

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DNAポリメラーゼを含む測定溶液を収める容器と、
 表面に一本鎖又は二本鎖DNAが結合され前記測定溶液中に配置された球状の担体と、
 前記担体の形状と適合した球面状の凹部が表面に形成された電極を有し、当該電極の近傍領域の電気的狀態を検出するセンサと、
 dNTP (NはA、C、G又はT) 又はその誘導体を含む溶液を選択的に注入する手段とを有し、
 前記電極の表面に前記担体を近接させて前記電気的狀態を検出することを特徴とするDNA計測システム。

10

【請求項 2】

請求項 1 記載のDNA計測システムにおいて、前記電極に対する前記担体の相対位置を制御するための機構を備えることを特徴とするDNA計測システム。

【請求項 3】

請求項 2 記載のDNA計測システムにおいて、前記機構は圧力波発生機能を有することを特徴とするDNA計測システム。

【請求項 4】

請求項 2 記載のDNA計測システムにおいて、前記機構は磁場発生機能を有し、前記担体は磁性体であることを特徴とするDNA計測システム。

【請求項 5】

請求項 2 記載のDNA計測システムにおいて、前記機構は温度制御機能を有することを特徴とするDNA計測システム。

20

【請求項 6】

請求項 1 記載のDNA計測システムにおいて、 r_1 を前記担体の半径、 r_2 を前記電極表面の凹部の曲率半径、 θ を前記担体が前記電極表面の凹部に接したときの、前記担体中心から接面方向への立体角 $2(1-\cos\theta)$ を与えるパラメータ、 d をDebye長、 ρ を前記担体に固定されたDNAの密度、 I_r を前記センサのリーク電流値、 t_a を前記電気的狀態を検出する時間間隔、 C をクーロンから電子数への変換係数とすると、次の関係を満たすことを特徴とするDNA計測システム。

【数 1】

$$r_2 - \sqrt{r_2^2 - 2(1 - \cos\theta)r_1r_2 + 2(1 - \cos\theta)r_1^2} < D$$

$$r_1 < r_2$$

$$2\pi(1 - \cos\theta)r_1^2d > I_r t_a C$$

30

【請求項 7】

請求項 1 記載のDNA計測システムにおいて、前記センサは絶縁ゲート電界効果トランジスタを備え、前記電極は前記絶縁ゲート電界効果トランジスタのゲートと導電性配線で接続されていることを特徴とするDNA計測システム。

【請求項 8】

請求項 1 記載のDNA計測システムにおいて、前記電極は貴金属からなることを特徴とするDNA計測システム。

40

【請求項 9】

請求項 1 記載のDNA計測システムにおいて、複数の前記センサが同一の基板に配置されていることを特徴とするDNA計測システム。

【請求項 10】

請求項 9 記載のDNA計測システムにおいて、前記容器内に複数のウェルを区画するセクションング層を有し、各ウェルに前記センサと前記担体が一つずつ配置されていることを特徴とするDNA計測システム。

【請求項 11】

50

請求項 10 記載のDNA計測システムにおいて、前記容器は蓋を有し、前記セクショニング層の上面から前記蓋までの高さが前記担体の直径よりも小さいことを特徴とするDNA計測システム。

【請求項 12】

請求項 7 記載のDNA計測システムにおいて、前記電極は前記基板上で前記ゲートの直上位置から空間的に離れた位置に配置されていることを特徴とするDNA計測システム。

【請求項 13】

請求項 12 記載のDNA計測システムにおいて、前記ゲートは遮光膜によって覆われていることを特徴とするDNA計測システム。

【請求項 14】

一本鎖DNAが固定化された球形の担体の表面にターゲットDNAを結合させる工程と、前記ターゲットDNAを結合させた前記担体を、ポリメラーゼを含む溶液に浸漬する工程と、

dNTP (NはA、C、G又はT) 又はその誘導体を含む溶液を選択的に注入する工程と、前記担体を、表面に前記担体の形状と適合した球面状の凹部が形成された電極を有し、当該電極の近傍領域の電気的狀態を検出するセンサの前記電極表面に近づける工程と、前記センサによって前記電極の近傍領域の電気的狀態を計測する工程とを有することを特徴とするDNA計測方法。

【請求項 15】

請求項 14 記載のDNA計測方法において、前記近づける工程と前記計測する工程とが同期していることを特徴とするDNA計測方法。

【請求項 16】

請求項 14 記載のDNA計測方法において、前記溶液を交換する工程と、前記担体を前記電極表面から遠ざける工程とを有し、当該 2 つの工程が同期していることを特徴とするDNA計測方法。

【請求項 17】

請求項 14 記載のDNA計測方法において、前記近づける工程が圧力波によるものであることを特徴とするDNA計測方法。

【請求項 18】

請求項 14 記載のDNA計測方法において、前記近づける工程が磁場によるものであることを特徴とするDNA計測方法。

【請求項 19】

請求項 14 記載のDNA計測方法において、前記近づける工程が温度変化によるものであることを特徴とするDNA計測方法。

【請求項 20】

請求項 16 記載のDNA計測方法において、前記近づける工程と前記遠ざける工程が同一の機構によって行われることを特徴とするDNA計測方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はDNA又はRNA等の生体物質を非修飾で計測する計測システム及びそれを用いた計測方法に関し、特に電界効果トランジスタ(FET)を用いた計測システム及び計測方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年の塩基配列解析技術の著しい進歩により、ヒトゲノムは標準的全塩基配列が決定されており、個体間の遺伝子相違を直接比較することが可能となっている。特に、疾患関連遺伝子に関しては、SNPsを用いた遺伝子的解析により、候補領域の絞込みが行われており、その領域の健常者と患者の間での配列比較が可能である。しかし、現状のDNAシーケンサを一台用いて 1 人のゲノム解析を行うには、莫大なコストと長い時間がかかるため、格

