット遺伝子を検出する遺伝

50

子検出用 F E T、第 2 の F E T 1 3 は第 2 の遺伝子を検出する遺伝子検出用 F E T、第 3 の F E T 1 4 は参照 F E T として用いられる。第 1、第 2 の F E T のゲート絶縁物上にはそれぞれ第 1、第 2 の遺伝子と相補的な塩基配列を有する核酸プローブが固定化されている。参照 F E T のゲート絶縁物表面には第 1 及び第 2 の遺伝子の相補的塩基配列とは異なる塩基配列を有する核酸プローブが固定化されている。

図 4 は、第 1 の遺伝子のみを含有する試料溶液を上記集積化 D N A マイクロアレイに導入し、ターゲット遺伝子とハイブリダイゼーションを行わせたときの状態を示している。第 1 の遺伝子は第 1 の F E T の核酸プローブとのみハイブリダイズして二本鎖を形成する。第 1 の遺伝子には帯電した分子又はイオンと複合体を形成する分子 1 6 が標識されており、上記の特異的なハイブリダイゼーションによりゲート絶縁物表面の電荷密度が変化する。第 2 の遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T の表面電荷密度は変化しないので出力信号が変化しない。したがって、第 1 の遺伝子検出用 F E T と参照 F E T の差動測定、及び第 2 の遺伝子検出用 F E T と参照 F E T の差動測定を行うことにより、前者の出力信号のみが変化して第 1 のターゲット遺伝子が検出される。

イオンと複合体を形成する分子(リガンド)としては、バリノマイシン、ノナクチン/モナクチン、ビスクラウンエーテル、カリックスアレン誘導体、非環状ポリエーテル誘導体、第 4 級アンモニウム塩などが用いられる。例えばターゲット遺伝子をビス 1 2 クラウン 4 (B i s (1 2 - c r o w n - 4)) で標識する場合、ビス 1 2 クラウン 4 はナトリウムイオンと選択的に複合体を形成するので、ゲート絶縁物上の核酸プローブとハイブリダイズさせた後、ナトリウムイオンを含む緩衝液を D N A マイクロアレイ上に導入すると、ビス 1 2 クラウン 4 とナトリウムイオンが選択的に複合体を形成し、ゲート絶縁物表面の電荷密度が局所的に変化する。この変化を F E T で検出する。

本実施例の具体的応用として S N P 解析を行った例について以下に説明する。実施例 3 で示したアルコールデヒドロギナーゼ関連遺伝子を用い、

第 1 核酸プローブ (Normal) : 5' - C A T A C A C T A A A G T G A A A -
3'

第 2 核酸プローブ (Mutant) : 5' - C A T A C A C T G A A G T G A A A -
3'

をそれぞれ第 1 及び第 2 の遺伝子検出用 F E T のゲート上に固定化する。参照用 F E T のゲートには第 1、第 2 の核酸プローブと異なる配列を有する核酸プローブ、例えばすべて A から構成される 1 7 塩基長の核酸プローブを固定化する。試料 D N A は血液中の白血球から抽出し、S N P 部位を含む 1 0 0 塩基長の領域を増幅すると同時に、N o r m a l D N A にはバリノマイシン、M u t a n t D N A にはビスクラウンエーテルで標識化した。

N o r m a l D N A からなる試料を第 1、第 2 の遺伝子検出用 F E T、及び参照 F E T に導入して、4 5 で 8 時間、ハイブリダイゼーションを行わせた。ハイブリダイゼーション後、緩衝液により洗浄して未反応の試料を除去し、5 0 m M の N a C l 水溶液を導入して、第 1、第 2 の遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T の出力電圧、第 1 の遺伝子検出用 F E T と参照用 F E T の差動出力、及び第 2 の遺伝子検出用 F E T と参照用 F E T の差動出力を測定した。第 1 の遺伝子検出用 F E T と参照用 F E T の差動出力は 4 m V、第 2 の遺伝子検出用 F E T と参照用 F E T の差動出力 0 . 2 m V であった。その後、5 0 m M K C l 水溶液を導入して同様に出力電圧を測定した結果、第 1 の遺伝子検出用 F E T と参照用 F E T の差動出力は 0 . 1 m V、第 2 の遺伝子検出用 F E T と参照用 F E T の差動出力 0 . 3 m V であり、試料中の N o r m a l D N A は第 1 の核酸プローブとのみハイブリダイゼーション反応し、第 1 の遺伝子検出用 F E T が選択的に応答することが確認された。

一方、M u t a n t D N A からなる試料を、上記と同様に測定すると、5 0 m M の N a C l 水溶液を導入したときの第 1 の遺伝子検出用 F E T と参照用 F E T の差動出力は 0 .

