

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4832759号
(P4832759)

(45) 発行日 平成23年12月7日(2011.12.7)

(24) 登録日 平成23年9月30日(2011.9.30)

(51) Int.Cl.

F 1

GO1N 27/414	(2006.01)	GO1N 27/30	301K
C12Q 1/68	(2006.01)	GO1N 27/30	301R
GO1N 27/416	(2006.01)	GO1N 27/30	301Y
GO1N 33/53	(2006.01)	C12Q 1/68	A
GO1N 33/566	(2006.01)	GO1N 27/46	386

請求項の数 19 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-561552 (P2004-561552)
(86) (22) 出願日	平成15年7月4日(2003.7.4)
(65) 公表番号	特表2006-510025 (P2006-510025A)
(43) 公表日	平成18年3月23日(2006.3.23)
(86) 國際出願番号	PCT/FR2003/002091
(87) 國際公開番号	W02004/057027
(87) 國際公開日	平成16年7月8日(2004.7.8)
審査請求日	平成18年6月12日(2006.6.12)
(31) 優先権主張番号	PCT/FR02/04283
(32) 優先日	平成14年12月11日(2002.12.11)
(33) 優先権主張國	フランス (FR)

前置審査

(73) 特許権者	502205846 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ ルシュ シアンティフィク フランス国 エフー 75016 パリ リ ュ ミシェル-アンジュ 3
(74) 代理人	100065248 弁理士 野河 信太郎
(72) 発明者	ボッケルマン, ウルリッヂ フランス、エフー 75020 パリ、リュ デ カスケード、33
(72) 発明者	ポウザス, フランソワ フランス、エフー 75013 パリ、リュ デ ゴベリンス、18

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】プローブ分子と標的生体分子との間の少なくとも1つの特異的相互作用を電子的に検出する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

センサの少なくとも1つの反応性ゾーンに固定されたプローブ分子と標的生体分子との間の少なくとも1つの特異的相互作用を電気的に検出する方法であつて、

前記センサが電界効果形トランジスタ(T_1 、 T_2 など)のアレイからなり、そのそれぞれがソース領域(S)と、ドレイン領域(D)と、前記特異的相互作用が検出される反応性ゾーンを構成するゲート領域とを有し、前記特異的相互作用は、全ての反応性ゾーンを覆う測定溶液の電位を、該測定溶液に浸された電極 E を用いて設定することにより反応性ゾーン上で検出され、かつ次の：

a) 少なくとも1つの反応性ゾーン(3)を、該反応性ゾーンに固定される所定のタイプのプローブ分子と接触させる工程、

b) 少なくともいくつかの前記プローブ分子を、該プローブ分子と相互作用可能な標的生体分子と接触させ、そして第1の塩濃度を有する反応溶液中で前記特異的相互作用を行う工程、

c) 該アレイの少なくとも1つのトランジスタのドレイン電流/ソース-ゲート電圧/ソース-ドレイン電圧特性の少なくとも1点を測定して、少なくとも、前記特異的相互作用に付されていたプローブ分子についての第1の塩濃度より低い第2の塩濃度を有する測定溶液中で得られる測定点について、前記特異的相互作用を検出する工程であつて、該測定が、該測定点と測定溶液中の特異的相互作用に付されていないプローブ分子についての参照点との間の差分によるか、または2つの異なる相互作用に付されたプローブ分子につ

10

20

いて該測定溶液中で得られる 2 つの測定点の間の差分によって行われる工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記特異的相互作用に付されたプローブ分子のタイプが D N A または R N A であり、前記参照点が、前記特異的相互作用に付されたものと同じタイプであり、かつ同じ配列または異なる配列を有するプローブ分子から測定されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 c) の差分測定が、別個の反応性ゾーン (3) に固定されたプローブ分子の 2 つの群について行なわれ、一方の群のプローブ生体分子は工程 b) の相互作用に付されるが、他方は付されないことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記 2 つの異なる相互作用に付されるプローブ分子のタイプが、それらが同一配列を有しても有さなくても、 D N A または R N A のいずれかで同じであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 c) の差分測定が、別個の反応性ゾーン (3) に固定されたプローブ分子の 2 つの群について行なわれ、一方の群のプローブ分子は前記特異的相互作用に付され、他方の群のプローブ分子は別の特異的相互作用に付されていたことを特徴とする請求項 4 に記載の方法。 20

【請求項 6】

工程 c) の差分測定が、同じプローブ分子に対して、それらが工程 b) の間の相互作用に付される前と後とに行われることを特徴とする請求項 1 および 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 7】

前記特性の少なくとも 1 点の測定が、少なくとも 1 つのトランジスタのドレインとソースとの間の所定の電圧 (U_{DS}) の印加、ならびに該トランジスタのゲートとソースとの間の所定の電圧 (U_{GS}) の印加を用いることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 8】

前記特性の少なくとも 1 点の測定が、少なくとも 1 つのトランジスタのドレインとソースとの間の所定の電圧 (U_{DS}) の印加、ならびに該トランジスタへの所定の電流 (I_D) の印加を用いることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。 30

【請求項 9】

前記の点が、ドレイン電流 I_D の測定により得られることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記の点が、ゲートとソースとの間の電圧 U_{GS} の測定により得られることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

測定溶液が K C 1 溶液であることを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の方法。 40

【請求項 12】

反応溶液の濃度が、 2 0 m M ~ 1 M の間であることを特徴とする請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 13】

測定溶液の濃度が、 0 . 0 0 2 m M より高く 2 0 m M 未満であることを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

測定溶液の濃度が、少なくとも 0 . 0 1 m M に等しく、かつ高くても 1 5 m M に等しい 50

ことを特徴とする請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

反応溶液と測定溶液との間の移行が、リノス工程により分けられることを特徴とする請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 1 6】

プローブ分子が、標的生体分子により認識され得る生体分子であり、プローブ分子および / または標的生体分子が、DNA 分子、RNA 分子またはタンパク質分子、あるいはビタミンであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

プローブ生体分子が DNA 分子であり、かつ電界効果形トランジスタが負のゲートバイアスを有するデプレッション n - チャネルタイプのものであることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。 10

【請求項 1 8】

工程 a) の前に、前記測定溶液を用いる少なくとも 1 つのコントロール測定工程を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 1 9】

参照を構成するかまたは標的分子を含有する少なくとも 1 つの溶液を少なくとも 1 つの前記電界効果形トランジスタと接触させるように、少なくとも 1 つのマイクロ流体チャネルを通して該溶液を循環することを含むことを特徴とする請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、分子と標的生体分子との間の少なくとも 1 つの相互作用を電子的に検出する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

電界効果形トランジスタを用いて DNA 配列のハイブリダイゼーションを検出するための方法は、E. SOUTEYRAND らにより "Direct Detection of the hybridization of synthetic Homo-Oligomer DNA Sequences by Field Effect" の題名で、J. Phys. Chem. B1997、1 01、第 2980 ~ 2985 頁に 1997 年に出版された論文に記載されるように、既に知られている。このタイプの使用に用いられる ISFET (イオン感受性電界効果形トランジスタ) タイプのトランジスタは、IEEE Transactions on Biomedical Engineering 第 BME-19 巻 - 第 5 号、September 1972、第 342 ~ 351 頁に出版されている Piet BERGVELD による "Development, Operation and Application of the ISFET as a Tool for Electrophysiology" の論文に記載されている。 30

【0 0 0 3】

このようなトランジスタ構造の製作の記載は、"Extracellular Resistance in Cell Adhesion Measured with a Transistor Probe" の題名で、Langmuir 2000、16、第 3517 ~ 3521 頁に出版されている、V. KIESSLING らによる論文に見出すことができる。最後に、サーフェスプレバレーション法は、"Silanized nucleic acids: a general platform for DNA immobilization" の題名で、Nucleic Acid Research 2000、第 28 巻、第 i ~ vi 頁に出版されている、A. KUMAR らの論文に記載されている。 40

【0 0 0 4】

本発明の関係において、表面に分子プローブを固定するための 2 つの方法を特に用いることができる。第一は、例えば "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis" の題名で、Science 251、第 767 ~ 773 頁 (1991) に出版されている、S.P. A. Fodor らによる論文に記載されているように、固相上への直接の合成からなる。第二は、希釈液を用いる分子の固定である。

【0 0 0 5】

50

20

30

40

50

生体分子間の相互作用の正確な検出を得るために、特定の数のパラメータを考慮に入れることが望ましい。

A-感度

感度は非常に良好(蛍光による検出と同等)であり得るが、反応性表面上の分子層の状態に依存する。本発明で用いられるトランジスタタイプのセンサについて、生体分子(プローブおよび標的)の必要量は、センサの表面積に反比例する。よって、構造を小型化するのが有利であるが、シグナル／ノイズ比に注意しなければならない。

【0006】

B-動力学

測定され得る分子の種々の濃度の範囲は狭い。低濃度において、寄生シグナル(parasitic signal)により限定されることができる(例えば、時々、表面上で乾燥した純水の滴により誘導されるシグナルを見ることが可能である)。高濃度において、有効電荷がゼロに近づくときに飽和が観察される。

