

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 11 月 28 日(28.11.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/176289 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) G01N 21/27 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) G01N 27/414 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 5/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/064675
- (22) 国際出願日: 2013 年 5 月 27 日(27.05.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-120286 2012 年 5 月 25 日(25.05.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 宮原 裕二(MIYAHARA, Yuji); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目 5 番 4 5 号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 合田 達郎(GODA, Tatsuro); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目 5 番 4 5 号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 前田 康弘(MAEDA, Yasuhiro); 〒

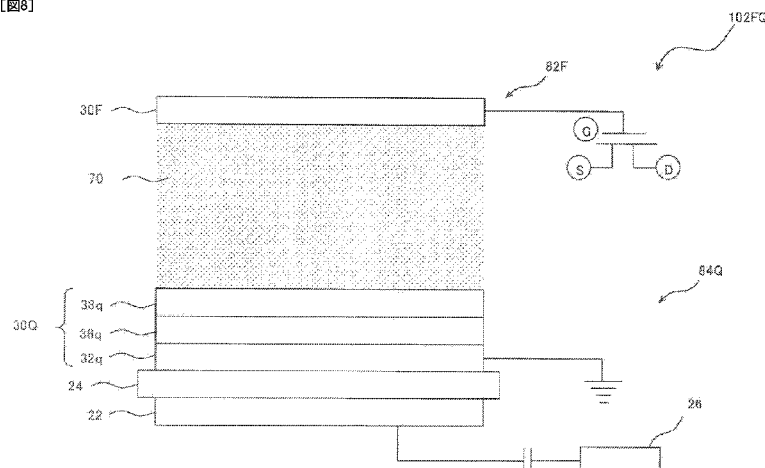
1138510 東京都文京区湯島一丁目 5 番 4 5 号
国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 中島 淳, 外(NAKAJIMA, Jun et al.); 〒1600022 東京都新宿区新宿 4 丁目 3 番 1 7 号 H K 新宿ビル 7 階 太陽国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

- (54) Title: BIOLOGICAL MOLECULE DETECTION DEVICE, AND, BIOLOGICAL MOLECULE DETECTION METHOD
- (54) 発明の名称: 生体分子検出装置、及び、生体分子検出方法

[図8]



(57) Abstract: A biological molecule detection device (102FQ) comprising a first biological molecule detection section (82F) having a first electrode (30F) and a second biological molecule detection section (84Q) having a second electrode (30Q), wherein the first electrode (30F) or the second electrode (30Q) is an electrode (32q) having a biological molecule probe-immobilized material (36q) onto which a biological molecule probe (38q) is immobilized. The first electrode (30F) and the second electrode (30Q) provided in the biological molecule detection device (102FQ) are simultaneously brought into contact with an aqueous solution (70) containing at least one biological molecule, and a signal at a solid/liquid interface between the electrodes (30F, 30Q) is detected.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2013/176289 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

第 1 の電極 30 F を有する第 1 の生体分子検出部 82 F と、第 2 の電極 30 Q を有する第 2 の生体分子検出部 84 Q とを有し、前記第 1 の電極 30 F、または、前記第 2 の電極 30 Q が、生体分子プローブ 38 q が固定化された生体分子プローブ固定化材料 36 q を有する電極 32 q である生体分子検出装置 102 F Q である。前記生体分子検出装置 102 F Q が有する第 1 の電極 30 F および第 2 の電極 30 Q を、同時に、少なくとも 1 種の生体分子を含有する水溶液 70 に接触して、前記電極 30 F、30 Q の固液界面における信号を検出する。

明 細 書

発明の名称：生体分子検出装置、及び、生体分子検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体分子検出装置、及び、生体分子検出方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、ヒトゲノムをはじめ各種生物のゲノム塩基配列の解読が急速に進展し、膨大な塩基配列情報が蓄積されつつある。生体中の遺伝子の機能を明らかにすることにより、各種疾病の診断、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ことが期待されている。このような遺伝子関連技術の開発においては、塩基配列情報ならびに遺伝子の発現および機能情報を、高精度で解析することが重要である。

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は、既に、DNAチップまたはDNAマイクロアレイとして、市販されている。しかし、現状のDNAチップ及びDNAマイクロアレイの多くは、蛍光物質などの標識分子を用いて、光学的に生体分子を検出する蛍光検出を基本原理としている。そのため、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。

[0003] かかる問題を解決するために、酸化還元標識を用いた電流検出方式のDNAチップが報告されている。例えば、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、前記分子の他端にDNAプローブを結合して、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と、を電流変化として検出することにより、ターゲット遺伝子を検出する方式が知られている（例えば、非特許文献1参照）。

[0004] また、医療診断の分野、すなわち遺伝子診断の分野では、高い精度および定量性が求められる。かかる要求に対して、例えば、電界効果トランジスタのゲート電極に接続されたフローティング電極の表面にDNAプローブを固定化し、ターゲット遺伝子とフローティング電極の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法が開示されている（例えば、特許文献1参照）。

[0005] さらに、生体分子検出を、電界効果トランジスタに代えて、表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance; SPR）法または水晶振動子マイクロバランス（Quartz Crystal Microbalance; QCM）法によって行う方法も開示されている（例えば、特許文献2参照）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2005-077210号公報

特許文献2：特開2010-107496号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Nature Biotechnology, vol. 16, (1998)p27, p40

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 上記装置の性能向上のためには、基板と生体分子との相互作用を明らかにすることが重要である。しかしながら、生体分子検出に用いる装置は、それぞれ固有の検出原理に基づき、それぞれ異なる物性値を検出するものである。そのため、個々単独での測定においては、測定対象である生体分子水溶液に含まれる生体分子の濃度や、分子量によっては正確な生体分子検出をすることができなかった。一方で、複数装置を組み合わせる場合でも、検出部を共有していないため、真に同一の現象を同時に測定していることにはならなかった。

[0009] 本発明は、上記事情に鑑みたものである。上記した状況の下、生体分子の有する物性を多面的に、精度良く同時に検出する生体分子検出装置、及び、生体分子の有する物性を多面的に精度良く同時に検出する生体分子検出方法が必要とされている。

課題を解決するための手段

[0010] 前記課題を達成するための具体的手段は、以下の通りである。

第1の本発明は、第1の電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極を有する第2の生体分子検出部と、を有し、前記第1の電極、または、前記第2の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である生体分子検出装置である。

[0011] 第2の本発明は、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極として前記第1の電極を共有する第2の生体分子検出部と、参照電極とを有する生体分子検出装置である。

[0012] 第3の本発明は、第1の電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極を有する第2の生体分子検出部と、を有し、前記第1の電極、または、前記第2の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である生体分子検出装置を用い、前記生体分子検出装置が有する第1の電極および第2の電極を、同時に、少なくとも1種の生体分子を含有する溶液に接触する溶液接触工程と、前記第1の電極と前記溶液との固液界面における信号および前記第2の電極と前記溶液との固液界面における信号をそれぞれ検出する検出工程とを有する生体分子検出方法である。

[0013] 第4の本発明は、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極として前記第1の電極を共有する第2の生体分子検出部と、参照電極とを有する生体分子検出装置を用い、前記生体分子検出装置が有する第1の電極および第2の電極を、同時に、少なくとも1種の生体分子を含有する溶液に接触する溶液接触工程と、前記第1の電極（第2の電極）と前記溶液との固液界面における信号を検出する検出工程とを有する生体分子検出方法である。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、生体分子の有する物性を多面的に、精度良く同時に検出する生体分子検出装置が提供される。また、

本発明によれば、生体分子の有する物性を多面的に精度良く同時に検出す

る生体分子検出方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]電界効果トランジスタ生体分子検出部の構成例を示す模式図である。

[図2]水晶振動子マイクロバランス生体分子検出部の構成例を示す模式図である。

[図3]表面プラズモン共鳴生体分子検出部の構成例を示す模式図である。

[図4] (A) は、電界効果トランジスタの構成例を示す側面模式図であり、(B) は、電界効果トランジスタの構成例を示す上面模式図である。

[図5] (A) は、トランジスタの構成例を示す側面模式図であり、(B) は、電界効果トランジスタの構成例を示す上面模式図である。

[図6]生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極の構成例を示す模式図である。

[図7]生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極の他の構成例を示す模式図である。

[図8]本発明の第1の発明に係る生体分子検出装置の構成例を示す模式図である。

[図9]本発明の第2の発明に係る生体分子検出装置の構成例を示す模式図である。

[図10]本発明の生体分子検出方法における核酸の一塩基伸長反応の概略図である。

[図11]分子量が小さいタンパク質がプローブ固定電極に吸着する際の各種の層形成過程を説明するためのプローブ固定電極界面の模式図であり、(A) は単層形成過程、(B) は濃縮層形成過程、(C) は積層形成過程をそれぞれ示す模式図である。

[図12]分子量が大きいタンパク質がプローブ固定電極に吸着する際の各種の層形成過程を説明するためのプローブ固定電極界面の模式図であり、(A) は単層形成過程、(B) は積層形成過程、(C) は濃縮層形成過程をそれぞれ示す模式図である。

[図13]生体分子検出部が測定し得るセンシング深さを説明するためのプローブ固定電極界面の模式図である。

[図14]比較例で用いたFET生体分子検出装置の構成を示す模式図である。

[図15]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質（BSA）の、計測時間に対する表面電位（ V_{out} ）および計測時間に対する濃度の変化を示すグラフである。

[図16]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質（BSA）の、タンパク質濃度に対する表面電位差（ ΔV_{out} ）の変化を示すグラフである。

[図17]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質（Fibrinogen）の、タンパク質濃度に対する表面電位差（ ΔV_{out} ）の変化を示すグラフである。

[図18]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質（IgG）の、タンパク質濃度に対する表面電位差（ ΔV_{out} ）の変化を示すグラフである。

[図19]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質（Myoglobin）の、タンパク質濃度に対する表面電位差（ ΔV_{out} ）の変化を示すグラフである。

[図20]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質（ β -casein）の、タンパク質濃度に対する表面電位差（ ΔV_{out} ）の変化を示すグラフである。

[図21]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質（Lysozyme）の、タンパク質濃度に対する表面電位差（ ΔV_{out} ）の変化を示すグラフである。

[図22]比較例で用いたQCM生体分子検出装置の構成を示す模式図である。

[図23]比較例で用いたQCM生体分子検出装置で測定されたタンパク質（BSA）の、タンパク質濃度に対する共振周波数差（ Δf ）の変化を示すグラフである。

[図24]比較例で用いたQCM生体分子検出装置で測定されたタンパク質（Fibrinogen）の、タンパク質濃度に対する共振周波数差（ Δf ）の変化を示すグラフである。

[図25]比較例で用いたQCM生体分子検出装置で測定されたタンパク質（IgG）の、タンパク質濃度に対する共振周波数差（ Δf ）の変化を示すグラフである。

[図26]比較例で用いたQCM生体分子検出装置で測定されたタンパク質（Myoglobin）の、タンパク質濃度に対する共振周波数差（ Δf ）の変化を示すグラフである。

[図27]比較例で用いたQCM生体分子検出装置で測定されたタンパク質（ β -casein）の、タンパク質濃度に対する共振周波数差（ Δf ）の変化を示すグラフである。

[図28]比較例で用いたQCM生体分子検出装置で測定されたタンパク質（Lysozyme）の、タンパク質濃度に対する共振周波数差（ Δf ）の変化を示すグラフである。

[図29]比較例で用いたSPR生体分子検出装置で測定されたタンパク質（BSA）のプロープ固定電極への吸着量（ Γ_{SRP} ）と、FET生体分子検出装置で測定されたタンパク質（BSA）のプロープ固定電極への吸着量（ Γ_{FET} ）との関係を示すグラフである。

[図30]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質（BSA）の表面電位差（ ΔV_{out} ）と、QCM生体分子検出装置で測定されたタンパク質（BSA）の共振周波数差（ Δf ）との関係を示すグラフである。

[図31]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質（Fibrinogen）の表面電位差（ ΔV_{out} ）と、QCM生体分子検出装置で測定されたタンパク質（Fibrinogen）の共振周波数差（ Δf ）との関係を示すグラフである。

[図32]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質（IgG）の表面電位差（ ΔV_{out} ）と、QCM生体分子検出装置で測定されたタ

ンパク質 (IgG) の共振周波数差 (Δf) との関係を示すグラフである。

[図33]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質 (Myoglobin) の表面電位差 (ΔV_{out}) と、QCM生体分子検出装置で測定されたタンパク質 (Myoglobin) の共振周波数差 (Δf) との関係を示すグラフである。

[図34]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質 (β -casein) の表面電位差 (ΔV_{out}) と、QCM生体分子検出装置で測定されたタンパク質 (β -casein) の共振周波数差 (Δf) との関係を示すグラフである。

[図35]比較例で用いたFET生体分子検出装置で測定されたタンパク質 (Lysozyme) の表面電位差 (ΔV_{out}) と、QCM生体分子検出装置で測定されたタンパク質 (Lysozyme) の共振周波数差 (Δf) との関係を示すグラフである。

[図36]実施例で用いた生体分子検出装置の構成を示す模式図である。

[図37]実施例で用いた生体分子検出装置で測定されたタンパク質 (BSA) の、計測時間に対する表面電位差 (ΔV) および計測時間に対する共振周波数差 (Δf) の変化を示すグラフである。

[図38]実施例で用いた生体分子検出装置で測定されたタンパク質 (Fibrinogen) の、計測時間に対する表面電位差 (ΔV) および計測時間に対する共振周波数差 (Δf) の変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明の生体分子検出装置は、第1の発明が、第1の電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極を有する第2の生体分子検出部と、を有し、前記第1の電極、または、前記第2の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である構成であり、第2の発明が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極として前記第1の電極を共有する第2の生体分子検出部と、参照電極とを有する構成である。

第1の発明も第2の発明も、生体分子検出装置1つにつき、1つの「生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極」を有し、かつ、少なくとも2種の異なる生体分子検出部を有することで共通する。

本発明の生体分子検出装置を用いた生体分子検出方法の詳細については後述するが、本発明の生体分子検出装置は、第1の電極と第2の電極とを、同時に、少なくとも1種の生体分子を含有する水溶液に接触すると共に、各生体分子検出部において、各電極と水溶液との固液界面における信号を検出する。これにより、1つの系内で生じる生体分子の挙動が、2種の生体分子検出部の観点で、同時に捉えられる。

[0017] 以下、少なくとも1種の生体分子を含有する水溶液を、「生体分子水溶液」とも称する。

また、生体分子検出部とは、詳細は後述するが、構成要素の1つに電極を有し、電極が生体分子水溶液と接触することで変化する電位や振動や誘電率等の信号を、検出することができる生体分子検出機器をいう。例えば、電界効果トランジスタ (Field effect transistor ; F E T) を利用した電界効果トランジスタ生体分子検出部、水晶振動子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance ; Q C M) 法を利用した水晶振動子マイクロバランス生体分子検出部、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance ; S P R) 法を利用した表面プラズモン共鳴生体分子検出部等が挙げられる。

以下、電界効果トランジスタ生体分子検出部を「F E T生体分子検出部」、水晶振動子マイクロバランス生体分子検出部を「Q C M生体分子検出部」、表面プラズモン共鳴生体分子検出部を「S P R生体分子検出部」とも称する。

[0018] さらに、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極を「プローブ固定電極」とも称する。

[0019] 特許文献1及び2、ならびに非特許文献1には、既述のように、生体分子を捕捉可能な生体分子プローブを有するプローブ固定電極を備えた生体分子

検出部を有する生体分子検出装置が開示されている。

特許文献 1 及び 2、ならびに非特許文献 1 で開示されている方法は、生体分子検出装置（生体分子検出装置 a とする）が、1 つの生体分子検出部（生体分子検出部 a とする）のみを有するため、当該生体分子検出装置で検出し得る情報は、生体分子検出部 a が検出する情報のみである。また、通常、生体分子検出機器は、生体分子水溶液の濃度や生体分子の分子量等によっては測定が困難となる検出限界域を有し、目的とする濃度や、分子量での情報を得ることができないことも多い。

[0020] このような場合、当該生体分子検出部 a では測定することができない濃度域、分子量域等でも測定が可能な他の生体分子検出機器である生体分子検出部 b を有する生体分子検出装置 b を用いて、別途、当該生体分子水溶液を測定することにより、生体分子検出装置 a では測定できなかった範囲の測定を補完することが行われる。

しかし、例え、生体分子検出装置 a および生体分子検出装置 b の測定対象が同じ生体分子水溶液であったとしても、生体分子検出部 a が有する電極上で生じた生体分子の挙動と、生体分子検出部 b が有する電極上で生じた生体分子の挙動とが同じであるとはいえない。

その点で、1 つの生体分子水溶液を、生体分子検出装置 a と、生体分子検出装置 b とで、別々に測定する手法は、生体分子の挙動を正確にとらえたものではなく、生体分子検出の精度が良いとはいえない。

[0021] そこで、生体分子検出部 a を有する生体分子検出装置 a と、生体分子検出部 b を有する生体分子検出装置 b と、を 1 つの生体分子水溶液に、同時に接触させることが考えられる。

この場合、生体分子検出部 a が有する電極と、生体分子検出部 b が有する電極と、が接触する水溶液は同一であるものの、どちらの電極もプローブ固定電極である。そのため、各生体分子検出部は、各々の電極上で生じている生体分子の挙動をそれぞれ検出しているに過ぎない。つまり、生体分子検出装置 a が検出している生体分子の挙動は、生体分子検出部 a が有する電極上

で生じている生体分子の挙動であり、生体分子検出部 b が有する電極上で生じている生体分子の挙動ではない。このことは、生体分子検出装置 b についても当てはまる。

従って、1つの生体分子水溶液に、生体分子検出装置 a とは異なる生体分子検出装置 b を取り入れても、生体分子検出部 a では測定することができない濃度域、分子量域等での、生体分子検出部 a が有する電極上で生じた生体分子の挙動検出を補完することにはならない。

[0022] それに対し、本発明である第1の発明および第2の発明によれば、1つの電極上で生じた生体分子の挙動を、2つの異なる生体分子検出部により、同時に測定することができ、1つの生体分子検出部では測定しにくい濃度域、分子量域、粘度域等での生体分子の検出を、他の生体分子検出部により測定することができる。また、互いに測定することができる濃度域、分子量域、粘度域等での生体分子の挙動については、少なくとも2つの観点から測定することができる。

これは、次の理由によると考えられる。

[0023] 本発明ののうち、第1の発明は、第1の電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極を有する第2の生体分子検出部と、を有し、前記第1の電極、または、前記第2の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極（プローブ固定電極）である生体分子検出装置である。すなわち、第1の電極と第2の電極のどちらか一方のみが、プローブ固定電極であり、他方は参照電極として働く。

このとき、プローブ固定電極が、例えば、QCM生体分子検出部であり、参照電極が、例えば、FET生体分子検出部であるとき、QCM生体分子検出部が、プローブ固定電極上で生体分子が生体分子プローブに捕捉されることにより生じる電極の振動を検出し、FET生体分子検出部が、参照電極として働きつつ、プローブ固定電極上で生体分子が生体分子プローブに捕捉されることにより生じる電位変化を、生体分子水溶液を通じて測定する。

生体分子検出装置が上記の構成であることにより、QCM生体分子検出部

と F E T 生体分子検出部は、プローブ固定電極上で生じる生体分子の挙動を、Q C M 生体分子検出部と F E T 生体分子検出部との観点から把握することができる。また、Q C M 生体分子検出部では検出できない濃度域等では、F E T 生体分子検出部が補って生体分子の挙動を検出することができる。また、Q C M 生体分子検出部と F E T 生体分子検出部とが共通して検出し得る領域では、Q C M 生体分子検出部と F E T 生体分子検出部との異なる観点で、生体分子の同じ挙動を把握することができる。

[0024] 第2の発明は、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極（プローブ固定電極）を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極として前記第1の電極を共有する第2の生体分子検出部と、参照電極とを有する生体分子検出装置である。すなわち、第1の生体分子検出部と、第2の生体分子検出部と、はプローブ固定電極である電極を共有している。つまり、このことは、プローブ固定電極を通じて第1の生体分子検出部と、第2の生体分子検出部と、が一体となっていることを意味する。

このとき、参照電極を基準に、プローブ固定電極上で生体分子が生体分子プローブに捕捉されることにより生じる当該電極の振動を Q C M 生体分子検出部が検出しつつ、生体分子が生体分子プローブに捕捉されることにより生じる電位の変化を F E T 生体分子検出部が検出する。

第2の発明においても、Q C M 生体分子検出部と F E T 生体分子検出部は、プローブ固定電極上で生じる生体分子の挙動を、Q C M 生体分子検出部と F E T 生体分子検出部との観点から把握することができる。また、Q C M 生体分子検出部では検出できない濃度域等では、F E T 生体分子検出部が補って生体分子の挙動を検出することができる。また、Q C M 生体分子検出部と F E T 生体分子検出部とが共通して検出し得る領域では、Q C M 生体分子検出部と F E T 生体分子検出部との異なる観点で、生体分子の同じ挙動を把握することができる。

[0025] このように、電極表面へのタンパク質吸脱着機構を吸着質量（Q C M）及び電気化学特性（電荷および誘電率）（F E T）を指標としてリアルタイム

モニタリングすることができる。また、同一の電極で生じる同一の現象を同時にモニタリングするため、測定原理の異なるデータを速度論的に比較解析することが可能となる。

したがって、本発明によれば、生体分子の有する物性を多面的に精度良く同時に検出することができる。

[0026] 以下、本発明の生体分子検出装置、および生体分子検出方法について詳細に説明する。

[0027] <生体分子検出装置>

第1の発明に係る生体分子検出装置は、第1の電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極を有する第2の生体分子検出部と、を有し、前記第1の電極、または、前記第2の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である構成である。

第2の発明に係る生体分子検出装置は、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極として前記第1の電極を共有する第2の生体分子検出部と、参照電極とを有する構成である。

まず、第1の発明に係る生体分子検出装置および第2の発明に係る生体分子検出装置に用い得る各生体分子検出部について、説明する。

[0028] [生体分子検出部]

本発明の生体分子検出装置が備える生体分子検出部は、構成要素の1つに電極を有し、電極が生体分子水溶液と接触することで変化する電位や共鳴振動等の信号を、検出することができる生体分子検出機器をいう。

例えば、電界効果トランジスタ (Field effect transistor ; FET) を利用した電界効果トランジスタ生体分子検出部 (FET生体分子検出部)、水晶振動子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance ; QCM) 法を利用した水晶振動子マイクロバランス生体分子検出部 (QCM生体分子検出部)、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance ; SPR) 法を利用した表面プラズモン共鳴生体分子検出部等が挙げられる。

[0029] ー電界効果トランジスタ生体分子検出部（FET生体分子検出部）ー

FET生体分子検出部は、生体分子が有する電荷によって変化する電位に基づいて生体分子を検出する生体分子検出機器である。FET生体分子検出部は、具体的には、生体分子が生体分子プローブに捕捉されたり、電極に吸着することにより生じる生体分子水溶液中の細かな電位変化を測定することができる。

電界効果トランジスタを用いた生体分子の検出については、目的とする生体分子を捕捉可能な生体分子プローブが固定化された電極（プローブ固定電極）を、生体分子水溶液中に浸すことで、生体分子プローブが生体分子を捕捉し、捕捉した生体分子の電気信号を電位の変化で捕らえる。

[0030] 捕捉した生体分子の電気信号を電位の変化で捕らえる電位方式は、生体分子プローブが、電荷を有する生体分子を捕捉することにより生じる電極（固体）と溶液（液体）との固／液界面（固液界面とも称する）の電位の変化（表面電荷密度の変化）を検出するものである。

[0031] 生体分子検出においては、捕捉した生体分子の電気信号を電流の変化で捕らえる電流方式も知られている。

電流方式では、通常、電極上での酸化還元反応を利用する手法がとられる。しかしながら、生体分子を含む溶液中に、酸化物質または還元物質（例えば、アスコルビン酸）が存在すると、酸化または還元に基づく電流が流れ、生体分子の検出が妨げられる。そのため、検出精度が劣化することがあった。また、電流計測に伴い、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。そのため、電極の腐食、ガスの生成等が生じ、電流測定の安定性が損なわれ、特に繰返し測定する場合に検出精度が劣化することがあった。

