

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-187491

(P2007-187491A)

(43) 公開日 平成19年7月26日(2007.7.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/30 (2006.01)	GO 1 N 27/30 B	4B024
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/30 351	4B029
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46 336Z	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2006-4334 (P2006-4334)
 (22) 出願日 平成18年1月12日 (2006.1.12)

(71) 出願人 306037311
 富士フイルム株式会社
 東京都港区西麻布2丁目26番30号
 (74) 代理人 100073184
 弁理士 柳田 征史
 (74) 代理人 100090468
 弁理士 佐久間 剛
 (72) 発明者 土谷 徹
 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社内
 Fターム(参考) 4B024 AA11 AA19 CA04 CA09 HA08
 HA09 HA12 HA14 HA19
 4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03
 CC08 FA12 FA15

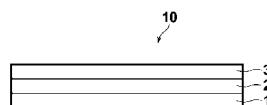
(54) 【発明の名称】 電気化学検出用電極およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 電気化学検出用電極を、核酸を再現性、安定性よく固定させることが可能なものとする。

【解決手段】 基板1上に形成された核酸を固定するための電極について、基板1の直上に相対的に結晶性が低い第一Au層2と、第一Au層2上に、相対的に結晶性が高く核酸を固定する面がAu(111)面からなる第二Au層3との少なくとも2層からなるものとする。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基板上に形成された核酸を固定するための電極であって、該電極が、前記基板の直上に相対的に結晶性が低い第一 Au 層と、該第一 Au 層上に、相対的に結晶性が高く前記核酸を固定する面が Au (111) 面からなる第二 Au 層との少なくとも 2 層からなることを特徴とする電気化学検出用電極。

【請求項 2】

前記第一 Au 層の (111) 面存在率が 30% 未満であって、前記第二 Au 層の (111) 面存在率が 30% 以上であることを特徴とする請求項 1 記載の電気化学検出用電極。

【請求項 3】

基板上に形成された核酸を固定するための電極の製造方法であって、前記基板上にスパッタにより Au を堆積させて第一 Au 層を形成し、次いで基板を 300 以上 700 未満に加熱してスパッタにより Au を堆積させて第二 Au 層を形成することを特徴とする電気化学検出用電極の製造方法。

【請求項 4】

前記基板を 300 未満に加熱して前記第一 Au 層を形成することを特徴とする請求項 3 記載の電気化学検出用電極の製造方法。

【請求項 5】

電極での酸化還元反応を利用して核酸のハイブリダイゼーションの有無を検出する電気化学検出チップにおいて、前記電極が基板上に形成された核酸を固定するためのものであって、前記基板の直上に相対的に結晶性が低い第一 Au 層と、該第一 Au 層上に、相対的に結晶性が高く前記核酸を固定する面が Au (111) 面からなる第二 Au 層との少なくとも 2 層からなることを特徴とする電気化学検出チップ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、電極での酸化還元反応を利用して核酸のハイブリダイゼーションの有無を検出する電気化学検出チップに用いられる電気化学検出用電極およびその製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

生体内の遺伝情報は DNA 塩基配列として保存されており、遺伝子の発現を解析することは各種疾病の予防、早期診断治療、オーダーメイド医療などに有効である。生物学、医学分野での遺伝子解析においては、特定の配列を有する核酸断片を検出する方法として、ハイブリダイゼーション法が広く用いられている。ハイブリダイゼーション法は、一本鎖の核酸同士が相補的である場合に相補性を持つ塩基対間の水素結合により二本鎖核酸を形成することを利用するものであり、この中でも特に、目的とする遺伝子の特異的に検出することができる方法として、サザンハイブリダイゼーション法が一般的に利用されている。

