

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4911639号  
(P4911639)

(45) 発行日 平成24年4月4日(2012.4.4)

(24) 登録日 平成24年1月27日(2012.1.27)

(51) Int. Cl.	F I
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 5 W
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 5 U
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 0 1 J
<b>CO 7 K 17/14 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 1 A
	C 1 2 Q 1/68 A
	請求項の数 2 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-307030 (P2008-307030)	(73) 特許権者	899000068
(22) 出願日	平成20年12月2日 (2008.12.2)		学校法人早稲田大学
(62) 分割の表示	特願2003-321535 (P2003-321535) の分割		東京都新宿区戸塚町1丁目104番地
原出願日	平成15年9月12日 (2003.9.12)	(74) 代理人	100079304
(65) 公開番号	特開2009-103703 (P2009-103703A)		弁理士 小島 隆司
(43) 公開日	平成21年5月14日 (2009.5.14)	(74) 代理人	100114513
審査請求日	平成20年12月19日 (2008.12.19)		弁理士 重松 沙織
		(74) 代理人	100120721
			弁理士 小林 克成
		(72) 発明者	逢坂 哲彌
			東京都新宿区大久保三丁目4番1号 学校 法人早稲田大学理工学部内
		(72) 発明者	新垣 篤史
			東京都新宿区大久保三丁目4番1号 学校 法人早稲田大学大学院理工学研究科内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンシング方法及び固定化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ターゲット分子とキャプチャー分子との生体分子間相互作用を検出するバイオセンシング方法であって、

シリコン基板を酸化処理してその表面にシリコン酸化膜を形成した基板、又は金属基板若しくは樹脂基板を表面処理してシリコン酸化膜を形成した基板の、該シリコン酸化膜上に、ターゲット分子及びキャプチャー分子に対して反応性を有さないアルコキシシランの有機単分子膜が被覆されたテンプレート領域と、上記シリコン酸化膜が露出した生体分子固定領域とを、上記テンプレート領域が上記生体分子固定領域を取り囲むように形成し、上記生体分子固定領域のシリコン酸化膜に、ターゲット分子を、アミノ系又はカルボキシル系の官能基を少なくとも1個含有し、炭素数3～20の直鎖状炭化水素基を有するアルコキシシランであり、上記有機単分子膜とは反応せず、上記シリコン酸化膜と反応して該シリコン酸化膜と上記ターゲット分子とを連結する連結分子を介して上記シリコン酸化膜に結合させて固定化し、次いで、上記生体分子固定領域に固定化されたターゲット分子に選択的に結合するキャプチャー分子を、表面に該表面と上記キャプチャー分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに固定化した磁性微粒子を、上記ターゲット分子とキャプチャー分子とを結合させることによって上記シリコン酸化膜上に固定化して、或いは上記生体分子固定領域のシリコン酸化膜に、ターゲット分子に選択的に結合するキャプチャー分子を、アミノ系又はカルボキシル系の官能基を少なくとも1個含有し、炭素数3～20の直鎖状炭化水素基を有するアルコキシシランであり、上記有機単分子膜とは反応せ

ず、上記シリコン酸化膜と反応して該シリコン酸化膜と上記キャプチャー分子とを連結する連結分子を介して上記シリコン酸化膜に結合させて固定化し、次いで、上記生体分子固定領域に固定化されたキャプチャー分子と結合させるターゲット分子を、表面に該表面と上記ターゲット分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに固定化した磁性微粒子を、上記ターゲット分子とキャプチャー分子とを結合させることによって上記シリコン酸化膜上に固定化して、

上記固定化された磁性微粒子の磁気をシグナルとして上記基板上に固定化されたターゲット分子を検出することを特徴とするバイオセンシング方法。

【請求項 2】

ターゲット分子とキャプチャー分子との生体分子間相互作用を検出するバイオセンシングにおいて、ターゲット分子又はキャプチャー分子を基板上に固定化する方法であって、シリコン基板を酸化処理してその表面にシリコン酸化膜を形成した基板、又は金属基板若しくは樹脂基板を表面処理してシリコン酸化膜を形成した基板の、該シリコン酸化膜上に、ターゲット分子及びキャプチャー分子に対して反応性を有さないアルコキシシランの有機単分子膜が被覆されたテンプレート領域と、上記シリコン酸化膜が露出した生体分子固定領域とを、上記テンプレート領域が上記生体分子固定領域を取り囲むように形成し、上記生体分子固定領域のシリコン酸化膜に、ターゲット分子を、アミノ系又はカルボキシル系の官能基を少なくとも 1 個含有し、炭素数 3 ~ 20 の直鎖状炭化水素基を有するアルコキシシランであり、上記有機単分子膜とは反応せず、上記シリコン酸化膜と反応して該シリコン酸化膜と上記ターゲット分子とを連結する連結分子を介して結合させて、或いは上記生体分子固定領域のシリコン酸化膜に、ターゲット分子に選択的に結合するキャプチャー分子を、アミノ系又はカルボキシル系の官能基を少なくとも 1 個含有し、炭素数 3 ~ 20 の直鎖状炭化水素基を有するアルコキシシランであり、上記有機単分子膜とは反応せず、上記シリコン酸化膜と反応して該シリコン酸化膜と上記キャプチャー分子とを連結する連結分子を介して結合させて固定化することを特徴とする固定化方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体関連物質の検出/定量に有効なバイオセンシング方法、並びにターゲット分子及びキャプチャー分子の固定化方法に関する。