従って、生体分子プローブが捕捉した生体分子の電気信号は、電位の変化で捕らえることが好ましい。

[0032] FET生体分子検出部は、電極を有する電界効果トランジスタ（FET）であれば、特に制限されず、公知の電界効果トランジスタを用いることがで

きる。F E T生体分子検出部の構成例を、図1を用いて説明する。

[0033] 図1には、離間して設けられているソースSおよびドレインD上にゲート電極Gを有し、ゲート電極Gに電極30Fが連結しているF E T生体分子検出部52が示されている。

電極30Fがプローブ固定電極ではないときは、電極30Fは電極基板のみで構成され、電極30Fがプローブ固定電極であるときは、電極30Fは、電極基板と、生体分子プローブ固定化材料と、生体分子プローブとを有して構成される。

F E T生体分子検出部においては、電極30Fが、生体分子水溶液と接触する。

[0034] ソースS、ドレインD、およびゲート電極Gを有して構成されるF E Tの構造について、より詳細に説明する。

F E Tとしては、例えば、F l o a t i n gゲート型、E x t e n d e d型などが挙げられる。これらのF E Tの構造の一構成例を、図4および図5を用いて説明する。

図4には、F l o a t i n gゲート型F E Tの模式図が示してあり、図5には、E x t e n d e d型F E Tの模式図が示してある。図4および図5とも(A)が断面図、(B)が上面図である。

[0035] 図4(A)には、F l o a t i n gゲート型のF E T（以下、「F－F E T」と称する）が示されている。図4(A)において、F－F E Tは、シリコン基板12と、シリコン基板12上に、離間して設けられているドレイン14Dおよびソース14Sと、シリコン基板12、ドレイン14Dおよびソース14Sの上に設けられた酸化シリコン層であるゲート絶縁膜16と、窒化シリコン層であるゲート絶縁膜17と、フローティング電極18とを備えている。

トランジスタにおいては、一般に、ドレイン14D－ソース14S間のチャネル領域上にフローティング電極18を形成し、フローティング電極18によって電位を検出する。従って、F－F E Tでは、図4(B)に示すよう

に、フローティング電極 18 の垂直下方の領域に、ドレイン 14 D およびソース 14 S の間のチャネル領域が位置している。

[0036] 一方、図 5 (A) には、Extended 型の FET (以下、「E-FET」と称する) が示されている。図 5 (A) において、E-FET は、シリコン基板 12 と、シリコン基板 12 上に、離間して設けられているドレイン 14 D およびソース 14 S と、シリコン基板 12、ドレイン 14 D およびソース 14 S の上に設けられているゲート絶縁膜 16 と、ゲート絶縁膜 17 と、フローティング電極 18 とを備えている。また、絶縁膜 16 の内部に、ゲート電極 15 を備えている。

このように、ゲート電極 15 を備えることで、ドレイン 14 D およびソース 14 S の間のチャネル領域を、フローティング電極 18 の垂直下方の領域に位置づける必要がなく、フローティング電極 18 を、位置にとらわれず自由に形成することができる。

E-FET では、図 4 (B) に示すように、フローティング電極 18 の垂直下方の領域に、ドレイン 14 D-ソース 14 S 間のチャネル領域が位置しておらず、フローティング電極 18 の垂直下方の領域に、ゲート電極 15 の一端が位置している。またゲート電極 15 の他端の垂直下方の領域にドレイン 14 D-ソース 14 S 間のチャネル領域が位置している。

[0037] Floating ゲート型の FET (F-FET) 及び Extended 型の FET (E-FET) において、ゲート絶縁膜 16 は、酸化シリコン (SiO_2)、窒化シリコン (SiN)、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、酸化タンタル (Ta_2O_5) などの材料が単独または組み合わせて用いられる。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 (SiO_2) の上に窒化シリコン (SiN)、酸化アルミニウム (Al_2O_3) あるいは酸化タンタル (Ta_2O_5) を積層した二層構造とする。

ゲート電極 15 は、ポリシリコン (Poly-Si) 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るソース 14 S、ドレイン 14 D 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。

フローティング電極 18 は、電極基板との親和性の高い材料が望ましく、金、白金、銀、パラジウムなどの貴金属、あるいは、カーボン材料などの導電性物質を用いることができる。

なお、カーボン材料としては、具体的には、例えば、グラッシーカーボン、グラファイト、グラフェン、カーボンナノチューブなどのような導電性カーボン材料が挙げられる。

[0038] Extended 型の FET において、ゲート電極 15 は、配線として用いるため、低抵抗でエッチングなど加工性の良い材料が好ましい。その材料としては、ポリシリコン (Poly-Si)、アルミニウム、モリブデンなどを用いることができる。

また、リフトオフ法などフローティング電極 18 のパターン形成方法を用いることにより、ゲート電極 15 とフローティング電極 18 とを、例えば金のような同じ材料で形成することもできる。

[0039] ー水晶振動子マイクロバランス生体分子検出部 (QCM 生体分子検出部) ー
QCM 生体分子検出部は、少なくとも、電極と、水晶振動子と、水晶振動子の振動を検出する発振回路とを有して構成され、水晶振動子マイクロバランス法に基づき、生体分子を検出する生体分子検出機器である。

ここで、水晶振動子マイクロバランス法とは、薄い板状の水晶の両面に電極を取り付けた積層体を用い、各電極に交流電場を印加すると、一定の周波数 (共振周波数) で振動する性質を利用して、電極に付着した物質の質量を測定する手法である。

したがって、QCM 生体分子検出部では、水晶振動子に隣接する電極に生体分子が付着すると、生体分子の質量に応じて共振周波数が変動する性質を利用し、生体分子の質量変化を計測することで、生体分子を検出する。

QCM 生体分子検出部の構成例を、図 2 を用いて説明する。

[0040] 図 2 には、電極 22 と、水晶振動子 (水晶板) 24 と、電極 30Q とが、この順に積層された QCM 生体分子検出部 54 が示されている。電極 22 と電極 30Q には、図示しない発振回路が導線により繋がっている。

電極 2 2 と、電極 3 0 Q とは、特に区別されず、どちらがプローブ固定電極になってもよいし、電極 2 2 と、電極 3 0 Q との両方がプローブ固定電極になってもよい。

電極 2 2 および電極 3 0 Q がプローブ固定電極ではないときは、電極 2 2 および電極 3 0 Q は電極基板のみで構成される。電極 2 2 および電極 3 0 Q がプローブ固定電極であるときは、電極 2 2 および電極 3 0 Q は、電極基板と、生体分子プローブ固定化材料と、生体分子プローブとを有して構成される。

なお、電極 2 2 も、電極 3 0 Q も、プローブ固定電極であるときは、水晶振動子 2 4 がある側とは反対の表面に、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する。

[0041] QCM 生体分子検出部においては、電極 2 2 および電極 3 0 F の少なくとも一方が、生体分子水溶液と接触する。

なお、以下、本明細書においては、QCM 生体分子検出部が有する電極がプローブ固定電極となる場合は、電極 3 0 F がプローブ固定電極である場合を例に、説明する。

[0042] ー表面プラズモン共鳴生体分子検出部（SPR 生体分子検出部）ー

SPR 生体分子検出部は、少なくとも、電極と、ガラス基板と、光照射装置と、反射光を受光し反射率を検出する受光装置とを有して構成され、表面プラズモン共鳴法に基づき、生体分子を検出する生体分子検出機器である。

ここで、表面プラズモン共鳴法とは、ガラス基板を通じて電極に全反射条件で入射させた光のうち、電極中及びその外側まで染み出す近接場光が、電極上に誘起される表面プラズモンに吸収されることにより、反射光中にこれに対応した吸収ピークが出現する現象を利用し、電極に付着した物質を検出する手法である。

[0043] 電極上に生体分子が付着すると、周辺の場の誘電率が変化する。この結果、表面プラズモンを励起できる光の波数ベクトルがずれ、反射光中に現れる吸収ピークの反射角度のシフト又は一定反射角度における反射光量の変化が

生じることになる。これを受光装置で測定して求めることにより、電極表面近傍に起こる生体分子の吸着及び脱着を検知することができる。これにより、生体分子プローブと、生体分子と、の検体物質間の特異的な相互作用（ハブリダイゼーション等）を高感度に検出することができる。

S P R 生体分子検出部の構成例を、図 3 を用いて説明する。

[0044] 図 3 には、ガラス基板 28 と、電極 30 S P とが、この順に積層された S P R 生体分子検出部 56 が示されている。

S P R 生体分子検出部 56 では、図示しない光照射装置から、ガラス基板 28 に入射角 θ で光 ($h\nu$) が照射され、電極 30 で反射すると共に、図示しない受光装置で反射光を受光することにより、電極 30 に付着した生体電子を検出する。受光装置としては、C C D (Charge Coupled Device) カメラなどを用いてもよい。

[0045] 電極 30 S P がプローブ固定電極ではないときは、電極 30 S P は電極基板のみで構成される。電極 30 S P がプローブ固定電極であるときは、電極 30 S P は、電極基板と、生体分子プローブ固定化材料と、生体分子プローブと、を有して構成される。

[0046] 次に、電極の詳細について説明する。

まず、電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極（プローブ固定電極）である場合の電極について説明し、ついで、電極がプローブ固定電極でない場合の電極について、説明する。

[0047] [電極]

生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極（プローブ固定電極）は、電極基板と、生体分子プローブ固定化材料と、生体分子プローブと、を有して構成される。より具体的には、電極基板上に、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料の層が積層されている構成である。

[0048] ー電極基板ー

電極基板としては、導電性物質を含む基板であれば、特に制限されず、例

えば、金属や既述のカーボン材料等を含んで構成すればよい。金属それ自体を電極基板としてもよく、このような電極基板（金属電極基板）は、金属単体でも、合金でもよい。例えば、金、銀、白金、タンタル、アルミニウム、チタン、マグネシウム、亜鉛、珪素、錫等が挙げられる。中でも、後述する生体分子プローブ固定化材料との親和性が良い金属が好ましい。生体分子プローブ固定化材料として、例えば、アルカンチオールを用いる場合には、硫黄原子との親和性が良い金属であることが好ましく、具体的には、銀、白金、または亜鉛であることが好ましく、金であることがより好ましい。

また、電極基板の形状は、薄膜であれば特に制限されず、上面視の形状は、円形でもよいし、楕円形でもよいし、矩形でもよいし、三角形でもよいし、多角形でもよいし、不定形でもよい。

[0049] 電極基板は、表面の一部または全部が、金属塩および金属酸化物の少なくとも一方で被覆されていてもよい。すなわち、電極基板表面に、金属塩および金属酸化物の少なくとも一方を含有する無機層が、隣接して積層されていてもよい。

生体分子検出部として、FET生体分子検出部を用いるとき、電極基板の表面の一部または全部が、金属塩および金属酸化物の少なくとも一方で被覆され、当該被覆部分が生体分子水溶液と接触していることで、水溶液と電極との固液界面における電位の安定性に優れる。

[0050] 電極基板は、生体分子水溶液による腐食が生じないとの理由から、一般に、金で構成された金属電極基板が用いられるが、金は分極を起こすため、固液界面の電位が不安定になること（「電位ドリフト」とも称する）がある。電位ドリフトは金属電極が浸されている生体分子水溶液中のイオン濃度が増減することによっても生ずることがある。

FET生体分子検出部では、電位方式で生体分子検出を行うために、電位ドリフトを抑制することで、生体分子検出の精度を高くすることができる。金属電極基板の表面の一部または全部が、金属塩および金属酸化物の少なくとも一方で被覆され、当該被覆部分が生体分子水溶液と接触可能なように露出

していることで、金属の分極を起こし難く、電位ドリフトを抑制することができる。これは次の理由によるものと考えられる。

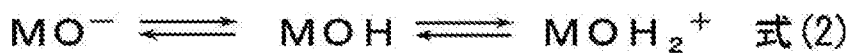
[0051] 金属塩をMXと表すと、金属塩は、水溶液中で、金属イオン (M^+) と塩イオン (X^-) とに解離し、下記式 (1) に示す式のごとく平衡状態になる。

[0052] [化1]



[0053] また、金属酸化物も水溶液中で解離し、平衡状態になると考えられる。すなわち、金属酸化物をMOと表すと、金属酸化物イオン MO^- は、水溶液中で水酸化物 (MOH) と平衡状態となり、さらに、水溶液の液性 (pH) に応じて、 MOH_2^+ となる。 MO^- と、 MOH と、 MOH_2^+ とは、下記式 (2) に示す式の如く、平衡状態になると考えられる。

[0054] [化2]



[0055] 従って、金属電極基板が金属塩で被覆されている場合は、 X^- イオンを含む生体分子水溶液、金属酸化物で被覆されている場合は H^+ イオンを含む生体分子水溶液中に浸されることで、イオンが平衡状態となり、電極と生体分子水溶液との固液界面での電位が安定すると考えられる。すなわち、電位ドリフトが生じ難いと考えられる。また、電極材料となる金属塩および金属酸化物は、金と異なり、分極を生じないため、かかる観点からも、電位ドリフトが生じ難いと考えられる。

[0056] 以上より、生体分子検出部として FET 生体分子検出部を用いる場合は、電極基板として、表面の一部または全部が、金属塩および金属酸化物の少なくとも一方で被覆され、当該被覆部分が生体分子水溶液と接触可能なように露出している電極基板を用いることで、より精度の高い生体分子検出を行うことができると考えられる。

[0057] 金属塩としては、特に制限されず、例えば、塩化銀、塩化カルシウム、塩

化バリウム、塩化マグネシウム、塩化亜鉛、塩化アルミニウム、硝酸カルシウム、硫酸アルミニウム、硫化銀、臭化銀、ヨウ化銀、塩化白金等が挙げられる。金属塩は、1種のみであってもよいし、2種以上であってもよい。

以上の中でも、血清等の生体分子を含有する水溶液は、塩化物イオンを多く含むことから、金属塩は、金属塩化物であることが好ましい。また、金属塩を構成する金属は、後述する生体分子プローブ固定化材料との親和性が良いものが好ましい。生体分子プローブ固定化材料として、例えば、アルカンチオールを用いる場合には、金属塩を構成する金属が、硫黄原子との親和性が良い金属であることが好ましく、具体的には、銀、白金、または亜鉛であることが好ましく、銀であることがより好ましい。

[0058] 金属酸化物としては、特に制限されず、例えば、タンタル酸化物 (Ta_2O_5)、酸化チタン (TiO_2)、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、酸化マグネシウム (MgO)、酸化亜鉛 (ZnO)、酸化シリコン、酸化錫、酸化白金、酸化金等が挙げられる。金属酸化物は、1種のみであってもよいし、2種以上であってもよい。

以上の中でも、金属塩を構成する金属が、後述する生体分子プローブ固定化材料との親和性が良いものが好ましい。生体分子プローブ固定化材料として、例えば、アルカンチオールを用いる場合には、金属塩を構成する金属が、硫黄原子との親和性が良い金属であることが好ましく、具体的には、タンタル (Ta)、白金、金、またはチタンであることが好ましく、タンタルであることがより好ましい。

[0059] 金属塩ないし金属酸化物で構成される無機層は、後述する表面処理により、金属電極基板の塩（金属塩）または酸化物（金属酸化物）として形成したり、電極基板に、別途、金属塩ないし金属酸化物を接着する方法が挙げられる。

[0060] 電極基板上に、別途用意した金属塩ないし金属酸化物を接着する方法としては、電極基板または金属塩ないし金属酸化物に、エポキシ化合物等の接着剤を付与して、電極基板と金属塩ないし金属酸化物とを張り合わせる方法や

、金属塩ないし金属酸化物を、電子ビーム等を用いて電極基板上に蒸着する方法やスパッタリングにより形成する方法が挙げられる。

[0061] 金属電極基板の表面を表面処理する方法としては、金属電極基板の表面に塩酸、硝酸、塩イオンを含むキレート剤溶液等の溶液や、酸素ガス、オゾンガス等の気体を付与する方法が挙げられる。

電極基板の表面に、金属塩で構成される無機層を形成するためには、電極基板として金属電極基板を用い、電極基板の金属表面を、目的の金属塩とし得る溶液等で表面処理すればよい。例えば、銀板表面に塩化銀で構成された層を形成するには、銀板表面に、 Fe^{3+} を配位子とするキレート剤（例えば、PDTA；1,3-Propanediamine Tetraacetic Acid）に塩化ナトリウムを溶解したキレート溶液を付与すればよい。キレート溶液中の塩化ナトリウムの濃度を調整したり、キレート溶液と銀板との接触時間を調整することにより、無機層たる塩化銀層の層厚を制御することができる。

[0062] 金属電極基板の表面に、金属酸化物で形成された無機層を形成するためには、金属電極基板の表面を酸化すればよい。例えば、金属電極基板表面に、過酸化水素等の酸化剤を含有する溶液を付与したり、酸素ガス、オゾンガス等を吹き付ける等して、金属電極基板を酸化すればよい。

[0063] 金属塩ないし金属酸化物を含んで構成される無機層の層厚は、 $1\text{ nm} \sim 100\text{ nm}$ であることが好ましく、 $1\text{ nm} \sim 10\text{ nm}$ であることがより好ましい。

[0064] 電極基板上に、金属塩ないし金属酸化物で構成された無機層が存在していることは、例えば、電極基板表面を、AFM（原子間力顕微鏡；Atomic Force Microscope）、TEM（透過型電子顕微鏡；Transmission Electron Microscope）等の顕微鏡を用いた写真観察等によって確認することができる。

[0065] 金属電極がプローブ固定電極ではないとき、金属電極基板が参照電極となる。

金属電極基板としては、金属電極がプローブ固定電極である場合の金属電極基板と同様であり、金属単体または合金の金属板であってもよいし、表面

の一部または全部が金属塩化物もしくは金属酸化物で被覆されている金属板であってもよい。

[0066] ー生体分子プローブ、生体分子プローブ固定化材料ー

プローブ固定電極は、金属電極基板上に、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する。

生体分子プローブとしては、核酸、ポリヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、抗体、抗原、アプタマー、糖タンパク質または糖鎖が挙げられる。これらは、断片等であってもよい。例えば、オリゴヌクレオチド、cDNAの断片等は、通常、300個以下の塩基から構成されている。オリゴヌクレオチドを用いる場合は、80個以下の塩基長の核酸断片であることが望ましい。

生体分子プローブは、一端が生体分子プローブ固定化材料に結合（固定化）し、生体分子を含有する水溶液中の生体分子と特異的に結合、または反応する。また、生体分子プローブを、一本鎖プローブ（例えば、一本鎖DNA）とし、ターゲットDNAと相補鎖結合させた後、そのターゲットDNAの塩基と相補的に反応する一塩基伸長反応を用いて、特定の生体分子を精度良く検出することもできる。生体分子の検出方法の詳細については後述する。

[0067] 生体分子プローブ固定化材料は、電極に生体分子プローブを固定化するための材料である。電極が、生体分子が有する電荷を正確に検出するためには、生体分子を捕捉する生体分子プローブと、金属電極基板と、が結合していること（固定化されていること）が重要である。

[0068] 生体分子プローブ固定化材料としては、含硫黄化合物、シリル基含有化合物、ストレプトアビジン（以下、単に「アビジン」とも称する）等が挙げられる。

含硫黄化合物としては、アルキル鎖を有するアルカンチオール等に代表されるチオール基含有化合物やアルカンジスルフィド類などが挙げられる。

シリル基含有化合物としては、アルキル鎖を有するアルキルアルコキシランなどが挙げられる。

含硫黄化合物、シリル基含有化合物はいずれも、アルキル鎖に代えて、ポリエチレングリコール（PEG）に代表されるポリマー鎖を有する含硫黄化合物またはシリル基含有化合物であってもよい。

[0069] 生体分子プローブ固定化材料として、チオール基含有化合物を用いる場合の、金属電極基板との結合性について説明する。

硫黄は、金、銀、白金等の貴金属との親和性が高い。

例えば、金属電極基板として、貴金属の金属板または金属薄膜を用いるとき、チオール基含有化合物の硫黄と、金属（例えば、金）と、が作用し、硫黄と金属とが結合する。

[0070] また、金属電極基板の表面の全部または一部を、金属塩および金属酸化物の少なくとも一方で構成される無機層で被覆したときに、当該無機層上に生体分子プローブ固定化材料の層を設けるときは、次のようなメカニズムで、金属電極基板と含硫黄化合物とが結合する。

無機層が金属塩であるとき、金属電極基板には、金属塩の塩イオン（Ag⁺、Cl⁻の場合、Cl⁻）が露出しており、無機層が金属酸化物であるとき、金属電極基板には、金属酸化物の酸素イオン（O²⁻）が露出している。このような状況下、電極の金属塩ないし金属酸化物に対して、含硫黄化合物を作用させると、金属電極基板の表面に金属塩が存在する場合は、塩イオン（例えばCl⁻）が硫黄と置換し、また、金属電極基板の表面に金属酸化物が存在する場合は、酸素イオン（O²⁻）が硫黄と置換して、金属と硫黄とが結合する。

[0071] 次に、生体分子プローブ固定化材料としてシリル基含有化合物を用いる場合の、生体分子プローブ固定化材料（シリル基含有化合物）と金属電極基板との結合性について、説明する。

シリル（Si）基は、酸素イオンとの親和性が高い。金属電極基板の表面にガラスや金属酸化物などの酸化物が存在するとき、金属電極表面には、金属酸化物の酸素イオン（O²⁻）が露出している。このような状況下、金属電極基板上の酸化物に対して、シリル基含有化合物を作用させると、酸素イオン（O²⁻）と硫黄原子とが結合する。

[0072] また、金属電極表面にまずチオール基含有化合物を作用させると、金属表面に硫黄が結合してチオール基含有化合物が固定化される。その後、金属電極表面を、例えばPDTAのような反応溶液と接触させると、チオール基含有化合物が形成されていない金属電極表面に塩化銀のような金属塩が形成される。チオール基含有化合物の濃度を調節することにより、金属表面に結合する硫黄原子の密度、すなわちチオール基含有化合物の密度を調節できる。これにより、電極表面において、金属塩の占める面積とチオール基含有化合物が固定化される面積の割合を制御して変えることができる。この方法において、PDTAのような反応溶液との接触時間を調節することにより、金属塩（塩化銀）の層の厚さを制御することができる。また、チオール含有化合物の大きさ、例えばアルキル基の長さを調節することにより、チオール基含有化合物の官能基（アミノ基、カルボキシ基、アルデヒド基など）と金属塩表面との相対位置、距離、チオール基含有化合物の柔軟性を制御し、最適化することができる。

[0073] アビジンは、分子の一部を、アルカンチオール等の含硫黄化合物、または、アルキルアルコキシシランなどのシリル基含有化合物で修飾することにより、電極にアビジンを固定化すればよい。

[0074] 一方、生体分子プローブ固定化材料と、生体分子プローブとの結合（固定化）は、例えば、生体分子プローブの一端および生体分子プローブ固定化材料の一端のいずれか一方をアミノ基で修飾し、他方をカルボキシ基で修飾して、両者をアミド結合等により結合することが考えられる。なお、分子内に、既に、アミノ基またはカルボキシ基を有する場合には、アミノ基またはカルボキシ基の修飾を行なわなくてもよい。また、カルボキシ基による修飾に代えて、前記一端をアルデヒド基で修飾し、アミノ基と結合させてもよい。

[0075] 生体分子プローブ固定化材料がアビジンである場合には、アビジンとの親和性の高いビオチンを用いることが考えられる。アビジンは、4つのサブユニットから構成されており、それぞれにビオチン結合部位を有するため、1分子あたり4つのビオチンと結合することができる。従って、ビオチンを生

体分子プローブの一端に修飾することで、アビジン-ビオチン結合を利用して、生体分子プローブ固定化材料と生体分子プローブとを結合（固定化）することができる。

[0076] 生体分子プローブ固定化材料は、上記の中でも、含硫黄化合物が好ましく、チオール基含有化合物がより好ましい。

含硫黄化合物は、自己組織化膜（SAM; Self-Assembled Membrane）として機能する。自己組織化膜（SAM）とは、外からの細かい制御を加えていない状態で、膜材料そのものがもつ機構によって形成される一定の秩序をもつ組織をもった薄膜のことをいう。この自己組織化により、非平衡の状況で長距離にわたって秩序がある構造やパターンが形成される。アルカンチオールやアルカンジスルフィド類などの含硫黄化合物は、金、銀等の貴金属、貴金属で構成される金属塩、または貴金属で構成される酸化物等、貴金属を含む基板上に、自発的に吸着し単分子サイズの薄膜を与える。従って、電極に高密度で生体分子プローブを固定化することができ、生体分子の検出の精度をより高くすることができる。

