

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5328915号
(P5328915)

(45) 発行日 平成25年10月30日(2013.10.30)

(24) 登録日 平成25年8月2日(2013.8.2)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 21/64 (2006.01) GO 1 N 21/64 G

請求項の数 12 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2011-520947 (P2011-520947)	(73) 特許権者	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
(86) (22) 出願日	平成22年6月30日(2010.6.30)	(74) 代理人	110000855 特許業務法人浅村特許事務所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/061124	(72) 発明者	坂井 友幸 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所 中央研究所内
(87) 国際公開番号	W02011/002010	(72) 発明者	曾根原 剛志 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所 中央研究所内
(87) 国際公開日	平成23年1月6日(2011.1.6)	(72) 発明者	芳賀 孝信 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所 中央研究所内
審査請求日	平成23年12月21日(2011.12.21)		
(31) 優先権主張番号	特願2009-158356 (P2009-158356)		
(32) 優先日	平成21年7月3日(2009.7.3)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高感度蛍光検出デバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

入射される光に対して透明な透明基板と、
 生体試料を配置させる開口を設けた非導光膜と、
 前記透明基板と前記非導光膜との間で、前記開口領域を含む領域に設けられ、前記基板の屈折率よりも低い屈折率を有し、前記基板を通して入射される光に対して透明なスペーサ層とを備えた蛍光検出デバイス。

【請求項 2】

前記入射される光の角度は、前記基板と前記スペーサ層の境界面における臨界角以上であることを特徴とする請求項 1 に記載の蛍光検出デバイス。

【請求項 3】

前記開口の径は、入射される光の波長以下の大きさであることを特徴とする請求項 1 に記載の蛍光検出デバイス。

【請求項 4】

前記非導光膜は、金属膜であることを特徴とする請求項 1 に記載の蛍光検出デバイス。

【請求項 5】

前記開口には、前記生体試料を設置する構造体が設けられていることを特徴とする請求項 1 に記載の蛍光検出デバイス。

【請求項 6】

前記構造体は、金属であることを特徴とする請求項 5 に記載の蛍光検出デバイス。

【請求項 7】

前記開口は、前記基板より入射される光に対して透明な材料で充填されていることを特徴とする請求項 1 に記載の蛍光検出デバイス。

【請求項 8】

前記充填された開口上に前記生体試料を配置する構造体が設けられていることを特徴とする請求項 7 に記載の蛍光検出デバイス。

【請求項 9】

光源と、

生体試料を設置するデバイスと、

前記光源からの光が前記生体試料に照射されて発光した蛍光を検出する検出器と、

前記検出器から検出された蛍光を分析する計算器とを有し、

前記デバイスは、前記光源から入射される光に対して透明な透明基板と、前記生体試料を配置させる開口を設けた非導光膜と、前記透明基板と前記非導光膜との間で、前記開口領域を含む領域に設けられ、前記基板の屈折率よりも低い屈折率を有し、前記基板を通して入射される光に対して透明なスペーサ層とを備えたことを特徴とする分析システム。

【請求項 10】

前記光源から前記デバイスに対して照射される光の入射角度は、前記基板と前記スペーサ層との境界面における臨界角以上であることを特徴とする請求項 9 に記載の分析システム。

【請求項 11】

前記デバイスと前記検出器との間にはカバープレートを備え、前記カバープレートと前記デバイスとの間において溶液の流路を構成することを特徴とする請求項 9 に記載の分析システム。

【請求項 12】

前記生体試料は DNA であって、前記計算器は、前記検出器によって検出された蛍光に基づいて、前記 DNA の配列決定を行うことを特徴とする請求項 9 に記載の分析システム。

【発明の詳細な説明】

【参照による取り込み】

【0001】

本出願は、2009年7月3日に提出された日本特許出願第2009-158356号の優先権を主張し、その内容を参照することにより本出願に取り込む。

【技術分野】

【0002】

本発明は、DNA、RNA、又はタンパク質等の生体物質の計測、分析に使用される高感度蛍光検出に関する技術分野に属する。

【背景技術】

【0003】

DNA やタンパク質等の生体物質を計測する手段として、前記物質に蛍光体を標識して、前記蛍光体にレーザ等の励起光を照射して発生する蛍光を検出する方法が一般的である。従来の高感度蛍光検出のための照射検出方式として、例えば非特許文献 1 に記載の全反射エバネッセント照射検出方式がある。前記文献では、蛍光標識生体物質の単分子レベルの高感度イメージングを行っている。石英ガラスに蛍光体 Cy3 標識ヘビメロミオシン固定し、水溶液を滴下する。石英ガラス（高屈折率）と水溶液（低屈折率）の境界面に対して、石英ガラスよりレーザ光を前記境界面の臨界角で照射すると、全反射が起こり、前記境界面の水溶液側にエバネッセント場が生じる。このエバネッセント場により励起された蛍光体 Cy3 の蛍光を、レーザ光照射側の反対側から、対物レンズを用いて 2 次元検出器である CCD 上に結像することによって検出される。エバネッセント場では、励起光強度が屈折率境界平面から離れるに従って指数関数的に減衰するため、落射蛍光検出方式と比較して励起光照射体積および蛍光検出体積を大幅に低減することができ、対象とする生

