

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/060417

発行日 平成29年3月9日 (2017.3.9)

(43) 国際公開日 平成27年4月30日 (2015.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/00 (2006.01)	GO 1 N 27/00 Z	2 G O 6 0
GO 1 N 27/04 (2006.01)	GO 1 N 27/04 Z	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

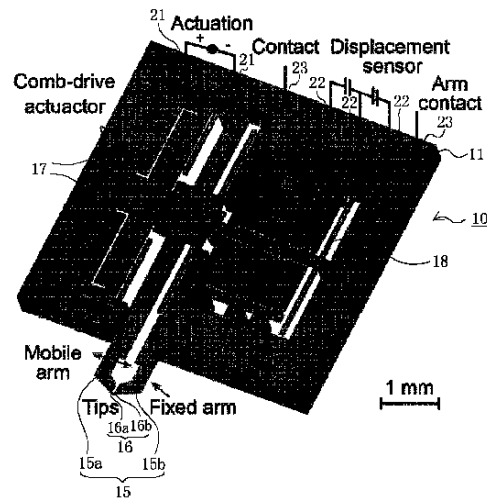
出願番号 特願2015-543920 (P2015-543920)	(71) 出願人 801000049 一般財団法人生産技術研究奨励会 東京都目黒区駒場四丁目6番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/078298	
(22) 国際出願日 平成26年10月24日 (2014.10.24)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-221803 (P2013-221803)	(71) 出願人 513269424 ニューロインデックス インク アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90 501、トランス、サウスウェスタン ア ベニュー スイート 100、20725
(32) 優先日 平成25年10月25日 (2013.10.25)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(71) 出願人 509304287 サントル ナショナル ドウラ ルシェル シュ シヤンティフィック フランス、75794 パリセデックス1 6、リュウミケランジュ 3
	(74) 代理人 100116207 弁理士 青木 俊明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAの検出方法

(57) 【要約】

検出装置の一対の電極間を伸張させたDNAによって橋渡しさせ、突起の電極間を橋渡しするDNAの性質決定を行うことによって、DNAを、蛍光体等の標識物質を使用することなく、容易に、かつ、確実に検出することができるようにする。そのため、少なくとも一対の電極を備える検出装置を使用するDNAの検出方法であって、前記電極にプライマーを固定し、単鎖DNAの環状テンプレートを含有する溶液内に前記電極を浸し、前記環状テンプレートをアニールし、RCA (Rolling Circle Amplification) 法によって単鎖DNA生成物を生成することにより、所定の電圧を印加した前記電極間を伸張したDNAによって橋渡しさせ、複数の単鎖DNA分子を含む前記電極間を橋渡しするDNAの性質決定を行うこと、を含む。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも一対の電極を備える検出装置を使用する DNA の検出方法であって、

(a) 前記電極にプライマーを固定し、

(b) 単鎖 DNA の環状テンプレートを含有する溶液内に前記電極を浸し、前記環状テンプレートをアニールし、RCA 法によって単鎖 DNA 生成物を生成することにより、所定の電圧を印加した前記電極間を伸張した DNA によって橋渡しさせ、

(c) 複数の単鎖 DNA 分子を含む前記電極間を橋渡しする DNA の性質決定を行うこと

を含むことを特徴とする DNA の検出方法。

10

【請求項 2】

前記電極の少なくとも一部は金で被覆されている請求項 1 に記載の DNA の検出方法。

【請求項 3】

前記伸張した DNA による前記電極間の橋渡しは、定温で行われる請求項 1 又は 2 に記載の DNA の検出方法。

【請求項 4】

前記電極間を橋渡しする DNA の性質決定は、前記電極間を橋渡しする DNA の共振周波数に基づいて行われる請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の DNA の検出方法。

【請求項 5】

前記電極間の間隔を所定の周波数で変化させる請求項 4 に記載の DNA の検出方法。

20

【請求項 6】

前記電極間を橋渡しする DNA は束になっている請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA の検出方法。

【請求項 7】

前記電極間を橋渡しする DNA は、二本鎖 DNA 分子を含む束になっている請求項 6 に記載の DNA の検出方法。

【請求項 8】

前記電極間を橋渡しする DNA の性質決定は、前記電極間を橋渡しする DNA の導電性に基づいて行われる請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の DNA の検出方法。

【請求項 9】

前記電極間を橋渡しする DNA の性質決定は、前記電極間を橋渡しする DNA のリアルタイム計測によって行われる請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の DNA の検出方法。

30

【請求項 10】

単鎖の相補的 DNA が生成されるように、対向する電極には異なるプライマーを固定する請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の DNA の検出方法。

【請求項 11】

複数の電極対に複数のプライマーを固定することによって、複数の DNA の性質決定を行う請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の DNA の検出方法。

【請求項 12】

少なくとも一対の電極を備える検出装置を使用する DNA の検出方法であって、

40

(a) 前記電極にプライマーを固定し、

(b) 単鎖 DNA の環状テンプレートを含有する溶液内に前記電極を浸し、前記環状テンプレートをアニールし、RCA 法によって単鎖 DNA 生成物を生成することにより、所定の電圧を印加した前記電極間を伸張した DNA によって橋渡しさせ、

(c) 前記電極間を橋渡しする DNA に導電性の微粒子を被覆し、

(d) 前記電極間を橋渡しする DNA の存在を確認すること、

を含むことを特徴とする DNA の検出方法。

【請求項 13】

複数の電極対に複数のプライマーを固定することによって、複数の DNA の存在を確認する請求項 12 に記載の DNA の検出方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNAの検出方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来、生物テロ防御、医療診断、食品安全性、環境モニタリング等の観点から、安価で口バスタなDNAの検出方法が強く求められている。そこで、MEMS (Micro-Electro-Mechanical System) 技術によって製作された微小鉗(かん)子を使用してDNAの検出を行う検出方法が提案されている(例えば、非特許文献1及び2参照。)

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【非特許文献1】M.Kumemura, D.Collard, S.Yoshizawa, D.Fourmy, N.Lafitte, S.Takeuchi, T.Fujii, L.Jalabert, and H.Fujita, "Direct bio-mechanical sensing of enzymatic reaction on DNA by silicon nanotweezers," Proc. IEEE MEMS '10, pp. 915-918, 2010

【非特許文献2】N.Lafitte, M.Kumemura, L.Jalabert, D.Collard, and H.Fujita, "Real-time sensing of molecule binding on DNA with silicon nanotweezers," Proc. MicroTAS 2011, 389-391

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、前記従来 of 検出方法では、検体に含まれるDNAをあらかじめ増幅して用意しておく必要があった。また、微小鉗子の微細化にも限界があるので、例えば、数[nm]~数十[nm]程度の非常に短いDNAを捕捉して検出することは、困難であった。

【0005】

本発明は、前記従来 of 問題点を解決して、検出装置の一对の電極間を伸張させたDNAによって橋渡しさせ、突起の電極間を橋渡しするDNAの性質決定を行うことによって、DNAを、蛍光体等の標識物質を使用することなく、容易に、かつ、確実に検出することができるDNAの検出方法を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0006】

そのために、本発明のDNAの検出方法においては、少なくとも一对の電極を備える検出装置を使用するDNAの検出方法であって、前記電極にプライマーを固定し、単鎖DNAの環状テンプレートを含有する溶液内に前記電極を浸し、前記環状テンプレートをアニールし、RCA (Rolling Circle Amplification) 法によって単鎖DNA生成物を生成することにより、所定の電圧を印加した前記電極間を伸張したDNAによって橋渡しさせ、複数の単鎖DNA分子を含む前記電極間を橋渡しするDNAの性質決定を行うこと、を含む。

40

【0007】

本発明の他のDNAの検出方法においては、さらに、前記電極の少なくとも一部は金で被覆されている。

【0008】

本発明の更に他のDNAの検出方法においては、さらに、前記伸張したDNAによる前記電極間の橋渡しは、定温で行われる。

【0009】

本発明の更に他のDNAの検出方法においては、さらに、前記電極間を橋渡しするDN

50

Aの性質決定は、前記電極間を橋渡しするDNAの共振周波数に基づいて行われる。

【0010】

本発明の更に他のDNAの検出方法においては、さらに、前記電極間の間隔を所定の周波数で変化させる。

【0011】

本発明の更に他のDNAの検出方法においては、さらに、前記電極間を橋渡しするDNAは束になっている。

【0012】

本発明の更に他のDNAの検出方法においては、さらに、前記電極間を橋渡しするDNAは、二本鎖DNA分子を含む束になっている。

10

【0013】

本発明の更に他のDNAの検出方法においては、さらに、前記電極間を橋渡しするDNAの性質決定は、前記電極間を橋渡しするDNAの導電性に基づいて行われる。

【0014】

本発明の更に他のDNAの検出方法においては、さらに、前記電極間を橋渡しするDNAの性質決定は、前記電極間を橋渡しするDNAのリアルタイム計測によって行われる。

【0015】

本発明の更に他のDNAの検出方法においては、さらに、単鎖の相補的DNAが生成されるように、対向する電極には異なるプライマーを固定する。

【0016】

本発明の更に他のDNAの検出方法においては、さらに、複数の電極対に複数のプライマーを固定することによって、複数のDNAの性質決定を行う。

20

【0017】

本発明の更に他のDNAの検出方法においては、少なくとも一対の電極を備える検出装置を使用するDNAの検出方法であって、前記電極にプライマーを固定し、単鎖DNAの環状テンプレートを含有する溶液内に前記電極を浸し、前記環状テンプレートをアニールし、RCA法によって単鎖DNA生成物を生成することにより、所定の電圧を印加した前記電極間を伸張したDNAによって橋渡しさせ、前記電極間を橋渡しするDNAに導電性の微粒子を被覆し、前記電極間を橋渡しするDNAの存在を確認すること、を含む。