【背景技術】

【0002】

バイオセンシングと呼ばれる生体分子間相互作用の検出は、臨床現場における遺伝子診断、各種イムノアッセイ、創薬におけるリガンドスクリーニングなど、医療分野への応用が望まれている。現在、生体分子間相互作用の検出に蛍光物質や発光物質をマーカーとして用いる手法が主流であるが、これらは物質の特性上の問題から定量性や再現性に乏しいものである。

【0003】

一方、磁性微粒子を用いた磁気検出法は、シグナルの減衰が起こらないことから安定しており、高い検出感度が得られることが期待できるものである。このような生体分子間相互作用を磁気を利用して検出する磁気検出法について、現在までに様々な報告がなされているが、これらは特殊な大型装置を必要とするものであり、これまで、汎用性を有しながら、簡便、迅速な測定を達成したものは示されていない。特開 2002 - 501174 号公報（特許文献 1）には、コンパクトディスク上に固定した DNA 又はタンパク質を磁性流体の磁性により検出することができるとの記載があるが、コンパクトディスク上の捕獲物質分子の固定面が不均一であるため、十分な感度や精度でシグナルを検出することができず、シグナルの安定性も悪い。そのため、生体分子間相互作用に由来するシグナルを安定的に発生させることができると共に、このシグナルを高精度かつ高感度で検出することができるバイオセンシング方法が望まれていた。

【0004】

10

20

30

40

50

【特許文献1】特開2002-501174号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、上記事情に鑑みなされたもので、生体分子間相互作用に由来するシグナルを安定的に発生させることができると共に、このシグナルを高精度、かつ高感度で検出することができ、汎用性を有しながら、効率的に生体分子間相互作用を検出することができるバイオセンシング方法を提供することを目的とする。また、本発明は、ターゲット分子とキャプチャー分子との生体分子間相互作用を検出するバイオセンシングにおいて、生体分子間相互作用に由来するシグナルを安定的に発生させることができると共に、このシグナルを高精度、かつ高感度で検出することができるターゲット分子又はキャプチャー分子の固定化方法を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、上記目的を達成するため鋭意検討を重ねた結果、基板上に、ターゲット分子及びキャプチャー分子に対して反応性を有さない単分子膜が被覆されたテンプレート領域と基板面が露出した生体分子固定領域とを、上記テンプレート領域が上記生体分子固定領域を取り囲むように形成し、上記生体分子固定領域の基板面に、ターゲット分子を、上記基板面と上記ターゲット分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに結合させて、或いは上記生体分子固定領域の基板面に、ターゲット分子に選択的に結合するキャプチャー分子を、上記基板面と上記キャプチャー分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに結合させて固定化することにより、基板上で生体反応を行う際に問題となる、生体分子や磁性微粒子の非特異的な吸着を防止することが可能となり、ターゲット分子又はキャプチャー分子の固定化状態を制御して所望の位置に選択的に固定化することができ、ノイズを低減できることから高い検出感度、検出精度が達成できることを見出した。

20

【0007】

更に、上記固定化されたターゲット分子に選択的に結合するキャプチャー分子を表面に該表面と上記キャプチャー分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに固定化した磁性微粒子を、上記ターゲット分子とキャプチャー分子とを結合させることによって上記基板上に固定化すること、或いは上記固定化されたキャプチャー分子と結合させるターゲット分子を表面に該表面と上記ターゲット分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに固定化した磁性微粒子を、上記ターゲット分子とキャプチャー分子とを結合させることによって上記基板上に固定化することにより、固定化された磁性微粒子の磁気をシグナルとしてターゲット分子を検出することができ、生体分子間相互作用に由来するシグナルを安定的に発生させて、このシグナルを高精度、かつ高感度で検出することができること、これにより汎用性を有しながら、効率的に生体分子間相互作用を検出することができることを見出し、本発明をなすに至った。

30

【0008】

即ち、本発明は、

(1) ターゲット分子とキャプチャー分子との生体分子間相互作用を検出するバイオセンシング方法であって、

40

シリコン基板を酸化処理してその表面にシリコン酸化膜を形成した基板、又は金属基板若しくは樹脂基板を表面処理してシリコン酸化膜を形成した基板の、該シリコン酸化膜上に、ターゲット分子及びキャプチャー分子に対して反応性を有さないアルコキシシランの有機単分子膜が被覆されたテンプレート領域と、上記シリコン酸化膜が露出した生体分子固定領域とを、上記テンプレート領域が上記生体分子固定領域を取り囲むように形成し、上記生体分子固定領域のシリコン酸化膜に、ターゲット分子を、アミノ系又はカルボキシル系の官能基を少なくとも1個含有し、炭素数3～20の直鎖状炭化水素基を有するアルコキシシランであり、上記有機単分子膜とは反応せず、上記シリコン酸化膜と反応して該シリコン酸化膜と上記ターゲット分子とを連結する連結分子を介して上記シリコン酸化膜

50

に結合させて固定化し、次いで、上記生体分子固定領域に固定化されたターゲット分子に選択的に結合するキャプチャー分子を、表面に該表面と上記キャプチャー分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに固定化した磁性微粒子を、上記ターゲット分子とキャプチャー分子とを結合させることによって上記シリコン酸化膜上に固定化して、或いは上記生体分子固定領域のシリコン酸化膜に、ターゲット分子に選択的に結合するキャプチャー分子を、アミノ系又はカルボキシル系の官能基を少なくとも1個含有し、炭素数3～20の直鎖状炭化水素基を有するアルコキシシランであり、上記有機単分子膜とは反応せず、上記シリコン酸化膜と反応して該シリコン酸化膜と上記キャプチャー分子とを連結する連結分子を介して上記シリコン酸化膜に結合させて固定化し、次いで、上記生体分子固定領域に固定化されたキャプチャー分子と結合させるターゲット分子を、表面に該表面と