[0077] 生体分子プローブ固定化材料を用いて構成される層（生体分子プローブ固定化層）を、電極に形成する場合は、生体分子プローブ固定化材料が溶解している生体分子プローブ固定化材料溶液を、電極基板に直接、または、金属塩ないし金属酸化物で構成される層上に付与し、乾燥すればよい。

生体分子プローブは、生体分子プローブ固定化層を形成した後に、生体分子プローブ固定化材料に結合すればよい。また、生体分子プローブと生体分子プローブ固定化材料とを予め結合してから、生体分子プローブが結合した生体分子プローブ固定化材料を溶媒に溶かし、溶液として、金属電極基板、または、金属塩ないし金属酸化物で構成される層の上に付与してもよい。

[0078] 金属電極基板、または、金属塩ないし金属酸化物で構成される無機層の上への溶液の付与方法としては、スピン塗布、エアナイフ塗布、バー塗布、ブレード塗布、スライド塗布、カーテン塗布等の塗布により溶液を付与方法、さらには、滴下法、スプレー法、蒸着法、キャスト法、浸漬法等により

付与する方法が挙げられる。

生体分子プローブ固定化材料、または、生体分子プローブが結合した生体分子プローブ固定化材料を溶解した溶液は、金属電極基板上、または、金属塩ないし金属酸化物で構成される無機層上に、ランダム状に付与してもよいし、アレイ状に配列させて付与してもよいし、ドメイン状に一塊に付与してもよい。また、パターン状に付与してもよい。

[0079] 生体分子プローブ固定化材料、または、生体分子プローブが結合した生体分子プローブ固定化材料を溶解する溶媒としては、水、アルコール、または、これらの混合溶媒が用いられる。生体分子プローブ固定化材料のみを溶解する場合は、非水溶性有機溶媒を用いてもよいが、生体分子プローブが結合した生体分子プローブ固定化材料を溶解する場合は、生体分子を扱う観点から、水、アルコール等の水溶性溶媒、または、これらの混合溶媒が用いられる。中でも、水、エタノール、または、これらの混合溶媒が好ましい。

[0080] 電極基板上に、生体分子プローブ固定化材料が固定化されていることは、例えば、金属電極基板表面について、XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy)、ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) 等のX線光電子分光分析を行うことで確認することができる。例えば、生体分子プローブ固定化材料としてアルカンチオールを用いた場合、アルカンチオールが金属電極基板上に固定化されているときは、硫黄原子に由来するピークが検出される。

また、生体分子プローブが、生体分子プローブ固定化材料に固定化されていることは、例えば、蛍光分子で生体分子を標識し、蛍光検出を行なうことで確認することができる。

[0081] 電極基板が金属薄膜であるプローブ固定電極の構成例を、図6を用いて説明する。

図6には、金属電極基板32aと、金属電極基板32aの表面に生体分子プローブ固定化材料を用いて構成される生体分子プローブ固定化層36aと、生体分子プローブ固定化層36aに固定化された生体分子プローブ38a

とを有する金属電極（プローブ固定電極）30aが示されている。

電極基板32aは、表面の全部が、生体分子プローブ38aが固定化された生体分子プローブ固定化層36aで被覆されていてもよいし、図6に示すように、表面の一部が、生体分子プローブ38aが固定化された生体分子プローブ固定化層36aで被覆されていてもよい。

[0082] 次に、金属電極基板表面の全部または一部が、金属塩および金属酸化物の少なくとも一方で構成される無機層で被覆されている場合のプローブ固定電極の構成例を、図7を用いて説明する。

図7には、金属電極基板32bと、金属電極基板32b上に位置し、金属塩及び金属酸化物の少なくとも一方で構成された無機層34bと、同様に、金属電極基板32b上に位置し、生体分子プローブ固定化材料を用いて構成される生体分子プローブ固定化層36bおよび生体分子プローブ固定化層36bに固定化された生体分子プローブ38bとを有する金属電極（プローブ固定電極）30bが示されている。

[0083] 図7に示す金属電極基板32bは銀薄膜であり、表面処理により、一旦、金属電極基板32bの表面の全てが、塩化銀（AgCl）で構成される無機層34bで被覆されている。その後に、無機層34b表面の一部に、アルカンチオールで構成される生体分子プローブ固定化材料を作用することにより、アルカンチオールの硫黄（S）が塩化銀の塩化物イオン（Cl）と置換して、アルカンチオールの硫黄（S）が金属電極基板の金属（Ag）と結合し、金属電極基板32b上に生体分子プローブ固定化層36bが形成されている。

生体分子プローブ38bは、生体分子プローブ固定化材料を無機層に作用させる前に、予め生体分子プローブ固定化材料と作用させ、結合しておけばよい。

[0084] 既述のように、生体分子検出部としてFET生体分子検出部を用いる場合は、電位安定性のため、生体分子水溶液と接触可能なように、無機層部34bを、金属電極基板32b表面の一部に残しておくことが好ましい。

次に、既述の生体分子検出部を用いた生体分子検出装置の構成について説明する。

[0085] [第1の発明に係る生体分子検出装置]

第1の発明に係る生体分子検出装置は、第1の電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極を有する第2の生体分子検出部と、を有し、前記第1の電極、または、前記第2の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である構成である。

本発明の第1の発明に係る生体分子検出装置の構成例を、図8に示す。

[0086] 図8は、第1の生体分子検出部としてFET生体分子検出部82Fを用い、第2の生体分子検出部としてQCM生体分子検出部84Qを用いた生体分子検出装置102FQが示されている。

FET生体分子検出部82Fは、ソースS、ドレインD及びゲート電極Gを有し、ゲート電極Gが電極30Fとリード線につながれている。電極30Fは、銀板に塩化銀が被覆した金属電極基板のみで構成されている。また、電極30Fは、生体分子水溶液70と接触しており、生体分子水溶液70中の電位の変化を読み取ることができる状態になっている。

[0087] 一方、QCM生体分子検出部84Qは、電極22と、水晶振動子24と、電極30Qとをこの順に有する構成となっている。

電極30Qは、金属電極基板32qと、金属電極基板32q上に位置する生体分子プローブ固定化層36qと、生体分子プローブ固定化層36q上に位置する生体分子プローブ38qとを有する。

図8では、生体分子プローブ38qを模式的に、1つの層として描いているため、QCM生体分子検出部84Qにおいて、生体分子水溶液70に接触するのが生体分子プローブ38qのみであるかのように見える。しかし、実際には、電極30Qは、図6や図7に示す金属電極30aまたは30bのごとき構造である。そのため、金属電極基板32qや、生体分子プローブ固定化層36qも生体分子水溶液70と接触し得る。

[0088] 電極22は金属電極基板のみで構成されており、電極基板32qと電極2

2は、共に金薄膜である。また、電極基板32qと電極22は発振回路26とリード線を通じて繋がっており、発振回路26は、生体分子プローブ38qで生体分子が捕捉されることにより生じる振動を感知する。なお、電極基板32qは、アースに連結している。

[0089] このように、図8に示す生体分子検出装置102FQでは、第1の生体分子検出部であるFET生体分子検出部82Fが参照電極として機能し、第2の生体分子検出部であるQCM生体分子検出部84Qが備える金属電極30Qがプローブ固定電極となっている。

従って、電極30Q上の生体分子プローブ38qによって、生体分子水溶液70中の生体分子が捕捉されると、QCM生体分子検出部84Qが、水晶振動子の振動を通じて生体分子の質量を検出する。同時に、FET生体分子検出部は、生体分子水溶液70を通じて、生体分子プローブ38qに生体分子が捕捉されたことで生じる電位の変化を感知し、生体分子を検出する。

[0090] 図8では、プローブ固定電極を有する生体分子検出部としてQCM生体分子検出部を用い、参照電極として機能する生体分子検出部としてFET生体分子検出部を用いた生体分子検出装置を示したが、例えば、QCM生体分子検出部に代えて、SPR生体分子検出部を、プローブ固定電極を有する生体分子検出部として用いてもよい。

次に、本発明の第2の発明に係る生体分子検出装置について、説明する。

[0091] [第2の発明に係る生体分子検出装置]

第2の発明に係る生体分子検出装置は、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極として前記第1の電極を共有する第2の生体分子検出部と、参照電極と、を有する構成である。

本発明の第2の発明に係る生体分子検出装置の構成例を、図9に示す。

[0092] 図9は、第1の生体分子検出部としてFET生体分子検出部86Fを用い、第2の生体分子検出部としてQCM生体分子検出部88Qを用い、更に参照電極60を用いた生体分子検出装置104FQが示されている。

F E T 生体分子検出部 8 6 F は、ソース S、ドレイン D 及びゲート電極 G を有し、ゲート電極 G が電極 3 0 F Q とリード線につながれている。

電極 3 0 F Q は、電極基板 3 2 f q と、電極基板 3 2 f q 上に位置する生体分子プローブ固定化層 3 6 f q と、生体分子プローブ固定化層 3 6 f q 上に位置する生体分子プローブ 3 8 f q とを有する。従って、電極 3 0 F Q はプローブ固定電極である。

[0093] なお、図 9 においては、電極 2 2 は金属電極基板のみで構成されており、電極基板 3 2 f q と電極 2 2 は、共に金薄膜である。また、電極基板 3 2 f q と電極 2 2 は発振回路 2 6 とリード線を通じて繋がっており、発振回路 2 6 は、生体分子プローブ 3 8 f q で生体分子が捕捉されることにより生じる振動を感知する。なお、電極 2 2 は、アースに連結している。

[0094] Q C M 生体分子検出部 8 8 Q は、電極 2 2 と、水晶振動子 2 4 と、電極 3 0 F Q とをこの順に有する構成となっている。

つまり、F E T 生体分子検出部 8 6 F と、Q C M 生体分子検出部 8 8 Q とは、プローブ固定電極である電極 3 0 F Q を共有している。

[0095] 電極 3 0 F Q は、生体分子水溶液 7 0 に接触し、別途、参照電極 6 0 が生体分子水溶液 7 0 に接触している。

図 9 では、生体分子プローブ 3 8 f q を模式的に、1 つの層として描いているため、F E T 生体分子検出部 8 6 F および Q C M 生体分子検出部 8 8 Q において、生体分子水溶液 7 0 に接触するのは生体分子プローブ 3 8 f q のみであるかのように見える。しかし、実際には、電極 3 0 F Q は、図 6 や図 7 に示す電極 3 0 a または 3 0 b のごとき構造である。そのため、電極基板 3 2 f q や、生体分子プローブ固定化層 3 6 f q も生体分子水溶液 7 0 と接触し得る。

[0096] このように、図 9 に示す生体分子検出装置 1 0 4 F Q では、第 1 の生体分子検出部である F E T 生体分子検出部 8 6 F と、第 2 の生体分子検出部である Q C M 生体分子検出部 8 8 Q とが、1 つの共通する電極 3 0 F Q を共有し、電極 3 0 F Q がプローブ固定電極となっている。生体分子検出装置 1 0 4

F Qでは、F E T生体分子検出部 8 6 Fも、Q C M生体分子検出部 8 8 Qと同様に電極が感知する信号を検出する。そのため、生体分子検出装置 1 0 4 F Qには、参照電極 6 0を用いて、生体分子検出の基準としている。

[0097] なお、参照電極 6 0には、電極基板 3 2 f qと同様の金属板または、表面の全部もしくは一部が金属塩および金属酸化物の少なくとも一方で被覆された金属板を用いることができる。

[0098] 図 9では、プローブ固定電極を有する生体分子検出部としてQ C M生体分子検出部とF E T生体分子検出部を用いた生体分子検出装置を示したが、例えば、F E T生体分子検出部またはQ C M生体分子検出部に代えて、S P R生体分子検出部を用いてもよい。また、プローブ固定電極を共有する生体分子検出部としてQ C M生体分子検出部およびS P R生体分子検出部を用いる場合には、参照電極として、電極が金属電極基板で構成されたF E T生体分子検出部を用いる態様も考えられる。

[0099] なお、第 2の発明に係る生体分子検出装置は、プローブ固定電極を共有している。そのために、例えば、図 9に示す態様の生体分子検出装置 1 0 4 F Qの態様においては、F E T生体分子検出部が、生体分子プローブに生体分子が捕捉されるとききの振動をノイズとして拾ってしまうことがある。かかる観点から言えば、プローブ固定電極を有する生体分子検出部としてQ C M生体分子検出部を用いるときは、F E T生体分子検出部は、プローブ固定電極を共有せずに、参照電極として機能する生体分子検出部として用いること（すなわち、本発明の第 1の発明に係る生体分子検出装置の構成とすること）が好ましい。F E T生体分子検出部がプローブ固定電極から離れて位置していることで、生体分子プローブに生体分子が捕捉されたときの振動をノイズとして拾い難く、より精度の高い生体分子検出を行うことができる。

[0100] <生体分子検出方法>

本発明の生体分子検出方法は、本発明の生体分子検出装置を用い、前記生体分子検出装置が有する第 1の電極および第 2の電極を、同時に、少なくとも 1種の生体分子を含有する水溶液に接触する水溶液接触工程と、前記第 1

の電極と前記水溶液との固液界面における信号および前記第 2 の電極と前記水溶液との固液界面における信号をそれぞれ検出する検出工程とを有して構成される。

すなわち、本発明の生体分子検出方法は、既述の本発明の生体分子検出装置（本発明の第 1 の発明に係る生体分子検出装置または本発明の第 2 の発明に係る生体分子検出装置）を、生体分子水溶液に接触する水溶液接触工程と、前記電極の固液界面における信号を検出する検出工程とを有して構成される。

[0101] [水溶液接触工程]

水溶液接触工程では、本発明の生体分子検出装置を、少なくとも 1 種の生体分子を含有する水溶液（生体分子水溶液）に接触する。

生体分子水溶液の接触方法としては、生体分子検出装置に備えられた第 1 の生体分子検出部および第 2 の生体分子検出部がそれぞれ有する電極が、同時に、生体分子水溶液に接触し得る方法であれば特に制限されない。例えば、金属電極表面を生体分子水溶液に浸したり、金属電極表面に生体分子水溶液を滴下したり、生体分子水溶液中に生体分子検出装置を浸漬すればよい。

また、第 1 の生体分子検出部の少なくとも金属電極と、第 2 の生体分子検出部の少なくとも電極と、を流路等の管内に配置し、生体分子水溶液を管内に流すことで、各電極と生体分子水溶液とを接触することもできる。かかる方法によれば、所望の量の生体分子水溶液について、継続的に生体分子の検出を行うことができる。

[0102] かかる工程により、本発明の生体分子検出装置が有するプローブ固定電極上の生体分子プローブ固定化材料に固定化された生体分子プローブが、水溶液中の生体分子を捕捉すると共に、生体分子の捕捉により生じた固液界面の信号の変化を検出する。これにより、生体分子の存在を定量的に検出することができる。

[0103] 生体分子水溶液中に、例えば、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、生体分子プローブが、ターゲット遺伝子と相補的塩基配列

を有するDNAプローブである場合には、適切な反応条件の下で、ターゲット遺伝子とDNAプローブとが、相補的な複合体を形成する〔ハイブリダイゼーション (Hybridization) 〕。かかる複合体を形成することで、生体分子プローブが、生体分子を捕捉する。

[0104] 〔検出工程〕

検出工程では、生体分子検出装置における、第1の電極および第2の電極と、水溶液と、の固液界面における信号をそれぞれ検出する。

ここで、固液界面における信号とは、FET生体分子検出部においては、電位の変化であり、QCM生体分子検出部においては、水晶振動子の振動に基づく共振周波数変化であり、SPR生体分子検出部においては、光の表面プラズモン共鳴角変化である。

なお、第2の発明の生体分子検出装置を用いる場合には、第1の生体分子検出部と第2の生体分子検出部とで、第1の電極を共有するため、「第1の電極と前記水溶液との固液界面における信号および第2の電極と前記水溶液との固液界面における信号をそれぞれ検出する」とは、第1の電極と水溶液との固液界面における信号を、第1の生体分子検出部と第2の生体分子検出部とで、それぞれ検出することを意味する。

[0105] FET生体分子検出部を例に、詳細に説明する。

生体分子水溶液中の生体分子は、正の電荷または負の電荷を帯びている。例えば、生体分子として核酸を検出するとき、生体分子水溶液は、一般に、pH 7～8の緩衝溶液（バッファ溶液）に調製する。かかるpH環境下では、DNAのリン酸エステル鎖は負の電荷を帯びている。このように電荷を帯びた核酸が、生体分子プローブであるDNAプローブとハイブリダイズによる複合体を形成することにより、電極と生体分子水溶液との固液界面で電荷密度が変化し、表面電位が変化する。

[0106] 〔洗浄工程〕

本発明の生体分子検出方法では、検査工程の前に、生体分子検出装置を洗浄液により洗浄する洗浄工程を設けてもよい。洗浄液は、生体分子検出装置

に非特異的に付着した生体成分水溶液を除去し得る液体であれば、特に制限されない。洗浄液としては、例えば、水、リン酸緩衝液、NaCl水溶液、生理食塩水等が挙げられる。

[0107] 本発明の生体分子検出装置と生体分子水溶液を接触させた後、洗浄液により生体分子検出装置を洗浄し、ターゲット以外の非特異的にプローブ固定電極に吸着した他の生体分子や妨害成分を除去することにより、高精度の測定を行うことができる。生体分子検出装置の洗浄後、電極の固液界面の電位変化を検出するための溶液（検出溶液）をプローブ固定電極表面に導入する。固液界面には電気二重層が形成されていて、固液界面の電位変化は電気二重層に依存する。電気二重層の幅（厚さ）をデバイ（Debye）長といい、イオン強度の関数である。

[0108] 塩濃度の高い溶液中ではデバイ長が小さく、例えば100mmol/L（以下、mmol/Lとも表す）のNaCl溶液中では約1nmである。一方、希釈溶液中ではデバイ長が大きくなり、例えば、1mmol/LのNaCl溶液中では約10nmとなる。高感度測定を行うためには、デバイ長は長い方が好ましく、生体分子検出装置に付着した生体成分水溶液を洗浄して取り除いた後、最適化された濃度の検出溶液に置き換えて、固液界面の電位変化を測定することが望ましい。

電極基板表面に金属／金属塩および金属／金属酸化物の少なくとも一方で構成される無機層が被覆されているプローブ固定電極においては、例えば、無機層が金属酸化物層である場合には、検出溶液として、1mmol/Lから100mmol/Lの濃度のリン酸緩衝液を用いることができる。また、無機層が塩化銀層である場合には、1mmol/Lから100mmol/Lの濃度の塩化ナトリウム水溶液あるいは塩化カリウム水溶液を用いることができる。

[0109] かかる電位の変化は、電極と連結したFETによって測定することができる。電極表面の電位の変化が、FETのゲート電圧変化と同等の作用となり、チャネルの導電率を変化させる。ソースドレイン間を流れるドレイン電

流変化として、ハイブリダイゼーションによる複合体の形成、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。

[0110] さらに、生体分子検出方法の他の態様について説明する。

本発明の生体分子検出方法では、DNAの一塩基伸長反応を利用することにより、特定の遺伝子配列のDNAを、精度良く検出することができる。

図10に、本発明の生体分子検出方法における核酸の一塩基伸長反応の一例を示す反応の概略図を示す。

図10(A)～(E)には、電極基板432と、電極基板432に固定化された一本鎖のDNAプローブであるオリゴヌクレオチドプローブ437と、遺伝子配列を検出したいターゲットとなるターゲットDNA440が示されている。電極基板432に固定化された一本鎖のDNAプローブであるオリゴヌクレオチドプローブ437は、核酸を含有する生体分子水溶液（核酸水溶液）中に浸されており、ターゲットDNA440は、当該核酸水溶液に含まれる核酸である。

電極基板432は、既述の本発明の生体分子検出装置の一部であり、電極基板432の表面には、金属塩ないし金属酸化物で構成される層（無機層）も形成されているが、電極基板432およびオリゴヌクレオチドプローブ437以外の構成は、図10(A)～(E)には、図示していない。

[0111] 図10(A)において、オリゴヌクレオチドプローブ437は、ターゲットDNA440を捕捉し、ターゲットDNA440の一部と、オリゴヌクレオチドプローブ437とが、ハイブリダイゼーションにより複合体を形成している。すなわち、ターゲットDNA440の一部の塩基と、オリゴヌクレオチドプローブ437の塩基とが、相補的に結合している。

ターゲットDNA440が有する塩基配列のうち、オリゴヌクレオチドプローブ437と複合体を形成していない塩基配列（ターゲット塩基配列）440aを、DNAの一塩基伸長反応により把握することができる。

[0112] 核酸が有するアデニン（A）、チミン（T）、グアニン（G）、シトシン（C）等の塩基は、特定の塩基と相補的に反応し、対をなす性質があること

が知られている。かかる性質を利用し、解析すべきターゲット塩基配列 4 4 0 a に含まれる塩基を、端から 1 つずつ検出することで、ターゲット塩基配列 4 4 0 a の詳細を把握することができる。

図 1 0 (A) では、ターゲット DNA 4 4 0 およびオリゴヌクレオチドプローブ 4 3 7 の各塩基は、電極基板 4 3 2 側から順に、下記配列で並んでいる。

[0113] ターゲット DNA 4 4 0 : T C T A T A T G C A C G G T C C A
C C T C

オリゴヌクレオチドプローブ 4 3 7 : A G A T A T A C G T G

[0114] ターゲット DNA 4 4 0 の塩基配列のうち、電極基板 4 3 2 側から、T C T A T A T G C A C までが複合体を形成し、G G T C C A C C T C からなる塩基配列（ターゲット塩基配列 4 4 0 a）の塩基は対をなしていない。

かかる状況下において、DNA ポリメラーゼ及び d C T P（デオキシシチジン三リン酸；deoxycytidine 5'-triphosphate）を核酸水溶液に投入すると、ターゲット塩基配列 4 4 0 a のうち、ハイブリダイゼーションにより複合体を形成している塩基（塩基 C）に隣接する塩基 G と相補的に反応する塩基 C を、オリゴヌクレオチドプローブ 4 3 7 の末端に導入することができる。

[0115] デオキシヌクレオチドとしては、塩基 T と相補的に反応する塩基 A を核酸に導入可能な d A T P（デオキシアデノシン 5'-三リン酸；deoxyadenosine 5'-triphosphate）、塩基 C と相補的に反応する塩基 G を核酸に導入可能な d G T P（デオキシグアノシン 5'-三リン酸；deoxyguanosine 5'-triphosphate）、塩基 A と相補的に反応する塩基 T を核酸に導入可能な d T T P（デオキシチミジン 5'-三リン酸；deoxythymidine 5'-triphosphate）等がある。

[0116] 図 1 0 (A) に示す状況下において、ターゲット DNA 4 4 0 の塩基配列のうち、ハイブリダイゼーションにより複合体を形成している塩基（塩基 C）に近い塩基 G は、2 つある。従って、核酸水溶液に d C T P を投入することにより、図 1 0 (B) に示すように、オリゴヌクレオチドプローブ 4 3 7 の末端に塩基 C が 2 つ導入される。オリゴヌクレオチドプローブ 4 3 7 の末

端に導入された塩基Cは、ターゲット塩基配列440aの末端の塩基Gと相補的に反応し、結合して複合体となる。

[0117] また、既述のように、DNAは負の電荷を有しており、塩基対を1つ形成するごとに、負電荷が検出される。従って、検出される表面電位の変化量の大きさから、相補的反応を起こした数、すなわち、ハイブリダイゼーションにより複合体を形成した塩基の数を把握することができる。

なお、塩基Gは、塩基Cとのみ相補的な反応を示すため、図10(A)に示す状況下において、dCTP以外のデオキシヌクレオチドであるdATP、dGTP、dTTP等を核酸水溶液中に投入しても、一塩基伸長反応は起こらない。

従って、図10(A)に示す状況下においては、dCTPを投入した場合にのみハイブリダイゼーションが生じ、電極の表面電位が変化する。そのため、表面電位の変化量と、表面電位の変化をもたらすデオキシヌクレオチドの種類と、からターゲット塩基配列440aの塩基の数および種類を検出することができる。

[0118] 図10(B)において、ハイブリダイゼーションによる複合体を形成しているターゲット塩基配列における塩基(塩基G)に隣接している塩基は塩基Tである。従って、図10(B)に示す状況下においては、核酸水溶液に、dATPを投入した場合にのみ、電極の表面電位が変化する。その電位変化量から、塩基Tの数を把握することができる。図10(C)に示すように、dATPの投入により生じた塩基対は、1つのみである。

[0119] なお、図10(A)に示す状況下から、各種デオキシヌクレオチドを順次、核酸水溶液に投入すると、複数種のデオキシヌクレオチドが混合され、定量的検出を妨げる恐れがある。従って、電極基板432およびオリゴヌクレオチドプローブ437を備える生体分子検出装置が浸っている核酸水溶液に、DNAポリメラーゼ及びデオキシヌクレオチドを投入することよりも、DNAポリメラーゼ及びデオキシヌクレオチドを含有する水溶液中に、電極基板432およびオリゴヌクレオチドプローブ437を備える生体分子検出装

置を浸すことが好ましい。また、DNAポリメラーゼ及びデオキシヌクレオチド含有水溶液に浸した生体分子検出装置を、種類の異なる他のDNAポリメラーゼ及びデオキシヌクレオチド含有水溶液に浸し直す場合は、当該種類の異なる他のDNAポリメラーゼ及びデオキシヌクレオチド含有水溶液に浸し直す前に、生体分子検出装置の、少なくとも電極を、水、緩衝溶液等で洗浄してから浸すことが好ましい。

[0120] DNAポリメラーゼ及び4種類のデオキシヌクレオチドを金属電極表面に導入して伸長反応を行わせる際、導入するデオキシヌクレオチドがターゲットDNAの塩基と相補的な場合、ターゲットDNA上で塩基が合成され、塩基長が伸長して負電荷が増加すると同時に、ピロリン酸が生成され、水素イオンが放出される。伸長する塩基の数の分だけ水素イオンが放出される。したがって、伸長反応の場となる金属電極表面近傍の水素イオン濃度、すなわちpHが変化する。プローブ固定電極となる金属電極が有する金属電極基板が、金属塩および金属酸化物の少なくとも一方で構成される無機層で被覆されている場合、金属酸化物を表面とする金属電極は、既述の式(2)に示した金属酸化物の解離平衡が水素イオン濃度に応じて移動し、それに依じて電極電位が変化するため良いpHセンサとなる。したがって、伸長反応の結果放出される水素イオンを検出する上で金属酸化物を表面に有する金属電極は効果的な構成である。

[0121] 以上の要領で、図10(D)及び図10(E)に示すように、dGTP及びdTTPを順次反応させることにより、一本鎖の核酸であるオリゴヌクレオチドプローブ437は、一塩基ずつ伸長し、ターゲットの核酸であるターゲットDNA440と、順次複合体を形成する。そして、どのDNAポリメラーゼを投入しても、電極の表面電位が変化しないときは、ターゲットDNAの塩基配列を解析し終わったことを意味し、解析が終了する。

[0122] 以上示したように、本発明の生体分子検出装置を用いれば、生体分子水溶液中の生体分子の挙動を、少なくとも2種の生体分子検出部の観点から測定することができる。さらに、各生体分子検出部が有する電極を、例えば、流

路内に配置することで、生体分子がプローブ固定電極に吸着していく過程をリアルタイムで検出することも可能となる。この場合、生体分子は、流路内に配置された電極によって、生体分子水溶液を流しながら、あるいは生体分子水溶液中の生体分子濃度を徐々に濃くしながら検出される。

また、既述のように、2種以上の生体分子検出部を用いることで、一方の生体分子検出部では生体分子検出に適さない濃度域や分子量域を、他方の生体分子検出部が生体分子の検出を補完することができる。

[0123] 生体分子の1種であるタンパク質は、プローブ固定電極に吸着するとき、濃度や分子量の大きさに応じて、種々の層を形成することが知られている。

図11と図12に、生体分子であるタンパク質の層形成の過程を表した模式図を示す。

図11及び図12には、金属電極基板32上に、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料37を有するプローブ固定電極が示されており、プローブ固定電極上に、図11では、タンパク質72（72a～72c）が吸着し、図12では、タンパク質74（74a～74c）が吸着している。

図11および図12は、共に、（A）、（B）、（C）の順に、生体分子水溶液中のタンパク質の濃度が濃くなることを示す。

[0124] 固体表面に吸着したタンパク質は、水溶液中のタンパク質濃度が高まり、またタンパク質の重量平均分子量（ M_w ；以下、単に分子量ともいう）が大きくなるにつれて、複合体を形成する。分子量と形状はタンパク質ごとに異なり、例えば、分子量が小さいタンパク質であるMyoglobinは、図11（A）～（C）に示されるような球状であるが、分子量が大きいFibrinogenは、図12に示されるような棒状である。

まず、図11（A）は、分子量の小さいタンパク質の単層形成過程を示し、生体分子水溶液中のタンパク質濃度が低いうちは、タンパク質がプローブ固定電極上に単層を形成している。タンパク質の濃度が大きくなるにつれ、球状の集合体が寄り添い、図11（B）に示すような濃縮層を形成する。さ

らに、タンパク質の濃度が大きくなると、図 1 1 (C) に示すように、タンパク質の層が積層化する傾向にある。

[0125] 一方、分子量が大きいタンパク質の場合は、生体分子水溶液中のタンパク質の濃度が低いときは、図 1 2 (A) に示すように、プローブ固定電極上に単層を形成する。分子量の大きなタンパク質の濃度を濃くしていくと、図 1 2 (B) に示されるように、まずタンパク質が積層化し、さらに濃度を濃くすると、図 1 2 (C) に示すような濃縮層を形成する傾向にある。

[0126] 以上の図 1 1 (A) ~ (C) および図 1 2 (A) ~ (C) の 6 つの濃度領域および分子量領域において、FET 生体分子検出部が得意とする領域 (FET-sensitive zone) は、図 1 1 (B)、図 1 2 (A)、及び図 1 2 (C) の各領域であり、QCM 生体分子検出部が得意とする領域 (QCM-sensitive zone) は、図 1 1 (A)、図 1 1 (C)、及び図 1 2 (B) の各領域である。

このように、生体分子検出部の種類によっては、生体分子検出の使用に適している領域と適していない領域があるが、本発明の生体分子検出装置では、2 種以上の生体分子検出部を用いるため、そのような問題も生じにくい。全領域を通じて生体分子の挙動を把握することができる。

[0127] 本発明の生体分子検出装置における生体分子検出部は、いずれも、電極と生体分子水溶液との固液界面における信号の変化を感知し、プローブ固定電極に吸着した生体分子の吸着量等を定量し得るものであるが、生体分子検出部の種類によっては、把握し得る情報の量が異なる。

図 1 3 に、金属電極基板 3 2 上に、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料 3 7 を有するプローブ固定電極が示されており、プローブ固定電極上に、生体分子 7 6 が吸着している模式図を示す。

生体分子検出部が把握し得る「プローブ固定電極の金属電極基板 3 2 表面から、生体分子までの距離 (SD) を、「センシング深さ」と称する。

[0128] プローブ固定電極を備える生体分子検出部が FET 生体分子検出部であるとき、センシング深さは 10 nm 程度であるが、プローブ固定電極を備える

生体分子検出部がＱＣＭ生体分子検出部であるときは、センシング深さは１００ｎｍ～３００ｎｍにまで及ぶ。

なお、各生体分子検出部のセンシング深さは、生体分子水溶液中の緩衝液の濃度によっても異なる。

従って、本発明の生体分子検出装置および生体分子検出方法では、センシング深さの異なる生体分子検出部を組み合わせることで測定することによっても興味深い測定結果を得ることができる。

[0129] 以下、本発明の生体分子検出装置及び生体分子検出方法、並びにこれらの好ましい態様について示す。

[0130] < 1 > 第１の電極を有する第１の生体分子検出部と、第２の電極を有する第２の生体分子検出部と、を有し、前記第１の電極、または、前記第２の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である生体分子検出装置である。

[0131] < 2 > 生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極を有する第１の生体分子検出部と、第２の電極として前記第１の電極を共有する第２の生体分子検出部と、参照電極とを有する生体分子検出装置である。

[0132] < 3 > 前記第１の生体分子検出部および前記第２の生体分子検出部は、各々独立に、電界効果トランジスタ生体分子検出部、水晶振動子マイクロバランス生体分子検出部、及び、表面プラズモン共鳴生体分子検出部から選択されるいずれか１つの生体分子検出部であり、前記第２の生体分子検出部は、前記第１の生体分子検出部とは異なる前記< 1 >または前記< 2 >に記載の生体分子検出装置である。

[0133] < 4 > 前記第１の生体分子検出部が水晶振動子マイクロバランス生体分子検出部であり、前記第１の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である前記< 3 >に記載の生体分子検出装置である。

[0134] < 5 > 前記第１の生体分子検出部が表面プラズモン共鳴生体分子検出部

であり、前記第 1 の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である前記<3>に記載の生体分子検出装置である。

[0135] <6> 前記電極が、金、銀、タンタル、または、カーボン材料を含む前記<1>～前記<5>のいずれか 1 つに記載の生体分子検出装置である。

[0136] <7> 前記生体分子プローブが、核酸、ポリヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、抗体、抗原、アプタマー、糖タンパク質、または、糖鎖である前記<1>～前記<6>のいずれか 1 つに記載の生体分子検出装置である。

[0137] <8> 第 1 の電極を有する第 1 の生体分子検出部と、第 2 の電極を有する第 2 の生体分子検出部と、を有し、前記第 1 の電極、または、前記第 2 の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である生体分子検出装置を用い、前記生体分子検出装置が有する第 1 の電極および第 2 の電極を、同時に、少なくとも 1 種の生体分子を含有する溶液に接触する溶液接触工程と、前記第 1 の電極と前記溶液との固液界面における信号および前記第 2 の電極と前記溶液との固液界面における信号をそれぞれ検出する検出工程とを有する生体分子検出方法である。

[0138] <9> 生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極を有する第 1 の生体分子検出部と、第 2 の電極として前記第 1 の電極を共有する第 2 の生体分子検出部と、参照電極とを有する生体分子検出装置を用い、前記生体分子検出装置が有する第 1 の電極および第 2 の電極を、同時に、少なくとも 1 種の生体分子を含有する溶液に接触する溶液接触工程と、前記第 1 の電極（第 2 の電極）と前記溶液との固液界面における信号を検出する検出工程とを有する生体分子検出方法である。

[0139] <10> 前記第 1 の生体分子検出部および前記第 2 の生体分子検出部は、各々独立に、電界効果トランジスタ生体分子検出部、水晶振動子マイクロバランス生体分子検出部、及び、表面プラズモン共鳴生体分子検出部から選択されるいずれか 1 つの生体分子検出部であり、前記第 2 の生体分子検出部

は、前記第 1 の生体分子検出部とは異なる前記< 8 >または前記< 9 >に記載の生体分子検出方法である。

[0140] < 1 1 > 前記第 1 の生体分子検出部が水晶振動子マイクロバランス生体分子検出部であり、前記第 1 の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である前記< 1 0 >に記載の生体分子検出方法である

[0141] < 1 2 > 前記電極が、金、銀、タンタル、カーボン材料、または、導電性物質を含む前記< 8 >～前記< 1 1 >のいずれか 1 つに記載の生体分子検出方法である。

[0142] < 1 3 > 前記生体分子プローブが、核酸、ポリヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、抗原、抗体、アプタマー、糖タンパク質、または、糖鎖である前記< 8 >～前記< 1 2 >のいずれか 1 つに記載の生体分子検出方法である。

[0143] < 1 4 > 前記水溶液接触工程は、1 本鎖である核酸を前記生体分子プローブとして用い、前記生体分子プローブと前記水溶液中の前記生体分子である核酸との相補的な複合体を形成する工程、または、抗原－抗体反応を形成する工程である前記< 8 >～前記< 1 3 >のいずれか 1 つに記載の生体分子検出方法である。

実施例

[0144] 以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はその主旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない限り、「%」及び「部」は質量基準である。

[0145] <各生体分子検出部の用意>

F E T 生体分子検出部、Q C M 生体分子検出部、及び S P R 生体分子検出部の各生体分子検出部（生体分子検出機器）は、次のものを用いた。

[0146] [F E T 生体分子検出部]

電極基板として、厚さ 9 0 n m、表面寸法 5 m m × 5 m m の銀（A g）板を用意した。電極基板を支える基板として、厚さ 1 m m であり、電極基板と

同じ表面寸法の石英あるいはガラス基板を用意した。電極基板とガラス基板との接着性を高めるため、厚さ10nmであり、電極基板と同じ表面寸法のチタン(Ti)板を用意した。

用意した銀板とチタン板とガラス基板とを、この順に積層し、接着して、FET用電極基板積層体Aを作製した。

[0147] 次に、1, 3-ジアミノプロパン四酢酸・鉄・アンモニウム・一水塩〔PDTA・Fe(III)〕と、塩化ナトリウム(NaCl)とを、それぞれ100mmol/Lずつ用いて、混合し、キレート溶液を調製した。

FET用電極基板積層体Aを、キレート溶液に180~300秒間浸漬して、銀板表面が塩化銀で被覆されたFET用金属電極基板を得た。

[0148] 得られたFET用金属電極基板をリード線で市販のFETのゲート電極とつなぎ、参照電極として用いるFET生体分子検出部を製造した。

FET用金属電極基板に生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料の層を設ける処方については後述する。

[0149] [QCM生体分子検出部]

QCM生体分子検出部としては、金属電極基板が金(Au)である株式会社日本電波工業社製の「NaPiCOS」を用いた。

金属電極基板に生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料の層を設ける処方については後述する。

[0150] [SPR生体分子検出部]

SPR生体分子検出部としては、金属電極基板が金(Au)である株式会社モリテックス・プレシジョン社製の「SPR-670M」を用いた。

金属電極基板に生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料の層を設ける処方については後述する。

[0151] [プローブ固定電極の作製]

—自己組織化膜SAMの形成と生体分子プローブの固定化—

まず、生体分子プローブ固定化材料として、10-Carboxy-1-decanthiol(10μmol/L)を、溶媒としてエタノールを用

い、これらを混合して、SAM形成用溶液を調製した。得られたSAM形成用溶液を、各生体分子検出部の金属電極基板に塗布して、各金属電極基板にSAMを形成した。上記のようにして作製した自己組織化膜SAMのカルボキシル基に、生体分子プローブである5' 端にアミノ基を有するオリゴヌクレオチド作用させ、アミド結合形成することにより、生体分子プローブを固定化した。

[0152] あるいは、5' 端にチオール基を有するオリゴヌクレオチド ($10 \mu\text{mol/L}$) と任意のアルカンチオール ($10 \sim 100 \mu\text{mol/L}$) を所定の割合 ($1:1 \sim 1:10$) で含む溶液を、金属電極基板に直接作用させることにより、生体分子プローブの固定化とSAM形成を同時におこなった。

[0153] <生体分子>

実験に用いた生体分子は、下記表1に示すタンパク質である。

また、表1には、各タンパク質の重量平均分子量 (Mw)、寸法 (Size)、等電点 (pI)、生体分子水溶液中の液性 (pH 7.4) における電荷量 (Q0) を示す。また、「Monolayer」欄には、棒状のタンパク質が、図12 (A) に示すような単層をプローブ固定電極上に形成したときに、棒状タンパク質が、面積の大きい面で電極に吸着した場合にQCM生体分子検出部で測定される単位面積当たりの質量 (side-on) および、棒状タンパク質が、面積の小さい面で電極に吸着した場合にQCM生体分子検出部で測定される単位面積当たりの質量 (end-on) を参考までに示した。

[0154]

[表1]

タンパク質 種	Mw [kD]	Size [nm ³]	pI	Q0 [pH 7.4]	Monolayer [ng/cm ²]	
					side-on	end-on
BSA	67.4	6.0×9.7×6.0	4.8	-23	192	311
Fibrinogen	337	13×9.5×30	7.0	-420	144	453
IgG (human)	148	6.6×7.7×10	7.1	-29	319	484
Myoglobin	17.0	6.4×2.9×3.6	7.8	-6.0	123	270
β-casein	23.6	4.0×4.0×6.6	5.6	-9.8	148	245
Lysozyme	14.0	4.5×4.5×3.0	11.1	+7.3	115	172

[0155] ついで、表1に示す各タンパク質と、DPBS希釈緩衝液（pH 7.4、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水）とを混合してpH 7.4の生体分子水

溶液をそれぞれ調製した。

なお、測定に当たっては、リン酸緩衝生理食塩水のリン酸濃度を 1.5 mmol/L 、 15 mmol/L 、及び 150 mmol/L に変えたものを用いて測定したものもある。行った測定によって用いた緩衝液の濃度が異なるため、緩衝液の濃度は測定ごとに示す。

[0156] <比較例>

まず、FET生体分子検出部、QCM生体分子検出部、及びSPR生体分子検出部をそれぞれ、単独で用いた場合のタンパク質の吸着量を示す。

[0157] [FET生体分子検出部によるタンパク質吸着の定量； ΔV_{out}]

図14に、既述の方法で作製したFET生体分子検出部のプローブ固定電極530と、参照電極560を、表1に示す各タンパク質を含有する生体分子水溶液570に接触するように配置したFET生体分子検出装置500Fを示す。

定量にあたっては、図15のグラフに示すように、タンパク質を含まない緩衝液のみの段階から、徐々に、タンパク質（図15ではBSA）の濃度を高めることにより生体分子の表面電位（ V_{out} ）を測定した。このように測定されたプローブ固定電極から得られる表面電位（ V_{out} ）と、タンパク質を含まない緩衝液中での表面電位と、の差をタンパク質吸着に由来する表面電位差（ ΔV_{out} ）とした。

[0158] タンパク質の濃度（横軸）に対する各表面電位差（縦軸）の変化を表すグラフを、図16～図21に示す。図16～図21は、それぞれ、BSA、Fibrinogen、IgG、Myoglobin、 β -casein、及びLysozymeに関するグラフである。

なお、各図に示す 1.5 mM 、 15 mM 、および 150 mM のプロットは、リン酸緩衝生理食塩水のリン酸濃度を示す。なお、各図において「mM」は「 mMmmol/L 」を意味する。

[0159] FET生体分子検出装置により測定される表面電位差（ ΔV_{out} ）は、FET生体分子検出部のプローブ固定電極に吸着したタンパク質の吸着量（ Γ_{FET}

）に、ほぼ比例しており（ $\Gamma_{\text{FET}} \propto \Delta V_{\text{out}}$ ）、タンパク質の *dry mass*（非含水重量）に対応している。

[0160]〔QCM生体分子検出部によるタンパク質吸着の定量； $-\Delta f$ 〕

図22に、水晶振動子920を、既述の方法で作製したQCM生体分子検出部のプローブ固定電極930と、金属電極（金薄膜）910とで挟み、プローブ固定電極930および金属電極（金薄膜）910を発振回路960につなげることにより、QCMの共鳴振動に由来して水溶液中に伝達する振動波950によって吸着分子の重量を測定するQCM生体分子検出装置を示す。QCM生体分子検出装置のプローブ固定電極にタンパク質940が吸着している様子を模式的に示している。

QCM生体分子検出装置を用いて、表1に示す各タンパク質を含む生体分子水溶液について、タンパク質の吸着を測定し、図23～図28に示されるグラフを得た。図23～図28は、いずれも、タンパク質の濃度（横軸）に対する共振周波数差（ Δf ）の変化を表す。

なお、共振周波数差（ Δf ）は、タンパク質を含まない緩衝液中でのプローブ固定電極が検出する共振周波数と、タンパク質を含む緩衝液中でのプローブ固定電極が検出する共振周波数との差を表す。

図23～図28は、それぞれ、BSA、Fibrinogen、IgG、Myoglobin、 β -casein、及びLysozymeに関するグラフである。

[0161] なお、図23～図28に示される斜線部の領域は、表1で示される各種タンパク質のサイズから見積もられる単層吸着量領域を表す。

[0162] QCM生体分子検出装置により測定される共振周波数差（ Δf ）のマイナス値は、QCM生体分子検出部のプローブ固定電極に吸着したタンパク質の吸着量（ Γ_{QCM} ）に、ほぼ比例しており（ $\Gamma_{\text{QCM}} \propto -\Delta f$ ）、タンパク質の *wet mass* に対応している。

[0163]〔SPR生体分子検出部によるタンパク質吸着の定量〕

既述の方法で作製したSPR生体分子検出部のプローブ固定電極を用いた

S P R 生体分子検出装置により、タンパク質を含む緩衝液中でのタンパク質の吸着量 (Γ_{SPR}) を測定した。タンパク質の吸着量 (Γ_{SPR}) は $dry\ mass$ (非含水重量) に対応している。得られた吸着量 (Γ_{SPR}) と、同じタンパク質についての F E T 生体分子検出装置による吸着量 (Γ_{FET}) とを比較したところ、図 29 に示される直線が得られた。なお、図 29 に示す 1.5 mM (mmol/L) と、150 mM (mmol/L) は、リン酸緩衝生理食塩水のリン酸濃度である。

150 mmol/L のプロットから得られた回帰直線は、縦軸を y 、横軸を x とした場合、 $y = 0.97x - 18.52$ (決定定数 $R^2 = 0.97$) と表すことができ、1.5 mmol/L のプロットから得られた回帰直線は、縦軸を y 、横軸を x とした場合、 $y = 0.62x - 19.28$ (決定係数 $R^2 = 0.99$) と表すことができる。

[0164] [F E T 生体分子検出装置のデータと、Q C M 生体分子検出装置のデータとの組み合わせ]

既述の F E T 生体分子検出装置を用いて得られたデータと、Q C M 生体分子検出装置を用いて得られたデータとを用い、横軸に F E T 生体分子検出装置による測定で得られた電位差 (ΔV_{out})、縦軸に Q C M 生体分子検出装置による測定で得られた共振周波数差 (Δf) のマイナス値 ($-\Delta f$) をとり、重ねて、1つのグラフで示した。

図 30～図 35 に、それぞれ、B S A、F i b r i n o g e n、I g G、M y o g l o b i n、 β -c a s e i n、及び L y s o z y m e に関するグラフを示した。

なお、図中に示す 1.5 mM (mmol/L) と、150 mM (mmol/L) は、リン酸緩衝生理食塩水のリン酸濃度である。

また、図 31～図 34 に示す F で示される四角枠、及び、Q で示される四角枠の各領域は、それぞれ、既述の「F E T - s e n s i t i v e z o n e」および「Q C M - s e n s i t i v e z o n e」である。

さらに、図中には、各プロットから得られた回帰直線の傾き ($K_1 \sim K_3$

）および、決定係数（ R^2 ）を示した。

[0165] <実施例>

次に、参考例で用いたFET生体分子検出装置を、FET生体分子検出部として用い、QCM生体分子検出装置をQCM生体分子検出として用いた生体分子検出装置を組み立て、2種のタンパク質（BSAおよびフィブリノゲン）について、測定した。なお、FET生体分子検出部は、参照電極として用いている。実施例で用いた生体分子検出装置は、図6を用いて説明した本発明の第1の発明に係る生体分子検出装置の構成をとっており、具体的には、図36に示す構成を成している。

[0166] 図36に、FET生体分子検出部とQCM生体分子検出部とを有する実施例における生体分子検出装置の模式図を示す。

FET生体分子検出部の金属電極は、参照電極760として、生体分子水溶液770と接触している。QCM生体分子検出部は、電極（金薄膜）710と、水晶振動子720と、プローブ固定電極730とを有し、電極（金薄膜）710及びプローブ固定電極730は発振回路と繋がっている。また、プローブ固定電極730は、生体分子水溶液770に接触し、また、アースにつながられている。

[0167] 参照電極760と、プローブ固定電極730は、流路内に配置されており、流路に流される生体分子水溶液770中のタンパク質を測定した。

測定条件は次の通りである。

[0168] ・緩衝液・・・・・・・・・・DPBS希釈緩衝液（150mmol/L、pH7.4）
・温度・・・・・・・・・・25℃
・生体分子水溶液の流速・・3mL/h
・タンパク質濃度・・・・・・・・1mg/mL
・参照電極（FET）・・・・Ag/AgCl

[0169] BSAの測定結果については図37に、フィブリノゲンの測定結果については図38に、それぞれ示した。

実線（—）で示す曲線は、FET生体分子検出部が検出した表面電位差（ ΔV ）の変化を示し、図の右側の縦軸を参照する。破線（---）および一点鎖線（- · - · -）で示す曲線は、QCM生体分子検出部が検出した共振周波数差（ Δf ）の変化を示し、図の左側の縦軸を参照する。

[0170] 測定は、流路に、予め緩衝液のみを流しておいてから、生体分子水溶液に切り替えている。図37および図38では、予め緩衝液のみを流し、生体分子水溶液に切り替える前の100秒間と、当該切り替えから600秒後までの測定結果を示している。すなわち、図37および図38における0秒が、緩衝液から生体分子水溶液への切り替え時点であり、いずれの曲線も、0秒を境に屈曲している。なお、生体分子水溶液が電極に接触する時間は0秒から240秒の間のみであり、240秒以降は緩衝液が流れる仕組みとなっている。

[0171] 図37および図38に示す通り、タンパク質の非特異吸着現象において吸着質量（QCM）および電気化学特性（FET）は異なる経時変化を示す。吸着質量は迅速に安定化している一方、電気化学特性はゆっくりと変化している。

[0172] 図38において、FET生体分子検出部が測定した表面電位差（ ΔV ）曲線が、300秒付近を境に減少から増大に変化している。また、図37及び図38に示すQCM生体分子検出部が測定した共振周波数差（ Δf ）曲線も、わずかではあるが、ある時点を境に減少から増大に転じている。

これは、流路内に送液される液体が生体分子水溶液から緩衝液に変わるリンス過程によるものであり、弱く結合した生体分子が、プローブ固定電極から脱離し流されたために、電位差や共振周波数差が変化したものと考えられる。

[0173] また、図37および図38に示される曲線は生体分子の経時的な変化を測定するリアルタイム測定である。この結果を基にして、生体分子の吸着速度論的解析を行うことができる。

さらに、図30および図31は、それぞれの生体分子水溶液の濃度変化に

伴う信号強度の測定結果を組み合わせた図である。生体分子の物性を多面的に検出することにより、生体分子の吸着現象のメカニズムについての詳細な検討が行える。

[0174] 図37および図38からわかるように、BSAとfibrinogenは同様の吸着質量変化パターンを示したが、電気化学特性は異なる経時パターンを示した。

以上の結果は、迅速な非特異吸着過程の後に、タンパク質の構造変性およびタンパク質膜の層状化などのタンパク質内およびタンパク質間での物理化学変化が誘起していることを示唆している。

このような考察は、同一電極で発生した同一現象を同時にモニタリングすることにより初めて可能となった。

[0175] 以上からわかるように、本発明の生体分子検出装置を用い、タンパク質について測定すると、1つの生体分子水溶液の系を、複数の生体分子検出部の観点から、同時に測定することができ、タンパク質の挙動をより詳細に調べることができる。

[0176] 日本出願2012-120286の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

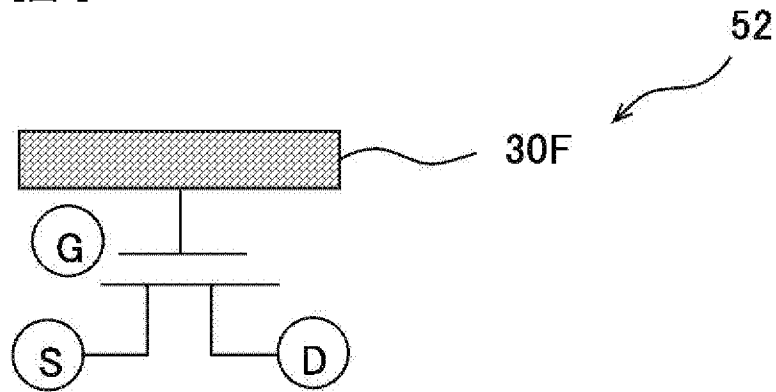
本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

請求の範囲

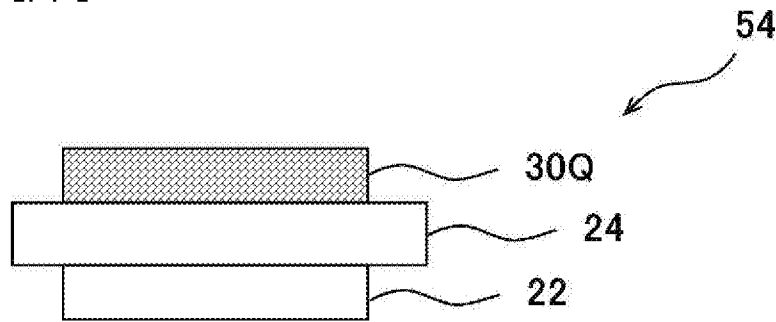
- [請求項1] 第1の電極を有する第1の生体分子検出部と、第2の電極を有する第2の生体分子検出部と、を有し、
前記第1の電極、または、前記第2の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である生体分子検出装置。
- [請求項2] 生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する第1の電極を有する第1の生体分子検出部と、
第2の電極として前記第1の電極を共有する第2の生体分子検出部と、
参照電極と、
を有する生体分子検出装置。
- [請求項3] 前記第1の生体分子検出部および前記第2の生体分子検出部は、各々独立に、電界効果トランジスタ生体分子検出部、水晶振動子マイクロバランス生体分子検出部、及び、表面プラズモン共鳴生体分子検出部から選択されるいずれか1つの生体分子検出部であり、前記第2の生体分子検出部は、前記第1の生体分子検出部とは異なる請求項1または請求項2に記載の生体分子検出装置。
- [請求項4] 前記第1の生体分子検出部が水晶振動子マイクロバランス生体分子検出部であり、前記第1の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である請求項3に記載の生体分子検出装置。
- [請求項5] 前記第1の生体分子検出部が表面プラズモン共鳴生体分子検出部であり、前記第1の電極が、生体分子プローブが固定化された生体分子プローブ固定化材料を有する電極である請求項3に記載の生体分子検出装置。
- [請求項6] 前記電極が、金、銀、タンタル、または、カーボン材料を含む請求項1～請求項5のいずれか1項に記載の生体分子検出装置。

- [請求項7] 前記生体分子プローブが、核酸、ポリヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、抗体、抗原、アプタマー、糖タンパク質、または、糖鎖である請求項1～請求項6のいずれか1項に記載の生体分子検出装置。
- [請求項8] 請求項1～請求項7のいずれか1項に記載の生体分子検出装置を用い、前記生体分子検出装置が有する第1の電極および第2の電極を、同時に、少なくとも1種の生体分子を含有する水溶液に接触する水溶液接触工程と、
- 前記第1の電極と前記水溶液との固液界面における信号および前記第2の電極と前記水溶液との固液界面における信号をそれぞれ検出する検出工程と、
- を有する生体分子検出方法。
- [請求項9] 前記水溶液接触工程は、1本鎖である核酸を前記生体分子プローブとして用い、前記生体分子プローブと前記水溶液中の前記生体分子である核酸との相補的な複合体を形成する工程、抗原－抗体反応、アプタマー分子認識反応、リガンド－レセプター反応、または、糖鎖認識反応を形成する工程である請求項8に記載の生体分子検出方法。

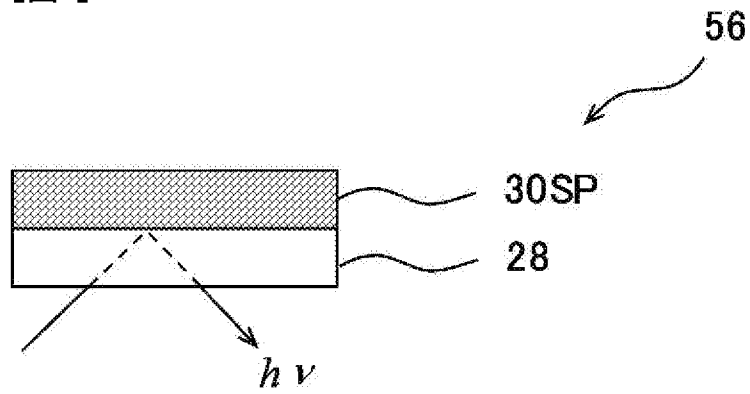
[図1]



[図2]



[図3]



[図4]

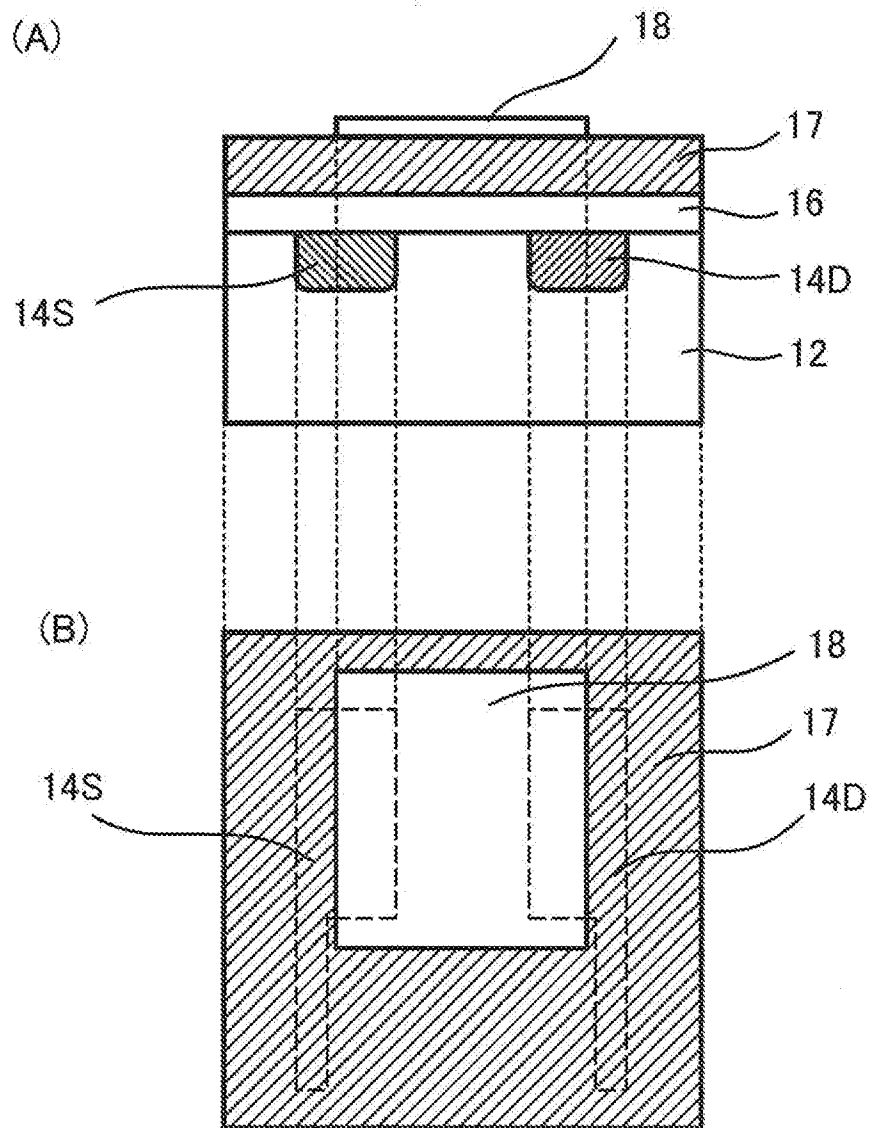
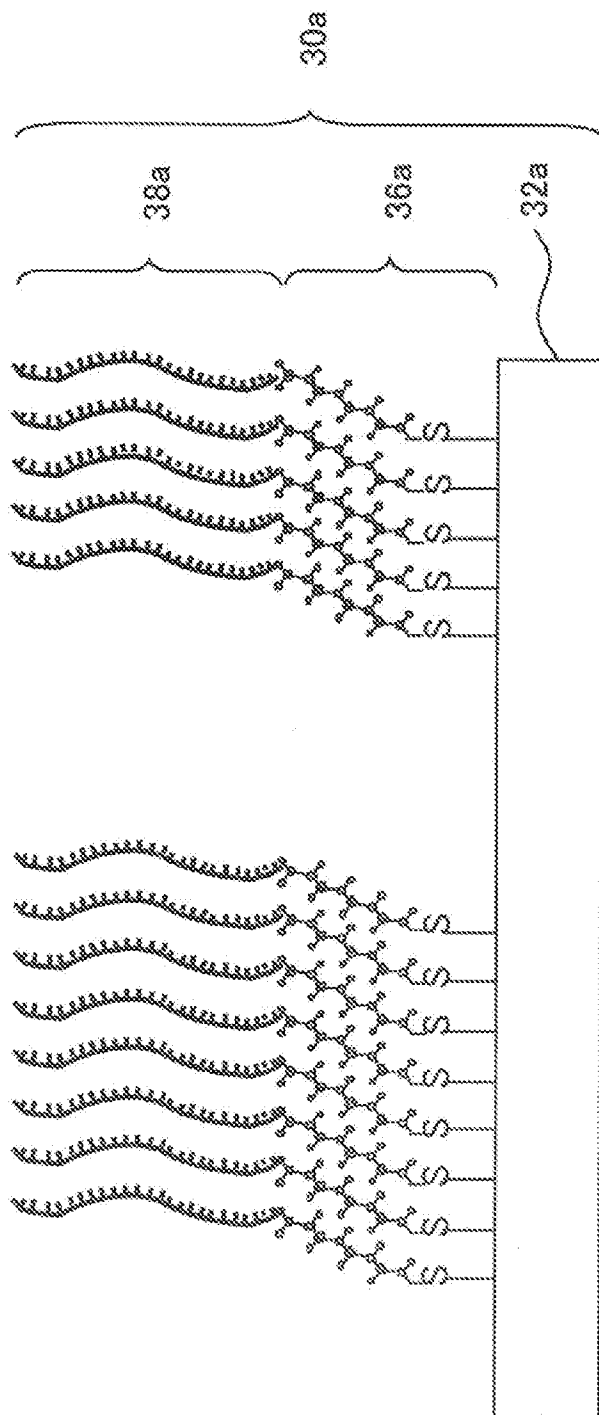
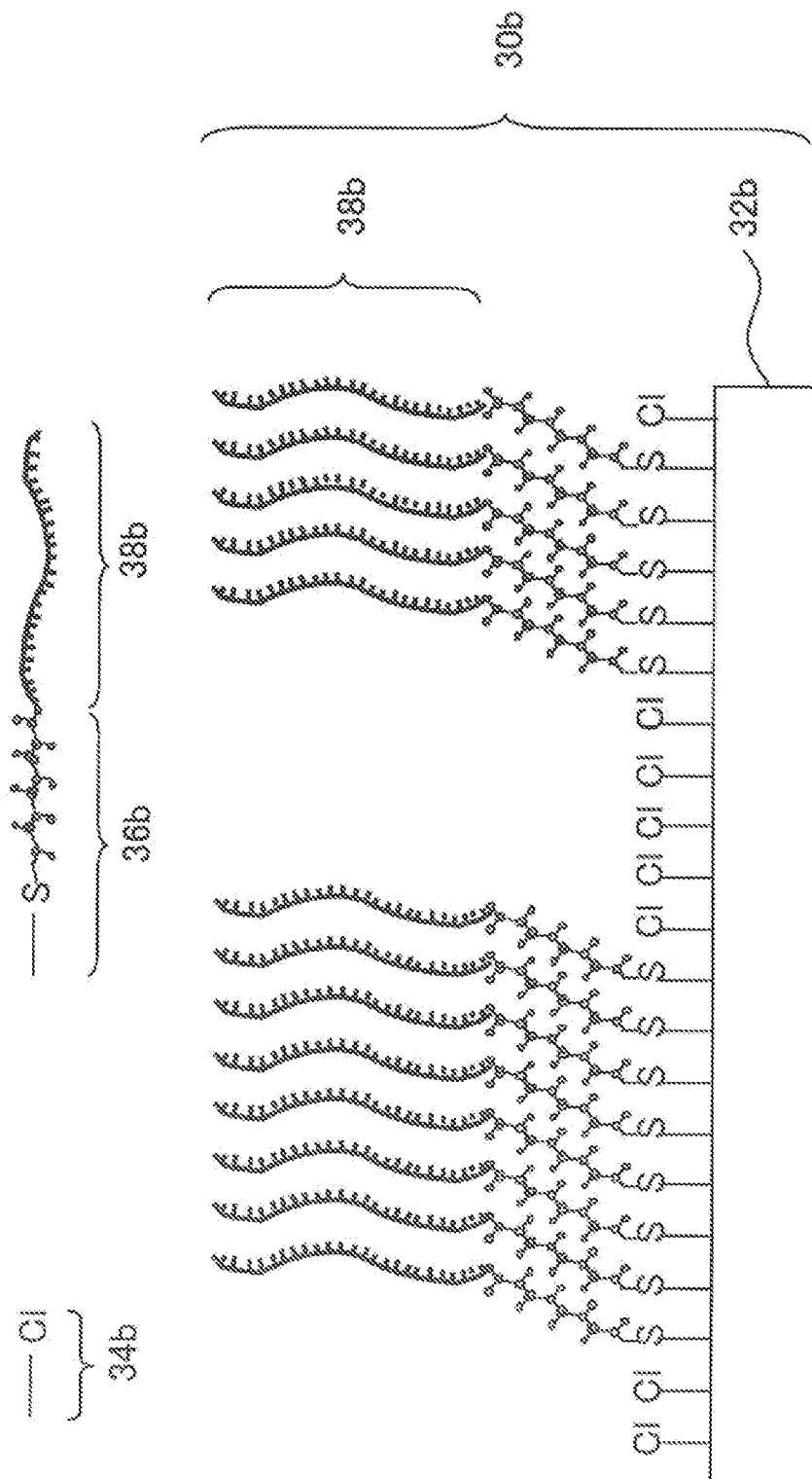


Figure 1 consists of two cross-sectional views, (A) and (B), of a semiconductor device. View (A) is a top view showing a central opening 12. A central protrusion 18 is located on the top surface. The device is composed of several layers: a top layer 15, a middle layer 16, and a bottom layer 17. The central protrusion 18 is formed by a series of steps. The bottom layer 17 is a thin layer. The middle layer 16 is a thicker layer. The top layer 15 is the thickest layer. The central opening 12 is a rectangular opening. The central protrusion 18 is a rectangular protrusion. The device is shown in a cross-sectional view, with the central opening 12 and the central protrusion 18 being the main features. View (B) is a bottom view showing a central opening 12. A central protrusion 18 is located on the bottom surface. The device is composed of several layers: a top layer 15, a middle layer 16, and a bottom layer 17. The central protrusion 18 is formed by a series of steps. The bottom layer 17 is a thin layer. The middle layer 16 is a thicker layer. The top layer 15 is the thickest layer. The central opening 12 is a rectangular opening. The central protrusion 18 is a rectangular protrusion. The device is shown in a cross-sectional view, with the central opening 12 and the central protrusion 18 being the main features.

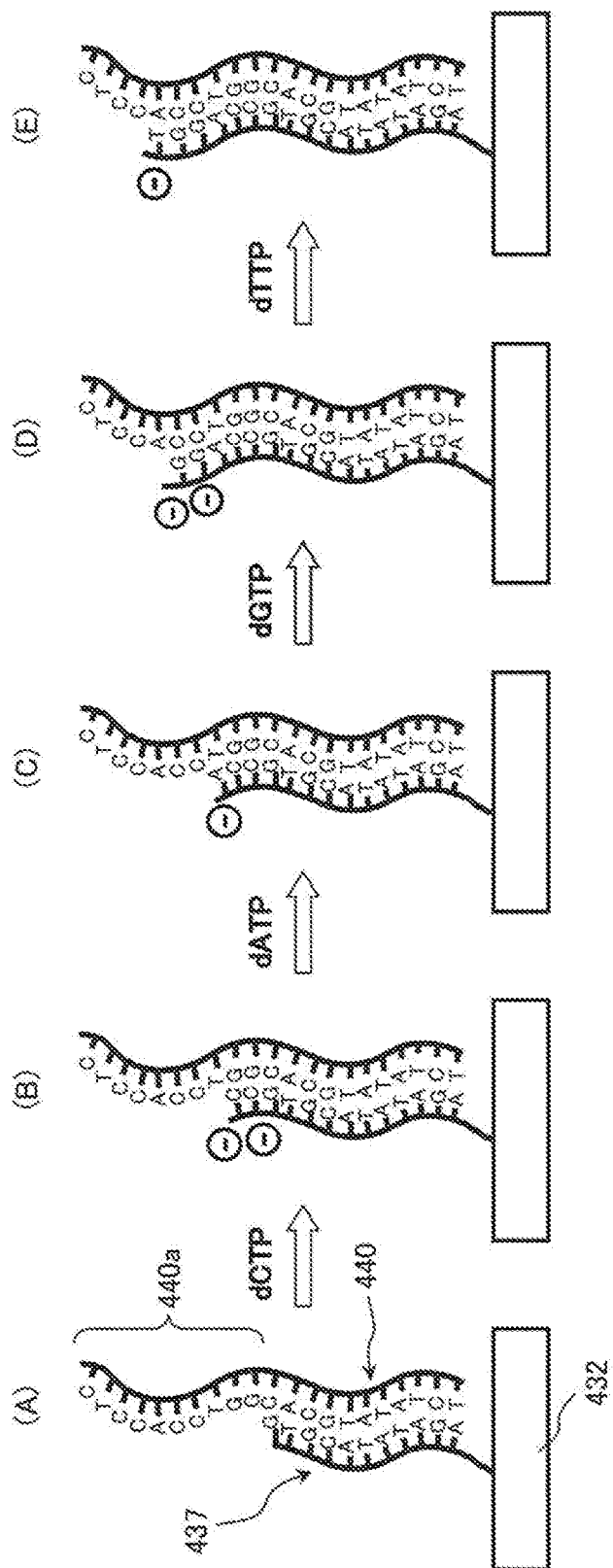
[図6]



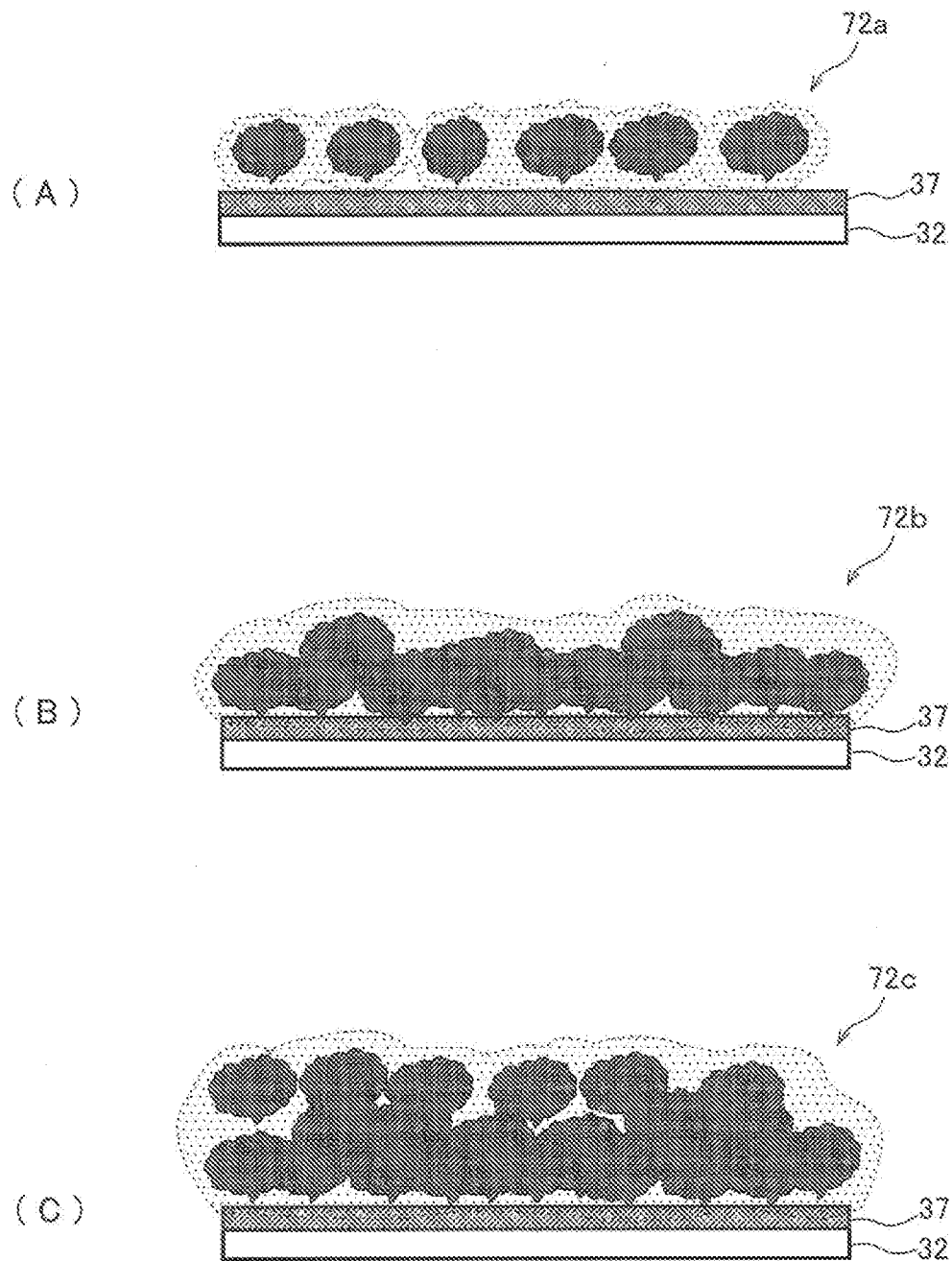
[図7]



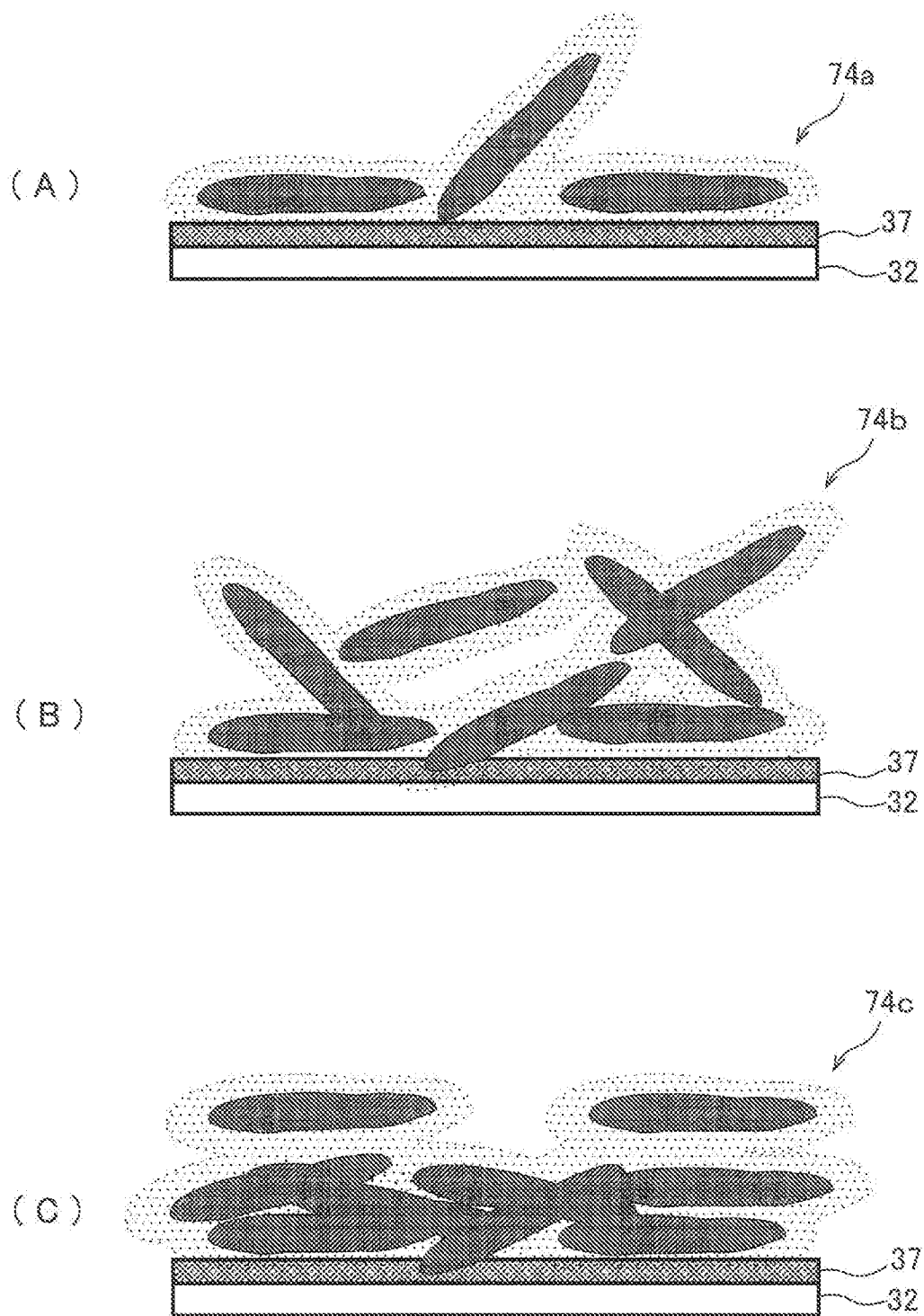
[図10]



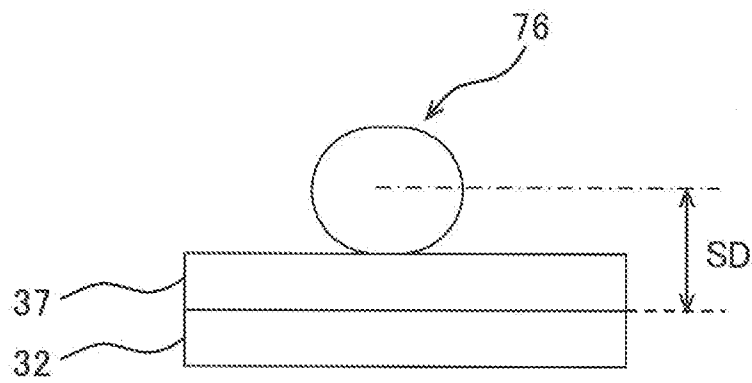
[図11]



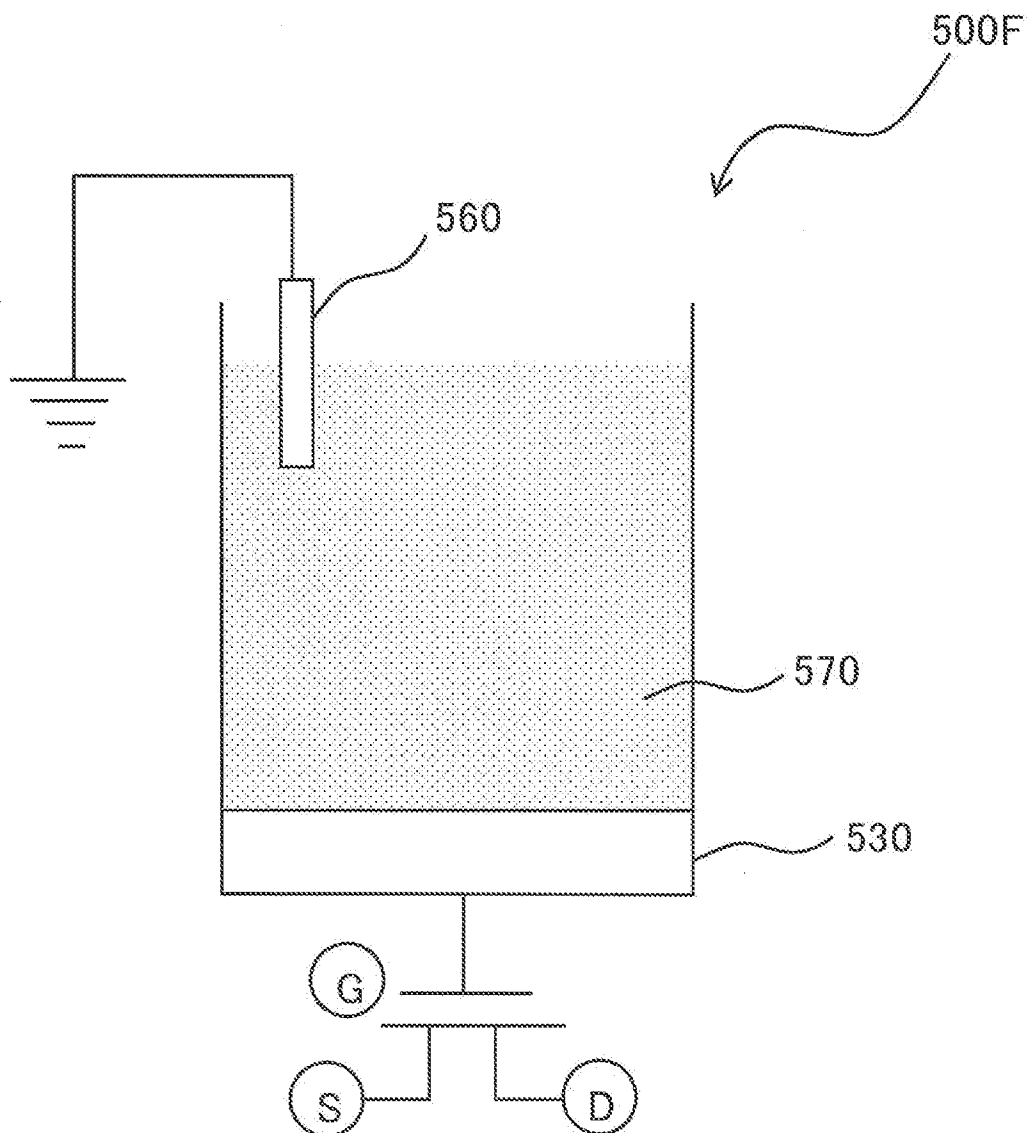
[図12]



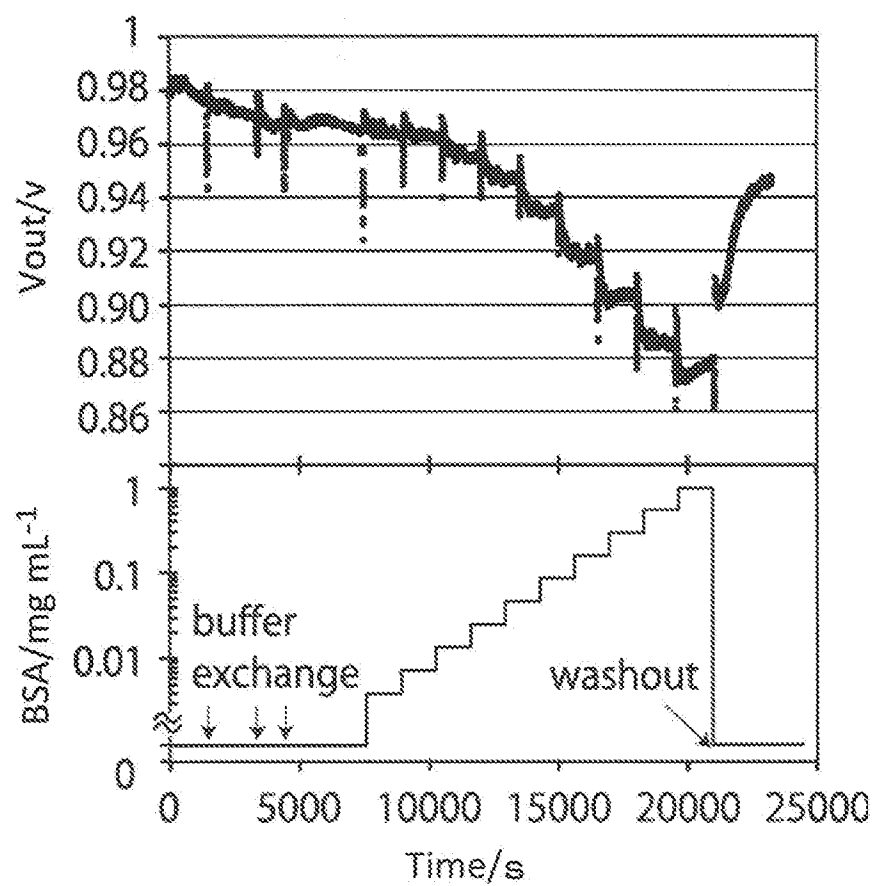
[図13]



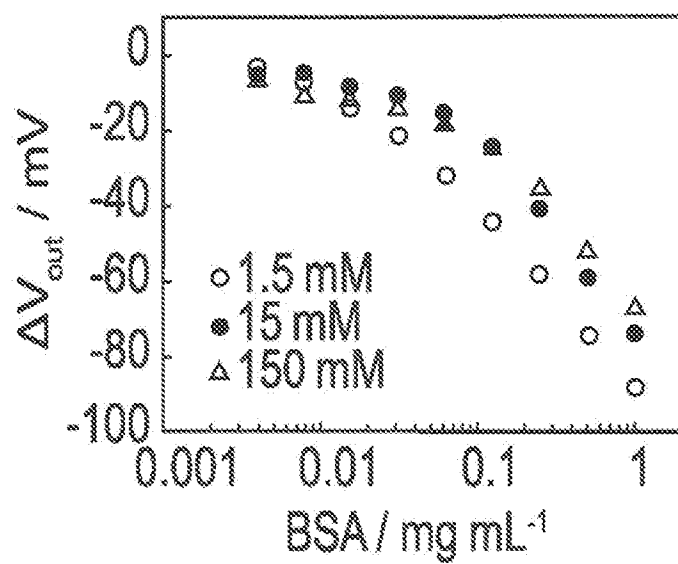
[図14]



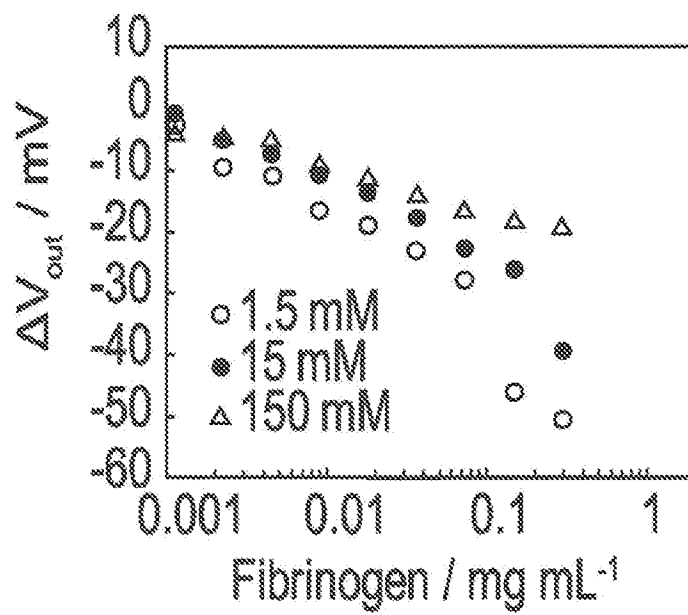
[図15]



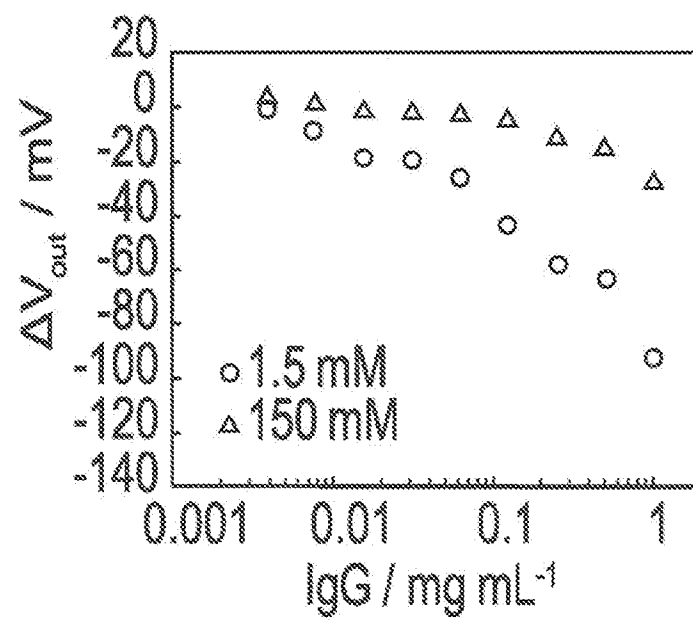
[図16]



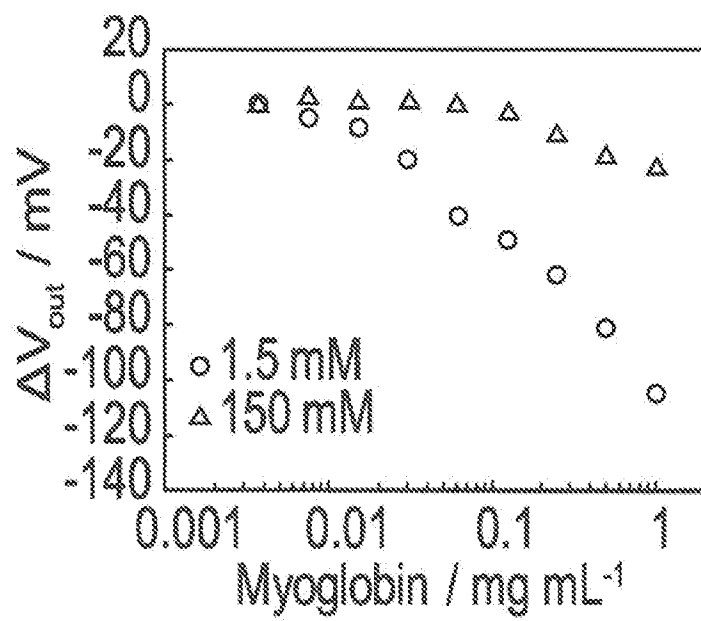
[図17]



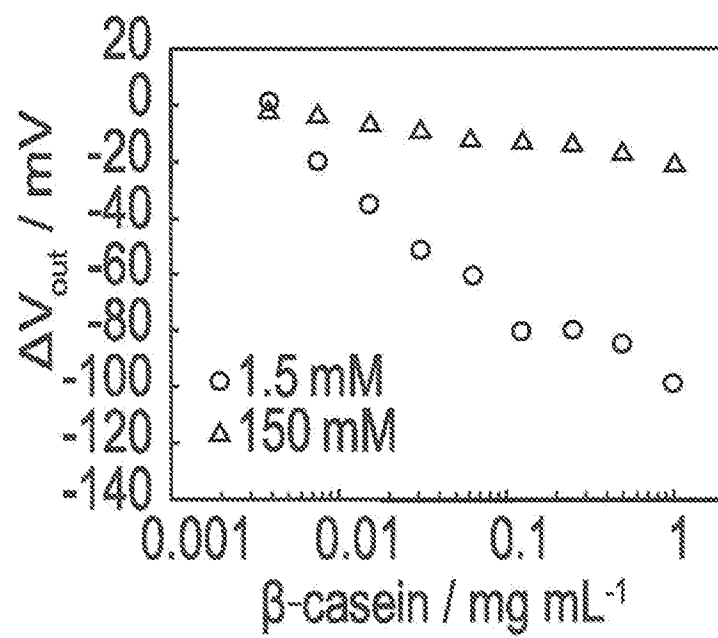
[図18]



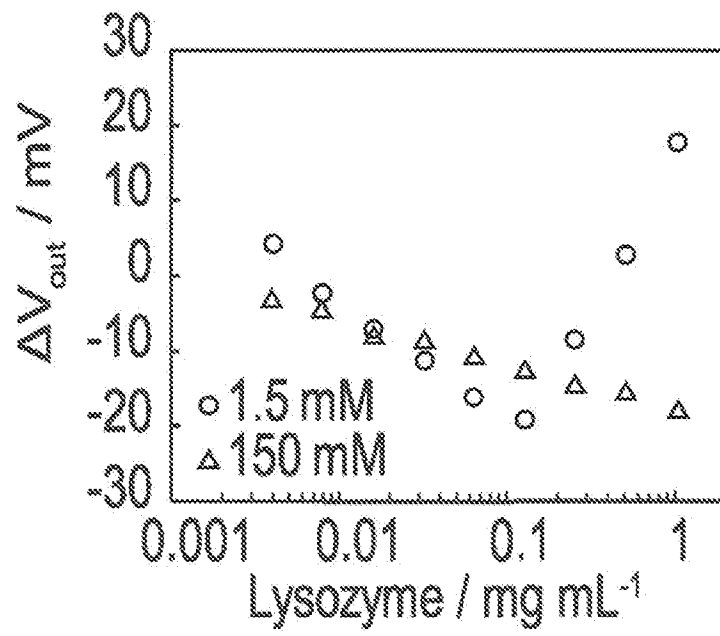
[図19]



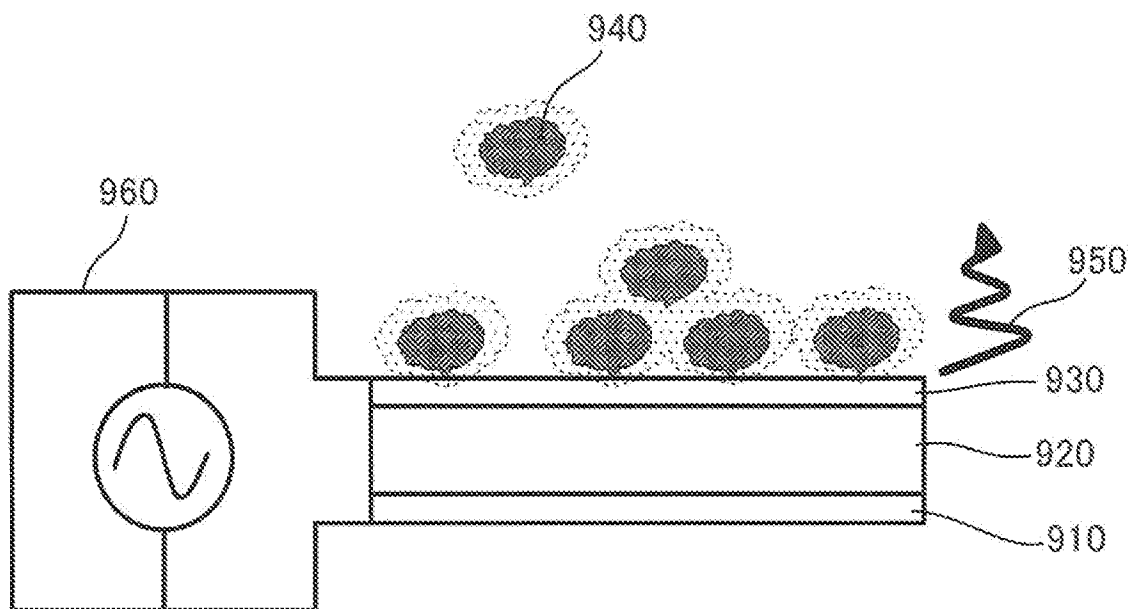
[図20]



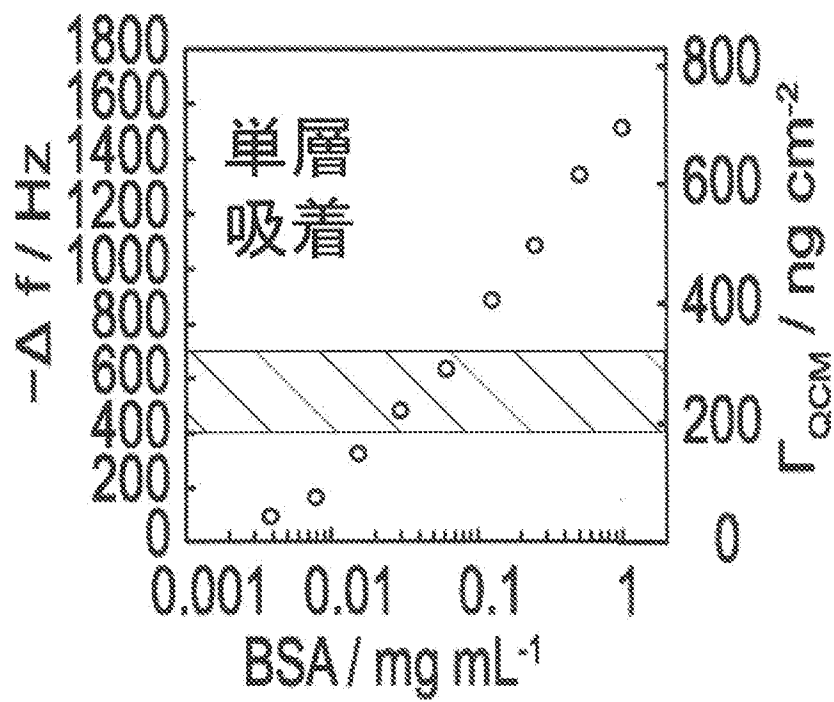
[図21]



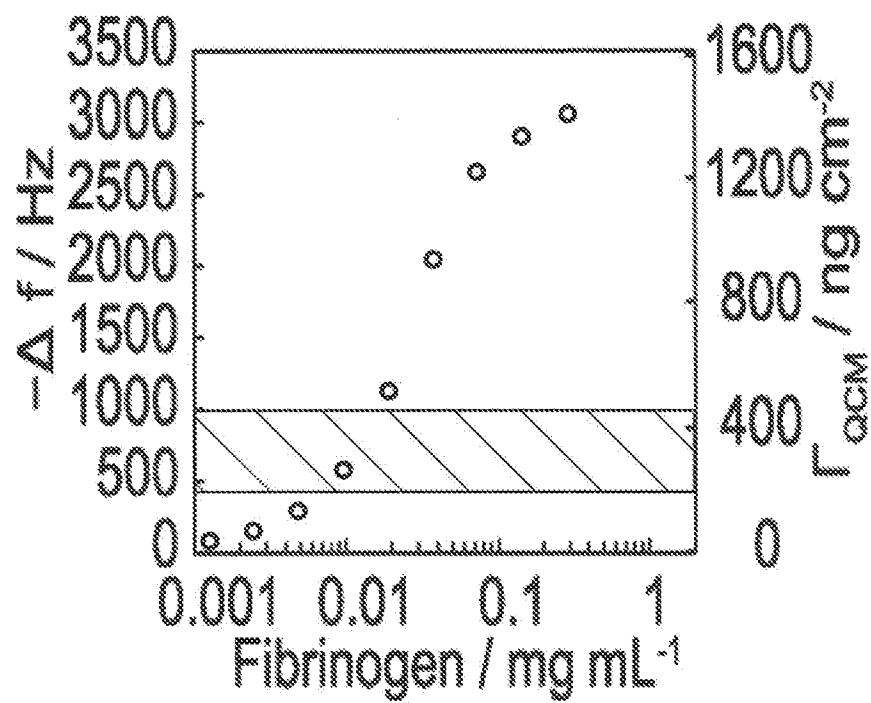
[図22]



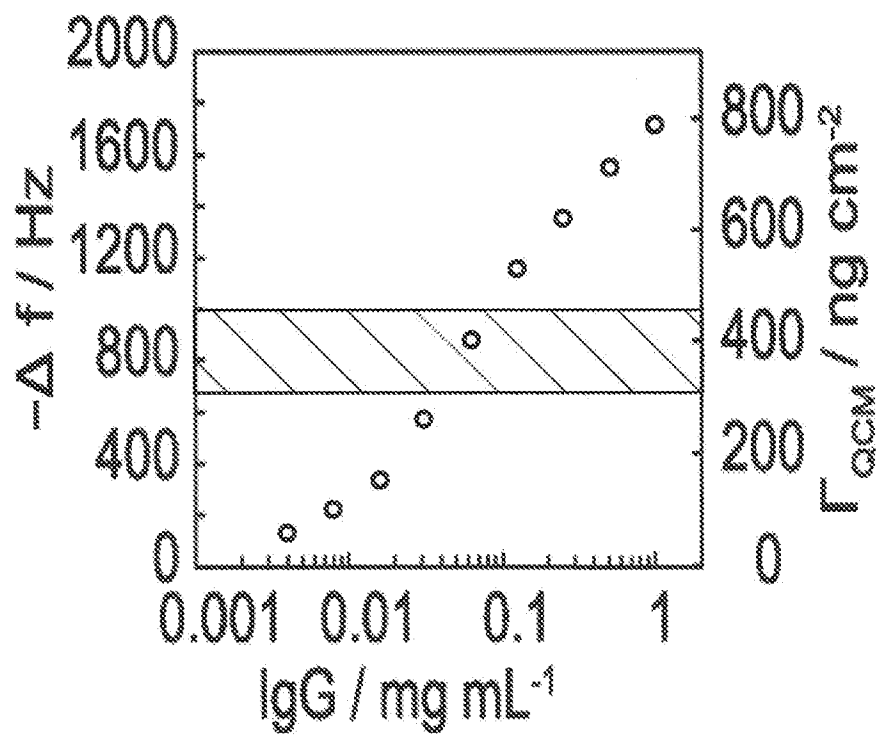
[図23]



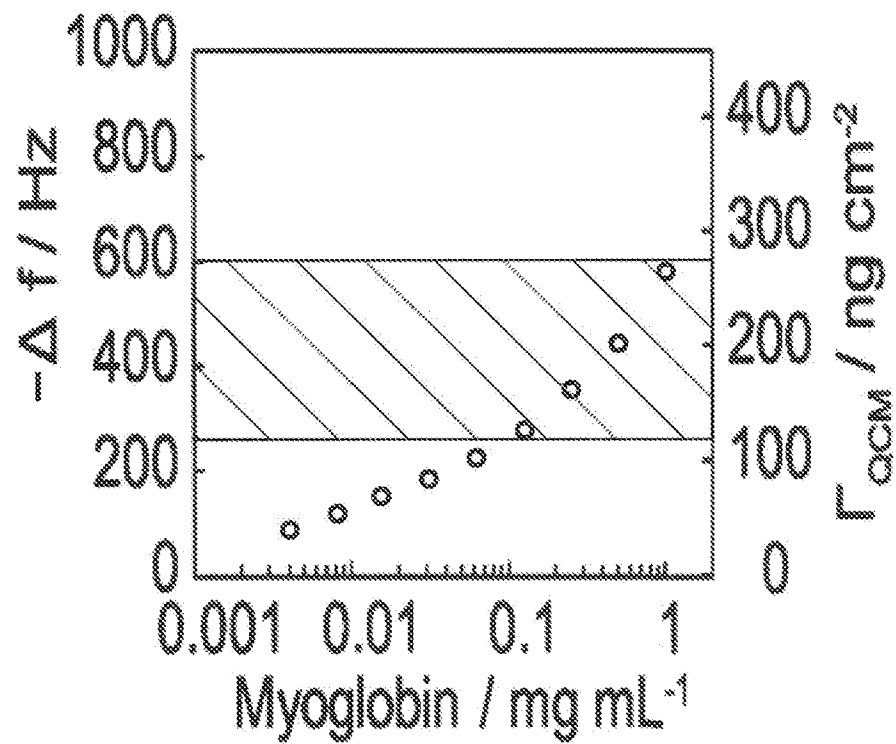
[図24]



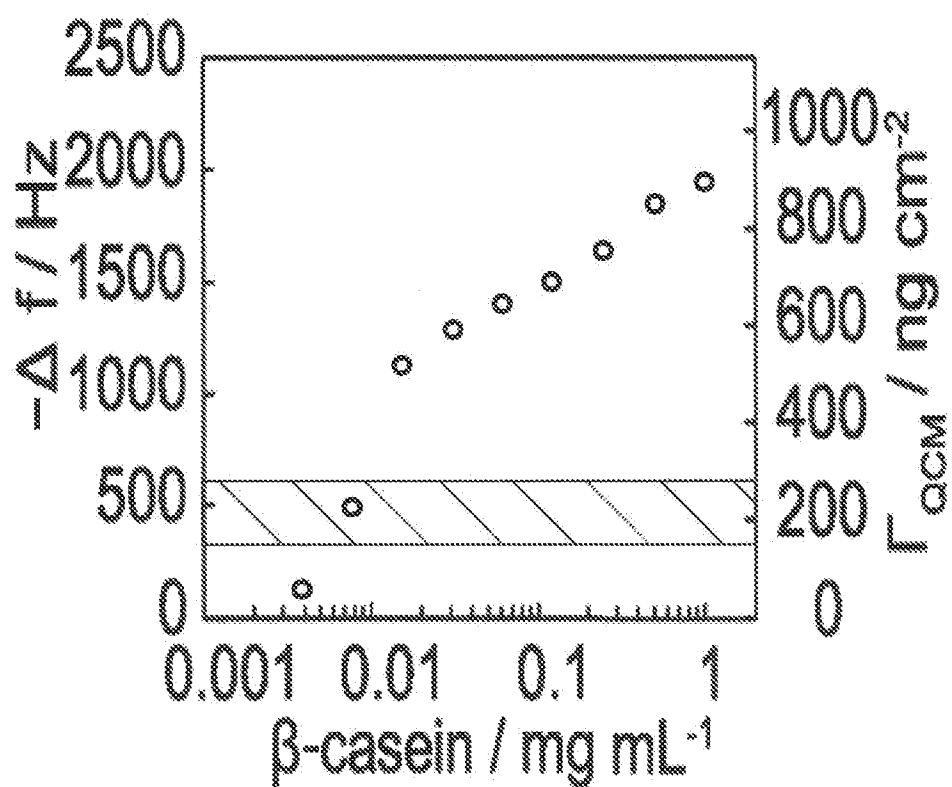
[図25]



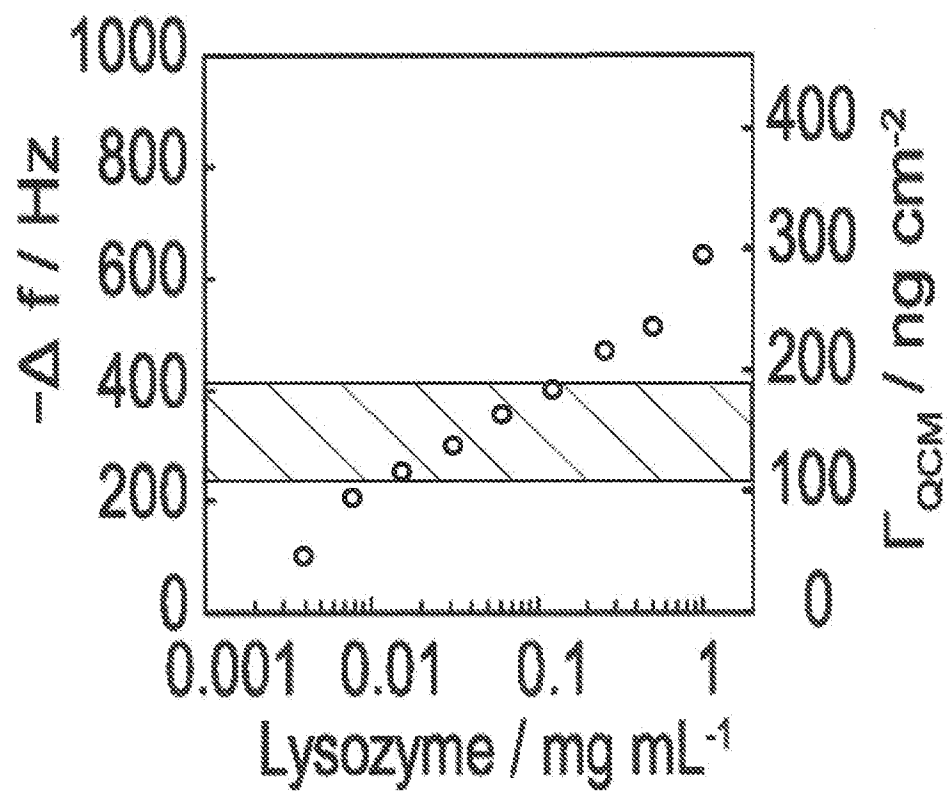
[図26]



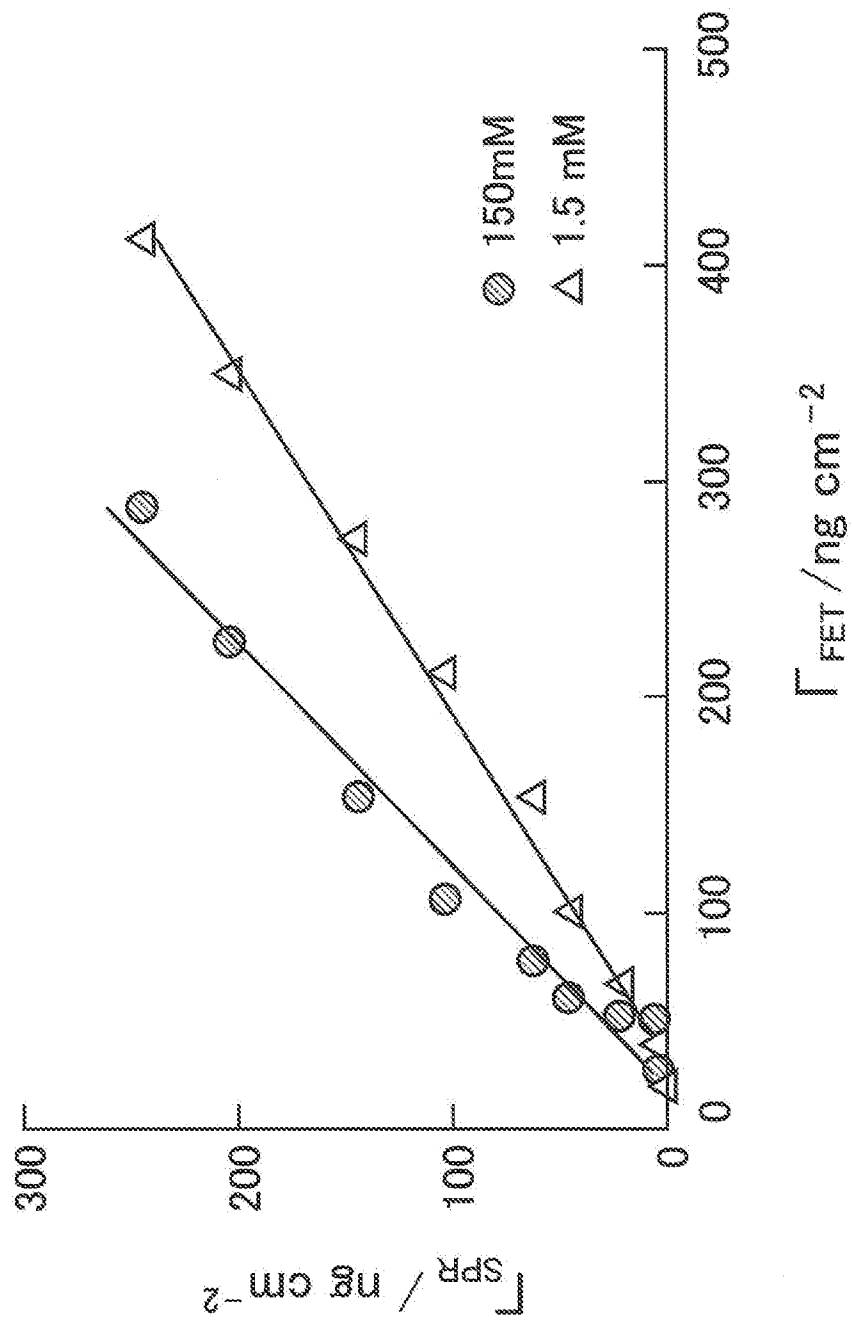
[図27]



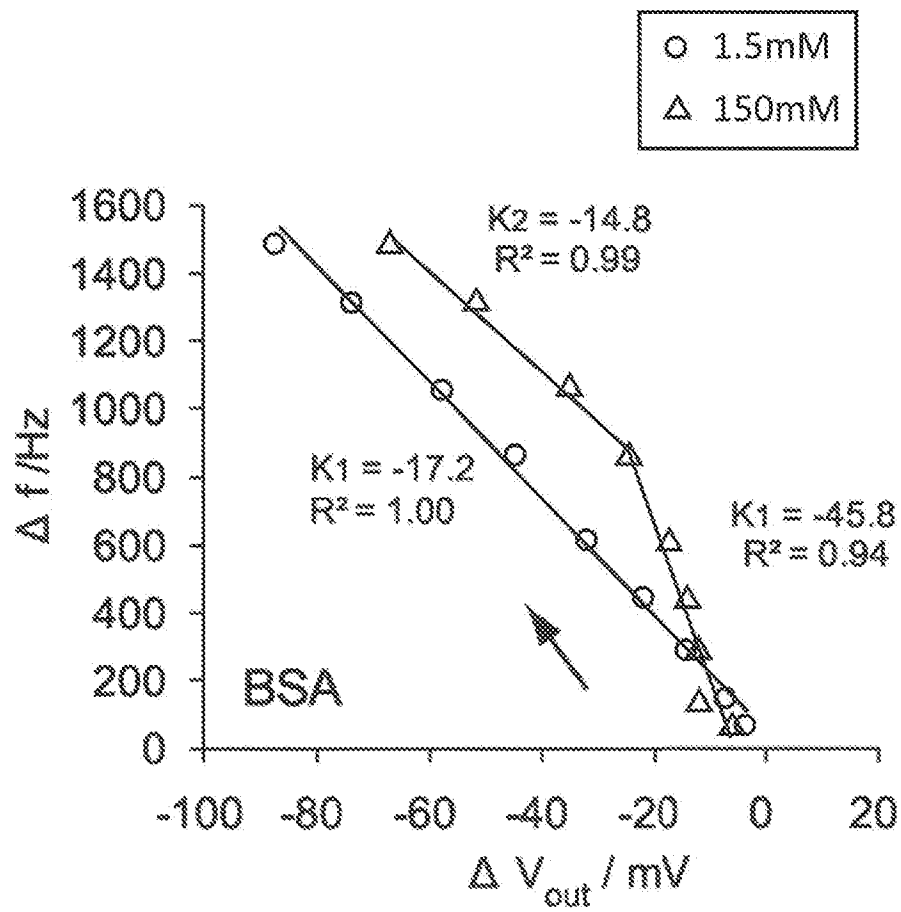
[図28]



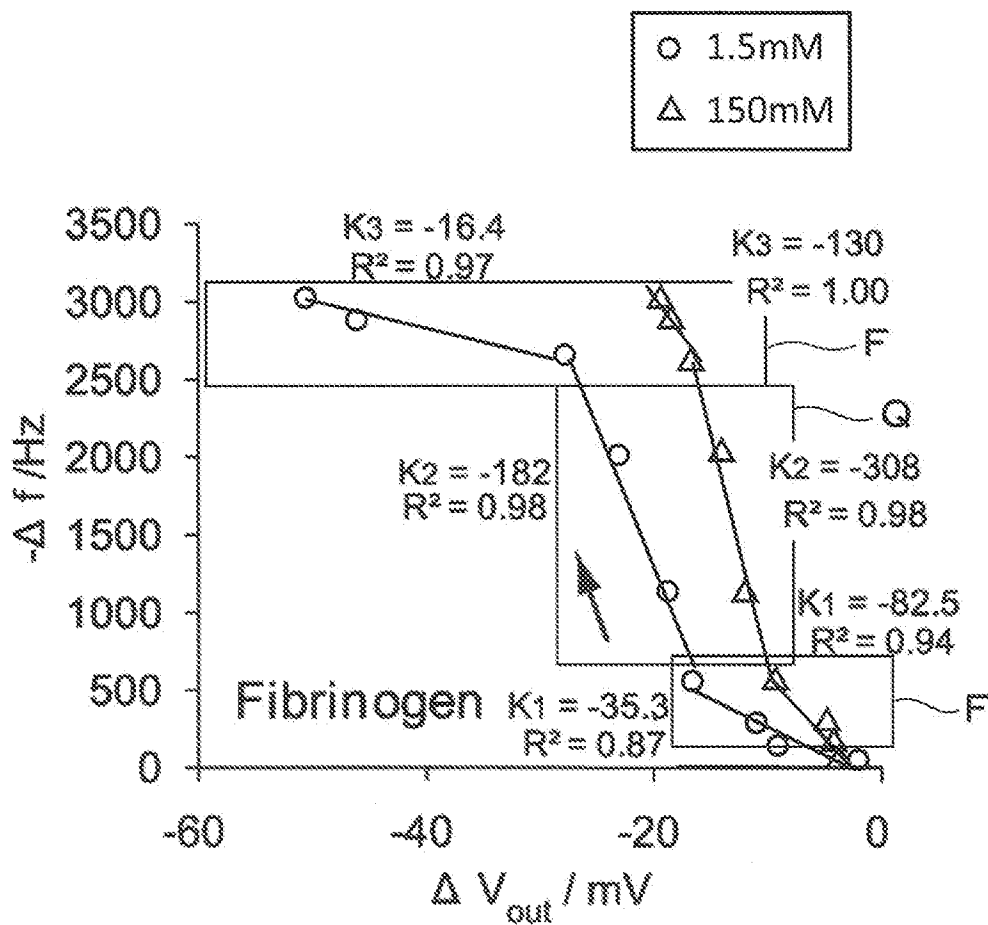
[図29]



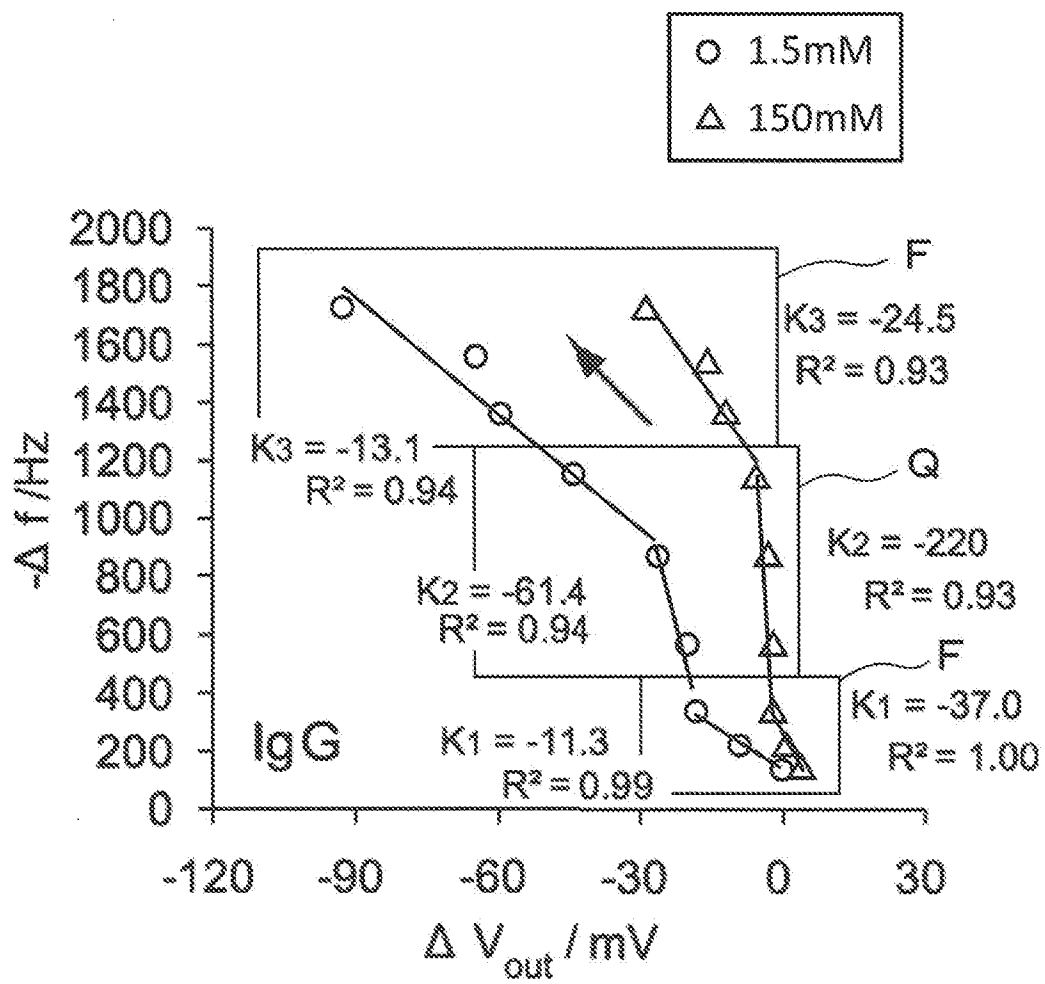
[図30]