【0018】

本発明の更に他のDNAの検出方法においては、さらに、複数の電極対に複数のプライマーを固定することによって、複数のDNAの存在を確認する。

30

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、DNAの検出方法においては、検出装置の一対の電極間を伸張させたDNAによって橋渡しさせ、突起の電極間を橋渡しするDNAの性質決定を行う。これにより、DNAを、蛍光体等の標識物質を使用することなく、容易に、かつ、確実に検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

40

【図1】本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置を示す斜視図である。

【図2】本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部を溶液に浸す方法を説明する図である。

【図3】本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部を溶液に浸す方法を説明する写真である。

【図4】本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部にプライマーを固定する方法を説明する図である。

【図5】本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部にDNA生成物を生成する方法を説明する図である。

【図6】本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しす

50

るDNAを説明する図である。

【図7】本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするDNAを示す顕微鏡写真である。

【図8】本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするDNAの共振周波数シフトを示すグラフである。

【図9】本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするDNAの共振周波数の時間変化を示すグラフである。

【図10】本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするDNAの電気導電率を示す第1のグラフである。

【図11】本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするDNAの電気導電率を示す第2のグラフである。

【図12】本発明の第2の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするDNAに金の微粒子を被覆させる方法を説明する図である。

【図13】本発明の第2の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするDNAに金の微粒子を被覆させた状態を示す顕微鏡写真である。

【図14】本発明の第2の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするDNAにパラジウムの微粒子を被覆させた状態の電気導電率を示すグラフである。

【図15】本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスの概念図である。

【図16】本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスの写真である。

【図17】本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスの電極ユニットを示す図である。

【図18】本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスのマイクロチャンネルユニットを示す図である。

【図19】本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスのマイクロチャンネルユニットの突起構造部の顕微鏡写真である。

【図20】本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスのDNA捕獲部を示す図である。

【図21】本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスのDNA捕獲部の顕微鏡写真である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下、本発明の実施の形態について図面を参照しながら詳細に説明する。

【0022】

図1は本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置を示す斜視図、図2は本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部を溶液に浸す方法を説明する図、図3は本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部を溶液に浸す方法を説明する写真である。なお、図2において、(a)は模式側面図、(b)は上方からの顕微鏡写真である。

【0023】

図において、10は、本実施の形態における検出装置としてのナノ鉗子装置(Nanotweezers)であって、MEMS技術によってシリコン基板から製作された装置であり、非特許文献1及び2に示されるナノ鉗子装置と類似の構造を有する。

【0024】

前記ナノ鉗子装置10は、平面視における形状が略矩(く)形の平板状の本体部11と、該本体部11の一側辺から突出した互いに平行な一対の腕部材15とを有する。該腕部材15は、前記本体部11に対して移動可能乃至変位可能に取り付けられた移動腕15aと、移動不能に取り付けられた固定腕15bとから成る。なお、前記移動腕15a及び固定腕15bは、本体部11の表面に平行な平面上に並ぶように配設され、前記移動腕15aは本体部11の表面に平行な平面上を移動する。

【0025】

10

20

30

40

50

そして、前記移動腕 15 a の先端には先鋭な形状を備える移動先端部 16 a が形成され、前記固定腕 15 b の先端には先鋭な形状を備える固定先端部 16 b が形成されている。前記移動先端部 16 a と固定先端部 16 b とは互いに対向する。なお、前記移動先端部 16 a 及び固定先端部 16 b を統合的に説明する場合には、先端部 16 として説明する。該先端部 16 は、電極として機能し、所定の AC 電圧が印加される。なお、先端部 16 の表面の少なくとも一部は、金で被覆されていることが望ましい。

【0026】

また、前記本体部 11 は、前記移動腕 15 a を変位させるための櫛（くし）歯アクチュエータ（Comb-drive Actuator）17 を有する。該櫛歯アクチュエータ 17 は、図示されない導電性の櫛歯間に作用する静電力を利用するリニアアクチュエータ 17 であって、図 1 における両方向矢印で示されるように、移動腕 15 a をその長手方向と直交する方向に変位させ、固定腕 15 b との間隔を変化させることができる。これにより、一对の先端部 16 間の間隔、すなわち、移動先端部 16 a と固定先端部 16 b との間隔を変化させることができる。

10

【0027】

さらに、前記本体部 11 は、前記移動腕 15 a の変位量を計測するための変位センサ（Displacement sensor）18 を有する。該変位センサ 18 は、静電容量の変化を検出する容量式センサであって、移動腕 15 a の変位量を計測することができる。これにより、一对の先端部 16 間の間隔、すなわち、移動先端部 16 a と固定先端部 16 b との間隔、及び、該間隔の変化量を計測することができる。

20

【0028】

前記本体部 11 の表面には、櫛歯アクチュエータ 17 に駆動電流を供給するためのアクチュエータ用端子 21 と、変位センサ 18 の静電容量の変化を検出するためのセンサ用端子 22 と、一对の腕部材 15 の先端部 16 に AC 電圧を印加するための腕部材用端子 23 とが形成されている。

【0029】

図 2 に示されるように、本実施の形態において、ナノ鉗子装置 10 は、溶液収容装置 30 とともに使用される。該溶液収容装置 30 は、平板状の一对の板部材 31 と、該板部材 31 の間に形成された微小空間 32 とを有する。前記板部材 31 は、上側に配設される上板部材 31 a と、下側に配設される下板部材 31 b とから成り、上板部材 31 a と下板部材 31 b とは、微小間隔（例えば、約 300 [μm] 程度の間隔）を空けて互いに平行となるように配設されている。なお、少なくとも上板部材 31 a は、ガラス等の透明材料から成るものであることが望ましい。そして、前記微小空間 32 内には、DNA を含む溶液が注入されて収容される。なお、前記微小空間 32 は、前方（図 2 における左方）が開放されているが、上板部材 31 a と下板部材 31 b との間隔が微小であるため、収容されている溶液は、ほとんど漏出したり、蒸発したりすることがない。

30

【0030】

そして、前記ナノ鉗子装置 10 は、実験室の床等に固定される基礎部 40 の上面に固定された鉗子保持台 41 の平坦（たん）な上面に、本体部 11 の表面がほぼ水平となるように取り付けられる。したがって、腕部材 15 はほぼ水平となるように配設される。

40

【0031】

また、前記溶液収容装置 30 は、基礎部 40 の上面に前記鉗子保持台 41 と対向するように固定された溶液保持装置 42 に取り付けられる。該溶液保持装置 42 は、前記鉗子保持台 41 に対して接近及び離間するように移動可能な可動保持台 42 a を備え、該可動保持台 42 a の平坦な上面に、板部材 31 がほぼ水平となるように溶液収容装置 30 が取り付けられる。また、板部材 31 の間に形成された微小空間 32 の位置が鉗子保持台 41 に取り付けられたナノ鉗子装置 10 の腕部材 15 の位置と対応するように、前記可動保持台 42 a の高さ方向の位置は調整されている。

【0032】

したがって、図 2 (a) における両方向矢印で示されるように、可動保持台 42 a を水

50

平方向に移動させることによって、ナノ鉗子装置 10 の腕部材 15 の先端部 16 を溶液収容装置 30 の微小空間 32 に相対的に出し入れすることができ、図 2 (b) に示されるように、前記先端部 16 を微小空間 32 内に収容されている溶液に浸すことができる。

【 0 0 3 3 】

なお、図 3 は、本発明の発明者が実際に製作したナノ鉗子装置 10 及び溶液収容装置 30 の位置関係を示す写真であって、ナノ鉗子装置 10 の腕部材 15 の先端部 16 を溶液収容装置 30 の微小空間 32 から出した状態を示している。

【 0 0 3 4 】

次に、本実施の形態における DNA を検出する方法であって、本発明の発明者が図 3 に示されるような装置を使用して実際に DNA を検出した方法について説明する。まず、先端部 16 間を DNA によって橋渡しさせる方法について説明する。

10

【 0 0 3 5 】

図 4 は本発明の第 1 の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部にプライマーを固定する方法を説明する図、図 5 は本発明の第 1 の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部に DNA 生成物を生成する方法を説明する図、図 6 は本発明の第 1 の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しする DNA を説明する図、図 7 は本発明の第 1 の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しする DNA を示す顕微鏡写真である。なお、図 4 及び 5 において、(a) 及び (b) は方法の第 1 及び第 2 の工程を示す図であり、図 6 において、(a) は先端部に橋渡しした DNA を示す図、(b) ~ (d) は橋渡しした DNA に含まれる DNA 分子を示す図である。