10

上記ターゲット分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに固定化した磁性微粒子を、上記ターゲット分子とキャプチャー分子とを結合させることによって上記シリコン酸化膜上に固定化して、

上記固定化された磁性微粒子の磁気をシグナルとして上記基板上に固定化されたターゲット分子を検出することを特徴とするバイオセンシング方法、及び

(2) ターゲット分子とキャプチャー分子との生体分子間相互作用を検出するバイオセンシングにおいて、ターゲット分子又はキャプチャー分子を基板上に固定化する方法であつて、

シリコン基板を酸化処理してその表面にシリコン酸化膜を形成した基板、又は金属基板若しくは樹脂基板を表面処理してシリコン酸化膜を形成した基板の、該シリコン酸化膜上に

20

、ターゲット分子及びキャプチャー分子に対して反応性を有さないアルコキシシランの有機単分子膜が被覆されたテンプレート領域と、上記シリコン酸化膜が露出した生体分子固定領域とを、上記テンプレート領域が上記生体分子固定領域を取り囲むように形成し、上記生体分子固定領域のシリコン酸化膜に、ターゲット分子を、アミノ系又はカルボキシル系の官能基を少なくとも1個含有し、炭素数3～20の直鎖状炭化水素基を有するアルコキシシランであり、上記有機単分子膜とは反応せず、上記シリコン酸化膜と反応して該シリコン酸化膜と上記ターゲット分子とを連結する連結分子を介して結合させて、或いは上記生体分子固定領域のシリコン酸化膜に、ターゲット分子に選択的に結合するキャプチャー分子を、アミノ系又はカルボキシル系の官能基を少なくとも1個含有し、炭素数3～20の直鎖状炭化水素基を有するアルコキシシランであり、上記有機単分子膜とは反応せず、上記シリコン酸化膜と反応して該シリコン酸化膜と上記キャプチャー分子とを連結する連結分子を介して結合させて固定化することを特徴とする固定化方法

30

を提供する。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、生体分子間相互作用に由来するシグナルを安定的に発生させることができると共に、このシグナルを高精度、かつ高感度で検出することができ、汎用性を有しながら、効率的に生体分子間相互作用を検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下、本発明について更に詳しく説明する。

本発明においては、基板上にバイオセンシングにより検出する生体分子であるターゲット分子又はターゲット分子に選択的に結合するキャプチャー分子を固定化する。そのために、まず、基板上にバイオセンシングにより検出する生体分子であるターゲット分子及びターゲット分子に選択的に結合するキャプチャー分子に対して反応性を有さない単分子膜が被覆されたテンプレート領域と基板面が露出した生体分子固定領域とを、上記テンプレート領域が上記生体分子固定領域を取り囲むように形成する。

40

【0011】

基板上にこれらの領域を形成する方法としては、まず、基板上に有機化合物等の単分子膜を形成し、これをパターンニングして、部分的に基板面を露出させることにより可能であ

50

る。ここで、基板としては、シリコン等の金属基板、樹脂基板などを用いることができ、形成する単分子膜の種類に応じて、必要により所望の表面処理を施したものをを用いることも可能である。

#### 【0012】

具体的には、図1に示されるように、例えば、シリコン基板1を酸化処理してその表面にシリコン酸化膜2を形成した基板の酸化膜上に、アルコキシシランの単分子膜等の有機単分子膜3を形成し、この上に粒子線（紫外線、電子線、X線等）レジスト4を塗布し、粒子線によってパターンニングを行い（図1（A））、その後、パターン下部の露出した有機単分子膜を酸素プラズマエッチングなどの手法を用いて除去し（図1（B））、レジストを剥離することによりテンプレート領域5及び生体分子固定領域6を形成（図1（C））することができる。

10

#### 【0013】

この場合、形成する有機単分子膜としては、非反応性の好ましくは炭素数8～20の直鎖アルキル又はフッ素化アルキル基を有するアルコキシシランによる単分子膜が挙げられる。有機単分子膜としては、基板上に均一な膜を形成させるため、自己集積化膜であることが望ましい。より具体的には、アルキルシラン： $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、フッ素化アルキルシラン： $\text{C}_8\text{H}_9\text{F}_9\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 等が挙げられる。また、有機単分子膜としてアルコキシシランを用いる場合、基板としては表面にシリコン酸化膜が形成されたものが好適である。

#### 【0014】

このような有機単分子膜は、有機単分子膜となる有機分子を気相中基板上に移動させて吸着させる気相化学反応法などにより成膜が可能である。

20

#### 【0015】

次に、上述したような方法により形成した生体分子固定領域の基板面に、ターゲット分子を、基板面とターゲット分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに結合させて、或いはキャプチャー分子を、基板面とキャプチャー分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに結合させて固定化する。この場合、ターゲット分子又はキャプチャー分子が基板面にそのまま結合するものであれば直接固定化することができ、ターゲット分子又はキャプチャー分子が基板面に直接結合しないものであれば連結分子を介して結合させることができる。基板面とターゲット分子又はキャプチャー分子とを連結する連結分子は、1種

