

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5675594号  
(P5675594)

(45) 発行日 平成27年2月25日 (2015. 2. 25)

(24) 登録日 平成27年1月9日 (2015. 1. 9)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 27/416 (2006. 01)

GO 1 N 27/46 3 3 6 B

GO 1 N 27/30 (2006. 01)

GO 1 N 27/46 3 3 6 G

GO 1 N 27/327 (2006. 01)

GO 1 N 27/46 3 0 1 G

GO 1 N 27/48 (2006. 01)

GO 1 N 27/30 B

C 1 2 M 1/34 (2006. 01)

GO 1 N 27/30 A

請求項の数 18 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-512083 (P2011-512083)  
 (86) (22) 出願日 平成21年5月29日 (2009. 5. 29)  
 (65) 公表番号 特表2011-522266 (P2011-522266A)  
 (43) 公表日 平成23年7月28日 (2011. 7. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/056616  
 (87) 国際公開番号 W02009/147093  
 (87) 国際公開日 平成21年12月10日 (2009. 12. 10)  
 審査請求日 平成24年5月21日 (2012. 5. 21)  
 (31) 優先権主張番号 102008027038.5  
 (32) 優先日 平成20年6月6日 (2008. 6. 6)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 503306168  
 フラウンホーファー・ゲゼルシャフト・ツ  
 ール・フェルデルング・デア・アンゲヴァ  
 ンテン・フォルシュング・エー・ファウ  
 ドイツ連邦共和国、80686 ミュンヘ  
 ン、ハンザストラーセ、27ツェー  
 (74) 代理人 100100354  
 弁理士 江藤 聡明  
 (72) 発明者 ネプリング, エリック  
 ドイツ、25421、ピネベルク、ハイン  
 リヒーボシェン-シュトラッセ、8  
 (72) 発明者 アルバース, イェルク  
 ドイツ、25576、プロクドルフ、ドル  
 フシュトラッセ、28、ハー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学的又は生物学的な種を検知するための方法及びそのための電極配列

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酸化還元 - 反応を受けることが可能であるか、又は酸化還元 - 反応を受けることができる分子を直接的又は間接的に生成することができる、1種以上の化学的又は生物学的な種を検知するための方法であって、

前記種は液体中に存在し、

前記酸化還元 - 反応で発生した電流が、少なくとも1つの電極で検知され、且つ以下の工程、

- 種又は分子の時間的に変化する量を、少なくとも1個の電極の上、該電極、又は該電極の近傍で、所定の時間間隔  $t_1 - t_{1,1} - t_2$  内に、ポジション化する工程、

を含み、ここで時間間隔  $t_1 - t_{1,1}$  の間に、前記液体を少なくとも1個の電極に流し、及び時点  $t_{1,1}$  でこの液体の流れを停止させ、及び更に、以下の工程、

- 時間間隔  $t_1 - t_{1,1} - t_2$  の間に、2つの異なる電位の間で、複数回、少なくとも1つの電極を切り替える工程、

を含み、前記電位は、参照電極電位に対して所定の電位を取り、該電位は、前記種又は前記分子の酸化電位の範囲内であるか、又はその上側、乃至、前記種又は前記分子の還元電位の範囲内、又はその下側に設定され、前記電極の切り替えにより、前記種 / 前記分子が、還元と酸化を交互に繰り返し、及び更に、以下の工程、

- 時間間隔  $t_1 - t_{1,1} - t_2$  にわたり、種 / 分子の繰り返しされた還元と酸化によって、少なくとも1個の電極で形成された電流を把握する工程、

10

20

を含み、

- 時間間隔  $t_1 - t_1$ 、 $t_2$  内で、少なくとも 1 つの電極内の電流を、測定する工程、
- 時間間隔  $t_1 - t_1$ 、 $t_2$  内の電流を、時間に対して整理する工程、
- 電流信号の絶対値を合計し、これにより時間に対する電流の絶対値を与える曲線を得る工程、

を含み、

種を質的に検知するために、前記液体の流れを停止させた後の範囲  $t_1$ 、 $t_2$  の曲線が、前記液体の流れを停止させる前の曲線  $t_1 - t_1$  よりも高いか否かを観察し、又は種を量的に検知するために、前記液体の流れを停止させた後の範囲  $t_1$ 、 $t_2$  内の電流値の上昇、又は電流値未満に該当する積分値を測定し、及び参照値と比較することを特徴とする方法。

10

#### 【請求項 2】

複数回の切り替えを、頻度が 0.1 ~ 10 Hz の範囲で行い、及び / 又は時間間隔  $t_1 - t_2$  のスイッチ切り替え回数が、10 ~ 100 の範囲、好ましくは 15 ~ 50 回の範囲であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 3】

1 種以上の種が、酸化還元 - 反応を受けることができ、及び種のポジション化が、該種を含む流体を、少なくとも 1 個の電極を経て移行させることを含む請求項 1 又は 2 の何れか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 4】

20

1 種以上の種が、酸化還元 - 反応を受けることができ、及び種のポジション化が、以下の工程：

- 捕獲分子を、少なくとも 1 個の電極上に、又は電極の直接的な周囲に供給する工程、
  - 種を含む流体を、少なくとも 1 個の電極、又はその直接的な周囲を経て導き、前記捕獲分子が、前記種を、結合又は錯化によって捕獲する工程、
- を含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 の何れか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 5】

1 種以上の種が、直接的又は間接的に、酸化還元 - 反応を受けることができる分子を生成することが可能であり、分子のポジション化が以下の工程：

- 種を含む流体を、少なくとも 1 個の電極、又はその直接的な周囲を経て導き、種を少なくとも 1 個の電極又は電極の直接の周囲で結合させる工程、
  - 種によって、酸化還元 - 反応を受けることができる分子を生成する工程、
- を含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 の何れか 1 項に記載の方法。

30

#### 【請求項 6】

少なくとも 1 個の電極、及び / 又はその直接的な周囲に捕獲分子を加え、該捕獲分子は、種を、結合又は錯化によって捕獲することができることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

#### 【請求項 7】

酸化還元 - 反応を受けることができる分子を生成するために、所定の流体が少なくとも 1 個の電極、及び所望により、その直接的な周囲を経て導かれ、前記流体は前駆体分子を含み、該前駆体分子から、前記酸化還元 - 反応を受けることができる前記分子を生成可能な種が形成されることを特徴とする請求項 5 又は 6 の何れかに記載の方法。

40

#### 【請求項 8】

種がプロテイン、すなわち酵素であるか、又はプロテイン、すなわち酵素を含むことを特徴とする請求項 5 ~ 7 の何れか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 9】