1 mV、第2の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力0.2 mVであった。50 mM KCl水溶液導入後の第1の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は0.1 mV、第2の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力5.0 mVであり、試料中のMutant DNAは第2の核酸プローブとのみハイブリダイゼーション反応し、第2の遺伝子検出用FETが選択的に応答することが確認された。NormalとMutantのDNAを半分ずつ有する試料(ヘテロ)では、50 mMのNaCl水溶液を導入したときの第1の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は2.3 mV、第2の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は0.1 mVであり、50 mM KCl水溶液導入後の第1の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は0.1 mV、第2の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力2.5 mVであり、ほぼ1対1の比が得られた。

10

以上より、本発明によるSNP解析により、Normal/Normalのホモ、Mutant/Mutantのホモ、Normal/Mutantのヘテロの3種類の試料を識別することができた。本実施例では、SNP解析の工程に、ハイブリダイゼーションとイオン-リガンド複合体の形成の2つの選択的化学反应工程が含まれている。したがって、高精度のSNP解析を行うことができる。

SNP解析以外に、多数種類の核酸プローブをFETのゲート上に固定化し、バリノマイシンとビスクラウンエーテルをそれぞれターゲット用と参照用の試料に標識化し、発現解析を行うこともできる。

[実施例5]

20

図5は、本発明による薄膜ゲート型遺伝子検出電界効果トランジスタを備えるDNAマイクロアレイの製造工程例を示す図である。まず、図5(a)に示すように、ガラス基板17に低圧化学気相成長法(Low pressure chemical vapor deposition)により、p型のポリシリコン薄膜19を形成する。ポリシリコン薄膜の厚さは10~10000 nmの範囲が望ましく、本実施例では1000 nmとした。次に、図5(b)に示すように、ポリシリコン膜のパターニングと酸化を行う。フォトリソグラフィプロセスにより、レジスト塗布、フォトマスクを介した光照射、レジスト現像を行い、ドライエッチングあるいはフッ酸と硝酸の混合液によるウエットエッチングにより、シリコン膜形成領域19を形成する。その後、酸素雰囲気中、900 でシリコン膜を熱酸化し、ポリシリコン薄膜19の表面に二酸化シリコン膜44を形成する。

30

次に、図5(c)に示すように、酸化膜のエッチングと不純物核酸領域の形成を行う。フォトリソグラフィプロセスにより、レジスト塗布、フォトマスクを介した光照射、レジスト現像を行い、ドライエッチングあるいはフッ酸とフッ化アンモニウムの混合液によるウエットエッチングにより、不純物拡散領域の二酸化シリコン膜を除去する。As⁺又はP⁺のイオン注入によりp型のポリシリコン薄膜19の中にn型領域を形成し、pn接合20を設ける。その後、酸素雰囲気中、900 で不純物拡散領域のシリコン膜を熱酸化し、その表面に二酸化シリコン膜44を形成する。

次に、図5(d)に示すように、金属電極配線を形成する。フォトリソグラフィプロセスにより、レジスト塗布、フォトマスクを介した光照射、レジスト現像を行い、ドライエッチングあるいはフッ酸とフッ化アンモニウムの混合液によるウエットエッチングにより、電極用コンタクト穴部の二酸化シリコン膜を除去する。アルミニウム薄膜を真空蒸着により形成し、フォトリソグラフィプロセスにより、レジスト塗布、フォトマスクを介した光照射、レジスト現像を行い、りん酸によるウエットエッチングによりアルミニウム配線25をパターン形成し、外部回路との接続を行った。水素雰囲気中でアニールし、それぞれFETのソース・ドレイン領域21、ヒーター22、温度センサ23とする。ソース、ドレイン領域の間が電界効果トランジスタのチャンネル24となる。

40

最後に、図5(e)に示すように、DNAプローブを固定化する。ガラス基板17の第2の表面(シリコン膜を形成した面と反対の表面)26において、電界効果トランジスタのチャンネルに対応する部分に核酸プローブ3を固定化し、遺伝子検出用FETとする。測定の高精度化を図るために、少なくとも遺伝子検出用FET、参照FET、ヒーター、温度