30

#### 【0016】

本発明においては、このような生体分子であるターゲット分子を、基板上に形成した生体分子固定領域に固定化するが、ターゲット分子又はキャプチャー分子を、基板面とターゲット分子又はキャプチャー分子とを連結する連結分子を介して固定化する場合、このような連結分子としては、上述した有機単分子膜とは反応せず、基板面と反応して結合するものである必要がある。

#### 【0017】

有機単分子膜として上述したようなアルコキシシランを用いる場合、連結分子としては、例えば、反応性の官能基、特にアミノ系の官能基（ $\text{NH}_2-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}-$ 、 $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}-$ 等）又はカルボキシル系の官能基（ $-\text{COOH}$ 等）を少なくとも1個含有する炭素数3～20の直鎖状炭化水素基（アルキル基等）を有するアルコキシシランを用いることが好適である。これらのアルコキシシランは、特に、基板としてシリコン酸化膜が形成されたものをを用いた場合、シリコン酸化膜と結合させることができるため好適である。

40

#### 【0018】

この場合、アミノ系の官能基、カルボキシル系の官能基等の反応性官能基に置換可能な基、例えば $\text{Br}-$ 、 $-\text{CN}$ 等のアミノ誘導基を有するアルコキシシランを用いて単分子膜を形成後、これらアミノ誘導基をアミノ基に置換する方法で導入することもできる。

#### 【0019】

なお、基板としてシリコン酸化膜が形成されたものをを用いる場合、連結分子としては、

50

密着性等の点でトリアルコキシシランが好ましく、またアルコキシ基としては炭素数 1 ~ 3 のアルコキシ基 ( - O R : R は一価炭化水素基を表す )、特にメトキシ基 ( - O C H <sub>3</sub> )、エトキシ基 ( - O C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) が好ましい。より具体的には、N H <sub>2</sub> ( C H <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> S i ( O C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> 等の活性官能基を有するトリアルコキシシランが挙げられる。

【 0 0 2 0 】

このような連結分子は、連結分子を含む溶液中に有機単分子膜からなるテンプレート領域と基板面が露出した生体分子固定領域を形成した基板を浸漬することにより生体分子固定領域内の基板面上に導入することが可能である。

【 0 0 2 1 】

本発明において、生体分子であるターゲット分子として、抗原、抗体、核酸、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、糖類、脂質、その他の生体高分子、生体関連低分子、生体に対する毒物 / 有害物質イオンやこれらの複合体等を対象とすることができる。

10

【 0 0 2 2 】

より具体的には、血清、だ液、糞尿、精液、各種細胞、細胞抽出液、環境中における水、土壌、生物、微生物、食品、化粧品等に含まれる抗原、抗体、核酸、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、糖類、脂質、その他の生体高分子、生体関連低分子、生体に対する毒物 / 有害物質イオン、これらの複合体などが挙げられる。

【 0 0 2 3 】

本発明において、キャプチャー分子は、ターゲット分子に選択的に結合するものであって、検出しようとするターゲット分子に応じて適宜選択される。例えば、ビオチンをターゲット分子とする場合は、アビジンを用いることができ、DNA をターゲット分子とする場合は、その DNA に適合する DNA 検出プローブを用いることができる。

20

【 0 0 2 4 】

このようなターゲット分子又はキャプチャー分子は、ターゲット分子又はキャプチャー分子が含まれる溶液を必要に応じて連結分子を導入した生体分子固定領域上に滴下することにより固定化することができる。

【 0 0 2 5 】

次に、キャプチャー分子又はターゲット分子を表面に固定化した磁性微粒子について説明する。

本発明においては、生体分子固定領域に固定化されたターゲット分子に選択的に結合するキャプチャー分子を、表面に該表面とキャプチャー分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに固定化した磁性微粒子を用い、これを上述したように基板上の生体分子固定領域に固定化したターゲット分子と結合させる。或いは、生体分子固定領域に固定化されたキャプチャー分子と結合させるターゲット分子を表面に該表面とターゲット分子とを連結する連結分子を介して又は介さずに固定化した磁性微粒子を用い、これを上述したように基板上の生体分子固定領域に固定化したキャプチャー分子と結合させる。

30

【 0 0 2 6 】

この場合、キャプチャー分子又はターゲット分子は、例えば、鉄酸化物、鉄化合物、ニッケル化合物、コバルト化合物等の磁性を有する微粒子に固定化する。磁性微粒子の大きさは基板上に固定化したときの検出面のラフネスを決定するため小さい方が望ましく、磁性微粒子の大きさはミクロンサイズ以下、特にナノサイズのものが好ましい。より具体的には、10 μ m 以下で超常磁性にならないもの、特に 5 ~ 400 n m、とりわけ 5 ~ 200 n m のものが好ましく挙げられる。しかしながら、磁性微粒子はあまり小さいと超常磁性となり検出が困難になるおそれがある。なお、超常磁性になる大きさは物質により異なる。

40

【 0 0 2 7 】

磁性微粒子へのキャプチャー分子又はターゲット分子の固定化は、キャプチャー分子又はターゲット分子が磁性微粒子と直接結合するものであれば直接固定化することができるが、キャプチャー分子又はターゲット分子が基板面に直接結合しないものであれば連結分子を介して結合させることができる。基板面とキャプチャー分子又はターゲット分子とを

50

連結する連結分子は、1種単独であっても2種以上を連鎖させてもよい。連結分子としては、例えば、反応性の官能基、特にアミノ系の官能基( $\text{NH}_2-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}-$ 、 $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}-$ 等)又はカルボキシル系の官能基( $-\text{COOH}$ 等)を少なくとも1個含有する炭素数3~20の直鎖状炭化水素基(アルキル基等)を有するアルコキシシランを用いることができる。