【0007】

C-特異性

「特異性」の用語は、2つのタイプの異なる標的分子間を区別するシステムの能力を意味することを意図する。例えばDNA分子間のハイブリダイゼーションについて、この差は塩基対の配列の差であり得る。これは、特異的相互作用(例えば相補的配列間のハイブリダイゼーション)が、非特異的プロセス(例えば吸着、非特異的、イオン的または疎水的相互作用)に対して優位になるように分子間認識反応の条件(塩、温度、期間および任意にpH)を最適化することの問題である。これらの最適化された条件は、一般的に、電子的検出についての最良の条件に対応しない。例えば、電子的検出より多くの塩が特異的ハイブリダイゼーションについて一般に用いられる。また、表面に関するプローブ分子の距離は、妥協しなければならない。静電的スクリーニングのために、電子的検出には短い距離が好ましいが、これは特異性には好ましくない。プローブ分子がSiO₂表面に近すぎると、非特異的分子／表面の相互作用が優位になることができる。加えて、プローブと標的生体分子との間の特異的相互作用は、近傍にある表面により妨げられ得る(立体妨害の近づき安さの問題)。

【0008】

これらの効果は、トランジスタアレイの反応性表面上に堆積された分子層(および特にそれらの電荷状態)に依存する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

以下の本明細書の記載において、所望の結果を達成することを可能にする実験的なアプローチが提案される。このアプローチは、本発明の基本的なアイデアを構成する検出のキーポイントを示すことを可能にしたが、つまりそれは検出工程から認識反応(recognition reaction)を分離することが望ましいということである。

【0010】

よって、本発明は、センサの少なくとも1つの反応性ゾーンに固定されたプローブ分子と標的生体分子との間の少なくとも1つの特異的相互作用を電子的に検出する方法に関し、該方法は、該センサが、そのそれぞれがソース領域(5)とドレイン領域(D)とその上で該特異的相互作用が検出される反応性ゾーン(3)を構成するゲート領域とを有する電界効果形トランジスタ(T₁、T₂など)のアレイからなることを特徴とし、かつ次の：

- a) 少なくとも1つの反応性ゾーン(3)を、該反応性ゾーンに固定された所定のタイプのプローブ分子と接触させる工程、
- b) 少なくともいくつかのプローブ分子を、該プローブ分子と相互作用可能な標的生体分子と接触させ、そして第1塩濃度を有する反応緩衝液中で該相互作用を行う工程、
- c) 該アレイの少なくとも1つのトランジスタのドレイン電流／ソース - ゲート電圧／ソース - ドレイン電圧特性の少なくとも1点を測定して、少なくとも、該特異的相互作用に付

10

20

30

40

50

されていたプローブ分子についての第1の塩濃度より低い第2の塩濃度を有する測定緩衝液中で得られる測定点について、該特異的結合を検出する工程を含むことを特徴とする。工程c)は、該測定点と、特に該測定緩衝液中で、該特異的相互作用に付されていない同じタイプのプローブ分子について参照点との間の差分によって(differentiably)行うことができる。

【0011】

一般に、プローブ分子は、該反応性表面上にグラフトされることができ、かつ標的生体分子により特異的に認識されることができるいずれの分子、特に生体分子(DNA、RNA、タンパク質など)または化学合成されたオリゴヌクレオチドDNAまたはペプチド核酸(PNA)であると考えられる。

10

【0012】

「時間的な(temporal)」変形によると、工程c)の差分測定(differential measurement)は、工程b)の相互作用の前に同じプローブ分子について行なわれる。

第1の「空間的な(spatial)」変形によると、工程c)の差分測定は、例えば(DNA)、同じ配列を有するかまたは有さず、別個の反応性ゾーンに固定された同じタイプのプローブ分子の2つの群の間で行われ、これらの群の一方は工程b)の相互作用に付され、他方は付されない。

【0013】

第2の「空間的な」変形によると、工程c)の差分測定は、別個の反応性ゾーン(3)に配置されたプローブ分子の2つの群について測定緩衝液を用いて行なわれ、例えば同じタイプであるが同じ配列を有しても有さなくてもよいプローブ分子のこれらの2つの群は、異なる特異的相互作用に付されている。

20

【0014】

プローブ分子および/または標的生体分子は、例えばDNA、RNA、PNAまたはタンパク質分子、あるいはビタミンのような小分子である。反応緩衝液および測定緩衝液は、例えばKClである。測定緩衝液の塩濃度は、例えば0.002 mMより高く20 mM未満であり、例えば0.005 mMより高く20 mM未満であり、特に0.005 mM~15 mMの間であり、そうでなければ0.01 mM~15 mMの間である。反応緩衝液の濃度は、例えば20 mM~1 M(モル濃度)の間である。

【0015】

本発明による方法は、蛍光による分子の相互作用の従来の検出に悪影響を及ぼさない。

30

【0016】

該方法は、上記の特性の少なくとも1点の測定が、少なくとも1つのトランジスタのドレンとソースとの間の所定の電圧(U_{DS})の印加、ならびに第一の場合に該トランジスタのゲートとソースとの間の所定の電圧(U_{GS})の印加、または第二の場合に該トランジスタへの所定のドレン電流(I_D)の印加を用いることを特徴とすることができる。第一の場合において、特性の点の測定はドレン電流 I_D の測定からなる。第二の場合においては電圧 U_{GS} が測定される。

【0017】

ある変形によると、参照を構成するかまたは標的分子を含有する少なくとも1つの溶液は、該溶液を電界効果形トランジスタの少なくとも1つの反応性ゾーンと接触させるように、少なくとも1つのマイクロ流体チャネルを通して循環する。

40

【0018】

例えば、参照溶液(例えば塩緩衝液)と標的分子を含有する溶液とを、1つ以上の反応性ゾーンまたは(平行して)1つ以上の異なる反応性ゾーンと連続的に接触させることができる。標的分子の2つの溶液を、例えば平行して1つ以上の異なる反応性ゾーンと接触させることができる。

【0019】

本発明のその他の特徴および利点は：

- 図1は、トランジスタの1次元または2次元のアレイにより組織化されたトランジスタの複数を含む検出チップの2つの電界効果形トランジスタを表し；

50

- 図2は、上から見た、検出チップ、およびそれぞれ電界効果形トランジスタに対応する反応性ゾーンの配置の詳細を表し；

【0020】

- 図3は、1次元または2次元のアレイの伝送のための電気的ドレイン接続を示し、
- 図4は、選択された反応性ゾーンに溶液を堆積させるための装置を表し；
- 図5a～5cは、種々の実験条件下で行った実験の結果を表し；
- 図6aおよび6bは、DNAの電子検出を表し；
- 図7aおよび7bは、マイクロ流体チャネルの使用を図解し；
- 図8a～8hおよび9a～9dは、本発明の使用の2つの例を表す

である添付の図とともに、以下の本明細書の記載を読めばより明確になるであろう。

10

【0021】

図1～3は、シリコン基板上に電界効果形トランジスタFETのアレイを有するセンサを図解する。図1に断面図として表されるトランジスタ T_1 または T_2 は、それぞれが電気的に接触し、かつそれぞれ絶縁層1および2、例えば SiO_2 熱酸化物が搭載されたソース領域Sおよびドレイン領域Dを備える。ソースSおよびドレインDの間の反応性領域3は、トランジスタのゲート領域Gを形成し、そして薄い絶縁層4、例えば熱 SiO_2 の層を有する。この反応性領域上に酸化物を有さないことも可能である。次いで、反応性表面は、絶縁材料が取り除かれた基板の4'部分により区画される。

【0022】

プローブ分子、例えば一本鎖DNA分子を、反応性表面4または4'の少なくとも一部に、周知の方法により固定する。DNAについては、デプレッションn-チャネル電界効果形トランジスタ(これに対する電荷担体は、より可動である電子であり、よって感度が増大)を、負のゲートバイアスとともに(すなわち、電解質は半導体に関して負にバイアスされている)用いることが好ましく、該DNAは負に帯電されている(中性pHの電解質について)。

20

【0023】

ソースSおよびドレインDの間のソース - ドレイン電圧 U_{SD} (T_1 について U_{SD1} 、および T_2 について U_{SD2})、ならびに電解質6およびソースSの間のゲート - ソース電圧 U_{GS} (例えば単独のAg/AgCl電極Eによる)の印加は、Si/SiO₂界面、または各トランジスタのSi/電解質界面における電荷担体の2次元ガスを誘導する。ドレイン電流 I_D はそれに起因し、該電流は各トランジスタについて、SiO₂/電解質またはSi/電解質界面における電荷に実質的に依存する。ソースSおよびドレインDの間のチャネルに面するこの界面を、反応性表面という。

30

【0024】

電流 I_D は、反応性表面4または4'へのプローブ分子、例えばDNA分子の固定に依存する。

【0025】

一定のソース - ゲート電圧 U_{GS} および一定のソース - ドレイン電圧 U_{SD} で、ドレイン電流 I_{SD} を測定することによるか、または以下の実施例1および2のように、一定のドレイン電流 I_{SD} および一定のソース - ドレイン電圧 U_{SD} で、ソース - ゲート電圧 U_{SG} を測定することにより検出を行うことができる。

【0026】

図2および3に示すように、電界効果形トランジスタタイプのn個の構造は、絶縁体(SiO₂またはその他)で被覆され、かつソース10およびドレイン(D_1, \dots, D_n)の電気的接続による適切な接続(金属化、または好ましくはドープされた導電性領域)が提供されたシリコン基板中に集積される。標準のMOSトランジスタ構造とは異なり、金属ゲート電極は存在しない。これは、"ISFET" (Ion Sensitive Field Effect Transistor、イオン感受性電界効果形トランジスタ)タイプの構造に一致する。より高い感度を与えるSOI (silicon-on-insulator、シリコンオンインシュレーター)タイプの基板が好ましく用いられる。

40

【0027】

種々の構造が互いに水平方向に近接しており、そしてそれらの反応性表面は、同じ測定溶液に接触する。現行のマイクロエレクトロニクスの典型的な水平方向の寸法は、1 μm未満である。本発明において用いられるようなDNAチップ技術においては、水平方向の寸法

