

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-515475

(P2005-515475A)

(43) 公表日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/414	GO 1 N 27/30 3 O 1 R	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 M	
GO 1 N 37/00	GO 1 N 37/00 1 O 2	
	GO 1 N 27/30 3 O 1 K	
	GO 1 N 27/30 3 O 1 V	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-562625 (P2003-562625)  
 (86) (22) 出願日 平成14年12月11日 (2002.12.11)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年7月13日 (2004.7.13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2002/004283  
 (87) 国際公開番号 W02003/062811  
 (87) 国際公開日 平成15年7月31日 (2003.7.31)  
 (31) 優先権主張番号 02/00676  
 (32) 優先日 平成14年1月21日 (2002.1.21)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

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

最終頁に続く

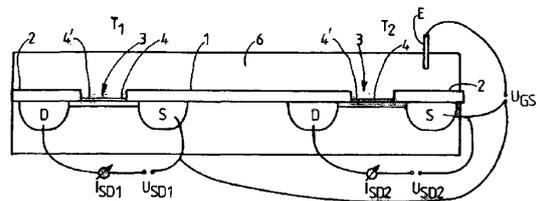
(54) 【発明の名称】 センサーの反応性ゾーンに固定された分子プローブの検出

(57) 【要約】

本発明は、センサーが、電界効果形トランジスタ( $T_1$ 、 $T_2$ ・・・)のネットワークを含み、各トランジスタがソース領域(S)、ドレイン領域(D)、およびその上で表示パラメータが検出され得る反応性ゾーン(3)を形成するゲート領域(G)を有することを特徴とし、次の工程：

- a) 分子プローブを固定するために、該ゾーン(3)の一部を上記と接触させ、
- b) 分子プローブと接触された少なくともこれらのゾーンを電解質溶液(6)中に浸し、
- c) 分子プローブと接触させたゾーン(3)に対応する第一群の少なくとも2つのトランジスタについてドレイン電圧、ゲート-ソース電圧およびソース-ドレイン電圧の電流カーブの少なくとも1点を測定し、2つの異なるゾーン(3)について得られた上記測定の少なくとも2つの比較により、少なくとも1つの上記パラメータをそこから推断する

ことを含む、センサーの反応性ゾーン(3)に固定された分子プローブを表示する少なくとも1つのパラメータを検出する方法に関する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

センサーが、電界効果形トランジスタ( $T_1$ 、 $T_2$ など)のネットワークからなり、各トランジスタはソース領域(S)、ドレイン領域(D)、およびその上で表示パラメータが検出されるべき反応性ゾーン(3)を形成するゲート領域(G)を有し、かつ次の工程：

- a) 分子プローブを固定するために、該ゾーン(3)の一部を該プローブと接触させ、
  - b) 分子プローブと接触された少なくともこれらのゾーンを電解質溶液(6)中に浸し、
  - c) 分子プローブと接触させたゾーン(3)に対応する第一群のトランジスタ中の少なくとも2つの、ドレイン電流/ソース-ゲート電圧/ソース-ドレイン電圧特性の少なくとも1点を測定し、2つの異なるゾーンについて得られた少なくとも2つの測定の間の比較により、少なくとも1つの該表示パラメータをそこから導出することを、
- ことを含むことを特徴とする、センサーの反応性ゾーンに固定された分子プローブを表示する少なくとも1つのパラメータを検出する方法。

10

## 【請求項2】

特性の少なくとも1点の測定が、第一群の少なくともトランジスタのドレインおよびソース間の所定の電圧( $U_{D,S}$ )の印加、ならびに第一の場合においては、第一群のこれらのトランジスタのゲートおよびソース間の所定の電圧( $U_{G,S}$ )の印加、または第二の場合においては、第一群のこれらのトランジスタに対する所定のドレイン電流( $I_D$ )の印加を用いることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

aおよびbの間にリンスを行う工程を有することを特徴とする、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項4】

次の工程：

- a1) リンスを行い、
  - a2) 分子プローブと特異的に相互作用しうる標的分子を含む溶液を添加する
- を、a)の後であってb)の前に含むことを特徴とする、先行する請求項の1つに記載の方法。

## 【請求項5】

次の工程：

- d) 分子プローブと特異的に相互作用し得る標的分子を含む電解質溶液(6)を添加し、
  - e) 少なくとも1つの表示パラメータの比較により得るように、分子プローブおよび標的分子と接触させたゾーン(3)に対応する第二群のトランジスタの少なくとも2つの、ドレイン電流/ソース-ゲート電圧/ソース-ドレイン電圧特性の少なくとも1点を測定する
- を、c)の後に含むことを特徴とする、請求項1~6の1つに記載の方法。

30

## 【請求項6】

e点において、特性の少なくとも1点の測定が、第二群の少なくとも2つのトランジスタの、トランジスタのドレインおよびソース間の所定の電圧( $U_{D,S}$ )の印加、ならびに第一の場合においては、第二群のこれらのトランジスタのゲートおよびソース間の所定の電圧( $U_{G,S}$ )の印加、または第二の場合においては、第二群のこれらのトランジスタに対する所定のドレイン電流( $I_D$ )の印加を用いることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

40

## 【請求項7】

時間に関して間隔をあけている、特性の少なくとも1点の測定の複数をを用いることを特徴とする、請求項5または6のいずれかに記載の方法。

## 【請求項8】

比較が微分測定により行われることを特徴とする、先行する請求項の1つに記載の方法。

## 【請求項9】

比較が、分子プローブに接触させた後に電解質溶液(6)に浸されたゾーン(3)に対応する少なくとも2つのトランジスタについて行われた測定の間で行われることを特徴とする、

50

先行する請求項の1つに記載の方法。

【請求項10】

比較が、それらを固定する目的で分子プローブに接触させた後に電解質溶液(6)に浸されたゾーン(3)に対応する少なくとも1つのトランジスタについて行われた測定、および分子プローブに接触させずに該電解質溶液(6)に浸されたゾーンに対応する少なくとも1つのトランジスタについて行われた測定の間で行われることを特徴とする、請求項1~8の1つに記載の方法。

【請求項11】

表示パラメータが、ゾーン(3)への分子プローブの固定の検出であることを特徴とする、先行する請求項の1つに記載の方法。

10

【請求項12】

分子プローブが、DNA、RNAまたはタンパク質分子であることを特徴とする、先行する請求項の1つに記載の方法。

【請求項13】

分子プローブがDNA分子であり、かつ電界効果形トランジスタが負のゲートバイアスを有するデプレッションn-チャネルタイプのものであることを特徴とする、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

