

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3677276号
(P3677276)

(45) 発行日 平成17年7月27日(2005.7.27)

(24) 登録日 平成17年5月13日(2005.5.13)

(51) Int.Cl.⁷

F I

GO 1 N 27/327
C 1 2 M 1/00
C 1 2 M 1/34
C 1 2 N 15/09
C 1 2 Q 1/68

GO 1 N 27/30 3 5 1
C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 M 1/34 Z
C 1 2 Q 1/68 A
GO 1 N 33/483 Z N A F

請求項の数 17 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-504573 (P2003-504573)
(86) (22) 出願日 平成14年8月28日(2002.8.28)
(86) 国際出願番号 PCT/JP2002/008671
(87) 国際公開番号 W02004/019024
(87) 国際公開日 平成16年3月4日(2004.3.4)
審査請求日 平成14年9月20日(2002.9.20)
(31) 優先権主張番号 特願2002-244018 (P2002-244018)
(32) 優先日 平成14年8月23日(2002.8.23)
(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000003078
株式会社東芝
東京都港区芝浦一丁目1番1号
(74) 代理人 100058479
弁理士 鈴江 武彦
(74) 代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
(74) 代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎
(74) 代理人 100091351
弁理士 河野 哲
(74) 代理人 100088683
弁理士 中村 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 塩基配列検出電極、塩基配列検出装置及び塩基配列検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

導電性の検出極と、

この検出極の表面を被覆するように形成され、該検出極表面への挿入剤の吸着を低減する第1ブロッキング分子と、

前記検出極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と相補的な塩基配列を有する標的相補プローブと、

導電性の対照極と、

この対照極の表面を被覆するように形成され、該対照極表面への挿入剤の吸着を低減する第2ブロッキング分子と、

直鎖状有機分子からなる第2のスペーサ部材を介して前記対照極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と非相補的な塩基配列を有するダミープローブと

を具備する事を特徴とする塩基配列検出電極。

【請求項2】

前記標的相補プローブは、直鎖状有機分子からなる第1のスペーサ部材を介して前記検出極に固定される事を特徴とする請求項1に記載の塩基配列検出電極。

【請求項3】

導電性の検出極と、

この検出極の表面を被覆するように形成され、該検出極表面への挿入剤の吸着を低減する第1ブロッキング分子と、

前記検出極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と相補的な塩基配列を有する標的相補プローブと、
導電性の対照極と、
この対照極の表面を被覆するように形成され、該対照極表面への挿入剤の吸着を低減する第2ブロッキング分子と、
前記検出極から検出された電気化学信号から前記対照極から検出された電気化学信号を減算する減算器と、
直鎖状有機分子からなる第2のスペーサ部材を介して前記対照極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と非相補的な塩基配列を有するダミープローブと
を具備してなる事の特徴とする塩基配列検出装置。

10

【請求項4】

前記標的相補プローブは、直鎖状有機分子からなる第1のスペーサ部材を介して前記検出極に固定される事の特徴とする請求項3に記載の塩基配列検出装置。

【請求項5】

前記検出極と対向して配置された第1の対極との間に所定の電圧を印加して、前記検出極からの電気化学信号を検出するための第1のポテンシオ・スタットと、
第1のポテンシオ・スタットの出力を信号処理し、前記減算器に出力する第1の信号処理装置と、
前記対照極と対向して配置された第2の対極との間に所定の電圧を印加して、前記対照極からの電気化学信号を検出する第2のポテンシオ・スタットと、
第2のポテンシオ・スタットの出力を信号処理し、前記減算器に出力する第2の信号処理装置と
を具備することを特徴とする請求項3に記載の塩基配列検出装置。

20

【請求項6】

前記減算器の減算結果を表示する表示装置をさらに備える事と特徴とする請求項3に記載の塩基配列検出装置。

【請求項7】

前記検出極、対照極及び減算器は同一基板に形成され、
前記減算器と前記表示装置はコンピュータを介して信号線により接続されてなる事の特徴とする請求項3に記載の塩基配列検出装置。

30

【請求項8】

前記検出極と、
前記検出極から第1の距離離間して配置され、前記検出極との間に所定の電圧を印加するための第1の対極と、
前記検出極から第2の距離離間して配置され、検出される電圧を第1の対極に負帰還させるための第1の参照極と
からなる検出極側3電極系と、
前記対照極と、
前記対照極から第1の距離離間して配置され、前記対照極との間に所定の電圧を印加するための第2の対極と、
前記検出極から第2の距離離間して配置され、検出される電圧を第2の対極に負帰還させるための第2の参照極と
からなる対照極側3電極系とをさらに備え、
前記検出極側3電極系と前記対照極側3電極系の組はマトリクス状に複数配置される事の特徴とする請求項3に記載の塩基配列検出装置。

40

【請求項9】

前記検出極が第1の方向に複数等間隔に配置された検出極群と、
前記検出極群から所定の距離離間して配置され、第1の方向に長手方向を有する参照極と、
前記参照極から所定の距離離間して配置され、前記対照極が第1の方向に複数等間隔に配

50

置された対照極群と、
前記対照極群から所定の距離離間して配置され、第1の方向に長手方向を有し、前記検出極の各々及び前記対照極の各々との間に所定の電圧を印加するための対極と
をさらに備える事を特徴とする請求項3に記載の塩基配列検出装置。

【請求項10】

前記検出極が第1の方向に複数等間隔に配置された検出極群と、
前記対照極が第1の方向に複数等間隔に配置された対照極群と、
前記検出極群及び前記対照極群から所定の距離離間して配置され、第1の方向に長手方向を有し、前記検出極の各々に所定の電圧を印加するための対極と、
前記検出極群、対照極群及び対極から所定の距離離間して配置され、第1の方向とはほぼ垂直な第2の方向に長手方向を有し、検出される電圧を前記対極に負帰還させるための参照極と
をさらに備える事を特徴とする請求項3に記載の塩基配列検出装置。

10

【請求項11】

前記検出極と、前記検出極から第1の距離離間して配置された第1の参照極からなる検出極側電極群と、
前記対照極と、前記対照極から第1の距離離間して配置された第2の参照極からなる対照極側電極群と、
第1の方向に長手方向を有し前記検出極の各々及び前記対照極の各々との間に所定の電圧を印加するための対極とをさらに備え、
前記検出極側電極群と前記対照極側電極群は、第1の方向と、第1の方向とは異なる第2の方向にマトリクス状に配置されてなる事を特徴とする請求項3に記載の塩基配列検出装置。

20

【請求項12】

前記検出極及び前記対照極に所定の電圧を印加するための円形の対極と、
前記対極を取り囲むように前記対極から所定の距離離間して配置された円環状の参照極とを備え、
前記検出極及び対照極は、前記対極を中心とした円周上に、交互に複数配置されてなる事を特徴とする請求項3に記載の塩基配列検出装置。

30

【請求項13】

第1の方向に長手方向を有する第1の部材と、第1の方向とはほぼ垂直な方向に長手方向を有し、第1の部材と第1の交点で交差する第2の部材からなる参照極と、
前記参照極により仕切られる4つの領域の各々に、第1の交点から第1の距離離間して配置される4つの対極とをさらに備え、
前記検出極は、前記4つの領域のうちの少なくとも1つの領域に配置され、第1の交点から第1の距離よりも長い距離離間して複数配置され、
前記対照極は、前記4つの領域のうちの少なくとも1つの領域に配置され、第1の交点から第1の距離よりも長い距離離間して複数配置されてなる事を特徴とする請求項3に記載の塩基配列検出装置。

40

【請求項14】

前記対照極は、前記4つの領域のうち、前記検出極が配置されていない領域に配置され、
前記検出極は、前記4つの領域のうち、前記対照極が配置されていない領域に配置されてなる事を特徴とする請求項3に記載の塩基配列検出装置。

【請求項15】

導電性の検出極と、この検出極の表面を被覆するように形成され、該検出極表面への挿入剤の吸着を低減する第1ブロッキング分子と、直鎖状有機分子からなる第1のスペーサ部材を介して前記検出極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と相補的な塩基配列を有する標的相補プローブと、導電性の対照極と、この対照極の表面を被覆するように形成され、該対照極表面への挿入剤の吸着を低減する第2ブロッキング分子とを備えた塩基配列検出装置の前記検出極及び対照極における電気化学信号を検出し、

50

前記検出極で検出された電気化学信号から前記対照極で検出された電気化学信号を減算し、
直鎖状有機分子からなる第2のスペーサ部材を介して前記対照極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と非相補的な塩基配列を有するダミープローブを備える事を特徴とする塩基配列検出方法。