20

【 0 0 3 6 】

図 4 (a) に示されるように、互いに対向する先端部 16 間の間隔は、最小でも 3 ~ 5 [μm] 程度である。ナノ鉗子装置 10 の微細化にも限界があり、現時点では、これよりも狭い間隔とすることは、不可能である。なお、図においては、左側に移動先端部 16 a が位置し、右側に固定先端部 16 b が位置しているが、移動先端部 16 a 及び固定先端部 16 b のいずれが左側に位置してもよく、また、いずれが右側に位置してもよい。また、前記先端部 16 は、表面が金で被覆されている。

【 0 0 3 7 】

そして、可動保持台 42 a を図 2 (a) における左方向に移動させ、前記先端部 16 を溶液収容装置 30 の微小空間 32 内に入れ、該微小空間 32 内に収容されている第 1 の溶液に浸すことによって、図 4 (b) に示されるように、先端部 16 の表面にプライマー 51 を付着させて固定する。ここで、第 1 の溶液は、プライマー 51 を含む溶液である。

30

【 0 0 3 8 】

本発明の発明者は、プライマー 51 として、5' - チオール - モディファイド RCA プライマー (5' - thiol - modified RCA primer) を使用した。

【 0 0 3 9 】

続いて、可動保持台 42 a を図 2 (a) における右方向に移動させ、前記先端部 16 を溶液収容装置 30 の微小空間 32 内から出した後、該微小空間 32 内に収容されている第 1 の溶液を、該第 1 の溶液と異なる第 2 の溶液と入れ替える。そして、可動保持台 42 a を再度図 2 (a) における左方向に移動させ、前記先端部 16 を溶液収容装置 30 の微小空間 32 内に入れ、該微小空間 32 内に収容されている第 2 の溶液に浸す。該第 2 の溶液は、単鎖 DNA の環状テンプレート 52 を含有する溶液である。

40

【 0 0 4 0 】

本発明の発明者は、環状テンプレート 52 として、オリゴヌクレオチドを合成して環状にしたものを使用した。

【 0 0 4 1 】

そして、前記先端部 16 を第 2 の溶液に浸した状態で、図 5 (a) に示されるように、環状テンプレート 52 のアニールを定温 (等温) で行う。該アニールは、熱サイクル (thermal cycle) を必要とせず、室温で行うことができる。さらに、前記先端部 16 を第 2 の溶液に浸した状態で、図 5 (b) に示されるように、その場で (in situ) 行う RCA

50

法によって単鎖DNA生成物53を生成する。RCA法は、熱サイクルを必要とせずに等温で行うことができる強力なDNAの増幅方法であって、室温で行うことができ、1時間に十億倍程度の増幅率を達成し得る。

【0042】

本発明の発明者は、30〔 〕の環境下で2時間に亘(わた)ってRCA法を行い、非常に長い(例えば、100キロベース〔kB〕以上)単鎖DNA生成物53を生成することができた。

【0043】

そして、前記先端部16に所定の電圧を印加することによって、先端部16間を伸張したDNA分子によって橋渡しさせることができ、図6(a)に示されるように、DNA橋54を形成することができる。該DNA橋54は、複数の単鎖DNA分子を含むものであって、DNAが束になっている。また、DNA橋54は、二本鎖DNA分子を含むDNAの束であってもよい。

10

【0044】

本発明の発明者は、先端部16に高周波のAC電圧(例えば、1〔MHz〕、1〔MV/m〕)を印加して強い電場を生成し、DNA分子を伸張し、誘電泳動(DEP: dielectrophoresis)させ、左右の先端部16に引き付け、これにより、DNA橋54を形成した。両端が左右の先端部16に固定されたDNA橋54として、15〔 μm 〕以上の長いDNA橋54を得ることができた。なお、図7は、左右の先端部16の間隔が6〔 μm 〕の場合に、実際に形成されたDNA橋54の写真であって、先端部16

20

【0045】

そして、ナノ鉗子装置10をそのまま使用して、先端部16間を橋渡しするDNAの性質決定を行うことができる。該性質決定は、DNAの機械的性質、又は、DNAの電氣的性質に基づいてリアルタイムで行われる。

【0046】

具体的には、DNA橋54を形成した後、可動保持台42aを図2(a)における右方向に移動させ、前記先端部16を溶液収容装置30の微小空間32内の第2の溶液から抜き出す際に、具体的には、ナノ鉗子装置10の櫛歯アクチュエータ17を作動させて移動先端部16aと固定先端部16bとの間隔を所定の周波数で変化させ、先端部16間を橋渡しするDNAに振動を付与し、該DNAの共振周波数を計測することによって、前記DNAの性質決定を行うことができる。

30

【0047】

例えば、図6(b)~(d)に示されるように、DNAの鎖同士が架橋結合(cross-linking)55によって結合している場合、その共振周波数は、結合形態に応じて変化すると考えられるので、あらかじめ計測した架橋結合55のないDNAの共振周波数、架橋結合55によって特定の結合形態になっているDNAの共振周波数等に基づいて、DNA橋54のDNAがどのような結合形態を備えているのかを判別することができる。具体的には、図6(b)に示されるように架橋結合55によって単鎖DNA分子が鎖内で結合している場合、図6(c)に示されるように架橋結合55によって単鎖DNA分子が鎖間で結合している場合、及び、図6(d)に示されるように架橋結合55によって二本鎖DNA分子が鎖間及び鎖内で結合している場合では、それぞれ、共振周波数が異なるから、図6(b)~(d)に示される場合のいずれに該当するのかを判別することもできる。

40

【0048】

また、ナノ鉗子装置10の一对の先端部16間に印加される電圧及び供給される電流の変化に基づいて、先端部16間を橋渡しするDNAの電気導電率の変化を計測することによって、前記DNAの性質決定を行うことができる。さらに、先端部16間をDNAが橋渡しする前、すなわち、DNA橋54が形成される前とでは、電気導電率が異なるから、蛍光体等の標識物質を使用することなく、DNA橋54が形成されたこと乃至DNA分子の存在を検出することができる。

50

【 0 0 4 9 】

次に、本発明の発明者が行ったDNAの性質決定の結果について説明する。まず、DNAの機械的性質に基づく性質決定の結果について説明する。

【 0 0 5 0 】

図8は本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするDNAの共振周波数シフトを示すグラフ、図9は本発明の第1の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするDNAの共振周波数の時間変化を示すグラフである。

【 0 0 5 1 】

前述の方法によって先端部16間にDNA橋54が形成されたと考えられる腕部材15の共振周波数を計測し、該共振周波数を、図4(a)に示されるように、先端部16に何も付着していない初期状態の腕部材15の共振周波数と比較することによって、実際に先端部16間にDNA橋54が形成されたか否かを、in situ で確認することができる。すなわち、DNAの検出をin situで行うことができる。

10

【 0 0 5 2 】

図8には、本発明の発明者が実際に製作したナノ鉗子装置10を使用して行った腕部材15の共振周波数の計測結果が示されている。ナノ鉗子装置10の櫛歯アクチュエータ17を作動させ、腕部材15の先端部16間の間隔を変化させる周波数を変化させ、周波数毎の振幅の変化を測定した。図において、は、DNAがない状態、すなわち、先端部16に何も付着していない初期状態の計測値を示し、は、ss DNA bundleの状態、すなわち、先端部16間に単鎖DNA分子が束になったDNA橋54が形成された状態の計測値を示している。なお、図において、横軸は共振周波数〔kHz〕を示し、縦軸は振幅〔mV〕を示している。

20

【 0 0 5 3 】

図8から分かるように、先端部16に何も付着していない初期状態では、共振周波数が1377.75〔Hz〕であるのに対し、先端部16間に単鎖DNA分子が束になったDNA橋54が形成された状態では、共振周波数が1669.39〔Hz〕である。

【 0 0 5 4 】

したがって、前述の方法によって先端部16間にDNA橋54が形成されたと考えられる腕部材15の共振周波数を計測して、図8を参照することによって、実際に先端部16間にDNA橋54が形成されたか否かを、in situ で確認することができる。

30

【 0 0 5 5 】

また、前述の方法によって先端部16間にDNA橋54が形成される途中及びDNA橋54が形成された後において、DNAの機械的性質は、時間の経過とともに変化することが分かった。

【 0 0 5 6 】

図9には、本発明の発明者が実際に製作したナノ鉗子装置10を使用して計測したDNA橋54の共振周波数の時間変化が示されている。図において、は、DNAがない状態、すなわち、先端部16に何も付着していない初期状態の計測値を示し、は、ss DNA bundleの状態、すなわち、先端部16間に単鎖DNA分子が束になったDNA橋54が形成された状態の計測値を示している。なお、図において、横軸は経過時間〔s〕を示し、縦軸は共振周波数〔kHz〕を示している。

40

【 0 0 5 7 】

図9から分かるように、DNA橋54が形成された場合であっても、先端部16を溶液収容装置30の微小空間32内に入れ、該微小空間32内に収容されている溶液に浸す、すなわち、In solutionの状態にする前は、先端部16に何も付着していないのであるから、初期状態と同様の共振周波数である。そして、先端部16が溶液に浸された状態で前述の方法が行われると、先端部16間がDNA分子によって橋渡しされてDNA橋54が形成されるので、共振周波数が上昇する。そして、先端部16を微小空間32内に収容されている溶液から出し始める、すなわち、Removalが開始される時には、共振周波数が相

50

当程度上昇する。そして、先端部 16 が微小空間 32 内に収容されている溶液の外に出て静電泳動が停止しても、すなわち、DEP stopped になっても、さらに、先端部 16 が完全に大気中にあっても、すなわち、In air の状態になっても、共振周波数は、時間の経過とともに上昇し続ける。