それぞれが少なくとも1つの電界効果形トランジスタを含み、かつ第一のゾーンが、第一のDNAサンプル中の変異の存在または欠如に特異的で検出可能な産物を与える酵素学的反応(例えばPCR増幅)により得られる溶液に浸され、そして第二のゾーンが、第二のDNAサンプル中の変異の存在または欠如に特異的で検出可能な産物を与える酵素学的反応(例えばPCR増幅)により得られる溶液に浸される、2つのゾーンの間の比較による検出を用いることを特徴とする、請求項12または13のいずれかに記載の方法。

20

【請求項15】

第一および第二のDNAサンプルが2人の患者を起源とし、かつ酵素学的反応が2つのサンプルについて同じであることを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

第一および第二のDNAサンプルが同じであり、そして同じ患者を起源とし、かつ第一のゾーンの酵素学的反応が、第一のサンプル中に変異が欠如してDNA産物を産生する実験的条件下で行われ、かつ第二のゾーンの酵素学的反応が、第二のサンプル中に変異が存在してDNA産物を産生する実験的条件下で行われることを特徴とする、請求項14に記載の方法。

30

【請求項17】

それを少なくとも1つの電界効果形トランジスタ( $T_1 \cdots T_2$ など)と接触させるような、少なくとも1つのマイクロ流体チャネルを介しての溶液の循環を含むことを特徴とする、先行する請求項の1つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、センサーのゾーンに固定された分子プローブを表示する少なくとも1つのパラメータを検出するための方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

電界効果形トランジスタを用いてDNA配列のハイブリダイゼーションを検出するための方法は、E. SOUTEYRANDらにより“Direct Detection of the hybridization of synthetic Homo-Oligomer DNA Sequences by Field Effect”の題名で、J. Phys. Chem. B1997、101、第2980~2985頁に1997年に出版されている、論文に記載されているように、既に知られている。このタイプの使用に用いられ得るISFET(イオン感受性電界効果形トランジスタ)タイプのトランジスタは、IEEE Transactions on Biomedical Engineering 第BME-19

50

巻 - 第5号、September 1972、第342～351頁に出版されているPiet BERGVELDによる“Development, Operation and Application of the ISFET as a Tool for Electrophysiology”の論文に記載されている。

【0003】

このようなトランジスタ構造の製作の記載は、“Extracellular Resistance in Cell Adhesion Measured with a Transistor Probe”の題名で、Langmuir 2000、16、第3517～3521頁に出版されている、V. KIESSLINGらによる論文に見出すことができる。最後に、サーフェスプレパレーション法は、“Silanized nucleic acids: a general platform for DNA immobilization”の題名で、Nucleic Acid Research 2000、第28巻、第14号、第i～vi頁に出版されている、A. KUMARらの論文に記載されている。

10

【0004】

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

【0005】

複数の反応性ゾーンを含むセンサー、例えばDNAチップまたはタンパク質チップの場合、分子プローブが効率的に固定されたゾーンを、比較的迅速な様式で、容易に調節する技術は、現在、入手できない。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、本発明の目的は、特に、実際問題として頻繁に遭遇するかなりの実験的変動によりおこる問題を少なくとも部分的に軽減することを可能にするように、特に分子プローブの局部沈積(local deposition)および局部固定を調節する目的のための、センサーの少なくとも1つのゾーンに固定された分子プローブを表示する少なくとも1つのパラメータを検出する方法である。

【課題を解決するための手段】

【0007】

したがって本発明は、センサーが、電界効果形トランジスタのネットワークからなり、各トランジスタはソース領域、ドレイン領域、およびその上で分子プローブを表示するパラメータが検出されるべき反応性ゾーンを形成するゲート領域を有し、かつ次の工程：

30

a) 分子プローブを固定するために、該ゾーンの一部を該プローブと接触させ、  
 b) 分子プローブと接触された少なくともこれらのゾーンを電解質溶液中に浸し、  
 c) 例えば第一群のこれらのトランジスタ、バイアスをかけられているドレインおよびソースに、ゲートおよびソース間の所定の電圧、例えば一定電圧を、または代わりに所定のドレイン電流、例えば一定電流を印加することにより、分子プローブと接触させたゾーンに対応する第一群のトランジスタ中の少なくとも2つの、ドレイン電流/ソース-ゲート電圧/ソース-ドレイン電圧特性の少なくとも1点を測定し、2つの異なるゾーンについて得られた測定の少なくとも2つの間の比較により、少なくとも1つの該表示パラメータをそこから導出する

40

ことを含むことを特徴とする、センサーの少なくとも1つの反応性ゾーンに固定された分子プローブを表示する少なくとも1つのパラメータを検出する方法に関する。

【0008】

該比較は、微分測定を用いて行われることが好ましい。表示パラメータは、分子プローブの固定の検出であり得る。

工程aおよびbの間に、リンスを行うことが想定できる。

【0009】

特定の実施形態によると、本方法は、次の工程：

50

- a1) リンスを行い、  
 a2) 分子プローブと特異的に相互作用し得る、例えば分子プローブがDNAである場合に、それらとハイブリダイズし得る標的分子を含む溶液を添加し、任意にその後リンスを行うを、a)の後であってb)の前に含むことを特徴とする。

【0010】

その他の特定の実施形態によると、本方法は、次の工程：

- d) 分子プローブと特異的に相互作用し得る、例えば分子プローブがDNAである場合に、ハイブリダイズし得る標的分子を含む電解質溶液を添加し、  
 e) 少なくとも1つの該表示パラメータの比較により得るように、例えば第二群のこれらのトランジスタのゲートおよびソース、バイアスをかけられたドレインおよびソースの間に電圧、例えば一定電圧を、または第二のこれらのトランジスタのソースに所定の電流、例えば一定電流を印加することにより、分子プローブおよび標的分子と接触させたゾーンに対応する第二群のトランジスタの少なくとも2つの、ドレイン電流/ソース-ゲート電圧/ソース-ドレイン電圧特性の少なくとも1点を測定する  
 を、c)の後に含むことを特徴とする。

10

【0011】

本方法は、時間に関して間隔をあけている、特性の少なくとも1点の測定の複数を用いることができる。これは、空間的および時間に関する2重の比較ができる測定値を得ることを可能にする。

【0012】

第一の変形によると、特に微分測定による比較は、分子プローブに接触させた後に電解質溶液に浸されたゾーンに対応する少なくとも2つのトランジスタの間で行われる。

20

【0013】

好ましい第二の変形によると、特に微分測定によるこの比較は、分子プローブに接触させた後に該電解質溶液に浸されたゾーンに対応する少なくとも1つのトランジスタ、および予め分子プローブに接触させずに該電解質溶液に浸されたゾーンに対応する少なくとも1つのトランジスタの間で行われる。