【請求項16】

前記標的相補プローブは、直鎖状有機分子からなる第1のスペーサ部材を介して前記検出極に固定される事を特徴とする請求項15に記載の塩基配列検出方法。

【請求項17】

前記減算結果を、コンピュータに備えられた表示装置に表示させる事を特徴とする請求項15に記載の塩基配列検出方法。 10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】

本発明は試料中に存在する特定の遺伝子の特異的に検出するための塩基配列検出電極、塩基配列検出装置及び塩基配列検出方法に関する。

【0002】

【背景技術】

近年の遺伝子工学の発展により、医療分野では遺伝子による病気の診断や予防が可能となってきた。遺伝子工学を用いた診断は遺伝子診断とよばれている。この遺伝子診断では、病気の原因となるヒトの遺伝子欠陥や変化を検出することにより、病気の発症前やその初期段階で診断や予測を行うことができる。また、感染したウィルスや病原菌の遺伝子を検出することにより、正確な診断が可能になる。 20

【0003】

従来用いられている一般的な遺伝子検出法は次の通りである。

【0004】

まず、試料から遺伝子を抽出する。必要があれば、適当な制限酵素で切断した後、電気泳動及びサザンプロットを行う。次に、検出の目的とする標的遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する核酸プローブを、プロットされた遺伝子とハイブリダイズさせる。なお、この核酸プローブは、通常蛍光色素でラベルされている。次いで、レーザー光で蛍光色素を励起する。これにより、ハイブリダイズされた核酸プローブを検出し、標的遺伝子の存在を確認する。 30

【0005】

しかしながら、この蛍光色素を用いた検出方法では、遺伝子の検出までに少なくとも2～3日間を要する。また、核酸プローブを高価な蛍光色素でラベルしなければならない。さらには、蛍光色素を励起させるためのレーザー発生装置が必要となり、装置が大型化してしまう。

【0006】

前述した蛍光色素を用いた検出方法の問題を解決するため、電気化学的手法を用いた遺伝子検出方法が考案されている。この電気化学的手法を用いた検出方法は、本発明者らにより考案された文献に開示されており、その内容は参考のためにここに組み込まれる（例えば、特許文献1参照）。この電気化学的手法によれば、プローブが固定化された電極からの電気化学的信号を検出することにより、標的遺伝子の存在を確認することができる。 40

【0007】

しかしながら、電気化学的手法を用いた遺伝子検出では、電流検出時にバックグラウンド電流が発生する。従って、電極から検出される電流値には、プローブとの由来による電流とバックグラウンド電流が含まれる。そのため、検出結果からプローブ由来の電流のみを抽出することが困難であった。

【0008】

【特許文献1】

特許第 2 5 7 3 4 4 3 号明細書

【0009】

【発明の開示】

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、標的塩基配列との相互作用に基づく電流の検出を高精度に行う塩基配列検出電極、塩基配列検出装置及び塩基配列検出方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

この発明の一の観点によれば、導電性の検出極と、この検出極の表面を被覆するように形成され、該検出極表面への挿入剤の吸着を低減する第1ブロッキング分子と、前記検出極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と相補的な塩基配列を有する標的相補プローブと、導電性の対照極と、この対照極の表面を被覆するように形成され、該対照極表面への挿入剤の吸着を低減する第2ブロッキング分子と、直鎖状有機分子からなる第2のスペーサ部材を介して前記対照極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と非相補的な塩基配列を有するダミープローブとを具備してなる塩基配列検出電極が提供される。

10

【0012】

この発明の別の観点によれば、導電性の検出極と、この検出極の表面を被覆するように形成され、該検出極表面への挿入剤の吸着を低減する第1ブロッキング分子と、前記検出極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と相補的な塩基配列を有する標的相補プローブと、導電性の対照極と、この対照極の表面を被覆するように形成され、該対照極表面への挿入剤の吸着を低減する第2ブロッキング分子と、前記検出極から検出された電気化学信号から前記対照極から検出された電気化学信号を減算する減算器と、直鎖状有機分子からなる第2のスペーサ部材を介して前記対照極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と非相補的な塩基配列を有するダミープローブとを具備してなる塩基配列検出装置が提供される。

20

【0013】

また、この発明のさらに別の観点によれば、導電性の検出極と、この検出極の表面を被覆するように形成され、該検出極表面への挿入剤の吸着を低減する第1ブロッキング分子と、直鎖状有機分子からなる第1のスペーサ部材を介して前記検出極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と相補的な塩基配列を有する標的相補プローブと、導電性の対照極と、この対照極の表面を被覆するように形成され、該対照極表面への挿入剤の吸着を低減する第2ブロッキング分子とを備えた塩基配列検出装置の前記検出極及び対照極における電気化学信号を検出し、前記検出極で検出された電気化学信号から前記対照極で検出された電気化学信号を減算し、直鎖状有機分子からなる第2のスペーサ部材を介して前記対照極に固定化され、検出の目的とする標的塩基配列と非相補的な塩基配列を有するダミープローブを備える塩基配列検出方法が提供される。

30

【0014】

【発明を実施するための最良の形態】

以下、図面を参照しながら本発明の一実施形態を説明する。

40

【0015】

図1は本発明の一実施形態に係る塩基配列検出装置の全体構成の概念を示すブロック図である。図1に示すように、電気化学セル1内に、検出極2及び対照極3が配置されている。これら検出極2及び対照極3における電流は、ポテンシオ・スタット40及び50でそれぞれ検出される。得られた電気化学信号は、それぞれ信号処理装置60及び70に出力される。信号処理装置60及び70は、ピーク電流値の算出等の信号処理を行い、その信号処理されたデータを減算器80に出力する。

【0016】

減算器80は、信号処理装置60から得られたデータから、信号処理装置70から得られたデータを減算し、減算結果をコンピュータ90に出力する。

50

【0017】

電気化学セル1、検出極2、対照極3、ポテンシオ・スタット40及び50は塩基配列を検出するための半導体基板101（チップ）に形成される。また、検出極2、対照極3、ポテンシオ・スタット40及び50は、その半導体チップの集積回路により構成される。減算器80はその半導体基板101に形成された集積回路として実現されてもよいし、半導体基板101とは別個に設けられたコンピュータや減算器により実現されてもよい。減算器80は、コンピュータとそのコンピュータを制御するソフトウェアにより実現されてもよいし、ROMなどに減算処理内容が記録されるファームウェアとして実現されてもよいし、ハードウェアのみで実現されてもよい。

【0018】

コンピュータ90は、例えばパーソナルコンピュータなど、一般的な演算処理が可能なコンピュータであれば何でもよい。コンピュータ90は、通信インタフェース91、CPU92及び表示装置93を備える。通信インタフェース91は、減算器80からの減算結果を受信し、CPU92に出力する。CPU92は、減算結果を表示装置93に表示させる。

【0019】

図2A及び図2Bは検出極2及び対照極3の詳細な構成を示す図である。図2Aは検出極2の詳細を、図2Bは対照極3の詳細を示している。

【0020】

図2Aに示すように、ブロッキング分子21が検出極2の表面を被覆するように形成されている。ブロッキング分子21は、検出極2表面よりも単位面積当たりの挿入剤の吸着が少ない分子により構成される。具体的には、例えばメルカプトヘキサノールやメルカプトオクタノールなどから構成されている。検出極2は完全に被覆されていなくてもよく、少なくとも検出極2表面の一部が被覆されていればよい。このように、検出極2表面をブロッキング分子21が被覆する構成とすることにより、挿入剤分子の検出極2表面への吸着を低減することができる。

【0021】

ブロッキング分子21は特に上述の物質に限定されるものではないが、例えば直鎖のアルカン、アルケン、アルキン、エーテル、エステル、ケトン類が好ましく、さらにこれらの分子が酸素、窒素、イオウ等の原子を介して複数個鎖状に結合した分子でも構わない。また、これらに官能基として例えばアルキル基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、スルホ基、ニトロ基、フェニル基、アミノ基、チオール基、ハロゲン等の中で、挿入剤分子と相互作用しにくいものが導入されている分子がより好ましい。また、これらのブロッキング分子21は、チオール基、アミノ基等を介して検出極2表面に吸着させ、自己組織単分子膜を作製するのが好ましい。この他にも、無機酸化物層、高分子層などを形成させてもよい。