50

センサを同一のシリコン膜形成領域 19 の中に集積化することが望ましい。

絶縁物基板 17 の表面のうち、核酸プローブ 3 が形成された表面は溶液が導入されるため、配線、トランジスタなどの電子デバイスの信号線が時として溶液に接触して短絡し、動作不良を起こすことがある。本実施例では、溶液が接触する、核酸プローブ 3 が形成された面と反対側の面に配線 25 を形成し、信号線を取り出す構造としたので、溶液への接触による動作不良の問題は無くなり、信頼性の高い測定システムを提供することができる。図 6 は、こうして作製された DNA マイクロアレイの一例を示す平面図である。本例の DNA マイクロアレイは、絶縁物基板 17 に 144 個のシリコン膜形成領域 19 が分離形成されている。一つのシリコン膜形成領域 19 の大きさは $500\ \mu\text{m}$ 角である。シリコン膜形成領域 19 を裏面から見たときの拡大図を図 7 に示す。シリコン膜形成領域 19 の中にそれぞれ複数の pn 接合 20 を形成した。シリコン膜が p 型の場合は n 型の不純物拡散領域を形成し、シリコン膜が n 型の場合には p 型の不純物拡散領域を形成する。これらの不純物拡散領域を電界効果トランジスタのソース、ドレイン領域 21、あるいはヒーター 22、あるいは温度センサ 23 とした。各不純物拡散領域は電気配線 25 により外部の駆動回路と接続している。

10

図 7 に示すように、本実施例では 1 つのシリコン膜形成領域 19 に 2 個の電界効果トランジスタが形成されており、その 1 つを遺伝子検出用 FET、他を参照 FET とした。温度センサ 23 の出力を用いてヒーター 22 を制御することにより各シリコン膜形成領域 19 の温度を所定の値に設定することができ、解離温度 (melting temperature, T_m) のそろった核酸プローブを同一のシリコン膜形成領域 19 の遺伝子検出用 FET 上に固定化し、解離温度の異なる核酸プローブを異なるシリコン膜形成領域に固定化することにより、高精度の遺伝子検出を実現することができる。温度変化に伴い FET の特性も変化するが、遺伝子検出用 FET と参照 FET の差動測定を行うことにより、各 FET 出力の温度変化を相殺することができる。

20

図 8 に、図 6 に示した DNA マイクロアレイを裏面からみた斜視図を示す。電気配線 25 は裏面に形成され、核酸プローブは反対側の面に固定化される。

〔実施例 6〕

図 9 及び図 10 を用いて本発明の他の実施例を説明する。図 9 は本発明による放熱フィン付 DNA マイクロアレイを示す平面図、図 10 はそれを裏面から見た斜視図である。

実施例 5 と同様に、絶縁物基板 17 の第 1 の表面 18 にシリコン膜を形成し、フォトリソグラフィとエッチングにより不要な部分のシリコン膜を除去して、複数のシリコン膜形成領域 19 に分離した。シリコン膜の厚さは $0.1 \sim 10\ \mu\text{m}$ の範囲が好ましく、本実施例では $1\ \mu\text{m}$ とした。各シリコン膜形成領域 19 には、実施例 5 と同様に、遺伝子検出用 FET、参照 FET、ヒーター及び温度センサが形成されている。

30

各遺伝子検出用 FET に形成する核酸プローブの解離温度に応じて、それぞれ最適な反応温度でハイブリダイゼーション・洗浄を行うため、本実施例では各シリコン膜形成領域 19 を囲うように格子状の放熱フィン 27 をシリコン膜で形成し、各シリコン膜形成領域 19 の温度制御精度を向上させた。放熱フィン 27 はシリコン膜で形成されているので熱伝導性がよく、隣接するシリコン膜形成領域で発生する熱を効率よく放熱し、隣のシリコン膜形成領域への影響を低減し、独立に各シリコン膜形成領域 19 の温度を制御することができる。本実施例では、一つのシリコン膜形成領域 19 の大きさは $1\ \text{mm}$ 角、シリコン膜形成領域 19 と放熱フィン 27 との間隔は $0.5\ \text{mm}$ 、放熱フィン 27 の幅は $0.5\ \text{mm}$ とし、この構造により各シリコン膜形成領域 19 の温度を室温から 95°C まで 1°C の精度で制御できた。

40

図 10 は上記チップを裏面から見た斜視図である。本実施例ではシリコン膜形成領域及び放熱フィンをウェットエッチング技術により形成したため、その断面形状は三角形及び台形になっているが、たとえば、リアクティブ・イオン・エッチング (Reactive Ion Etching) 技術を用いれば矩形の断面形状のシリコン膜形成領域及び放熱フィンを製作することができる。