【0003】

サザンハイブリダイゼーション法では、まず試料 DNA を一種類以上の制限酵素でフラグメントとし、アガロースゲル電気泳動あるいはポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけてその分子量サイズによって分画ごとに分離し、次いで、分離した試料 DNA 断片を一本鎖に変性した後、ナイロンフィルターまたはニトロセルロースペーパーに固定化する。そして、その試料 DNA 断片と、この試料 DNA 断片に相補性を有する放射性同位元素で標識された一本鎖 DNA 断片とをハイブリダイズさせた後、洗浄後のフィルターをオートラジオグラフィーにかけ現像することによって、相補性 DNA とハイブリダイズする特定の塩基配列を有する試料 DNA 断片を検出することができる。

【0004】

しかし、上記のサザンハイブリダイゼーション法を含めた方法は標識として放射性同位

10

20

30

40

50

元素を用いるため、検出に長時間を要し、バンドが不明確となりやすく、また放射性物質の取り扱いやコストの点で問題がある。

【0005】

放射性同位元素による標識の代わりに蛍光物質を標識として用いる方法も知られている。蛍光物質を標識として用いる方法は、安全性および迅速性において優れた方法である。例えば、スライドガラスやシリコンなどの基板上に非共有結合（静電結合）や共有結合で固定して高密度に整列化しているDNA断片に対して、蛍光物質で標識したDNA断片をハイブリダイゼーションさせ、そのハイブリダイゼーションを検出するDNAチップがすでに利用されている。しかし、励起光による褪色が起ること、測定には専用の蛍光測定装置が必要であることや蛍光の内部消光および凝集等のために一定量以上の蛍光物質を導入することは困難であること等の問題がある。

10

【0006】

一方、電極での酸化還元反応を利用して核酸のハイブリダイゼーションの有無を検出する電気化学検出チップによる方法も知られている。この方法は、出力端子を備えた電極にプローブDNA断片を固定し、ここに試料DNA断片および電気化学活性縫込み型インターカレーターを接触させると、電極上に固定されているプローブDNA断片と試料DNA断片との間に二本鎖DNAが形成され、この二本鎖DNAの内部にインターカレーターが結合するため、電極に電位を印加すると、別に設けた対極との間にインターカレーターを介して電流が流れるため、その電流量を測定することによってハイブリダイゼーションを検出することができるものである。

20

【0007】

しかし、電気化学チップによる方法では電極（一般的にはAu電極）へプローブDNAを固定する必要があるため、固定したDNA量に関する再現性、固定されたDNAの固定に対する安定性が低いため、最終的に得られた結果（データ）の信頼性が低いという問題がある。

【0008】

Au電極上へのDNAの固定方法としては、DNAの末端に修飾したチオール基とAu原子の結合を利用した固定方法、Au電極上に形成したSAM（自己組織化単一分子膜）を介してDNAを固定する方法等が代表的である。

【0009】

しかしこれらの固定方法はAu(111)面上においては再現性良く結合するが、異なる面方位や、結晶性の悪い表面では結合し難いという問題がある。また、Au(111)面を得るための基板はマイカ（雲母）のみで、基板として一般的なガラス等のアモルファス材料や異なる結晶構造の基板では、Au(111)面が得られず汎用性に乏しいという問題がある。

30

【0010】

固定に関する再現性の問題を解決する方法として、例えば、特許文献1には、下地基板と上板とを組み合わせることによりマイクロ流路が形成され、下地基板上にマイクロ流路内に露出した一对の電極が形成され、既知の塩基配列を有する核酸断片および試料核酸断片を含む混合溶液をインターカレーターと共にマイクロ流路内に導入し、一对の電極間に電位を印加して電極間に流れる電流を測定することにより混合溶液内のハイブリダイゼーションの有無を検出する電気化学検出チップが開示されている。

40

【特許文献1】特開2004-109049号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

特許文献1に記載されている電気化学検出チップは、電極へプローブDNAを固定しないため、測定の再現性は向上されているものの、性能、生産性等の問題が解決されていないため、研究目的の使用にとまり汎用には至っていない。