10

20

30

40

50

段に低コストで高スループットのDNAシーケンサが必要となる。このような背景のもと、アメリカのNational Institutes of Healthは、現実的な費用で1人のゲノム解読を行うことを目標に掲げて、DNA解析技術の開発を行っている。従来のDNAシーケンサより格段に低コストで高スループットのDNAシーケンサを実現するために、同時に処理するサンプル数を一桁以上増やした超並列方式DNAシーケンサが開発されている。超並列方式では、同時処理数を増やすために、シーケンスを行う反応部を微細化して高密度にしており、これにより使用する試薬量を削減でき、解読コストを低くできる。

【0003】

現在開発されている超並列方式DNAシーケンサとしては、プローブDNAにターゲットDNAをハイブリダイズさせ、相補鎖伸長反応で生成するピロリン酸をATPに変え、ATPにルシフェリンを作用させて発光させ、この生物発光を検出することにより相補鎖伸長反応で取り込まれた基質（デオキシリボヌクレオチド三リン酸、dNTP）を知ること、順次塩基配列決定を行うピロシーケンシング法を高密度に行うピロシーケンシング装置(Nature 2005, Vol.437, pp.376-380)や、ガラス基板上に固定化されたプローブDNAにターゲットDNAをハイブリダイズさせ、相補鎖伸長反応により取り込まれたdNTPをdNTPに標識した蛍光体を検出することにより、相補鎖伸長反応で取り込まれたdNTPを知り、順次塩基配列決定を行う蛍光検出法を高密度に行う単分子DNAシーケンシング装置(PNAS 2003, Vol.100, pp.3960-3964)がある。

10

【0004】

上記したピロシーケンシング装置では、ピロシーケンスを行う反応部を微細化して高密度化するために、emulsion(em)PCR増幅を用いてターゲットDNA断片を固定した直径約30 μm のビーズを、アレイ化した直径約45 μm のウェル内に1つずつ配置する。アレイ状のウェルを注入口と排出口を有するフローセルに設置し、4種のdNTP溶液を順次交換することによりピロシーケンスを行う。ピロシーケンスの原理に従い、伸長反応に伴い生じる発光を各ウェルに対応した光ファイバを通してCCD上に画像化することにより、前記ビーズに固定されたターゲットDNA分子の塩基配列を平均約100塩基決定することができる。その際、各ビーズにはそれぞれ異なるターゲットDNAが固定化されており、一回の解析で45万種のターゲットDNAを並列に処理できる。

20

【0005】

上記した単分子DNAシーケンシング装置では、2種類の蛍光体(蛍光体Cy3及び蛍光体Cy5)をプローブDNA及び基質であるdNTPの標識に用い、2種類のレーザー(波長532 nm及び635 nm)を標識されたプローブDNA及び基質の検出に用いている。ガラス基板上に単一のターゲットDNA分子をビオチン-アビジンの結合を利用して固定し、次にCy3で標識したプローブDNAをターゲットDNA分子にハイブリダイズさせる。この時、波長532 nmのレーザーのエバネッセント照射によってCy3を蛍光検出することで、ターゲットDNA分子の結合位置を確認する。次に、溶液中に、ポリメラーゼ及びCy5で標識された一種の塩基のdNTP(NはA、C、G、Tのいずれか)を導入すると、相補伸長反応が起こる場合に限り、蛍光標識dNTP分子がプローブDNAの伸長鎖に取り込まれる。伸長反応の有無は、波長635 nmのレーザーのエバネッセント照射により生じる蛍光を検出することによって確認する。その後、Cy5を高出力の波長635 nmのレーザー照射によって蛍光退色させる。以上のdNTPの取り込み反応プロセスを、順次繰り返すことによって、ターゲットDNA分子の塩基配列を決定することが可能となる。本方式では直径100 μm の視野で二、三百のターゲットDNAを並列に処理することができるので、自動化されたスキャンステージを使えば、25 mm角の領域で1200万個のターゲットDNAを並列に処理することが可能である。

30

40

【0006】

一方、上記した発光用の試薬及び酵素や、蛍光用の蛍光体を用いなく、FETセンサのソースとドレイン間の上に形成されたゲート絶縁層にプローブDNAを固定化し、ターゲットDNAがハイブリダイズしたプローブDNAの伸長反応に伴い変化する絶縁層上の界面電位をソースとドレイン間の電流値の変化として直接検出することで、DNA配列読み取りを行う方法が報告されている(Angewandte Chemie 2006, Vol.45, pp.2225-2228)。

50

【 0 0 0 7 】

上記したFETセンサ方式では、ソースとドレイン間の上に形成されたゲート絶縁層としてSiO₂層、その上層に保護膜であるSi₃N₄を成膜したものをを用いている。このFETセンサ表面(Si₃N₄表面)にシランカップリングによりプローブDNAを固定し、ターゲットDNAをハイブリダイズさせる。その後、DNAポリメラーゼと一種類の塩基のdNTP(NはA、C、G、Tのいずれか)を含む溶液を導入し伸長反応させる。dNTP分子は1個のリン酸基を有し、水溶液中では負電荷を有している。そのため、dNTP分子がプローブDNA分子の伸長鎖に取り込まれると、FETセンサ表面の電荷密度が変化し、界面電位は変化する。この界面電位の変化は、ソースとドレイン間の電流値の変化として検出することができる。そのため、ソースとドレイン間の電流値の変化量から、dNTPの取り込み量を計測することができる。以上のdNTPの取り込み反応プロセスを、塩基の種類を例えばA C G Tのように順次変えて段階的に繰り返すことによって、ターゲットDNA分子の塩基配列を決定することが可能である。前記文献のFETセンサを用いるシーケンス技術は、高価な発光試薬や蛍光試薬を用いない為、解読コストを安くすることができる。また、通常の半導体プロセスを使用すれば、高密度にFETセンサをアレイ上に形成できる。検出点を高密度にすると、発光計測や蛍光計測のような光検出の場合にはクロストークが問題となるが、FETセンサは電位計測を基本原理としているため、クロストークは問題にならない。

10

【 0 0 0 8 】

【非特許文献1】Nature 2005, Vol.437, pp.376-380.

【非特許文献2】PNAS 2003, Vol.100, pp.3960-3964.

20

【非特許文献3】Angewandte Chemie 2006, Vol.45, pp.2225-2228.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 9 】

上記したFET方式DNAシーケンサでは、FETセンサのソースとドレイン間の上に形成されたゲート絶縁層へプローブDNAを固定し、前記プローブDNAにターゲットDNAをハイブリダイズさせ、伸長反応及び伸長反応に伴い変化する絶縁層上の界面電位変化検出を行っている。そのため原理的に検出可能な塩基長は短く、さらにFETセンサの再利用が困難な問題があった。

【 0 0 1 0 】

30

検出可能な塩基長(すなわち、読み取り塩基長)は、ターゲットDNAがハイブリダイズしたプローブDNAの伸長反応に伴う電荷変化と、その際変化する界面電位の関係で決まる。FETセンサ表面(非特許文献3では、ゲート絶縁膜の一部であるSi₃N₄表面)の電荷の界面電位に及ぼす影響は、センサ表面からの距離の増加と共に減少する。そのため、ターゲットDNAとハイブリダイズしたプローブDNAの伸長反応が進み、伸長反応部位がセンサ表面から遠ざかっていくほど、一塩基の伸長反応当たりの界面電位変化量は小さくなり、伸長反応の検出は困難となる。一般に界面電位を検出できるセンサ表面からの距離の限界は、主に溶液中のイオン種とイオン強度等によって求まるDebye長によって決まる。非特許文献3で使用したDebye長を増大するための特殊な低濃度バッファー条件(2.5 mM)でのDebye長は約10 nmであり、一塩基の大きさ(0.34 nm)を考慮すると、理論的には30塩基が検出限界である。実際には読み取り可能な塩基長は10塩基程度であった。また、プローブDNAとハイブリする部分の長さやセンサ表面に固定化するためにプローブDNAに結合したリンカーの長さを考慮すると、現実的な読み取り塩基長は20塩基が限界であり、配列決定したシーケンス情報をユニークにマッピングするには50塩基以上は必要であるため(Nucleic Acid s Research 2005、Vol.33. e171)、通常のシーケンシングに使用することは困難である。

40

【 0 0 1 1 】

FETセンサの再利用に関しては、センサ表面に直接プローブDNA又はターゲットDNAを固定する場合、シーケンス使用後に前記DNA分子を取り除く必要がある。しかし、これには特殊な化学溶媒などを用いる煩雑な処理が必要となるため、FETセンサの再利用は難しく

50

なり、解読コストの増大につながる。

【課題を解決するための手段】

【0012】

前記課題を解決するために、本発明では、プローブDNAとターゲットDNAをハイブリダイズさせた二本鎖DNAを固定した球体の微粒子を、センシング部が前記微粒子と接触する球面を有する金属電極である延長ゲートFETセンサの金属電極表面に配置し、二本鎖DNAの伸長反応をセンサ表面の界面電位変化として検出する。ここで使用する延長ゲートFETセンサは、センシング部である金属電極と、絶縁ゲート電界効果トランジスタのゲートとが導電性配線で接続されている絶縁ゲート電界効果トランジスタセンサである。

【0013】

一般に、電界効果トランジスタにはリーク電流があるために、ドレイン電流値は、絶縁層上の界面電位変化と無関係に測定時間と共に変化する。その為、伸長反応をセンサ表面の界面電位変化によって検出するには、伸長反応後の界面電位変化によるドレイン電流値変化がリーク電流によるそれよりも大きくなることが望ましい。上記の条件として、図1に示すように、FETセンサのセンシング部の形状は、微粒子101の半径を r_1 、金属電極103表面の球面の曲率半径を r_2 として、次式(1)及び(2)を満足するものとする。

【0014】

【数1】

$$r_2 - \sqrt{r_2^2 - 2(1 - \cos\theta)r_1r_2 + 2(1 - \cos\theta)r_1^2} < D \quad \dots(1)$$

$$r_1 < r_2 \quad \dots(2)$$

【0015】

ここで、DはDebye長であり、 I_r は次式(3)を満たす値を取る。 I_r はFETセンサのリーク電流値、 t_a は界面電位測定間の時間、Cはクーロンから電子数への変換係数、dは微粒子に固定した二本鎖DNAの密度である。

【0016】

【数2】

$$2\pi(1 - \cos\theta)r_1^2d > I_r t_a C \quad \dots(3)$$

【0017】

微粒子のブラウン運動による位置変化が引き起こす測定再現性の低下を抑制するため、圧力波による流れ、磁場による引力、温度変化による流れ等を用いて微粒子を金属電極の表面に押し付ける機構を有する。また、圧力波による流れ、磁場による引力、温度変化による流れ等を用いて溶液交換時に微粒子を金属電極の表面から離すための機構を有する。微粒子を金属電極の表面に押し付ける機構と金属電極の表面から離すための機構には、同一の機構を用いても良い。

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、従来のFET方式DNAシーケンサで問題となるDebye長の制限を受けることなく、長塩基のDNA配列決定が可能となる。FETセンサのセンシング部として微粒子と接触する球面を有する金属電極を用いることで、センシング部が有する球面は微粒子表面と広範囲に接することができ、平面の金属電極を用いた場合に比べてより多くのターゲットDNAをDebye長内に配置することができる。また、金属電極の内部は等電位であるため、金属電極の形状に依らずセンサ表面のいずれの部位で生じた界面電位変化もゲート絶縁膜の電位に等しい変化をもたらすことができるので、高精度の検出ができる。

【0019】

また、プローブDNAあるいはターゲットDNAを直接センサ表面に固定するのではなく、球体の微粒子に固定することにより、シーケンス後に微粒子を除去するだけで、FETセンサ

10

20

30

40

50

を再利用することができる。

【0020】

さらに、圧力波による流れ、磁場による引力、又は温度変化に流れ等を用いて微粒子を金属電極の表面に押し付けることで、微粒子の位置のずれによる測定再現性の低下を抑制できる。微粒子の金属電極表面への押し付けは、FETセンサによる電位計測を行う際に同時に行えば十分である。また、溶液交換時に、微粒子を金属電極の表面から離すことで、溶液の交換を効果的に行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

以下、本発明の実施の形態を説明する。

10

[実施例1]

本発明によるFET方式DNAシーケンサのシステム構成例を図2に示す。本システムは、測定部201、信号処理回路202、及びデータ処理装置203から構成される。測定部201はさらに、FETセンサ部233、チャンバ部234、微粒子コントロール部229、参照電極部235の4つの構成を有する。以下に各部位の詳細を記す。

【0022】

FETセンサ部233は、シリコン基板204上に複数のFETが形成され、ソース205、ドレイン206、ゲート絶縁膜207と導電性配線208で接続された接着層211の上に形成した金属電極209、ソース236、ドレイン237、ゲート絶縁膜207と導電性配線238で接続された接着層240の上に形成した金属電極241、ソース245、ドレイン246、ゲート絶縁膜207と導電性配線247 20

20

で接続された接着層248の上に形成した金属電極249の組み合わせを複数備え、金属電極以外の部分は絶縁膜210で被覆されている。

【0023】

FETセンサ部233を製造する工程を、FET基本構成部と本発明の特徴である球面を有する金属電極の2つに分けて以下に示す。

FET基本構成部である、ソース205、236、245、ドレイン206、237、246、ゲート絶縁膜207、及び導電性配線208、238、247は既存の半導体製造技術で形成した。シリコン基板204を酸化させてSiO₂のゲート絶縁膜207を生成後、ポリシリコンの導電性配線208、238、247をアレイ状に形成するため、ポリシリコンをゲート絶縁膜207全体に塗布後、レジスト塗布、パターニング、現像、エッチングの順に作業を行った。ソースとドレインは、導電性配線208、238、247をマスクとして、イオン注入により形成した。導電性配線208、238、247の素材としては、ポリシリコンが望ましく、ポリシリコンゲートを通してイオン注入によりソース、ドレインを形成する、いわゆるセルフアラインプロセスとの整合性がよい。また、ゲート絶縁膜207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ても良い。さらに、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)あるいは酸化タンタル(Ta₂O₅)を積層した二層構造としても良い。

30

【0024】

次に、表面に微粒子212、242、250の形状に適合した球面状の凹部を有する金属電極209、241、249の製造工程を以下に説明する。導電性配線208、238、247上に絶縁膜210としてSiO₂膜をCVDにより形成後、絶縁膜表面全体にレジストを塗布した。次に、金属電極209、241、249を配置する箇所(つまり導電性配線208、238、247の上)にドットをパターニングして現像した。パターニングした箇所を等方エッチングして絶縁膜210上に球面を形成した。その後、金属電極209、241、249と導電性配線208、238、247を電氣的に接続する接着層211、240、248としてタングステン(W)を、金属電極209、241、249として金(Au)を順にスパッタリングし、前記同様に、それぞれ、レジスト塗布、パターニング、現像、エッチングにより、球面を有する金属電極209、241、249をアレイ状に形成した。

40

【0025】

本実施例では、金属電極209、241、249と絶縁膜210を安定に接着するために、接着層21

50

1, 240, 248であるWを介して金属電極209, 241, 249である金(Au)を絶縁膜210であるSiO₂膜上に形成したが、接着層を介さずに、直接導電性配線208, 238, 247上に金属電極209, 241, 249を形成しても良い。尚、金属電極209, 241, 249の材質としては、試料溶液に直接接触するので、化学的安定性が高く、安定な電位を示し、かつ生体材料を固定化するため生体材料との親和性の高い材料が望ましく、金(Au)、白金(Pt)、銀(Ag)、パラジウム(Pd)などの貴金属を用いることができる。

【0026】

本実施例では、微粒子212, 242, 250に直径200 μmのビーズ(半径 $r_1=100$ μm)を使用し、伸長反応時間、溶液交換、界面電位測定に要する時間 t_a が5分であり、FETのリーク電流値 $I_r=1$ fAであった。前記条件式(1)、(2)及び(3)より、金属電極の球面の高感度達成に必要な曲率半径 r_2 は、 $100 < r_2 < 108$ μmと算出された。そのため、金属電極209, 241, 249の球面部の曲率半径を100 μmとなるように作製した。ただし、曲率半径 r_2 の範囲は、より高感度な配列解読を行うための目安であって、上記範囲を逸脱した為に本発明の効果が失われるものではない。

【0027】

チャンバ部234は、微粒子212, 242, 250、セクショニング層213, 244、溶液槽214、スぺーサ215, 252、カバー216、溶液注入口217、溶液排出口218、洗浄液容器219、dATP溶液容器220、dTTP溶液容器221、dGTP溶液容器222、dCTP溶液容器223、洗浄液供給バルブ224、dATP溶液供給バルブ225、dTTP溶液供給バルブ226、dGTP溶液供給バルブ227、dCTP溶液供給バルブ228から成る。微粒子212, 242, 250が隣のウェルに移動するのを防ぐセクショニング層213, 244は、前記同様に、レジスト塗布、パターニング、現像、エッチングによって作製した。

【0028】

セクショニング層213, 244の厚みに特に制限は無いが、微粒子212, 242, 250を溶液槽214に展開する際、微粒子1個ずつを効率的にウェル内に配置するには、(セクショニング層213, 244の厚み) (微粒子212, 242, 250の半径)であることが望ましい。また、溶液交換を効率的に行うには、前記の範囲内で出来る限り厚みを小さくすることが望ましい。本実施例では、微粒子212, 242, 250の半径が100 μmであるため、セクショニング層213, 244の厚みを100 μmとした。また、セクショニング層213, 244の材質には、ポリイミドを用いたが特に制限はない。スぺーサ215, 252の厚みは、厚すぎるとセクショニング層213, 244とカバー216間の距離が長くなり、微粒子212, 242, 250が隣接ウェルへ移動する可能性が出てくる。この移動を防ぐため、スぺーサは、(セクショニング層213, 244の厚み) + (微粒子212, 242, 250直径)よりも薄くする必要がある。

【0029】

溶液交換を効率良く行うには、前記の制限内で極力厚くすることが望ましい。本実施例では、セクショニング層213, 244の厚みが100 μm、微粒子212, 242, 250の直径が200 μmなので、スぺーサ215, 252に250 μmのポリエチレンフィルムを用いたが、特に素材の規定はない。洗浄液容器219にはリン酸バッファー溶液(0.025 M Na₂HPO₄/0.025 M KH₂PO₄, pH 6.86)、dATP溶液容器220、dTTP溶液容器221、dGTP溶液容器222、dCTP溶液容器223には、KCl(50 mM)、Tris-HCl(20 mM, pH 8.4)、MgCl₂(3 mM)、Klenow Fragment(0.1 U μL⁻¹)、dNTP(5 mM) (dATP溶液容器220にはdATP溶液、dTTP溶液容器221にはdTTP溶液、dGTP溶液容器222にはdGTP溶液、CTP溶液容器223にはdCTP溶液)をそれぞれ満たした。

【0030】

微粒子コントロール部229は、溶液交換時に微粒子212, 242, 250を金属電極209, 241, 249から遊離させ、界面電位検出時に金属電極209, 241, 249の表面のDebye長内に微粒子212, 242, 250の表面を配置させるための装置である。本実施例では、微粒子コントロール部229に圧力波発生装置を使用した。

【0031】

参照電極部235は、参照電極230と高周波電源231からなる。参照電極230には、内部溶液に飽和塩化カリウム溶液を有する銀塩化銀電極を用いた。本実施例では、参照電極部235

10

20

30

40

50

を図2で示したように溶液排出口218から排出される溶液を受ける容器中に配置したが、溶液槽214に導入される溶液と接触していれば、別の場所に配置してもよい。また高周波電源の代わりに、直流電源を用いてもよい。

【0032】

以下、図3を用いて配列解読の工程を説明する。微粒子212, 242, 250へのプローブDNA232, 243, 251の固定化法、及び固定化したプローブDNAへのターゲットDNAのハイブリダイゼーションは非特許文献1に記載されている方法に従った。微粒子212, 242, 250毎に異なるターゲットDNA断片一本を固定し、emPCR増幅により、単一微粒子表面に同一複数ターゲットDNA分子が固定された微粒子212, 242, 250を得た(S301)。微粒子212, 242, 250の材質として、emPCR増幅過程を効率的に行うために、比重が1に近いセファロースビーズを使用した

10

【0033】

前記方法で調製したDNA分子が固定された微粒子212, 242, 250を含む溶液を、カバー216、溶液注入口217及び溶液排出口218を取り外した状態でチャンバ部234の溶液槽214に展開し(S302)、その後カバー216を取り付けた状態でFETセンサ部233とチャンバ部234を遠心することで、セクショニング層213、244で区切られた各ウェル内に、複数の微粒子212、242、250をそれぞれ一つずつ配置した(S303)。ただし、遠心の際、取り外した溶液注入口217と溶液排出口218の接続部より溶液槽214内の溶液が漏れないように、パラフィルムで接続部を塞いだ。その後、溶液注入口217と溶液排出口218を取り付け、洗浄溶液供給バルブ224を開き(S304)、注入口217からリン酸バッファ溶液(0.025 M Na₂HPO₄/0.025 M KH₂PO₄、pH 6.86)を溶液槽214に注入し、溶液槽に存在する気泡を排出口から取り除いた後、バルブを閉じた(S305)。

20

【0034】

伸長反応前の界面電位を検出する為、微粒子コントロール部229に設置した圧力波発生装置により約10気圧のパルス状の圧力波を金属電極209, 241, 249に向けて連続的に発射しながら(S306)、界面電位を計測した。この時、ウェル内をブラウン運動していた微粒子212, 242, 250は圧力波により金属電極209, 241, 249の球面に押し付けられるため、圧力波発生のタイミングに合わせて、界面電位は変化した。界面電位計測には、信号処理回路202の構成部である半導体パラメータアナライザを用いた。高周波電源231を用いて参照電極230に周波数1MHz、振幅0.2V、バイアス0.1Vの電圧を印加しながら、ソース205, 236, 245-ドレイン206, 237, 246間に1Vを印加し、電流変化をリアルタイムでモニターし、信号処理回路202及びデータ処理装置203でドレイン電流値を記録した(S307)。記録したドレイン電流値は、別途測定したゲート電圧-ドレイン電流特性から界面電位に変換した。各ウェルに関して複数回検出した界面電位変化の平均をV₀、標準偏差をσとした。界面電位計測に際しては、ノイズの原因となる光が導電性配線及びゲートへ入射するのを抑制し、より高いS/N比を得るために、FETセンサ部及びチャンバ部を暗幕で覆い遮光した。ただし、遮光操作は必須ではない。

30

【0035】

また、複数のFETからドレイン電流を測定する方法として、図4に示すように、信号処理回路のソース配線に繋がったソース配線スイッチ401とドレイン配線に繋がったドレイン配線スイッチ402をそれぞれ各FETのソース403, 404又は405とドレイン406, 407又は408への接続を組み合わせることで行った。

40

【0036】

伸長反応を行うため、dATP溶液供給バルブ225を開き(S308)、dATP溶液容器220内のKCl(50 mM)、Tris-HCl(20 mM、pH 8.4)、MgCl₂(3 mM)、Klenow Fragment(0.1 U μL⁻¹)、dATP(5 mM)を含む反応液を溶液注入口217から溶液槽214に展開し、dATP溶液供給バルブ225を閉じた(S309)。3分間25℃で静置して反応させた。その後、界面電位変化検出の際にノイズの原因となる未反応のdATPを洗い流し、さらに界面電位検出のための低イオン溶液に置換するため、洗浄液供給バルブ224を開き(S310)、洗浄液容器219のリン酸バッファ溶液(0.025 M Na₂HPO₃/0.025 M KH₂PO₃、pH 6.86)を、溶液注入口217から溶液槽214に展開

50

し、洗浄液供給バルブ224を閉じた(S311)。

【0037】

前記同様に、圧力波を発生し(S312)、ドレイン電流を測定し(S313)、伸長反応後の各ウェルの界面電位変化の平均 V_1 、標準偏差 V_1 を求めた。各ウェルに関して、 $V_1 - V_0 > 3 \times V_0$ の時、伸長反応が行われたと判断した。その後、洗浄液供給バルブ224を開き(S314)、洗浄液容器219のリン酸バッファー溶液(0.025 M Na_2HPO_4 /0.025 M KH_2PO_4 、pH 6.86)を、溶液注入口217から溶液槽214に展開し、洗浄液供給バルブ224を閉じた(S315)。前記のステップをdATP(S320) dCTP(S317) dGTP(S318) dTTP(S319)の順に複数回繰り返し、各微粒子212, 242, 250に固定されたDNA分子232, 243, 251のターゲットDNA配列を決定した。本構成を用いた解析によって、50塩基以上のDNA配列を決定することができる。

10

【0038】

微粒子212, 242, 250と金属電極209, 241, 249の隙間の溶液交換や、その隙間の微粒子に存在するターゲットDNAの伸長反応を行うためには、隙間にある程度の距離がある方が効率的になる。本実施例では、溶液交換や伸長反応時に、微粒子コントロール部229から圧力波は発振せず、微粒子のブラウン運動により、前記距離を設けた。前記距離を設けるため、図2に示すFETセンサ部233部下方に微粒子コントロール部229と同様に圧力波発生装置を設置し、溶液交換や伸長反応時に、圧力波発生装置から圧力波は発振させても良い。

【0039】

尚、本実施例では、DNAポリメラーゼにKlenow Fragmentを用いたため、室温で反応を行ったが、Taqポリメラーゼのような耐熱性DNAポリメラーゼを用いる場合は、チャンバ部の温度を高温に保つ機構を付加することが望ましい。

20

【0040】

本実施例では、配列解読の対象としてDNAを用いたが、発現解析などを目的にRNAを用いてもよい。RNAを用いる場合は、既存の方法に従い、抽出したRNAを逆転写によりDNA鎖にして、以降の工程を前記DNAと同等に行うことで、RNA配列を決定することができる。

【0041】

また、微粒子212, 242, 250に同一複数ターゲットDNA分子を固定する手段としてemPCRを用いたが、別な手段でも構わない。例えば、以下のように微粒子212, 242, 250に1本鎖のプロープDNAをあらかじめ固定する方法も可能である。各微粒子212, 242, 250にリファレンスゲノム上のそれぞれ異なる配列部分を持つ複数同一断片をプロープDNAとして固定しておき、前記同等に各ウェルに微粒子212, 242, 250を配置させておく。そこに1本鎖の複数ターゲットDNA断片を含む溶液を前記同等の送液手段により展開し、ハイブリダイズさせる。ターゲットDNA断片は、理想的には相補的な配列を持つプロープDNAとのみハイブリダイズするので、各ターゲットDNA断片は特定の微粒子212, 242, 250にのみ固定される。その後のDNA配列決定法は、前記と同等である。1本鎖プロープDNAを固定する方法の利点は、(1)予めウェル内に微粒子212, 242, 250を固定したFETセンサ部233とチャンバ部234を用意することができるので、配列解読工程の際、カバー216を取りはずす手間が省ける、(2)リファレンスゲノム上の既知配列をプロープDNAに使うことで、読取配列の開始位置を制御することができるので、マッピングが効率的に行える、などが考えられる。

30

【0042】

[実施例2]

第2の実施例では、微粒子位置の制御手段として磁場発生装置を用いた。システム概略は図2と同等である。本実施例では、微粒子コントロール部229に磁場発生装置として強力な磁石を用い、微粒子212, 242, 250に直径200 μm の磁気ビーズを用いた。DNA分子232, 243, 251を固定した微粒子212, 242, 250の調製方法、微粒子212, 242, 250のウェル内への配置方法、伸長反応方法は、実施例1と同等である。以下、実施例1と異なる溶液交換と界面電位検出方法について述べる。

40

【0043】

溶液注入口217と溶液排出口218を用いた溶液交換の際は、より効率的に行うため、微粒子コントロール部229の磁石をカバー216上に設置して(図2の状態)、微粒子212, 242, 2

50

50をカバ-216側に寄せた。

【0044】

界面電位検出に際しては、微粒子コントロール部229の磁石を図2に示すシリコン基板204の下方に設置することで、微粒子212, 242, 250(磁気ビーズ)を金属電極209, 241, 249の球面に押し付けた。実施例1と同様に、微粒子212, 242, 250を押し付けて、伸長反応前の界面電位変化 V_0 、伸長反応後の界面電位変化 V_1 を求め、界面電位変化 V_0 と界面電位変化 V_1 の差から、伸長反応の有無を判断した。前記のステップをA C G Tの順に繰り返し、各微粒子212, 242, 250に固定されたDNA分子232, 243, 251のターゲットDNA配列を決定した。

【0045】

[実施例3]

実施例1及び実施例2と同様に、図2を用いて説明する。本実施例では、温度制御により、微粒子の位置をコントロールすることで塩基配列決定を行う。そのために、微粒子コントロール部229に温度制御するためのペルチェ素子を設置する。その他の構成は、実施例1と同等である。尚、本実施例では、ペルチェ素子を用いたが、温度を制御するシステムであれば、ペルチェ素子以外でも代替可能である。また、具体的な配列決定方法に関しても、界面電位検出方法時の微粒子操作法以外は、実施例1と同等である。

【0046】

界面電位検出に際しては、微粒子コントロール部229のペルチェ素子により、溶液槽214の温度を5℃にした。これにより、微粒子212, 242, 250のブラウン運動を抑えられるので、金属電極209, 241, 249の球面との接触確率が増加する。このときの界面電位を検出し、 V_0 とした。伸長反応の際は、再び溶液槽214の温度を25℃又は37℃に設定した。伸長反応後、同様に溶液槽214を5℃にして、界面電位 V_1 を得た。 V_0 に対する V_1 の変化により伸長の有無を判断した。前記のステップをA C G Tの順に繰り返し、各微粒子212, 242, 250に固定されたDNA分子232, 243, 251のターゲットDNA配列を決定した。本実施例では、界面電位検出時の温度を5℃としたが、溶液槽214が凍る0℃以上であれば、特に設定温度に制約はない。ただし、伸長反応前後の界面電位変化を比較するので、配列決定時の設定温度は常に同じにする必要がある。

【0047】

[実施例4]

本実施例では、図5に示すように導電性配線504と金属電極511を空間的に離れたFETセンサ部を用いる。図5(a)はFETセンサ部の正面図、図5(b)は図5(a)のB-B断面図である。導電性配線504と金属電極511を空間的に離すことで、ノイズの原因となる光が導電性配線504及びゲートへ入射するのを抑制するための遮光を簡便に行うことができる。以下に前記構成を実現するためのFETセンサ部製作方法を述べる。

【0048】

FETセンサ部以外のチャンバ部、微粒子コントロール部229に関しては、図2に示す実施例1の形態と同等である。また、配列決定に必要な一連の工程も実施例1と同等である。本実施例では、FETセンサ部以外の構成及び操作を実施例1に則したが、実施例2又は3を用いても構わない。

【0049】

以下、実施例1と異なるFETセンサ部について図5を用いて述べる。FETセンサ基本構成部である、ソース501、ドレイン502、ゲート絶縁膜503、及び導電性配線504は実施例1と同等の方法でアレイ状に作製した。材質に関しても、実施例1と同等である。その他、絶縁膜505、延長用配線506、絶縁膜507、遮光膜508、絶縁膜509に関しても実施例1と同様に、それぞれ、材料の塗布、レジスト塗布、パターニング、現像、エッチングの順に行い、接着層510と金属電極511及び微粒子512を除く図5の構成を得た。

【0050】

球面を有する金属電極511を作製するため、絶縁膜509上に、金属電極を配置する箇所にもドットをパターニングして現像し、パターニング箇所を等方エッチングして球面を形成し

10

20

30

40

50

た。その後、金属電極511と遮光膜508を電氣的に接続する接着層510としてWを、金属電極511としてAuを順にスパッタリングし、前記同様に、それぞれ、レジスト塗布、パターンニング、現像、エッチングにより、球面を有する金属電極511をアレイ状に形成した。本実施例では、遮光膜508の材質にAlを用いたが、遮光可能であれば特に材質に限定はない。また、絶縁膜505, 507, 509の材質は酸化物など絶縁性物質である必要がある。延長用配線506の材料には、より低抵抗のAlを用いたが、導電性配線504と同様ポリシリコンを使用してもよい。その際、導電性配線504と延長用配線506部位の工程を同時に行うことができるのが利点である。またその他、延長用配線506の素材としては、低抵抗でエッチングなど加工性の良い材料が好ましく、他にモリブデン(Mo)などを用いることができる。本実施例では、前記の如くFETセンサ部に遮光膜508を作成することで、実施例1で行ったような、界面電位計測に際する遮光作業を省略することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】金属電極の球面と微粒子球面の関係を表す模式図。

【図2】本発明によるFET方式DNAシーケンサのシステム構成例を示す図。

【図3】DNA配列解読の工程図。

【図4】複数FETからのドレイン電流値を測定する為の配線図。

【図5】(a)は実施例4のFETセンサ部の正面図、(b)は(a)のB-B断面図。

【符号の説明】

【0052】

101, 212, 242, 250, 512... 微粒子

103, 209, 241, 249, 511... 金属電極

201... 測定部

202... 信号処理回路

203... データ処理装置

204, 515... シリコン基板

205, 236, 245, 501, 403, 404, 405... ソース

206, 237, 246, 502, 406, 407, 408... ドレイン

207, 503... ゲート絶縁膜

208, 238, 247, 504... 導電性配線

210, 505, 507, 509... 絶縁膜

211, 240, 248, 510... 接着層

213, 244... セクショニング層

214... 溶液槽

215, 252... スペーサ

216... カバー

217... 溶液注入口

218... 溶液排出口

219... 洗浄液容器

220... dATP溶液容器

221... dTTP溶液容器

222... dGTP溶液容器

223... dCTP溶液容器

224... 洗浄液供給バルブ

225... dATP溶液供給バルブ

226... dTTP溶液供給バルブ

227... dGTP溶液供給バルブ

228... dCTP溶液供給バルブ

229... 微粒子コントロール部

230... 参照電極

20

30

40

50

- 231... 高周波電源
- 232, 243, 251, 513... DNA分子
- 233... FETセンサ部
- 234... チャンバ部
- 235... 参照電極部
- 401... ソース配線スイッチ
- 402... ドレイン配線スイッチ
- 506... 延長用配線
- 508... 遮光膜

【 図 1 】

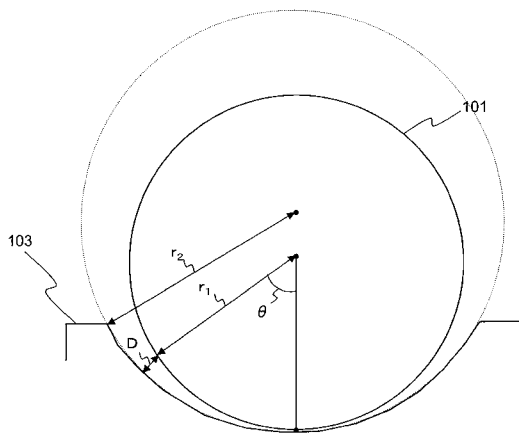


図1

【 図 2 】

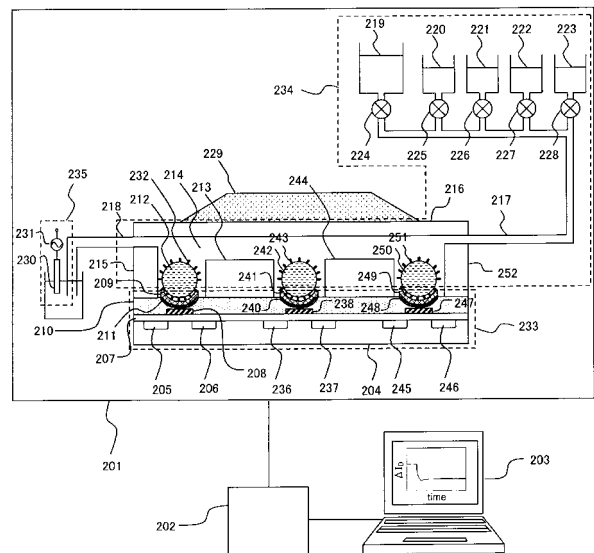


図2

【 図 3 】

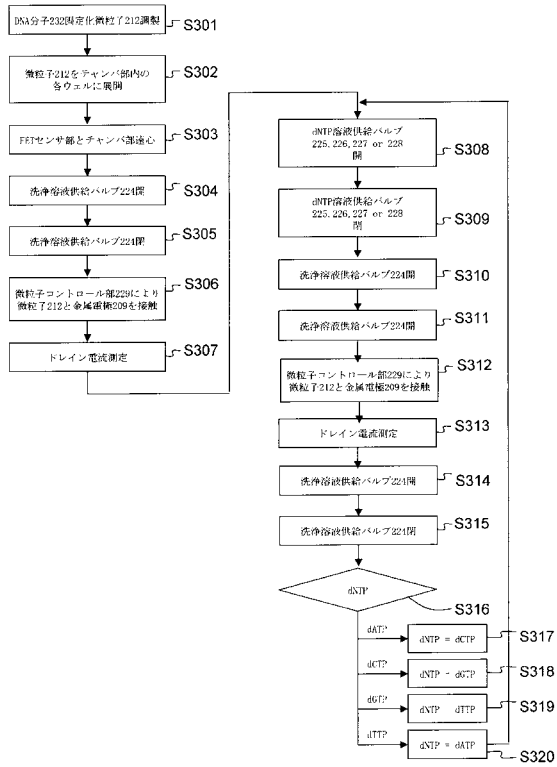


図3

【 図 4 】

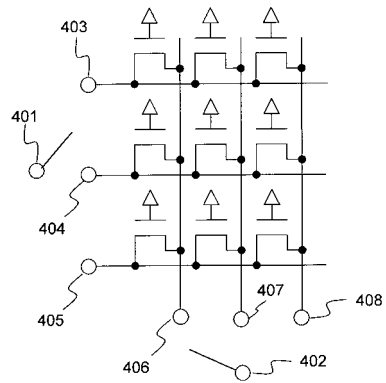


図4

【 図 5 】

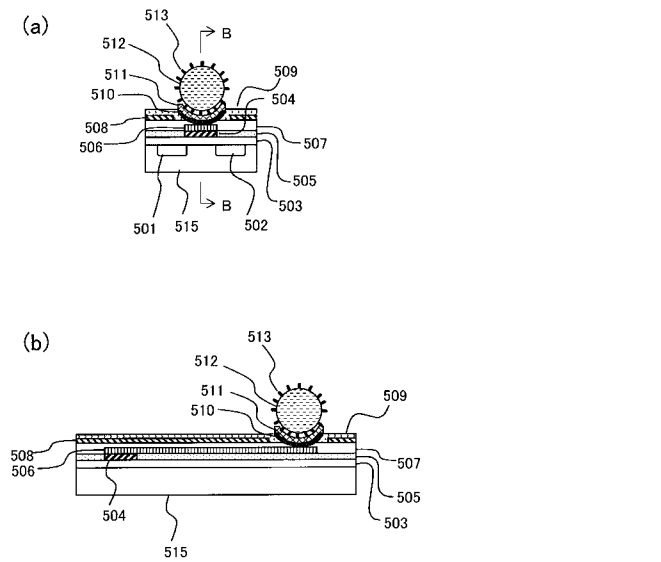


図5

フロントページの続き

(72)発明者 石毛 悠

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA35 FB05