【0022】

また、このブロッキング分子21が形成されていない検出極2表面にはスペーサ部材22の末端が固定化されている。このスペーサ部材22は検出極2表面よりも単位面積当たりの挿入剤の吸着が少ない材料からなる。具体的には、スペーサ部材22は直鎖状有機分子からなり、例えばエチレングリコールが該当する。スペーサ部材22の材料は特に限定されるものではないが、例えば直鎖のアルカン、アルケン、アルキン、エーテル、エステル、ケトン類が好ましく、さらにこれらの分子が酸素、窒素、イオウ等の原子を介して複数個鎖状に結合した分子でも構わない。

【0023】

さらに、このスペーサ部材22の他の末端には、標的相補核酸プローブ23が固定化されている。標的相補核酸プローブ23は、検出の目的とする標的核酸配列と相補的な塩基配列を有する核酸からなるプローブである。このように、スペーサ部材22を介して検出極2に標的相補核酸プローブ23が固定化される構成をとることにより、試料と標的相補核酸プローブ23との結合の効率を向上させることができる。

10

20

30

40

50

【0024】

従来、スペーサ部材には挿入剤分子が相互作用し、バックグラウンド電流を増加させる原因となっていたが、本実施形態のようにスペーサ部材22の構成として、挿入剤分子が相互作用しにくい分子を選択することにより、バックグラウンド電流を減少させることができる。バックグラウンド電流とは、検出極2に配置した標的相補核酸プローブ23と挿入剤との相互作用に起因する電流以外のノイズ等の原因となる電流を指す。このバックグラウンド電流は、例えば検出極2表面と挿入剤との相互作用や、ブロッキング分子21と挿入剤との相互作用、スペーサ部材22と挿入剤との相互作用に起因する電流を含む。標的相補核酸プローブ23と挿入剤との相互作用に起因する電流をプローブ電流と呼ぶ。

【0025】

10

上述したような直鎖状有機分子から構成される標的相補核酸プローブ23を使用する場合には、バックグラウンド電流は、ほぼ検出極2表面に挿入剤が相互作用することに起因する電流のみとなる。このため、後述する対照極3の構成は、ブロッキング分子層のみでよく、非常に好ましい。このような効果のあるスペーサ分子としては、例えばエチレングリコールが1つあるいは多数連結された直鎖状分子がある。この他にも、挿入剤分子と相互作用しない分子であれば、その材料は限定されない。

【0026】

図2Bに示すように、対照極3では、ブロッキング分子31が対照極3の表面を被覆するように形成されている。このブロッキング分子31は、検出極2表面を被覆するブロッキング分子21と同じ材料により構成されるのが好ましいが、類似の性質を示す分子であれば特に限定されない。対照極3を完全に被覆してなくてもよく、少なくとも対照極3表面の一部が被覆されていればよい。このように、対照極3表面を、ブロッキング分子21と同じ材料のブロッキング分子31が被覆する構成とすることにより、挿入剤分子の検出極2表面への吸着を低減することができるとともに、検出極2と対照極3の双方におけるバックグラウンド電流に対する影響の低減効果を同じにすることができる。

20

【0027】

図3～図14は、この検出極2及び対照極3を含む電極構造の上面模式図である。図3～図14に示すように、電極の種類には、検出極2及び対照極3の他に、対極4及び参照極5がある。これら検出極2、対照極3、対極4及び参照極5は導電性の材料により構成され、いずれも電気化学セル1内に配置される。これら検出極2、対照極3、対極4及び参照極5が配置された電気化学セル1には、検出極2や対照極3に固定化されたプローブとの間のハイブリダイゼーションを行わせるための検体塩基配列を有する試料や、挿入剤、バッファなどが充填され、電気化学反応が実行される。

30

【0028】

検出極2及び対照極3は、セル1内の反応電流を検出するための電極である。

【0029】

検出極2には、標的塩基配列とは相補的な標的相補塩基配列を有するDNAプローブが固定化され、標的相補核酸プローブと挿入剤との相互作用に起因するプローブ電流が検出される。

【0030】

40

対照極3は、ノイズなどのバックグラウンド電流を検出し、後にそのバックグラウンド電流で検出極2で検出される電流から差し引くことによりノイズ等の影響を低減するための電極である。対照極3は、プローブが固定されずに用いられるか、あるいは後述の図16に示すようにダミープローブが固定化されて用いられる。

【0031】

対極4は、検出極2あるいは対照極3との間に所定の電圧を印加してセル1内に電流を供給する電極である。

【0032】

参照極5は、参照極5と検出極2あるいは参照極5と対照極3の間の電圧を所定の電圧特性に制御すべく、その電極電圧を対極4に負帰還させる電極である。この参照極5により

50

、対極 4 による電圧が制御され、セル 1 内の各種検出条件に左右されない精度の高い酸化電流検出が行える。

【0033】

図 3 は、検出極 2、対極 4 及び参照極 5 からなる検出極側 3 電極系 3 1 と、対照極 3、対極 4 及び参照極 5 からなる対照極側 3 電極系 3 2 からなる。

【0034】

検出極側 3 電極系 3 1 は、円形の検出極 2 に対して所定の間隔をおいて、所定の方向に長手方向を有する長方形の対極 4 が配置されている。また、検出極 2 に対して所定の間隔をおいて、対極 4 の長手方向とはほぼ垂直な方向に長手方向を有する長方形の参照極 5 が配置されている。検出極 2 と対極 4 との距離と、検出極 2 と参照極 5 との距離はほぼ等しく配置される例を示しているが、これに限定されず、異なる距離で配置してもよい。

10

【0035】

対照極側 3 電極系 3 2 は、検出極側 3 電極系 3 1 の検出極 2 を対照極 3 に置換した構成となっている。これら 3 電極系 3 1 や 3 2 を 1 組の電極系として、ポテンシオ・スタット 40 や 50 が接続される。

【0036】

図 4 は図 3 の電極構造に基づいて構成されるより具体的な電極構造例である。図 4 に示すように、図 3 に示したのと同様の 3 電極系 3 1 及び 3 2 が交互にマトリクス配置されている。図 4 では列方向に同じ 3 電極系が並び、行方向に異なる 3 電極系が交互に配置される例を示しているが、行方向に同じ 3 電極系を配置し、列方向に異なる 3 電極系を交互に配置してもよい。また、行方向及び列方向共に異なる 3 電極系が交互に配置されるように配置してもよい。この場合、マトリクスの斜め方向に共通する 3 電極系が並んで配置される。

20

【0037】

図 5 は図 3 と同一形状の電極の別の配置例を示している。長方形の対極 4 に対して長手方向が同一の参照極 5 が対極 4 を挟んで等しい間隔をおいて配置されている。対極 4 及び一方の参照極 5 の間には対照極 3 が配置され、さらにその参照極 5 の対照極 3 が設けられた側とは反対側には検出極 2 が配置されている。また、対極 3 及び他方の参照極 5 の間には検出極 2 が配置され、さらにその参照極 5 の対照極 3 が設けられた側とは反対側には対照極 3 が配置されている。対極 4 あるいは参照極 5 と検出極 2 あるいは対照極 3 の距離は等間隔である。また、検出極 2 と対照極 3 は、参照極 5 を挟んで対称の位置に配置されている。さらに、検出極 2 と対照極 3 は対極 4 を挟んで対称の位置に配置されている。

30

【0038】

図 6 は図 5 の電極構造に基づいて構成されるより具体的な電極構造例である。図 6 に示すように、図 5 に示したのと同様の電極構造を有しているが、検出極 2 及び対照極 3 は、対極 4 や参照極 5 の長手方向に沿って等間隔に複数配置され、それぞれ検出極群 20 及び対照極群 3 をなす。また、検出極 2 や対照極 3 は、参照極 5 や対極 4 を挟んで対称の位置に配置されている。対称の位置に配置される検出極 2 と対照極 3 同士が減算の対象となる電極である。すなわち、参照極 5 に対して対称の位置に配置される検出極 2 あるいは対照極 3 と、その参照極 5 と、さらにはその検出極 2 あるいは対照極 3 に近接して設けられた対極 4 により 3 電極系をなす。各検出極 2 から対極 4 及び参照極 5 までの距離は等しく、各対照極 3 から対極 4 及び参照極 5 までの距離は等しい。その 3 電極系にポテンシオ・スタット 40 あるいは 50 が接続される。1 つの検出極群 20、1 つの対照極群 30、1 つの対極 4 及び 1 つの参照極 5 からなる電極セットが、それら電極あるいは電極群の長手方向と異なる方向（望ましくはほぼ垂直な方向）に複数配置される。

40

【0039】

図 7 は図 3 や図 5 と同一形状の電極の別の配置例を示している。対極 4 の中心近傍から所定の間隔をおいて、かつ対極 4 に対して長手方向がほぼ垂直となるように参照極 5 が配置されている。参照極 5 から所定の間隔をおいて検出極 2 が配置され、またこの検出極 2 と参照極 5 に対して対称の位置に対照極 3 が配置されている。

50

【0040】

図8は図7の電極構造に基づいて構成されるより具体的な電極構造例である。図8に示すように、図7に示したのと同様の電極構造を有しており、かつ検出極2及び対照極3は、参照極5を挟んで対称の位置に、参照極5の長手方向に沿って等間隔に複数配置され、それぞれ検出極群20及び対照極群3をなす。参照極5に対して対称の位置に配置される検出極2と対照極3が減算の対称となる電極である。すなわち、参照極5に対して対称の位置に配置される検出極2あるいは対照極3と、その参照極5と、さらには参照極5に垂直に設けられた対極4により3電極系をなす。その3電極系にポテンシオ・スタット40あるいは50が接続される。各検出極2から参照極5までの距離は等しく、各対照極3から参照極5までの距離は等しい。

10

【0041】

図9は図3、5や7と同一形状の電極の別の配置例を示している。対極4から所定の間隔をおいて、かつ対極4の長手方向とほぼ平行に長手方向を有する参照極51、52が配置されている。その一方の参照極51と対極4の間には検出極2が、他方の参照極52と対極4の間には対照極3が配置されている。検出極2に対する参照極51及び対極4に対する位置関係と、対照極3に対する参照極52及び対極4に対する位置関係は等しい。検出極2と、この検出極2に対応して設けられた参照極51の組を検出極側電極群510、対照極3と、この対照極3に対応して設けられた参照極52の組を対照極側電極群520と呼ぶ。1つの検出極側電極群510と対極4により3電極系をなし、これにポテンシオ・スタット40が接続される。1つの対照極側電極群520と対極4により3電極系をなし、これにポテンシオ・スタット50が接続される。

20

【0042】

図10は図9の電極構造に基づいて構成されるより具体的な電極構造例である。図10に示すように、図9に示したのと同様の電極構造を有しており、検出極側電極群510が列方向に複数等間隔で配置され、対照極側電極群520が列方向に複数等間隔で配置され、これら電極群同士が互いに行方向に交互に配置されているマトリクス構造である。この電極群510、520の各々と対極4により3電極系をなし、これにポテンシオ・スタット40あるいは50が接続される。なお、列方向には同一の電極群が配置される例を示しているが、列方向にも検出極側電極群510と対照極側電極群520が交互に配置される構成としてもよい。また、行方向と列方向は互いにほぼ垂直な場合を示しているが、これに

30

【0043】

図11は図3、5、7や9と同一形状の検出極2及び対照極3と、円形の対極4及び円環形状の参照極5による電極構造の一例を示す図である。図11に示すように円形の対極4の中心を同じくする円環形状の参照極5が対極4を囲むように配置されている。さらに、対極4に対して対称の位置であって参照極5の外周から所定の間隔をおいて検出極2及び対照極3が配置されている。

【0044】

図12は図11の電極構造に基づいて構成されるより具体的な電極構造例である。図12に示すように、図11に示すのと同様の電極構造を有しており、かつ検出極2及び対照極3が対極4に対して対称の位置に複数配置されている。また、複数の検出極2及び複数の対照極3の各々は対極4から同じ位置に配置されているため、対極4を中心とする円周400上に検出極2及び対極3が交互に複数配置される構成をなす。対極4に対して対称の位置にある検出極2及び対照極3同士を減算の対象としてもよいし、隣り合う検出極2及び対照極3同士を減算の対象としてもよい。

40

【0045】

図13は図3、5、7や9と同一形状の検出極2及び対照極3と、正方形の対極4及び十字形状の参照極5による電極構造の一例を示す図である。図13に示すように、長手方向が互いにほぼ垂直に交差する2つの長方形の電極が重なるように構成された十字形状の参

50

照極 5 が配置されている。この参照極 5 の十字により仕切られる 4 つの領域の各々に、参照極 5 から所定の間隔をおいて対極 4 が 1 つずつ配置されている。また、これら 4 つの領域の各々のうち、2 つの領域には、検出極 2 が 1 つずつ配置され、他の 2 つの領域には対照極 3 が 1 つずつ配置されている。これら検出極 2 及び対照極 3 は、対極 4 よりも参照極 5 から離れた位置に配置される。参照極 5 からの各対極 4 への距離は等しく、また参照極 5 からの各検出極 2 及び各対照極 3 への距離は等しい。

【0046】

図 1 4 は図 1 3 の電極構造に基づいて構成されるより具体的な電極構造例である。図 1 4 に示すように、対極 4 と参照極 5 の構成は図 1 3 と共通する。この図 1 4 の場合、参照極 5 で仕切られる 4 つの領域 401 ～ 404 の各々に、検出極 2 が複数配置され、あるいは対照極 3 が複数配置される。より具体的には、互いに隣接する領域 401 と 404 には検出極 2 が複数配置され、互いに隣接する領域 402 と 403 には対照極 3 が複数配置される。参照極 5 との間隔が等しい検出極 2 及び対照極 3 同士が減算の対象となる。なお、4 つの領域 401 ～ 404 のうちの少なくとも 1 つの領域に検出極 2 が配置され、また少なくとも 1 つの領域に対照極 3 が配置されていればよい。従って、3 つの領域に検出極 2 が配置されていても、1 つの領域のみに検出極 2 が配置されていてもよい。また、対極 4 は各領域に 1 つずつ、計 4 つ配置する場合を示したが、各領域に 2 つ以上の対極 4 を配置してもよい。また、1 つの領域に検出極 2 と対照極 3 を混在して配置してもよい。

【0047】

以上に示した図 3 ～図 1 4 の電極配置は一例にすぎず、各電極の形状、大きさ、位置関係などを種々変更することができる。図 3 ～図 1 4 に示す電極構造は、1 つの半導体やガラス等の基板に配置することができる。従って、検出極 2 と対照極 3 は同一基板内に配置される。検出極 2 は 1 つでも複数でもよい。対照極 3 は 1 つでも複数でもよい。また、検出極 2 に対して減算の対象となる対照極 3 は 1 つでも複数でもよい。また、対照極 3 に対して減算の対象となる検出極 2 は 1 つでも複数でもよい。もちろん、各電極を別の基板上に配置してもよい。

【0048】

次に、前述した塩基配列検出装置の動作を図 1 5 のフローチャートに沿って説明する。

【0049】

まず、電気化学セル 1 内に検出極 2 及び対照極 3 を配置し、セル 1 内に検査の対象となる核酸を含む試料（検体溶液）で充填する。そして、セル 1 を所定の温度に保持し、試料と検出極 2 に固定化された標的相補核酸プローブとのハイブリダイゼーション反応を促進させる。ハイブリダイゼーション反応が終了した後、セル 1 内から試料を送出し、バッファ剤で充填した後、セル 1 内を挿入剤で充填する。この挿入剤が充填されたセル 1 内の検出極 2 及び対照極 3 と対極 4 との間に参照極 5 による電圧のフィードバックの下で所定の電圧を印加することにより、検出極 2 及び対照極 3 でそれぞれ並行してポテンシオ・スタット 40 及び 50 により電気化学測定が行われる（s1）。

【0050】

次に、電気化学測定により得られた検出極 2 及び対照極 3 からの電流値のピーク電流値を検出する（s2）。このピーク電流値の検出は、検出極 2 及び対照極 3 の双方で並行して行われる。ピーク電流値の検出は、信号処理装置 60 及び 70 で実行される。信号処理装置 60 及び 70 は、ポテンシオ・スタット 40 及び 50 から得られる電流波形あるいは電流波形を電流電圧変換した電圧波形のピーク値を抽出する。なお、得られるピーク電流値は、A/D 変換されていてもよいし、また複数の検出極 2 や複数の対照極 3 の平均値算出等の統計処理を行った後に得てもよい。得られたピーク電流値は減算器 80 に出力される。

【0051】

減算器 80 は、検出極 2 についてのピーク電流値から対照極 3 についてのピーク電流値を減算する（s3）。検出極 2 についてのピーク電流値は、標的相補核酸プローブに挿入剤分子が相互作用することに起因するプローブ電流と、意図しないノイズとして検出される