10

20

30

40

50

体分子に標識された蛍光体以外の遊離の蛍光体の蛍光発光や水のラマン散乱を始めとする背景光を飛躍的に低減することが可能となる。

【0004】

一方、非特許文献2および特許文献1では、全反射エバネッセント照射検出方式よりも励起光照射体積の一層の低減が可能となるナノ開口照射検出方式によって、蛍光検出の感度を更に向上させている。ガラス基板の表面に直径50nmの微小開口(ナノ開口)を有する膜厚約100nmの平板上のAl薄膜を成膜する。ガラス基板のAl薄膜が成膜されている面とは反対の面よりレーザー光を前記面に対して直角に照射すると、前記微小開口内部にエバネッセント場が生じる。エバネッセント場では、励起光強度がナノ開口底平面から離れるに従って指数関数的に減衰する。更に、ナノ開口エバネッセント照射検出方式では、全反射エバネッセント照射検出法と異なり、ガラス基板と平行方向の励起光照射幅が開口径すなわち50nmに限定されるため、励起光照射体積が一層低減される。このため、遊離の蛍光体の蛍光発光や水のラマン散乱を始めとする背景光を飛躍的に低減することが可能となる。その結果、より高濃度の遊離の蛍光体存在下で、対象とする生体分子に標識された蛍光体だけを選択的に検出することが可能となり、非常に高感度な蛍光検出を実現できる。非特許文献2では、ナノ開口照射検出方式を用いて、微小開口内底面部にポリメラーゼを固定し、蛍光体標識dCTPのポリメラーゼへの取込み計測に応用している。

10

【0005】

特許文献2では、ナノ開口内部に透明材質を充填し、その上にターゲット蛍光体を固定する、もしくはナノ開口底面のガラス基板を数百nm程度掘下げ、その底面にターゲット蛍光体を固定することにより、ターゲット蛍光体の発光の検出効率を向上させている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第6,917,726

【特許文献2】特開2007-198801

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Nature 1995, Vol. 374, pp. 555 - 559.

【非特許文献2】SCIENCE 2003, Vol. 299, pp. 682 - 686.

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

一般に蛍光標識された生体物質を単分子レベルで高感度に計測するためには、背景光の低減とシグナル強度の増加が必要となる。

【0009】

背景光低減に関しては、励起光照射体積を縮小することが有効である。非特許文献2および特許文献1のナノ開口照射検出方式では、エバネッセント場による蛍光検出光軸方向での励起光照射領域低減だけでなく、蛍光検出光軸と垂直方向の励起光照射領域を回折限界レベル以下に制御することができるため、背景光の影響を大幅に低減することが可能である。しかしながら、前記ナノ開口照射検出方式では、以下の理由による背景光上昇の可能性が生じる。ナノ開口照射検出方式では、ガラス基板上面に直径50nm程度の開口を設けたアルミ薄膜を有したナノ開口デバイスを使用する。励起光であるレーザー光をダイクロイックミラーで反射させ、対物レンズを用いて集光し、ナノ開口デバイス下面より前記ガラス基板面と垂直方向に照射するとナノ開口内部にエバネッセント場が生じる。ナノ開口内部に蛍光標識のターゲット分子が存在すると、前記エバネッセント場により蛍光が励起されて発光する。この発光蛍光をナノ開口デバイスの下面より前記対物レンズを用いて集光し、前記ダイクロイックミラーを透過させ、検出器で検出する。この時、ガラス基板の散乱光や励起光のガラス基板やアルミ薄膜面での反射光も同時に集光される。ダイクロイックミラーの性能にもよるが、前記散乱光や励起光の反射光も僅かながら透過して検出

40

50

される。前記検出されてしまう散乱光や励起光の反射光は背景光となり、検出感度の低下につながる。

【0010】

ナノ開口デバイス上面より検出すれば、前記ガラス基板で生じる散乱光や励起光の反射光による背景光の上昇を防ぐ事は可能である。しかしながら、アルミ薄膜を励起光が僅かながら透過してしまうため、それを検出してしまい背景光が上昇してしまう。アルミ薄膜を厚くする事により前記透過光を防ぐ事も可能ではあるが、ナノ開口の深さが深くなり、底面部で発光した蛍光の検出感度が低下してしまう。

【0011】

前記問題を解決するため、励起光の入射角を大きくして照射し、ナノ開口デバイス上面より検出する方法が考えられる（ナノ開口斜め照射検出方式）。例えば、臨界角以上で入射すれば、アルミ薄膜からの検出側への励起光の漏れ光は事実上0になる。

10

【0012】

高感度検出方法として前記背景光を低減する以外に、シグナル強度の増加がある。励起光の強度を強くする事により、シグナル強度を増加させることはできる。しかしながら、一般的に光源のコストはその出力強度とともに上昇する。そのため、効率良い照射方式が望まれる。また、効率良く照射できれば、検出感度に必要な照射強度を維持したまま広範囲を照射することが可能となる。これは、基板表面に固定された複数のターゲットを同時に照射することができるため、スループットの向上にもつながる。

【0013】

本発明では、低背景光照射検出方式であるナノ開口斜め照射検出方式において、効率良く励起光を照射することによるシグナル強度の増加方法を提供する。

20

【課題を解決するための手段】

【0014】

透明基板上に微小開口を設けた遮光膜を有したナノ開口デバイスの透明基板側から、入射角度を付けて励起光を照射し、遮光膜側から蛍光検出するナノ開口斜め照射検出方式において、ナノ開口デバイスの遮光膜と透明基板間に透明基板よりも低屈折率な透明薄膜を設けることにより、効率良く励起光をナノ開口内のターゲット分子に照射することができる。

【0015】

また、上記デバイスにおいて、ナノ開口底面にプラズモン共鳴を発生させるための金属薄膜や励起光波長よりも小さな微細構造を設けることにより、より高効率にターゲット分子に励起光を照射することが可能となる。

30

【0016】

生体試料としては、DNA、RNA、タンパク質等、蛍光検出可能なものが挙げられる。

【0017】

本発明の蛍光検出デバイスは、入射される光に対して透明な透明基板と、生体試料を配置させる開口を設けた非導光膜と、透明基板と非導光膜との間に設けられ、基板の屈折率よりも低い屈折率を有し、基板を通して入射される光に対して透明なスペーサ層とを備えることを特徴とする。ここで、基板に入射する光は、基板に対して入射角を直角以上にする等、基板に対して傾きを設けて入射するのがよい。