分子プローブは、例えばDNA、RNAまたはタンパク質分子である。

【0014】

本発明による方法は、通常の、蛍光による分子の相互作用の検出に影響を及ぼさない。

30

【0015】

本発明のその他の特徴および利点は：

- 図1は、トランジスタの1次元または2次元のネットワークにより組織化されたトランジスタの複数を含む、検出チップの2つの電界効果形トランジスタを表し；
- 図2は、上から見た、検出チップ、およびそれぞれ電界効果形トランジスタに対応する反応性ゾーンの配置の詳細を表し；

【0016】

- 図3は、1次元または2次元のネットワークの伝送(transmissions)の電氣的ドレイン接続を図解し、図4は、種々の電氣的ドレイン接続の抵抗を表し、カーブAは計算値を、そしてカーブBは測定値を表し、カーブ間の差は、ほとんどが、一定のチャンネル抵抗によるものであり；
- 図5は、選択された反応性ゾーンに溶液を沈積させるための装置を表し；
- 図6は、ドレイン電流 $I_{SD}$ の変動による、 $U_{SG}$ および $U_{SD}$ 一定での、シラン処理されたDNAおよびポリ-L-リシンの存在の検出を図解し；

40

【0017】

- 図7は、電圧 $U_{SG}$ の変動の検出による、 $I_{SD}$ および $U_{SD}$ 一定での、シラン処理されたDNAおよびポリ-L-リシンの存在の検出を図解し；
- 図8A~8Cは、種々の実験条件下で行った実験の結果を表し；
- 図9A~9Dは、DNAの電子検出を表し；
- そして、図10Aおよび10Bは、マイクロ流体チャンネルの使用を図解する

50

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

【0018】

図1~3は、シリコン基板上に電界効果形トランジスタのネットワークを有するセンサーを図解している。図1に断面図として表されるトランジスタ $T_1$ または $T_2$ は、それぞれが電氣的接点を示し、かつそれぞれ絶縁層1および2、例えば $SiO_2$ 熱酸化物が上に載せられているソース領域Sおよびドレイン領域Dとともに与えられる。ソースSおよびドレインDの間の反応性領域3は、トランジスタのゲート領域Gを形成し、そして薄い絶縁層4、例えば熱 $SiO_2$ の層を有する。この反応性領域上に酸化物を有さないことも可能である。次いで、反応性表面は、絶縁材料の縞である基板の4'部分により区切られる。

【0019】

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

【0020】

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

【0021】

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

【0022】

図2および3に示すように、電界効果形トランジスタタイプのn個の構造は、絶縁体(SiO<sub>2</sub>またはその他)で被覆され、かつソース10およびドレイン(D<sub>1</sub>、...D<sub>n</sub>)の電氣的接続により適切な接続(金属化、または好ましくはドーパされた導電性領域)が提供されたシリコン基板中に集積される。標準のMOSトランジスタ構造とは異なり、金属ゲート電極は存在しない。これは、"ISFET" (Ion Sensitive Field Effect Transistor、イオン感受性電界効果形トランジスタ)タイプの構造に一致する。より高い感度を与えるSOI (silicon-on-insulator、シリコンオンアイソレーター)タイプの基板が好ましく用いられる。

【0023】

種々の構造が互いに横に近接しており、そしてそれらの反応性表面は、同じ測定溶液に接触する。現行のマイクロエレクトロニクスの典型的な横の寸法は、1μm未満である。本発明において用いられるようなDNAチップ技術においては、横の寸法は、固相上への直接合成については5~10μmであり、希釈液を用いる分子の固定の場合は50~100μmである。

【0024】

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

【0025】

電極E(例えばAg/AgCl)を用いて、それが被覆するシリコン構造に関する測定溶液6(電解質)の電位を設定し、そしてセンサー(トランジスタ)の動作点を設定する。ある場合においては、電解質6の電位は0に等しいことが可能である。センサーを浸す測定溶液6は、十分な導電率を与え、かつ反応性表面のより広い遮へいを起こさない濃度のイオンを含む。これは、中性pHを有するのが好ましい。

【0026】

分子認識(molecular recognitions)を検出するための方法は、比較、特に微分比較によ

10

20

30

40

50

るアプローチに基づく。測定は、並列のいくつかのトランジスタ構造を用いて行われる。測定は、グラフトされた(grafted)分子の種々のタイプに関して差異に基づくものであってよく、そして分子のタイプ当たりいくつかのトランジスタを任意に含むことができる。分子認識(および/またはこの反応中の進展)を明らかにする反応の前/後のシグナルを比較することも可能である。

【0027】

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

【0028】

好ましい実施形態による本方法は、次の工程：

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

10

20

【0029】

工程f~hを用いる場合、cおよびdを省略すること、すなわちただ1度だけ電子測定を行うことが可能である。

【0030】

分子プローブと接触させていないいくつかのトランジスタ(または、でなければ単独のトランジスタ)は、コントロールになり得る。これらの特性は、例えば全てのトランジスタを浸す測定電解質の添加の後に測定する。

30

【0031】

分子プローブのグラフト化は、直径約100 $\mu$ mの微小液滴を、市場で入手可能な金属のマイクロペンを用いてトランジスタの反応性表面上に沈積させることにより行われる。

【0032】

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

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

【0033】

この趣意において、ドレイン接続抵抗 $R_c$ は、ドーブされたラインの幾何学上の長さ、および断面積から算出され、その抵抗率は不明である。算出値は、DC電圧(例えば $U_{SD} = 0.1$  Vおよび $U_{SG} = 2$  V)を印加することによるドレインインデックスの関数としての抵抗の測定値と比較する。これにより、例として図4に与えられる補正カーブを得ることが可能になる。

40

【0034】

図5に表されるような装置は、本方法を実行するのに用いることができる：プラットホーム12がテーブル10の上に設置され、該プラットホームには、テーブル11に、3つの直交方向X、YおよびZへの移動を提供するマイクロコントローラを含むコントロール装置が組み込まれている。n個のトランジスタのネットワークを組み込んだチップ15は、支持体14

50

上に設置される。3方向X、YおよびZへの移動を提供するテーブル21を含むもう1つのプラットフォーム20は、n個のトランジスタの少なくとも一部に微小液滴を沈積させるためのマイクロペン、またはピペット23を保持するアーム22を移動するのに用いられる。スクリーン19に連結されたカメラおよび/または対物レンズ17は、微小液滴の沈積を観察し、操作を制御するのを可能にする。

【0035】

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

10

【0036】

本方法の実行を、ここで、図6に関連して記載する。

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

【0037】

局所沈積の前、しかし水でのリンスの前および後に行われる2つの測定の間は、図6中に小さい四角形として示される。十字形は、2つの異なる溶液の局所沈積の後に行われた測定と、沈積前に行われた測定(測定は、水でのリンスの前に行われる)との差異を示す。