酵素が、p - アミノフェノールを遊離可能であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

#### 【請求項 10】

酵素が、フォスファターゼ及び - ガラクトシダーゼから選ばれることを特徴とする請

50

求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

種がリボ核酸であり、及び酸化還元反応を受けることができる分子が、以下の工程、  
- 所定の分子を含む流体を、少なくとも 1 個の電極、及び所望によりその直接的な周囲を経て導く工程（但し、前記分子は、捕獲分子と種で構成される化合物又は錯体と結合可能であるが、捕獲分子単独では結合せず、及び酸化還元 - 反応を受けることができる分子を、化合した状態、又はカプセル化された状態で含む）、及び  
- 酸化還元 - 反応を受けることができる分子を遊離させる工程、  
によって生成されることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 1 2】

酸化還元 - 反応を受けることができる分子の遊離が、更なる液体を、少なくとも 1 個の電極、及び所望により電極の直接の周囲を経て導くことにより行われ、前記液体は、酸化還元反応を受けることが可能な分子を遊離することが可能であることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

少なくとも 1 個の電極の表面が、白金又は金を有することを特徴とする請求項 1 ~ 1 2 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

少なくとも 1 個の電極の表面に、検知する種と結合するか、又は錯化することが可能な捕獲分子が存在することを特徴とする請求項 1 ~ 1 3 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

捕獲分子が、チオール橋を介して電極と結合していることを特徴とする請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

少なくとも 1 個の電極の直接的な近傍に、絶縁性の基材が存在し、該基材は、種及び / 又は捕獲分子と結合するか、又は吸着することが可能なように活性化されていることを特徴とする請求項 1 ~ 1 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

少なくとも 2 個の電極が存在し、時間間隔  $t_1 - t_2$  の間、前記異なる電位の間で複数回、同様の切り替えが行われ、該切り替えにおいて、前記電位が、参照電極に対して、前記種又は前記分子の酸化還元電位の範囲内、ないし下側 / 上側の電位に設定され、これにより、前記種 / 前記分子が、同時に、少なくとも 2 個の電極のそれぞれで交互に還元及び酸化されることを特徴とする請求項 1 ~ 1 6 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

両方又は 2 個の電極が、異なる種と結合可能な、又は異なる種を検知可能な異なる捕獲分子で覆われていることを特徴とする請求項 1 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、1 種以上の化学的又は生物学的な種（該種は、酸化還元 - 反応を受けることが可能であるか、又は直接的又は間接的に、酸化還元 - 反応を受けることが可能な分子を遊離可能である）を検知する方法であって、上記酸化還元 - 反応によって生成される電流が、少なくとも 1 個の電極位置で検知される方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本技術分野の標準技術は、電極（該電極では、媒体の酸化又は還元のみが行われる）から成る 1 個以上の測定位置を有する支持体である。この方法を行うための電極の製造は単純である（例えば、Golddraht, Leiterplatten, mit Metall bedampfter Kunststoff）が、しかし得られる電流信号は、しばしば十分な感度を有していない。

10

20

30

40

50

## 【0003】

近年、超微細なインターデジタル電極配列が開発されており、該インターデジタル電極配列では、各測定位置が指状の構造を有する2個の電極を有し、そして両方の指状の構造が相互に密接に連関し合っており、これにより、ある電極と他の電極の電極ストライプが - 通常、平行に - 交互に隣り合って配置されるようになっている。両方の電極の間隔は、有利な場合では、(明確に)  $1\text{ }\mu\text{m}$  未満である。電極の構造幅がサブ -  $\mu\text{m}$  - 範囲である、このようなセンサーは、例えば特許文献1 (DE 4 3 1 8 5 1 9) に記載されている。O. Niwa et al., Anal Chem. (1993) 65, 1559 - 1563では、4 - アミノフェニルフォスフェイトの、アルカリ性フォスファターゼによる酵素性の開裂によって発生する、4 - アミノフェノールのシクロボルタメトリックな検知(cyclovoltammetrischen Detektion)において、構造幅が3 ~  $5\text{ }\mu\text{m}$ で、指間の間隔が2 ~  $5\text{ }\mu\text{m}$ の電極で、通常の幾つかの電極の使用下に、検知に対する測定信号が(明確に)拡大されている。

10

## 【0004】

特許文献2 (EP 8 8 6 7 7 3 B 1) には、希釈剤又は溶媒中の分子又は分子錯体を検知する方法が開示されており、該方法では、測定試料が、インターデジタルの超 - ミクロ電極配列と接触している。この方法のために、電極構造体における電氣的電位の設定によって、電氣的な交換フィールドが形成され、そして電流又は電位の変化(該変化は、測定試料中に存在するか、又は発生する種に起因する)が測定される。ここで、得られる電流は、主として、電極近傍の空間部分の、検知される分子又は分子錯体によって影響される。この影響は、測定される種の分散、堆積又は結合によってなし得る。測定は、特に、インピーダンススペクトロスコピーを使用して行われる。検知のために利用される電氣場(電場)は、約  $10\text{ mV}$  ~  $50\text{ mV}$  の範囲の非常に小さい振幅の交流電圧によって、形成することができ、その周波数は、 $1\text{ MHz}$  ~  $10\text{ MHz}$  の範囲になる。

20

## 【0005】

測定される分子は、マイクロ電極の表面に結合させることができる。該結合は、物理的(吸着)又は化学的な結合によって行うことができ、そして例えば、チオ結合(チオール結合)が金の電極の上にもたらされ、そして測定される。電極上では、アンチゲン又は同様のものをもたらしことができ、これは測定試料中の抗体と反応するか、又は核酸化学中の雑種反応(Hybridisierungsreaktionen)を行う。

30

## 【0006】

実施例として、上記文献は、S - ビオチン化した(金でできた)電極表面で、 - ガラクトース - Streptavidinの結合を検知することを開示している。ビオチンと、変性したStreptavidinの結合の後、インピーダンスの変化がいわゆるNyquist - プロットによって測定され(これは、錯化された分子による電極間の誘電体の妨害(中断)を示す)、そしてこれにより、ビオチンとStreptavidin - 酵素 - 錯体の間の結合が表される。超 - ミクロ電極配列は、 - ガラクトース - Streptavidinのビオチンでの結合を、更に、p - アミノフェノールの検知を使用して、アンペアメトリック的に測定することができる。このために、電氣的な変換場が、同じく残っている電位に被せられ、これにより、電極が、Ag / AgCl - 参照電極に対して、 $+250\text{ mV}$ の電位とされ、これにより、アミノフェノールがChinoniminに酸化される。

40

## 【0007】

インターデジタル電極を使用した上述した文献の測定原理及び更なる可能な測定原理を以下に詳細に説明する：

## 【0008】

1. 純粋なインピーダンススペクトロスコピーを使用し、複合した交流電流抵抗が測定される。これは、電氣化学において、主として、電極間に存在する媒体、及び/又は捕獲分子(例えば、金の電極でのチオ橋(チオール橋、又はチオール橋かけ)を介して結合した生物学的な捕獲分子)で占められた電極表面の特定の付加物の特徴化のために使用され

50

る。上述したインターデジタル電極でできた、ある測定個所（測定位置）を使用して、検知流体中の捕獲分子に結合した種が見つけ出され、一方、結合によって、電極の周囲の電子及び／又はプロトンの導電率が変化する。複数の測定個所が設けられる場合、これらは、所望により、異なる種が結合する、異なる捕獲分子で覆う（敷き詰める）ことができ、これにより、複数種類の種を検知流体中に検知することができる。代表例では、電極自体は、検知される種の捕獲分子との結合によって、化学的に変化されない。このような測定技術のために、可能な限り小さい交流電圧（通常、50 mV以下）が使用され、該交流電圧は、通常、参照する必要がない。部分的に、周波数が、非常に広い範囲に変化され、これにより、広い範囲の依存性が読み取られる。図2a（図では、測定値が、時間（s）に対する座標電圧[V]によって示されている）にグラフを示す。

10

#### 【0009】

2. インピーダンススペクトロスコピーは、（例えば、上記文献に記載されているように、）追加的に酸化、及び／又は還元の影響力を利用することができる。純粋なインピーダンススペクトロスコピーにおけるように、交流電流抵抗が、たいていは10～50 mVの小さな交流電圧を使用して測定される。しかしながら同時に、等しい電圧で、両電極の少なくとも一方の電極に、規定された電位が（典型的には、参照電極カバ（Referenzelektrodenbezug）を使用して）設けられ、これは、（目的の）存在する酸化又は還元可能な還元可能な又は酸化還元を受ける媒体に作用し、そして再度、同じ電流が生じるが、しかしながらこれは無条件に評価されるものではない。通常、インピーダンスに対するその追加的な影響のみが測定される。対応する図（該図では、時間[s]に対する電位[V]が示されている）を、図2bに示す。

20

#### 【0010】

3. インピーダンスの代わりに、この配置構成での測定原理として、サイクリ的なボルタメトリー(cyclische Voltammetrie)を使用可能である。このために、電極は、非常にゆっくりと - 通常、数秒間、又は数分間にわたって - 予め設定された正の電圧から、予め設定された負の電圧へと、そしてまた逆に切り替えられる。ここで得られた、電圧に対する測定された電流量の図は、インターデジタル電極間の検知される分子の存在を帰納的に推理することを許容する。シクロボルタメトリー(サイクリ的なボルタメトリー)は、原則として、対応する物質の代謝がされる、非常にゆっくりとした電気化学的酸化還元 - 方法（該方法で、それぞれの物質の酸化 - 及び／又は還元最大値が確かめられる）である。

30

#### 【0011】

4. この方法とは異なり、酸化還元サイクリング又は酸化還元リサイクリングと言われる。このために、両方の電極がそれぞれ、酸化 - 及び還元電位（参照電極カバを使用）に一定に課せられる（これらの電位は、検知される酸化還元分子の酸化電位以上、及び還元電位以下に設定されるものである）。両電極の、極めて近傍の位置に基づいて、酸化された分子が、反対に荷電された電極に移動し、そしてそこで還元され、そして再度、逆に移動する。電極で、酸化還元分子の酸化ないし還元によって直接的に形成された、両電流が測定される。複数回の酸化と還元によって、それぞれの個々の分子が、数回にわたって把握（理解）され、そして測定信号が増強される。対応する図（該図では、時間[s]に対する電位[V]が示されている）を、図2cに示す。

40

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0012】

【特許文献1】DE 4 3 1 8 5 1 9

【特許文献2】EP 8 8 6 7 7 3 B 1

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0013】

上述した技術の不利な点は、インターデジタルの電極構造体は、それぞれの異なって荷電された電極を、相互に非常に近い位置に設けるために、サブ -  $\mu\text{m}$  - 範囲に製造する必

50

要があることである。しかしながら、これによってのみ、十分な感受性で測定が可能になる。目下のところ、このことは、費用のかかる（純粹空間内での）半導体技術で行われている（例えば、E. Nebeling et al., Anal. Chem. (2004) 76(3), 689-696、参照）。更なる不利な点は、電極が相互に、非常に接近することは、短絡の危険性をもたらすことである：アノード及びカソードが、僅か約400 nmの間隔で接触するような場合、それぞれの測定位置は、全体としては役に立たない。（異なる捕獲分子を有する複数の測定個所が設けられた）所定の電極配列で、液体中の複数の種が検知される場合、該電極配列が異なる液体に置かれる場合には、全体の試験は、新しい電極配列で繰り返される必要がある。

【0014】

10

短絡を回避するために、電極構造体は、たびたび基材にはめこまれる。このことは、当然ながら、費用がかかることになる。

【0015】

本発明の目的は、弊害を除去し、及び分子又はその他の種、例えば分子錯体、ペプチド、プロテイン（特に酵素）、アンチゲン、核酸又は核酸を含む種の測定を、使用する装置について、信頼性があり、そして要求される条件の少ない所定の技術を使用して行うことにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

この課題は、酸化還元 - 反応を受けることが可能であるか、又は酸化還元 - 反応を受けることができる分子を直接的又は間接的に遊離することができる、1種以上の（化学的又は生物学的な）種を検知するための方法であって、上記酸化還元 - 反応で発生した電流が、少なくとも1つの電極で検知され、及び少なくとも1個の電極位置（該電極位置の上、又はその近傍に、検知される種が存在する）が、2つの異なる電位の間で複数回にわたり切り替えられ、上記電位は、参照電極電位に対して取られ、上記電位は、上記種又は上記分子の酸化還元電位の近傍、ないし下側 / 上側に設定され、これにより、上記種 / 上記分子（後者は、その遊離の後）が、上記電極位置で、又はその近傍で、スイッチの切り替えによって、交互に還元及び酸化がされる方法によって解決される。ここで、所定の時間にわたり、種 / 分子の還元と酸化の繰り返しによって形成された電流が、把握（理解、記録）され、及び所望により、（その個所又はその近傍位置で、上記種又は上記分子が存在しない）電極電位と比較される。電流量の把握と評価、及び検査対象の種（該種は、質的に、又は量的に測定可能である）が、存在するか、又は存在しないかの推論は、通例では、請求項1の特徴的事項、及び所望により請求項2の特徴的事項により行われる。ここで、

20

30

「種又は分子の時間的に変化する量を、少なくとも1個の電極の上、該電極で、又は該電極の近傍で、所定の時間間隔  $t_1 - t_2$  内に、ポジション化する工程」の「種の時間的に変化する量のポジション化(Positionierung)」という表現は、電極の上、電極の個所、又は電極の近傍での種の量が、時間間隔  $t_1 - t_2$  の間に変化し、及び好ましくは増加することを意味すると理解される。

40

ここで、請求項1の発明は、酸化還元 - 反応を受けることが可能であるか、又は酸化還元 - 反応を受けることができる分子を直接的又は間接的に生成することができる、1種以上の化学的又は生物学的な種を検知するための方法であって、  
前記酸化還元 - 反応で発生した電流が、少なくとも1つの電極で検知され、且つ以下の工程、  
- 種又は分子の時間的に変化する量を、少なくとも1個の電極の上、該電極、又は該電極の近傍で、所定の時間間隔  $t_1 - t_2$  内に、ポジション化する工程、  
- 時間間隔  $t_1 - t_2$  の間に、2つの異なる電位の間で、複数回、少なくとも1つの電極を切り替える工程、

を含み、前記電位は、参照電極電位に対して所定の電位を取り、該電位は、前記種又は前記分子の酸化電位の範囲内であるか、又はその上側、乃至、前記種又は前記分子の還元電位の範囲内、又はその下側に設定され、前記電極の切り替えにより、前記種 / 前記分子

50

が、還元と酸化を交互に繰り返し、及び更に、以下の工程、

- 時間間隔  $t_1 - t_2$  にわたり、種 / 分子の繰り返された還元と酸化によって、少なくとも 1 個の電極で形成された電流を把握する工程、

を含み、

前記時間間隔  $t_1 - t_2$  に渡り、前記種 / 分子の前記還元と酸化の繰り返しによって形成された電流の前記把握が、以下の工程：

- 前記種又は分子を、前記電極の上、該電極、又は該電極の近傍でポジション化する前に、時間間隔  $t_0 - t_1$  の間、少なくとも 1 個の電極で、2 つの電位の間で、複数回、切り替えを行なう工程、

- 時間間隔  $t_0 - t_1$  内で、少なくとも 1 つの電極内の電流を、測定する工程、

- 時間間隔  $t_1 - t_2$  内で、同じ電極内の電流を、測定する工程、

- 時間間隔  $t_0 - t_1 - t_2$  内の電流を、時間に対して整理する工程、

- 電流信号の絶対値を合計し、これにより時間に対する電流の絶対値を与える曲線を得る工程、

-  $t_0 - t_1$  及び  $t_1 - t_2$  の間の絶対値を比較する工程、

を含むことを特徴とする構成を有する。そして請求項 2 の発明は、請求項 1 に記載の方法であって、種を質的に検知するために、範囲  $t_1 - t_2$  の曲線が、曲線  $t_0 - t_1$  よりも高いか否かを観察し、又は種を量的に検知するために、範囲  $t_1 - t_2$  内の電流値の上昇を観察し、又は電流値未満に該当する積分値を測定し、及び参照値と比較することの特徴とする構成を有する。

更に、請求項 2 の発明は、種を質的に検知するために、範囲  $t_1 - t_2$  の曲線が、曲線  $t_0 - t_1$  よりも高いか否かを観察し、又は種を量的に検知するために、範囲  $t_1 - t_2$  内の電流値の上昇、又は電流値未満に該当する積分値を測定し、及び参照値と比較することの特徴とする構成を有する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図 1】発生した電流（正の酸化 - 及び負の還元）の合計を測定した態様を示した図である。

【図 2 a】インターデジタル電極を使用した文献の測定原理及び更なる可能な測定原理を説明した図である。

【図 2 b】インターデジタル電極を使用した文献の測定原理及び更なる可能な測定原理を説明した図である。

【図 2 c】インターデジタル電極を使用した文献の測定原理及び更なる可能な測定原理を説明した図である。

【図 2 d】本発明に従い、電圧を、電極位置で、周期的に変化させた態様を示した図である。

【図 3 a】12 個の金電極における、所定の時間にわたる平行した、各電極での酸化還元 - サイクリングを使用した電流測定を、（全ての電極について得られた、相互に重なった電流信号の測定値で）示した図である。

【図 3 b】それぞれ各電極についての酸化 - 及び還元電流からの、電流信号 - 値の合計を示した図である（矢印：流体の流れの停止）。

【図 3 c】各測定個所の、時間に対する電流値の変化（電流上昇）を示した図である（棒グラフ）。

【発明を実施するための形態】

【0018】

通常の酸化還元 - サイクリングに対して、本発明の方法は、電位差が固定して設定されたインターデジタル電極を使用する必要がなく、そして本発明では、電圧を、電極位置で、周期的に変化させるだけである（電極は、参照電極に対して、それぞれカソード及びアノードとして、交互に機能する）。このことについて、図 2 d に概略的に示す。これにより - 通常、例えば、0.1 ~ 10 Hz の比較的低い周波数で - この電極上の 2 つの異なる

10

20

30

40

50

電位の間で、スイッチの切り替えが行われ、そして該電極上、又は該電極の近傍で、種又は（酸化還元反応を受け得る）分子が存在する場合には、これ（これら）は、所定の電位によって酸化され、及び他の電位によって還元される。ここで発生した電流（正の酸化 - 及び負の還元）は、その合計が測定される（図 1 参照、ここで、符号 1 は、1 つの電極から構成される測定位置、符号 2 は、酸化された酸化還元 - 媒体、符号 3 は、還元された酸化還元 - 媒体、符号 4 は、電極にかけられた、低周波数の交流電圧、符号 5 は、生成した酸化還元 - 電流の時間の経過に対する読取値を概略的に示している。）。

#### 【 0 0 1 9 】

ここで、たいいていの場合、加算した合計電流信号（酸化 - 及び還元電流の値の合計）の時間的变化（該時間的变化は、酸化還元 - 媒体の濃度変化に対応する）が評価される。発生する「容量的な積み替え電流(kapazitive Umladestrom)」は考慮されていない。この理由は、これは、媒体の酸化還元 - 電流に対して独立しているからである。これは、「積み替え(Umladung)」の後、速やかにリラックスするが、それぞれの新しい測定サイクルにおいて、ほとんど同一であり、従って時間に対して変化しない。

#### 【 0 0 2 0 】

この配列の感受性は、インターデジタルのアノードとカソード上の「従来の」酸化還元 - サイクリングのものにおおよそ相当する。インターデジタル電極 - 配列の複雑な製造工程は、例えば半導体工学によって、除去される。周期的な交流電位がかけられた 1 個以上の電極は、測定位置として又は異なる測定位置を有する完全な配列として、その用途を見出すことができる。

#### 【 0 0 2 1 】

本発明に従う方法を使用して、一方では検知流体中に存在する分子が（直接的に）、該分子が酸化還元反応を受けることができる限り、検知される。他方では、直接的に、又は捕獲分子を経て、電極で又はその周囲で結合可能であり、及びその結合の後、直接的又は間接的に（分子側で酸化還元反応を受けることができる）分子を遊離する、このような種が検知できる。

#### 【 0 0 2 2 】

本発明に従う方法は、対応して、測定流体又は他の検知流体中に存在し、及び酸化還元反応を受ける分子の検知のために使用される。検知流体下で、これにより、流体（液体）、ゲル、又は他の高粘度の材料、及びガスが把握（分析、理解）される。流体流路中の検知液体が、1 個以上の測定電極を経て導かれることが有利である。所望により、流体流路（液体流路）のそれぞれの検知流体が、測定電極を経て導入された状態で、複数の検知流体が同時に測定される。ここで、測定電極の一つを経て、（酸化還元反応を受けることができる分子の内容又は分子が存在しないことが知られている）比較流体を導くことが有利である。（これは、半 - 量的な、又は量的なテストを軽減する。）

#### 【 0 0 2 3 】

例えば、測定流体（液体）を、測定電極の近くに流し、そしてそこに留めることによって、測定流体中の 4 - アミノフェノールが直接的に検知される。各電極は、p - アミノフェノールの酸化還元電位、+ 2 0 0 m V と - 3 5 0 m V の間を、1 . 0 H z で、連続的に切り替えられる。カバー(Bezug)として、例えば、イリジウムノ酸化イリジウム参照電極が使用される。対照電極が、任意の場所に設けられ、差電流を導き出す。本実施の形態では、それぞれが分けられた流体流路中に存在する、複数の電極を設けることも可能である。

#### 【 0 0 2 4 】

この替わりに、検知される種が、例えば、いわゆる「セルフアセンブリング」によって、例えば、その表面上の官能基及び/又はその種の官能基を介して、本発明に従う電極構造及び/又はその周囲に、直接的に結合し（例えば、S H - 基を有するプロテインが、金の表面に結合する）、又は、電極構造又はその直接的な周囲に、- 同様のメカニズムによって - （検知される種と反応し、及び種と結合するか錯化する）捕獲分子が施され、ここで、生成物が発生し、該生成物は、加えられる基質を、（向こう側で）酸化還元 - 反応を

10

20

30

40

50



受けることができる分子に変換するが（酸化還元 - 媒体とも称される）、この一方で捕獲分子は、検知される種が存在しない場合には、このような基質を変換することができない。ここで酸化還元 - 媒体は、化学的、物理的又は酵素的に発生できる。例えば、金の電極を設けることができ、金の電極の上にプロテインを吸着によって結合させることができる。一例：酸フォスファターゼ(Phosphatase)が、4 - アミノフェニルフォスファートを、酸化還元分子 4 - アミノフェノールに開裂し、 $\beta$  - ガラクトシダーゼが、p - アミノフェニル -  $\beta$  - ガラクトピラノシドを、同様の分子に開裂する。当然、任意の酸化還元 - 分子を、本発明のために使用することができ；酵素によって開裂するものは、酵素又は酵素を含む錯体の検知に特に適切である。使用可能な酸化還元 - 分子の更なる例は、フェロセン誘導体(Ferrocenderivate)、カリウムヘキサシアノフェラート(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)及び有機ルテニウム - 及びオスミウム錯体、例えばルテニウムヘキサミン、オスミウムビスピリギルジクロリドである。しかしながら、その他の有機、及び所望により無機の酸化還元 - 分子も使用することができる；後者は、好ましくはカプセル化した状態であり、ここで、カプセルは、例えばリポソーム(Liposomen)、例えば所定の基（これらは、捕獲分子と検知される種の組合せとのみ反応し、捕獲分子単独とは反応しない）を有することができる。これらの結合の可能性は、例えば、いわゆるインターカレーション化合物(Interkalationsverbindungen)（該化合物は、DNA - 技術から公知であり、そして二重螺旋構造の核酸とのみ反応し、一重螺旋構造の核酸とは反応しない）を与える。当業者は、これらの技術を行う可能な手段を知っている（例えば、WO 2 0 0 2 / 0 8 1 7 3 9 又は WO 2 0 0 2 / 0 8 2 0 7 8、参照）。

10

20

#### 【 0 0 2 5 】

この方法のために、好ましくは、第 1 の工程で、種を含む検知流体が、1 個以上の電極（該電極は、既に捕獲分子で覆われている）を経て流れる。複数の電極が使用される場合、電極を、（異なる種と結合 / 錯化できる）異なる捕獲分子で覆う。従って、この方法を使用して、（一つの）検知流体中の複数の異なる種を検知可能であり、このことは、DNA - 分析に特に重要である。当然、この場合、複数の電極を、共通の流体流路に、又は異なる流体流路内に配置することができる。

#### 【 0 0 2 6 】

この実施の形態では、測定箇所（測定位置）として作用可能な電極の 1 個以上を、捕獲分子がないままにすることができる。従ってこれらは、（それぞれの測定値を、適当な零値に対して比較可能とするか、又は検定可能とするために、）比較電極として適切であり、このことは、量的又は半量的な検知（検知結果）を可能にする。

30

#### 【 0 0 2 7 】

電極 / 測定箇所は、任意の導電性材料、例えば貴金属、例えば金又は白金で作ることができ、又、炭素化合物、例えばグラファイト又はナノチューブで作ることができ；金が有利であり、この理由は、種々の生物学的に意義を有する種を、チオ橋（チオール橋）を介して金に結合させることができるからである。測定箇所がバイオ分子で覆われる場合、測定箇所は、生物学的な試験のために、プラットフォーム（基盤）として作用することができる。ここで酸化還元 - 媒体は、例えば酵素マークによって、位置特定的に生成され、ないし、その電気化学的な活性形態に変化される。

40

#### 【 0 0 2 8 】

電極 / 測定箇所の直接的な周囲も、同じく上述のように、捕獲分子が結合できるように仕上ることができる。このために例えば、所定の材料、例えば水酸化物 - 表面を有する酸化物又は変性シラン / シロキサン、又は無機 / 有機ハイブリッド材料、例えば、シリシウム含有 Ormocer e（登録商標）が適切である。これらは、その表面を、本発明にとって適切な基で容易に仕上ることができ、又は変性することができる（例えば、このためにアミン、ヒドロキシ基、カルボキシル基を使用）。上記の場合、通常、捕獲分子の、1 個以上の電極上での結合が想定されるが、これに限られるものではない。

#### 【 0 0 2 9 】

電極 / 測定位置の直接的な周囲は、電極材料にもたらされた滴の縁部角度を（特に捕獲

50

分子の結合のために)できるだけ大きく維持するために、交互に、又は追加的に疎水性に仕上ることもできる。この替わりに、又は追加的に、電極/測定個所は、リング又はシュテーク(Stegen)で囲むことができ、これは同様に、捕獲材料 - 滴の途絶え(流過)の回避に役立つ。このような形態は、例えばDE 1 991 686 7 A 1に記載されている。リング又はシュテークは、留めた状態で、又は中間的に供給することができる。同文献は、捕獲分子の供給(塗布)のためにスタンプを使用すること、及びマイクロ毛細管反応の構成も記載されており;その実施の形態は、同様に、本発明にとって適切である。

#### 【0030】

電極/測定個所は、任意の支持材料、例えば、有機基材(有機サブストレート)、例えば合成物質、又、導体プレート又はこれに類似するものに設けることができる。所望により、当然ながら、シリコンウエハー又はこれに類似するものを支持体として使用することもできるが、このことが必要であるわけではない。金電極と銅基材の組合せが有利である。電極は、容易な方法で基材上に施すことができる(導体構造も同様である)。導体構造は、金、しかし - 例えば、費用を低減するために、銅又はアルミニウム、又は他の通常の材料で構成することができる。

#### 【0031】

電極/測定個所(測定位置)の形状は、問題にならない。この理由は、電極/測定個所の形状は、任意の形状を有することができるからである。これらは、試験を行い、及び他の条件、例えば1個以上の流体流路の配置に従って、例えば、平面であって良く、及び丸い、卵形の、長方形の、長く - 伸ばされた、正方形、又は他に多角形状を有して良い。これらは、連続して良く、又は空所を有して良く、その表面は、例えば上述したように、捕獲分子の結合のために適切なものである。これらは、所望により、例えば、これらが存在する流体流路内の電流割合を改良するために、(周りを囲んだ状態の)基材に埋め込むことができる。この替わりに、これらを、例えば、蒸着処理、印刷、めっき処理、はんだ付け、又は他の方法で基材(サブストレート)の上に施すことができる。この変形例は、埋め込み処理に対して、明確にコスト的に有利である。電極/測定個所は、任意の大きさを有することができる。複数の電極を(例えばチップ上に)同時に装着し、及び測定可能とするために、電極の表面を、比較的小さく形成することが有利である(例えば、表面積が約 $0.05 \sim 0.5 \text{ mm}^2$ )。ここで電極は、所望により、マイクロ電極、又は超マイクロ電極(長さ - 及び/又は幅の寸法が $\mu\text{m}$ からサブ- $\mu\text{m}$ の範囲)として形成することができる。最後に、電極/測定個所は、所望により、3次元構造(例えば、滴、レートパンプ、針金、又はプレート)を有していても良い。

#### 【0032】

本方法は、典型的には、参照電極を必要とするが、該参照電極は、測定電極と同じ基材上に存在する必要はない。(参照電極が、伝導性化合物中の検知流体(例えば、酸化還元 - 種を有する又は有しない緩衝液)を経て測定電極に対して判定すれば十分である。)参照電極は、電流が作用しない。参照電極は、それぞれの方法のために、適切な材料、例えばイリジウム/一酸化イリジウム、カロメル、 $\text{Ag}/\text{AgCl}$ でできている。本方法のために、更に、対照電極が使用され、該対照電極は、所望の電流を測定電極にもたすために、対応する等価の値に課せられる。これらの電極は、測定電極と同じ基材上に存在する必要は必ずしもない。対照電極は、代表例では、金でできているが、これに制限されるものではない。

#### 【0033】

本発明の方法の有利な点は、その形状が任意に形成された電極上での電流の読み取りを、酸化還元 - サイクリングを使用して行うことができ、その読み取りの感受性は、インターデジタル電極構造に匹敵することにある。電極の製造は、デジタル性の構造を避けることによって、明確に容易に、そして安価に行うことができる。この理由は、従来の酸化還元 - サイクリングのために使用するサブ- $\mu\text{m}$  - 電極構造のための、高価な半導体 - 及びマスクでの被覆技術、ポリマー塗布、感光、及び洗浄を省略することができるからである。更に、この電極の生成物 - 収量が上昇する。この理由は、粗悪物(くず)が、電気的な

短絡（該短絡は、従来技術のサブ -  $\mu\text{m}$  - インターデジタル構造体では、例えば、純粹空間工程(Reinraumprozess)での、誤りから起こった粒子の堆積によって発生し得る）によって発生し得ないからである。

#### 【0034】

本発明に従う方法は、好ましくは、いわゆるチップ - テクノロジーに使用される。ここで、好ましくは電極の形態の複数の測定個所が、例えば大きさが  $50 \sim 200 \text{ mm}^2$  の1つのチップの上に設けられる。各測定個所は、流体流路上で、検知流体又は比較流体、例えば純粹な緩衝液に当たる（ぶつかる）ことができる。参照電極及び対照電極は、同様にチップの上に設けることができるが、その必要があるわけではない。チップ上の全ての電極は、電位を課する（当てがう）ための電氣的伝導体と、電流の変化の読み取り（装置）と結合している。

10

#### 【0035】

電氣的試験は、別個の電位スタット（ポテンシオスタット）上で行うことができ、これは、別個のチップ（2 - チップ - 溶液）上の電氣的構造物として配置することもできる。このようなチップは、数回でも使用され、一方測定個所を有するチップは、通常、（特に、電極又はその周囲が捕獲分子で覆われている場合には）1回しか使用されず、そして廃棄される。最後に、測定個所をも有する電子機器を、チップ内に直接的に配置することも可能である。これらの全ての變形例は、従来技術から公知であり、例えば、E. Nebling et al., "Electrical Detection of Viral DNA Using Ultramicroelectrode Arrays", Anal. Chem. (2004), 76(3): 689 - 696, J. Albers et al., "Electrical biochip technology - a tool for microarrays and continuous monitoring", Anal. Bioanal. Chem. (2003), 377(3): 521 - 7又はR. Hintsche et al., "Fully electrical microarrays", Electrochemistry of Nucleic acids and Proteins, Toward Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics, 247 - 277, Herausgeber E. Palecek, F. Scheller und J. Wang, Elsevier, Amsterdam, 2005が参照される。

20

30

#### 【0036】

本発明を、実施例を使用して以下に詳細に説明する。

#### 【実施例】

#### 【0037】

##### 実施例 1

支持体材料、例えば不動態化されたシリコンの上に、複数の金の電極（直径  $0.5 \text{ mm}$ ）、対照電極（Gegenelektrode: 対極）、及びイリジウム/イリジウムオキシド - 参照電極が蒸着された。ここで、各金電極は、測定個所に対応する。電極 1 ~ 8 の上に、非特定の蛋白質（BSA）が、吸着によって結合されている。電極 9 ~ 12 の上には、酵素 - ガラクトシダーゼ（-Galaktosidase）が、吸着によって結合されている。金の電極は、マイクロポンプ、ホース、及び分配バルブを有するマイクロ流体性の流通セルを使用して、種々の流体媒体（液体媒体）で浸す（洗う）ことができる。

40

#### 【0038】

12個の金の電極は、16個の流路マルチ電位スタットを使用して、必要な電位が与えられ、そして、得られたナノ - アンペア - 範囲の電流が読み取られる。この電位スタットは、28重の複合器でできており、これは、電極を、（それぞれの電位の発生する負荷状態に従って、）短時間で、連続的に読み取るものである。各電極は、 $+200 \text{ mV} \sim -350 \text{ mV}$  の範囲で、 $1.0 \text{ヘルツ}$  で、連続的に切り替えられる。カバー (Bezug) として、イリジウム/イリジウムオキシド - 参照電極が使用される。対照電極は、差異電流 (Differenzstrom) を導き出す。媒体 p - アミノフェノールの酸化還元電位は、 $+200 \text{ mV} \sim -$

50

350 mV の範囲である。

【0039】

緩衝液 (PBS pH: 7.0) を使用した洗浄工程の後、緩衝液に溶解した酵素基材 (1.0 mg/ml in PBS pH: 7.0) が、電極を経て (電極に) 与えられた。この基材は、p - アミノフェニル - D - ガラクトピランシド (pAP - gal) であり、そして電気化学的に不活性な状態の酵素 - ガラクトシダーゼによって、電気化学的に活性な状態の酸化還元 - 媒体 p - アミノフェノールに導入される。電気化学的な測定の間、液体の流れが停止される。結果として、各金電極が、相互に独立して、酵素の存在と不存在に従って、酸化還元 - 電流を発生させるか、又は発生させない。このような電流は、酵素を有する電極で、所定の時間にわたり、連続的に増加する。この理由は、酵素が絶え間なく基材を変換し、及び従って、酸化還元 - 媒体を遊離するからである。これに従って、電極 1 ~ 8 で、所定の時間にわたって、電流が上昇しないことが期待され (比較電極)、そして電極 9 ~ 12 で、所定の時間にわたって電流の増加が期待される (測定電極)。ここで、使用される新規な電気化学的読み取りが図 3 に示されている。

【0040】

図 3 a は、12 個の金電極における、所定の時間にわたる平行した、各電極での酸化還元 - サイクリングを使用した電流測定を、(全ての電極について得られた、電流信号の測定値を相互に重ねた状態で) 示している。p - アミノフェノールの代謝 (入れ替わり: Umsatz) が、それぞれ各電極で測定されている (+200 mV、-350 mV、1.0 Hz)。溶解した基材が金電極を完全に浸した後、液体流が停止されたが (28 秒、時間  $t_{1.}$ 、矢印参照)、電流の測定は更に継続された。かけられた電位に従い、酸化電流 - ピーク (正) 又は還元電流 - ピーク (負) が得られる。主要成分は、容量性「積み替え電流」であるが、これは評価において、後に所定処理 (平均化) される。

【0041】

図 3 b は、それぞれ各電極についての酸化 - 及び還元電流からの、電流信号 - 値の合計を示している (矢印: 流体の流れの停止: 時間  $t_{1.}$ )。位置 1 ~ 8 (ポジション 1 ~ 8) は、電流信号の、最も広範囲に及ぶ水平方向 (横方向) の推移を示している。これに対して位置 9 ~ 12 (ポジション 9 ~ 12) は、液体流の停止 (矢印) の後、時間に対して電流が上昇していることを示している。電極 1 ~ 8 では酵素が欠けているので、活性の酸化還元 - 媒体が形成されず、その結果、酸化還元 - 電流が形成されない。電極 9 ~ 12 では、酵素が活性の酸化還元 - 媒体を形成し、そしてこれにより電流が、その電位において、時間に対して連続的に上昇する。電極 1 ~ 8 は、異なる、高い、殆ど一定の電流を示している。これは、容量性「積み替え電流 (Umladestrom)」であり、これは、それぞれの「積み替え」の後、ミリ秒の範囲で、速やかに減衰 (衰弱) し、その位置ごとの絶対高さは、それぞれの測定経過において、殆ど同一である。電極から電極についてのこれらの「積み替え電流」の異なった高さは、電極の電位が同時に切り替えられ、しかし複合器による読み取りが時間的に容易にずらされることによる。電極において、スイッチの切り替えの直後に測定される (1、2) は、この「積み替え電流」がなお高い。この理由は、その緩和 (Relaxation) がまだ完了していないからである。

【0042】

図 3 c は、各測定個所の、時間に対する電流値の変化 (電流上昇) を示している (棒グラフ)。「負」の電極 1 ~ 8 の、水平方向に推移する電流は、ここで、その高さ (図 3 b) とは無関係に殆ど変化していない。これに対して、「正」の位置 9 ~ 12 は、時間に対して明らかに上昇している。これは、明確に、酵素の存在を示している。位置 9 ~ 12 の電流上昇の平均値は、約 209 nA/min である。

【0043】

インターデジタル電極上の酸化還元 - サイクリングは、比較し得る試験配列で、約 300 nA/min の電流上昇であった。+200 mV で、媒体の酸化のみを測定した場合、電流上昇は約 20 nA/min であった。

【0044】

従って、上述した発明は、酸化還元 - 媒体を、インターデジタル電極を使用せずに、高い感受性で電氣的に読み取るのに適切であり、そしてこのような電極で、酸化のみで行うよりも明らかに感受性があり、一方、読み取りの感受性は、インターデジタル電極を使用した場合に匹敵する。

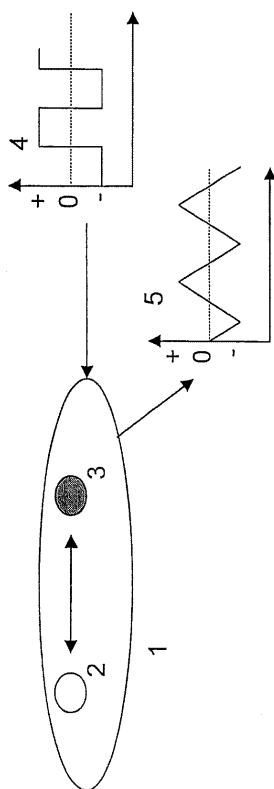
【 0 0 4 5 】

#### 実施例 2

生物学的な試験を行うために、金電極を、最初に適切な捕獲分子 (Fangermolekul) で、吸着的に覆った。特定の、上記捕獲分子に結合した目的分子を、酵素でマークした (例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ)。導入された基材が、これらの酵素によって、活性な酸化還元 - 媒体に変換された。これは、電極特定の、上述した方法で、良好な感受性で測定

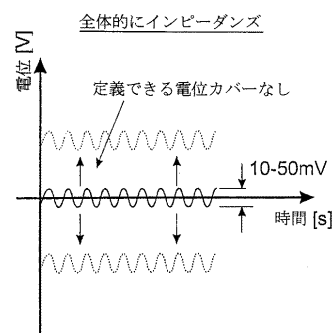
10

【 図 1 】

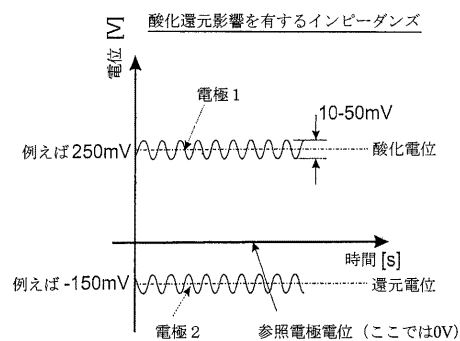


1. 電極で構成された測定箇所
2. 酸化された、酸化還元媒体
3. 還元された、酸化還元媒体
4. 電極に与えられた、低周波交流電圧
5. 発生した、酸化還元電流の時間に対する読取

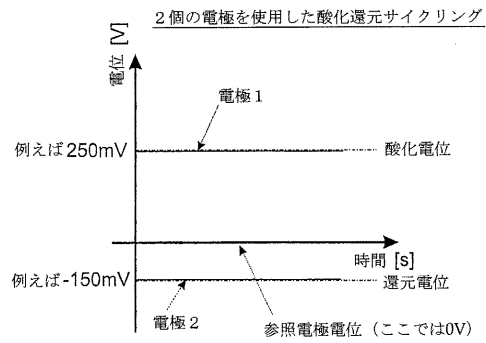
【 図 2 a 】



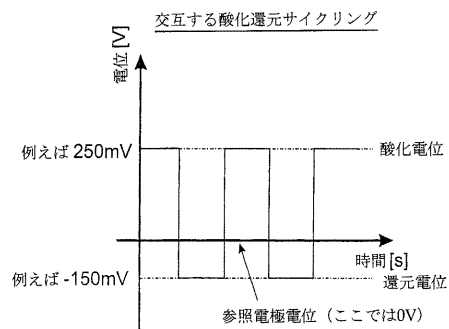
【 図 2 b 】



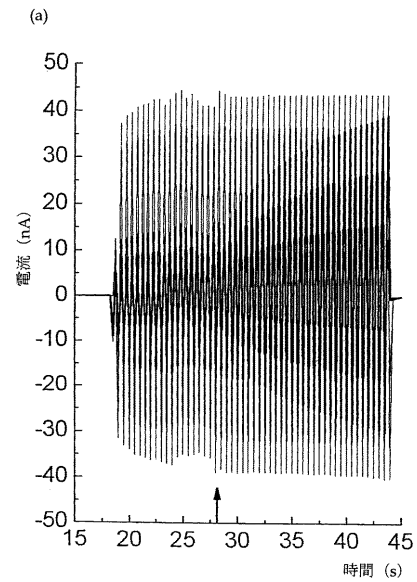
【図 2 c】



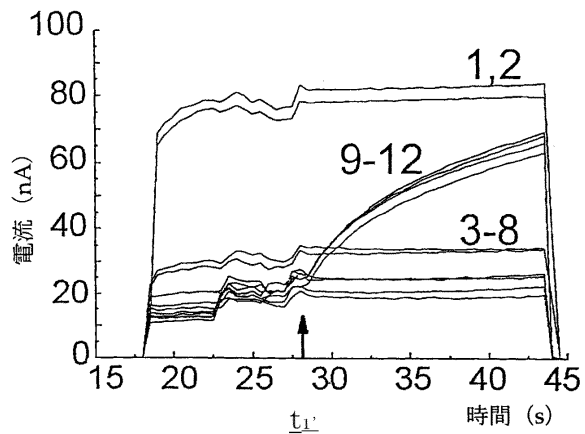
【図 2 d】



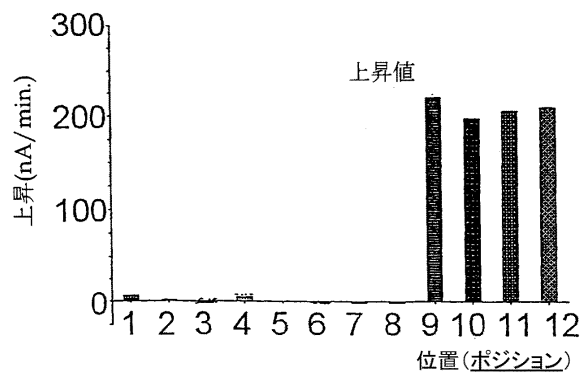
【図 3 a】



【図 3 b】



【図 3 c】



---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/34</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	27/30 3 5 3 P
			G 0 1 N	27/30 3 5 3 R
			G 0 1 N	27/48 3 1 1
			C 1 2 M	1/34 E
			C 1 2 Q	1/34

審査官 大竹 秀紀

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

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 G 0 1 N 2 7 / 4 1 6