〔実施例 7〕

50

図 1 1 は、本発明による薄膜ゲート型遺伝子検出用 F E T チップの一例を示す断面図である。

本実施例の薄膜ゲート型遺伝子検出用 F E T チップは、実施例 5 で説明した D N A マイクロアレイにおいて、遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T のゲート部のガラス基板を薄くした構造である。薄膜ゲート部 2 8 のガラス基板の厚さは $0.01 \sim 1 \mu\text{m}$ の範囲が好ましく、本実施例では $0.1 \mu\text{m}$ とした。本構造により、F E T のトランスコンダクタンスを大きくすることができ、ゲート上で起こる電荷の変化を高感度に検出することができる。F E T のゲート部のみの薄膜化だけでなく、シリコン膜形成領域のガラス基板部分全体を薄膜化することもでき、薄膜化した凹部を反応セルとして使用することができる。

〔実施例 8〕

図 1 2 は、本発明による薄膜ゲート型遺伝子検出用 F E T チップの他の例を示す断面図である。

実施例 5 , 6 , 7 ではシリコン薄膜形成領域と反対面のガラス表面上に核酸プローブ 3 を形成する方式であるが、本実施例ではシリコン薄膜形成領域 1 9 上に形成した絶縁膜 2 であるシリコン酸化膜の上に、第 2 の絶縁膜 2 9 を形成し、その上に核酸プローブ 3 を固定化した。第 2 の絶縁膜 2 9 の材料としては窒化シリコン、酸化アルミニウム、酸化タンタルを用いることができる。本実施例では F E T のゲート絶縁膜の厚さを正確にコントロールすることができ、トランスコンダクタンスを大きくし、ゲート上で起こる電荷の変化を高感度に検出することができる。

〔実施例 9〕

図 1 3 は、本発明の薄膜ゲート型遺伝子検出用 F E T チップを用いた測定システムの一例を説明する図である。

少なくとも遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T を搭載した D N A マイクロアレイチップをフローセル 3 0 にマウントし、流路 3 1 に接続する。流路 3 1 にはハイブリダイゼーション液 3 2 及び洗浄液 3 3 がバルブ 3 4 を介して接続されており、ポンプ 3 5 を駆動して、ハイブリダイゼーション液及び洗浄液をフローセル 3 0 に導入することができる。また、試料及びインターカレータは分注器 3 6 によりバルブ 3 4 中に分注し、フローセル 3 0 に導入して遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T と反応させることができる。反応後、使用済みの液はポンプ 3 5 により廃液ボトル 3 7 に送られる。反応後の遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T の出力は信号処理回路 3 8 により処理 / 演算される。

図 1 4 に、フローセル 3 0 の構造を示す。フローセル 3 0 の中のプリント基板 3 9 に遺伝子検出用 F E T チップ 4 0 をマウントし、ワイヤー 4 1 で電氣的にプリント基板 3 9 と接続させる。プリント基板 3 9 にはピン 4 2 が設けられており、信号処理回路 3 8 と接続されている。試料溶液 4 3 は流路 3 1 により遺伝子検出用 F E T チップ 4 0 に導入される。試料溶液 4 3 が信号線となるワイヤー 4 1 に接触しないようにワイヤー部分を保護キャップ 4 4 で保護する。保護キャップ 4 4 の材料はアクリル、ポリプロピレン、ポリカーボネイトなどが適している。

図 1 5 に、フローセル 3 0 の分解図を示す。フローセル本体 3 0 には流路 3 1 となる直径 1 mm の穴が形成されており、遺伝子検出用 F E T チップ (D N A マイクロアレイ) 4 0 の表面に試料 / 試薬が導入される。流路 3 1 の入口部及び出口部にはネジ 4 5 がきつてあり、チューブ 4 6 を通したボルト 4 7 をねじ込むことにより、外部の流路系と接続した。チューブ 4 6 の端面は平坦化処理が施してあり、ボルトをねじ込むことにより平坦部がシール 4 8 として作用して液漏れを防ぐ。

本構成の遺伝子検出用 F E T 測定システムは、フロー方式の測定であるため多数の試料を連続に自動的に処理することができ、高スループットの測定に有効である。実施例 3 に示したインターカレータを用いる場合、次のステップで測定が行われる。

(1) 洗浄液をフローセル中に導入

(2) ハイブリダイゼーション液をフローセル中に導入 (洗浄液を置換)