【0012】

50

本発明は上記事情に鑑みなされたものであり、核酸を再現性、安定性よく固定させることが可能な、電気化学検出用電極およびその製造方法を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明の電気化学検出用電極は、基板上に形成された核酸を固定するための電極であって、該電極が、前記基板の直上に相対的に結晶性が低い第一Au層と、該第一Au層上に、相対的に結晶性が高く前記核酸を固定する面がAu(111)面からなる第二Au層との少なくとも2層からなることを特徴とするものである。

【0014】

前記第一Au層の(111)面存在率は30%未満であって、前記第二Au層の(111)面存在率は30%以上であることが好ましい。

【0015】

本発明の電気化学検出用電極の製造方法は、基板上に形成された核酸を固定するための電極の製造方法であって、前記基板上にスパッタによりAuを堆積させて第一Au層を形成し、次いで基板を300以上700未満に加熱してスパッタによりAuを堆積させて第二Au層を形成することを特徴とするものである。

【0016】

前記第一Au層の形成は、前記基板を300未満に加熱することが好ましく、より好ましくは50以上200未満、さらには50以上100以下に加熱することが好ましい。

【0017】

本発明の電気化学検出チップは、電極での酸化還元反応を利用して核酸のハイブリダイゼーションの有無を検出する電気化学検出チップにおいて、前記電極が基板上に形成された核酸を固定するためのものであって、前記基板の直上に相対的に結晶性が低い第一Au層と、該第一Au層上に、相対的に結晶性が高く前記核酸を固定する面がAu(111)面からなる第二Au層との少なくとも2層からなることを特徴とするものである。

【発明の効果】

【0018】

本発明の電気化学検出用電極は、基板上に形成された核酸を固定するための電極であって、この電極が、基板の直上に相対的に結晶性が低い第一Au層と、この第一Au層上に、相対的に結晶性が高く核酸を固定する面がAu(111)面からなる第二Au層との少なくとも2層からなるので、核酸を固定する面はAu(111)面上となり、4個のAu原子によって規則正しい隙間が形成され、ここに核酸の末端に形成されるチオール基(SH基)が入るため、Au-Sの配位結合によりその結合を強固なものとすることができ、安定性よく核酸を固定することが可能である。

【0019】

また、一般的にAuは酸化されやすく、他の物質との接触による影響を受けやすいため、チオール基の固定能の低下を生じやすいが、本発明の電気化学検出用電極は、核酸を固定する面がAu(111)面からなりAu原子が規則正しく配列しているので、安定して固定することが可能であり、また、Au原子が規則正しく配列しているのでC軸方向の剥離を抑制することができる。

【0020】

また、本発明の電気化学検出用電極の製造方法は、基板上にスパッタによりAuを堆積させて第一Au層を形成し、次いで基板を300以上700未満に加熱してスパッタによりAuを堆積させて第二Au層を形成するので、第一Au層の形成時には基板の凹凸を緩衝するように、基板近傍においてはAu(111)面の存在率が30%未満である相対的に結晶性の低いAu層が得られ、第二Au層の形成時には、基板の凹凸を緩衝した第一Au層上に、基板を300以上700未満に加熱することによって高いエネルギー状態でスパッタするので、Auが自己結晶化して、Au(111)面の存在率が30%以

10

20

30

40

50

上である相対的に結晶性の高い第二Au層を形成することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

以下、本発明の電気化学検出用電極について図面を用いて説明する。図1は本発明の電気化学検出用電極の概略断面図である。図1に示すように、本発明の電気化学検出用電極10は、基板1の直上に相対的に結晶性が低い第一Au層2と、この第一Au層2上に、相対的に結晶性が高く核酸を固定する面がAu(111)面からなる第二Au層3との少なくとも2層からなることを特徴とする。