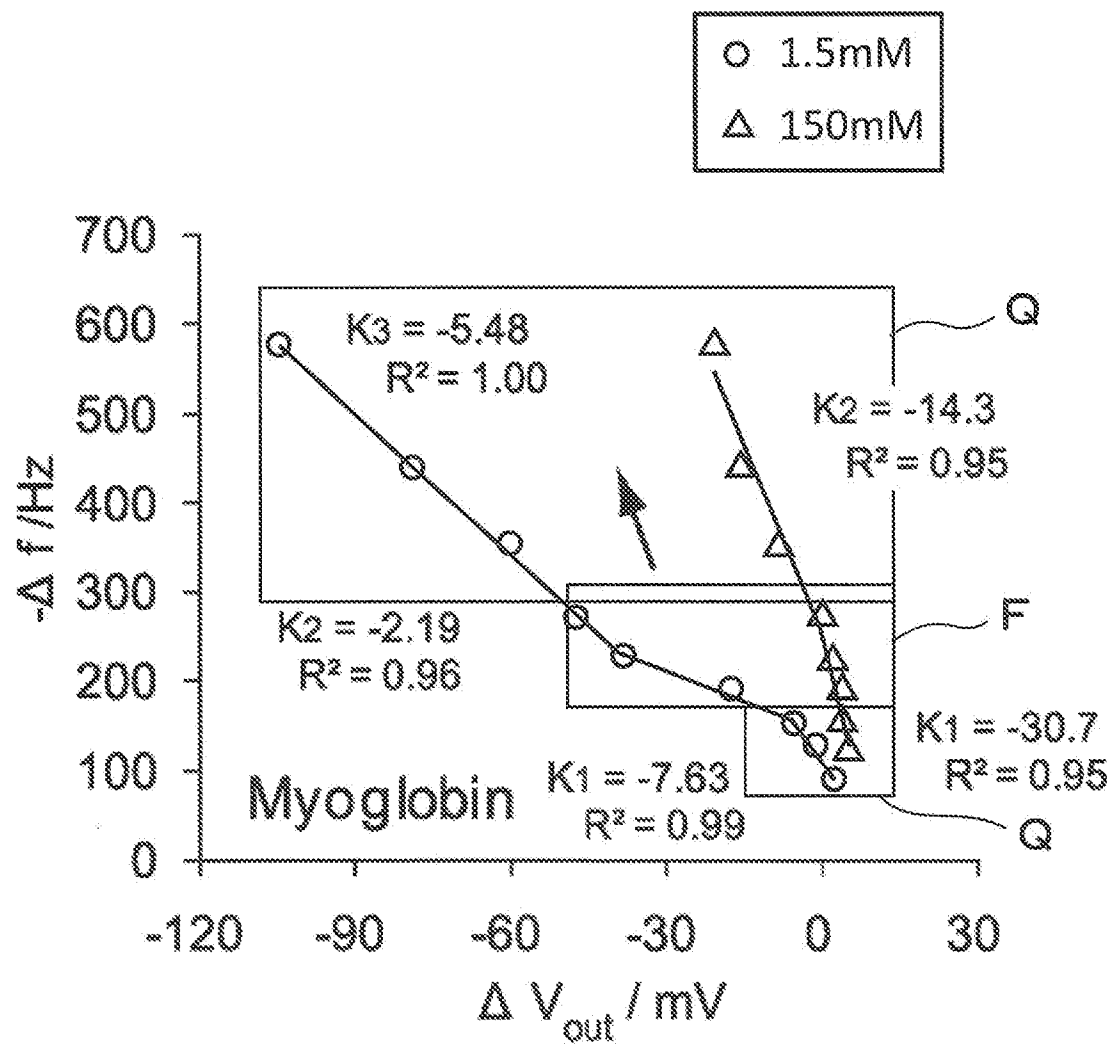
[図31]



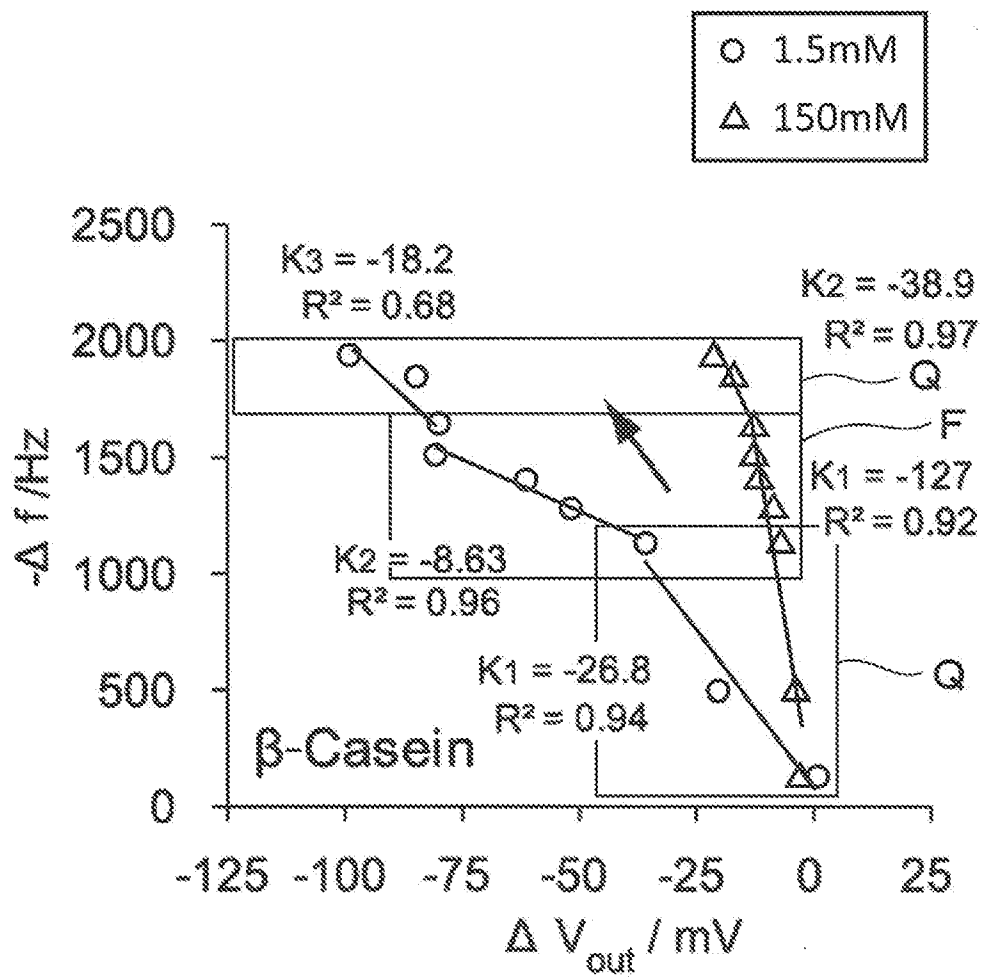
[図32]



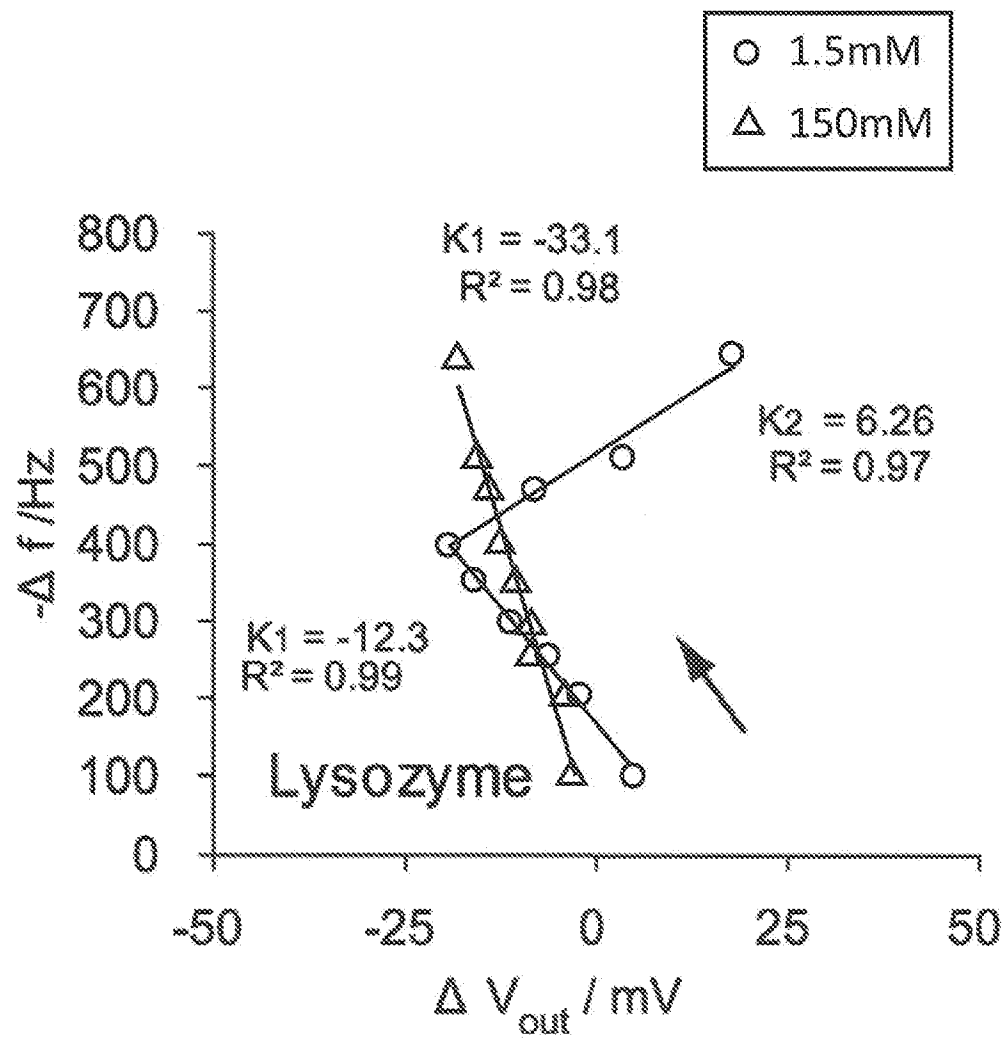
[図33]



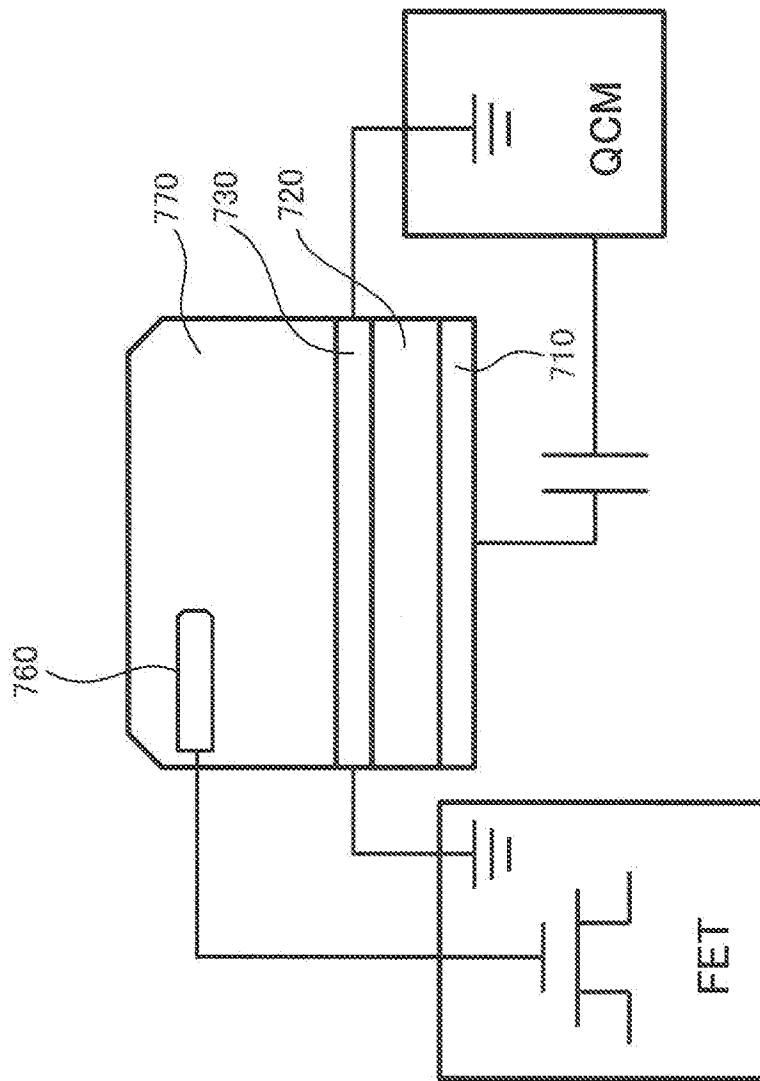
[図34]



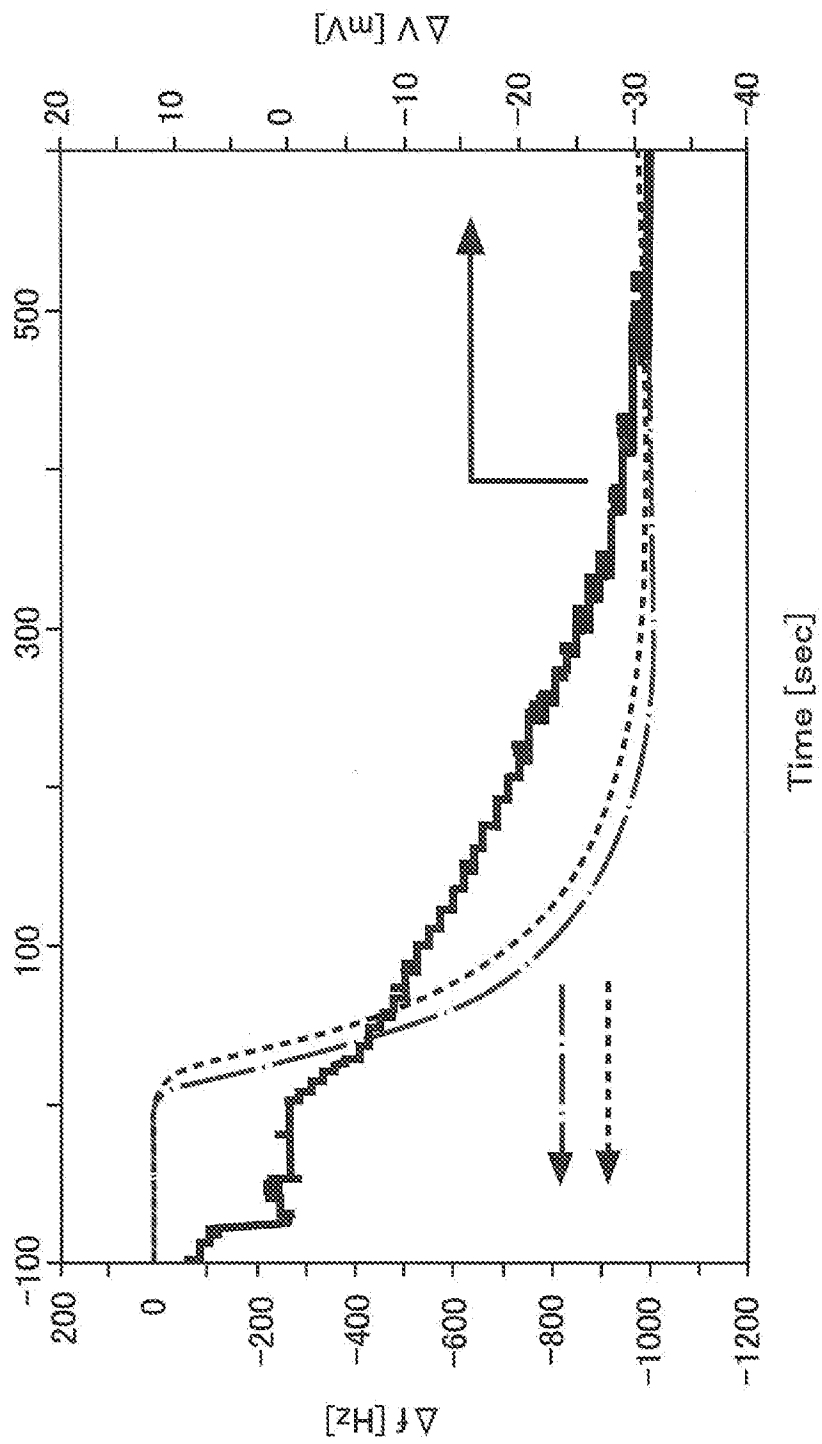
[図35]



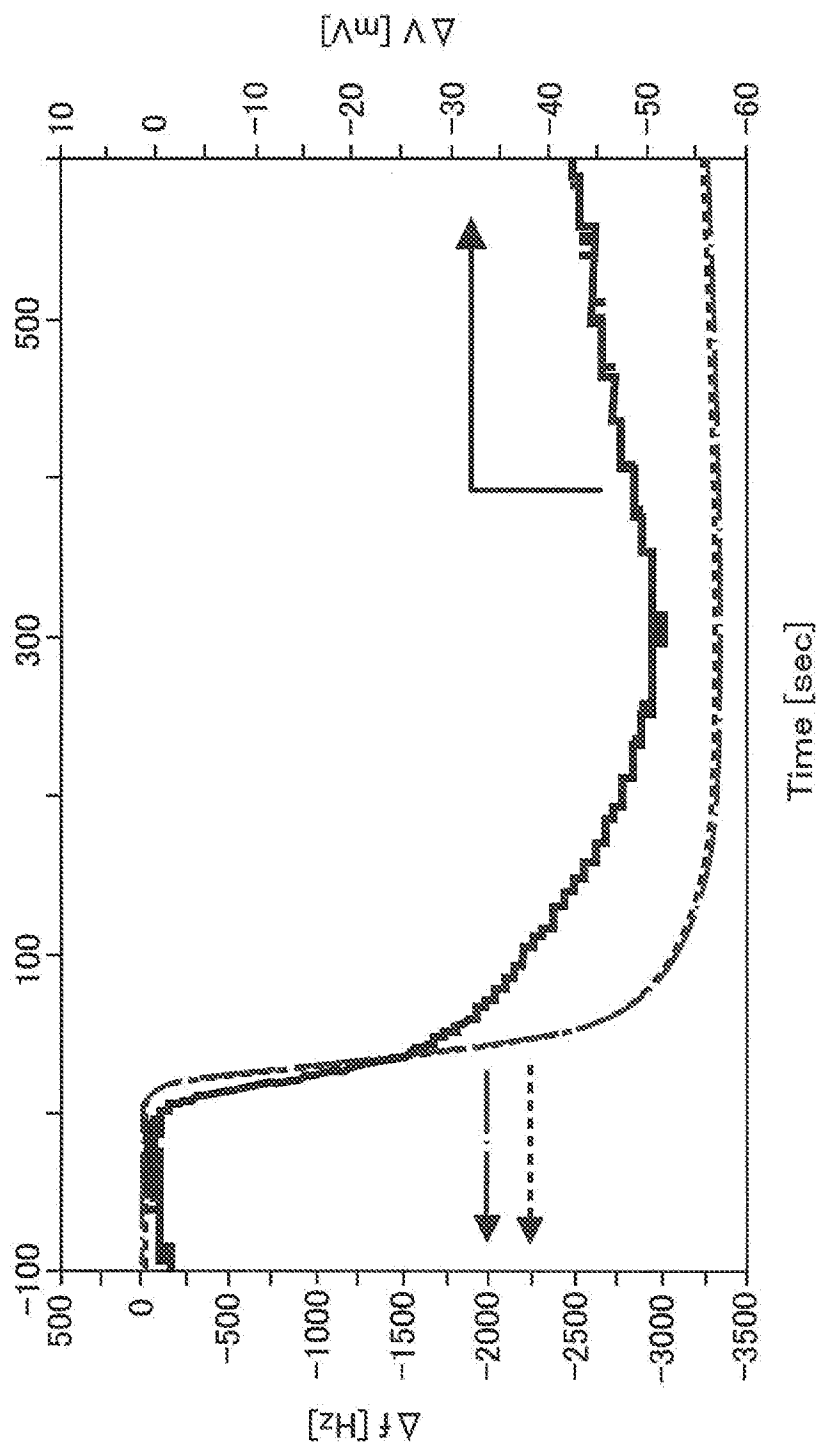
[図36]



[図37]



[図38]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064675

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N5/02(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N27/414(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

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)

C12N15/09, C12M1/00, C12M1/34, C12Q1/68, G01N5/02, G01N21/27, G01N27/414, G01N33/53, G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Science Direct, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	REIMHULT, E., et al., Simultaneous surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring measurements of biomolecular adsorption events involving structural transformations and variations in coupled water., Anal. Chem., 2004, Vol.76, No.24, p.7211-7220	1,3-9/1-9
X/Y	US 2010/0248283 A1 (Oakland University), 30 September 2010 (30.09.2010), (Family: none)	1,3-9/1-9
Y	DAMOS, F.S., et al., Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors., Quim. Nova, 2004, Vol.27, No.6, p.970-979	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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 application or patent 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
13 August, 2013 (13.08.13)

Date of mailing of the international search report
20 August, 2013 (20.08.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064675

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yuji MIYAHARA et al., "'Kagaku Sensor no Genjo to Tenbo' Electrical Detection of Bio-molecular Recognition Using Insulated Gate Field Effect Transistors", Journal of the Surface Science Society of Japan, 2006, vol.27, no.1, pages 13 to 20	1-9
X/Y	ZONG, Y., et al., Quartz Crystal Microbalance with Integrated Surface Plasmon Grating Coupler., Anal. Chem., 2008, Vol.80, No.13, p.5246-5250	2-9/1-9
P,X	GODA, T., et al., Simultaneous Monitoring of Protein Adsorption Kinetics Using a Quartz Crystal Microbalance and Field-Effect Transistor Integrated Device., Anal. Chem., 2012.08.04, Vol.84, No.17, p.7308-7314	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i,
G01N5/02(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N27/414(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i,
G01N33/543(2006.01)i

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 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12M1/00, C12M1/34, C12Q1/68, G01N5/02, G01N21/27, G01N27/414, G01N33/53, G01N33/543

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Science Direct, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX(STN)

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	関連する 請求項の番号
X/Y	REIMHULT, E., et al., Simultaneous surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring measurements of biomolecular adsorption events involving structural transformations and variations in coupled water., Anal. Chem., 2004, Vol.76, No.24, p.7211-7220	1, 3 - 9 / 1 - 9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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
「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
「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)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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
「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
「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
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 3 . 0 8 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

2 0 . 0 8 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

9 3 5 8

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 請求項の番号
X/Y	US 2010/0248283 A1 (Oakland University) 2010.09.30, (ファミリーなし)	1, 3-9 / 1-9
Y	DAMOS, F.S., et al., Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors., Quim. Nova, 2004, Vol.27, No.6, p.970-979	1-9
Y	宮原 裕二, 他, 「化学センサの現状と展望」電界効果トランジスタによる生体分子認識反応の電氣的検出, 表面科学, 2006, Vol.27, No.1, p.13-20	1-9
X/Y	ZONG, Y., et al., Quartz Crystal Microbalance with Integrated Surface Plasmon Grating Coupler., Anal. Chem., 2008, Vol.80, No.13, p.5246-5250	2-9 / 1-9
P, X	GODA, T., et al., Simultaneous Monitoring of Protein Adsorption Kinetics Using a Quartz Crystal Microbalance and Field-Effect Transistor Integrated Device., Anal. Chem., 2012.08.04, Vol.84, No.17, p.7308-7314	1-9