10

20

30

40

50

バックグラウンド電流を加算した電流に基づいて得られる。バックグラウンド電流としては、検出極 2 表面と挿入剤分子が相互作用することに起因する電流値と、核酸プローブ部分と基板表面とをつなぐスペーサ部材 2 2 に挿入剤分子が相互作用することに起因する電流値が含まれる。

【0052】

対照極 3 についてのピーク電流値は、意図しないノイズとして検出されるバックグラウンド電流に基づいて得られる。従って、減算により、バックグラウンド電流による電流値を差し引くことができ、プローブによる電流を検出することができる。

【0053】

減算器 80 は、減算結果をコンピュータ 90 に出力する。コンピュータ 90 は、減算結果を表示装置 93 に表示する。オペレータは、この表示された減算結果により、試料に含まれる塩基配列を特定することができる。もちろん、減算結果に基づき試料に含まれる塩基配列の有無の判定などを行う判定回路を設け、その判定結果を表示装置 93 に表示してもよい。

10

【0054】

このように本実施形態によれば、本発明においては、検出極 2 としての従来の遺伝子検出電極のほかに、対照極 3 としてバックグラウンド電流のみを検出できる電極を具備する。両電極 2, 3 における電流値を検出した後、基板上の集積回路上で演算を行うことによって検出極 2 の電流値から対照極 3 の電流値を差し引き、バックグラウンド電流を除去した標的遺伝子由来の電流値のみを検出することが可能である。ブロッキング分子が検出極 2 及び対照極 3 の表面を被覆するように形成されているため、電極表面と挿入剤の相互作用によるバックグラウンド電流の影響を低減できる。また、スペーサ部材として直鎖状有機分子を用いることにより、スペーサ起因のバックグラウンド電流を大幅に低減できる。従って、対照極 3 はプローブを設けなくてもスペーサの有無によるバックグラウンド電流の差がほとんど生じない。従って、スペーサ及びプローブを固定化させる手間が省ける。

20

【0055】

従来の電流検出型の遺伝子検出法においては、標的遺伝子由来の電流値のみを抽出し、解析することが困難であった。特に一塩基多型を判別する際には、非特異的にハイブリダイズした遺伝子によって電流値が増加し、バックグラウンド電流との判別が困難であったが、本実施形態によれば、このような課題を解決することができる。

30

【0056】

本発明は上記実施形態に限定されるものではない。

【0057】

検出極 2 に固定化させるプローブは、標的塩基配列と相補的な塩基配列である標的相補塩基配列を有するプローブが用いられたが、これに限定されるものではない。例えば、標的相補塩基配列とは一塩基、あるいは数塩基異なる塩基配列を有し、標的相補塩基配列よりも標的塩基配列との相補性が低いプローブ（以下、標的準相補核酸プローブと呼ぶ）を用いてもよい。また、標的相補核酸プローブと標的準相補核酸プローブの双方を検出極に固定化して用いてもよい。

【0058】

また、上記実施形態では対照極 3 表面にブロッキング分子 31 を被覆し、スペーサ及びプローブを設けない例を示したが、これに限定されない。図 16 は図 2 B に示す対照極 3 の変形例を示す図である。この変形例に係る対照極 300 は、ブロッキング分子 31 を介して直鎖状有機分子からなるスペーサ部材 301 の末端が固定化されている。このスペーサ部材 301 は検出極 2 に設けられたスペーサ部材 22 と同一の材料により構成される。

40

【0059】

スペーサ部材 301 の他の末端には、ダミープローブ 302 が固定化されている。ダミープローブ 302 は、標的核酸配列と相補的な塩基配列を有さず、非相補的な塩基配列を有する核酸からなるプローブである。

【0060】

50

このように、対照極 3 側にもスペーサを介してプローブを固定化することができる。これにより、検出極 2 側のスペーサ部材 2 2 に起因するバックグラウンド電流を対照極 3 側の電流で差し引くことが出来る。

【0061】

また、検出極 2 側では、スペーサ部材 2 2 を介して検出極 2 に標的核酸プローブ 2 3 を固定化する例を示したが、これに限定されない。例えば図 2 2 A 及び図 2 2 B に示すように、標的核酸プローブ 2 3 をスペーサ部材 2 2 を介さずに検出極 2 に固定化させるものでもよい。

【0062】

また、図 1 では特に示さなかったが、コンピュータ 9 0 が半導体基板 1 0 1 に形成された各回路を自動制御するものでもよい。この場合、コンピュータ 9 0 は、通信インタフェース 9 1 を介してポテンシオ・スタット 4 0、5 0、信号処理装置 6 0、7 0、減算器 8 0 の動作を制御するための制御指令を出力する。これら各回路は、受信した制御指令に基づき動作し、動作結果や演算結果をさらにコンピュータ 9 0 に送信する。これにより、塩基配列の検出を自動化することができる。また、図 1 では、半導体基板 1 0 1 に信号処理装置 6 0、7 0 及び減算器 8 0 を設ける場合を示したが、これらと同様の機能をコンピュータ 9 0 側で実現してもよい。この場合、ポテンシオ・スタット 4 0 及び 5 0 の出力信号がコンピュータ 9 0 に送信され、コンピュータ 9 0 側で信号処理及び減算処理が実行される。

【0063】

以上説明したように本発明は、標的塩基配列との相互作用に基づく電流の検出を高精度に行うことができる。

【0064】

(実施例)

以下に、本発明による塩基配列検出装置のより具体的な実施例を説明する。

【0065】

この実施例では、上述した本実施形態の実施例と、その実施例との比較のための従来例を説明する。

【0066】

(従来例)

この従来例では、対照極 3 を用いずに核酸の検出を行った。検出極 2 として、検出極 2 0 1、2 0 2 及び 2 0 3 の 3 つの A u 電極が用いられた。試料核酸には配列番号 1 を持つ M x A タンパク質のプロモーター領域を用いた。

【0067】

(1) A u 電極表面への核酸プローブの固定化

前述の試料核酸を標的核酸とする。この標的核酸の配列番号 1 と相補的な配列 2 を持つプローブとして、一本鎖の核酸プローブを 1 0 μ M 含む溶液に検出極 2 0 1 を 1 時間浸漬する。これにより、検出極 2 0 1 への標的相補核酸プローブ 2 1 1 の固定化を行った。同様に標的核酸と相補的な塩基配列と一塩基異なる配列 3、4 を持つ一本鎖核酸プローブ（以下、標的準相補核酸プローブ 2 1 2、2 1 3 と呼ぶ）を検出極 2 0 2 及び 2 0 3 にそれぞれ固定化した。これら一本鎖核酸プローブ 2 1 1 ~ 2 1 3 は、塩基(シトシン) 2 0 個からなるスペーサを介して検出極 2 0 1 ~ 2 0 3 にそれぞれ固定されている。次に、1 mM メルカプトヘキサノール水溶液中に検出極 2 0 1 ~ 2 0 3 を浸漬することにより、標的相補核酸プローブ 2 1 1 や標的準相補核酸プローブ 2 1 2 及び 2 1 3 が固定化されていない部分をブロッキングした。

【0068】

(2) 核酸プローブ固定化表面を用いた試料核酸の検出

試料核酸は、抽出後、PCR により増幅した。この試料核酸を含む 2 $\times$ S S C 溶液中に、(1) で作製した検出極 2 0 1 ~ 2 0 3 を浸漬し 3 5 $^{\circ}$ C で 6 0 分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行った。その後、0. 2 $\times$ S S C 溶液で洗浄を行った。さ

10

20

30

40

50

らに検出極 201～203 および対照極 3 を挿入剤であるヘキスト 33258 溶液を 50 μ M 含む溶液中に 15 分間浸漬した後、ヘキスト 33258 分子の酸化電流応答を測定した。電流測定の結果を図 17 に示す。検出極 201 と比較すると検出極 202 及び 203 の電流値は低いが、バックグラウンド電流との区別が付かない。

【0069】

(実施例 1)

この実施例 1 では、対照極 3 を用いて従来例と同様な核酸の検出を行った。検出極 2 として、検出極 201、202 及び 203 の 3 つの Au 電極が用いられた。試料核酸には配列番号 1 を持つ Mx A タンパク質のプロモーター領域を用いた。