【0058】

次に、DNA の電気的性質に基づく性質決定の結果について説明する。

【0059】

図 10 は本発明の第 1 の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しする DNA の電気導電率を示す第 1 のグラフ、図 11 は本発明の第 1 の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しする DNA の電気導電率を示す第 2 のグラフ

10

【0060】

前述の方法によって先端部 16 間に DNA 橋 54 が形成されたと考えられる腕部材 15 の先端部 16 間に電圧を印加したときに流れる電流を計測し、該電流を、図 4 (a) に示されるように先端部 16 に何も付着していない初期状態の先端部 16 間に電圧を印加したときに流れる電流と比較することによって、実際に先端部 16 間に DNA 橋 54 が形成されたか否かを、in situ で確認することができる。すなわち、DNA の検出を in situ で行うことができる。

【0061】

図 10 には、本発明の発明者が実際に製作したナノ鉗子装置 10 を使用して行った先端部 16 間に電圧を印加したときに流れる電流の計測結果が示されている。ナノ鉗子装置 10 の先端部 16 間に印加される電圧を変化させ、電圧毎の電流値を測定した。図において、 I_0 は、DNA がいない状態、すなわち、先端部 16 に何も付着していない初期状態の計測値を示し、 I_{ss} は、ss DNA bundle の状態、すなわち、先端部 16 間に単鎖 DNA 分子が束になった DNA 橋 54 が形成された状態の計測値を示している。なお、図において、横軸は電圧 [V] を示し、縦軸は電流 [mA] を示している。

20

【0062】

また、図 10 中には、電流の単位を [mA] から [pA] に変えて縦軸のスケールを拡大したグラフが枠に囲まれて示されている。これは、先端部 16 に何も付着していない初期状態では、電流の変化量が小さく、電流の単位が [mA] の縦軸では、全く変化しないように見えてしまうからである。

30

【0063】

図 10 から分かるように、先端部 16 に何も付着していない初期状態では、電圧を上昇させても電流があまり大きく増加せず、例えば、電圧を 5 [V] にまで上昇させても電流は 3 [pA] に届かないのに対し、先端部 16 間に単鎖 DNA 分子が束になった DNA 橋 54 が形成された状態では、電圧を上昇させると電流が大きく増加し、例えば、電圧を 5 [V] にまで上昇させると電流が 1.7 [mA] を超えるほどになる。

【0064】

したがって、前述の方法によって DNA 橋 54 が形成されたと考えられる先端部 16 間に電圧を印加して電流を計測して、図 10 を参照することによって、実際に先端部 16 間に DNA 橋 54 が形成されたか否かを、in situ で確認することができる。

40

【0065】

ところで、リアルタイムで DNA 橋 54 の形成を確認するという観点からは、DNA 橋 54 が形成される直前の段階と比較することが望ましい。つまり、図 4 (a) に示されるような先端部 16 に何も付着していない初期状態でなく、図 4 (b) に示されるような先端部 16 にプライマー 51 が固定された状態と比較することが望ましい。

【0066】

図 11 には、本発明の発明者が実際に製作したナノ鉗子装置 10 を使用して行った先端部 16 間に電圧を印加したときに流れる電流の他の計測結果が示されている。ナノ鉗子装置 10 の先端部 16 間に印加される電圧を変化させ、電圧毎の電流値を測定した。図にお

50

いて、**10**は、primer の状態、すなわち、先端部 16 にプライマー 51 としての 5' - チオール - モディファイド R C A プライマーが固定された状態の計測値を示し、**11**は、rinsed ss DNA bundle の状態、すなわち、先端部 16 間に単鎖 D N A 分子が束になった D N A 橋 54 が形成された状態であって、D N A 橋 54 を純水に浸してリンス（洗浄）した状態の計測値を示している。なお、図において、横軸は電圧〔V〕を示し、縦軸は電流〔pA〕を示している。

【0067】

図 10 及び 11 から分かるように、先端部 16 にプライマー 51 が固定された状態では、電圧を上昇させても電流があまり大きく増加しないのに対し、先端部 16 間に単鎖 D N A 分子が束になった D N A 橋 54 が形成された状態では、電圧を上昇させると電流が大きく増加する。

10

【0068】

したがって、前述の方法によって D N A 橋 54 が形成されたと考えられる先端部 16 間に電圧を印加して電流を計測して、図 10 及び 11 を参照することによって、実際に先端部 16 間に D N A 橋 54 が形成されたか否かを、in situ で確認することができる。

【0069】

また、図 11 に示されるように、D N A 橋 54 を純水に浸してリンスした状態では、電圧を上昇させても電流があまり大きく増加しないのに対し、図 10 に示されるように、D N A 橋 54 をリンスしない状態では、電圧を上昇させると電流が大きく増加する。これは、D N A 橋 54 をリンスしない状態では、D N A 橋 54 に塩が付着しているために、電気導電率が高くなっているからである。D N A 橋 54 を純水に浸してリンスすることによって、D N A 橋 54 に付着した塩が除去されるので、D N A 橋 54 自体の電気導電率を計測することができる。

20

【0070】

このように、本実施の形態における D N A の検出方法は、一对の電極として腕部材 15 の先端部 16 を備える検出装置であるナノ鉗子装置 10 を使用する方法であって、先端部 16 にプライマー 51 を固定し、単鎖 D N A の環状テンプレート 52 を含有する溶液内に先端部 16 を浸し、環状テンプレート 52 をアニールし、R C A 法によって単鎖 D N A 生成物 53 を生成することにより、所定の電圧を印加した先端部 16 間を伸張した D N A によって橋渡しさせ、複数の単鎖 D N A 分子を含む先端部 16 間を橋渡しする D N A の性質決定を行うこと、を含む方法である。

30

【0071】

これにより、D N A を、蛍光体等の標識物質を使用することなく、容易に、かつ、確実に検出することができる。

【0072】

なお、先端部 16 の少なくとも一部は金で被覆されていることが望ましい。

【0073】

また、伸張した D N A による先端部 16 間の橋渡しは、定温で行われる。したがって、従来の検出方法で行われているような D N A を増幅させるために溶液等の温度を変化させる温度サイクル操作が不要となるので、容易に D N A を検出することができる。

40

【0074】

さらに、先端部 16 間を橋渡しする D N A の性質決定は、先端部 16 間を橋渡しする D N A の共振周波数に基づいて行われる。より具体的には、先端部 16 間の間隔を所定の周波数で変化させることによって行われる。これにより、D N A の検出を in situ で行うことができる。

【0075】

また、先端部 16 間を橋渡しする D N A は束になっている。さらに、この D N A は、二本鎖 D N A 分子を含む束になっている。

【0076】

さらに、先端部 16 間を橋渡しする D N A の性質決定は、先端部 16 間を橋渡しする D

50

N Aの導電性に基づいて行われる。これにより、D N Aの検出をin situで行うことができる。

【0077】

さらに、先端部16間を橋渡しするD N Aの性質決定は、先端部16間を橋渡しするD N Aのリアルタイム計測によって行われる。したがって、時間経過に伴うD N Aの性質変化を把握することができる。

【0078】

さらに、単鎖の相補的D N Aが生成されるように、対向する先端部16には異なるプライマー51を固定することもできる。生成された単鎖D N A同士は、相補的であるため、二本鎖D N Aを形成する。したがって、合成された二本鎖D N Aの性質変化を把握することができる。

10

【0079】

さらに、複数対の先端部16を、例えば、厚さ方向に並べるようにして、並列に配置し、異なるプライマー51を固定することによって、プライマー51に相互作用するそれぞれのテンプレートからD N Aの増幅、橋渡し、性質決定を行うことができる。

【0080】

次に、本発明の第2の実施の形態について説明する。なお、第1の実施の形態と同じ構造を有するものについては、同じ符号を付与することによってその説明を省略する。また、前記第1の実施の形態と同じ動作及び同じ効果についても、その説明を省略する。

【0081】

図12は本発明の第2の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするD N Aに金の微粒子を被覆させる方法を説明する図、図13は本発明の第2の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするD N Aに金の微粒子を被覆させた状態を示す顕微鏡写真、図14は本発明の第2の実施の形態におけるナノ鉗子装置の腕部材の先端部間を橋渡しするD N Aにパラジウムの微粒子を被覆させた状態の電気導電率を示すグラフである。なお、図12において、(a)は先端部に橋渡ししたD N Aを示す図、(b)は金の微粒子を被覆させたD N Aを示す図であり、図13において、(a)はD N Aがない状態の写真、(b)及び(c)はD N Aに金の微粒子を被覆させた第1及び第2の状態の写真である。

20

【0082】

本実施の形態においては、図12(b)に示されるように、ナノ鉗子装置10の腕部材15の先端部16間を橋渡しするD N Aに金(Au)から成る微粒子57を被覆させ、これにより、前記先端部16間を橋渡しするD N Aの存在を確認する。

30

【0083】

なお、ナノ鉗子装置10及び溶液収容装置30の構成は、前記第1の実施の形態と同様であるので、その説明を省略する。また、ナノ鉗子装置10の腕部材15の先端部16間をD N Aによって橋渡しさせ、図12(a)に示されるように、D N A橋54を形成するまでの動作についても、前記第1の実施の形態と同様であるので、その説明を省略する。なお、図12(a)は、前記第1の実施の形態において説明した図6(a)と同様のもの