40

【0018】

また、本発明の分析システムは、光源と、生体試料を設置するデバイスと、光源からの光が生体試料に照射されて発光した蛍光を検出する検出器と、検出器から検出された蛍光を分析する計算器とを有し、当該デバイスは、光源から入射される光に対して透明な透明基板と、生体試料を配置させる開口を設けた非導光膜と、透明基板と非導光膜との間に設けられ、基板の屈折率よりも低い屈折率を有し、基板を通して入射される光に対して透明なスペーサ層とを備えることを特徴とする。

【発明の効果】

50

【 0 0 1 9 】

本発明により、ナノ開口内への高効率照射が可能となり、蛍光標識された生体物質を単分子レベルで高感度に計測することが可能となる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 0 】

【 図 1 】 実施例 1 における分析用システムの概観図

【 図 2 】 実施例 1 におけるナノ開口デバイスの拡大図

【 図 3 A 】 実施例 1 におけるナノ開口デバイスの作製方法の例

【 図 3 B 】 実施例 1 におけるナノ開口デバイスの作製方法の例

【 図 3 C 】 実施例 1 におけるナノ開口デバイスの作製方法の例

10

【 図 4 】 実施例 1 におけるシミュレーションモデル

【 図 5 A 】 ナノ開口中央部の照射強度と伝播距離の関係のグラフ

【 図 5 B 】 ナノ開口中央部の照射強度と伝播距離の関係のグラフ

【 図 6 】 低屈折率透明薄膜の各厚さにおける開口底部の照射強度の関係のグラフ

【 図 7 A 】 DNA シーケンシングの反応プロセス図

【 図 7 B 】 DNA シーケンシングの反応プロセス図

【 図 7 C 】 DNA シーケンシングの反応プロセス図

【 図 7 D 】 DNA シーケンシングの反応プロセス図

【 図 7 E 】 DNA シーケンシングの反応プロセス図

【 図 7 F 】 DNA シーケンシングの反応プロセス図

20

【 図 8 】 実施例 2 におけるナノ開口デバイスの構成図

【 図 9 A 】 実施例 2 におけるナノ開口デバイスの作製方法の例

【 図 9 B 】 実施例 2 におけるナノ開口デバイスの作製方法の例

【 図 9 C 】 実施例 2 におけるナノ開口デバイスの作製方法の例

【 図 9 D 】 実施例 2 におけるナノ開口デバイスの作製方法の例

【 図 1 0 】 実施例 2 におけるシミュレーションモデル

【 図 1 1 】 構造物の有無における照射強度と伝播距離の関係のグラフ

【 図 1 2 】 実施例 3 におけるナノ開口デバイスの構成図

【 図 1 3 A 】 実施例 3 におけるナノ開口デバイスの作製方法の例

【 図 1 3 B 】 実施例 3 におけるナノ開口デバイスの作製方法の例

30

【 図 1 3 C 】 実施例 3 におけるナノ開口デバイスの作製方法の例

【 図 1 4 】 実施例 3 におけるシミュレーションモデル

【 図 1 5 】 充填層の有無における照射強度と伝播距離の関係のグラフ

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 1 】

以下、図面に従って本発明の実施の形態を説明する。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 2 】

図 1 に、分析用システムの概観を示す。本実施例では、前記システムを用いた DNA シーケンシングを行う。本システムは、照射部、検出部、ナノ開口デバイスおよびチャンバ部の 4 つの構成から成る。

40

【 0 0 2 3 】

励起光源 1 0 1 および励起光源 1 0 2 から発振するレーザー光を / 4 板 1 0 3 , 1 0 4 によってそれぞれ円偏光にし、ミラー 1 0 5 およびダイクロイックミラー 1 0 6 (波長 5 5 0 n m 以上を反射) によって 2 本のレーザー光の光軸を同一にする。前記光軸が同一となった 2 本のレーザー光をミラー 1 0 7 によって入射角度を調整し、レンズ 1 0 8 で絞り、プリズム 1 0 9 に入射し、さらにナノ開口デバイス 1 1 0 に入射する。プリズム 1 0 9 とナノ開口デバイス 1 1 0 の間はマッチングオイルで満たされており、前記 2 つの界面では全反射が起こらないようにしてある。本実施例では励起光源 1 0 1 として波長 4 8 8 n m の A r - i o n レーザを、励起光源 1 0 2 として波長 6 3 3 n m の H e - N e レーザを使用

50

したが、もちろんYAGレーザ、半導体レーザを用いても良い。

【0024】

チャンバ部は、カバープレート115と検出窓116と溶液交換用口である注入口112と排出口113から構成される。カバープレート115の材質として、アクリル樹脂を使用した。検出窓116は、光学的に透明な材質が望ましく、ここでは、石英ガラス性のカバーガラスを使用し、その厚さは0.17mmとした。スペーサ111を用いて、ナノ開口デバイス110とカバープレート115の間に隙間を設け、サンプル溶液等が流れる流路114(高さ:25 μ m)を作製した。

【0025】

ナノ開口デバイス110表面での発光は、対物レンズ117($\times 40$, NA0.95)で集光されて、平行化された後に、ノッチフィルタ118(波長488nmのみをカット)、119(波長633nmのみをカット)によって発光のうち励起光と同一の波長を持つ成分(弾性散乱光)が除去される。その後分散素子120で波長ごとに異なる方向へ分散させ、結像レンズ121でイメージセンサ122の光電面上に結像させる。イメージセンサ122で得られた画像は、演算、記憶および制御機能を備えたコンピュータとしての機能を有する制御部123に記録される。本実施例では分散素子としてプリズムを使用しているが、回折格子でももちろんかまわない。

【0026】

図2は本実施例におけるナノ開口デバイス110の拡大図である。ナノ開口デバイスは、光学的に透明な基板201、透明基板201上に成膜された低屈折率透明薄膜202、低屈折率透明薄膜202に成膜された遮光性薄膜203、遮光性薄膜に形成されたナノ開口204から構成される。低屈折率透明薄膜202は、屈折率が透明基板201よりも低いものであればよく、また、入射される光に対して透明であればよい。

【0027】

図3A-図3Cにナノ開口デバイス110の作製方法を示す。まず、透明基板201である石英製基板の片面に塗布防止用フィルム206を貼り、CYTOP(R)を200nmの厚さになるよう浸漬引き上げにてコーティングし、低屈折率透明薄膜202を透明基板201の片面に形成させる(図3A)。低屈折率透明薄膜成膜後に塗布防止用フィルム206を取り除く。次いで、低屈折率透明薄膜202の表面にスパッタにてアルミニウムを厚さ100nmになるように成膜し、遮光性薄膜203を形成させる(図3B)。遮光性薄膜203は、金属膜を用いることができるが、ここでのアルミニウム以外の材質として、例えば、銀、金、クロム、炭化シリコンなどを用いて遮光性薄膜としても良い。遮光性薄膜203上に、Electron beam lithography(EBリソ)技術により直径200nmのナノ開口204を1 μ mの間隔で格子状に複数形成する(図3C)。開口サイズはナノ開口デバイス110に入射される光の波長以下であれば良い。

なお、ナノ開口204の底面に、単分子のビオチン205を固定しておく。後述するように、単分子DNAポリメラーゼをナノ開口底面204に固定する方法として、本実施例ではビオチン-アビジン結合を用いているが、非特異吸着を用いて直接固定する方法を用いても良い。

【0028】

励起光がナノ開口デバイス110に照射されるとナノ開口204内部にエバネッセント場が生じる。ナノ開口内部の電界強度(以下、照射強度とする)を時間領域差分法シミュレーションOptiFDTD(Optiwave社)によりシミュレートした。図4にシミュレーションに用いたモデルを示す。2D Transverse Modeにおいて、ガラス基板301(屈折率1.46)上に、低屈折率透明薄膜(屈折率1.34)302、アルミニウム膜303(厚100nm)の順に積層し、アルミニウム膜に直径200nmの開口304を設けた。アルミニウム膜303上面と開口304内部には溶媒305(屈折率1.33)が満たされていると想定した。励起光の波長を488nmおよび633nmとし、入射角度311を70度とした。モデル幅308を2 μ m、ガラス幅309を1 μ m、モデル長さ307を照射光波長488nmでは1.06709 μ m、照射光波

10

20

30

40

50

長 633 nm では 1.38416 μm とし、メッシュサイズを 0.003 μm とした。低屈折率透明薄膜 302 の厚みを 0 ~ 500 nm に変化させシミュレーションを行った。

【0029】

図 5 A, 図 5 B にシミュレーションにより得られた様々な低屈折率透明薄膜 302 の厚さにおける開口中央部 310 の照射強度と伝播距離の関係を示す。図 5 A は励起光波長 488 nm, 図 5 B は励起光波長 633 nm のシミュレーション結果である。いずれも、横軸が伝播距離を、縦軸が照射強度を示す。伝播距離の原点 0 はナノ開口部における低屈折率透明薄膜と溶媒 305 の境界面とした。照射光波長 488 nm において伝播距離 50 nm 程度まで照射強度が若干上昇傾向を示すが、それ以外は伝播距離にしたがって急速に照射光強度が減少する。図 6 に低屈折率透明薄膜 302 の各厚さ (Space) における開口 304 底部の照射強度の関係を示す。開口底部の照射強度は、開口底部全面の照射強度の平均値とし、低屈折率透明薄膜 302 の厚み 0 の時の値で規格化した。いずれの励起光波長における開口底部の照射強度は、低屈折率透明薄膜 302 の厚み 0 から 250 nm 近傍までは増加し、250 nm 以上になると減少する。図 6 から、低屈折率透明薄膜 302 の厚さは 100 ~ 400 nm 程度あれば、薄膜が無い場合に比べて 1.5 以上強度向上を図ることが出来る。また、低屈折率透明薄膜 302 の厚さが 200 ~ 300 nm 程度あれば、薄膜が無い場合に比べて 2 倍前後の強度向上を図ることが出来る。本実施例において低屈折率透明薄膜 302 の厚みは 200 nm であるため、低屈折率透明薄膜が無い時に比べ、照射強度は約 2 倍程度向上する。

【0030】

励起光のガラス基板 301 における入射角度 311 は 0 度よりも大きい場合、上記低屈折率透明薄膜 302 の存在による照射効率向上という効果が得られるが、遮光膜の流路側への励起光の漏れ光を小さく、つまり低背景光にするために入射角度 311 はガラス基板 301 と低屈折率透明薄膜 302 の境界面における臨界角以上が好ましい。