**【0028】**

この場合、アミノ系の官能基、カルボキシル系の官能基等の反応性官能基に置換可能な基、例えば $\text{Br}-$ 、 $-\text{CN}$ 等のアミノ誘導基を有するアルコキシシランを用いて単分子膜を形成後、これらアミノ誘導基をアミノ基に置換する方法で導入することもできる。

**【0029】**

なお、アルコキシシランとしては、トリアルコキシシランが好ましく、またアルコキシ基としては炭素数1~3のアルコキシ基( $-\text{OR}$ : Rは一価炭化水素基を表す)、特にメトキシ基( $-\text{OCH}_3$ )、エトキシ基( $-\text{OC}_2\text{H}_5$ )が好ましい。より具体的には、 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 等の活性官能基を有するトリアルコキシシランが挙げられる。また、連結するキャプチャー分子又はターゲット分子によっては、非反応性の好ましくは炭素数8~20の直鎖アルキル又はフッ素化アルキル基を有するアルコキシシランを用いることもできる。具体的には、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 等の不活性官能基を有するトリアルコキシシランが挙げられる。

**【0030】**

このような連結分子は、連結分子を含む溶液中に磁性微粒子を浸漬することにより磁性微粒子表面上に導入することが可能である。

**【0031】**

またキャプチャー分子又はターゲット分子は、キャプチャー分子又はターゲット分子が含まれる溶液に必要な応じて連結分子を導入した磁性微粒子を分散させて反応させることにより固定化することができる。

**【0032】**

次に、磁性微粒子上に固定化されたキャプチャー分子又はターゲット分子を、生体分子固定領域に固定化されたターゲット分子又はキャプチャー分子に結合させることによって上記基板上に磁性微粒子を固定化する。この固定化は、キャプチャー分子又はターゲット分子を固定化した磁性微粒子を分散させた分散液をターゲット分子又はキャプチャー分子が固定化された生体分子固定領域に滴下することにより可能である。

**【0033】**

キャプチャー分子は対応するターゲット分子と選択的に結合するため、生体分子固定領域以外の部分、即ち、テンプレート領域や、対応するターゲット分子が存在しない生体分子固定領域には磁性微粒子は固定化されない。そのため、磁性微粒子は、ターゲット分子又はキャプチャー分子が存在する生体分子固定領域上のみ固定される。また、固定化される磁性微粒子の量は存在するターゲット分子の量によって決まる。

**【0034】**

基板上に固定化された磁性微粒子は、そのまま磁気を有しているためこの磁気をシグナルとして上記基板上に固定化されたターゲット分子を検出、定量することができる。また、必要に応じて、更に、マイクロメートル領域に磁場を引加できる素子等を用いて着磁することも可能である。磁気検出、定量には、振動試料型磁力計(VSM)等の磁気計測装置、光磁気計測装置、磁気力顕微鏡等を用いることが可能である。また、電磁誘導を利用したインダクティブヘッド、磁気抵抗効果や巨大磁気抵抗効果を利用したMR、GMRヘッド等の磁気ヘッドを用いた磁気計測装置を用いることも可能である。更に、基板上の磁気微粒子は磁気シグナルが長期に亘って安定したシグナルとして残存するため、サンプルの保存が可能であり、半永久的にシグナルの測定が可能である。

**【0035】**

なお、本発明の方法においては、磁性微粒子の像を確認することにより、ターゲット分

10

20

30

40

50

子を検出することも可能であり、この場合、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡などの走査型プローブ顕微鏡等を用いて、磁性微粒子の像から磁性微粒子の有無を観察することによりターゲット分子を検出することも可能である。

#### 【0036】

更に、ディスク状の基板を用い、これを回転させながら検出器を基板上で走査すれば、連続して多数のサンプルを迅速かつ、簡便に検出、定量することが可能である。また、同一の基板上で、種類の異なるターゲット分子 - キャプチャー分子間の反応（相互作用）を同時に検出することも可能である。

#### 【0037】

なお、磁性微粒子には、キャプチャー分子又はターゲット分子と共に蛍光物質を固定化することが可能である。この場合、キャプチャー分子として、蛍光物質が固定化されたキャプチャー分子を用いることも可能である。このようなものとしては、Cy2、Cy5、FITC、Rhodamine等の蛍光色素の他、GFP等の蛍光タンパク質、蛍光タンパク質もしくは蛍光物質が固定化されたキャプチャー分子が修飾されたCdSeなどの半導体ナノ微粒子（量子ドット）などが挙げられる。蛍光物質を固定することにより、蛍光による検出も可能となり、検出の信頼性を向上させることができる。この場合、蛍光の検出には、蛍光スキャナ、蛍光顕微鏡等を用いることが可能である。

10

#### 【0038】

本発明は、生体分子間反応の検出/定量が可能な方法であり、医療分野において必要とされる遺伝子、疾患の診断等における各種アッセイ、環境分野における物質計測、食品分野における生物種判別等の用途において有効な方法である。