(3) 各シリコン膜形成領域の温度を各核酸プローブの最適温度に設定

(4) 遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T の出力を測定、差の演算

10

20

30

40

50

- (5) 試料をバルブに分注して、ハイブリダイゼーション液でフローセルに導入
- (6) フローセル中でハイブリダイゼーション
- (7) 緩衝液をフローセルに導入して、未反応の試料を除去
- (8) インターカレータ溶液をフローセルに導入・反応
- (9) 緩衝液を導入して未反応のインターカレータ液を除去
- (10) 遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T の出力を測定、差の演算
- (11) 各シリコン膜形成領域の温度を 95 に設定
- (12) 洗浄液を導入して、フローセル中を洗浄
- (13) (1) に戻る

上記測定シーケンスを図 16 に示す。試料及びインターカレータを導入して洗浄し、F E T の出力電位を測定した後、シリコン膜形成領域の温度を 95 に上昇させて、ハイブリダイズした二本鎖 DNA を解離させて一本鎖 DNA とし、二本鎖に挿入されたインターカレータとともに洗浄液で除去する。すると、F E T のゲート上には核酸プローブのみが残り、最初の状態に戻って次の測定を行うことができる。

実施例 4 に示したイオンと複合体を形成する分子 (リガンド) を用いた S N P 解析の場合、次のステップで測定が行われる。

- (1) 洗浄液をフローセル中に導入
- (2) ハイブリダイゼーション液をフローセル中に導入 (洗浄液を置換)
- (3) 各シリコン膜形成領域の温度を各核酸プローブの最適温度に設定
- (4) 遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T の出力を測定、差の演算
- (5) 試料をバルブに分注して、ハイブリダイゼーション液でフローセルに導入
- (6) フローセル中でハイブリダイゼーション
- (7) 緩衝液をフローセルに導入して、未反応の試料を除去
- (8) 50 m M N a C l 溶液をフローセルに導入・反応
- (9) 遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T の出力を測定、差の演算
- (10) 50 m M K C l 溶液をフローセルに導入・反応
- (11) 遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T の出力を測定、差の演算

各 F E T の核酸プローブ情報と N a C l 中及び K C l 中の差動出力から N o r m a l / N o r m a l 、 M u t a n t / M u t a n t 、 N o r m a l / M u t a n t を判定

- (12) 緩衝液を導入して K C l 溶液を除去
- (13) 各シリコン膜形成領域の温度を 95 に設定
- (14) 洗浄液を導入して、フローセル中を洗浄
- (15) (1) に戻る

産業上の利用可能性

本発明では、電界効果トランジスタのゲート絶縁物表面に核酸プローブを固定化し、ターゲット遺伝子とゲート絶縁物表面でハイブリダイゼーションを行わせ、その際に生ずる表面電荷密度の変化を電界効果を利用して検出する方式の DNA マイクロアレイを提供する。表面電荷密度の変化を大きくするために、核酸自身が持っている電荷に加えて、インターカレータの導入やイオンなどの荷電粒子と複合体を形成する分子を核酸に標識することにより、大きな信号 / 雑音比で表面電位変化のポテンシオメトリック検出が可能な DNA マイクロアレイを実現できる。本発明の DNA マイクロアレイシステムは高価なレーザや複雑な光学検出系を必要とせず、また電流検出 (アンペロメトリック) 方式と異なり、絶縁物基板に核酸プローブを固定化して平衡状態での表面電位を検出するので、基板の腐食やガスの発生、酸化 / 還元物質の妨害などによる信号値の不安定性は問題とならず、安定性に優れた高精度の遺伝子検出が可能となる。