【0031】

以下、図 7 A - 図 7 F を用いて DNA シーケンシングの工程を説明する。ストレプトアビジン 602 を加えたバッファを注入口 112 より流路 114 に導入し、ストレプトアビジン 602 をナノ開口の底面 603 に固定されているビオチン 601 に結合させ、ビオチン - アビジン複合体をナノ開口底面 603 に形成させる (図 7 A)。固定反応後に、余剰のストレプトアビジンを洗浄用バッファにて流路 114 より洗い流した。ビオチン修飾した DNA ポリメラーゼ 604 を注入口 112 より流路 114 に導入し、ビオチン - アビジン結合を介して、単分子の DNA ポリメラーゼ 604 をナノ開口底面 603 に固定する (図 7 B)。固定反応後に、余剰の DNA ポリメラーゼを洗浄用バッファにて流路 114 より洗い流した。ターゲット一本鎖鋳型 DNA 605 にプライマ 606 をハイブリダイゼーションさせて鋳型 DNA - プライマ複合体を形成させ、注入口 112 より流路 114 に導入し、前記鋳型 DNA - プライマ複合体と DNA ポリメラーゼ複合体を形成させる (図 7 C)。固定反応後に、余剰な鋳型 DNA - プライマ複合体を洗浄用バッファにて流路 114 より洗い流した。リン酸末端に蛍光標識した 4 種の dNTP (dATP - (Alexa 488) 608, dCTP - (Cy3) 609, dGTP - (Cy5) 607, dTTP - (Cy5.5) 610) を注入口 112 より流路 114 へ導入して伸長反応を行うと同時に、励起光を照射しナノ開口内部にエバネッセント場 611 を形成した (図 7 D)。プライマ 606 の 3' 末端の塩基の次に位置するところの相補的な位置にある一本鎖鋳型 DNA 605 の配列上の塩基と相補的な dNTP が伸長反応によって前記鋳型 DNA - プライマ複合体に取込まれると同時に、前記取込まれた dNTP に標識された蛍光体はエバネッセント場 611 に進入するため発光する (図 7 E)。この時、発光の有無とその発光蛍光の波長の特定をすることにより、ナノ開口内の鋳型 DNA - プライマ複合体に取込まれた dNTP の種別を判断する。前記伸長反応と同時に前記取込まれた dNTP に標識された蛍光体はリン酸末端に標識されているため、dNTP から切断され、伸長反応が続く (図 7 F)。本システムでは、複数のナノ開口底面 603 からの発光を同時計測できるため、各ナノ開口底面 603 にそれぞれ異なる鋳型 DNA を固定した場合、前記複数の異なる

鋳型DNA - プライマ複合体に取込まれたdNTPの塩基種を、つまり複数の鋳型DNAの配列を同時に決定できる。

【0032】

本実施例で示した照射方式において、励起光強度は、ナノ開口底面から離れるに従って指数関数的に減少するため、ナノ開口より上方には励起光は存在しない。また、蛍光検出光軸と垂直方向においてナノ開口外部に励起光は伝播されないため、遮光性薄膜203に非特異吸着した蛍光体やゴミは励起されない。そのため、背景光の上昇を抑えることが可能となる。さらに、透明基板201と遮光薄膜203の間に低屈折率透明薄膜202を設けることにより、照射効率が向上するため、低出力の励起光源でもナノ開口底面に固定された鋳型DNA - プライマ複合体に取込まれたdNTPに標識された蛍光体を高感度に検出することができる。

10

【実施例2】

【0033】

本実施例では、より照射効率を向上させる方法を用いてDNAシーケンシングを行う。照射効率向上の方法としては本発明とプラズモン共鳴を利用する。ナノ開口デバイスの形状以外は、実施例1と同等である。

【0034】

図8に本実施例におけるナノ開口デバイスの構造を示す。また、図9A - 図9Dに本実施例のナノ開口デバイスの作製方法を示す。実施例1と同等の方法でナノ開口デバイスを作製した後に、レジスト207をナノ開口デバイスの遮光性薄膜203上面に塗布し(図9A)、EBリソ技術によりナノ開口204の中心に直径50nmの開口208をレジスト上に設ける(図9B)。スパッタにより銀209を厚さ50nmになるように成膜し(図9C)、レジストを剥離する。上記方法によりナノ開口204底面中心部に直径50nm高さ50nm円柱形状の構造体701を形成させる(図9D)。次いで、構造体701の上面縁にビオチン702を固定する。構造体701の材質としては、アルミニウム、金、白金、タングステンなどの金属であれば良く、形状は円錐や立方体などの微細な突起でも、微粒子を用いても良い。また、構造体701の大きさはナノ開口の直径よりも小さければ良い。

20

【0035】

照射効率向上の効果を確認するため、実施例1の図4と同等のシミュレーションを行った。図10にシミュレーションに用いたモデルを示す。開口中央に構造体801を設けた以外は実施例1図4と同等である。開口中央部に設けた構造体801の材質を銀、構造体幅802を0.05 μ m、構造体長さ803を0.05 μ mとした。図11にシミュレーションにより得られた(構造物あり)照射強度と伝播距離の関係を示す。比較対象として実施例1図4で得られた結果(構造物なし)も示す。構造物なしでは、実施例1図4開口中央部310の照射強度を、構造物ありでは図10構造体左端部804の照射強度を示す。いずれの場合も励起光波長は488nmとし、低屈折率透明薄膜302の厚みは200nmとした。また、伝播距離の原点0はナノ開口部における低屈折率透明薄膜と溶媒305の境界面とした。構造物ありでは、構造体801の上面縁の照射強度がプラズモン共鳴により構造物なしに比べて30倍程度高いことが分かる。

30

40

【0036】

本デバイスを用いる事により、ターゲット蛍光体に対して非常に効率的に励起光を照射することが可能となり、低出力の励起光源でも銀構造体縁に固定された鋳型DNA - プライマ複合体に取込まれたdNTPに標識された蛍光体を高感度に検出することができる。

【実施例3】

【0037】

本実施例では、本発明とターゲット蛍光体の発光検出効率を向上させる方法を用いてDNAシーケンシングを高感度に行う。ナノ開口デバイスの形状以外は、実施例1と同等である。

【0038】

50

図12に本実施例におけるナノ開口デバイスの構造を示す。また、図13A - 図13Cに本実施例のナノ開口デバイスの作製方法を示す。実施例1と同等の方法でナノ開口デバイスを作製した後に、ナノ開口デバイス110の透明基板201側面に塗布防止用フィルム206を貼り、CYTOP(R)210を浸漬引き上げにてコーティングする(図13A)。前記コーティング後に前記塗布防止用フィルムを取り除く。CYTOP(R)コーティング後に、遮光性薄膜203と等しい高さになるまで、余剰のCYTOP(R)を研磨し、CYTOP(R)の溶液層側表面と遮光性薄膜203の溶液層側表面が、ほぼ同一平面になるように表面を平面にし、透明充填相1001を形成する(図13B)。次いで、透明充填層1001表面に一分子のビオチン1002を固定する(図13C)。透明充填層1001の材質として、光学的に透明な材質であれば良く、本実施例では、低屈折率透明薄膜と同じCYTOP(R)を使用した。