50

は、固相上への直接合成については5~10 μmであり、希釈液を用いる分子の固定の場合は50~100 μmである。

【0028】

本発明の並列の測定配置においては、固定化されたプローブ分子の種々のタイプのいくつかのプロットが同じ溶液、特に測定溶液に接触し、そして少なくとも1つのトランジスタ構造が各プロットより下に位置する。プロット当たりいくつかのトランジスタの使用は、上記の寸法の観点から可能であり、そして検出における重複(redundancy)を可能にする。

【0029】

電極E(例えばAg/AgCl)を用いて、それが被覆するシリコン構造に関する測定溶液6(電解質)の電位を設定し、そしてセンサ(トランジスタ)の動作点を設定する。ある場合においては、電解質6の電位は0に等しいことが可能である。センサを浸す測定溶液6は、充分な導電率を与え、かつ反応性表面の広いすぎる遮へいを起こさない濃度のイオンを含む。これは、中性pHを有するのが好ましい。

【0030】

提案される技術は、種々のアプローチを用いる検出を促進するのを可能にする。

A-電子測定による層の特性決定

電子測定は、トランジスタ上に堆積された分子層の(静電的)状態の概略的な特性決定を許容する。電子測定は、種々のサーフェスプレバレーション工程の間に行われる。それぞれの化学処理工程または分子堆積工程は、測定される電圧にシフトを誘導し、トランジスタ間の差は、いずれの可能な非均質性を反映する。次いで、これらの全てのシフトは、多数の堆積された層を有するシステムの特性決定を提供する。

【0031】

言い換えると、センサのアレイの「電気化学的」状態を証明することができる。予め最適化された条件について測定される参照値と比較することができ、構造のエージングがモニターできる(例えば、電荷堆積(charge deposits)およびSiO₂酸化物へのその他の効果によるアレイの分解)。さらに、短時間(および任意に中間のリソス)により分けられた2つの電子測定の比較は、電子シグナルにおけるいずれの実質的なドリフトが存在しないことを証明することを可能にする。これらの点は、FET電界効果形トランジスタの、反応性表面上の分子の固定化への応答が、反応性表面上の全ての層に依存するので、重要である。この過程は、適切な感度(検出が望まれる分子の量に適切である)および充分な特異性を再現可能に得る助けとなる。

【0032】

一旦センサアレイが既知になれば、測定はさらなる検証を行わずに繰り返すことができる。

【0033】

B-検出工程からの認識反応の分離

プローブの堆積、認識反応および電子測定は、種々の緩衝液中で行うことができる。このことは、これらの工程を大幅に独立して最適化することを可能にする。0.01 mMの塩濃度での電子検出に連結された50 mMの塩濃度でハイブリダイゼーションの例を、特に以下に示す。

【0034】

C-差分測定

本出願が優先権を主張する出願PCT/FR02/04283号の主題である差分測定は、本発明において非常に重要な要素である。これは、電子測定による層の特性決定と比べて、非均質性を検出することを可能にする。検出工程からの認識反応の分離に関して、これは必須であるようにさえ見える。なぜなら、緩衝液中の変化により誘導される電圧U_{GS}の値のシフトが、検出が望まれる特異的相互作用に対応するシグナルより大きい変動を示すからである。

【0035】

10

20

30

40

50

D- 反応性構造

FET電界効果形構造の使用は、ほぼ1ミクロン程度の特徴的なサイズを許容する。電流ACの測定を変えることによるアプローチは、Fritzら(Proceedings Nat. Acad. Sci., USA, Vol. 99, p. 14142 (2002))により用いられる。ドレインもソースも有さないSiO₂/Si受動構造(passive structure)の代わりのアプローチ(「インピーダンス分光」という)は、接続による寄生容量(parasitic capacity)のために約50ミクロン×50ミクロンの表面積を必要とする(Wiegandら、Review of Scientific Instruments No. 71, 2309 (2000)を参照)。この困難は、センサの近傍で、実際のチップ内の代わりのシグナルの処理によりバイパスすることができる。

【0036】

10

この場合でさえも、測定電子工学は、FET電界効果形トランジスタに基づく直接電流DC測定について、本発明の関係で用いられるものよりもより複雑であろう。よって、反応性構造(FET)は、小型化により適する。2ミクロン×20ミクロンの反応性表面積を用いることにより、FETトランジスタのノイズを制限しない。

【0037】

分子認識(molecular recognitions)を検出するための方法は、比較、特に差分比較によるアプローチに基づく。測定は、例えば並列のいくつかのトランジスタ構造を用いて行われる。測定は、グラフトされた分子の種々のタイプに関して差分的であって(differentiation)よく、そして分子のタイプ当たりいくつかのトランジスタを任意に含むことができる。これは、分子認識(および/またはこの反応中の進展)を明らかにする相互作用反応の前/後のシグナルを比較することを可能にする。参考測定は第2濃度を有する測定緩衝液中で行うことができるが、例えば第1塩濃度を有する上記反応緩衝液中のように別の緩衝液中でも行うことができる記載される。

20

【0038】

本発明の方法は、pHおよびイオン強度に対する個別のセンサの感度に関連する問題点、および1つの個別のトランジスタからその他へのばらつきに関する問題点(これは、トランジスタ構造およびプローブの固定の質を含む)を回避することを可能にする。

【0039】

ある実施形態による本方法は、次の工程：

- a) プローブ分子の固定を準備するための絶縁表面全体の均質な処理；
- b) 個別の反応性表面の少なくとも一部への種々のタイプのプローブ分子の局所グラフト化；
- c) 任意の均質なリンス；
- d) 電子測定：測定電解質を添加し、電極を浸し、そしてトランジスタを測定し(例えばU_SおよびU_{SG}の関数としての特性I_Dの1以上の点)、得られた結果をトランジスタにより比較する；
- e) 任意の均質なリンス；
- f) 電解質の存在下での標的分子の溶液の添加、および認識反応；
- g) 任意の均質なリンス；
- h) (d)のような電子測定

30

を用いる。

【0040】

40

プローブ分子と接触していないいくつかのトランジスタ(または、でなければ単独のトランジスタ)は、コントロールとして働くことができる。これらの特性は、例えば全てのトランジスタを浸す測定電解質の添加の後に測定する。

【0041】

プローブ分子のグラフト化は、直径約100 μmの微小液滴を、市場で入手可能な金属のマイクロピンを用いてトランジスタの反応性表面上に堆積させることにより行われるか、または市販のマイクロ堆積システム(例えばGe Sim社からのナノプロッターNP1)により行なわれる。

50

【0042】

図3に示すように、n個のトランジスタのアレイ(例えばn = 96トランジスタ)は、n個のドレイン接続 D_1 、 D_2 ・・・ D_n 、および共通のソースに等しい2の接続(図示せず)を有する。これらの接続と関連する直列抵抗 R_c は、ドレインのインデックス 1・・・nに依存する値を有する。

例えばシリコンのドーピングにより製造されるこれらの抵抗 R_c の値は無視できないが、それらは補正できる。

【0043】

この趣意において、ドレイン接続抵抗 R_c は、例えばドープされたラインの幾何学的結合および断面積から算出され、その抵抗率は既知である。算出値は、DC電圧(例えば $U_{SD} = 0.1V$ および $U_{SG} = 2V$)を印加することによるドレインインデックスの関数としての抵抗の測定値と比較する。10

【0044】

図4に表されるような装置は、本方法を実行するのに用いることができる：プラットホーム12がテーブル10の上に設置され、該プラットホームには、3つの直交方向X、YおよびZへの移動を提供するテーブル11についてマイクロコントローラを含むコントロール装置が組み込まれている。n個のトランジスタのアレイを組み込んだチップ15は、支持体14上に設置される。3方向X、YおよびZへの移動を提供するテーブル21を含むもう1つのプラットホーム20は、n個のトランジスタの少なくとも一部に微小液滴を堆積するためのマイクロピンまたはピペット23を保持するアーム22を移動するのに用いられる。スクリーン19に連結されたカメラおよび/または対物レンズ17は、微小液滴の堆積を観察し、操作を制御するのを可能にする。20

【0045】

ドレイン電流 I_D 測定は、例えば $U_{SG} = 1V$ および $U_{SD} = 0.9V$ 、ならびにリットル当たり0.1ミリモルの濃度のKClからなる中性pHの堆積された電解質を用いて行われる。トランジスタ(p-チャネル蓄積トランジスタ)が相互に連絡されたそれらのソースを有するので、ソース電圧またはゲート電圧は、電圧標準(例えば質量電圧(mass voltage))となり得る。

【0046】

これらの測定の前に、スルホクロム酸中の1~2分のインキュベーションおよび脱イオン水の流れの下でのリンス、次いでNaOH溶液(16N NaOH 60 μ l、エタノール420 μ l、および水220 μ l)中の3~5分のインキュベーション、そして最後に脱イオン水の流れの下でのリンスにより、Si/SiO₂構造の表面の全体にわたる処理を行う。30

【0047】

局所堆積の前、しかし水でのリンスの前および後に行われる2つの測定の間の差は、図5a中に小さい四角形として示される。十字形は、2つの異なる溶液の局所堆積の後に行われた測定と、堆積前に行われた測定(測定は、水でのリンスの前に行われる)との差分を示す。

【0048】

図4に示す装置22上に載せた市販のピン23 (Telechem SMP3B)を用いて、ポリ-L-リジンの溶液をトランジスタ64~69、トランジスタ74~79およびトランジスタ87~91の上に堆積させる。40