20

【0038】

図5に示す装置22上に載せた市販のピン23 (Telechem SMP3B)を用いて、溶液1をトランジスタ5~7 (ピンおよび表面の間での接触)、トランジスタ19~21およびトランジスタ33~37の上に沈積させ、溶液2をトランジスタ66~69、トランジスタ76~79およびトランジスタ87~89の上に沈積させる。

【0039】

溶液1: 1 nmol/ $\mu$ lの、5'末端でチオール修飾された20マーのオリゴヌクレオチド0.5  $\mu$ l、30 mM酢酸ナトリウム(pH 4.3) 9  $\mu$ l、酢酸ナトリウム中の5 mMメルカプトシラン0.5  $\mu$ l、これは沈積前に周囲温度において1時間反応させる。

30

溶液2: pH 7の0.1x PBS緩衝液中のポリ-L-リシン(0.01% 重量/容積"w/v" 最終濃度(P8920、Sigma))。

【0040】

局所沈積の後、サンプルを湿性雰囲気中で15分間、次いで50 °Cで5分間乾燥させる。

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

【0041】

溶液1について、DNA上のシラン修飾はSiO<sub>2</sub>のOH基と反応し、そしてDNAは溶液中で負に荷電される。

40

よって、溶液1および2は、反対の符号のシグナルを与える。

【0042】

本発明のもう1つの実行を、ここで、図7に関連して記載する。

沈積の前/後の測定に対応する表面電位  $U_{SG}$  の差異を測定する。  $U_{SG}$  を測定するために、二次元特性、例えば $I_D(U_{SG}, U_{SD})$ を測定し、96個のトランジスタの固有特性を、直列のドレインラインの抵抗 $R_C$ の関数として数値的に補正することにより測定する。SiO<sub>2</sub>界面の状態の修飾は、定数 $U_{SD}$ およびドレイン電流 $I_D$ におけるシフト  $U_{SG}$ に対応する、固有特性の変化を誘導する。このシフトは、図6に表される電流  $I_D$ における変化と異なり、トランジスタの動作点の独立した測定を直接得ることを可能にする。  $U_{SG}$  の値は、第一の近似において、局所沈積により誘導されるSiO<sub>2</sub>/液体界面での変化を定量することを可能

50

にする。変形によると、 $U_{SG}$ を、 $I_D$ を一定に保つように変化させる。

【0043】

図8A~8Cは、ポリ-L-リシンの沈積の前および後に行われた微分測定(図8A)、KClの濃度の関数として行われた微分測定(図8B)、および沈積されたポリ-L-リシンの濃度の関数として行われた微分測定を示す。

図8Aにおいて、ドレイン電流 $I_D$ の変動  $I_D$ は、X軸上に示されるトランジスタ60~96のそれぞれについてY軸上に表される( $U_{SG} = 1$  V、 $U_{SD} = 0.9$  Vおよび電解質0.1 mMのKCl)。局所沈積の前に行われたが、水でのリンスにより分けられた2つの測定の間の変動  $I_D$ は、丸形で表される。ポリ-L-リシンの局所沈積の前および後に行われた測定に対応する変動  $I_D$ は、星形で表される。局所沈積の後、サンプルを、50 で5分間乾燥させる前に、湿性媒質中で15分間、周囲温度において放置する。ポリ-L-リシンの希釈 $C_0$ は、pH 7の0.1 × PBS緩衝液中に0.01%重量/容積 "W/V"最終濃度(P8920、Sigma)である。

10

【0044】

図8Bにおいて、ソース-ゲート電圧 $U_{SG}$ における変動  $U_{SG}$ は、 $U_{SD} = 1.2$  Vおよび $I_D = 50$   $\mu$  Aの62 FETトランジスタのネットワークのトランジスタのいくつかについて測定される。参照測定(局所沈積の前に、0.01 mMのKClの濃度で行われる)と、2連続の測定(ポリ-L-リシンの局所沈積の後に、種々の濃度のKClで行われる)との間の差異は、丸形および星形で表される。ここで、ポリ-L-リシンの局所沈積は、図8Aの場合と同様に、同じ希釈 $C_0$ の2つの別個の領域において行われた。2連続の測定のそれぞれにおいて、測定緩衝液中のKClの濃度は、範囲が0.1 mM、1 mMおよび10 mMの値を含む、0.01 mM~100 mMの間で変動させる。2連続の測定の間、表面を水でリンスする。ポリ-L-リシンの検出の顕著な感度が、0.01 mMおよび1 mMの間のKCl濃度について観察され、これらの値を超えると、ピークの高さは徐々に減少する。

20

【0045】

図8Cは、沈積されたポリマー(ポリ-L-リシン)の濃度、すなわち0.1 × PBS 緩衝液、pH 7中の $2C_0$ 、 $C_0$ 、 $C_0/2$ 、 $C_0/4$ 、 $C_0/8$  ( $C_0$ は、図8Aの測定で示される値を有する)の関数として、電圧 $U_{SG}$ における変動  $U_{SG}$ を示す。測定条件は次のとおりである： $U_{SD} = 1$  V、 $I_D = 10$   $\mu$  A、およびKClについて0.01 mMの濃度。これらの測定は、選択された実験的条件下で、 $C_0$ を超えて濃度を増加させることに利点がないことを示す。

30

【0046】

図9A~9Dは、DNAの電子検出を示す。電圧 $U_{SG}$ および電圧 $U_{SG}$ における変動  $U_{SG}$ は、 $U_{SD} = 1$  V、 $I_D = 100$   $\mu$  A、および0.01 mMのKCl濃度の動作点に対応する。これらは、特性 $I_D(U_{SG}, U_{SD})$ から得られ、そしてX軸上のFETトランジスタ番号(1~96)とともにカーブに記録される。

【0047】

星形は、図6に関して上で示したような、水酸化ナトリウムでの最初の表面処理の前の測定を表す。丸形は、全体のネットワーク上でのポリ-L-リシンのインキュベーションの後の測定を表す。DNAの固定を許容するために、FETトランジスタのネットワークを、ポリ-L-リシン(濃度 $C_0$ )の希釈中に30分間インキュベーションする。次いで、いずれの予めの乾燥もなしに、水でリンスを行い、その後、空気乾燥する。インキュベーションにより、電圧 $U_{SG}$ において $97 \pm 50$  mV (準備された67を超える表面の統計的な値)の値のシフトとなり、これが電子シグナルにおけるトランジスタ間の変動を減少させる。このシフトは、同じ濃度で局所沈積について図8Cに関して測定された値で観察されたものと矛盾しない。四角形は、トランジスタ番号30、60および90の周囲でのオリゴヌクレオチド(5' Cy-5修飾された20マーのオリゴヌクレオチド、脱イオン水中に濃度50  $\mu$  M)の局所沈積の後の測定を表す。上記の3つのDNAの点の微蛍光のイメージを、グレー水準で図9Aの上に表す。