【0070】

(1) Au 電極表面への核酸プローブの固定化

前述の試料核酸を標的核酸とする。この標的核酸と相補的な配列 2 を持つ一本鎖核酸プローブを 10 μ M 含む溶液に検出極 201 を 1 時間浸漬することによって標的相補核酸プローブ 211 の固定化を行った。同様に配列 2 と一塩基異なる配列 3、4 を持つ一本鎖標的準相補核酸プローブを検出極 202 及び 203 に固定化した。さらに配列 2 とは非相補的な配列 5 を持つ一本鎖核酸プローブ（以下、標的非相補核酸プローブと呼ぶ）を対照極 3 に固定化した。一本鎖核酸プローブは、塩基(シトシン)20 個からなるスペーサ部材を介して電極に固定されている。次に、1 mMメルカプトヘキサノール水溶液中に検出極 201～203 及び対照極 3 を浸漬することにより、核酸プローブが固定化されていない部分をブロッキングした。

【0071】

(2) 核酸プローブ固定化表面を用いた試料核酸の検出

試料核酸は、抽出後、PCR により増幅した。この試料核酸を含む 2 $\times$ SSC 溶液中に、

(1) で作製した検出極 201～203 および対照極 3 を浸漬し 35 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行った。その後、0.2 $\times$ SSC 溶液で洗浄を行った。さらに検出極 201～203 および対照極 3 を挿入剤であるヘキスト 33258 溶液を 50 μ M 含む溶液中に 15 分間浸漬した後、ヘキスト 33258 分子の酸化電流応答を測定した。電流測定後、減算器によりバックグラウンド電流を除去した。除去後の結果を図 18 に示す。検出極 202 は検出目的とする遺伝子由来の電流値がほとんどなく、1 塩基の差が明確に判別できていることを示している。一方、検出極 203 は非特異的に目的とする遺伝子がハイブリダイゼーションしていることがわかる。この実施例 1 により、対照極 3 を用いた遺伝子検出を行うことによって目的遺伝子由来の電流のみを抽出できていることが明らかになった。

【0072】

(実施例 2)

従来例 1 及び実施例 1 においては、核酸プローブのスペーサ部材に、挿入剤分子と相互作用しやすい塩基列を用いた。そのため、対照極 3 にも核酸プローブを固定化した。この実施例 2 においては、核酸プローブのスペーサ部材に、挿入剤分子と相互作用しないエチレングリコール分子を用いた。試料核酸には配列番号 1 を持つ Mx A タンパク質のプロモーター領域を用いた。

【0073】

(1) Au 電極表面への核酸プローブの固定化

前述の試料核酸を標的核酸とする。この標的核酸と相補的な配列 2 を持つ一本鎖の標的相補核酸プローブ 211 を 10 μ M 含む溶液に検出極 201 を 1 時間浸漬することによって核酸プローブの固定化を行った。同様に標的核酸と一塩基異なる配列 3、4 を持つ一本鎖の標的準相補核酸プローブ 212 及び 213 を検出極 202 及び 203 に固定化した。対照極 3 には一本鎖核酸プローブの固定は行わない。一本鎖核酸プローブ 211～213 は、エチレングリコール分子 30 個からなるスペーサを介して各電極に固定されている。次に、1 mMメルカプトヘキサノール水溶液中に検出極 201～203 及び対照極 3 を浸漬することにより、核酸プローブが固定化されていない部分をブロッキングした。

【0074】

(2) 核酸プローブ固定化表面を用いた試料核酸の検出

試料核酸は、抽出後、PCRにより増幅した。試料核酸を含む $2 \times \text{SSC}$ 溶液中に、(1)で作製した検出極201及び202および対照極3を浸漬し 35°C で60分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行った。その後、 $0.2 \times \text{SSC}$ 溶液で洗浄を行った。さらに検出極201及び202および対照極3を挿入剤であるヘキスト33258溶液を $50 \mu\text{M}$ 含む溶液中に15分間浸漬した後、ヘキスト33258分子の酸化電流応答を測定した。電流測定後、減算器によりバックグラウンド電流を除去した。除去後の結果を図19に示す。検出極202は検出の目的とする遺伝子由来の電流値がほとんどなく、1塩基の差が明確に判別できていることを示している。一方、検出極203は非特異的に目的遺伝子がハイブリダイゼーションしていることがわかる。この実施例2により、検出極2に固定化させる核酸プローブのスペーサとしてエチレングリコールを用いることによって、対照極3には核酸プローブを固定化せずにブロッキング分子のみで構成することが可能であることが明らかになった。

10

【0075】

(実施例3)

この実施例3においては、従来例、実施例1及び2とは別なブロッキング分子を用いた。核酸プローブのスペーサ部材には、エチレングリコール分子が5個結合した分子を用いた。試料核酸には配列番号1を持つMxAタンパク質のプロモーター領域を用いた。

【0076】

(1) Au電極表面への核酸プローブの固定化

前述の試料核酸を標的核酸とする。この試料核酸と相補的な配列2を持つ一本鎖の標的相補核酸プローブ211を $10 \mu\text{M}$ 含む溶液に検出極201を1時間浸漬することによって核酸プローブの固定化を行った。同様に試料核酸と一塩基異なる配列3, 4を持つ一本鎖の標的準相補核酸プローブ212及び213を検出極202及び203に固定化した。対照極3には一本鎖核酸プローブの固定は行わない。一本鎖核酸プローブ211～213は、エチレングリコール分子30個からなるスペーサを介して電極に固定されている。次に、 1mM メルカプトオクタノール水溶液中に各検出極201～203及び対照極3を浸漬することにより、核酸プローブが固定化されていない部分をブロッキングした。

20

【0077】

(2) 核酸プローブ固定化表面を用いた試料核酸の検出

試料核酸は、抽出後、PCRにより増幅した。この試料核酸を含む $2 \times \text{SSC}$ 溶液中に、(1)で作製した検出極201～203および対照極3を浸漬し 35°C で60分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行った。その後、 $0.2 \times \text{SSC}$ 溶液で洗浄を行った。さらに検出極201～203および対照極3を挿入剤であるヘキスト33258溶液を $50 \mu\text{M}$ 含む溶液中に15分間浸漬した後、ヘキスト33258分子の酸化電流応答を測定した。電流測定後、減算器によりバックグラウンド電流を除去した。除去後の結果を図20に示す。検出極202は検出の目的とする遺伝子由来の電流値がほとんどなく、1塩基の差が明確に判別できていることを示している。一方、検出極203は非特異的に目的遺伝子がハイブリダイゼーションしていることがわかる。

30

40

【0078】

(実施例4)

この実施例4においては、核酸プローブのスペーサ部材に、直鎖アルカン分子を用いた。試料核酸には配列番号1を持つMxAタンパク質のプロモーター領域を用いた。

【0079】

(1) Au電極表面への核酸プローブの固定化

前述の試料核酸を標的核酸とする。この試料核酸と相補的な配列2を持つ一本鎖の標的相補核酸プローブ211を $10 \mu\text{M}$ 含む溶液に検出極201を1時間浸漬することによって核酸プローブ211の検出極201への固定化を行った。同様に試料核酸と一塩基異なる配列3, 4を持つ一本鎖の標的準相補核酸プローブ212及び213を検出極202及び

50

203に固定化した。対照極3には一本鎖核酸プローブの固定は行わない。一本鎖の標的相補核酸プローブ211及び標的準相補核酸プローブ212及び213は、炭素数96個の直鎖アルカン分子からなるスペーサを介して電極に固定されている。次に、1 mMメルカプトヘキサノール水溶液中に検出極201～203及び対照極3を浸漬することにより、核酸プローブが固定化されていない部分をブロッキングした。

【0080】

(2) 核酸プローブ固定化表面を用いた試料核酸の検出

試料核酸は、抽出後、PCRにより増幅した。試料核酸を含む $2 \times \text{SSC}$ 溶液中に、(1)で作製した検出極201～203および対照極3を浸漬し 35°C で60分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行った。その後、 $0.2 \times \text{SSC}$ 溶液で洗浄を行った。さらに検出極201～203および対照極3を挿入剤であるヘキスト33258溶液を $50 \mu\text{M}$ 含む溶液中に15分間浸漬した後、ヘキスト33258分子の酸化電流応答を測定した。電流測定後、減算器によりバックグラウンド電流を除去した。除去後の結果を図21に示す。検出極202は検出目的遺伝子由来の電流値があまりなく、1塩基の差が明確に判別できていることを示している。この実施例4により、核酸プローブのスペーサとして直鎖アルカン分子を用いることによっても、対照極3には核酸プローブを固定化せずにブロッキング分子のみで構成することが可能であることが明らかになった。

10

【0081】

付加的な長所及び改変は当該技術に長けた者にとって容易に思い浮かぶであろう。従って、そのより広範な観点における本発明は、ここで示され説明される具体的な詳細及び代表的な実施形態に限定されない。従って、添付されるクレーム及びその均等物により定義される一般的な発明概念の精神あるいは視野から離れることなく様々な改変がなされ得る。

20

【0082】

なお、本発明は上記実施形態そのままに限定されるものではなく、実施段階ではその要旨を逸脱しない範囲で構成要素を変形して具体化できる。また、上記実施形態に開示されている複数の構成要素の適宜な組み合わせにより、種々の発明を形成できる。例えば、実施形態に示される全構成要素から幾つかの構成要素を削除してもよい。さらに、異なる実施形態にわたる構成要素を適宜組み合わせてもよい。

【0083】

【産業上の利用可能性】

30

以上説明したようにこの発明は、塩基配列を検出するための検出電極の技術分野、塩基配列を検出するための検出装置の技術分野及び塩基配列を検出するための検出方法の分野に有効である。

【0084】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KABUSHIKI KAISHA TOSHIBA

OKADA, Jun

HASHIMOTO, Koji

TAKAHASHI, Masayoshi

<120> Base sequence detecting electrode, base sequence detecting device and base sequence detecting method

<130> 02S1026P

<150> JP 2002-244018

<151> 2002-8-23

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 121

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
ggcctccgct ctcgtttcgc ctctttcacc ccgcgcccag ccccgccccg cgccgcgaag 60
aatgaaact cacagacct gtgctgaggg cggctccggg cgcagaaacg aaacctagct 120
c                                     121
```

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
gtttctgcgc ccgga                                     15
```

<210> 3

<211> 15

<212> DNA

10

20

30

40

<213> Homo sapiens

<400> 3

gtttctgcac ccgga

15

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 4

gtttctgctc ccgga

15

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 5

20

gacctgcttc tgact

15

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の一実施形態に係る塩基配列検出装置の全体構成の概念を示すブロック図。

【図 2】A 及び B は同実施形態に係る検出極及び対照極の詳細な構成を示す図。

【図 3】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

【図 4】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

【図 5】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

30

【図 6】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

【図 7】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

【図 8】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

【図 9】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

【図 10】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

【図 11】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

【図 12】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

【図 13】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

【図 14】同実施形態に係る検出極及び対照極を含む電極構造の上面図。

【図 15】同実施形態に係る塩基配列検出装置の動作のフローチャートを示す図。

40

【図 16】同実施形態に係る塩基配列検出装置の対照極の変形例を示す図。

【図 17】従来の塩基配列検出装置の電流測定結果を示す図。

【図 18】対照極を含む塩基配列検出装置の電流測定結果を示す図。

【図 19】スペーサ部材にエチレングリコール分子を用いた塩基配列検出装置の電流測定結果を示す図。

【図 20】メルカプトオクタノールをブロッキング分子として用いた塩基配列検出装置の電流測定結果を示す図。

【図 21】スペーサ部材に直鎖アルカン分子を用いた塩基配列検出装置の電流測定結果を示す図。

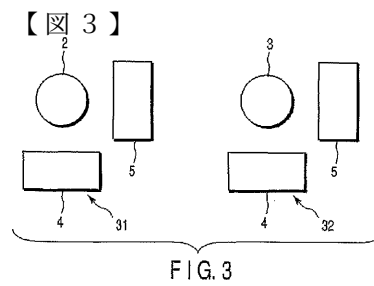
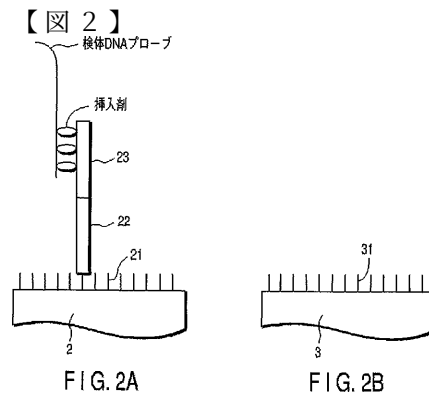
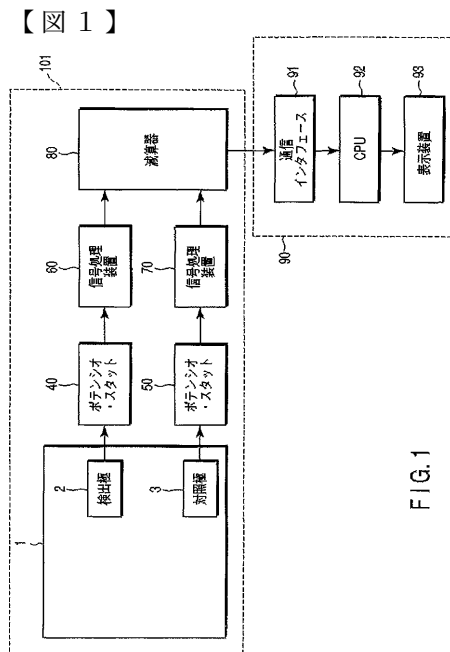
【図 22】A 及び B はスペーサ部材を用いずに標的核酸プローブを固定化する変形例を示

50

す図。

【符号の説明】

1…電気化学セル、2…検出極、3…対照極、40、50…ポテンシオ・スタット、60、70…信号処理装置、80…減算器、90…コンピュータ、91…通信インタフェース、92…CPU、93…表示装置、101…半導体基板（チップ）。