溶液 : pH 7の0.1 × PBS緩衝液中のポリ-L-リジン(0.01% 重量/容積 "w/v" 最終濃度(P8920、Sigma))。

【0049】

局所堆積の後、サンプルを湿性雰囲気で15分間、次いで50℃で5分間乾燥させる。

ポリ-L-リジンは、イオン化されたアミン基のために測定電解質(中性pH)中で正である。ポリ-L-リジンの堆積において観察される電流の減少は、表面への正電荷の吸着に影響しない。

【0050】

堆積の前/後の測定に対応する表面電位 U_{SG} の差分を測定する。 U_{SG} を測定するため

50

20

30

40

50

に、二次元特性、例えば $I_D(U_{SG}, U_{SD})$ を測定し、96個のトランジスタの固有特性を、直列のドレインラインの抵抗 R_c の関数として測定される特性を数値的に補正することにより測定する。 SiO_2 界面の状態の修飾は、定数 U_{SD} および一定のドレイン電流 I_D におけるシフト

U_{SG} に対応する、固有特性の変化を誘導する。このシフトは、図5aに表される電流 I_D における変化と異なり、トランジスタの動作点の独立した測定を直接得ることを可能にする。 U_{SG} の値は、第一の近似において、局所堆積により誘導される SiO_2 /液体界面での変化を定量することを可能にする。変形によると、 U_{SG} を、 I_D を一定に保つように変化させる。

【0051】

図5a～5cは、ポリ-L-リジンの堆積の前および後に行われた差分測定(図5a)、KClの濃度の関数として行われた差分測定(図5b)、および堆積されたポリ-L-リジンの濃度の関数として行われた差分測定を示す。

図5aにおいて、ドレイン電流 I_D の変動 I_D は、X軸上に同定されるトランジスタ60～96のそれについてY軸上に表される($U_{SG} = 1 V$ 、 $U_{SD} = 0.9 V$ および電解質0.1 mMのKCl>)。局所堆積の前に行われたが、水でのリンスにより分けられた2つの測定の間の差分 I_D は、丸形で表される。ポリ-L-リジンの局所堆積の前および後に行われた測定に対応する差分 I_D は、星形で表される。局所堆積の後、サンプルを、50°で5分間乾燥させる前に、湿性媒質中で15分間、周囲温度において放置する。ポリ-L-リジンの希釈 C_0 は、pH 7の0.1×PBS緩衝液中に0.01%重量/容積 "W/V" 最終濃度(P8920、Sigma)である。

【0052】

図5bにおいて、ソース-ゲート電圧 U_{SG} における差分 U_{SG} は、 $U_{SD} = 1.2 V$ および $I_D = 50 \mu A$ の62 FETトランジスタのアレイのトランジスタのいくつかについて測定される。参考測定(局所堆積の前に、0.01 mMのKClの濃度で行われる)と、2連続の測定(ポリ-L-リジンの局所堆積の後に、種々の濃度のKClで行われる)との間の差分は、丸形および星形で表される。ここで、ポリ-L-リジンの局所堆積は、図5aの場合と同様に、同じ希釈 C_0 の2つの別個の領域において行われた。2連続の測定のそれについて、測定緩衝液中のKClの濃度は、範囲が0.1 mM、1 mMおよび10 mMの値を含む、0.01 mM～100 mMの間で変動させる。2連続の測定の間に、表面を水でリンスする。ポリ-L-リジンの検出の顕著な感度が、0.01 mMおよび1 mMの間のKCl濃度について観察され、これらの値を超えると、ピークの高さは徐々に減少する。

【0053】

図5cは、堆積されたポリマー(ポリ-L-リジン)の濃度、すなわち0.1×PBS 緩衝液、pH 7中の $2C_0$ 、 C_0 、 $C_0/2$ 、 $C_0/4$ 、 $C_0/8$ (C_0 は、図5aの測定で示される値を有する)の関数として、電圧 U_{SG} の変動分 U_{SG} を示す。測定条件は次のとおりである： $U_{SD} = 1 V$ 、 $I_D = 100 \mu A$ 、およびKClについて0.01 mMの濃度。これらの測定は、選択された実験的条件下で、 C_0 を超えて濃度を増加させることに利点がないことを示す。

【0054】

図6aおよび6bは、DNAの電子検出を示す。電圧 U_{SG} および電圧 U_{SG} における変動 U_{SG} は、 $U_{SD} = 1 V$ 、 $I_D = 100 \mu A$ 、および0.01 mMのKCl濃度の動作点に対応する。これらは、特性 $I_D(U_{SG}, U_{SD})$ から得られ、そしてX軸上のFETトランジスタ番号(1～96)とともにカーブに記録される。

【0055】

星形は、水酸化ナトリウムでの最初の表面処理の後の測定を表す。丸形は、全体のアレイ上でポリ-L-リジンのインキュベーションの後の測定を表す。DNAの固定を許容するために、FETトランジスタのアレイを、ポリ-L-リジン(濃度 C_0)の希釈液中に30分間インキュベーションする。次いで、いずれの予めの乾燥もなしに、水でリンスを行い、その後、空気乾燥する。インキュベーションにより、電圧 U_{SG} において $97 \pm 50 mV$ (準備された67の表面の統計的な値)の値のシフトとなり、これが電子シグナルにおけるトランジスタ間の変動を減少させる。これらのシフトは、同じ濃度で局所堆積について図5cに関して測定された値で観察されたものと矛盾しない。四角形は、トランジスタ番号30、60および90の周囲

10

20

30

40

50

でのオリゴヌクレオチド(5' Cy-5修飾された20マー、脱イオン水中に濃度50 μM)の局所堆積の後の測定を表す。上記の3つのDNAの点の微蛍光のイメージを、グレー水準で図6aの上に示す。

【 0 0 5 6 】

図6bは、Cy5修飾されたオリゴヌクレオチドの電子検出、および蛍光による検出を示す。星形で表される点は、DNAの異なる濃度(Ref. = 0 μM、5 μM、10 μM、20 μM)での4つの局所堆積の前および後に行われた2つの電子測定の間の差分 U_{SG} により得られた。これらは、トランジスタの特性において観察され、かつDNAの局所堆積による電圧 U_{SG} における変動分 U_{SG} を示す。四角は、電解質を用いて電子測定が一度行われた、乾燥されたFETトランジスタ上で測定された蛍光強度を示す。同じ電子検出が、同じタイプであるが、修飾されていないオリゴヌクレオチドから得られることが記載される。10

【 0 0 5 7 】

図7aおよび7bは、ライン(またはいくつかのライン)に沿って配置されたトランジスタTを有する集積回路を示す。基板30の2つのマイクロ流体チャネル(例えば並列のチャネル) C_1 および C_2 は、1以上の電界効果形トランジスタTを、チャネル C_1 および/または C_2 を循環する参照溶液または標的分子含有溶液に接触させることを可能にする。マイクロ流体チャネル(またはキャピラリー)を含む基板30の材料は、PDMS(ポリジメチルシロキサン)ポリマーまたはその他のポリマー、ガラス、シリコンなどであり得る。

【 0 0 5 8 】

したがって、2つのチャネル C_1 および C_2 を循環する2つの溶液を用いて、差分測定を行うことができる。同じ基板30上に、このようなマイクロ流体チャネルの多数を製造することも可能であり、該チャネルが配置される該基板は、FET電界効果形トランジスタが組み込まれる半導体基板と連結する。所定のチャネル内部で変動を測定することも可能である。この変動は、時間に関するものであり得る。キャピラリーの中に種々の溶液を注入することも可能であり、濃度のプロフィールは、注入点からかなりの距離であっても、チャネルに沿って変化しないままである。"Microfabrication inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning"の題名で、SCIENCE、第285巻、July 2、1999、第83~85頁で出版されている、Paul J.A. KENISらによる論文(特に図1A)を参照とすることができます。20

【 0 0 5 9 】

マイクロ流体工学を用いた分析技術は、Sensors and Actuators B 63 (2000)、第138~146頁で出版されている、Eric T. LAGALLYらによる論文"Monolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system"に記載されている。

【 0 0 6 0 】

プローブ生体分子と標的生体分子との間の少なくとも1つの特異的相互作用の検出は、塩濃度(例えばKCl)が反応緩衝液の塩濃度より低い測定緩衝液を用いることにより有利に行なわれる。

【 0 0 6 1 】

関係する生体分子(ソースまたは標的)は、例えばDNA、RNA、タンパク質およびビタミンであり得る。40

【 0 0 6 2 】

特異的相互作用は、例えばDNA - DNA、DNA - RNA、DNA - タンパク質、RNA - タンパク質、タンパク質 - タンパク質またはビタミン - タンパク質の相互作用であり得る。DNAは、化学合成されたオリゴヌクレオチドDNAであり得る。相互作用は、ペプチド核酸である「PNA」で行なうこともできる。

【 0 0 6 3 】

センサ(FETトランジスタ)の表面状態、プローブ生体分子の固定の質および測定の再現性を検証するために、さらなる測定工程が加えられる。

【 実施例 】

50

30

30

40

50

【 0 0 6 4 】**実施例****製品 :**

NaOH : 16N NaOH 60 μL、エタノール420 μL、水220 μL。

PLL : ポリ-L-リジン溶液、P8920 (Sigma)、0.1 × PBS 緩衝液中に0.01% w/v。

オリゴヌクレオチドARS3 : 5'CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC

オリゴヌクレオチドARS5 : 5' CAG GCG CGA GGG CTG ACG TT

オリゴヌクレオチドCy3-ARS3sense : (ARS3に相補的でCy3蛍光体を有する)

オリゴヌクレオチドCy5-ARS5sense : (ARS5に相補的でCy5蛍光体を有する)