10

【0039】

照射効率を求めるため、実施例1の図4と同等のシミュレーションを行った。図14にシミュレーションに用いたモデルを示す。開口304内に透明充填層1101を設けた以外は実施例1の図4と同等である。開口304内に設けた透明充填層1101の材質を低屈折率透明薄膜302と同一(屈折率1.34)とした。図15にシミュレーションにより得られた(充填剤あり、薄膜あり)照射強度と伝播距離の関係を示す。比較対象として実施例1図4で得られた結果「充填剤なし、薄膜あり」ならびに「充填剤なし、薄膜なし」を示す。「薄膜あり」では低屈折率薄膜302の厚みを200nm、「薄膜なし」では低屈折率薄膜302の厚みを0nmとした。いずれの場合も、照射強度は開口中央部(図4開口中央部310、図14開口中央部1102)での値を求め、励起光波長は488nmとした。また、伝播距離の原点0はナノ開口部における低屈折率透明薄膜と溶媒305の境界面とした。「充填剤あり、薄膜あり」の前記境界面での照射強度は、「充填剤なし、薄膜あり」に比べて約5/6程度減少するが、「充填剤なし、薄膜なし」に比べて2倍程度向上する。これに加え、特許文献2で示すように「充填剤あり、薄膜あり」では、前記境界面上での発光蛍光の検出効率が向上する。

20

【0040】

本デバイスを用いる事により、ターゲット蛍光体に対して非常に効率的に励起光を照射することが可能となり、また検出効率も向上するため、低出力の励起光源でも固定された鑄型DNA-プライマ複合体に取込まれたdNTPに標識された蛍光体を高感度に検出することができる。

30

【0041】

この他に実施例2に示すようなプラズモン共鳴を起す励起光波長以下の微細金属構造体を図12に示す透明充填層1001表面に固定し、前記微細金属構造体の表面で蛍光発光を行うことにより、より高感度検出が可能となる。

【0042】

尚、これらの実施例においては、生体試料としてDNAを用いているが、その他にも、RNA、タンパク質等の分析にも用いることができる。

【0043】

本発明は、前述の説明および実施例に特に記載した態様以外でも実施できることは明らかである。そのため、本発明の多くの改変および変形が可能であり、したがって、それらも本件添付の特許請求の範囲内のものである。

40

【産業上の利用可能性】

【0044】

DNAシーケンサ等への利用が可能と考えられる。

【符号の説明】

【0045】

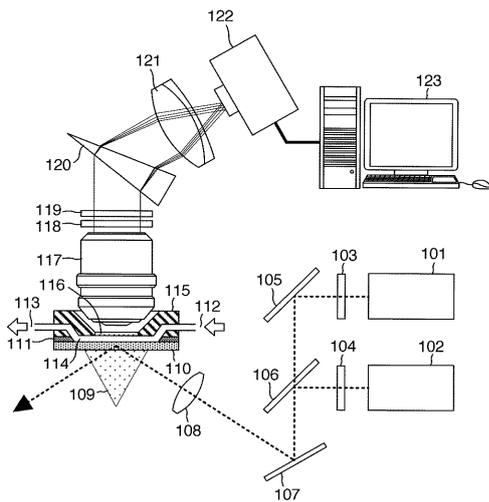
- 101：励起光源
- 102：励起光源
- 103： / 4

50

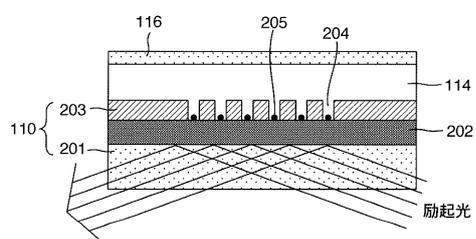
1 0 4 :	ノ 4	
1 0 5 :	ミラー	
1 0 6 :	ダイクロイックミラー	
1 0 7 :	ミラー	
1 0 8 :	レンズ	
1 0 9 :	プリズム	
1 1 0 :	ナノ開口デバイス	
1 1 1 :	スペーサ	
1 1 2 :	注入口	
1 1 3 :	排出口	10
1 1 4 :	流路	
1 1 5 :	カバープレート	
1 1 6 :	検出窓	
1 1 7 :	対物レンズ	
1 1 8 :	ノッチフィルタ	
1 1 9 :	ノッチフィルタ	
1 2 0 :	分光素子	
1 2 1 :	結像レンズ	
1 2 2 :	イメージセンサ	
1 2 3 :	制御部	20
2 0 1 :	透明基板	
2 0 2 :	低屈折率透明薄膜	
2 0 3 :	遮光性薄膜	
2 0 4 :	ナノ開口	
2 0 5 :	ビオチン	
2 0 6 :	塗布防止用フィルム	
2 0 7 :	レジスト	
2 0 8 :	開口	
2 0 9 :	銀	
2 1 0 :	C Y T O P (R)	30
3 0 1 :	ガラス基板	
3 0 2 :	低屈折率透明薄膜	
3 0 3 :	アルミニウム膜	
3 0 4 :	開口	
3 0 5 :	溶媒	
3 0 7 :	モデル長さ	
3 0 8 :	モデル幅	
3 0 9 :	ガラス幅	
3 1 0 :	開口中央部	
3 1 1 :	入射角度	40
6 0 1 :	ビオチン	
6 0 2 :	ストレプトアビジン	
6 0 3 :	ナノ開口底面	
6 0 4 :	D N A ポリメラーゼ	
6 0 5 :	一本鎖鋳型 D N A	
6 0 6 :	プライマ	
6 0 7 :	d G T P - C y 5	
6 0 8 :	d A T P - A l e x a 4 8 8	
6 0 9 :	d G T P - C y 3	
6 1 0 :	d T T P - C y 5 . 5	50

- 6 1 1 : エバネッセント場
- 7 0 1 : 構造体
- 7 0 2 : ピオチン
- 8 0 1 : 構造体
- 8 0 2 : 構造体幅
- 8 0 3 : 構造体長さ
- 8 0 4 : 構造体左端部
- 1 0 0 1 : 透明充填層
- 1 0 0 2 : ピオチン
- 1 1 0 1 : 透明充填層
- 1 1 0 2 : 開口中央部

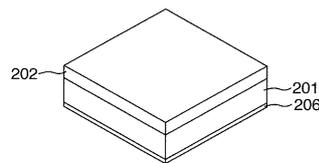
【図 1】



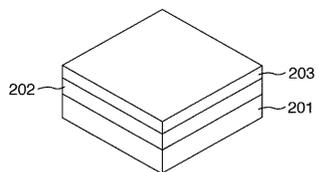
【図 2】



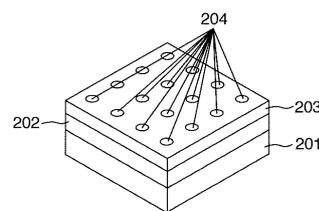
【図 3 A】



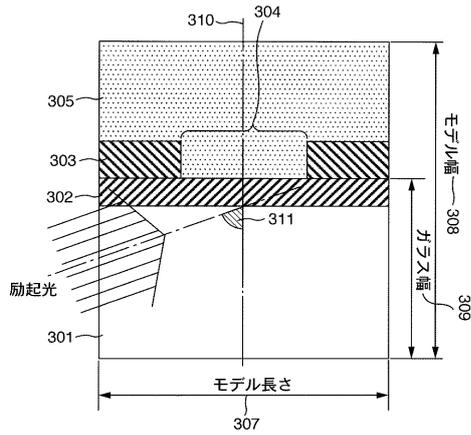
【図 3 B】



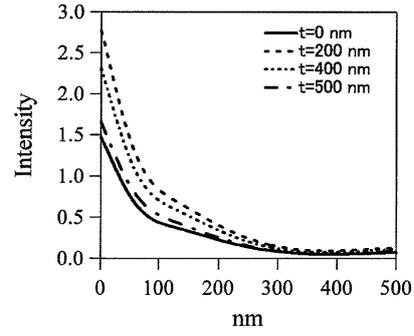
【図 3 C】



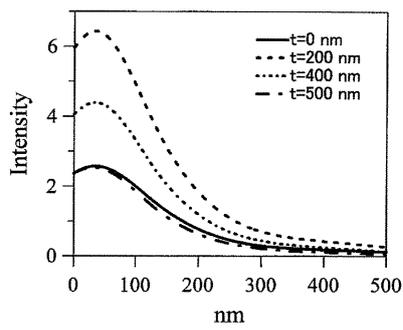
【 図 4 】



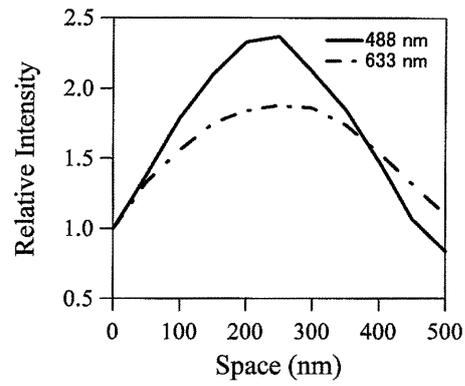
【 図 5 B 】



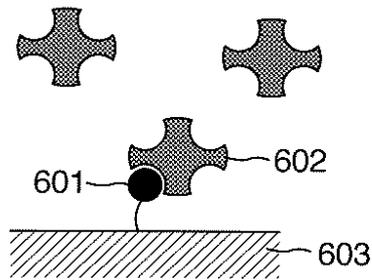
【 図 5 A 】



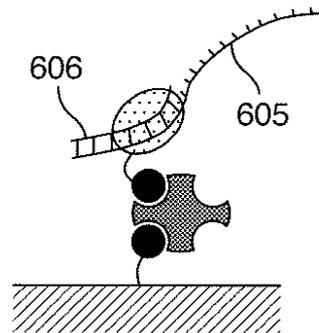
【 図 6 】



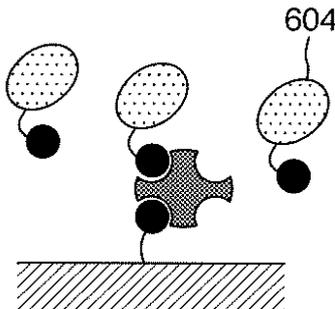
【 図 7 A 】



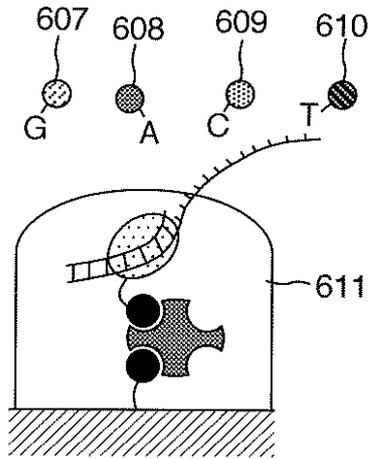
【 図 7 C 】



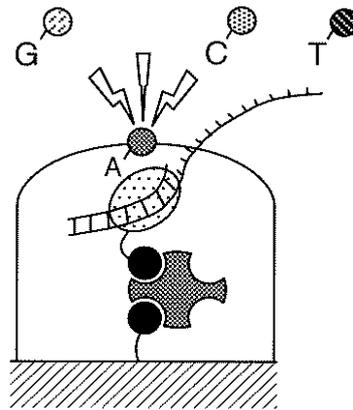
【 図 7 B 】



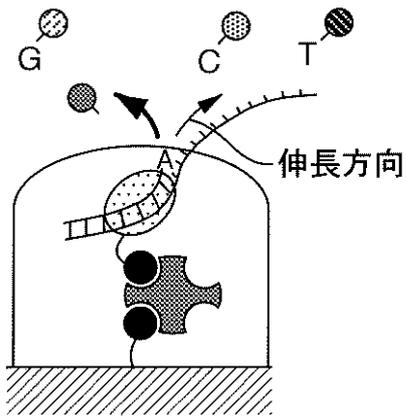
【図7D】



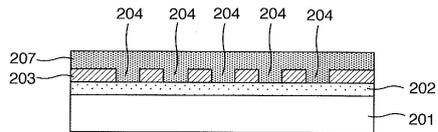
【図7E】



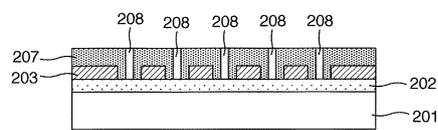
【図7F】



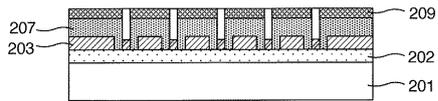
【図9A】



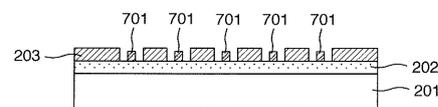
【図9B】



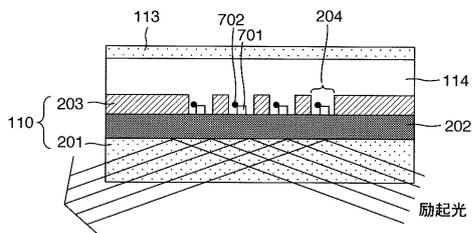
【図9C】



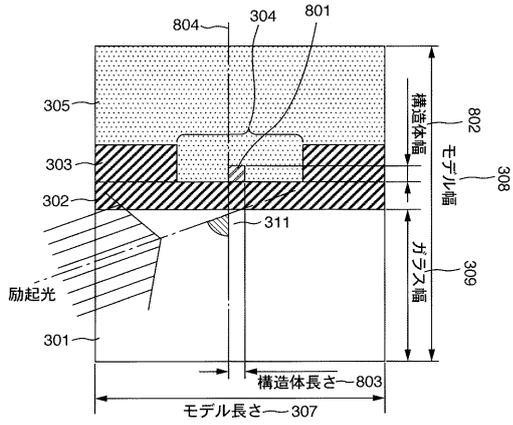
【図9D】



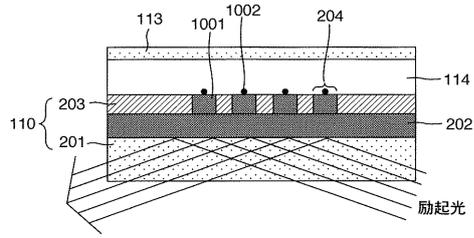
【図8】



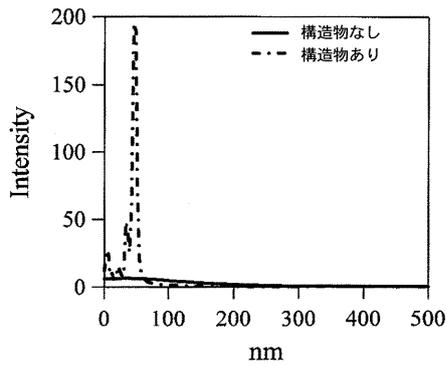
【図10】



【図12】

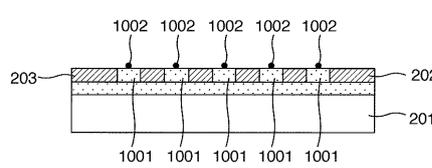


【図11】



【図13A】

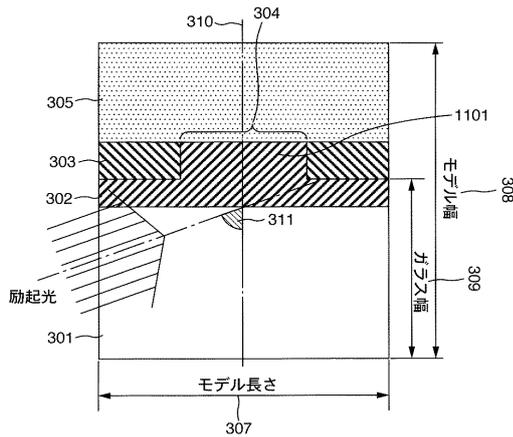
【図13B】



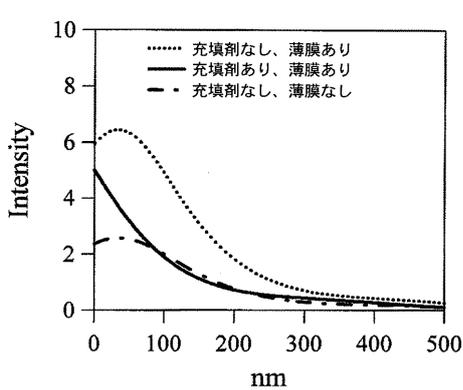
【図13C】



【図14】



【図15】



フロントページの続き

審査官 廣田 健介

- (56)参考文献 特開2009-074947(JP,A)
特開2007-198801(JP,A)
特開2007-187560(JP,A)
特開2008-286778(JP,A)
特開2008-051512(JP,A)
特開2002-357543(JP,A)
特表2003-507705(JP,A)
特表2007-508536(JP,A)
特表2007-513847(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/62 - 21/83

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)