

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3758183号
(P3758183)

(45) 発行日 平成18年3月22日(2006.3.22)

(24) 登録日 平成18年1月13日(2006.1.13)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	M
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64	F
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78	C
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483	C

請求項の数 8 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-343020 (P2001-343020)	(73) 特許権者	000006507
(22) 出願日	平成13年11月8日(2001.11.8)		横河電機株式会社
(65) 公開番号	特開2003-149238 (P2003-149238A)		東京都武蔵野市中町2丁目9番32号
(43) 公開日	平成15年5月21日(2003.5.21)	(72) 発明者	大坪 実
審査請求日	平成15年8月20日(2003.8.20)		東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河電機株式会社内
		(72) 発明者	田名網 健雄
			東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河電機株式会社内
		審査官	加々美 一恵

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオチップおよびそれを用いた遺伝子配列測定装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の既知の生体高分子を配置し、蛍光物質で標識した未知の生体高分子と前記既知の生体高分子とをハイブリダイゼーションさせるバイオチップにおいて、前記蛍光物質から発生する蛍光を反射すると共に前記未知の生体高分子を引き寄せ電圧が印加される一方の電極として用いられる金属層と、この金属層の上に前記蛍光の波長の $1/4 + i/2$ ($i = 0, 1, 2, \dots$) の厚みを有する透明層が積層された蛍光強度増強部を備え、前記金属層または前記透明層に前記既知の生体高分子が固定され、前記ハイブリダイゼーションが電界促進型または電流促進型で行われることを特徴とするバイオチップ。

10

【請求項2】

前記金属層は Ag または Al で形成され、前記透明層はガラスまたはゲルまたは樹脂で形成されたことを特徴とする請求項1のバイオチップ。

【請求項3】

前記電界促進型または前記電流促進型における電極への印加電圧は直流または交流またはパルスであることを特徴とする請求項1または請求項2に記載のバイオチップ。

【請求項4】

複数の既知の生体高分子を配置し、蛍光物質で標識した未知の生体高分子と前記既知の生体高分子とをハイブリダイゼーションさせて前記未知の生体高分子の遺伝子配列を測定するように構成された遺伝子配列測定装置において、

20

前記未知の生体高分子を含んだ溶液が充填されたカートリッジと、
前記蛍光物質から発生する蛍光を反射すると共に前記未知の生体高分子を引き寄せ電圧が印加される一方の電極として用いられる金属層と、この金属層の上に前記蛍光の波長の $1/4 + i/2$ ($i = 0, 1, 2, \dots$) の厚みを有する透明層が積層された蛍光強度増強部を備え、前記金属層または前記透明層に前記既知の生体高分子が固定され、前記カートリッジ内に取り付けられて、前記既知の生体高分子と前記未知の生体高分子とをハイブリダイゼーションさせるバイオチップと、

前記未知の生体高分子を引き寄せ電圧が印加される他方の電極と、
前記金属層と前記他方の電極に電圧を印加する手段と、
を有することを特徴とする遺伝子配列測定装置。

10

【請求項 5】

前記他方の電極は、ハイブリダイゼーション後に前記カートリッジから取り外せるかまたは透明電極で形成されたことを特徴とする請求項 4 に記載の遺伝子配列測定装置。

【請求項 6】

前記他方の電極はカートリッジの内面に取り付けられ、ハイブリダイゼーションが電流促進型で行われるように構成されたことを特徴とする請求項 4 に記載の遺伝子配列測定装置。

【請求項 7】

前記バイオチップの金属層が Ag または Al で形成され、透明層がガラスまたはゲルあるいは樹脂で形成されたことを特徴とする請求項 4 から請求項 6 のいずれかに記載の遺伝子配列測定装置。

20

【請求項 8】

前記電圧を印加する手段は、直流または交流あるいはパルス電圧を印加することができるように構成されたことを特徴とする請求項 4 から請求項 7 のいずれかに記載の遺伝子配列測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNA や蛋白等の生体高分子の遺伝子の配列を調べるためのバイオチップおよびそれを用いた遺伝子配列測定装置に関するものである。

30

【0002】

【従来の技術】

既知の DNA を固定した基板の上に未知の DNA を流してハイブリダイゼーションすることにより、対応する DNA 配列に未知の DNA を結合させることができる。この場合、未知の DNA 側に蛍光試薬を結合しておくことにより、既知の DNA と結合した未知の DNA 配列を知ることができる。

【0003】

図 4 (a) に示すように、既知の DNA 2 が固定された電極 1 に正の電圧を印加すると、DNA が負に帯電しているため、未知の DNA 3 は同図 (b) に示すように電極 1 側に引き寄せられる。これにより数時間かかっていたハイブリダイゼーションは数十秒で完了することになる。