40

【0048】

図9Bは、Cy5修飾されたオリゴヌクレオチドの電氣的検出、および蛍光による検出を示す。星形で表される点は、DNAの異なる濃度(Ref. = 0  $\mu$  M、5  $\mu$  M、10  $\mu$  M、20  $\mu$  M)での4つの局所沈積の前および後に行われた2つの電子測定の間の変動  $U_{SG}$ により得られた。これ

50

らは、トランジスタの特性において観察され、かつDNAの局所沈積による電圧 $U_{SG}$ における変動  $U_{SG}$ を示す。四角は、電解質を用いて電子測定が一度行われた、乾燥されたFETトランジスタ上で測定された蛍光強度を示す。同じ電子検出が、同じタイプであるが、修飾されていないオリゴヌクレオチドから得られることが記載される。

#### 【0049】

図9Cは、FETトランジスタの2つのゾーンAおよびB上への2つの産物の巨視的沈積後の、二本鎖DNAの検出を示す。2つのチューブAおよびBから採取された $0.15\mu\text{l}$ を、マイクロピペットを用いて、FET電界効果形トランジスタのネットワークの2つのそれぞれの領域上に沈積させる。ネットワークは、DNAを固定するためにポリ-L-リシンで予め被覆され、参照となるように測定された。図9CのゾーンA (トランジスタ1~20)は、チューブAからの溶液で、そしてゾーンB (トランジスタ50~90)は、チューブBからの溶液で被覆され、それらの間に被覆されていない中央領域(トランジスタ21~49)が残ることを許容する。インキュベーションは、乾燥せずに15分間行い、その後、水でリンスし、次いでネットワークのトランジスタを測定する。トランジスタ1~20 (ゾーンA)を、以下に記載される手順に従ってチューブAで得られるポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)の産物を含む溶液とインキュベートした。ゾーンB (トランジスタ50~90)との比較、およびAとBとの間の、上記のインキュベートしていないゾーンとの比較で、このゾーンにおいて下方へのシフトが見られる。実際に、ゾーンBで用いられる参照溶液は、二本鎖DNAを産生しないように選択された(以下に記載の手順によるチューブB)。

10

#### 【0050】

図9Dでは、以下に記載の条件下でPCR増幅により得られた溶液がその上に沈積されているMUT領域(トランジスタ1~35)において、変異を有するDNAから、 $U_{SG}$ の下方へのシフトが観察されるのに対して、出発DNAは変異を有さない参照領域WTにおいては、このようなシフトは観察されない。

20

#### 【0051】

図9Cの実験について、1009塩基対DNA断片のPCR増幅のための技術は、2つのプライマー：

5'-CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC

および

5'-CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT

を用いて、BstEII酵素で消化したバクテリオファージ DNAを用いる。

30

#### 【0052】

PCRプロトコルは、市販のサーモサイクラーで：

- 94 °C で3分間の開始、

- 94 °C で30秒 / 57 °C で30秒 / および72 °C で2分間の、変性 / ハイブリダイズ / 伸長の30サイクル

で行われる。

最後のPCR工程は、72 °C で3分間行われる。

#### 【0053】

$50\mu\text{l}$ の容積について、BstEIIで消化された DNA 10 ng、各プライマーについて20ピコモル、およびそれぞれ最終濃度 $50\mu\text{M}$ をもつ4つのdNTPを用いる。ロシュディアグノスティクスからのTAQポリメラーゼ( $1\text{U}/\mu\text{l}$ )  $0.5\mu\text{l}$ を、標準のPCR反応緩衝液(TAQポリメラーゼとともに供給される)の中に入れる。これは、ゾーンAへのチューブAからの調製に対応する。参照チューブB(ゾーンBに対応する)では、4つのdNTPの1つ、すなわちdTTPを、dNTPの全濃度が同じに保持されるような様式でdCTPと置換し、これが二本鎖DNA産物の合成を阻害する。

40

#### 【0054】

両方の場合において、PCR産物を、キアゲン社からの"QIAQUICK"カラムで2回精製し、濃度10 mMにおいて、Tris-Cl緩衝液、pH 8.5で溶出する。

#### 【0055】

50

図9Dに対応する実験の関係において用いられる変異の具体的なPCR増幅は、ヒトCX 26遺伝子(受理コードM 86849、染色体13q11-12)の断片に基づく。この遺伝子は、1以上の患者を起源とするゲノムDNAから増幅される。PCR法は、サイクルプライマー、ならびにHuman Molecular Genetics、1997、第6巻、第12号、第2173~2177頁に出版されている、最初の"Prelingual Deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene"、およびTHE LANCET、第353巻、April 17、1999、第1298~1303頁に出版されている、次の"Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling"に用いられたF. DENOYELLEらによる論文に記載されている条件を用いる。Pwoポリメラーゼ(ロシュディアグノスティクスより)を、1.5 mMで、MgSO<sub>4</sub>を用いたPCR緩衝液中で用いる。プライマーは、GAP1FおよびCONNR (上記のF. DENOYELLEによる第二の論文の第1299頁右欄、終わりから2番目のパラグラフを参照)であり、実験条件は、同じ著者による上記の最初の論文(第2177頁)のものである。各プライマーについて0.6 μM、各dNTPについて0.2 mMの最終濃度を用いる。

10

## 【0056】

PCR産物は、キアゲン社からの"QIAQUICK"カラムで精製し、希釈後(10000倍)に、その後に行う変異に特異的な反応における出発DNAとなる。

## 【0057】

PCR増幅は、この変異に特異的なプライマーによる、CX26遺伝子における変異35delG (または30delG)の検出を許容するように選択される。サイクル条件およびプライマーの配列は、"PCR test for diagnosis of the common GJB2 (connexin 26) 35delG mutation on dried blood spots and determination of the carrier frequency in France"の題名で、Molecular and Cellular Probes (2001) 15 第57~59頁に出版されている、G. LUCOTTEらによる論文に示される。各プライマーオリゴヌクレオチド20ピコモルを、50 μlの最終容積に対して用いる。

20

## 【0058】

変異に特異的な2つのプライマー(上記のLUCOTTEによる論文、第58頁右欄、MプライマーおよびNプライマー)、および共通プライマー(Cプライマー)を用いて、197塩基対のPCR産物を合成する。2つの特異的PCR反応を各DNAサンプルについて行い、これらの反応の第一を、第一の特異的プライマーを用いて行い、出発DNAの中に変異が存在すれば産物が得られる。第二の反応は、第二の特異的プライマーを用いて行い、出発DNAの中に変異が存在しなければ産物が得られる。これにより、サンプルが、この変異に関して正常、ヘテロ接合体またはホモ接合体であるかを決定することが可能になる。