【0022】

ここで、上記核酸とは、塩基、リン酸および糖からなるヌクレオチドを基本単位とし、このリン酸が各ヌクレオチド間で糖の3'と5'位炭素の間にジエステル結合を作ることにより重合した長い鎖状のポリヌクレオチドである。糖部分がリボースかデオキシリボースかによってRNAとDNAがある。核酸は電極に固定されるためにその末端にチオール基が形成されたものである。

10

【0023】

上記基板としては、特に限定されるものではなく、汎用性の高いガラス等のアモルファス材料やSi等の半導体材料、セラミックスやアルミナ等の絶縁材料等があげられる。

【0024】

第一Au層の(111)面存在率は30%未満であって、第二Au層の(111)面存在率は30%以上であることが好ましく、より望ましくは第一Au層の(111)面存在率は50%未満であって、第二Au層の(111)面存在率は50%以上であることが好ましい。ここで、Au層の(111)面存在率は、任意の点でTEM像を撮影し、目視により結晶配列のそろっている領域をAu(111)面とみなし、TEM像で目視によりAu(111)面を測定することにより求めるものである。

20

【0025】

上記のような電極を製造するためには、基板上にスパッタによりAuを堆積させて第一Au層を形成し、次いで基板を300以上700未満に加熱してスパッタによりAuを堆積させて第二Au層を形成する。

【0026】

スパッタとしては、直流スパッタ(DC)、高周波(RF)スパッタ、マグネトロンスパッタ、イオンビームスパッタ等いずれでもよいが、電極膜の品質や汎用性の観点から高周波スパッタが好ましい。

30

【0027】

スパッタ時の加熱温度は、第一Au層の形成時にあっては、基板を300未満に加熱することが好ましく、より好ましくは50以上200未満、さらには50以上100以下に加熱することが好ましい。第二Au層の形成時にあっては、基板を300以上700未満、より好ましくは500以上600以下に加熱することが好ましい。

【0028】

第一Au層および第二Au層の層厚は、スパッタ方法、スパッタ条件によるため一概には言えないが、第一Au層は30~70nmが好ましく、第二Au層は100nm以上が好ましい。

40

【0029】

なお、ここでは、スパッタによりAuを堆積させて第一Au層を形成し、次いで基板を300以上700未満に加熱してスパッタによりAuを堆積させて第二Au層を形成する場合について説明したが、基板上にAu層を形成する際に、最初に室温~200未満でAuのスパッタを開始し、その後、徐々に加熱温度を上昇させて、最終的に300以上700未満でスパッタを行うこととしてもよい。

【0030】

図2は、第二Au層3の核酸が固定される最上層のAu(111)面の拡大模式図である。図2に示すように、第二Au層3の核酸が固定される最上層のAu(111)面は、

50

4個のAu原子によって規則正しい隙間が形成され、ここに核酸の末端に形成されるチオール基が入るため、その結合を強固なものとすることができ、安定性よく核酸を固定することが可能である。

【0031】

本発明の電気化学検出用電極は、酸化還元反応を利用して核酸のハイブリダイゼーションの有無を検出する電気化学検出チップに利用することができる。この電気化学検出チップは、一本鎖の核酸（例えばDNAプローブ）を電極表面に固定化し、溶液系でインターカレータの存在下、被験DNAとプローブDNAとの相補的二本鎖DNAを形成させ、形成された二本鎖DNAの検出を、電極の電流変化を電気化学的シグナルとして検出するものである。

10

【0032】

図3に作用極(WE)、対極(CE)、および参照極(RE)からなる三電極方式を用いて電気化学検出法を実施する電気化学測定概念図を示す。出力端子を備えた作用極にプローブDNAを固定し、ここに被験DNA断片および電気化学活性縫込み型インターカレーターを接触させると、電極上に固定されているプローブDNA断片と被験DNA断片との間に二本鎖DNAが形成され、この二本鎖DNAの内部にインターカレーターが結合するため、電極に電位を印加すると、別に設けた対極との間にインターカレーターを介して電流が流れるため、その電流量を測定することによってハイブリダイゼーションを検出することができる。なお、参照極は作用極の電位を測定するためのものであり、参照極には事実上電流は流れない。