20

#### 【実施例】

#### 【0039】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【0040】

##### [実施例1]

##### 生体分子固定化

基板として、シリコンウェハの表面にシリコン酸化膜を950のドライ酸化によって形成したものをを用いた。これを、硫酸過水（硫酸：過酸化水素 = 4：1）で10分間、120、続いてアンモニア過水（アンモニア：過酸化水素：水 = 1：1：5）で10分間、80の条件で洗浄し、ドライ窒素で乾燥後、疎水性単分子膜（ODMS：n-オクタデシルトリメトキシシラン）をシリコン酸化膜上に成膜した。成膜は、0.2mlのODMSを含む20cm<sup>3</sup>のテフロン（登録商標）容器に基板を封入し、露点-80のドライルーム中で110にて3～5時間以上気相化学反応させる方法で行った。ODMSの膜厚は、エリプソメーターによって測定され、1.7～2.1nmであることが確認された。この結果は、ODMSが単分子膜であることを示している。

30

#### 【0041】

次に、表面に疎水性単分子膜を成膜した基板の上に、UVフォトリソグラフィー及び酸素プラズマエッチングにより30μm径のシリコン酸化膜が露出したドットパターンを形成した。この基板を1%アミノプロピルトリメトキシシラン（APTES）を含むトルエン溶液中に60で、10分間浸漬することにより、ドット内のシリコン酸化膜上にAPTESを導入した。

40

#### 【0042】

次に、アミノ基との反応性を有する7.5mmol/lのSulfo-NHS-LC-LC-ビオチンを基板上に滴下し、1時間静置し、洗浄することにより基板上にビオチンを固定化した。

#### 【0043】

このビオチンを固定化した基板について、別途、40μg/mlに調製したCy2-アビジン溶液を滴下し、ビオチン-アビジン反応を1時間行い、洗浄を行ったところ、蛍光

50



顕微鏡によりドットパターンに特異的な蛍光が観察され、基板上におけるビオチンの固定化が確認された(図2(A))。

#### 【0044】

##### 生体分子固定化磁性微粒子の調製

10% APTESを含むトルエン溶液中に粒径が約200nmの磁性微粒子( $Fe_3O_4$ : マグネタイト)を加え、分散させながら、60℃にて30分間反応した。次に、メタノール及び水を用いて十分洗浄し、得られたAPTESを導入した磁性微粒子を、7.5mmol/l Sulfon-NHS-LC-LC-ビオチンを含むTris buffer (10mmol/l, pH7.4)中で分散させながら1時間反応した。次に、ビオチン固定化磁性微粒子を50 $\mu$ mol/l アビジン溶液に分散させながら1時間反応してアビジン固定化磁性微粒子を得た。反応後、磁性微粒子は繰り返し洗浄することで精製した。

10

#### 【0045】

得られた粒子を蛍光顕微鏡により観察したところ、アビジンが固定化されていることが確認された(図2(B))。また、粒度分布計を用いて得られた粒子の分散性について評価したところ、溶液中でほぼ単一粒子として分散していることが確認された。

#### 【0046】

##### ビオチン固定化基板に対するアビジン固定化磁性微粒子の固定化

ビオチン固定化基板に対するアビジン固定化磁性微粒子の反応は、20 $\mu$ lのTris buffer (10mmol/l, pH7.4)中に分散した1~100 $\mu$ g/mlの粒子を含む溶液を基板ドット上に滴下し、10~30分間、室温にて静置することで行った。反応後、基板を洗浄することで非特異的に吸着した粒子を除去した。

20

#### 【0047】

##### 基板上に固定化した磁性微粒子の顕微鏡観察

アビジン固定化磁性微粒子のビオチン固定化基板に対する反応について、各種顕微鏡を用いた詳細な観察を行った。光学顕微鏡観察から、ビオチン-アビジン反応による磁性微粒子の基板上への固定化が確認された(図3(A))。また、基板ドット内に固定化された磁性微粒子の詳細を観察するため、透過型電子顕微鏡(SEM)による評価を行った(図3(B))。ドット内には粒径約200nmの磁性微粒子の存在が確認された。この結果から、生体分子間相互作用により粒子はドット内部にのみ、選択的に固定化されていることが確認された。

30

#### 【0048】

##### タンパク質-小分子間反応の検出

ビオチン固定化基板に対してアビジン固定化磁性微粒子を固定化した基板を、原子間力顕微鏡(AFM)及び磁気力間顕微鏡(MFM)により観察した。図4(A)に基板ドット内部のAFM写真、図4(B)にMFM写真を示す。AFM観察から得られた凹凸像に対応する明瞭な磁場像がMFMによって観察された。一方、蛍光顕微鏡により、ドットパターンに対応する粒子に標識されたCy2由来の蛍光像も観察された(図4(C))。

#### 【0049】

##### [ 実施例2 ]

##### 生体分子固定化

実施例1と同様の方法でAPTESを導入した基板を得、この基板に、10mmol/lのSulfon-LC-LC-SPDP溶液を基板表面に滴下し、1時間反応後、基板を洗浄し、続いて25 $\mu$ mol/lのターゲットDNA(オリゴヌクレオチド:5'SH-TTTT TTTTTTTTTTTTTTTT-3'FITC)溶液25 $\mu$ lを滴下し、1時間静置することで固定化を行った。洗浄後、蛍光顕微鏡を用いて固定化したターゲットDNAを確認したところ、FITC由来の蛍光像が観察された(図5(A))。

40

#### 【0050】

##### 生体分子固定化磁性微粒子の調製

10% APTESを含むトルエン溶液中に粒径が約200nmの磁性微粒子( $Fe_3O_4$ : マグネタイト)を加え、分散させながら、60℃にて30分間反応した。次に、メタノ