【 0 0 6 5 】**実施例1：50 mM KCl緩衝液中のハイブリダイゼーションおよび0.01 mM KCl緩衝液を用いる測定：**

この実施例は、測定電解質液の塩濃度を、ハイブリダイゼーションの塩濃度に比べて低くすることにより、より高いシグナルを得ることが可能であることを示す。特異的ハイブリダイゼーションは、蛍光によるコントロール測定により証明される。

【 0 0 6 6 】**1. SiO₂表面の全体処理**

スルホクロム酸中での1分間のインキュベーション、次いで脱イオン水の流れでのリンス、および圧縮空気を用いる乾燥。このインキュベーション、リンス、乾燥のサイクルを1回繰り返す。

NaOH溶液中の4分間のインキュベーション。

水でリンスおよび乾燥。

【 0 0 6 7 】**2. NaOH処理後の電子測定**

測定緩衝液 : 0.01 mM濃度のKCl(図8a参照)。

この測定に続いて、水でのリンスおよび乾燥を行う。

【 0 0 6 8 】**3. 全体のポリ-L-リジン処理**

インキュベーションを2時間行う。

このインキュベーションに続いて、水でのリンスおよび乾燥を行う。

【 0 0 6 9 】**4. 電子測定「PL1」**

測定緩衝液 : 0.01 mM KCl (図8a参照)。

この測定に続いて、水でのリンスおよび乾燥を行う。

【 0 0 7 0 】**5. 電子測定「PL2」**

測定緩衝液 : 0.01 mM KCl

この測定に続いて、水でのリンスおよび乾燥を行う。

この第二の測定の目的は、この段階での測定の安定性を証明するためである。

【 0 0 7 1 】**6. DNAプローブ堆積**

オリゴヌクレオチドArs5を含有する溶液0.2 μLを、マイクロピペットを用いてFETアレイの左部分に堆積させる。オリゴヌクレオチドArs3を含有する溶液0.2 μLを、該アレイの右部分に堆積させる。この2つの場合において、希釈物は50 mM KCl緩衝液中に1マイクロモルのオリゴヌクレオチドを含有する。インキュベーションを湿性の雰囲気中で15分間、乾燥を防ぐようにして行う。

このインキュベーションに続いて、水でのリンスおよび乾燥を行う。

【 0 0 7 2 】**7. 電子測定「プローブ1」**

測定緩衝液0.01 mM KClを用いる。

10

20

30

40

50

図8bは、プローブ生体分子の堆積後に行なわれた「プローブ1」測定と、この堆積の前に行なわれたPL2測定(第5工程)との間の差分 U_{GS} を示す。

「プローブ1-PL2」カーブ(KCl濃度：0.01 mM)は、左(トランジスタ1～13にArs3の堆積)および右(トランジスタ21～31にArs5の堆積)の堆積の2つの領域について25 mVのシフトを示す。この値は、まだ飽和に近すぎないプローブ生体分子の充分な濃度があることを示す。

次いで、電解質液のポンピングを行い、該電解質液を乾燥せずに50 mM KCl 1 mlに置き換える。

【0073】

8. 電子測定「プローブ2」

10

測定緩衝液：50 mMの濃度のKCl。

図8bに示すように、堆積物はもはや見られない。

リスなし。電子測定「プローブ3」(50 mM KCl)を、安定性を証明するために行う(図8c)。

【0074】

9. ハイブリダイゼーション1 (Cy5-Ars5senseと)

「プローブ2」測定(第8工程)の間に、FETトランジスタ上にKCl 1 mlが存在した。

次いで、Cy5Ars5sense 100 μlを直接加える(リスなし)。

オリゴヌクレオチドの最終希釈は、100 nM程度である。ポンピングにより攪拌を行い、この溶液を2回、再堆積する(redeposited)。攪拌後、認識反応を暗中で5分間行う(蛍光体の脱色を防ぐように)。

20

5分後にリスを行う。電解質液のポンピングおよび50 mM KCl 1 mlの添加、攪拌、続いてさらなるポンピングなど。このサイクルを3回繰り返す。これらのリスが反応を停止する。この工程の間に表面上での乾燥はない。

【0075】

10. 電子測定「Hyb1」

電極を50 mM KCl緩衝液に浸漬し、電子測定を行う。

得られるHyb1 - プローブ3カーブを図8dに示す。

Hyb1およびプローブ3という測定の間のシフト U_{SG} は、Ars3領域で約+3.9 mV、およびArs5領域で約+2.3 mVである(ここで、プローブ生体分子と標的生体分子は相補配列を有する)。このシフトは、DNAプローブ堆積がない中央領域では約-1.6 mVである(トランジスタ14～20)。

30

この測定の後、リスを行う：電解質液のポンピングおよび0.01 mM KCl 1 mlの添加、攪拌、再ポンピングなど、5回繰り返す。この工程の間に表面上での乾燥はない。

【0076】

11. 電子測定「Hyb12」

測定電極を0.01 mM KCl緩衝液中に浸漬し、電子測定を行う。

得られるカーブ(Hyb12 - プローブ1)を、図8eに示す。シフトのサインは50 mM(「Hyb1」測定)で観察されたものに対応するが、これらのシフトのレベルはより大きい。

Ars5 (Ars3)領域において、+40 mV (+49 mV)の平均シフトが0.01 mM KClで行なわれた「Hyb12」測定と「プローブ1」測定との間で観察される。

40

【0077】

12. ハイブリダイゼーション2 (Cy3-Ars3senseと)

0.01 mM KCl電解質液をポンプで押し出し、50 mM KCl 1 mlで置き換える。次いで、1 μM Cy3Ars3sense 100 μlを直接添加する(リスなし)。

オリゴヌクレオチドの最終希釈は100 nM程度である。

攪拌をポンピングにより行い、この溶液を2回、再堆積させる。攪拌後、認識反応を5分間、暗中で行う。

この5分経過後、リスを行ない、続いて電解質液のポンピングを行い、その後50 mM KCl 1 mlを加える。攪拌とポンピングを再び行う。このサイクル(リス、攪拌、ポンピング)

50

グ)を3回繰り返す。これらのリシスが反応を停止する。この工程の間に表面上での乾燥はない。

【0078】

13. 電子測定「Hyb2」

電極を50 mM KCl緩衝液に浸漬し、電子測定を行う。これらの測定の結果を、Hyb2 - プローブ3カーブにより図8dに示す。

図8dにおいて、上記の測定Hyb1とプローブ3との間の差分 U_{SG} は、Ars3領域(左)においてArs5領域(右、プローブと標的がハイブリダイゼーション1について相補配列を有する)よりもより正(positive)であると観察される。この傾向は、Hyb2とプローブ2との間の差について逆になり、これはハイブリダイゼーション2について、プローブと標的生体分子がArs3領域で相補配列を有するという事実と一致する。
10

この測定の後に、リシスを行う：電解質のポンピングおよび0.01 mM KCl 1 mLの添加、攪拌、再ポンピングなど、5回繰り返す。

この工程の間に表面上での乾燥はない。

【0079】

14. 電子測定「Hyb22」

電極を0.01 mM KCl緩衝液に浸漬し、電子測定を行う。結果をHyb22 - プローブ1カーブにより図8fに示す。

シフトのサインは、50 mMで観察されるもの(「Hyb2」測定)に関して逆であり、シグナルはより高い。
20

Ars5 (Ars3)領域において、「Hyb22」と「Hyb12」測定の間で-11 mV (+1 mV)の平均シフトが観察される。

この測定後、水でのリシスおよび乾燥を行う。

【0080】

15. 蛍光測定

特異的ハイブリダイゼーションを、2色蛍光測定装置により証明する。

633 nmでの励起(Cy5)を用いて、Ars5領域により多くの蛍光が観察される(図8h)。

532 nmでの励起(Cy3)では、Ars3領域により多くの蛍光が観察される(図8g)。

【0081】

結論

50 mMでの測定およびArs5Senseとのハイブリダイゼーション：Ars5領域のシフトは、Ars3のシフトよりも1.6 mV負(negative)である。
30

50 mMでの測定およびArs3Senseとのハイブリダイゼーション：Ars3領域のシフトは、Ars5領域のシフトよりも5.4 mV負である。

0.01 mMでの測定およびArs5Senseとのハイブリダイゼーション：Ars5領域のシフトは、Ars3のシフトよりも9 mV負である。

0.01 mMでの測定およびArs5Senseとのハイブリダイゼーション：Ars3領域のシフトは、Ars3領域のシフトよりも 22 mV負である。

特異的ハイブリダイゼーションは、蛍光測定により証明される。

【0082】

実施例2：マイクロ堆積とのハイブリダイゼーションと20 mM/0.01 mM緩衝液交換

工程1～5は、実施例1のものと同じである。

【0083】

6. DNAプローブ堆積

市販のマイクロ堆積システム(GeSim、Rossendorf、Germany、Nano-plotter NP1)を用い、オリゴヌクレオチドArs5を含有する溶液を実質的に0.2 nL FETトランジスタアレイの左部分に堆積させる。オリゴヌクレオチドArs3を含有する溶液0.2 nLをこのアレイの右部分に堆積させる。Ars5とArs3の混合物を中央に堆積させる。全ての場合において、希釈物は1 μM (1マイクロモル)のオリゴヌクレオチドを脱イオン水の緩衝液中に含有する。プローブは、堆積後数秒間で、通常の温度と湿度で乾燥する。
50

rinsなし。

【0084】

7. 電子測定「プローブ1」

測定緩衝液：0.01 mM KCl。

図9aのプローブ1 - PL2カーブは、プローブ堆積後に行なわれる測定と、この堆積の前に行なわれるPL2測定(同じ測定緩衝液)との間の差分 U_{SG} を示す。

「プローブ1 - PL2」カーブは、オリゴヌクレオチドの堆積が、-20 ~ -25 mVの間のシフト U_{SG} を誘導したことを示す。

測定に続いて、電解質液のポンピングを行い、乾燥せずに該電解質液を20 mM KCl 1 mlで置き換える。

10

【0085】

8. 電子測定「プローブ2」

測定緩衝液：20 mM KCl。

結果は、図9aに、プローブ1 - PL2カーブ(20 mM測定緩衝液)により表される。堆積物はまだ見られるが、ピークは0.01 mM測定緩衝液を用いるよりも小さくなる。

rinsなし。

【0086】

9. 電子測定「プローブ3」および「プローブ4」

測定緩衝液：20 mM KCl。

これらの測定の目的は、安定性を証明するためである。

20

rinsなし。

【0087】

10. ハイブリダイゼーション1 (Cy3-Ars5Senseと)

「プローブ4」測定の間に、FET上にKCl 1 mlを置いた。次いで、 $1 \mu M$ Cy3Ars5Sense 10 $0 \mu l$ を直接加える(rinsなし)。オリゴヌクレオチドの最終希釈は、約100 nMである。攪拌をポンピングにより行い、この溶液を2回、再堆積させる。攪拌の後、認識反応を5分間、暗中に行う。

この5分経過後にrinsを行う。電解質液のポンピングおよび20 mM KCl 1 mlの添加、このサイクルを3回繰り返す。これらのrinsが反応を停止する。この工程中に表面上の乾燥はない。

30

【0088】

11. 電子測定「Hyb1」

電極を20 mM KCl緩衝液に浸漬し、電子測定を行う。

結果を「Hyb1 - プローブ4」カーブにより図9bに示す。

上記のHyb1およびプローブ4測定の間のシフト U_{SG} は、Ars3領域(トランジスタ71 ~ 81)で約-21 mVであり、Ars5領域(トランジスタ11 ~ 19)で約-25 mVである。ここで、Ars5領域において、プローブと標的生体分子は相補配列を有する。

この測定の後にrinsを行う。電解質のポンピングおよび0.01 mM KCl 1 mlの添加、攪拌、再ポンピングなど、5回繰り返す。

この工程の間に表面上に乾燥はない。

40

【0089】

12. 電子測定「Hyb12」

電極を0.01 mM KCl緩衝液に浸漬し、電子測定を行う。結果を図9cに示す。

シフトのサインは、20 mMの濃度を有する測定緩衝液を用いて観察されたものに対応するが、シグナルはより高い。

Ars5 (Ars3)領域において、「Hyb12」測定と「プローブ1」測定との間で-61 mV (-41 mV)の平均シフトが観察される。

この測定の後にrinsを行う。電解質液のポンピング、20 mM KCl 1 mlの添加、攪拌、再ポンピングなど、5回繰り返す。この工程の間に表面上の乾燥はない。

【0090】

50

13. 蛍光測定

特異的ハイブリダイゼーションが、2色蛍光測定装置を用いて証明される。

532 nmの励起(図9d)を用いて、Ars5領域でより多くの蛍光が観察される。これは特異的ハイブリダイゼーションを確実にする。

【0091】

結論

20 mMでの測定およびArs5Senseを用いるハイブリダイゼーション：Ars5領域のシフトは、Ars3領域のものより3.8 mV負である。

0.01 mMでの測定およびArs5Senseを用いるハイブリダイゼーション：Ars5領域のシフトは、Ars3領域のものより20.7 mV負である。

特異的ハイブリダイゼーションは、蛍光測定により証明される。

【0092】

標的分子との相互作用に付されていないか、またはまだ付されていないプローブ分子を用いて行なわれた参照測定は、標的分子との該相互作用反応が起こるところとは別個の1つ以上の反応性ゾーン上で行なうことができる。同じ集積回路の反応性ゾーンを種々の相互作用に用いることができ、これは、例えば種々の相互作用および／または種々の標的生体分子の研究に相当する異なるタイプのいくつかの測定を平行して行なうことを可能にする。よって、相互作用に付されないプローブ分子について行なわれる1つ以上の参照測定についてのいくつかの相互作用を検出することが可能である。例えば同じタイプのプローブ分子間、例えば同じ配列を有するかまたは有さないDNA、ならびに同一または異なる標的生体分子の間の種々の相互作用に付された分子について行なわれた互いの測定の間の比較により、相互作用を検出することも可能である。

【0093】

本発明の潜在的適用の2つの例を以下に示す。

1つの例は、遺伝子発現の研究である。ここでは、細胞から抽出される種々のメッセンジャーRNAの相対量に興味が集中する。異なる塩基配列を有するDNAプローブ分子が、チップの表面の異なる部位にグラフトされる。各DNAプローブは、1つのタイプのRNA分子と特異的に相互作用するように選択される(その配列により特徴付けられる)。異なるプローブの2つの領域にハイブリダイズしたRNA分子の相対数は、RNA分子の2つのタイプの相対的な存在度(およびこれを用いて、対応する2つの遺伝子の発現の相対的なレベル)を与える。多数の遺伝子が、例えば発達の研究、病理の遺伝的特徴づけ、医薬品の効能の分子的分析などについて平行して追跡できるという利点がある。

【0094】

別の例は、DNAチップ上での突然変異の検出に関する。ここでは、患者のDNAを、いくつかの既知の突然変異の存在(または不在)を平行して調査することにより分析することを意図する。このために、種々のオリゴヌクレオチド(典型的には12マー)を、チップの種々の部位にグラフトする。塩基配列およびハイブリダイゼーション条件(塩、温度など)は、突然変異(点突然変異であっても)の存在が、種々のプローブのハイブリダイゼーションの程度に測定可能な差を誘導するように最適化される。ここでは標的分子サンプルは、しばしば、患者からのゲノムDNAの少量からの「PCR」により得られる二本鎖DNAからなる。

【0095】

上記の2つの場合において、異なるプローブ(しばしば同じタイプであるが、異なる配列の分子)のいくつかの領域を有するチップ上で、多数の異なる標的生体分子を含有する複合サンプルのハイブリダイゼーションにより誘導されるシグナルにおける差分に興味が集中する。この形態は、電子的に相互作用を検出するために非常に有利である。

【0096】

「2つの異なる相互作用」および「その他の相互作用」の用語は、相互作用のこの差分が、同じ標的分子溶液と接触する異なるタイプまたは配列の2つのプローブに相当する状況を包含すると理解される。

【0097】

10

20

30

40

50

特異的相互作用の検出は、FET電界効果形トランジスタアレイの1つ以上のゲート領域について行なわれ得る。いくつかのゲート領域を用いる利点は、非均質性を示すことを可能にする。

【0098】

代わりに、アレイの単一のトランジスタの使用は、所定のタイプのプローブ生体分子および所定の相互作用について可能である。大きい寸法のトランジスタを用いる場合、非均質性の平均化された測定を直接得る。

【図面の簡単な説明】

【0099】

【図1】図1は、トランジスタの1次元または2次元のアレイにより組織化されたトランジスタの複数を含む検出チップの2つの電界効果形トランジスタを表す。

10

【図2】図2は、上から見た、検出チップ、およびそれぞれ電界効果形トランジスタに対応する反応性ゾーンの配置の詳細を表す。

【図3】図3は、1次元または2次元のアレイの伝送の電気的ドレイン接続を図解する。

【図4】図4は、選択された反応性ゾーンに溶液を堆積させるための装置を表す。

【図5a】図5aは、種々の実験条件下で行った実験の結果を表す。

【図5b】図5bは、種々の実験条件下で行った実験の結果を表す。

【図5c】図5cは、種々の実験条件下で行った実験の結果を表す。

【図6】図6aおよび6bは、DNAの電子検出を表す。

【図7】図7aおよび7bは、マイクロ流体チャネルの使用を図解する。

20

【図8a】図8aは、本発明の使用の例を表す。

【図8b】図8bは、本発明の使用の例を表す。

【図8c】図8cは、本発明の使用の例を表す。

【図8d】図8dは、本発明の使用の例を表す。

【図8e】図8eは、本発明の使用の例を表す。

【図8f】図8fは、本発明の使用の例を表す。

【図8g】図8gは、本発明の使用の例を表す。

【図8h】図8hは、本発明の使用の例を表す。

【図9a】図9aは、本発明の使用の例を表す。

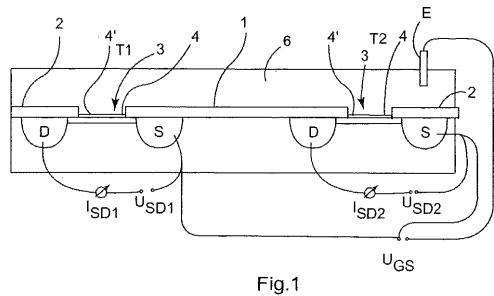
【図9b】図9bは、本発明の使用の例を表す。

【図9c】図9cは、本発明の使用の例を表す。

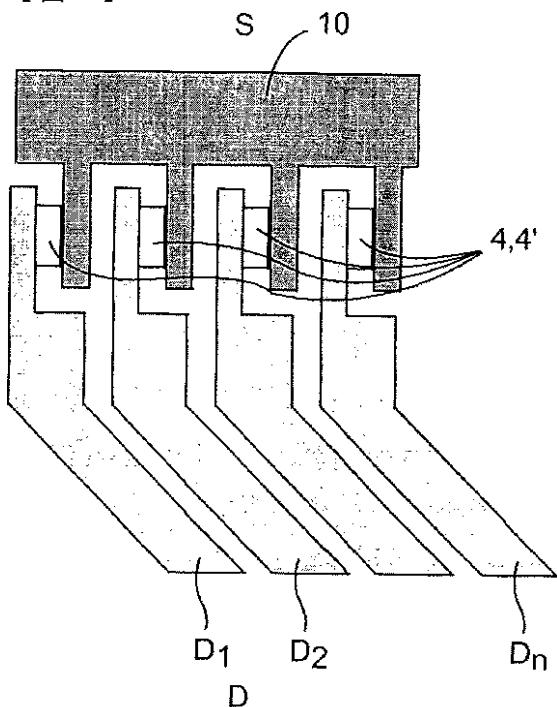
【図9d】図9dは、本発明の使用の例を表す。

30

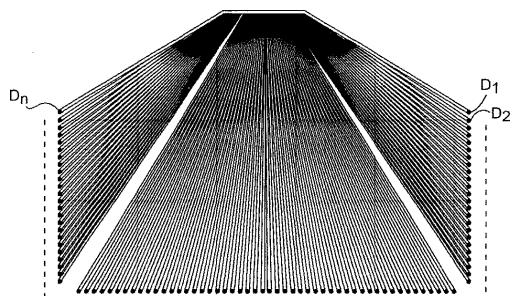
【図1】



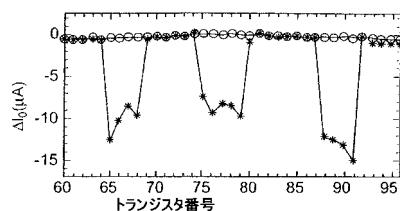
【図2】



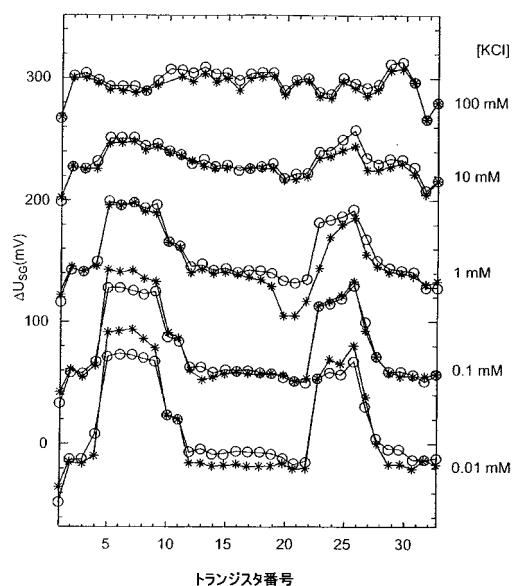
【図3】



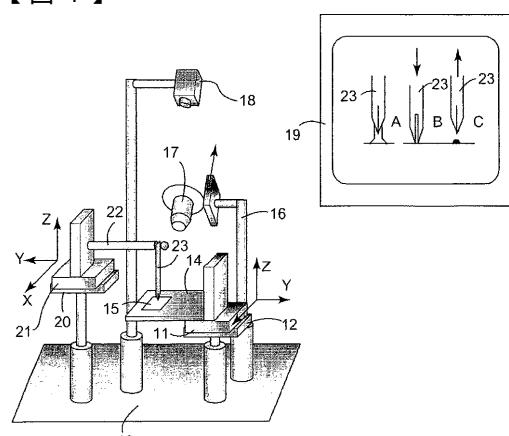
【図5 a】



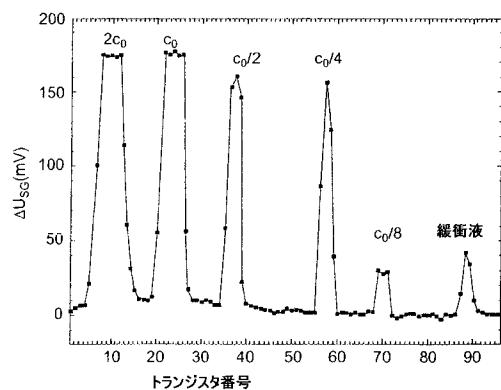
【図5 b】



【図4】



【図 5 c】



【図 6】

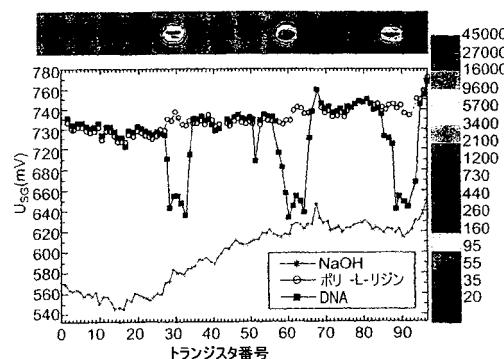


図.6A

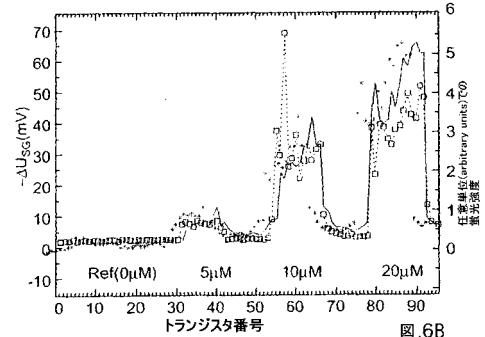


図.6B

【図 7 A - B】

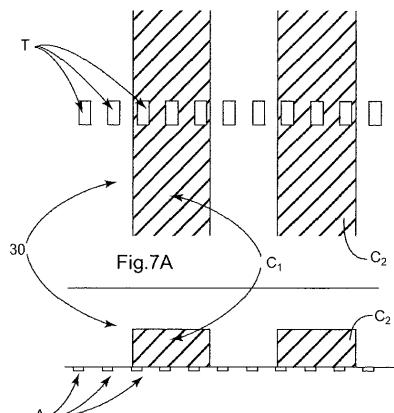
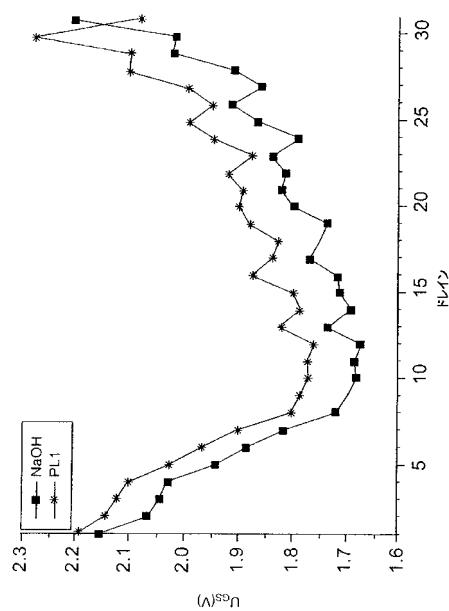
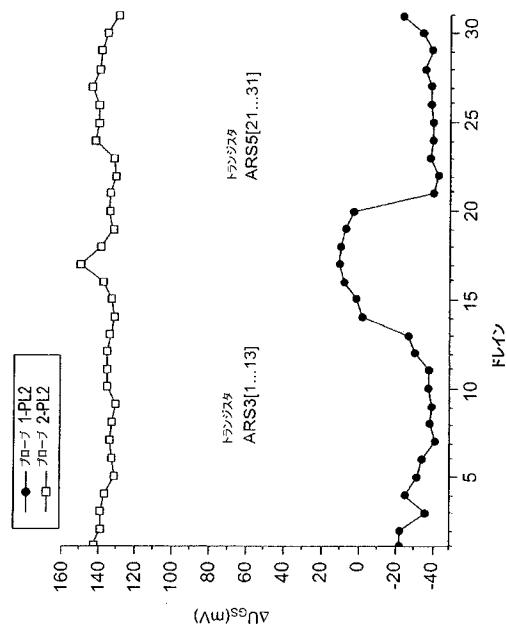


Fig.7B

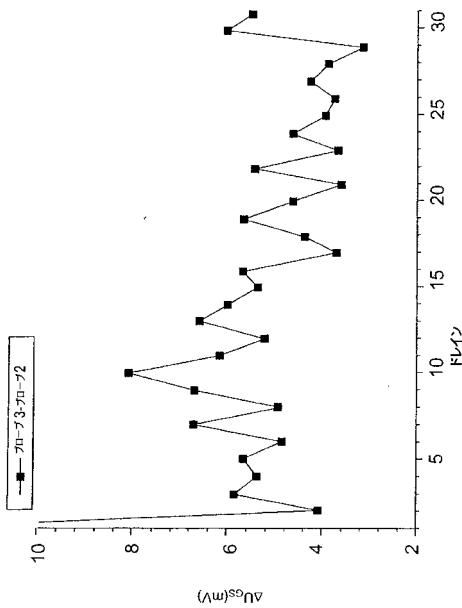
【図 8 a】



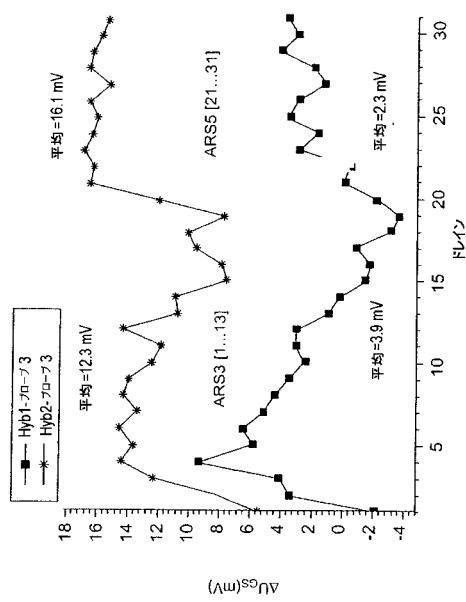
【図 8 b】



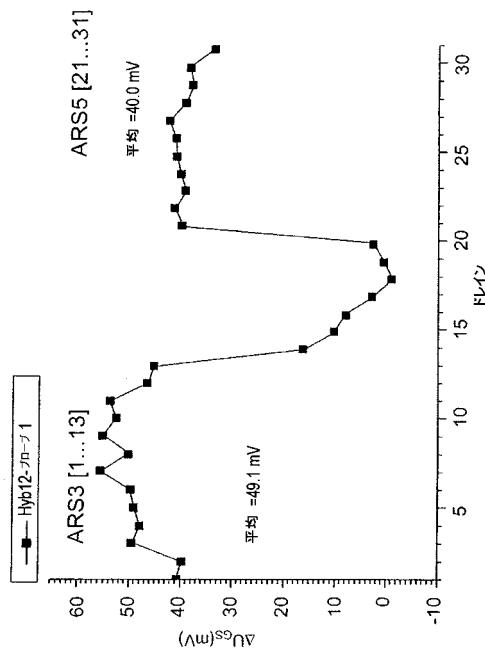
【図 8 c】



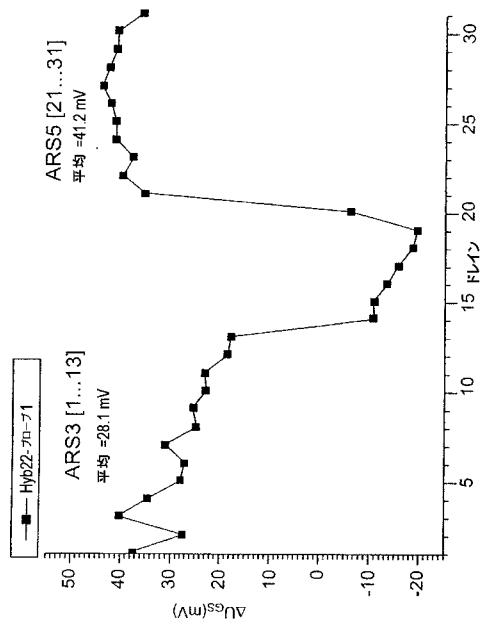
【図 8 d】



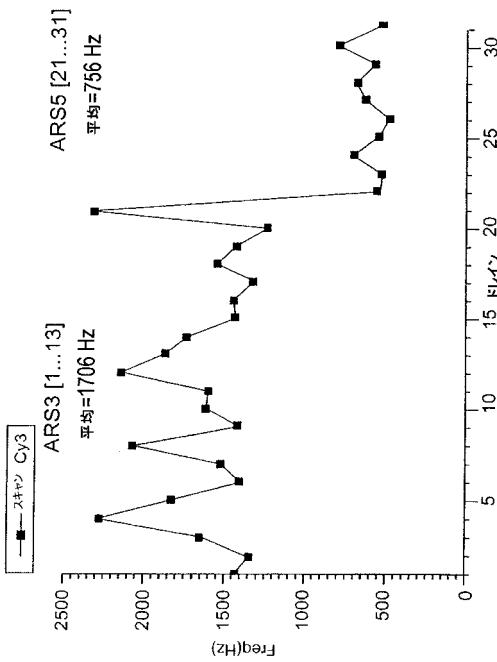
【図 8 e】



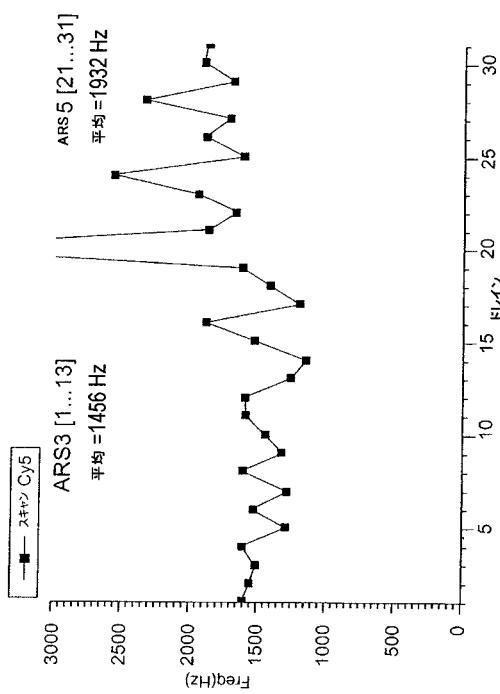
【図 8 f】



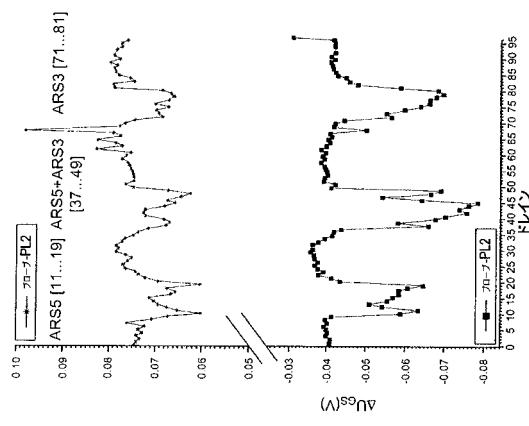
【図 8 g】



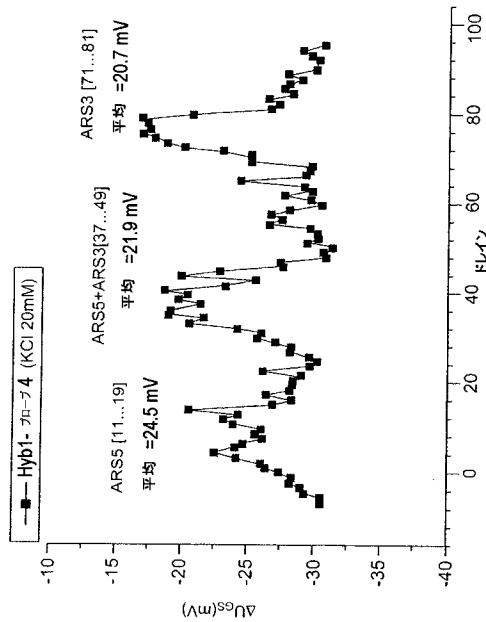
【図 8 h】



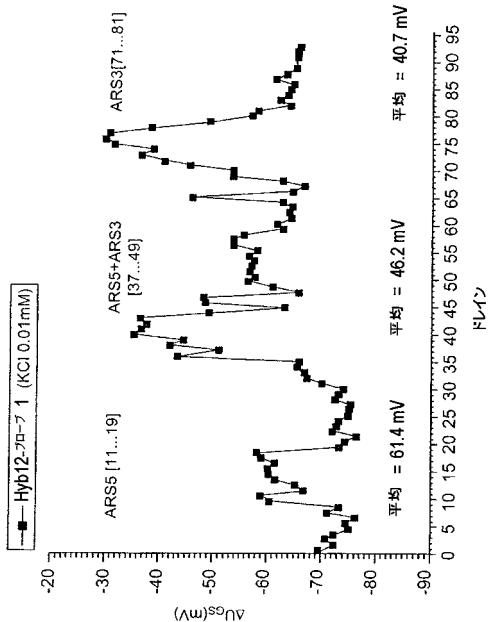
【図 9 a】



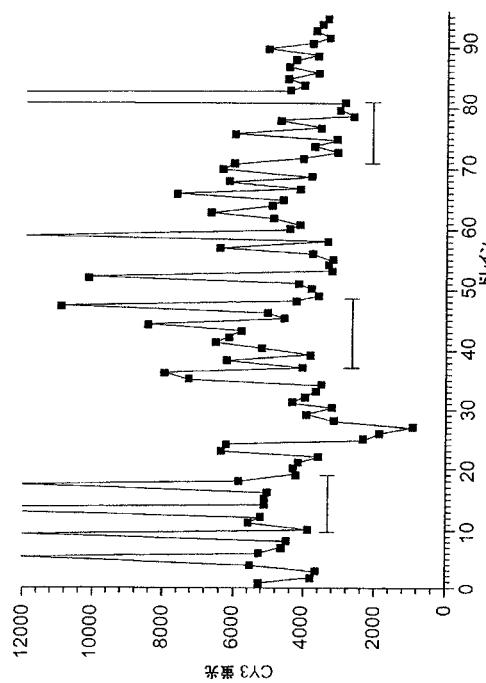
【図 9 b】



【図 9 c】



【図 9 d】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
G 0 1 N	37/00	(2006.01)
		G 0 1 N 33/53 D
		G 0 1 N 33/53 M
		G 0 1 N 33/566
		G 0 1 N 37/00 1 0 2
		G 0 1 N 37/00 1 0 3

(72)発明者 ゲンティル, セドリック
フランス、エフ - 75014 パリ、リュ フランシス ド プレッセンス、13

審査官 大竹 秀紀

(56)参考文献 特表平11-514748 (JP, A)
特開2002-221510 (JP, A)
特開2001-147215 (JP, A)
特開2000-055874 (JP, A)
特開2001-165894 (JP, A)
国際公開第02/048701 (WO, A1)
国際公開第02/000746 (WO, A1)
国際公開第01/029550 (WO, A1)
国際公開第00/065099 (WO, A1)
米国特許第04238757 (US, A)
E. Souteyrand(外6名), Direct Detection of the Hybridization of Synthetic Homo-Oligo
mer DNA Sequences by Field Effect, The Journal of Physical Chemistry B, 1997年 5
月12日, vol. 101, No. 15, p. 2980-2985

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/414
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)