20

【0033】

以下、本発明の電気化学検出用電極およびその製造方法を実施例によりさらに詳細に説明する。

【実施例】

【0034】

(実施例1)

有機洗浄(アセトン及び超純水にて、5分間/2回超音波洗浄)を施したガラス基板上に、成膜速度100nm/min、パワー200Wの条件で高周波スパッタを行い、約50nmの膜厚の第一Au層を形成させた。次に、ガラス基板を500℃に加熱しながら、成膜速度100nm/min、パワー200Wの条件で高周波スパッタを行い、約150nmの膜厚の第二Au層を形成して電極を製造した。

30

【0035】

得られた電極表面をTEM像撮影したところ、実施例1の電極の第二Au層では、Au(111)面存在率が50%以上である、相対的に結晶性の高い表面が得られており、一方第二Au層を削り取り、さらに第一Au層の表層を削り取って基板近傍について再度TEM像撮影をしたところ、Au(111)面存在率が25%である、相対的に結晶性の低い面が得られていた。

【0036】

(比較例1)

実施例1と同様に下処理したガラス基板上に、 10^{-3} Pa以下の真空度中で、蒸着により200nmの厚みでAuを堆積させて電極を製造した。

40

【0037】

(比較例2)

実施例1と同様に下処理したガラス基板上に、100nm/minの成膜速度で200Wのパワーで250nmの膜厚のAuを堆積させて電極を製造した。

【0038】

(比較例3)

比較例2で得られた電極を電気炉に入れ、空气中530℃で7時間アニールして電極を製造した。

【0039】

50

図4～図7に実施例1、比較例1～3で得られた電極のRHEED（反射高速電子線回折）のパターンを示す。RHEEDのパターンから明らかなように、実施例1で製造した電極のみでAu(111)面が得られていた。

【0040】

また、実施例1および比較例1～3で得られたAu電極に、末端をチオール基で修飾したDNAプローブを固定し、応答曲線(DPV)を調べた結果を図8～図11に示す。DPVグラフは、DNAを固定した場合の応答曲線を丸繫線で、何も固定していない場合の応答曲線を四角繫線で示した。実施例1の電極の場合には固定されたDNA量が比較例1～3の電極に比べて大幅に向上していることがわかる。これは、比較例1～3で製造された電極の場合には、Au層が非晶質で単結晶化されていない状態であるために、DNA末端のチオール基との結合が十分に得られないが、実施例1で製造した電極は表面がAu(111)面となっており、この(111)面上の4個のAu原子の間にチオール基が確実に結合されたためと考えられる。このように確実に結合される部分が形成されているために、再現性が向上できるものと考えられる。

10

【0041】

以上のように、本発明の電気化学検出用電極は、基板の直上に相対的に結晶性が低い第一Au層と、この第一Au層上に、相対的に結晶性が高く核酸を固定する面がAu(111)面からなる第二Au層との少なくとも2層からなるので、核酸を固定する面はAu(111)面上となり、4個のAu原子によって規則正しい隙間が形成され、ここに核酸の末端に形成されるチオール基が入るため、Au-Sの配位結合によりその結合を強固なものとすることができ、安定性よく核酸を固定することが可能である。

20

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】本発明の電気化学検出用電極の概略断面図

【図2】核酸が固定される最上層のAu(111)面の拡大模式図

【図3】電気化学測定概念図

【図4】実施例1で得られた電極のRHEEDのパターン

【図5】比較例1で得られた電極のRHEEDのパターン

【図6】比較例2で得られた電極のRHEEDのパターン

【図7】比較例3で得られた電極のRHEEDのパターン

30

【図8】実施例1で得られた電極にDNAを固定した場合の応答曲線

【図9】比較例1で得られた電極にDNAを固定した場合の応答曲線

【図10】比較例2で得られた電極にDNAを固定した場合の応答曲線

【図11】比較例3で得られた電極にDNAを固定した場合の応答曲線

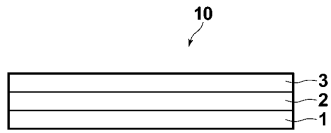
【符号の説明】

【0043】

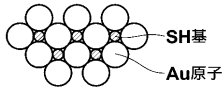
- 1 基板
- 2 第一Au層
- 3 第二Au層
- 10 電極

40

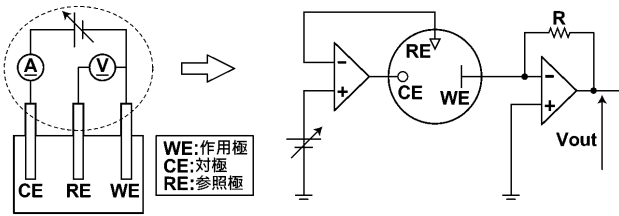
【 図 1 】



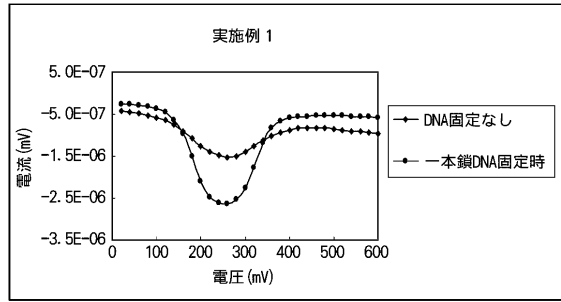
【 図 2 】



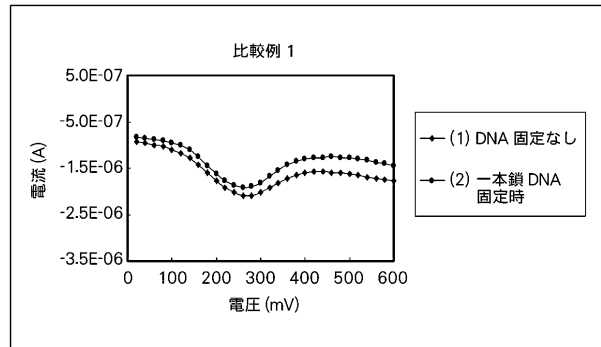
【 図 3 】



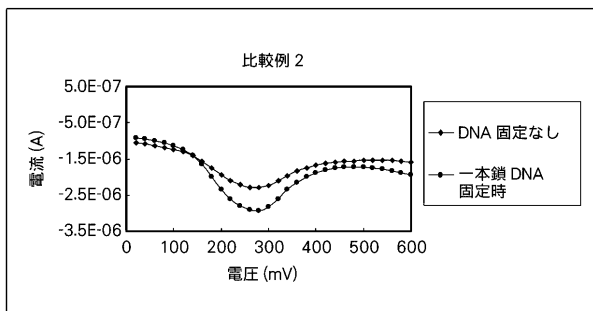
【 図 8 】



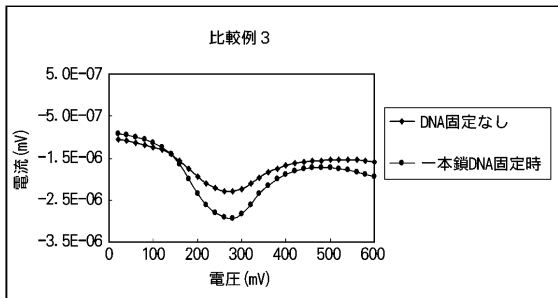
【 図 9 】



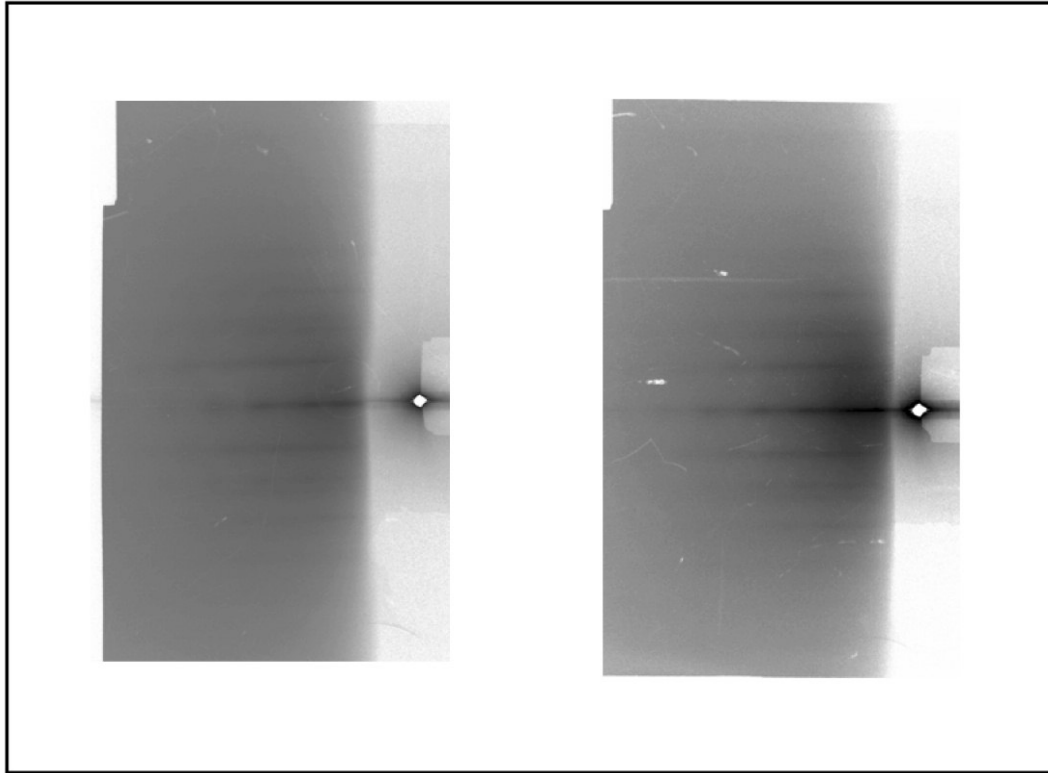
【 図 10 】



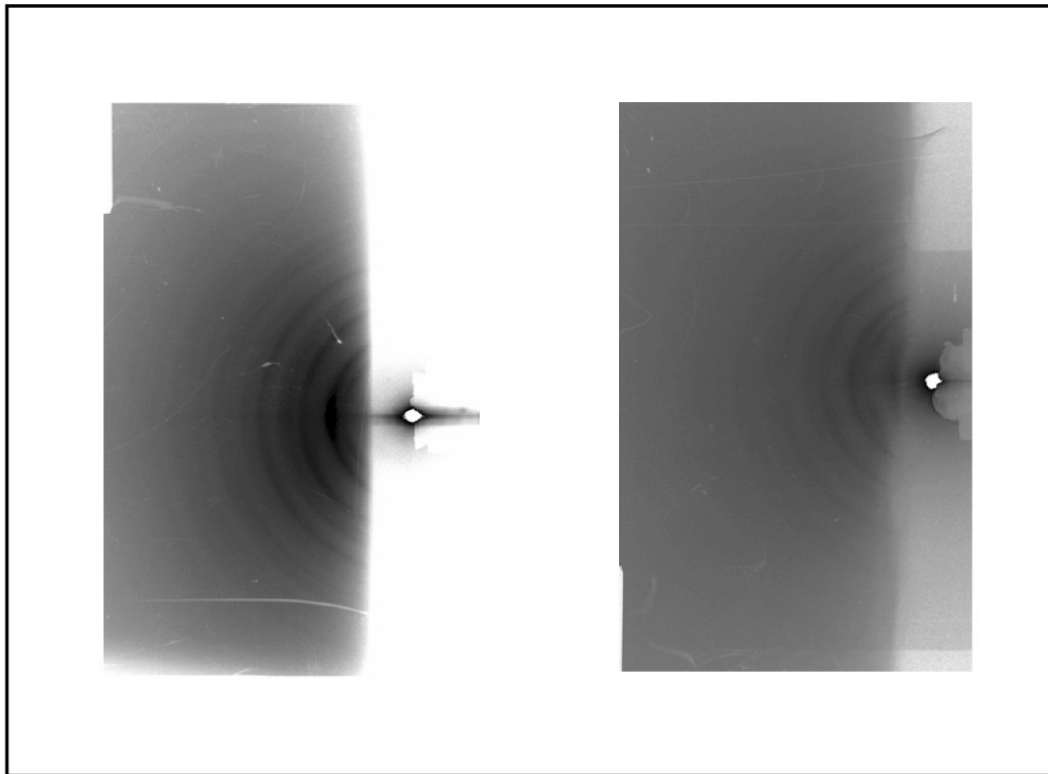
【 図 11 】



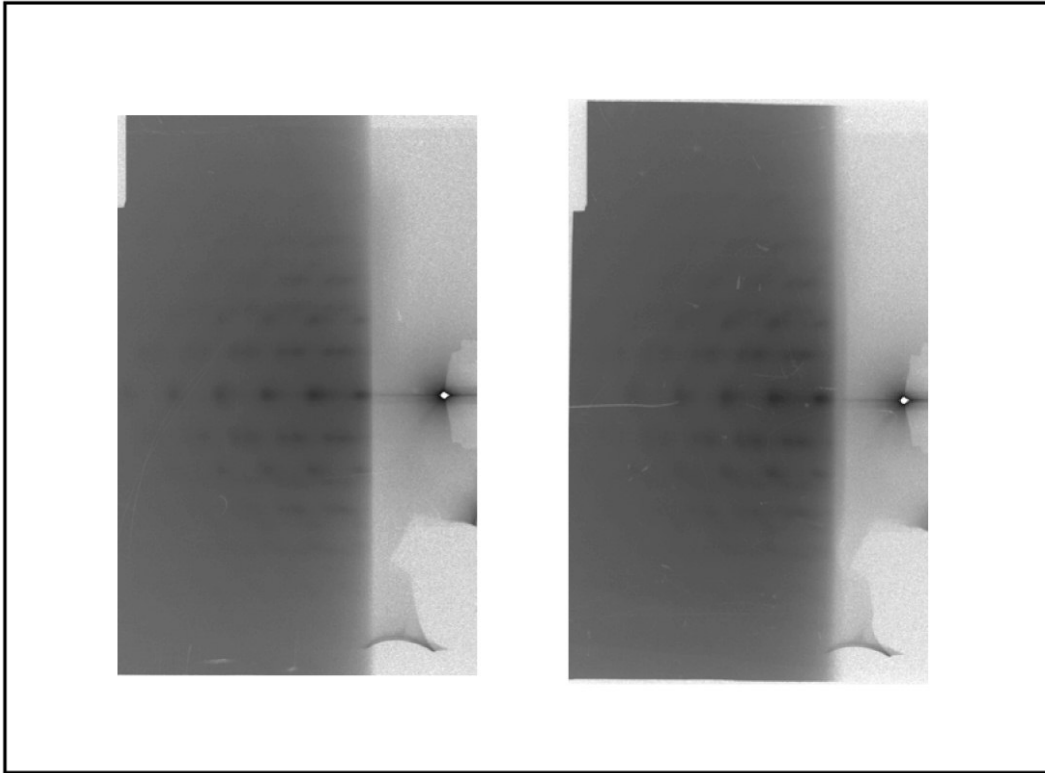
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