50

ール及び水を用いて十分洗浄し、得られた APTES を導入した磁性微粒子を、 $7.5 \text{ mol/l}$  Sulfon-NHS-LC-LC-ビオチンを含む Tris buffer ( $10 \text{ mmol/l}$ ,  $\text{pH} 7.4$ ) 中で分散させながら 1 時間反応した。次に、ビオチン固定化磁性微粒子を  $50 \text{ } \mu\text{mol/l}$  アビジン溶液に分散させながら 1 時間反応し、更に、これに  $25 \text{ } \mu\text{mol/l}$  の Rhodamine 標識検出プローブ (オリゴヌクレオチド:  $5'$  biotin-AAAAAAAAAAAAA- $3'$  Rhodamine) を加え、1 時間反応を行った後、洗浄して DNA 検出プローブ固定化磁性微粒子を得た。

#### 【0051】

得られた粒子を蛍光顕微鏡により観察したところ、DNA 検出プローブが固定化されていることが確認された (図 5 (B))。また、粒度分布計を用いて得られた粒子の分散性について評価したところ、溶液中でほぼ単一粒子として分散していることが確認された。

10

#### 【0052】

##### DNA 固定化基板に対する DNA 検出プローブ固定化磁性微粒子の固定化

DNA 固定化基板に対する DNA 検出プローブ固定化磁性微粒子の反応は、 $20 \text{ } \mu\text{l}$  の Tris buffer ( $10 \text{ mmol/l}$ ,  $\text{pH} 7.4$ ) 中に分散した  $1 \sim 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$  の粒子を含む溶液を基板ドット上に滴下し、 $10 \sim 30$  分間、室温にて静置することで行った。反応後、基板を洗浄することで非特異的に吸着した粒子を除去した。

#### 【0053】

##### 基板上に固定化した磁性微粒子の顕微鏡観察

DNA 検出プローブ固定化磁性微粒子の DNA 固定化基板に対する反応について、各種顕微鏡を用いた詳細な観察を行った。光学顕微鏡観察から、DNA 検出プローブと DNA との反応による磁性微粒子の基板上への固定化が確認された。また、基板ドット内に固定化された磁性微粒子の詳細を観察するため、透過型電子顕微鏡 (SEM) による評価を行った。ドット内には粒径約  $200 \text{ nm}$  の磁性微粒子の存在が確認された。この結果から、生体分子間相互作用により粒子はドット内部にのみ、選択的に固定化されていることが確認された。

20

#### 【0054】

##### DNA ハイブリダイゼーションの検出

DNA 固定化基板に対して DNA 検出プローブ固定化磁性微粒子を固定化した基板を、原子間力顕微鏡 (AFM) 及び磁気力間顕微鏡 (MFM) により観察した。AFM 観察から得られた凹凸像に対応する明瞭な磁場像が MFM によって観察された。一方、蛍光スキャナにより、ドットパターンに対応する粒子に標識された Rhodamine 由来の蛍光像も観察された (図 6)。

30

#### 【0055】

##### [ 実施例 3 ]

ディスク状基板を用いて実施例 1 と同様の方法で、ビオチン固定化基板に対してアビジン固定化磁性微粒子を固定化した基板を得た (図 7)。次に、ドット部位の磁性微粒子について振動試料型磁力計 (VSM) を用いて磁気の検出を行ったところ、図 8 に示すように良好なヒステリシスループが得られた。この時の保磁力、残留磁化は  $1750 \text{ e}$ 、 $0.062 \text{ emu/dot}$  であった。また、ドット以外の部位においては、図 9 に示すように磁気は全く検出されなかった。このように、ドット部位のみにおいて磁気信号が検出されることから、ドット部位以外には、磁性微粒子の付着がないことが確認され、また、ドット部位における磁力を磁力検出機器により検出することが可能であることも確認された。

40

#### 【0056】

また、サンプルを着磁し、基板を回転させながら VSM と同種のピックアップコイルを振動させて磁化を検出したところ、磁性微粒子が存在する部分のみにおいて磁化を検出できた。一方、サンプルを  $15 \text{ kOe}$  の磁場を印加したまま、基板を回転させながら VSM と同一のピックアップコイルを振動させて磁化を検出した場合にも、磁性微粒子が存在する部分のみにおいて磁化を検出できた。これらの結果から、基板を回転させながら基板上で磁気検出器を走査することによって基板上の磁性微粒子の磁気検出が可能であることが

50

確認された。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】基板上に単分子膜が被覆されたテンプレート領域と基板面が露出した生体分子固定領域を形成する工程を説明する断面図である。

【図2】実施例1において得られた基板及び磁性微粒子の蛍光顕微鏡写真を示し、(A)生体分子固定領域に固定化されたビオチンにアビジンが反応した状態の蛍光を示す写真、(B)はアビジンが固定化された磁性微粒子の蛍光を示す写真(スケールの長さ=250 $\mu\text{m}$ )である。

【図3】実施例1において、基板上に磁性微粒子が固定化された状態を示す顕微鏡写真であり、(A)は光学顕微鏡写真(スケールの長さ=150 $\mu\text{m}$ )、(B)は走査型電子顕微鏡写真である。

10

【図4】実施例1において、基板上に磁性微粒子が固定化された状態を示す顕微鏡写真であり、(A)は、原子間力顕微鏡写真、(B)は磁気力間顕微鏡写真、(C)は蛍光顕微鏡写真(スケールの長さ=50 $\mu\text{m}$ )である。

【図5】実施例2において得られた基板及び磁性微粒子の蛍光顕微鏡写真を示し、(A)基板上にDNAが固定化された状態の蛍光を示す写真、(B)はDNA検出プローブが固定化された磁性微粒子の蛍光を示す写真(スケールの長さ=250 $\mu\text{m}$ )である。

【図6】実施例2において得られた磁性微粒子が固定化された基板を蛍光スキャナによって読み込んだ蛍光イメージを示す。

20

【図7】実施例3において得られた磁性微粒子が固定化されたディスク状基板の写真である。

【図8】実施例3において得られたディスク状基板上に固定化された磁性微粒子について、振動試料型磁力計を用いて磁気を測定した結果を示すヒステリシスループである。

【図9】実施例3において得られたディスク状基板のドット以外の部位について、振動試料型磁力計を用いて磁気を測定した結果を示すヒステリシスループである。

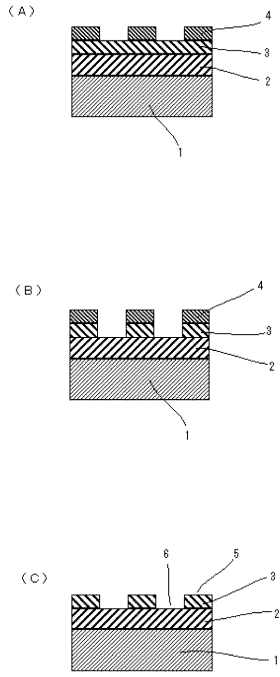
【符号の説明】

【0058】

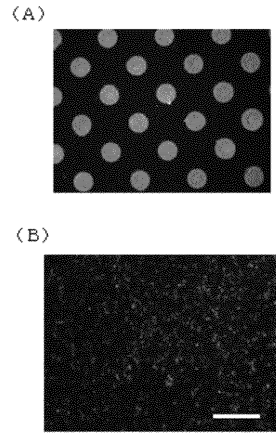
- 1 シリコン基板
- 2 シリコン酸化膜
- 3 有機単分子膜
- 4 レジスト
- 5 テンプレート領域
- 6 生体分子固定領域

30

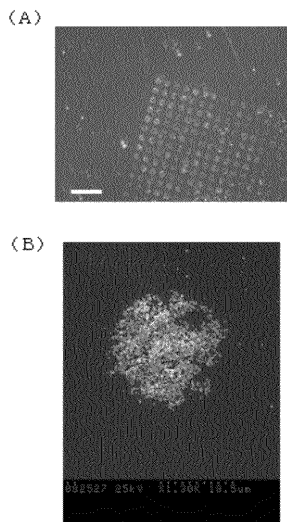
【図1】



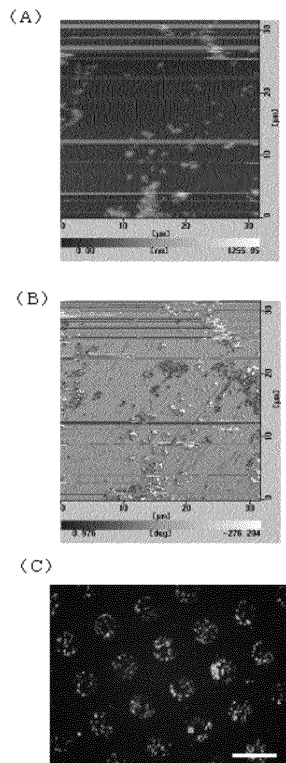
【図2】



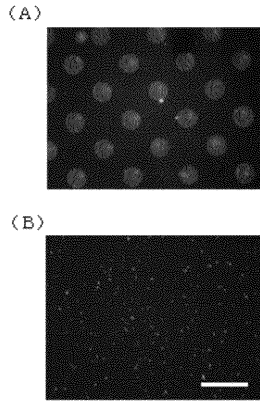
【図3】



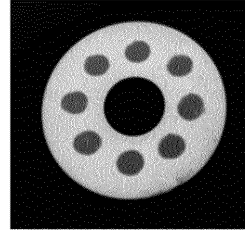
【図4】



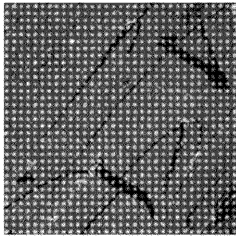
【 図 5 】



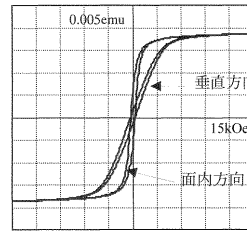
【 図 7 】



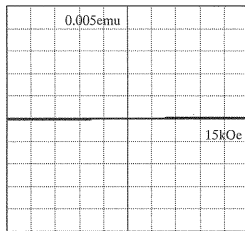
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 15/00 A  
C 0 7 K 17/14

- (72)発明者 丹羽 大介  
東京都新宿区大久保三丁目4番1号 学校法人早稲田大学工学部内
- (72)発明者 横島 時彦  
東京都新宿区大久保三丁目4番1号 学校法人早稲田大学工学総合研究センター内
- (72)発明者 朝日 透  
東京都新宿区大久保三丁目4番1号 学校法人早稲田大学大学院理工学研究科内
- (72)発明者 松永 是  
東京都新宿区大久保三丁目4番1号 学校法人早稲田大学工学総合研究センター内

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特開2001-324816(JP,A)  
特開2001-147230(JP,A)  
特表2002-520620(JP,A)  
特開2003-021635(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 5 4 3  
G 0 3 F 7 / 2 0