40

【0084】

図12(a)に示されるように、先端部16間にD N A橋54が形成されると、可動保持台42aを図2(a)における右方向に移動させ、前記先端部16を溶液収容装置30の微小空間32内から出した後、該微小空間32内に収容されている第2の溶液を、該第2の溶液と異なる第3の溶液と入れ替える。そして、可動保持台42aを再度図2(a)における左方向に移動させ、前記先端部16を溶液収容装置30の微小空間32内に入れ、該微小空間32内に収容されている第3の溶液に浸す。

【0085】

該第3の溶液は、金の微粒子57を含有する溶液である。前記微粒子57は、ナノ粒子(nanoparticle)であって、直径が1~100[nm]程度の超微粒子である。そして、

50

前記第3の溶液には、例えば、3～30〔ng/μl〕程度の割合で、微粒子57が含有されている。

【0086】

これにより、図12(b)に示されるように、前記先端部16間に形成されたDNA橋54が金の微粒子57によって被覆される。金の微粒子57によって被覆されたDNA橋54は、被覆されていないDNA橋54と比較して、視認が容易であるとともに、電気導電率が高い(導電抵抗が低い)。したがって、顕微鏡写真を撮影したり、先端部16間に電圧を印加して流れる電流を計測したりすることによって、先端部16間にDNA橋54が形成されたか否か、すなわち、先端部16間を橋渡しするDNAの存在を容易に確認することができる。

10

【0087】

本発明の発明者は、第3の溶液として、3〔ng/μl〕の割合で、金の微粒子57が含有されている溶液、及び、30〔ng/μl〕の割合で、金の微粒子57が含有されている溶液を使用することによって、先端部16間に形成されたDNA橋54に金の微粒子57を被覆した。図13は、左右の先端部16の間隔が6〔μm〕の場合に、実際に形成されたDNA橋54の写真であって、図13(a)は、DNA橋54が形成される前の状態を示し、図13(b)は、3〔ng/μl〕の割合で金の微粒子57が含有されている溶液に浸してDNA橋54に金の微粒子57を被覆した状態を示し、図13(c)は、30〔ng/μl〕の割合で金の微粒子57が含有されている溶液に浸してDNA橋54に金の微粒子57を被覆した状態を示している。なお、図13(a)に示されるように、左右の先端部16の間隔は、6〔μm〕である。

20

【0088】

図13(b)に示されるように、金の微粒子57が被覆されたDNA橋54は、視認が容易になっていることが分かる。また、図13(b)と(c)とを比較すると、金の微粒子57の含有量の多い溶液に浸した場合の方がDNA橋54を被覆する金の微粒子57の量が多いので、視認がより容易になっていることが分かる。

【0089】

また、先端部16間に電圧を印加して流れる電流を計測し、前記先端部16間の導電抵抗を算出したところ、図13(a)に示される場合が26〔T〕、図13(b)に示される場合が692〔G〕、図13(c)に示される場合が390〔G〕であった。

30

【0090】

このことから、金の微粒子57によって被覆されたDNA橋54は、被覆されていないDNA橋54と比較して、導電抵抗が桁(けた)違いに低く、検出が容易であることが分かる。また、DNA橋54を被覆する金の微粒子57の量が多い方が、導電抵抗がより低いので、検出がより容易であることが分かる。

【0091】

ところで、DNAに被覆する微粒子57の材料は、必ずしも金である必要はなく、その他の導電性の材料であってもよく、例えば、パラジウム(Pd)であってもよい。

【0092】

本発明の発明者は、第3の溶液として、パラジウムの微粒子57が含有されている溶液を使用することによって、先端部16間に形成されたDNA橋54にパラジウムの微粒子57を被覆した。図14には、本発明の発明者が実際に製作したナノ鉗子装置10を使用して行った先端部16間に電圧を印加したときに流れる電流の計測結果が示されている。ナノ鉗子装置10の先端部16間に印加される電圧を変化させ、電圧毎の電流値を測定した。図には、ss DNA bundleの状態、すなわち、先端部16間に単鎖DNA分子が束になったDNA橋54が形成された状態の計測値、DNA coated with Pdの状態、すなわち、先端部16間に形成されたDNA橋54がパラジウムの微粒子57で被覆された状態、及び、rinsed DNA coated with Pdの状態、すなわち、先端部16間に形成されたDNA橋54がパラジウムの微粒子57で被覆された状態であって、該微粒子57で被覆されたDNA橋54を純水に浸してリンス(洗浄)した状態の計測値を示している。なお、図におい

40

50

て、横軸は電圧〔V〕を示し、縦軸は電流〔pA〕を示している。

【0093】

図14から分かるように、先端部16に単鎖DNA分子が束になったDNA橋54が形成された状態では、電圧を上昇させても電流があまり大きく増加しないのに対し、DNA橋54がパラジウムの微粒子57で被覆された状態では、電圧を上昇させると電流が大きく増加する。なお、リンスをした状態では、DNA橋54に付着した塩が除去されるので、電気導電率が低くなっている。

【0094】

このように、本実施の形態におけるDNAの検出方法は、一对の電極として腕部材15の先端部16を備える検出装置であるナノ鉗子装置10を使用する方法であって、先端部16にプライマー51を固定し、単鎖DNAの環状テンプレート52を含有する溶液内に先端部16を浸し、環状テンプレート52をアニールし、RCA法によって単鎖DNA生成物53を生成することにより、所定の電圧を印加した先端部16間を伸張したDNAによって橋渡しさせ、先端部16間を橋渡しするDNAに導電性の微粒子57を被覆し、先端部16間を橋渡しするDNAの存在を確認すること、を含む方法である。

【0095】

これにより、先端部16間を橋渡しするDNAの存在を容易に、かつ、確実に確認することができる。

【0096】

次に、本発明の第3の実施の形態について説明する。なお、第1及び第2の実施の形態と同じ構造を有するものについては、同じ符号を付与することによってその説明を省略する。また、前記第1及び第2の実施の形態と同じ動作及び同じ効果についても、その説明を省略する。

【0097】

図15は本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスの概念図、図16は本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスの写真、図17は本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスの電極ユニットを示す図、図18は本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスのマイクロチャンネルユニットを示す図、図19は本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスのマイクロチャンネルユニットの突起構造部の顕微鏡写真、図20は本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスのDNA捕獲部を示す図、図21は本発明の第3の実施の形態におけるマイクロ流体デバイスのDNA捕獲部の顕微鏡写真である。なお、図16において、(a)はマイクロ流体デバイスの全体を示す写真、(b)は電極ユニットを示す写真、(c)は電極先端部を示す写真であり、図17において、(a)は電極ユニットの全体を示す図、(b)は電極ユニットの中央部拡大図であり、図18において、(a)はマイクロチャンネルユニットの全体を示す図、(b)はマイクロチャンネルユニットの中央部拡大図であり、図19において、(a)は突起構造部の顕微鏡写真、(b)は(a)の写真に突起構造部の外周を示す黒線を付加した写真であり、図20において、(a)はDNA捕獲部の全体を示す図、(b)はDNA捕獲部の中央部拡大図であり、図21において、(a)はDNAがない状態の写真、(b)は蛍光染色したDNAを捕獲した状態の写真である。

【0098】

本実施の形態においては、図16(a)に示されるようなマイクロ流体デバイスを使用してDNAを検出する。該マイクロ流体デバイスは、図17に示されるような電極ユニット61、及び、図18に示されるようなマイクロチャンネルユニット70であって前記電極ユニット61と統合されたマイクロチャンネルユニット70を有する。より具体的には、前記マイクロ流体デバイスは、一方の表面に金(Au)から成る電極ユニット61がパターン形成されたカバーガラスと、前記マイクロチャンネルユニット70が形成され、前記カバーガラスに重ね合わされたポリマー製の板とを有する。なお、図16(a)に示される例において、カバーガラスは、縦26〔mm〕、横36〔mm〕の矩形の透明なガラス板である。

10

20

30

40

50

【0099】

前記電極ユニット61は、互いに同じ形状を有する一对の第1電極ユニット61a及び第2電極ユニット61bから成る。そして、第1電極ユニット61aと第2電極ユニット61bとは、図17に示されるように、互いに向き合って配設され、これにより、電極ユニット61は、全体としてほぼ左右対称の形状を有する。

【0100】

前記第1及び第2電極ユニット61a、61bは、それぞれ、第1及び第2接続パッド62a、62bと、該第1及び第2接続パッド62a、62bに基端が接続された第1及び第2軸部63a、63bと、該第1及び第2軸部63a、63bの先端に接続された第1及び第2櫛部64a、64bと、該第1及び第2櫛部64a、64bが含む複数の第1及び第2歯部65a、65bと、該第1及び第2歯部65a、65bの各々の先端から突出する第1及び第2電極先端部66a、66bとを備える。

10

【0101】

前記第1及び第2接続パッド62a、62bは、縦及び横が3[m]の正方形の部分であり、図16(a)に示されるような外部の電源に他端が接続されたテープ状の導電線の先端が接続される部分である。また、前記第1及び第2軸部63a、63bは、幅が200[μm]の帯状の部分である。さらに、前記第1及び第2歯部65a、65bは、幅の狭い直線的な帯状の部分であり、前記第1及び第2電極先端部66a、66bは、第1及び第2歯部65a、65bよりも幅の狭い直線的な帯状の部分である。

【0102】

そして、対応する第1歯部65aと第2歯部65bとは互いに平行となるように配置され、かつ、対応する第1電極先端部66aと第2電極先端部66bとは互いに平行となるように配置される。対応する第1電極先端部66aと第2電極先端部66bとの間隔は、図16(c)に示されるように、4[μm]である。

20

【0103】

また、前記マイクロチャンネルユニット70は、図18に示されるように、第1及び第2接続部74a、74bと、第1接続部74aと第2接続部74bとを連結する直線的なマイクロチャンネル71と、該マイクロチャンネル71の中央部においてマイクロチャンネル71の両側縁から突出するように形成された複数の突起構造部73とを備える。

【0104】

前記第1及び第2接続部74a、74bは、縦及び横が3[m]の正方形の部分であり、図16(a)に示されるような外部の溶液供給口及び溶液排出口に他端が接続されたチューブの先端が、パイプ状の金具を介して接続される部分である。また、前記マイクロチャンネル71は、前記第1の溶液、第2の溶液、第3の溶液等の溶液や純水、すなわち、流体を流すための流路であって、幅が70[μm]、厚さ(深さ)が3[μm]の直線的な帯状の部分である。さらに、前記突起構造部73は、マイクロチャンネル71の両側縁から外方に突出するように、かつ、左右対称となるように形成された部分であって、互に対向する一对の突起構造部73の先端同士の間隔は105[μm]となっている。各突起構造部73は、マイクロチャンネル71と連通する空洞であるから、マイクロチャンネル71内を流れる流体によって満たされる。

30

【0105】

そして、前記電極ユニット61とマイクロチャンネルユニット70とは、図20に示されるように組み合わせられる。具体的には、第1及び第2歯部65a、65b並びに第1及び第2電極先端部66a、66bの延在する方向とマイクロチャンネル71の延在する方向とが直交し、対応する第1歯部65aの先端と第2歯部65bの先端との間をマイクロチャンネル71が通過し、一对の第1及び第2電極先端部66a、66bが、少なくとも部分的に、一对の突起構造部73と重なり合うように、前記電極ユニット61とマイクロチャンネルユニット70とは組み合わせられる。

40

【0106】

このように電極ユニット61とマイクロチャンネルユニット70とを組み合わせさせたマイク

50

口流体デバイスにおいて、図15に示されるように、マイクロチャネル71に矢印72で示される方向に溶液を流しつつ、電極ユニット61に所定の電圧を印加することによって、互いに対応する第1電極先端部66aと第2電極先端部66bとの間にDNA橋54を形成することができる。

【0107】

なお、マイクロチャネル71内を溶液が流れているので、互いに対応する第1電極先端部66aと第2電極先端部66bとの間にDNA橋54が形成されても、該DNA橋54は、溶液の流れによって前記第1及び第2電極先端部66a、66bから離脱して流されてしまうことがある。しかし、突起構造部73内では溶液が滞留するので、図15に示されるように、突起構造部73と対応する箇所位置する第1電極先端部66aと第2電極先端部66bとの間に形成されたDNA橋54は、流されることがない。

10

【0108】

また、マイクロチャネル71内を流れる溶液を、例えば、第1の溶液から第2の溶液に取り替えたり、リンスのための純水に取り替えたりすることにより、第1及び第2電極先端部66a、66bが浸される溶液又は流体を容易に交換することができる。

【0109】

このようなマイクロ流体デバイスを使用することにより、前記第1及び第2の実施の形態と同様の方法で、第1電極先端部66aと第2電極先端部66bとの間をDNAによって橋渡しさせることができる。

【0110】

本発明の発明者は、実際に前記マイクロ流体デバイスを使用して予備的実験を行うことにより、第1電極先端部66aと第2電極先端部66bとの間をDNAにより橋渡しさせることが可能であることを確認した。なお、前記予備的実験では、DNAの増幅を行わなかった。また、前記予備的実験で使用したマイクロ流体デバイスでは、電極ユニット61とマイクロチャネルユニット70との組み合わせが完璧でなく、図21(a)に示されるように、一对の第1及び第2電極先端部66a、66bと、一对の突起構造部73とが完全には重なり合っていない。さらに、前記予備的実験では、便宜的に、YOYO-1と呼ばれる蛍光色素によって標識付けを行い、蛍光を観察することにより、図21(b)における点線の楕(だ)円内に示されるように、第1電極先端部66aと第2電極先端部66bとの間を橋渡しするDNAの存在を確認した。

20

30

【0111】

このように、本実施の形態におけるDNAの検出方法では、一对の電極として一对の第1及び第2電極先端部66a、66bを備える電極ユニット61とマイクロチャネルユニット70とを組み合わせたマイクロ流体デバイスを使用する。そして、前記第1及び第2の実施の形態において説明した方法と同様の方法によって、一对の第1電極先端部66aと第2電極先端部66bとの間を伸張したDNAにより橋渡しさせ、該DNAの性質決定を行うことや、前記DNAの存在を確認することができる。

【0112】

これにより、DNAを容易に、かつ、確実に検出することができる。

【0113】

前記第1～第3の実施の形態において説明したように、本発明は、DNAを容易に、かつ、確実に検出することができるDNAの検出方法に関するものである。したがって、本発明は、蛍光体等の標識物質を使用することのない突然変異及び病原体の検出、遺伝子型判定から、種々のDNA相互作用因子(例えば、架橋結合化学物質)及び照射のような物理的効果に対応した配列特異DNAの物理的性質決定までの広汎(はん)な分野に適用することができる。配列特異DNAの物理的性質決定は、トランスレーショナルリサーチ(例えば、癌(がん)治療薬の機能確認)及び環境試験に直接的に適用し得る。本発明は、単一のプラットフォームにおいて、DNAの検出と物性分析とを可能にするものである。

40

【0114】

なお、本発明は前記実施の形態に限定されるものではなく、本発明の趣旨に基づいて種

50

々変形させることが可能であり、それらを本発明の範囲から排除するものではない。

【産業上の利用可能性】

【0115】

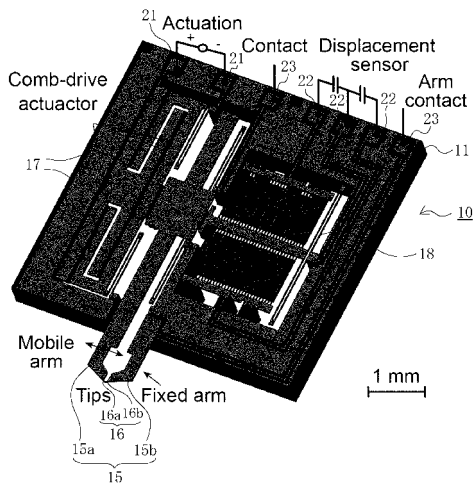
本発明は、DNAの検出方法に適用することができる。

【符号の説明】

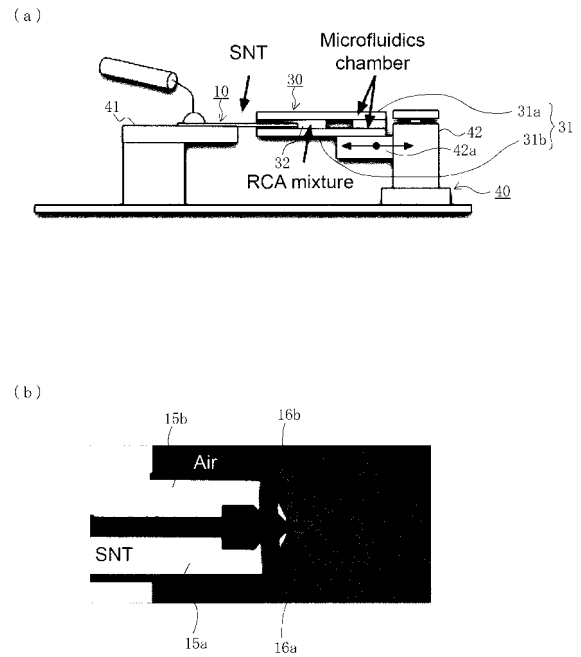
【0116】

- 10 ナノ鉗子装置
- 16 先端部
- 51 プライマー
- 52 環状テンプレート
- 53 単鎖DNA生成物
- 57 微粒子

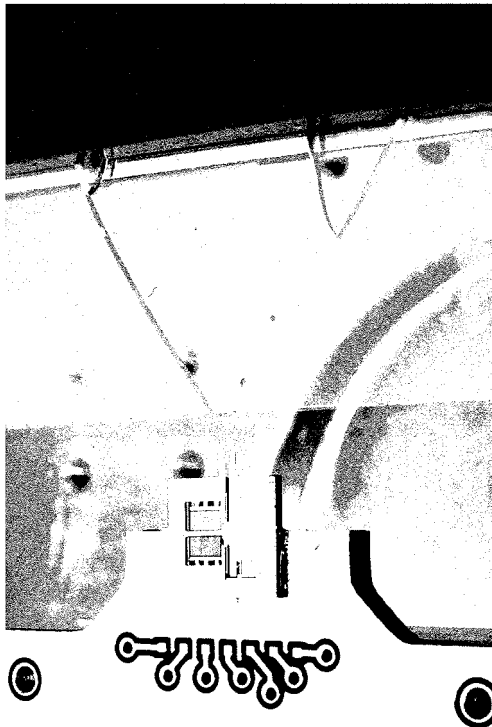
【図1】



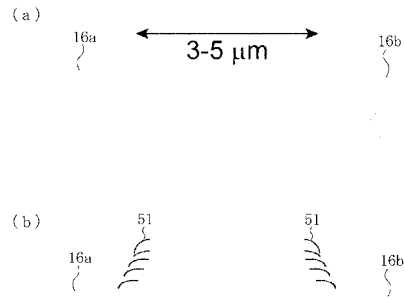
【図2】



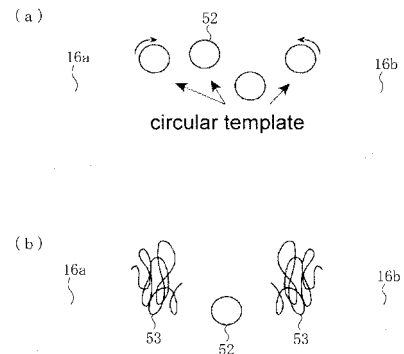
【 図 3 】



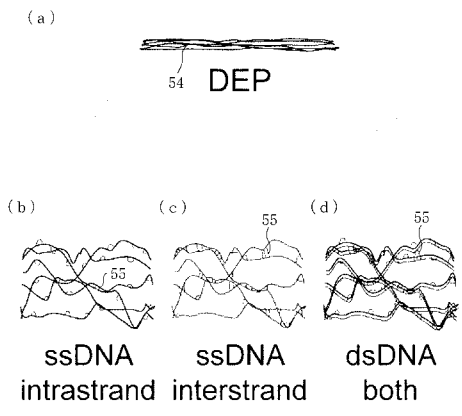
【 図 4 】



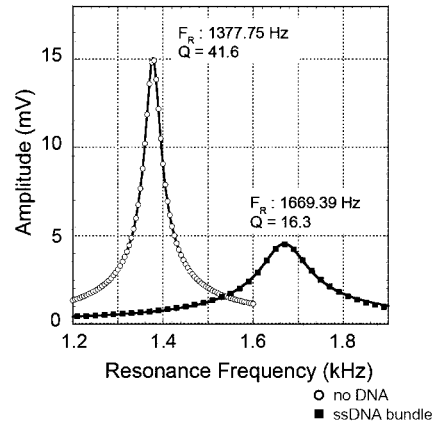
【 図 5 】



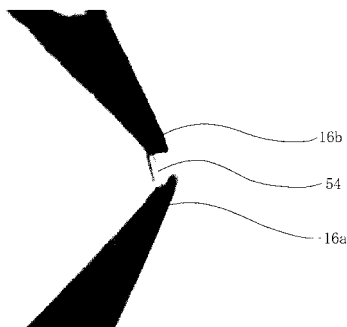
【 図 6 】



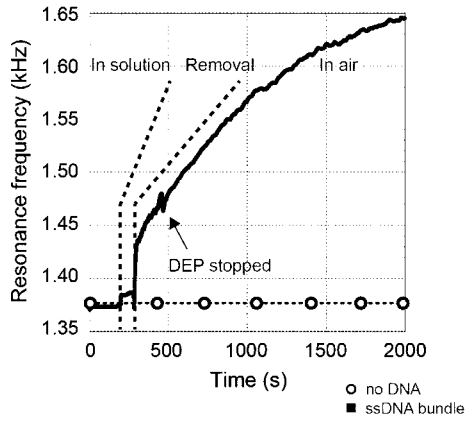
【 図 8 】



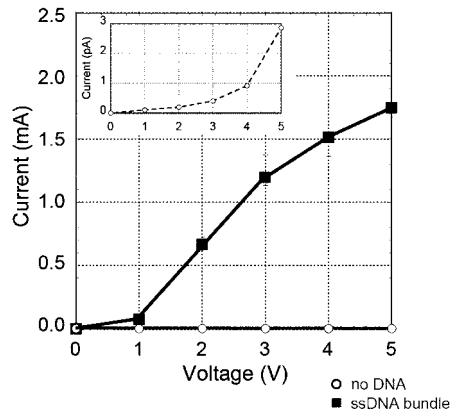
【 図 7 】



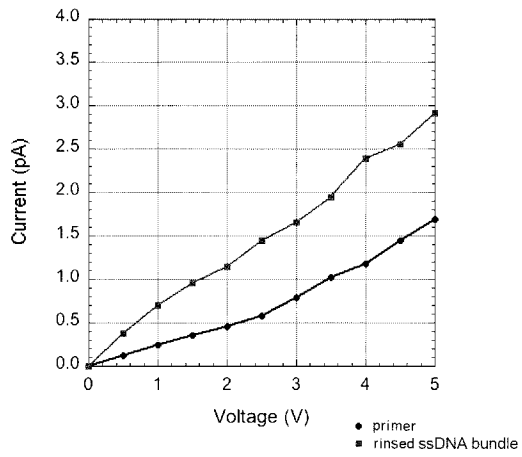
【 図 9 】



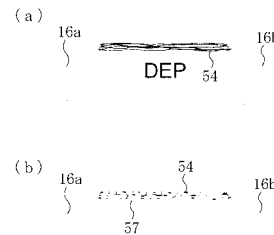
【 図 1 0 】



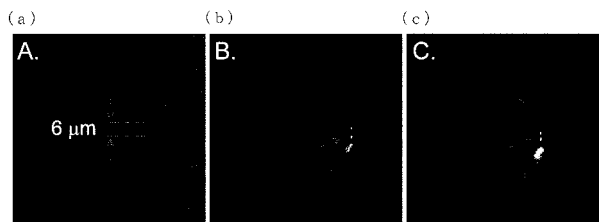
【 図 1 1 】



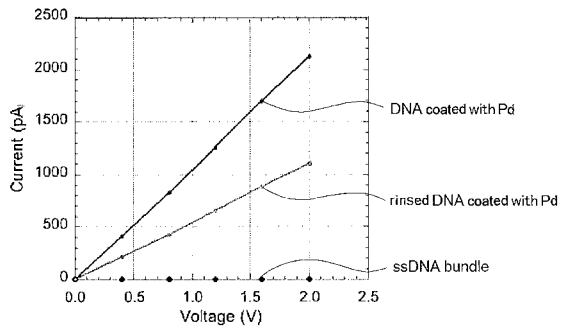
【 図 1 2 】



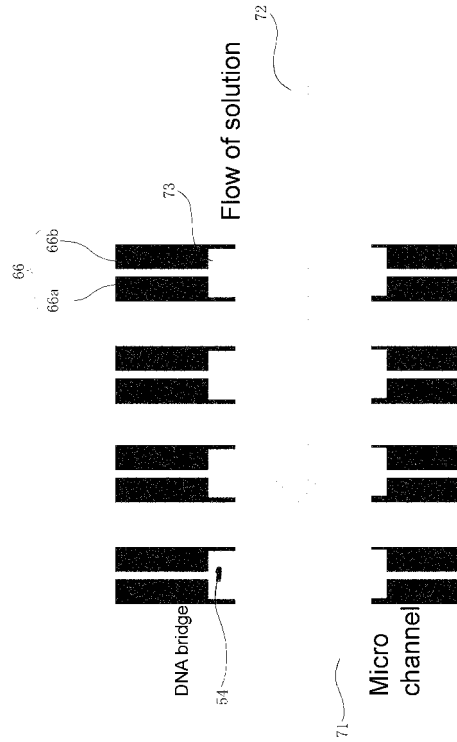
【 図 1 3 】



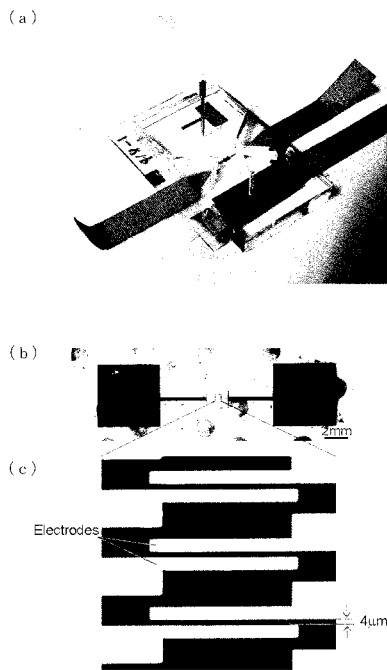
【 図 1 4 】



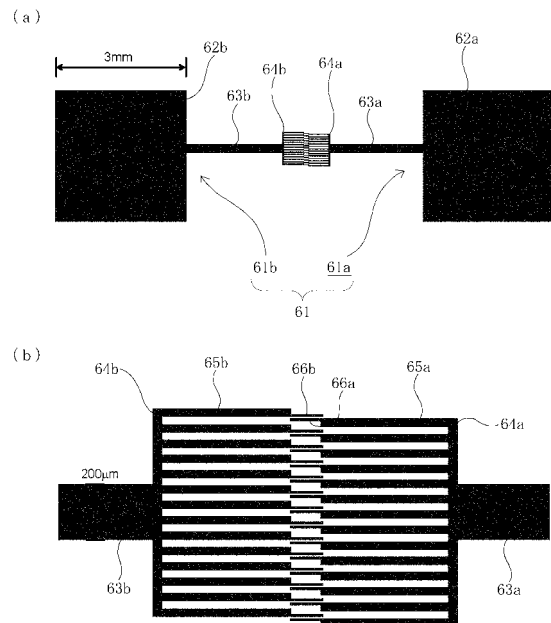
【 図 1 5 】



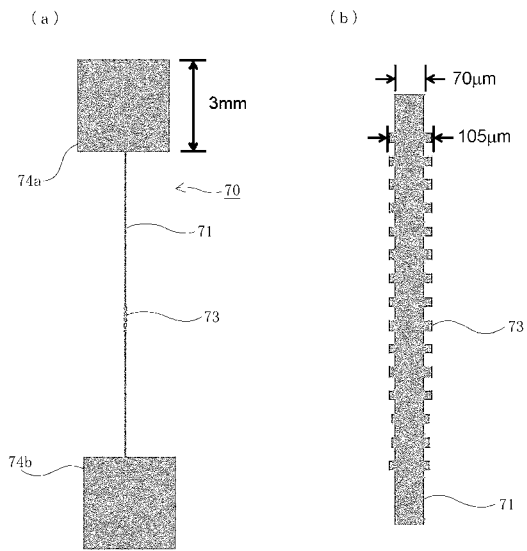
【 図 1 6 】



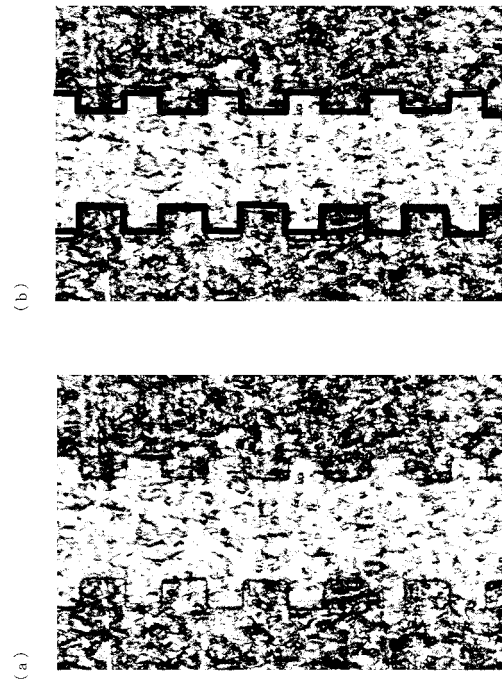
【 図 1 7 】



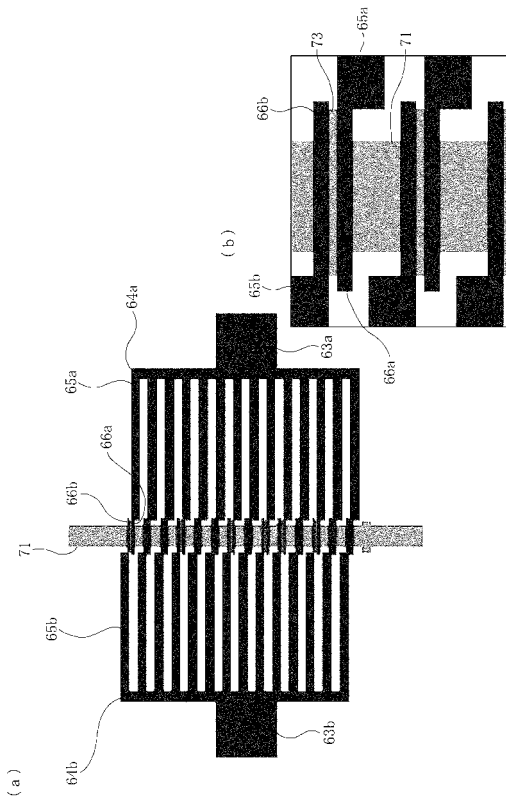
【 図 1 8 】



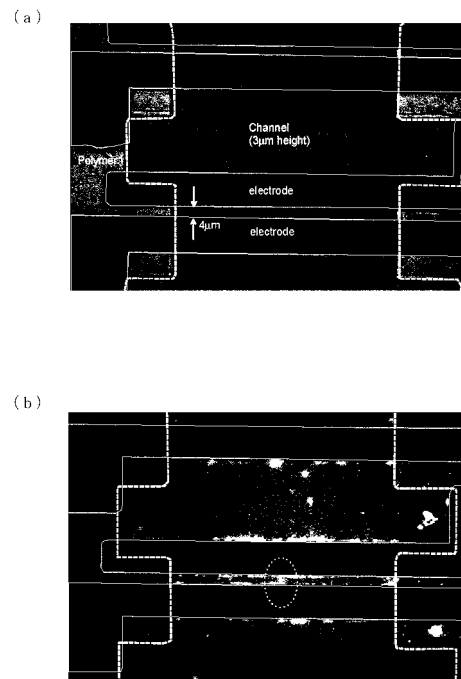
【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/078298
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N27/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N27/04(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) G01N27/00-27/10, G01N27/14-27/24, G01N33/48-33/98, C12Q1/00-3/00		
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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-520130 A (Integrated Nano-Technologies, L.L.C.), 07 July 2005 (07.07.2005), entire text; all drawings & US 2003/0203384 A1 & EP 1487996 A & WO 03/076902 A2 & CA 2478096 A1 & AU 2003218047 A	1-13
A	JP 2008-501122 A (Nanogen Inc.), 17 January 2008 (17.01.2008), entire text; all drawings & US 2006/0134657 A1 & EP 1749108 A & WO 2005/118870 A2 & CA 2567114 A1	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 06 January 2015 (06.01.15)		Date of mailing of the international search report 13 January 2015 (13.01.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/078298

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-013375 A (Tosoh Corp.), 24 January 2013 (24.01.2013), entire text; all drawings (Family: none)	1-13
A	JP 2007-512810 A (Geneohm Sciences, Inc.), 24 May 2007 (24.05.2007), entire text; all drawings & US 2005/0186590 A1 & EP 1687406 A & WO 2005/047474 A2 & DE 602004025371 D & CA 2545356 A1 & AT 456678 T & AU 2004290036 A	1-13
A	M.Kumemura et al., Direct bio-mechanical sensing of enzymatic reaction on DNA by silicon nanotweezers, 2010 IEEE 23rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2010, 915-918	1-13
A	Chritsophe Yamahata et al., Silicon Nanotweezers With Subnanometer Resolution for the Micromanipulation of Biomolecules, Journal of Microelectromechanical Systems, 2008.06, Vol.17, No.3, 623-631	1-13
A	Erez Braun et al., DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire, Nature, 1998.02.19, Vol.391, 775-778	1-13

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 8 2 9 8	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N27/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N27/04(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 (IPC)) Int.Cl. G01N27/00-27/10, G01N27/14-27/24, G01N33/48-33/98, C12Q1/00-3/00			
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用了用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)			
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	
A	JP 2005-520130 A (インテグレイティッド ナノテクノロジーズ エルエルシー) 2005.07.07, 全文全図 & US 2003/0203384 A1 & EP 1487996 A & WO 03/076902 A2 & CA 2478096 A1 & AU 2003218047 A	1-13	
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 06.01.2015		国際調査報告の発送日 13.01.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 蔵田 真彦	2W 3602
		電話番号 03-3581-1101 内線 3250	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2014/078298
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
A	JP 2008-501122 A (ナノゲン・インコーポレイテッド) 2008.01.17, 全文全図 & US 2006/0134657 A1 & EP 1749108 A & WO 2005/118870 A2 & CA 2567114 A1	1-13
A	JP 2013-013375 A (東ソー株式会社) 2013.01.24, 全文全図 (ファミリーなし)	1-13
A	JP 2007-512810 A (ジーンオーム サイエンス、インク) 2007.05.24, 全文全図 & US 2005/0186590 A1 & EP 1687406 A & WO 2005/047474 A2 & DE 602004025371 D & CA 2545356 A1 & AT 456678 T & AU 2004290036 A	1-13
A	M. Kumemura et al., Direct bio-mechanical sensing of enzymatic reaction on DNA by silicon nanotweezers, 2010 IEEE 23rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2010, 915-918	1-13
A	Chritsophe Yamahata et al., Silicon Nanotweezers With Subnanometer Resolution for the Micromanipulation of Biomolecules, Journal of Microelectromechanical Systems, 2008.06, Vol.17, No.3, 623-631	1-13
A	Erez Braun et al., DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire, Nature, 1998.02.19, Vol.391, 775-778	1-13

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 藤田 博之

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 カルステン スタニスラフ エル

アメリカ合衆国、90755 カリフォルニア州シグナル ヒル、イースト 28番ストリート
1655

(72)発明者 コラル ドミニク

東京都目黒区駒場四丁目6番1号 国立大学法人東京大学生産技術研究所内

(72)発明者 久米村 百子

東京都目黒区駒場四丁目6番1号 国立大学法人東京大学生産技術研究所内

Fターム(参考) 2G060 AA15 AA19 AD06 AF02 AF03 AF08 AF20 AG10 AG15 GA04
JA07 KA09
4B063 QA18 QQ42 QR08 QR32 QR42 QR50 QR55 QR62 QR82 QS25
QS28 QS34 QS36 QS39 QX04

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。