【図面の簡単な説明】

図 1 は、本発明による遺伝子検出用電界効果トランジスタの一例を説明する断面模式図である。

図 2 は、本発明の遺伝子検出用電解効果トランジスタを用いた測定システムの構成例を示す図である。

10

20

30

40

50

図 3 は、本発明の DNA マイクロアレイとインターカレータを組み合わせた測定システムの説明図である。

図 4 は、本発明の DNA マイクロアレイと標識分子を組み合わせた測定システムの説明図である。

図 5 は、本発明の薄膜ゲート型遺伝子検出用 F E T チップ (DNA マイクロアレイ) の製作工程を説明する図である。

図 6 は、本発明の DNA マイクロアレイの一例を示す平面図である。

図 7 は、F E T、ヒーター、温度センサの配置例の説明図である。

図 8 は、本発明の DNA マイクロアレイを裏面から見た斜視図である。

図 9 は、本発明による放熱フィン付 DNA マイクロアレイを示す平面図である。

図 10 は、本発明による放熱フィン付 DNA マイクロアレイを裏面から見た斜視図である。

図 11 は、本発明による薄膜ゲート型遺伝子検出用 F E T チップの一例を示す断面図である。

図 12 は、本発明による薄膜ゲート型遺伝子検出用 F E T チップの他の例を示す断面図である。

図 13 は、本発明の薄膜ゲート型遺伝子検出用 F E T チップを用いた測定システムの説明図である。

図 14 は、本発明の遺伝子検出用 F E T チップを装備したフローセルの説明図である。

図 15 は、図 14 に示したフローセルの分解図である。

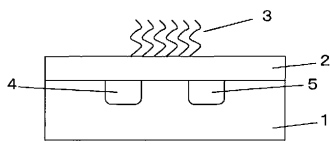
図 16 は、本発明の遺伝子検出用 F E T による測定プロトコルの説明図である。

10

20

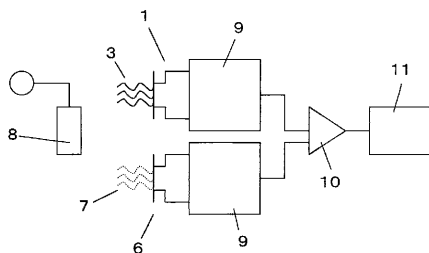
【 図 1 】

図1



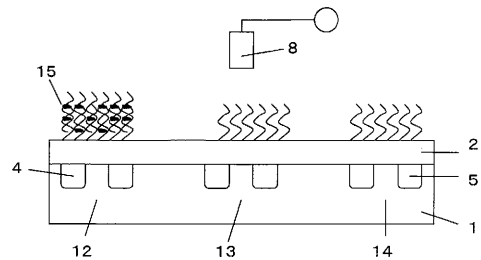
【 図 2 】

図2



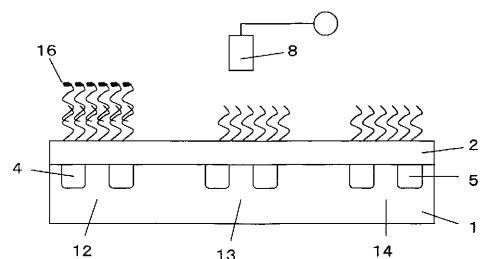
【 図 3 】

図3



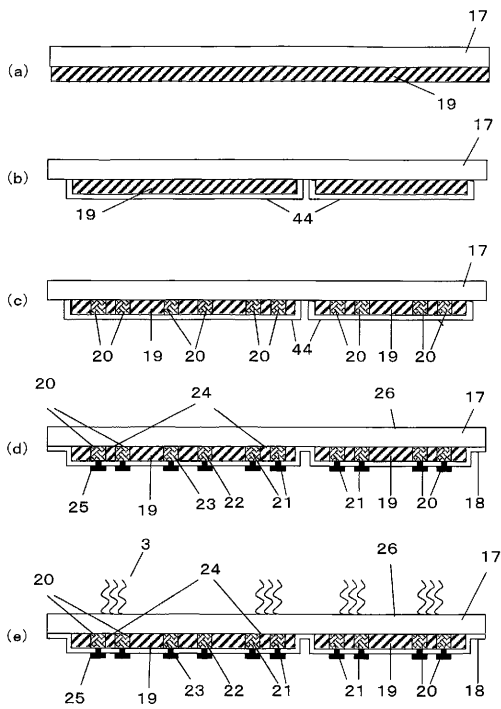
【 図 4 】

図4



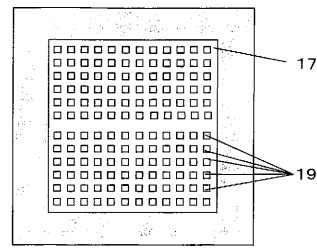
【 図 5 】

図5



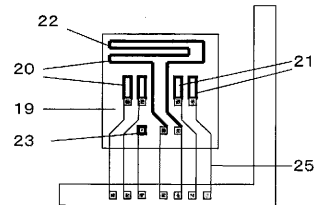
【 図 6 】

図6



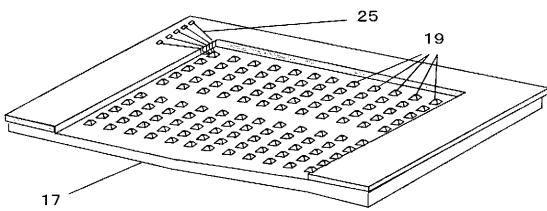
【 図 7 】

図7



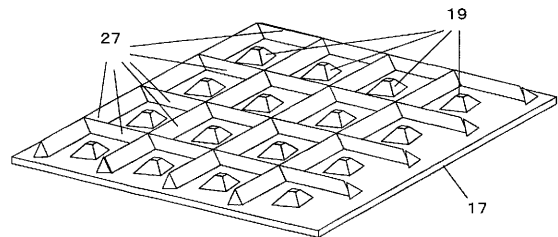
【 図 8 】

図8



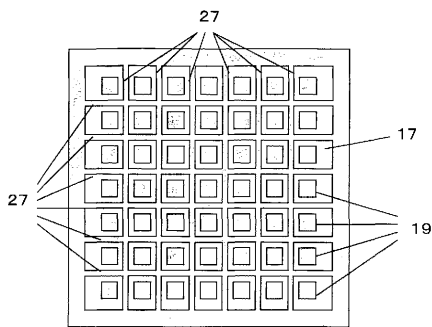
【 図 10 】

図10



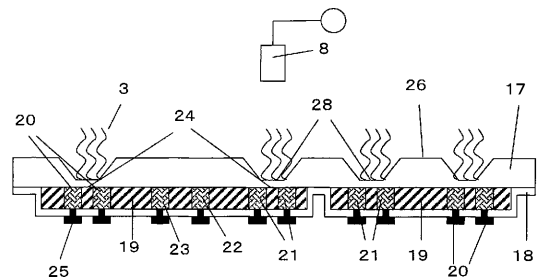
【 図 9 】

図9



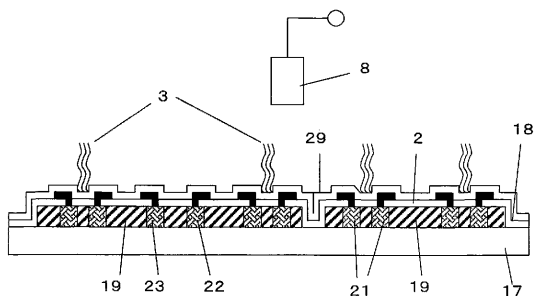
【 図 11 】

図11



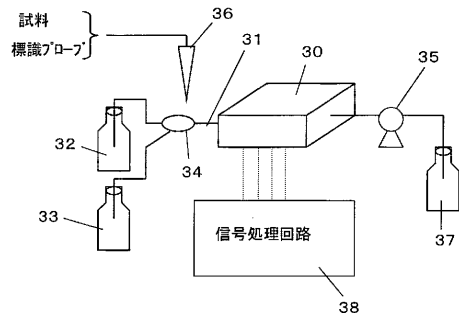
【図12】

図12



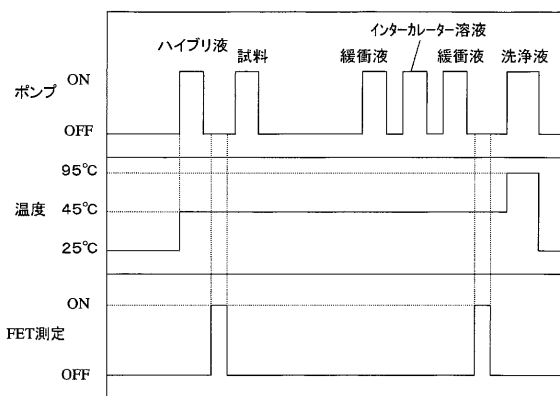
【図13】

図13



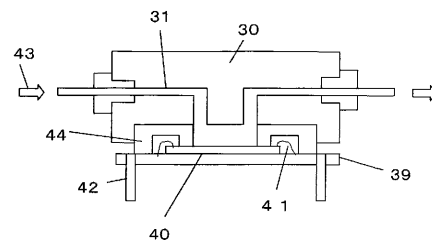
【図16】

図16



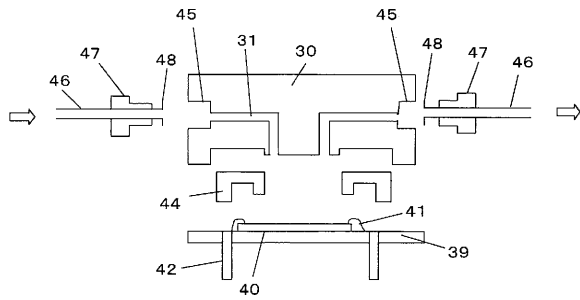
【図14】

図14



【図15】

図15



【手続補正書】

【提出日】平成16年8月3日(2004.8.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の詳細な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

- (1) 明細書第8頁6行目の「アビジン」を「ピオチン」と訂正する。
- (2) 明細書第9頁下から1行目の「第1のF E T 1 3」を「第1のF E T 1 2」と訂正する。
- (3) 明細書第13頁17 - 18行に「Normal DNAにはバリノマイシン、Mutant DNAにはビスクラウンエーテルで標識化した。」とあるを、「Normal DNAにはビスクラウンエーテル、Mutant DNAにはバリノマイシンで標識化した。」と訂正する。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11150

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/09, C12Q1/68, C12M1/00, H01L29/06, H01L29/66 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) Int.Cl ⁷ C12N15/09, C12Q1/68, C12M1/00, H01L29/06, H01L29/66 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) JICST FILE (JOIS) MEDLINE (STN) WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG) INSPEC (DIALOG) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | Yuji MIYAHARA, "Microfabrication-gijutsu o Mochiiru Biosensing System", Chromatography, May 2001, Vol.22, pages 83 to 84 | 1-11 |
| A | Yi CUI et al., Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species, Science, August 2001, Vol.293, No.5533, pages 1289 to 1292 | 1-11 |
| A | Graham RAMSAY et al., DNA chips: State-of-the art, Nature Biotechnology, 1998, Vol.16, No.1, pages 40 to 44 | 1-11 |
| A | EP 882979 A1 (Commissariat A L'energie Atomique), 09 December, 1998 (09.12.98), & JP 11-31806 A & FR 2764386 A | 1-11 |
| <input checked="" 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 "E" earlier document but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 30 April, 2002 (30.04.02) | | Date of mailing of the international search report 14 May, 2002 (14.05.02) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11150

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | S.AMEUR et al., Immunosensing Using Electrochemical Impedance Spectroscopy on Functionalized Gold Electrodes., Chemical and Biological Sensors and Analytical Electrochemical Methods, 1997, pages 1019 to 1023 | 1-11 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/11150

| | |
|---|---|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) | |
| Int. Cl ⁷ C12N 15/09, C12Q 1/68, C12M 1/00, H01L 29/06, H01L 29/66 | |
| B. 調査を行った分野 | |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) | |
| Int. Cl ⁷ C12N 15/09, C12Q 1/68, C12M 1/00, H01L 29/06, H01L 29/66 | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) | |
| JICST7ファイル(JOIS) MEDLINE(STN) WPI(DIALOG) BIOSIS(DIALOG) INSPEC(DIALOG) | |
| C. 関連すると認められる文献 | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 |
| A | 宮原 裕二, Microfabrication技術を用いるバイオセンシングシステム, Chromatography, May 2001, Vol. 22, p. 83-84 |
| A | Yi CUI et al., Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species, Science, August 2001, Vol. 293, No. 5533, p. 1289-1292 |
| A | Graham RAMSAY et al., DNA chips: State-of-the art, NATURE BIOTECHNOLOGY, 1998, Vol. 16, No. 1, p. 40-44 |
| | 関連する 請求の範囲の番号 |
| | 1-11 |
| | 1-11 |
| | 1-11 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | |
| * 引用文献のカテゴリー | |
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの |
| 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの | 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの |
| 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」 同一パテントファミリー文献 |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | |
| 国際調査を完了した日 30.04.02 | 国際調査報告の発送日 14.05.02 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 |

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/JPO1/11150 |
|---------------------|---|-----------------------|
| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | EP 882979 A1 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 1998.12.09 & JP 11-31806 A & FR 2764386 A | 1-11 |
| A | S.AMEUR et al., Immunosensing Using Electrochemical Impedance Spectroscopy on Functionalized Gold Electrodes., Chemical and Biological Sensors and Analytical Electrochemical Methods, 1997, p.1019-1023 | 1-11 |

 フロントページの続き
(51) Int.Cl.⁷

F I

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/543 5 9 3

G 0 1 N 33/543

G 0 1 N 37/00 1 0 2

G 0 1 N 37/00

C 1 2 N 15/00 F

G 0 1 N 27/30 3 0 1 R

(72)発明者 服部 久美子

茨城県ひたちなか市市毛 8 8 2 番地 株式会社 日立ハイテクノロジーズ 設計・製造統括本部
那珂事業所内

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。