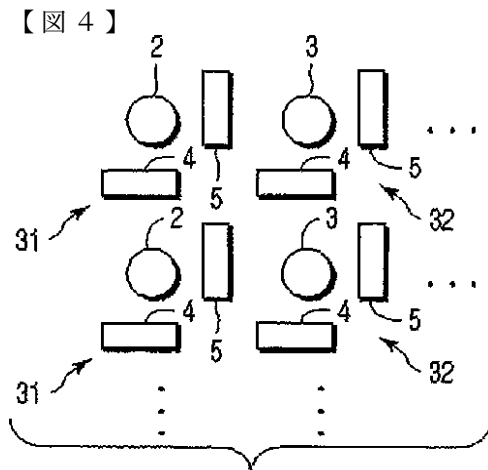


FIG. 4

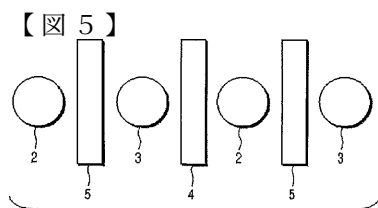


FIG. 5

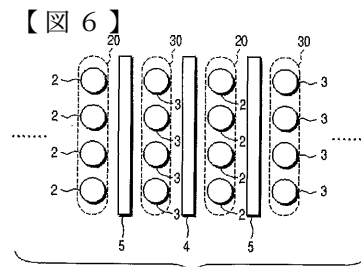


FIG. 6

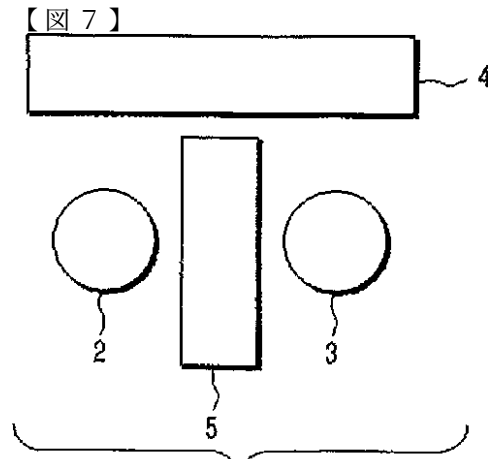


FIG. 7

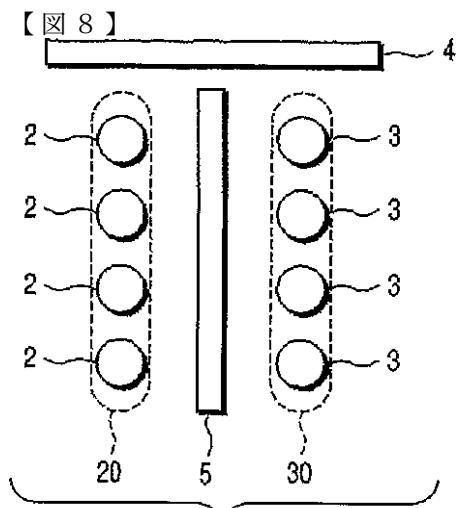


FIG. 8

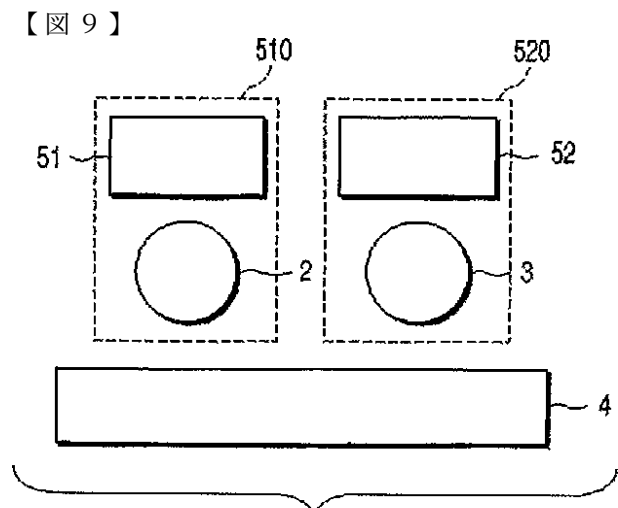


FIG. 9

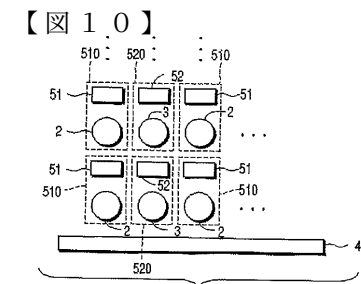
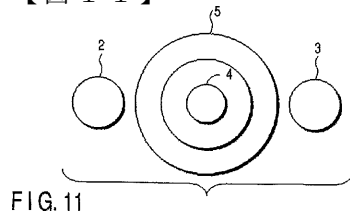
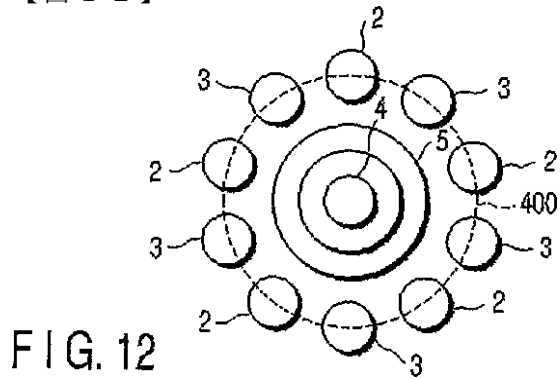


FIG. 10

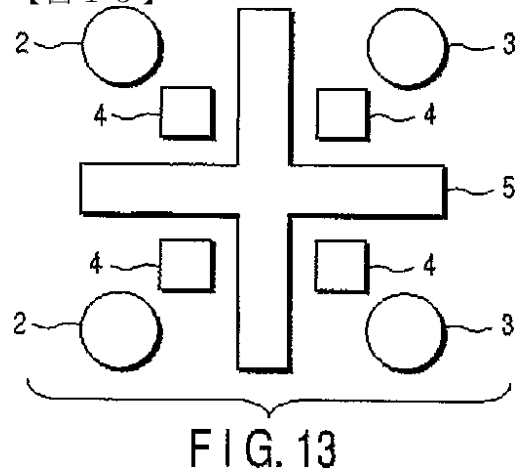
【図 1 1】



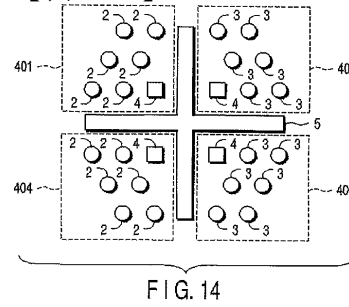
【図 1 2】



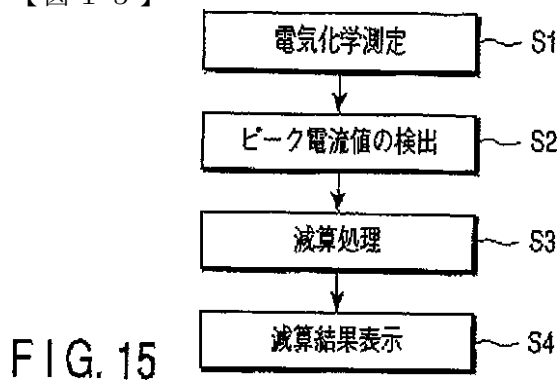
【図 1 3】



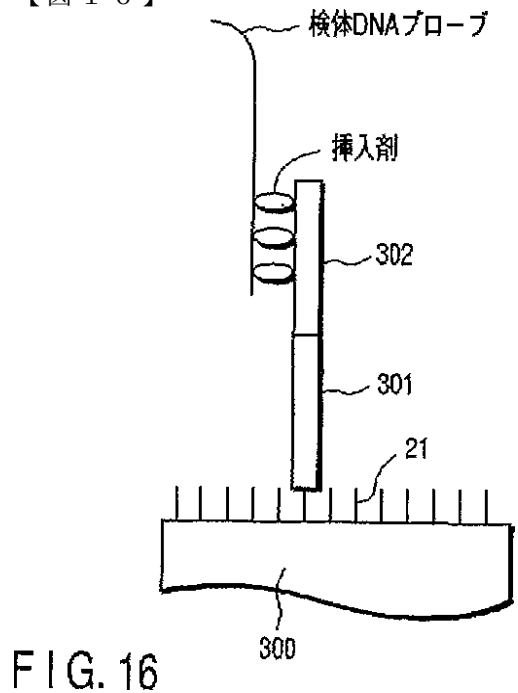
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



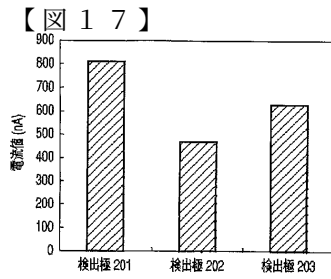


FIG. 17

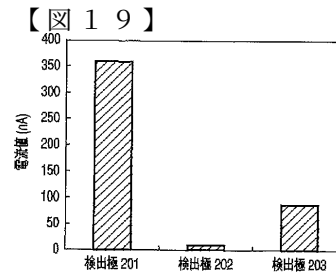


FIG. 19

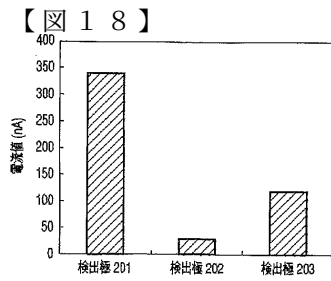


FIG. 18

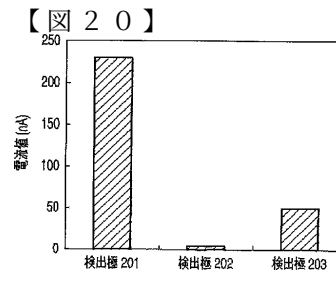


FIG. 20

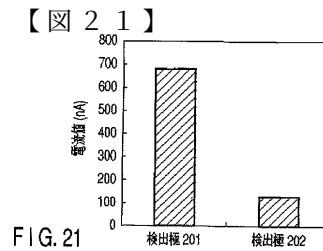
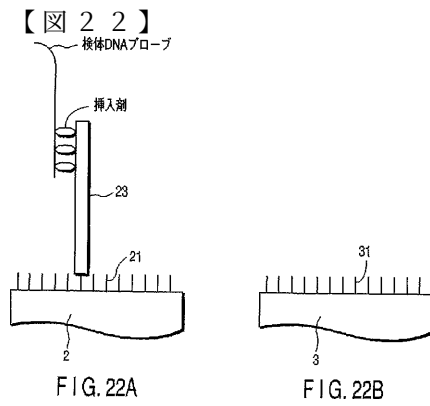


FIG. 21



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I
G 0 1 N 27/416	G 0 1 N 33/53 M
G 0 1 N 33/483	G 0 1 N 37/00 1 0 2
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 27/46 3 3 6 M
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00 F

(72)発明者 岡田 純
 日本国神奈川県横浜市港北区日吉本町4-14-1-A209

(72)発明者 橋本 幸二
 日本国神奈川県厚木市妻田東2-21-3

(72)発明者 高橋 匡慶
 日本国神奈川県横浜市港北区日吉本町4-14-1-A210

審査官 谷垣 圭二

(56)参考文献 特開2001-056311 (JP, A)
 特開2002-195997 (JP, A)
 特開2001-242135 (JP, A)
 実用新案登録第3076232 (JP, Y2)
 特表2001-511245 (JP, A)
 特表2002-518690 (JP, A)
 特表2002-531100 (JP, A)
 欧州特許出願公開第1065278 (EP, A1)
 国際公開第02/63041 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
 G01N 27/416
 G01N 27/327