30

## 【0059】

反応媒質50 μlの容積について、標準のPCR緩衝液中に、上記の予めの増幅を起源とするDNA 1 μl、各プライマー30ピコモル、100 μMの濃度のdNTPおよびロシュディアグノスティクスからのTAQポリメラーゼ(1 U/μl) 1 μlを用いる。PCR産物を、キアゲン社からの"QIAQUICK"カラムで2回精製し、10 mMのTris-Cl緩衝液、pH 8.5で溶出する。同じ対のプライマー:C-プライマーおよびM-プライマーを、WTおよびMUTチューブに用いる。出発DNAのみが相違点である。

40

## 【0060】

図10Aおよび10Bは、ライン(またはいくつかのライン)に沿って配置されたトランジスタTを有する、組み込まれた回路を示す。基板30の2つのマイクロ流体チャネル(例えば並列のチャネル)C<sub>1</sub>およびC<sub>2</sub>は、1以上の電界効果形トランジスタTを、チャネルC<sub>1</sub>および/またはC<sub>2</sub>を循環する溶液に接触させることを可能にする。マイクロ流体チャネル(またはキャピラリー)を含む基板30の材料は、PDMS (ポリジメチルシロキサン)またはその他のポリマー、ガラス、シリコンなどであり得る。

## 【0061】

したがって、2つのチャネルC<sub>1</sub>および/またはC<sub>2</sub>を循環する2つの溶液を用いて、微分測定を行うことができる。同じ基板30上に、このようなマイクロ流体チャネルの多数を製造

50

することも可能であり、該基板は、FET電界効果形トランジスタが組み込まれる半導体基板に接触するように配置されている。所定のチャンネル内で変動を測定することも可能である。この変動は、時間に関するものであり得る。キャピラリーの所定の位置に種々の溶液を注入することも可能であり、濃度のプロファイルは、注入点からかなりの距離であっても、チャンネルに沿って変化しないままである。"Microfabrication inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning"の題名で、SCIENCE、第285巻、July 2、1999、第83～85頁で出版されている、Paul J.A. KENISらによる論文(特に図1A)を参照とすることができる。

【0062】

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

10

【図面の簡単な説明】

【0063】

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

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

【図3】図3は、1次元または2次元のネットワークの伝送の電氣的ドレイン接続を図解する。

20

【図4】図4は、種々の電氣的ドレイン接続の抵抗を表す。

【図5】図5は、選択された反応性ゾーンに溶液を沈積させるための装置を表す。

【図6】ドレイン電流 $I_{SD}$ の変動による、 $U_{SG}$ および $U_{SD}$ 一定での、シラン処理されたDNAおよびポリ-L-リシンの存在の検出を図解する。

【図7】電圧 $U_{SG}$ の変動の検出による、 $I_{SD}$ および $U_{SD}$ 一定での、シラン処理されたDNAおよびポリ-L-リシンの存在の検出を図解する。

【図8】図8A～8Cは、種々の実験条件下で行った実験の結果を表す。

【図9】図9A～9Dは、DNAの電子検出を表す。

【図10】図10Aおよび10Bは、マイクロ流体チャンネルの使用を図解する。

30

【符号の説明】

【0064】

- 1 絶縁層
- 2 絶縁層
- 3 反応性領域
- 4 反応性表面
- 4' 反応性表面
- 6 電解質
- 10 ソース
- 11 テーブル
- 12 プラットホーム
- 14 支持体
- 15 チップ
- 17 対物レンズ
- 19 スクリーン
- 20 プラットホーム
- 21 テーブル
- 22 アーム
- 23 ピペット

40

【 図 1 】

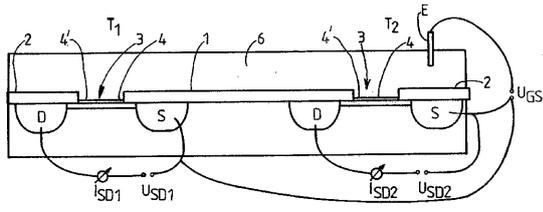


FIG.1

【 図 3 】

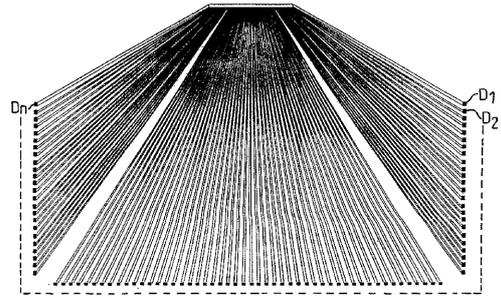


FIG.3

【 図 2 】

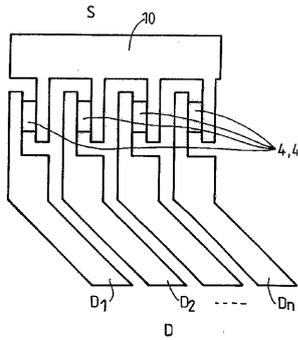
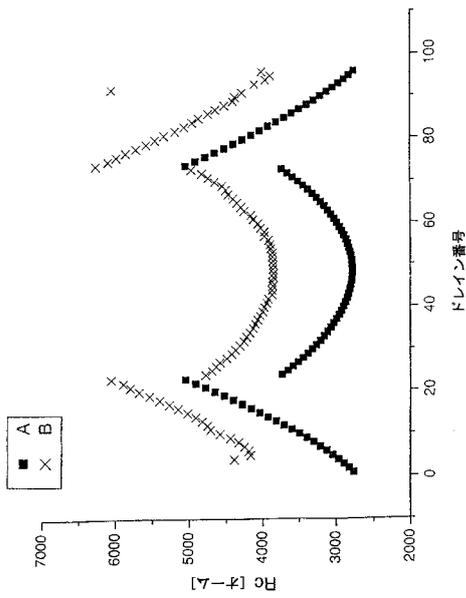