40

【0004】

この原理を応用してハイブリダイゼーションを高速化するものとして、例えば、特願平 2000-271357 号に記載の遺伝子配列を計測するための測定装置がある。この測定装置は図 5 のように構成されている。絶縁体で形成されたカートリッジ 11 の内部には、既知の DNA 2 と未知の DNA 3 が混入した液体が密封状に充填されている。

【0005】

既知の DNA 2 は同図 (a) のようにカートリッジ 11 の壁面に固定化されている。カートリッジ 11 を挟んで配置された正電極 12 と負電極 13 に電圧源 14 から電圧が印加されると、浮遊している未知の DNA 3 は負に帯電しているため同図 (b) に示すように正

50

電極 1 2 側に引き寄せられて既知の DNA 2 に接近する。このようにしてハイブリダイゼーションの高速化が可能となる。

【 0 0 0 6 】

また、未知の DNA を蛍光物質で標識しておき、これに励起光を照射して蛍光を発生させる場合、検出される蛍光強度が強ければ強いほどその系における検出感度は高くなる。すなわち、より微量の蛋白質や核酸を定量することが可能となる。このため、等量の蛍光物質からの蛍光を増強することは極めて有意義なことである。

【 0 0 0 7 】

米国特許 4, 649, 280 には、図 6 に示すようにガラス基板 21 の上に金属 22、誘電体 23、蛍光物質 24 を重ねた構造として、蛍光物質 24 から発生する蛍光の強度を増幅できるようにした蛍光強度増強チップが記載されている。

10

【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、従来のこれらチップには次のような課題があった。

高速ハイブリダイゼーション用のチップの場合、

(a) カートリッジにはある程度の厚みが必要であるため、電極間距離が長くなり、電界強度が低下する。

(b) カートリッジや電極などの部品が必要となる構成であるため部品点数が多くなる。

(c) ハイブリダイゼーションの速度は速くなるが感度が向上するわけではない。

【 0 0 0 9 】

20

他方、蛍光強度増強チップの場合は、感度は向上するがハイブリダイゼーション速度が速くなるわけではない。

【 0 0 1 0 】

本発明の目的は、上記の課題を解決するもので、蛍光強度増強部により高感度化を図ると共に、蛍光強度増強部の金属層を未知の生体高分子を引き寄せる電圧が印加される電極に兼用してハイブリダイゼーションを行うことにより、別途正電極を設けることなく、また電極間の距離を短くでき、ハイブリダイゼーションの高速化が容易に行えるバイオチップおよび遺伝子配列測定装置を実現することにある。

【 0 0 1 1 】

【課題を解決するための手段】

30

このような目的を達成するために、請求項 1 の発明では、

複数の既知の生体高分子を配置し、蛍光物質で標識した未知の生体高分子と前記既知の生体高分子とをハイブリダイゼーションさせるバイオチップにおいて、

前記蛍光物質から発生する蛍光を反射すると共に前記未知の生体高分子を引き寄せる電圧が印加される一方の電極として用いられる金属層と、この金属層の上に前記蛍光の波長の $1/4 + i/2$ ($i = 0, 1, 2, \dots$) の厚みを有する透明層が積層された蛍光強度増強部を備え、

前記金属層または前記透明層に前記既知の生体高分子が固定され、前記ハイブリダイゼーションが電界促進型または電流促進型で行われることを特徴とする。

このようなバイオチップによれば、ハイブリダイゼーションの高速化と高感度化を実現できる。

40

また、金属層がハイブリダイゼーション用の一方の電極を兼ねるため従来のバイオチップに比べて部品点数が減り、また薄い透明層により絶縁されるため電極間距離を短くすることができるという効果がある。

【 0 0 1 2 】

また、請求項 4 の発明では、

複数の既知の生体高分子を配置し、蛍光物質で標識した未知の生体高分子と前記既知の生体高分子とをハイブリダイゼーションさせて前記未知の生体高分子の遺伝子配列を測定するように構成された遺伝子配列測定装置において、

前記未知の生体高分子を含んだ溶液が充填されたカートリッジと、

50

前記蛍光物質から発生する蛍光を反射すると共に前記未知の生体高分子を引き寄せる電圧が印加される一方の電極として用いられる金属層と、この金属層の上に前記蛍光の波長の $1/4 + i/2$ ($i = 0, 1, 2, \dots$) の厚みを有する透明層が積層された蛍光強度増強部を備え、前記金属層または前記透明層に前記既知の生体高分子が固定され、前記カートリッジ内に取り付けられて、前記既知の生体高分子と前記未知の生体高分子とをハイブリダイゼーションさせるバイオチップと、

前記未知の生体高分子を引き寄せる電圧が印加される他方の電極と、
前記金属層と前記他方の電極に電圧を印加する手段と、
を有することを特徴とする。

このような構成によれば、特有の構造の蛍光強度増強部を使用したことおよびその金属層を電極としても兼用したことにより、一方の電極を別途を設ける必要がないので部品点数が少なく、従来の遺伝子配列測定装置に比べてハイブリダイゼーションの高速化が図れると共に高感度化が同時に実現できる遺伝子配列測定装置を容易に得ることができる。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下図面を用いて本発明を詳しく説明する。図1は本発明に係るバイオチップを用いた測定装置の一実施例を示す要部構成図である。

図1において、図5と同等部分には同一符号を付してある。図5と異なるところは、透明材料で形成されたカートリッジ11aの底面が蛍光強度増強部30で形成され、カートリッジ11aの上面には着脱可能に構成された負電極13が取り付けられた構造になっている点である。

【0014】

図2は蛍光強度増強部30の部分拡大図である。この蛍光強度増強部30は、ガラス基板31の上に金属層32と透明層33が積層された構造であり、カートリッジ11aの底面に、透明層33が内側になるようにして密封状に取り付けられている。

この場合、金属層32は蛍光強度増強用の反射ミラーの作用効果を持つが、ハイブリダイゼーションの正電極としても兼用される。また、透明層33はハイブリダイゼーションにおける絶縁体としても兼用される。

【0015】

この場合、透明層33は、所定の厚さ、例えば蛍光の波長の $1/4$ あるいはこれに $1/2$ 波長の整数倍を加えた厚さ[すなわち、蛍光の波長の $1/4 + i/2$ (ただし $i = 0, 1, 2, \dots$) の厚さ]であれば、蛍光強度を増強する作用があり、ガラス、ゲルあるいは樹脂などの材質で形成されたものである。金属層32はAgあるいはAlなどで形成されている。

【0016】

このような構成における動作を次に説明する。既知のDNA2は蛍光強度増強部30の透明層33の表面に固定化されている。溶液と絶縁された蛍光強度増強用の金属層32は正電極として利用する。この正電極と負電極13は対向しており、この電極に挟まれた領域に、荷電したDNAなどの生体高分子溶液が存在する形である。

【0017】

電圧源14より上記電極に電圧を印加し、電界をかける。DNAは負に荷電しているため正電極側に引き寄せられ、未知のDNA3が相補的な関係にある既知のDNAとハイブリダイゼーションする。

ハイブリダイゼーション後は電極への電圧印加を取りやめ、負電極13をカートリッジ11aから取り外す。

【0018】

既知のDNAに結合した未知のDNA3には蛍光標識がしてあるので、カートリッジ11aの蛍光強度増強部30を蛍光測定するとその未知のDNAの配列を測定することができる。

【0019】

10

20

30

40

50

本発明は、上記実施例に限定されることなく、その本質から逸脱しない範囲で更に多くの変更、変形をも含むものである。

例えば、負電極 1 3 を透明電極とすれば、ハイブリダイゼーション後の DNA 配列測定時には電極を取り外さなくても測定することができる。

また、金属膜 3 2 としては、A g または A 1 が使用できる。

【0020】

また、上記実施例は溶液に電界を印加してハイブリダイゼーションを高速化するいわゆる電界促進型であるが、図 3 に示すような電流促進型とすることもできる。図 3 において、1 3 a は負電極、3 0 a は金属層 3 2 と透明層 3 3 から構成される蛍光強度増強部である。負電極 1 3 a と蛍光強度増強部 3 0 a の金属層 3 2 (正電極を兼ねている)は、絶縁体のカートリッジ 1 1 の内壁面に取付けられている。なお、負電極 1 3 a は金属層 3 2 と離れた位置にあればカートリッジ内面の何処に取り付けても構わない。

10

【0021】

このような構成においても、図 1 の場合と同様に蛍光強度増強部 3 0 の透明層 3 3 の表面に既知の DNA 2 が固定化されていて、電圧源 1 4 から電圧を印加すると(溶液中に電流は流れるが)、負に帯電した未知の DNA 3 は正電極(金属層 3 2)側に引き寄せられ、相補的な関係にある既知の DNA 2 とハイブリダイゼーションする。

【0022】

また、図 1 および図 3 に示す透明層 3 3 としては、ガラスに限らず、ゲルや樹脂を使用することもできる。また、電圧源 1 4 からの印加電圧は、直流に限らず、交流やパルスであっても構わない。

20

また、既知の DNA は透明層 3 3 の表面ではなく、下地の金属層 3 2 に固定してもよい。これは透明層がゲルなどの場合に特に有効である。

【0023】

【発明の効果】

以上説明したように本発明によれば次のような効果がある。

(1) 蛍光強度増強部の使用および蛍光強度増強部の金属層を電極に兼用することにより、電界促進型あるいは電流促進型のハイブリダイゼーションの高速化と高感度化が同時に実現できる。

(2) 蛍光強度増強部の金属層を電極に兼用したため、従来のように別途正電極を設ける必要はなく、部品点数は少なくなる。

30

(3) 薄い透明層で絶縁されるため電極間距離を容易に短くすることができ、カートリッジの小型化、ハイブリダイゼーションの高速化が容易に実現できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明に係るバイオチップを用いた測定装置の一実施例を示す要部構成図である。

【図 2】蛍光強度増強部の部分拡大図である。

【図 3】本発明に係るバイオチップを用いた測定装置の他の実施例を示す要部構成図である。

【図 4】DNA を電極に引き寄せせる場合の説明図である。

40

【図 5】従来の測定装置の一例を示す構成図である。

【図 6】従来の蛍光強度増強チップの一例を示す構成図である。

【符号の説明】

2 既知の DNA

3 未知の DNA

1 1, 1 1 a カートリッジ

1 2 正電極

1 3 負電極

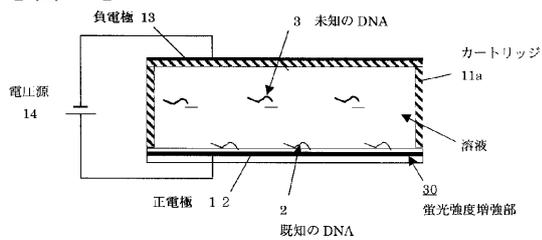
1 4 電圧源

3 0, 3 0 a 蛍光強度増強部

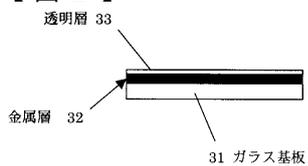
50

- 3 1 ガラス基板
- 3 2 金属層
- 3 3 透明層

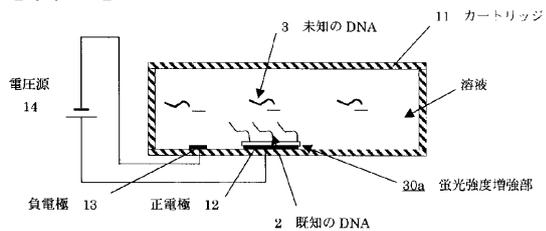
【図 1】



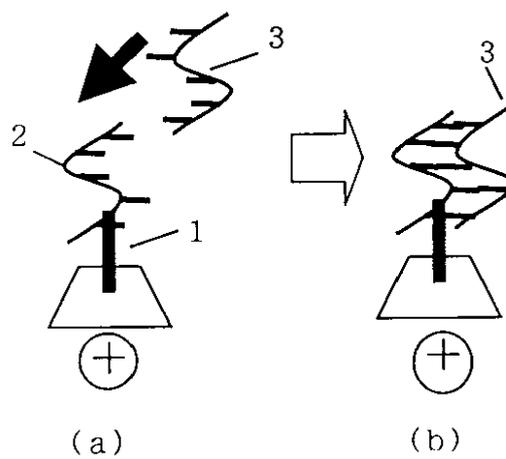
【図 2】



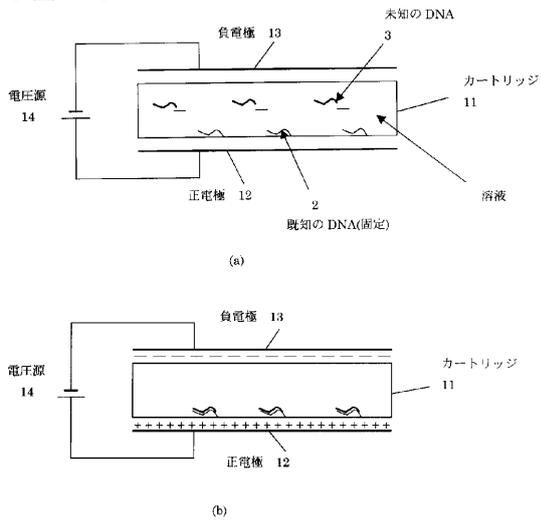
【図 3】



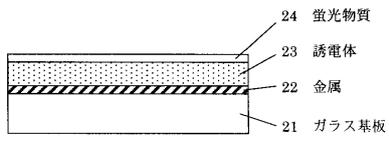
【図 4】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
G 0 1 N 37/00 (2006.01) G 0 1 N 37/00 1 0 2

(56) 参考文献 特開 2 0 0 0 - 0 6 0 5 5 4 (J P , A)
特開 2 0 0 1 - 1 5 3 8 7 0 (J P , A)
米国特許第 0 4 6 4 9 2 8 0 (U S , A)
国際公開第 9 8 / 5 3 3 0 4 (W O , A 1)

(58) 調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/48-33/98

C12M 1/00

G01N 21/64

G01N 21/78

G01N 37/00