FIG.2

【 図 4 】



【 図 5 】

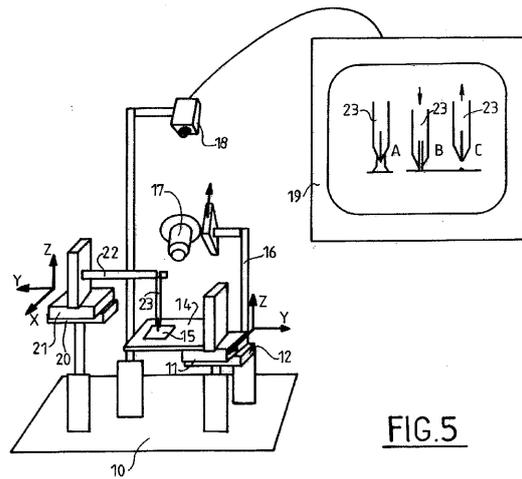
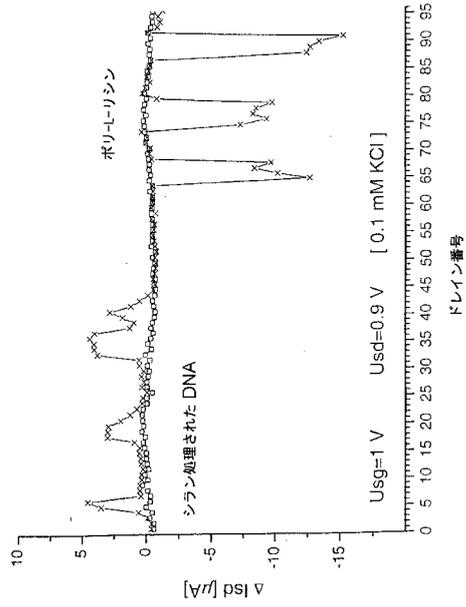
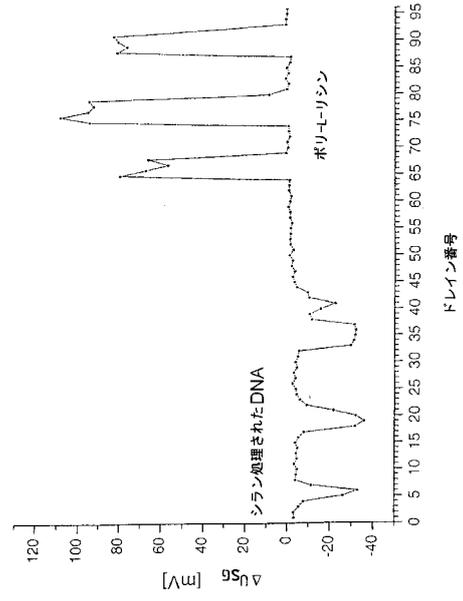


FIG.5

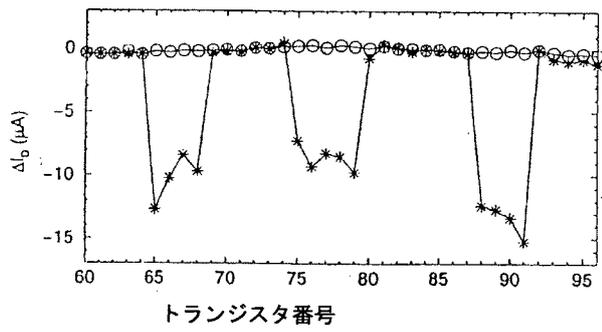
【 図 6 】



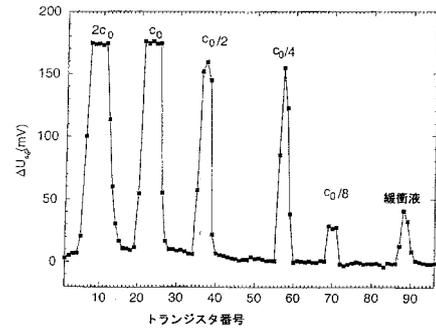
【 図 7 】



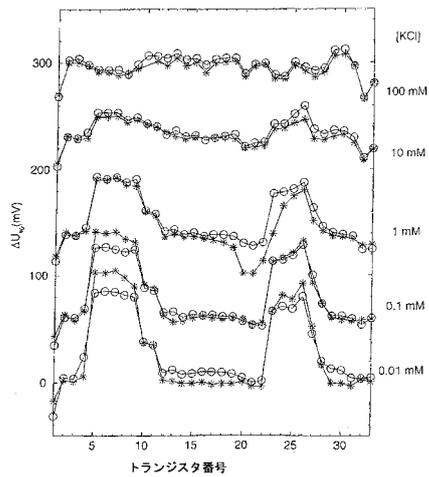
【 図 8 A 】



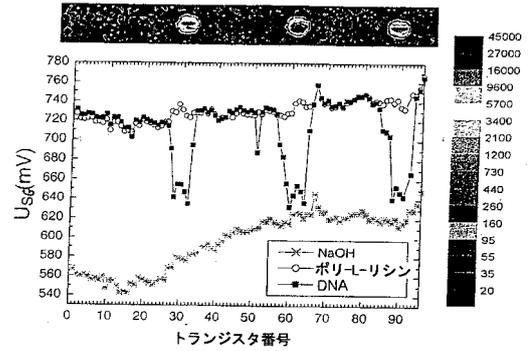
【 図 8 C 】



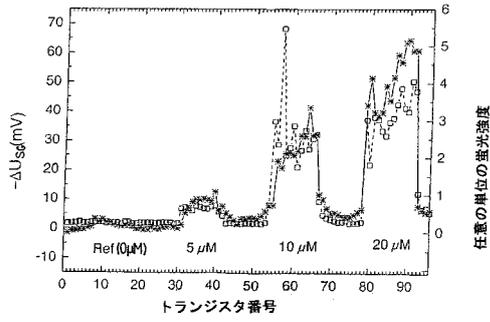
【 図 8 B 】



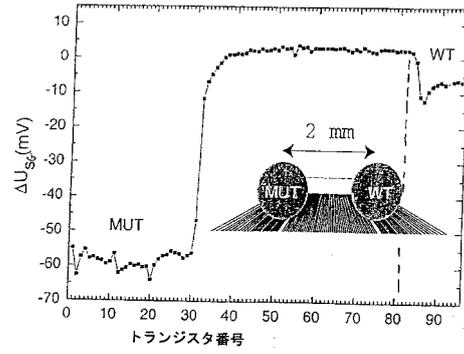
【 図 9 A 】



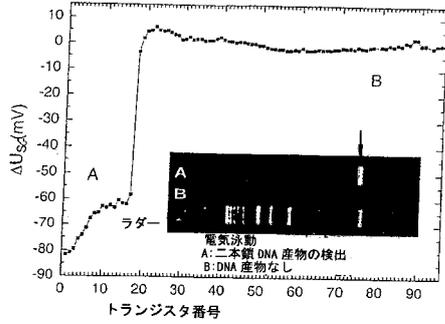
【図 9 B】



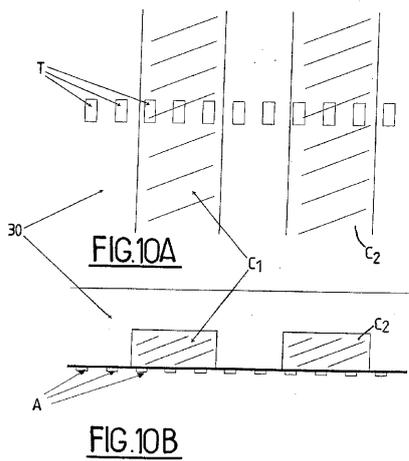
【図 9 D】



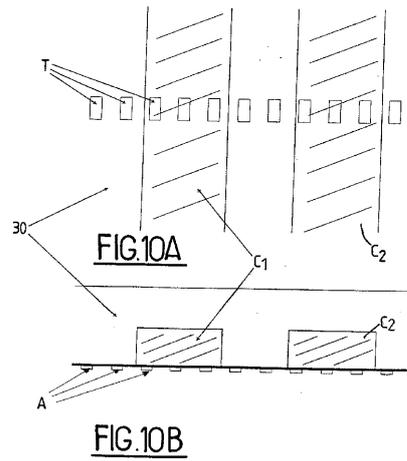
【図 9 C】



【図 10 A】



【図 10 B】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 02/04283
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 GO1N27/327 C12Q1/00 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 GO1N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 331 274 B1 (ACKLEY DONALD E ET AL) 18 December 2001 (2001-12-18) the whole document ---	1
A	US 6 322 963 B1 (BAUER ALAN JOSEPH) 27 November 2001 (2001-11-27) the whole document -----	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<b>Special categories of cited documents:</b>		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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 <b>23 April 2003</b>		Date of mailing of the international search report <b>04/06/2003</b>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlean 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 540-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>Moreno, C</b>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 02/04283

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6331274	B1	18-12-2001	US 6099803 A 08-08-2000
			US 6287517 B1 11-09-2001
			US 5849486 A 15-12-1998
			US 5632957 A 27-05-1997
			US 6017696 A 25-01-2000
			US 5605662 A 25-02-1997
			AU 742960 B2 17-01-2002
			AU 2763899 A 06-09-1999
			BR 9909207 A 06-11-2001
			CA 2320798 A1 26-08-1999
			CN 1296525 T 23-05-2001
			EP 1054949 A1 29-11-2000
			WO 9942558 A1 26-08-1999
			US 2001026778 A1 04-10-2001
			US 2001026935 A1 04-10-2001
			US 6068818 A 30-05-2000
			US 6225059 B1 01-05-2001
			US 6254827 B1 03-07-2001
			US 6315953 B1 13-11-2001
			US 6540961 B1 01-04-2003
			US 2002028503 A1 07-03-2002
			AU 733523 B2 17-05-2001
			AU 5367198 A 29-06-1998
			BR 9713991 A 08-02-2000
			CN 1268905 A 04-10-2000
			EP 0961652 A1 08-12-1999
			JP 2002501611 T 15-01-2002
			KR 2000057400 A 15-09-2000
			WO 9824544 A1 11-06-1998
			US 6309602 B1 30-10-2001
			US 6375899 B1 23-04-2002
			US 6319472 B1 20-11-2001
			US 6423271 B1 23-07-2002
			AU 723134 B2 17-08-2000
			AU 6968996 A 17-04-1997
			BR 9610618 A 06-04-1999
			CA 2233238 A1 03-04-1997
			CN 1202929 A 23-12-1998
			EP 0852617 A1 15-07-1998
			JP 11512605 T 02-11-1999
			NZ 318253 A 28-02-2000
			US 2002085954 A1 04-07-2002
			WO 9712030 A1 03-04-1997
US 6245508 B1 12-06-2001			
US 2002155586 A1 24-10-2002			
US 2001014449 A1 16-08-2001			
US 6187642 B1 13-02-2001			
US 6306348 B1 23-10-2001			
US 6518022 B1 11-02-2003			
US 6403367 B1 11-06-2002			
US 6322963	B1	27-11-2001	AU 4162899 A 05-01-2000
			EP 1093583 A1 25-04-2001
			US 6096497 A 01-08-2000
			WO 9966322 A1 23-12-1999

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Internationale No  
PCT/FR 02/04283

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N27/327 C12Q1/00 C12Q1/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 6 331 274 B1 (ACKLEY DONALD E ET AL) 18 décembre 2001 (2001-12-18) le document en entier -----	1
A	US 6 322 963 B1 (BAUER ALAN JOSEPH) 27 novembre 2001 (2001-11-27) le document en entier -----	1
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: <ul style="list-style-type: none"> <li>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</li> <li>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</li> <li>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</li> <li>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</li> <li>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</li> <li>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</li> <li>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</li> <li>*V* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque la document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</li> <li>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</li> </ul>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  23 avril 2003		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  04/06/2003
Norm et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Moreno, C

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 02/04283

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6331274	B1	18-12-2001	US 6099803 A 08-08-2000
			US 6287517 B1 11-09-2001
			US 5849486 A 15-12-1998
			US 5632957 A 27-05-1997
			US 6017696 A 25-01-2000
			US 5605662 A 25-02-1997
			AU 742960 B2 17-01-2002
			AU 2763899 A 06-09-1999
			BR 9909207 A 06-11-2001
			CA 2320798 A1 26-08-1999
			CN 1296525 T 23-05-2001
			EP 1054949 A1 29-11-2000
			WO 9942558 A1 26-08-1999
			US 2001026778 A1 04-10-2001
			US 2001026935 A1 04-10-2001
			US 6068818 A 30-05-2000
			US 6225059 B1 01-05-2001
			US 6254827 B1 03-07-2001
			US 6315953 B1 13-11-2001
			US 6540961 B1 01-04-2003
			US 2002028503 A1 07-03-2002
			AU 733523 B2 17-05-2001
			AU 5367198 A 29-06-1998
			BR 9713991 A 08-02-2000
			CN 1268905 A 04-10-2000
			EP 0961652 A1 08-12-1999
			JP 2002501611 T 15-01-2002
			KR 2000057400 A 15-09-2000
			WO 9824544 A1 11-06-1998
			US 6309602 B1 30-10-2001
			US 6375899 B1 23-04-2002
			US 6319472 B1 20-11-2001
			US 6423271 B1 23-07-2002
			AU 723134 B2 17-08-2000
			AU 6968996 A 17-04-1997
			BR 9610618 A 06-04-1999
			CA 2233238 A1 03-04-1997
			CN 1202929 A 23-12-1998
			EP 0852617 A1 15-07-1998
			JP 11512605 T 02-11-1999
			NZ 318253 A 28-02-2000
			US 2002085954 A1 04-07-2002
			WO 9712030 A1 03-04-1997
US 6245508 B1 12-06-2001			
US 2002155586 A1 24-10-2002			
US 2001014449 A1 16-08-2001			
US 6187642 B1 13-02-2001			
US 6306348 B1 23-10-2001			
US 6518022 B1 11-02-2003			
US 6403367 B1 11-06-2002			
US 6322963	B1	27-11-2001	AU 4162899 A 05-01-2000
			EP 1093583 A1 25-04-2001
			US 6096497 A 01-08-2000
			WO 9966322 A1 23-12-1999

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 27/30	3 0 1 X
	G 0 1 N 27/30	3 0 1 U

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW