

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4949589号  
(P4949589)

(45) 発行日 平成24年6月13日(2012.6.13)

(24) 登録日 平成24年3月16日(2012.3.16)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46	3 3 6 B
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/46	3 3 6 G
GO 1 N 27/333 (2006.01)	GO 1 N 27/46	3 3 6 M
GO 1 N 27/48 (2006.01)	GO 1 N 27/46	3 3 8
GO 1 N 27/30 (2006.01)	GO 1 N 27/30	3 5 3 R
請求項の数 12 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2001-580284 (P2001-580284)  
 (86) (22) 出願日 平成13年5月2日(2001.5.2)  
 (65) 公表番号 特表2003-532090 (P2003-532090A)  
 (43) 公表日 平成15年10月28日(2003.10.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/014257  
 (87) 国際公開番号 W02001/083674  
 (87) 国際公開日 平成13年11月8日(2001.11.8)  
 審査請求日 平成20年4月24日(2008.4.24)  
 (31) 優先権主張番号 60/201,603  
 (32) 優先日 平成12年5月3日(2000.5.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502400935  
 ガウ, ジェーン-ジェイアール  
 アメリカ合衆国・91754・カリフォル  
 ニア州・モンテレー パーク・コーポレイ  
 ト プレイス・2540・スイート ビイ  
 101  
 (74) 代理人 100064621  
 弁理士 山川 政樹  
 (72) 発明者 ガウ, ジェーン-ジェイアール  
 アメリカ合衆国・91754・カリフォル  
 ニア州・モンテレー パーク・コーポレイ  
 ト プレイス・2540・スイート ビイ  
 101

審査官 土岐 和雅

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 集積センサ・チップを有する生物学的同定システム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中のターゲット分析物の存在を検出する、またはターゲット分析物の量を測定する方法であって、その方法は、

作業電極と、基準電極と、カウンタ電極を有する基板上の電極を備えるセンサ上に、前記試料を配置するステップと、

前記作業電極を流れる電流を測定する間に、前記基準電極と前記作業電極間の電位差を制御する工程を実施する前記試料の分析を行うステップと、

前記試料内にターゲット分析物が存在するかどうか、またその量を判断するために前記測定した電流を用いるステップと、

から構成され、

前記それぞれの電極は導電性材料より構成され、

前記基準電極と前記作業電極上に形成された自己組織単層はチオール分子を含み、前記チオール分子は、前記基準電極、前記作業電極に直接結合した硫黄を有し、

前記試料内の構成物と作業電極の間に、レドックス反応が生じるように前記電位は制御され、

前記作業電極を流れる電流は前記カウンタ電極に流れる電流によりバランスをとっていることを特徴とする方法。

【請求項2】

前記基板はシリコン、ガリウム砒素、プラスチック、およびガラスからなる群から選択

されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記作業電極、基準電極およびカウンタ電極のそれぞれは、金の単一層を有することを特徴とする請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記分析はサイクリック・ボルタメントリ分析であることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記分析は電流測定分析であることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

前記作業電極と前記基準電極間の前記電位差は前記カウンタ電極に電流を流すことによって制御されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

試料中のターゲット分析物の存在を検出する、またはターゲット分析物の量を測定する電気化学センサであって、そのセンサは、

基板上に設けられた作業電極、基準電極およびカウンタ電極とから構成され、

前記それぞれの電極は導電性材料より構成され、

前記基準電極、作業電極上に自己組織化単層が形成され、

前記自己組織化単層はチオール分子を有し、前記チオール分子は、前記基準電極、作業電極に直接結合した硫黄を含むことを特徴とするセンサ。

【請求項 8】

前記基板は、シリコン、ガリウム砒素、プラスチック、およびガラスからなる群から選択されることを特徴とする請求項 7 に記載のセンサ。

【請求項 9】

前記作業電極、前記基準電極、およびカウンタ電極のそれぞれは金の単一層を有することを特徴とする請求項 8 記載のセンサ。

【請求項 10】

前記電極は前記基板上の  $160 \mu\text{m}^2 \sim 25 \text{mm}^2$  の面積を占有することを特徴とする請求項 7 記載のセンサ。

【請求項 11】

前記基準電極は、前記作業電極の一部が前記基準電極とは異なる領域間に位置するように、前記作業電極の周辺に配置されていることを特徴とする請求項 7 記載のセンサ。

【請求項 12】

前記カウンタ電極は、前記作業電極の一部が前記基準電極とは異なる領域間に位置するように、前記作業電極の周辺に配置されていることを特徴とする請求項 7 記載のセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、2000年5月3日出願の米国仮特許出願第60/201603号の特権を特許請求するものである。

【0002】

(政府出資研究開発に関する陳述)

本発明は、米国海軍省によって与えられた Grant No. N66001-96-C-8632 の下で政府支援を受けた。米国政府は、本明細書にいくらかの権利を有する。

【0003】

(発明の分野)

本発明の分野は、一般に、イオン分子(例えば、鉄、クロム、鉛、銅、カルシウム、またはカリウム)および高分子(例えば、DNA、RNA、または蛋白質)を含めた様々なターゲット分析物を感知または検出するための装置および方法に関し、より詳細には、バイオセンサと、バイオセンサを使用する方法と、バイオセンサを作成する方法とに関する。

【0004】

10

20

30

40

50

(発明の背景)

病原性バクテリアなどの生体材料を検出するために様々なバイオセンサが開発されている。バクテリアを検出するための従来の方法は通常、有機体の形態学的評価を含み、そのような評価に必要な数の有機体の成長に依拠している(またはしばしばそれが必要である)。そのような方法は、時間がかかり、通常は現場条件下で実用的でない。高速検出および携帯性の要求が、病原体認識を信号変換と結合するシステムの開発をもたらした。バクテリアの光学検出と電気化学検出の両方が報告されている(イヴニツキ等, 1999年、T.ワン等, 2000年)(本明細書で引用する文献に対する完全な引用は本明細書の最後に与える)。しかし、本発明の実体は、電気化学方法のほうが、小型化に関して修正可能であるという利点を有することを突き止めた。

10

【0005】

理想的な検出器に対する要件には、比較的短時間で完了させることができるプロトコルを使用する高い特異性および高い感度が含まれる。さらに、小型化し、自動化することができるシステムが、特に現場で検出が必要とされる場合に、現在の技術に勝る大きな利点を提供する。

【0006】

電気化学方法は、電気回路完成の原理を使用する。電気回路を完成させるために、カウンタ電極を使用して、試料溶液または試薬に対するリターン経路を提供し、基準電極を基準点として使用して、それに対して1つまたは複数の別の電極の電位(典型的には作業電極または測定電極の電位)が求められる。このコンタクトは、電気化学手段、すなわち化学溶液または試薬に浸漬された金属電極によって提供しなければならないので、電極により発生する電位と直列に電位が発生するのを回避するのは不可能である。電気化学方法の従来の理論では、基準電極電位が非常に安定しており、溶液中での化学変化による影響を受けないことが重要である。したがって、非常に安定した基準電位を提供する銀/塩化銀基準電極が、今日基準電極に使用される最も一般的なタイプの電極である。

20

【0007】

図1を参照すると、典型的な銀/塩化銀基準電極10が、塩化銀(AgCl)で飽和された塩化カリウム(3.5M KCl)の溶液5中に浸漬された塩素処理銀ワイヤ1(塩化銀の層が銀ワイヤ上に被覆されている)を含む。この内部充填溶液5は、有孔セラミック接合20を介して電極10から徐々に浸みだし、基準要素1と試料の間の電気接続として作用する。安価であり、通常は測定に干渉しないので、塩化カリウムが使用される。溶液5はまた、基準要素1上のコーティングの溶解を防止するために塩化銀を含む。したがって、充填溶液穴40を使用して、電極10内の溶液5のレベルを維持する必要がある。

30

【0008】

しかし、本発明の実体は、上述した知られている基準電極電位を有する2層の基準電極(例えば銀で被覆された塩化銀)を必要とせずに、頑強かつ精密な生物学的検出を、電気化学方法を使用して、より正確にはレドックス(酸化還元)方法を使用して達成することができることを突き止めた。

【0009】

次に図2を参照すると、電気化学方法は、フィードバック・ループ内に試験セルが配置された制御増幅器であるポテンショスタット50を必要とした。目的は、第3の補助電極(カウンタ電極)80を介する電流の印加によって、試験電極(作業電極)60と基準電極70の電位差を制御することである。実際、最小限の構成要素を使用して、かなり良好なポテンショスタットを構築することができる。ここで示す回路では、90Aおよび90Bは、正のパワー・レールと負のパワー・レールの間に接続された1.22Vバンドギャップ基準ダイオードである。次いで、ポテンショメータ100を使用して、主増幅器110の非反転入力に加えられる必要なセル極性を設定する。作業電極60は回路の接地に接続し、基準電極70は、主増幅器110の反転入力に接続する。出力能力をいくぶん上げるために(ほとんどの動作増幅器が、約20mAに制限され、容量負荷に良好には耐えられない)、単一の利得バッファ増幅器120が使用される。好ましくは、利得バッファ増幅

40

50

器 1 2 0 は増幅器 1 1 0 よりもはるかに大きな帯域幅を有する。そうでないと、容量電池を駆動するとき回路が振動しやすい。バッファ増幅器 1 2 0 の出力は、電流測定レジスタ 1 4 0 を介して補助電極 8 0 に接続する。次いで差動増幅器 1 3 0 を使用して、このレジスタ 1 4 0 の両端間の電圧降下を測定し、それを接地基準出力電圧に変換する。

#### 【 0 0 1 0 】

マイクロエレクトロメカニカル・システム ( M E M S ) 技術は、様々な設計適用例で感知および作動を行うためにトランスデューサを用意する。M E M S 技術の重要な点は、電子回路と共に集積し、大量にバッチ製造することができるミクロンサイズの機械部品を可能にすることである。M E M S デバイスは、マイクロ加工のプロセスによって製造され、バッチ製造プロセスはリソグラフィを採用する。マイクロ加工は、事前設計レジスト・パターン ( マスク ) を使用して 3 次元構造を作成するために、リソグラフィ方法の使用に大きく依拠している ( ホーおよびタイ , 1 9 9 6 年 , 1 9 9 8 年 ) 。 M E M S は、マイクロ製造デバイスまたはその態様を作成するための 1 つの適切な技術である。マイクロ製造デバイスは通常、M E M S および / または集積回路 ( I C ) 技術を使用することによって製造されるデバイスと定義される。集積回路 ( I C ) は、基板材料の小さなチップと定義され、その上に、電子構成要素およびその相互接続の複合体がエッチングされる、または印刷される。

#### 【 0 0 1 1 】

本発明の実体は、電気化学方法に固有の小型化および携帯性の特徴が、この方法を、M E M S デバイスへの集積に優れた候補にすること、さらに様々なイオン分子および高分子 ( D N A 、 R N A 、 または蛋白質 ) を検出するために M E M S 技術をバイオセンシング方法と統合することが有利であることを突き止めた。

#### 【 0 0 1 2 】

また、本発明の実体は、バクテリアのバイオセンシングの分野で、高い特異性を達成する最も効果的な手段の 1 つはバクテリアの遺伝材料 ( 例えば r R N A 、 m R N A 、 変性 D N A ) を検出することであることを突き止めた。ターゲット・バクテリアの r R N A または s s D N A のみに配列が相補的である一本鎖 D N A ( s s D N A ) プローブを選択することによって、ハイブリダイゼーション・イベントの監視が、ターゲット細胞の選択的センシングを可能にする。感度を最大にするために、ハイブリダイゼーション・イベントと酵素反応の組合せが信号増幅をもたらす。これは、各基質から生成物への転換が信号全体に寄与するためである。酵素反応によって増幅される D N A ハイブリダイゼーションを検出するためのバイオセンシングは、本発明によれば、依然として比較的短時間で完了することができる。

#### 【 0 0 1 3 】

したがって、エシェリキア・コリ ( E . c o l i ) に対する原型電流測定検出器が、上述した決定および技術に基いて開発されている ( チェン等 , 2 0 0 0 年、ガウ等 , 2 0 0 0 年 ) 。 M E M S 、 自己組織化単層 ( S A M ) 、 D N A ハイブリダイゼーション、および酵素増幅の技術は全て、小型化された特定の高感度 E . c o l i 検出器の設計に寄与する。D N A 電気化学プローブは、すでに報告されており ( ワン等 , 1 9 9 7 年、マラザ等 , 1 9 9 9 年 ) 、通常はグラファイトまたは炭素電極が使用される。使い捨て試験ストリップ上のスクリーン印刷炭素電極を使用する、E . c o l i からの D N A の電流測定検出用の市販ユニットも利用可能である。スクリーン印刷は、低コストであるという利点を有するが、高次元精度を達成することは容易でない。そこで、本発明の実体は、金属 ( 例えば A u 、 A g ) や炭素など広い範囲の材料を  $\mu$  m サイズ寸法で正確にパターン形成するためにリソグラフィを使用する方法を開発する必要性を突き止めた。さらに、ピオチン - D A D - C 1 2 - S H ドデカンアミドの自己組織化単層 ( S A M ) など表面修正を利用することが、M E M S 表面上で分子を選択的に不動化する 1 つの好ましい方法である。A u 、 A g 、 および他の金属上への S A M の形成がよく研究されており ( レベル等 , 1 9 9 8 年、モテシャライ等 , 1 9 9 8 年、シャー等 , 1 9 9 8 年、ライリ等 , 1 9 9 9 年 ) 、蛋白質および他の生体分子を、S A M を使用して A u などの表面上に簡単に不動化することができ

10

20

30

40

50

る（オスツーン等，1999年、ケーン等，1999年、スピッケ等，1993年、ハウスリング等，1991年）。基板上でSAMを使用する電流測定方法は、ターゲット分析物を正常に検出することができることが実証されている（サン等，1998年、ホウ等，1998年、マーシー等，1998年）。

#### 【0014】

このEcoli検出システムで、本発明は、各技術に固有のいくつかの利点を識別し、利用する。DNAハイブリダイゼーションおよび酵素増幅を使用して、本発明は、必要な特異性および感度を達成する。MEMSおよびSAMを使用して、本発明の実体は、携帯型器具内に開発することができる小型システムを製造した。最後に、本発明は、この検出システムが広い範囲の病原性バクテリアに適用可能であることを実証した。例えば、検出モジュールおよびアッセイ・プロトコルを、尿路病原性バクテリアの検出、および中耳炎（中耳感染）をもたらす微生物の同定に適合させることができる。

10

#### 【0015】

したがって、本発明の目的は、新規なバイオセンサと、バイオセンサを使用する新規な方法と、バイオセンサを作成する新規な方法とを提供することである。この目的は、主要な請求項の特徴の組合せによって解決され、従属請求項がさらに、本発明の有利な実施態様を開示する。

#### 【0016】

（発明の概要）

本発明のこの概要は、本明細書で詳述する全ての必要な特徴を必ずしも説明するものではなく、本発明はまた、ここで説明する特徴、および本明細書の他の場所で説明する特徴の副次的組合せも含む。

20

#### 【0017】

本発明の第1の態様は、単一基板（シリコン、ガラス、プラスチックなど）に組み込まれたバイオセンサを使用して、特に高分子（例えば、DNA、RNA、または蛋白質）およびイオン分子（例えば、鉄、クロム、鉛、銅、カルシウム、またはカリウム）を含めた様々なターゲット分析物を感知または検出する装置および方法を提供する。基板に構成されたバイオセンサ・システムは、通常は、基板上に単一シリーズ・マイクロ製造プロセス・ステップとして一体に製造された少なくとも2つの電極を備える。しかし、システムを製造するために連続マイクロ製造ステップを採用することもできる。

30

#### 【0018】

1つの好ましい実施態様では、電極は全て、（例えば従来技術のAg/AgCl電極に比べて）純粋な金属から作成される。別の好ましい実施態様では、基板に構成されたバイオセンサ・システムが、作業電極、基準電極、およびカウンタ（補助）電極を備える。好ましくは、基板に構成されたバイオセンサ・システムは、従来の電気化学バイオセンサと同じ電気化学性能を有する。さらに、基板に構成されたバイオセンサ・システムは、集積回路（IC）および/またはMEMS製造プロセスに適合性があり、かつ小さな領域に構成することができるものにすべきである。

#### 【0019】

本発明の第2の態様は、小さなスケールでの表面張力を使用して、バイオセンサ内に試薬および/または溶液を閉じ込める装置および方法を提供する。試薬および/または溶液は、生物学的センシングに必要とされる必要な電解質および/または分析物を含む。

40

#### 【0020】

1つの好ましい実施態様では、本発明の装置および方法は、制御可能な表面性質および小さなスケールでの表面張力を使用することによって、様々なイオン分子（例えば鉄、クロム、鉛、銅、カルシウム、またはカリウム）および高分子（例えばDNA、RNA、または蛋白質）を感知または検出するために使用される各電極を、電解質および/または分析物が必要とされるときに試薬および/または溶液と選択的に接触できるようにする。

#### 【0021】

別の好ましい実施態様では、表面張力を使用して試薬および/または溶液（したがって、

50

試薬および/または溶液中の電解質および/または分析物)を閉じ込めるための装置および方法が、携帯型またはハンドヘルド・デバイスに組み込まれ、デバイスの振動に対する耐性をもつ。さらに、試薬および/または溶液は、バイオセンサが逆さになったとしても表面張力を使用してバイオセンサによって定位置に堅く保持されるべきである。

【0022】

本発明の第3の態様は、集積回路(IC)技術を用いて、1つおよび/または複数の電気化学センサの構成要素(例えば電極)と、1つまたは複数の電気化学センサ内の追加の必要な電子回路構成要素(例えば増幅器)とを集積する装置および方法を提供する。1つおよび/または複数のセンサ・システム全体を、単一の半導体(例えばシリコンまたはガリウム砒素)基板またはチップなど、単一のIC基板またはチップ上に組み込むことができる。好ましくは、1つまたは複数のシステムを完成させるのに、外部構成要素および/または器具が全く必要ない、またははるかに少数しか必要とされない。1つまたは複数のセンサは、好ましくは、ICプロセスを使用して製造される。

10

【0023】

高分子電気化学検出に使用される任意の実施態様で、本発明の好ましい特徴は、少なくとも1つの電極の表面を修正することである。好ましくは、表面は、表面上に高分子を係留するように修正される。好ましくは、表面は、ピオチンストレプトアビジンなど自己組織化単層(SAM)を使用して修正される。好ましくは、SAMは、電気化学センサ内の作業電極の表面上に配置される。任意選択で、ゾルゲルおよび/または炭素ペーストなどの材料を使用して表面を修正することができる(SAMの代用として、またはSAMと組み合わせて)。

20

【0024】

上述した「発明の概要」は、例示のみを表し、限定を与えない。本発明のさらなる実施形態および副次的組合せ、修正、変更、および強化は、本明細書で以下に続く発明の詳細な説明で明らかになる。

【0025】

図面中、いくつかの図を通じて同じ参照番号が同じ要素を示す。

【0026】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

次に、本発明の特定の実施形態を図面を参照しながら説明するが、本発明の精神、範囲、および企図から逸脱することなく様々な変更および修正を加えることができることを理解されたい。実際、図面および本明細書での説明は、例として提供されており、限定を与えるものではない。

30

【0027】

本発明の第1の形態は、電気化学検出の原理を使用する様々なターゲット分析物、特にイオン分子(例えば、鉄、クロム、鉛、銅、カルシウム、またはカリウム)および高分子(例えば、DNA、RNA、または蛋白質)の検出に関する。電気化学検出の原理は、レドックス電池の使用と、電池内での電気化学反応とを必要とする。

【0028】

レドックス電池は、電池内で化学反応が起きたときに化学エネルギーを電気エネルギーに変換する、または電気エネルギーを化学エネルギーに変換するデバイスである。典型的には、この電池は、水溶液(電解質)中に浸漬された3つの電極からなり、電極溶液面で電極反応が生じる。

40

【0029】

電池は、イオン伝導相(例えば、水溶液または非水溶液、熔融塩、イオン伝導固体)によって接続された2つの電子伝導相(例えば、固体または液体金属、半導体など)からなる。電流が流れる際、電子電流からイオン電流へモードを変更し、電子電流に戻さなければならない。伝導モードのこの変更には、酸化還元反応が伴う。各モード変更反応は半電池と呼ばれる。

【0030】

50

各電気化学反応は、レドックス電池内で生じる酸化還元（レドックス）反応である。例えば、酸素によって水素を酸化して水を生成する間の自発的「化学反応」では、電子は、水素から酸素に直接移る。対照的に、レドックス電池内での自発的電気化学反応では、2つの個別電極反応が、実質的に同時に、または並行して発生する。

【0031】

レドックス電池の重要な特徴は、同時に発生する酸化還元反応が、空間的に離れていることである。例えば、水素は、電子をアノード電極に移動することによってアノード電極で酸化され、酸素は、電子をカソード電極から受け取ることによってカソード電極で還元される。全電気化学反応は、2つの電極反応を合わせたものである。電極反応で発生するイオン、この場合はプラスの水素イオンとマイナスの水酸イオンが、溶液中で再結合されて、反応の最終生成物である水を生成する。

10

【0032】

このプロセス中、電子は、電子電流を測定することができる外部電気回路を介してアノード電極からカソード電極に伝導される。この反応を逆に行うこともできる。電解槽内に電力を印加することによって水を水素と酸素に分解することができる。

【0033】

本発明の3電極システムは、作業電極、カウンタ電極（または補助電極）、および基準電極を含む電気化学電池である。電流が、作業電極とカウンタ電極の間を流れることができ、作業電極の電位が基準電極に対して測定される。このセットアップは、作業電極表面上、または電気分析適用例で発生する電極反応の速度論および機構を検査するために、基本的な研究で使用することができる。本発明の好ましい実施形態での検出モジュールは3電極システムに基づいている。

20

【0034】

カウンタ電極は、電流を作業電極に印加することができるように電解質への電気接続を形成するために使用される。カウンタ電極は通常、その溶解を回避するために不活性材料（貴金属または炭素/グラファイト）から作成される。本発明に関連して、大きな電流がカウンタ電極から引き出されたときに、カウンタ電極での小さなフィーチャまたは小さな断面が周囲溶液を加熱することが観察された。電流が連続的にオーバーフローした場合には気泡が発生し、最終的には電極の溶解が生じる。したがって、電流および/または電極サイズを制御することによって気泡発生を回避することができる。本発明の1つの好ましい実施形態では、カウンタ電極の幅を、大きな電流のときでさえこの加熱の問題を回避するのに十分な大きさにする。

30

【0035】

基準電極は基準点として使用され、その基準点に対して他の電極の電位（典型的には作業電極または測定電極の電位）を電気化学電池内で測定することができる。銀/塩化銀電極、カロメル電極、または水素電極などいくつかの一般的に使用されている（通常は市販されている）電極アセンブリは全て、電池内で使用される電解質とは無関係に電極電位を有する。しかし、本発明の実体は、金電極の単一層など単一層電極が基準電極に関する要件を満たす場合があることを突き止めた。さらに、銀、銅、白金、クロム、アルミニウム、チタン、ニッケルなど他の材料も、正しい条件下で単一層基準電極として働く場合がある。

40

【0036】

作業電極は、本発明の電気化学バイオセンサで中心的な役割をする。作業電極で発生する反応を使用して、電解質溶液の電気化学分析を行うことができる。作業電極は、加えられる極性に依りて、アノードまたはカソードとして働くことができる。いくつかの「従来型2電極」電池における電極の1つも、例えば、（基準電極に対する）測定電極の電位が溶液中の1つの種の濃度の尺度である電位差測定電気分析セットアップでは、「作業」（「測定」、「インジケータ」、または「感知」）電極と考えることができる。

【0037】

1つの好ましい3電極実施形態では、カウンタ電極および基準電極が、バイオセンサの作

50

業電極の周縁の周りに概して延在するように構成される。適切な構成は、例えば図3、4、5、12、13、および23に見られる。

【0038】

1つの好ましい実施形態では、電気化学バイオセンサは、マイクロエレクトロメカニカル・システム(MEMS)技術を使用して製造される。ここで図3を参照すると、二酸化珪素( $\text{SiO}_2$ 、1000)の層が、ベア・シリコン・ウェハ200(第1級、p型<100>、厚さ500~550 $\mu\text{m}$ )上に堆積され、窒化珪素( $\text{Si}_3\text{N}_4$ 、1000)の下でパッド層として働いて、応力を解放し、接着性を改善する。複数のMEMSバイオセンサ(バイオセンサ210など)が、様々な寸法の作業電極(作業電極220など)と共に製造された。好ましくは、各作業電極は、エッチングされて、深さが最大350 $\mu\text{m}$ のウェルを形成する。

10

【0039】

窒化物被覆シリコン・ウェハ200は、パターン形成され、[111]および[100]結晶面に沿ってKOHを使用してバルク・エッチングされる。ウェルの深さは、KOHエッチング時間および温度によって制御される。100 $\mu\text{m}$ 幅の補助電極(補助電極230など)および基準電極(基準電極240など)が、対応する作業電極220から200 $\mu\text{m}$ だけ離隔される。図3は、MEMSバイオセンサ(バイオセンサ210など)を製造する際に使用されるパターンの概略図を示す。

【0040】

窒化物および酸化物がHFエッチングによって除去されて内部応力が解放され、電気絶縁のために別の酸化物層(5000)が堆積された。電極は、PR5214フォトリソ・レジスト・リバーサ・イメージングおよびAu(2000)/Cr(200)の電子ビーム堆積を用いた電子リフトオフ・プロセスによってパターン形成された。最後に、ウェハ200が、150で10分のホット・ベークの後、ヘキサメチルジシラザン(HMDS)蒸気中に3分間浸されて、周囲のSi領域に疎水性表面が生成された。作業電極(作業電極220など)の3次元性質と共に、周囲領域の疎水性が、溶液中の対象の分子を作業電極に不動化する初期センシング・ステップ中に、作業電極220上での液体水滴の封じ込めを可能にする。この設計は、MEMSアレイの他の領域への生体分子の不特定結合を効果的に最小限に抑えた。

20

【0041】

好ましくは、全ての電気化学電極に使用される材料が金(Au)である。MEMS技術で利用可能ないくつかの伝導材料が、リフトオフ・プロセスによってシリコン基板上にパターン形成され、3電極システムの特徴が、フェリシアン化物溶液を用いてサイクリック・ボルタンメトリによって試験された。金、白金、チタン、アルミニウム電極の様々な組合せが試験され、Au/Au/Auの3電極システムが最良のC-V曲線およびレドックス特性を与えた。

30

【0042】

図4は、バイオセンサ310など複数の円形バイオセンサを有する正方形基板300(シリコン、ガリウム砒素、プラスチック、および/またはガラスなど)上に製造されたバイオセンサの一実施形態を示す。バイオセンサ310は、作業電極320、基準電極330、およびカウンタ(補助)電極340を備える。前述したように、好ましくは、電極が、MEMS技術で利用可能な伝導材料の単一層から構成される。さらに、好ましくは、全ての電極を金(Au)で構成すべきである。

40

【0043】

図5は、本発明のさらに別の好ましい実施形態を示す。バイオセンサ410が、基板上に製造された作業電極420と、基準電極430と、カウンタ(補助)電極440とを備える。好ましくは、電極は金から作成される。作業電極420は、基板内にある、深さが最大350 $\mu\text{m}$ のビルトイン・ウェル450内に形成される。ウェル450は、よく区画された空間内部に所望の試薬を閉じ込めるように設計されている。図5に示されるように、本明細書で説明するマイクロ製造方法によって製造されるウェル450は、KOHエッチ

50



ングの後に(111)シリコン面によって境界を画される。上述したマイクロ製造方法によって形成される作業電極420は、ウェル450表面全体をカバーする。

【0044】

動作の際、上述した実施形態は、製造が容易であるという利点を有し、基板上に、単一シリーズ・マイクロ製造プロセス・ステップとしてまとめて製造することができる。しかし、製造に連続マイクロ製造ステップを採用することもできる。さらに、以下に示す分析および実験のように、これらの低コストであり、製造が容易なバイオセンサは、再利用可能であり、従来のバイオセンサと同じ頑強性および可逆電気化学性質を有する。

【0045】

1つの実験では、サイクリック・ボルタンメトリ(CV)分析技法が使用される。CVは、電気活性種およびバイオセンサの特徴の研究で使用される最も多用途の分析技法の1つである。電気化学システムの基本的な特徴では、産業および学術研究ツールとして広く使用されている。サイクリック・ボルタンメトリでは、制御された(典型的には固定された)掃引速度(V/秒)で初期電位( $E_0$ )から最大電位( $E_m$ )に電位が傾斜している。図6はその概念を例示する。分析物の還元および酸化の反復サイクルは、作業電極内外で交互にアノード電流とカソード電流を発生する。溶液および/または試薬が攪拌されないため、様々な分析物濃度および様々なスキャン率で拡散効果が観察される。

10

【0046】

アノード電流ピーク( $i_{pa}$ )とカソード電流ピーク( $i_{pc}$ )の離隔距離を使用して、レドックス反応に関わる電子の数を予測することができる。ピーク電流はまた、分析物濃度C、およびスキャン率vに正比例している。実験結果は通常、図7に示したグラフと同様に、電流対電位としてプロットされる。

20

【0047】

図7に示されるCVスキャンでは、電位が、x軸に沿ってグラフに描かれており、より正(または酸化)の電位が右にプロットされており、より負(または還元)の電位が左にプロットされている。電流は、y軸にプロットされており、カソード(すなわち還元)電流が負の方向に沿って下へプロットされており、アノード(すなわち酸化)電流が正方向にプロットされている。

【0048】

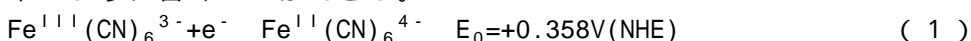
以下に述べる制御実験で使用された分析物は、窒化カリウム $KNO_3$ (101.11g/mol)の緩衝液中で+3酸化状態の鉄原子( $Fe^{III}$ )を含むフェリシアン化カリウム $K_3Fe(CN)_6$ (329.26g/mol)であった。作業電極の表面で、単一の電子をフェリシアン化物陰イオンに追加することができる。これは、その陰イオンを、+2酸化状態の鉄原子( $Fe^{II}$ )を含むフェリシアン化物陰イオン $Fe^{II}(CN)_6^{4-}$ に還元させる。分析物と電極のこの単純な1電子交換は、良好に挙動する可逆反応である。これは、分析物を、 $Fe^{II}(CN)_6^{4-}$ に簡単に還元し、その後、酸化して $Fe^{III}(CN)_6^{3-}$ に簡単に戻すことができることを意味する。

30

【0049】

レドックス・カップルは、酸化状態のみが異なる一対の分析物である。 $Fe^{III}(CN)_6^{3-}/Fe^{II}(CN)_6^{4-}$ レドックス・カップルに関する電気化学半反応は、以下のように書くことができる。

40



【0050】

図8に示されるボルタモグラムは、一方がカソードのピーク( $i_{pc}$ )であり他方がアノードのピーク( $i_{pa}$ )である2つの非対称ピークを示す。標準水素電極(NHE)など標準の基準電極を使用すると、この半反応に関連する見掛電位は+358mV前後になる。作業電極が、+400mVよりもプラス側の電位で保持される場合、分析物は、 $Fe^{II}(CN)_6^{4-}$ 形態に酸化される傾向がある。作業電極でのこの酸化は、溶液から電極内に電子を進めて、アノード電流をもたらす。+400mVよりもマイナス側の電位では、分析物が $Fe^{III}(CN)_6^{3-}$ に還元される傾向がある。作業電極でのこの還元

50

は、電極から溶液中に電子を流して、カソード電流をもたらす。本発明の好ましいセンサ設計実施形態は、NHE、銀/塩化銀(Ag/AgCl)、または飽和カロメル電極(SCE)など標準の基準電極を利用しないので、かつ3つの電極全てが金(Au)であるので、この実験での静止(不偏)電位が0ボルトに近づく。

【0051】

サイクリック・ボルタモグラムの重要なパラメータは、カソードおよびアノード・ピーク電流(それぞれ $i_{p,c}$ および $i_{p,a}$ )、ならびにこれらの電流が観察される電位(それぞれ $E_{p,c}$ および $E_{p,a}$ )の大きさである。これらのパラメータを使用して、見掛還元電位( $E_0$ 、これは $E_{p,a}$ と $E_{p,c}$ の中間に取られる)、および電荷移動反応で輸送される電子の数( $n$ )を計算することができる。

10

【0052】

ピーク電流( $i_{p,a}$ または $i_{p,c}$ )は、ランドルス・セヴシクの式で表すことができる。

$$i_p = 0.4463 n F A C [n F v D / R T]^{1/2} \quad (2)$$

ここで、

$n$  = レドックス・カップルに関する半反応で現れる電子の数

$F$  = ファラデー定数(96485 C/mol)

$A$  = 電極面積( $\text{cm}^2$ )

$v$  = 電位が掃引される速度(V/秒)

$D$  = 分析物の拡散係数( $\text{cm}^2/\text{秒}$ )

20

$R$  = 一般気体定数(8.314 J/mol·K)

$T$  = 絶対温度(K)

である。25 で、ランドルス・セヴシクの式は、以下のように変形することができる。

$$i_p = (2.687 \times 10^5) n^{3/2} v^{1/2} D^{1/2} A C \quad (3)$$

ここで、この定数は単位を有する(すなわち $2.687 \times 10^5 \text{ C mol}^{-1} \text{ V}^{-1/2}$ )。

【0053】

ランドルス・セヴシクの式は、ボルタモグラムが様々なスキャン率で取られたときに、掃引速度の平方根にピーク電流が比例することを予想している。図9に示されるように、ピーク電流と掃引速度の平方根との関係のプロットは直線になる。ランドルス・セヴシクの式を、以下のように、この直線の傾きに関する表現を与えるように修正することができる。

30

$$\text{傾き} = (2.687 \times 10^5 \text{ C mol}^{-1} \text{ V}^{-1/2}) n^{3/2} D^{1/2} A C \quad (4)$$

ピーク電位およびピーク電流に依存するスキャン率を用いて、レドックス反応に関与する電子の数を評価し、かつ反応全体での可逆性の度合の定性的評価を与える。可逆レドックス・カップルに関して電極反応( $n$ )中に移動される電子の数は、ピーク電位の離隔距離( $E_p = E_{p,a} - E_{p,c}$ )から求められる。単純な可逆(高速)レドックス・カップルでは、アノード・ピーク電流とカソード・ピーク電流の比が1となるはずである。好ましいセンサ設計を使用した実験の結果は、1からわずかしかずれない。大きな逸脱は、電極プロセスに関連する干渉化学反応を示し、しかし1からのわずかな逸脱は、理想的なシステムではないことを単に示唆するにすぎない。図10は、第1のサイクルからわずかに逸脱した12の連続サイクルに関するCVスキャンを示す。これらの結果は、明らかに、高い可逆性のあるシステムと、頑強な電池設計とを示す。

40

【0054】

従来のセンサと同じ性能を有しながら容易に、かつ安価に製造することに加え、本発明の上述した実施形態はまた、集積回路(IC)およびMEMS製造プロセスに適合性があるという利点を有する。さらに、図3および4に示されるように、これらの実施形態は、バイオセンサのアレイ内で、小さい領域内に構成することができる。

【0055】

本発明の第2の態様は、小さなスケールでの表面張力を使用する、バイオセンサの試薬お

50

よび/または溶液の閉込めに関する。試薬および/または溶液は、バイオセンシングに必要な(1つまたは複数の)ターゲット分析物および/または(1つまたは複数の)化学物質を含む。

【0056】

バイオセンサの性能は、その特異性および感度によって主に決定される。シリコンなどの基板上に試薬を閉じ込めるといった概念は本発明に関連する研究で発見され、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)などの分析物または他の試薬もしくは溶液成分が作業電極の周縁の周りの領域上に不特定結合し、高い検出ノイズを生じ、高い偽陽性率を生み出すことによって生じる高レベルの検出ノイズを低減するための解決策となる。HRPは、本実施形態ではシグナリング酵素として使用される。表面のHRP残留物からノイズが生じないことを検証するために、簡単な試験を行って、この望ましくない結合の寄与を推定する。HRPは、ベア・シリコン・チップに導入され、その後、基板溶液の追加前にいくつかの洗浄ステップが行われた。基板溶液を追加した後、非常に高レベルの酵素反応が即座に観察された。

10

【0057】

予想されるように、HRPは、他の蛋白質と同様に、シリコン表面に簡単かつ密接に付着する。不特定結合を低減する大きな改良は行わずに、いくつかの市販されている洗浄溶液および阻止蛋白質が試験された。その結果、望ましくない結合の効果を回避する最良の方法は、まずそれが起こらないようにすることであることが突き止められた。本発明のバイオセンサの作業電極の外側の領域は、生物学的センシングを達成するためにHRP溶液にさらす必要はない。しかし、従来技術では、常に水成システム中に3つの電極全てを浸漬することが慣例であり、全ての試薬が表面領域全体を介して流れる。

20

【0058】

本発明の実体によって発見された、よく区画された空間内部に何らかの試薬を閉じ込めるための最も簡単な方法は、バイオセンサ内にウェルを形成することである。図5に示されるように、マイクロ製造ウェルは、KOHエッチングの後、シリコン結晶面400によって境界を画される。リフトオフ・プロセスによって形成される作業電極420がウェル表面全体をカバーする。したがって、不特定結合する可能性がある試薬または溶液含有成分(例えばHRP)を始めはウェル領域に閉じ込めて、ウェル内で電極(好ましくは作業電極)への所望の結合を達成することができ、その一方でバイオセンサの周縁領域への不特定結合を回避する。次いで、試薬または溶液をバイオセンサから洗浄除去し、追加の試薬および/または溶液を後で追加して、センシング・プロセスを完了することができる。

30

【0059】

バイオセンサを設計する際に、表面および材料科学の重要性を過小評価することはできない。希釈された試薬がウェハ表面の周りを流れている状態で、受け入れられない量の不特定結合が洗浄プロセス中に依然として生じている場合がある。例えばHRPを含む洗浄溶液が周縁領域に留まる時間は、結合時定数よりもはるかに長い。したがって、ウェル構造を製造するのに加えて、好ましくは、周縁領域の表面を他の機構によって保護すべきである。

【0060】

したがって、表面が望ましくない試薬または結合成分に接触しないようにする別の方法は、表面を疎水性にすることである。シリコン表面のシラン化は、浮遊構造が表面張力によって基板に付くのを防止するために広く使用されている。ここでは、この手法を使用して、シリコン基板の周縁領域への生体分子の直接接触を防止する。

40

【0061】

様々な機能末端基を有するシランベースの分子を使用して、シリコン・ウェハ、窒化珪素チップ、および原子間力顕微鏡(AFM)チップの表面性質を修正した。表面修正のためのシラン化合物は、末端Si(Cl)<sub>n</sub>またはSiO-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基の加水分解により、シリコン酸化物表面に化学的に繋がれた頑強な単層を形成する。

【0062】

50

生体系と接触する人工材料の性能は、2つの材料の表面相互作用によって決定される。表面相互作用は、ノイズ増大および構造損傷をもたらす可能性があるため、表面修正が、この問題を回避するための一方法である。最も簡単な方法は、構造の表面性質を変更すること、またはプラスチックを使用することによるものである。表面を生体適合性または生体不活性表面に変換することにより、表面に強く繋がれた分子層の生成によって不特定の相互作用を最小限に制限する、またはなくす。最も広く実施されている手法は、主にC・D・ペインおよびG・M・ホワイトサイズによって80年代に開発されたよく確立された処置に従ってシリコン酸化物表面上にSAMを形成するために、金表面およびシラン分子上への化学吸着によってチオール分子からの自己組織化単層(SAM)を使用する。ゾルゲルおよび炭素ペーストなど他の材料を使用して表面を修正することもできる。

10

## 【0063】

次に図11(a)を参照すると、操作の際、試薬は疎水性作業電極によって成形され、小滴が、Au作業電極表面を覆うように良好に形成される。図11(b)は、試薬の体積の増大と共に、試薬によってカバーされる領域が徐々に広がり、その後、他の2つの電極をカバーすることを実証している。図11(c)は、余剰の試薬の流れがピペットによって投与されるときに、疎水性シリコン基板上に広がるのではなく、試薬の玉465が形成されることを示す。

## 【0064】

次に図12および13に移ると、各個別の電極が、制御可能な表面性質および小さなスケールでの表面張力を使用することによって、必要とされるときにのみ電解質および/または分析物、ならびに他の成分509に接触する。次に、図13のみを参照すると、電気化学検出に関して、全ての電極を、検出時間にのみ、電解質および/または分析物509中に浸漬しなければならない。ほとんどの適用例で、作業電極510上に電解質および/または分析物509を不動化するための図12に示される試料調製に大部分の時間が費やされる。図12および13に示されるこの実施形態では、電極の上の電解質および/または分析物509のカバー範囲は、表面性質および試薬体積520によって制御される。

20

## 【0065】

したがって、上述の実施形態は、小さなスケールでの表面張力を利用して、電解質および/または分析物、ならびに他の成分を閉じ込める。さらに、上述した実施形態は、はるかに少ない試薬(pL~mL程度)しか必要とせず、大量の溶液の必要性をなくする。さらに、少量の試薬使用のため、上述した実施形態は、電極の近く(pm~mm)に分析物を有するという利点を有し、それにより、電極に対する分析物の適切な露出を拡散効果のみを使用して達成することができ、攪拌または他の混合の必要性がなくなる。上述した実施形態の別の利点は、電極に対する電解質および/または分析物のカバー範囲の制御および/または変更が容易であることである。さらに、上述した試薬および/または溶液閉込め実施形態は、不特定結合を大幅に低減することによって、ターゲット分析物の損失を低減し、バイオセンサの感度を改善する。さらに、上述した実施形態は、バイオセンサの振動に対して比較的耐性があり、携帯型またはハンドヘルド・システムに適している。最後に、表面張力閉込め効果により、センサが逆さになったとしても、試薬は表面張力によってしっかりと保持される。

30

40

## 【0066】

任意選択で、図12および13に示されるように、バイオセンサ実施形態は反応ウェル530を備え、試薬520を定位置に保持する助けをし、試薬520の形状を制御することができる。しかし、そのようなウェル530は必要ではなく、試薬520の閉込めは、単純な平らな表面によって達成することができる。

## 【0067】

次に図14を参照すると、これは、このバイオセンサ(センサチップ)の実施形態の好ましい製造の最初のステップを示す。図14に示されるように、二酸化珪素(SiO<sub>2</sub>、1000)の層620がまず、ペアSiウエハ610(第1級または試験級、p型またはn型<100>、厚さ500~550μm)上に堆積される。二酸化珪素620は、窒化

50

珪素 630 (  $\text{Si}_3\text{N}_4$ 、1000 ) の下でパッド層として働いて、応力を解放し、接着を改善する。

【0068】

次に、図15および16を参照すると、窒化物ウエハ600は、マスク640によってパターン形成され(図15)、[111]および[100]結晶面に沿ってKOHを使用してバルク・エッチングされる(図16)。エッチングによりウェル650が作成される。ウェル650の深さ(最大350 $\mu\text{m}$ )は、KOHエッチング時間および温度によって制御される。

【0069】

次に図17を参照すると、次いで、窒化物630および酸化物620がHFエッチングによって除去されて、内部応力が解放され、電気絶縁のために別の酸化物660層(500)が堆積される。

【0070】

図18および19は、必要な電極を製造するためのリフトオフ・プロセスを示す。バイオセンシング用の電極が、二酸化珪素層660上でPR5214フォトリソ層670を使用することによって基板610上にパターン形成される。次に、マスク671を使用して、(望ましくないフォトリソ層670の除去を含めた)リバース・イメージング・プロセスを使用することによってフォトリソ層670上に所望のパターンを転写する。金Au(2000)の層680が、所望のフォトリソ・パターン層670を有する二酸化珪素層660上に電子ビーム堆積される。好ましくは、二酸化珪素層660上へのAuの接着を改善するために、Au(2000)680の堆積の前に、クロム(Cr200)など接着剤690の堆積が行われる。さらに、チタンまたは膠など他の材料も接着剤として働く場合がある。最後に、図19を参照すると、フォトリソ670および望ましくないAu680およびCr690が、フォトリソ・パターン層670を溶解することによって除去される。

【0071】

最終的に、ウエハ600は、150で10分のホット・ベークの後、ヘキサメチルジシラザン(HMDS)蒸気中に3分間浸されて、周囲のSi領域に疎水性表面が生成される。

【0072】

好ましくは、不特定結合を防止するために、表面修正ステップによってバイオセンサ(センサチップ)の表面が修正される。一例として、図20を参照すると、始めに濃縮「ピラニア」溶液(70体積%の $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、30体積%の $\text{H}_2\text{O}_2$ )を用いてAu表面680を浄化するステップと、脱イオン水( $\text{dH}_2\text{O}$ )を用いて入念にすすぎ洗いするステップとによって、高分子バイオセンサの表面を修正することができる。次に、図20を参照すると、ピオチン-DAD-C12-SH(12メルカプト(8-ピオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル)ドデカンアミド)(ロシュ GmbH、ドイツ)のSAMなどの表面修正材料が堆積される。ピオチン-DAD-C12-SHのSAMを堆積する際、スピケ他(1993年)の処置が使用され、試料は、 $4.5 \times 10^{-4} \text{M}$  11-メルカプト-1-ウンデカノールを有するエタノール中の50mMピオチン-DAD-C12-SH溶液(アルドリッチケミカル社 44,752-8)中で約18時間インキュベートされ、エタノールおよび水ですすぎ洗いされた。最後に、図21を参照すると、次いで、ピオチン被覆Au表面700が約10分間、1.0mg/mlストレプトアビジン溶液に露出され、やはり $\text{dH}_2\text{O}$ を用いてすすぎ洗いされて、ストレプトアビジン被覆Au表面710が形成された。

【0073】

本発明の第3の形態は、単一集積回路(IC)チップ上に電気化学(レドックス)バイオセンサ全体を集積することに関する。集積回路(IC)は、基板材料の小さなウエハと定義され、その上に、電子構成要素およびその相互接続の複合体がエッチングされる、または印刷される。

## 【 0 0 7 4 】

M E M S デバイスは、小さなフィーチャの結果として特有の性質を有し、しかし、M E M S ベースのセンサからの信号レベルは、従来センサに比べて比較的低い。オフチップ増幅モジュールを使用することによって感度を改善することができるが、ノイズおよびシステム・サイズも増大する。したがって、本発明の実体は、オンチップ増幅回路（バイオセンサ・チップ自体に組み込まれた増幅回路）および検出回路（例えばバイアス電位、電流測定、順次制御および信号処理を提供する）を設計して、チップ間干渉を低減する。検出回路と増幅回路はどちらも、バイポーラ・トランジスタ（B J T）および/または相補型金属酸化膜半導体（C M O S）デバイスを使用することによって提供することができる。

## 【 0 0 7 5 】

本発明の一実施形態では、オンチップ増幅デバイスが、通常は電気化学センサ電池の最大領域である作業電極の下に配置される。オープンベース・バイポーラ（B J T）フォトセンサに類似して、ベース領域は、電流利得をもつトランスデューサから電流を受け取り、電流利得は80～150の範囲にある。電気化学電池と共に実装することができる2つのタイプのB J T、すなわち垂直B J Tと水平B J Tが存在する。電流利得はベース領域の長さによって決定される。垂直B J Tでは、これは、イオン注入エネルギーとドーピング濃度の関数である。水平B J Tでは、この長さは、リソグラフィ分解能、イオン注入角度、および熱拡散の関数である。これらの理由から、垂直B J Tは、チップ間またはチップ内利得均一性の点でより信頼性がある。

## 【 0 0 7 6 】

図22は、好ましくは電気化学センシングに使用される3つの金属電極を備えるバイオセンサを含むチップ内増幅器回路の一実施形態を断面で示す。好ましくは、3つの電極が集積回路（I C）プロセスを使用して製造され、相互接続および絶縁のために比較的大きな領域を有する。バイオセンサ・チップ700全体を、2つのステージ（電気化学センシング・ステージ730とバイポーラ・トランジスタ（B J T）増幅ステージ720）で積層することができる。Au作業電極710が、B J Tデバイス720用の電気化学シールドとして働くことができる。作業電極コンタクト（コンタクト733、734、735、736、737、および738など）は、コンタクト界面740に接触し、また、より高い信号のために作業電極710の表面積を増大する。全てのコンタクトおよび電極構造を、金などの金属の単一層を備えるように作成することができる。さらに、バイオセンサ・チップ700はシリコン基板744を備える。基板744は、ベース領域743と、コレクタ742と、エミッタ741とを含む。ベース領域743は、作業電極710から電子流を受け取る。コレクタ742は、電源に接続され、増幅の理由での何らかのベース条件の下で電流利得を提供する。次いで、ベース743およびコレクタ742からの、結果として得られる電流がエミッタ741で測定される。

## 【 0 0 7 7 】

引き続き図22を参照すると、金属相互接続750が、信号出力（図示せず）およびエミッタ741に接続される。金作業電極710は、エッチングによって第1の二酸化珪素層760を介してベース領域743に接続する。第2の二酸化珪素層770が、B J T720と信号線を絶縁し、第1の層760は、3つの電極（作業電極710、基準電極780、およびカウンタ電極790）を絶縁する。作業電極710上のコンタクト（コンタクト733、734、735、736、737、および738など）は、表面積を増大し、またB J T720と共に固体コンタクトを形成する。コンタクトの寸法（それぞれ約数十μm）は、作業電極710上の任意の蛋白質S A Mのサイズ（約数十）よりもはるかに大きく、したがって蛋白質吸着に影響はない。

## 【 0 0 7 8 】

図24は、図23に示された基板805上にある複数のバイオセンサの好ましい実施形態を表す、バイオセンサ・ユニット800の別の好ましい実施形態の断面図である。図24に見られるように、バイオセンサ・ユニット800は、C M O Sおよび/またはB J T層830、電気化学層840、および試薬封じ込め層850を備え、すでに述べた図22の

10

20

30

40

50

実施形態と概して同様である。

【 0 0 7 9 】

したがって、図 2 2、2 3、および 2 4 に示されるように、本発明の第 3 の形態は、センサ内の構成要素を、生物学的検出に必要な他の構成要素とチップ間接続することなく、直接集積することができるようにするバイオセンシング・システムに関する。このシステムは、完全なシステムを構成するために、外部構成要素（器具）を必要としない、または最小数の外部構成要素しか必要としない。さらに、このオールインワン・バイオセンシング・システムは、生物学的センシングのコストおよびノイズ・レベルを低減し、そのようなセンシングのプロセスを簡略化する。

【 0 0 8 0 】

次に図 2 5 を参照すると、これは、本発明のバイオセンサ（センサチップ）の一実施形態を、好ましくは 1 つおよび / または複数の CMOS デバイスと共に集積回路（IC）技術によって製造することができる方法の一例を示す。さらに、1 つおよび / または複数の BJT デバイス（図示せず）を含むこともできる。図 2 5 に示されるように、集積回路（IC）は半導体基板 9 0 0 上に製造され、ポリシリコン・ゲート 9 0 7 を有する二酸化珪素層 9 0 5 が活性ウェル領域 9 0 9 の上にある。ポリシリコン・ゲート 9 0 7 は、アモルファス・シリコンから製造され、低抵抗ソース 9 1 7 およびドレイン 9 1 9 を備えるトランジスタを切り換えるために使用される。

【 0 0 8 1 】

次に図 2 6 を参照すると、次いで、電気絶縁のために酸化層（5 0 0 0）9 2 0 が基板 9 0 0 上に堆積される。次に図 2 7 を参照すると、次いで、リソグラフィおよびエッチング方法を使用することによって二酸化珪素層 9 2 0 が選択的にエッチングされて、電気接続穴 9 4 0 が形成される。次に図 2 8 を参照すると、次いで、伝導プラグ 9 5 0 が、コンタクト穴 9 4 0 内に取り付けられる。伝導プラグ 9 5 0 は、伝導性電極 9 6 0 と、低抵抗ソース 9 1 7 および / またはドレイン 9 1 9 との相互接続として使用される。

【 0 0 8 2 】

図 2 9 は、必要な電極を製造するためのリフトオフ・プロセスを示す。二酸化珪素層 9 2 0 上で PR 5 2 1 4 フォト・レジスト層 9 7 0 を使用することによって、バイオセンシング用の電極が基板 9 0 0 上にパターン形成される。次に、マスク 9 2 1 を使用して、（望ましくないフォト・レジスト層 9 7 0 の除去を含めた）リバース・イメージング・プロセスを使用することによってフォト・レジスト層 9 7 0 上に所望のパターンを転写する。金 Au（2 0 0 0）および / または Cr（2 0 0）の層 9 6 0 が、所望のフォト・レジスト・パターン層 9 7 0 を有する二酸化シリコン層 9 2 0 上に電子ビーム堆積される。最後に、図 3 0 を参照すると、フォト・レジスト 9 7 0 および望ましくない Au / Cr 9 6 0 が、フォト・レジスト・パターン層 9 7 0 を溶解することによって除去される。

【 0 0 8 3 】

次に図 3 1 を参照すると、これは、本発明のバイオセンサ（センサチップ）1 0 0 0 の一実施形態を、好ましくは鉄（Fe）などのイオン分子を検出するために使用することができる方法の一例を示す。この実施形態では、センサ表面 1 0 1 0 が修正されておらず、上述した製造実施形態で示される製造後浄化の後に、使用できる準備が整う。この実施形態で使用された分析物は、窒化カリウム  $\text{KNO}_3$ （1 0 1 . 1 1 g / m o l）の緩衝液中で + 3 酸化状態の鉄原子（ $\text{Fe}^{\text{III}}$ ）を含むフェリシアン化カリウム  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ （3 2 9 . 2 6 g / m o l）であった。図示されるように、図 3 1 で、分析物（または電解質を有する試薬）を有する混合溶液 1 0 2 0 が、3 つの電極（作業電極 1 0 3 0、基準電極 1 0 4 0、カウンタ電極 1 0 5 0）全ての上に塗布される。溶液 1 0 2 0 の体積が調節され、それにより小滴は、表面張力によって 3 つの電極全ての上に閉じ込められる。

【 0 0 8 4 】

次に、図 3 2 を参照すると、サイクリック・ボルタンメトリ（CV）電流とバイアス電位の関係が、ピコアンプ・ブースタおよびファラデー・ケージを有する CH インストゥルメント 6 6 0 A エレクトロケミカル・ワークステーションを使用して測定された。電位は、

10

20

30

40

50

0.1ボルトと-0.4ボルトの間で掃引され、電流は、作業電極1030を介して測定される。

【0085】

測定後、センサ1000を再利用する場合は、Au表面が、アセトン、アルコール、および濃縮「ピラニア」溶液(70体積%の $H_2SO_4$ 、30体積%の $H_2O_2$ )を用いて浄化され、脱イオン水( $dH_2O$ )を用いて入念にすすぎ洗いされた。

【0086】

図33は、高分子(例えばDNA、RNA、蛋白質)検出のための1つの好ましい実施形態を示す。好ましくは、高分子(DNA、RNA、蛋白質)の濃度の検出は、ピオチン/ストレプトアビジン層のセンサ表面修正を含む。上述した表面修正プロセスで示したように、センサ表面は、適切な生物化学溶液を用いて修正されて、製造後浄化の後にストレプトアビジン層を形成する。バイオセンサ1100の表面が修正された後、まず250mlのバクテリア溶液の試料に50mlの溶菌試薬(0.4M NaOH)を追加することによって病原体の電流測定バイオセンシングが行われ、室温で5分間インキュベートされる。次いで、100mlのプロープ溶液(アンカリングおよびシグナリング・プロープ)が追加され、混合物が65で10分間インキュベートされた。次いで、5 $\mu$ Lの溶菌E. coli/プロープ溶液混合物1120が、バイオセンサ1100のストレプトアビジン被覆作業電極1130上に配置され、室温で10分間インキュベートされた。

【0087】

次に図34を参照すると、次いで、バイオセンサ1100が、ピオチン洗浄溶液(キルケゴールアンドペリー・ラボラトリー、50-63-06)を用いて洗浄される。次に、希釈剤(PBS/0.5%カゼイン)を用いて0.75U/mlまたは0.15U/mlまで希釈された5 $\mu$ LのAnti-Fl-POD(アンチフルオレセインペルオキシダーゼ、150U、ロシュ社、1426346)1140が、作業電極1130上に配置され、室温で10分間インキュベートされる。

【0088】

次に図35を参照すると、次いで、バイオセンサが再び洗浄溶液で洗浄される。洗浄後、3つの電極(作業電極1130、基準電極1140、カウンタ電極1150)全てが基質溶液1160によってカバーされるように、10 $\mu$ LのK-blue基質(ネオゲン社300176)1160がバイオセンサ上に配置される。

【0089】

最後に、電気化学(より具体的にはレドックス)測定値が即座に行われる。電流測定電流と時間の関係は、ピコアンプ・ブースタおよびファラデー・ケージを有するCHインストゥルメンツ660Aエレクトロケミカル・ワークステーションを使用して測定される。バイオセンサ上の試料が順次に測定される。電圧は(基準に対して)-0.1Vで固定すべきであり、カソード電流(電流測定信号)読取りは20秒間で行うべきである。これは、20秒で電流値が安定状態に到達するはずだからである。細胞濃度(細胞数)は、連続的な希釈および培養皿カウティングを使用することによって決定される。

【0090】

測定後、センサ1100を再利用する場合は、次いでAu表面をアセトン、アルコール、および濃縮「ピラニア」溶液(70体積%の $H_2SO_4$ 、30体積%の $H_2O_2$ )で浄化し、脱イオン水( $dH_2O$ )で入念にすすぎ洗うべきである。

【0091】

好ましくは、上述したバイオセンサ実施形態の任意のもので、バイオセンサが、実際の試料検出の前に較正される。バイオセンサは、好ましくは、既知量の(1種または複数種の)ターゲット分析物を含む較正溶液と、検出不可能な量(例えば、ゼロ)の(1つまたは複数種の)ターゲット分析物を含む別の較正溶液とを用いて較正される。任意選択で、バイオセンサを、複数の較正溶液を用いて較正することができる。この複数の較正溶液はそれぞれ、既知量のターゲット分析物を含む。好ましくは、較正溶液は、異なる濃度レベルでターゲット分析物を含む。これらの較正溶液を、上述した検出プロセスによってバイオセ

10

20

30

40

50



ンサで測定して、1つおよび/または複数の基準信号を得る。次いで、1つおよび/または複数の基準信号が、試料溶液からの測定信号と比較されて、試料試薬中の分析物の存在および量を求める。(1つまたは複数の)分析物の存在および量(例えば濃度または絶対量)の割出しは、従来の生物学的補間方法によって求めることができる。

【0092】

添付書類Aは、本発明をさらに特徴付けるために追加の資料を提供する。

【0093】

本出願の添付書類にある参考文献を含めた本明細書における外部文献への全ての参照を、それらが、本明細書で採用される方法、技法、および/または構成を補足し、説明し、その背景を提供し、または教示する範囲で参照により本明細書に組み込む。さらに、以下に  
10  
列挙する参考文献も、それが、本明細書で採用される方法、技法、および/または構成を補足し、説明し、その背景を提供し、または教示する範囲で参照により本明細書に組み込む。

【0094】

(参考文献)

「生体材料に対する医学的防御に関するUSAFパンフレット - 生体材料に対する医学的防御」ディフェンス・テクニカル・インフォメーション・センター(1997年2月11日公開)

N. L. アボット; C. B. ゴーマン; G. M. ホワイトサイズ「印加電位および自己組織化単層を使用する濡れの活性制御」ラングミュア, 11, 1995年1月1日発行, 1  
20  
6 - 18)

N. L. アボット; D. R. ロリソン; G. M. ホワイトサイズ「高分子を製造するためのマイクロ加工と分子自己組織化の組合せ」ラングミュア, 10, 1994年8月8日発行, 2672 - 2682

I. アブデルハミッド, D. イヴニツキ, P. アタナゾフ, E. ウィルキンス, 1998年 部分的に浸漬された免疫電極を使用する E. coli 0157:H7 に関する高速電流測定アッセイ(エレクトロアナリシス 10(11), 758 - 763)

I. アブデルハミッド, D. イヴニツキ, P. アタナゾフ, E. ウィルキンス, 1999年 E. coli 0157:H7 の高速検出のためのフロースルー免疫濾過アッセイ・システム(Biosens. Bioelect. 14, 309 - 316)  
30

J. D. アンドレイド「生物医学ポリマーの表面および界面様相: 蛋白質吸着」米国ニューヨーク州プレナム, 1985年

C. D. ベイン; E. B. トラフトン; Y. T. タオ; J. エバル; G. M. ホワイトサイズ; R. G. ナッツ(J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 321)

イアン・バクスター; リサ・D. コザー; キャロル・デュピュイ; ポールD. リッキス; アンドリュー・J. P. ホワイト; およびデビッド・J. ウィリアム「シラノールへの水素結合」英帝国科学工学医学大学 化学科(ロンドン SW2AY, 英国)

K. E. ビーム「シリコンの異方性エッチング」(電子デバイスに関するIEEE会報, 1978年10月)

E. W. ベッカー; H. ベッツ; W. エアフェルド; W. グラスハウザー; A. ホイベル  
40  
ガー; H. J. ミッシェル; D. ミュンヒメヤー; S. ポングラッツ; R. V. シーメンス「X線リソグラフィとガルバノプラスチックの組合せによるウラニウム・エンリッチメントのための個別ノズル・システムの製造」ナチュアビッセンシャフテン, 69, (1982) 520 ~ 523

C. ブレーク, B. J. グールド 1984年 免疫アッセイ技法での酵素の使用(A review. Analyst 109, 533 - 547)

J. P. ブローディー; P. イェーガー; R. E. ゴールドシュタイン; R. H. オースチン「低レイノルド数での生物工学」J. Biophys. 71, 1996, 3430 - 3441

Y. F. チェン, J. M. ヤン, J. J. ガウ, C. M. ホー, Y. C. タイ  
50

2000年 生物剤検出のためのマイクロ流体システム(技術と流体力学の相互作用に関する第3回国際会議(スイス、チューリッヒ)の議事録)

Y. F. チェン; J. M. ヤン; J. J. ガウ; C. M. ホー; Y. C. タイ 「生物剤検出のためのマイクロ流体システム」技術と流体力学の相互作用に関する第3回国際会議(スイス、チューリッヒ, 2000年)

N. クーパー 「ヒトゲノム計画」ロスアラモス研究所 サイエンス, 20, 1-338  
1992年

E. L. クスラー 拡散 - 流体システムの大量移動 第2版 ケンブリッジ大学出版 1997年

S. A. ダースト; M. アーラー; P. H. メーラー; E. W. クバレク; R. ブランケンブルク; H. O. リビ; H. リングスドルフ; R. コルンベルク 「ピオチン化脂質層上でのストレプトアビジンの2次元結晶」Biophys J. 59 (1991) 387-396

10

J. エバース; K. E. エバース; M. B. グリシャム編 化学および生物学でのペルオキシダーゼ 第2巻(CRC出版, フロリダ州ボカトン, pp. 1-24)におけるH. B. ダンフォード 1991年 ホースラディッシュペルオキシダーゼ: 構造および速度論性質

G. エーテシャミ; N. ラーナ; P. ラウ; F. シャドマン 「酸化中の、不純物と珪素および二酸化珪素との相互作用」マイクロ汚染制御の核心(NSF I/U CRC)

リチャードP. ファインマン 「There's Plenty of Room at the Bottom」エンジニアリングアンドサイエンス, カルテック, 1960年2月

20

J. J. ガウ, E. H. ラン, B. ダン, C. M. ホー 2000年 DNAアレイ・チップを有する酵素ベースの電気化学バイオセンサ(マイクロ・トータル分析システム(μTAS))に関する第4回国際シンポジウム(オランダ、エンシェーデ)の議事録)

A. L. ギンジリス, P. アタナゾフ, E. ウィルキンス 1997年 酵素触媒直接電子移動: 基礎と分析適用例(エレクトロアナリシス 9, 661-674)

L. ゴートン, A. リンドレン, T. ラーソン, F. D. ムンテーニュ, T. ラズガス, I. ガザリアン 1999年 第3世代バイオセンサの基礎としての、ヘム含有酵素と電極の間の直接電子移動(Anal. Chim. Acta 400, 91-108)

30

E. A. H. ホール 1991年 バイオセンサ(プレントイス・ホール, ニュージャージー州イングリウッド・クリフス)

L. ハウスリング, H. リングスドルフ, F. J. シュミット, W. クノール 1991年 金上でのピオチン機能化自己組織化単層: 特定の認識反応の表面プラズモン光学研究(ラングミュア 7(9), 1837-1840)

C. M. ホー, Y. C. タイ 1996年 レビュー: 流れ制御のためのMEMSおよびその応用(J. Fluids Eng. 118, 437-447)

C. M. ホー, Y. C. タイ 1998年 マイクロエレクトロメカニカル・システム(MEMS)と流体の流れ(Ann. Rev. Fluid Mech. 30, 579-612)

40

S. F. ホウ, K. S. ヤン, H. Q. ファン, H. Y. チャン 1998年 自己組織化単層表面上に多層でグルコースオキシダーゼを不動化することによる電流測定グルコース酵素電極(タランタ 47, 561-567)

R. T. ハウおよびR. S. ミュラー 「多結晶シリコン・マイクロメカニカル・ビーム」電気化学会ジャーナル: 固体科学および技術, 1983年6月

D. イヴニツキ, I. アブデルハミッド, P. アタナゾフ, E. ウィルキンス 1999年 病原性バクテリアの検出のためのバイオセンサ(Biosens. Bioelect. 14, 599-624)

D. イヴニツキ, I. アブデルハミッド, P. アタナゾフ, E. ウィルキンス, S. ストリッカー 2000年 食物病原性バクテリアを検出するための電気化学バイオセンサの

50

- 応用 (エレクトロアナリシス 12 (5), 317 - 325)
- L. S. ユング, K. E. ネルソン, C. T. キャンベル, P. S. ステートン, S. S. イー, V. ペレスルナ, G. P. ロペス 1999年 混合ビオチン含有アルキルチオレート単層上のワイドタイプおよび変異ストレプトアビジンの結合および解離の表面プラズモン共鳴測定 (センサーズ・アクチュエータズ B 54, 137 - 144)
- R. S. ケイン, S. タカヤマ, E. オスツーニ, D. E. イングバー, G. M. ホワイトサイズ 1999年 ソフトリソグラフィを使用する蛋白質および細胞のパターン付け (バイオマテリアルス 20, 2363 - 2376)
- D. ケプレスおよびL. フード「符号の符号: ヒトゲノム計画における科学のおよび社会的問題」ハーバード大学出版, マサチューセッツ州ケンブリッジ, 1992年 10
- J. ライリ, E. オスツーニ, G. M. ホワイトサイズ 1999年 マイクロコンタクト印刷による反応性SAM上へのリガンドのパターン付け (ラングミュア 15 (6) 2055 - 2060)
- A. リンドレン, F. D. ムンテーニュ, I. G. ガザリアン, T. ラズガス, L. ゴートン 1998年 グラファイト電極上のホースラディッシュペルオキシダーゼのための直接および間接電子移動の速度論を研究するための、回転ディスクと壁ジェット電極システムの比較 (J. Electroanal. Chem. 458, 113 - 120)
- G. マラザ; I. キアネラ; M. マシーニ「環境監視のための使い捨てDNA電気化学バイオセンサ」Analytica Chimica Acta 387 (1999), 297 - 307 20
- K. モテシャライ, D. C. ミレス 1998年 金上へのアルカンチオールの機能化自己組織化単層に関する分子認識 (J. Am. Chem. Soc. 120 (29), 7328 - 7336)
- A. S. N. マーシー, J. シャルマ 1998年 金電極でのビス(4-ピリジル)二硫化物の自己組織化単層に結合されたグルコースオキシダーゼ: グルコースの電流測定算出 (Anal. Chim. Acta 363, 215 - 220)
- H. C. ナサーソン; W. E. ネウエル; R. A. ウィックストローム; およびJ. R. デービス Jr. 「共鳴ゲート・トランジスタ」電子デバイスに関するIEEE会報, 1967年3月
- A. A. オオカ, K. A. クーア. N. チョ, G. L. ガレル 1999年 コロイド状銀および金上での、a, w-アミノ酸の相同な列の表面相互作用 (バイオスペクトロスコピー 5, 9 - 17) 30
- E. オスツーニ, L. ヤン, G. M. ホワイトサイズ 1999年 金および銀上での、蛋白質および細胞とアルカンチオレートの自己組織化単層との相互作用 (コロイド表面 B15, 3 - 30)
- J. ラオ, L. ヤン, B. スー, およびG. M. ホワイトサイズ 1999年 D-Ala-D-Alaを表す自己組織化単層に対するバンコマイシンおよびそのダイマーの結合を研究するための表面プラズモン共鳴の使用 (J. Am. Chem. Soc. 121 (11), 2029 - 2030)
- D. J. レベル, J. R. ナイト, D. J. プリス, A. H. ヘインス, D. A. ラッセル 1998年 自己組織化炭水化物単層: 形成および表面選択分子認識 (ラングミュア 14 (16) 4517 - 4524) 40
- T. ラズガス, L. ゴートン, J. エムニス, G. マルコバーガ グラファイト電極上のホースラディッシュペルオキシダーゼ作用の速度論モデル (J. Electroanal. Chem. 391, 41 - 49)
- T. ラズガス; E. コズレギ; J. エムニス; L. ゴートン; G. マルコバーガ「ペルオキシダーゼ修正電極: 基礎と応用」Analytica Chimica Acta 330 (1996), 123 - 138
- A. B. シーバル; A. L. デミレル; J. W. M. ニシンク; M. R. リンフォード; J. H. ファンデルマース; W. H. デジュ; H. ズイルホフ; E. J. R. ズードヒュ 50

- ルター「シリコン(100)表面上での非常に安定なSi-Cリンク機能化単層」(ラングミュア 1998, 14, 1759-1768)
- A. B. シーバル; H. ズイルホフ; E. J. R. ズードヒュルター; F. M. シュールマンズ; W. C. シンク「有機単層によるシリコンの表面パッシベーション」光起電力太陽エネルギー変換に関する第2回世界会議およびエキシビションの議事録(ウィーン 1998年)
- G. B. シーガル, C. バンダッド, A. バルベリス, J. ストロミンガー, G. M. ホワイトサイズ 1996年 表面プラズモン共鳴によるヒスチジンタグ付き蛋白質の結合および研究のための自己組織化単層(Anal. Chem. 68, 490-497)
- J. スピンケ, M. リリー, H. J. グデー, L. アンゲルマイヤー, W. クノール 1993年 自己組織化単層での分子認識: 多成分多層の構成(ラングミュア 9(7), 1821-1825)
- X. サン, P. ヘー, S. リュー, チャンイー, Y. ファン 1998年 DNA電気化学センサ適用例のための自己組織化アミノエタノール単層を用いた金電極上での一本鎖デオキシリボ核酸の不動化(タランタ 47, 487-495)
- ロバート・テラー「バイオテロリズム・スペシャルレポート: All fall down」ニューサイエンティスト 第150巻, 発行2029, 1996年5月11日
- W. S. N. トリマー「マイクロロボットおよびマイクロメカニカル・システム」センサーズアンドアクチュエータズ, 19, 第3号, 1989年9月, 267-287
- ウィリアム・トリマー「Grand in Purpose, Insignificant in Size」MEMSに関する第10回年次国際ワークショップ(日本、名古屋)議事録IEEEカタログ番号97CH36021, 1997, 9-13
- A. アルマン ラングミュア・ブラジレットから自己組織化への超薄有機被膜(アカデミックプレス: ニューヨーク, 1991年)
- A. アルマン ラングミュア・ブラジレットから自己組織化への超薄有機被膜に対する緒言(アカデミックプレス社 米国カリフォルニア州サンディエゴ 1991年)
- A. アルマン編 有機薄膜の特徴; バターワース-ハインマン: ボストン, 1995年  
ドナルド・フート; J. フート「生物化学 第2版」ウィリー, ニューヨーク, 916-919
- P. ワグナー; M. ヘグナー; H. J. グンテロット, G. セメンサ「超平坦テンプレートストリップ金表面上に化学吸着された単層の形成およびin Situ修正」ラングミュア 11(1995)3867-75
- J. ワン, G. リバス, X. カイ, E. パレセック, P. ニールセン, H. シライシ, N. ドンサ, D. ルオ, C. パラド, M. チッチャロ, P. A. Mファリアス, F. S. バレラ, D. H. グラント, M. オズソス, M. N. フレア 1997年 環境監視用のDNA電気化学バイオセンサ(A Review. Anal. Chim. Acta 347, 1-8)
- T. H. ワン, Y. F. チェン, S. マセット, C. M. ホー, Y. C. タイ 2000年 分子ビーコンベースの微生物検出システム(医学および生物学における数学および設計技術に関する2000年国際会議(METMBS'2000 米国ネバダ州カリフォルニア)の議事録)
- P. C. ウェーバー, D. H. オーレンドルフ, J. J. ウェンドロスキー, F. R. サレメ 1989年 ストレプトアビジンに対する高親和カビオチン結合の構造起源(サイエンス 243, 85-88)
- G. M. ホワイトサイズ; P. E. ライビニス ラングミュア 1990, 6, 87
- Th. ウィンク; S. J. ファンツイレン; A. パルト; W. P. ファンベネコム「バイオセンサ用の自己組織化単層」アナリスト, 1997年4月, 122, 43R-50R
- K. D. ワイス; T. N. ジャクソン; N. A. マスナリ; M. B. ロビンソン; D. E. ソロモン; G. H. ワットケ; W. B. レンセル「熱核溶融研究での使用のための半導体技術を使用する半球構造の製造」(真空科学技術ジャーナル, 1979年5/6月)

Y.シー, G.M.ホワイトサイズ 1998年 ソフトリソグラフィ (Angew. Chem. Int. Ed. 37, 550-575)

R.H.ヤン, K.M.ワン, D.シャオ, K.ルオ, X.H.ヤン 3, 3A, 5, 5A - テトラメチルベンジジジヒドロクロライドの蛍光焼入れに基づくジまたはトリニトロフェノールに関する回復可能な液体ドロップ・センサ (アナリスト, 2000, 125, 877-882)

【0095】

以上により、新規な「バイオセンシング」システムが図示され、説明された。当然、本発明の精神および範囲を逸脱することなく様々な修正を行うことができる。例えば、本明細書で開示したバイオセンサを使用して、非生体要素および化合物を感知または検出することができる。したがって、本発明は、頭書の特許請求の範囲の意図を除いては、制限を受けない。

10

【0096】

添付書類 A

マイクロ・トータル分析システム 2000 写本

DNAアレイ・チップを有する酵素ベースの電気化学バイオセンサ

要旨

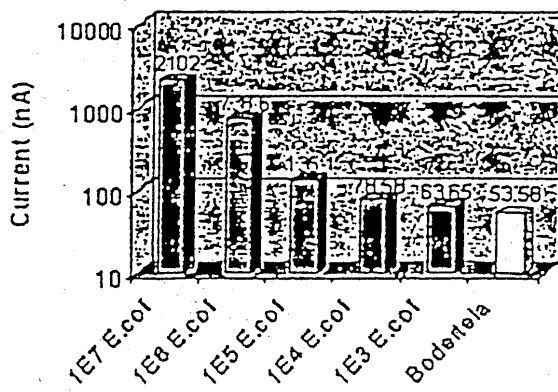
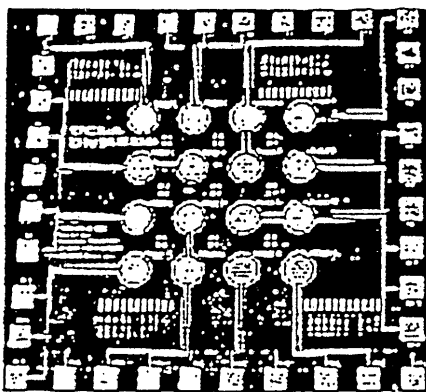
高速生物剤検出のための再利用可能DNAセンサをシリコン・チップ上に製造した(図1)。DNAベースのプロブは、抗体を使用する間接プロービングではなく、分析物のDNA/RNA配列を標的とする。ハイブリダイゼーション・イベントを信号酵素と組み合わせることによって感度が大幅に高まる。自己組織化単層センサ表面の形成、in-situ DNAハイブリダイゼーション、信号測定、およびセンサ再生成を、40分以内に行うことができる。PCRを使用しない場合でさえ、このセンサ・アレイを使用して、16srRNAによって1000以上のエシェリキア・コリ(E.coli)細胞を検出することができる(図2)。各センサ領域の寸法は、25mm<sup>2</sup>~160μm<sup>2</sup>の範囲である。

20

キーワード: 電気化学センサ、マイクロエレクトロメカニカル・システム(MEMS)、自己組織化単層(SAM)、DNAハイブリダイゼーション

【外1】

30



40

細胞数

図1 DNAセンサ・アレイ・チップ 図2 感度および特異性チェック

【0097】

1. 緒言

酵素ベースの電気化学バイオセンサは、現場使用時にバクテリア、ウィルス、または様々な生物学種の濃度の高速監視が可能で、非常に高感度であり選択性のあるプロトコルを定めることによって主に動機付けされている。そのようなプロトコルは、遠隔操作のものであり、十分に自動化されており、コンパクトであり、頑強である[1]。したがって、光学システムよりも、最少電力消費およびより小さなサイズを有する電気化学トランスデュ

50

ーサが好ましい [ 2 ]。偽陽性信号および偽陰性信号を低減するためにDNAハイブリダイゼーションを使用することによって高い特異性を達成することができる。グラファイトまたは炭素電極を使用するDNA電気化学バイオセンサがすでに報告されている [ 3、4 ]。しかし、炭素ベース電極は通常、小さな (< μm) 寸法が必要とされるときにMEMS技術に適合可能でない。本研究では、電極としてAuを使用し、E. coli rRNAを捕捉するために蛋白質自己組織化単層 (SAM) を用いた。本研究では、生物学的増幅因子として酵素を使用して、PCRを用いずに高感度を得る。E. coli MC4100対ボルデテラSB54に関する感度および特異性チェックが図2に示されている。

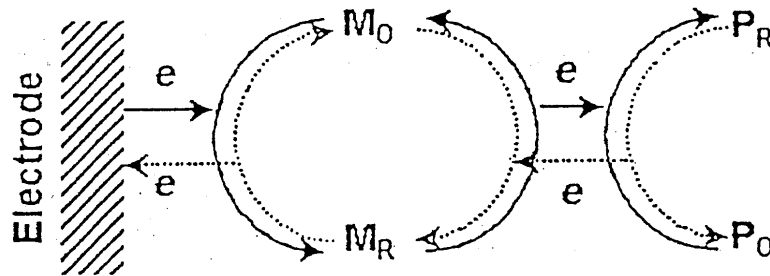
【 0 0 9 8 】

2. 検出原理

HRPは、分析目的およびバイオセンサへの塗布に最も広く使用されている酵素の1つである [ 5 ]。酵素増幅は、電気化学的に検出することができる反応の高転換数により生じる。ここでは、媒介物として3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を有するホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) に基づく電流測定バイオセンサを説明する (図3)。電極表面での電子移動が電流測定によって測定されて、ターゲット細胞の16sリボゾームRNAによるDNAハイブリダイゼーションによって不動化される酵素の数を表す。したがって、出力電流は、溶液中のターゲット細胞の数に比例する。

【 0 0 9 9 】

【 外 2 】



P<sub>R</sub> : 還元ペルオキシダーゼ      P<sub>O</sub> : 酸化ペルオキシダーゼ  
M<sub>0</sub> : 酸化媒介物                      M<sub>R</sub> : 還元ペルオキシダーゼ

図3 HRP酵素反応の電子輸送

【 0 1 0 0 】

3. 実験

3電極電気化学電池が、作業電極用のマイクロ製造反応ウェルを有して構成される (図4a)。導電層として金 (Au) が堆積され、絶縁層としてSi<sub>3</sub>N<sub>4</sub> / SiO<sub>2</sub> が堆積される (図4b)。周囲のSi表面は、疎水性になるように修正される。3次元反応ウェルは、周囲領域の疎水性と共に、液体小滴を作業電極内によく含むことができるようにする。この設計は、センサ・チップの他の領域への生体分子の不特定結合を最小限に抑える。Au作業電極は、チオレート化ピオチンSAMによって、または金の上への直接蛋白質吸着によって、基板上に不動化されたストレプトアビジンの単層を有する (図4c)。E. coliを含む試料溶液は溶菌バッファで処理され、E. coli細胞からのターゲットDNA / RNAが、細胞デブリの存在下でアニーリング温度 (約65 °C) で、アンカリングssDNAプローブとラベリングssDNAプローブの両方を用いてハイブリダイゼーションされる (図4d)。アンカリング・プローブ (ピオチンに結合された) とラベリング・プローブ (フルオレセインに結合された) は、2つの明確に異なる保存的配列を認識し、それによりハイブリッドは、ターゲット生物剤からの特定の遺伝子セグメントのみを用いて生成される。次いで、オリゴヌクレイック・ハイブリッドが作業電極上に、ピオチンストレプトアビジン結合によって不動化され、結合されていない成分が洗浄除去される。次いで、HRPリンク・アンチフルオレセイン抗体が各ハイブリッド上に担持される (図4e)。基質の追加後、酵素反応が、3電極電池を使用して電流測定で測定される電流信号を生じる (図4f)。プロトコル全体が40分で完了する。

10

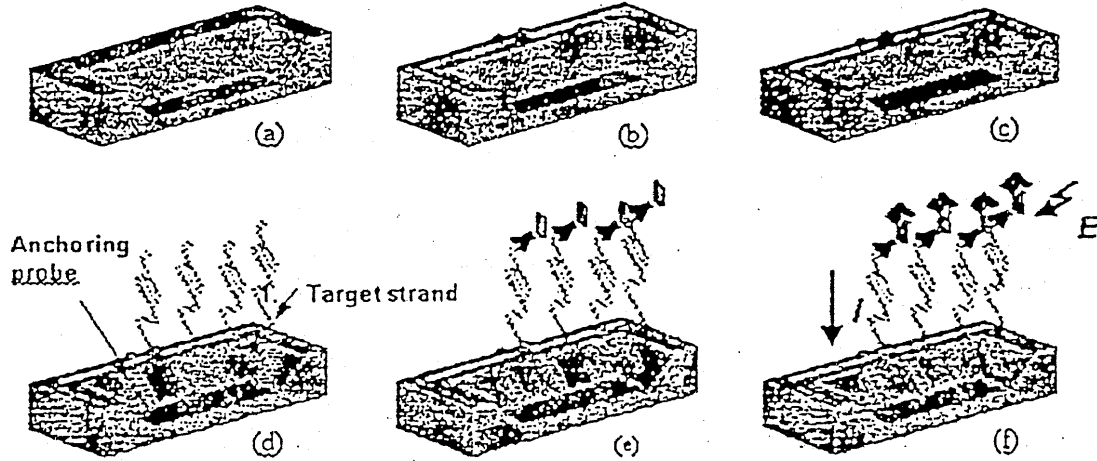
20

30

40

50

【外3】



10

図4 センサ・ユニット・プロセスの流れ  
 Anchoring probe: アンカリング・プローブ  
 Target strand: ターゲット鎖

【0101】

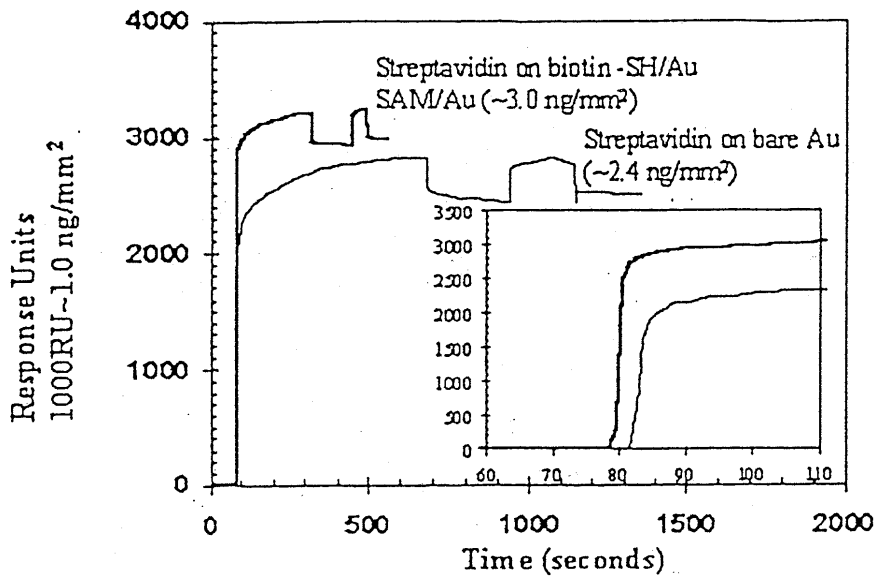
4. 実験結果

DNA センサ上のSAMは、単層のみが堆積されたかどうかを判定し、また蛋白質堆積の速度論を求めるための表面プラズモン共鳴 (SPR) および原子間力顕微鏡検査 (AFM) によって特徴付けられる。このデータから、一体型流体システム内での *in situ* センサ表面形成に必要な時間スケールを確かめることができる。ストレプトアビジンSAMを堆積するための2つの異なる方法が使用され、一方がチオレート化ビオチンを使用し、他方が直接蛋白質吸着を使用した。どちらの場合にも、SPRデータは、ただ1つの単層が基板の上に堆積されたことを示す(図5)。ストレプトアビジンの結晶単層は、 $2.8 \text{ ng/mm}^2$  の予想表面カバー範囲を有する[6]。本実験の結果は、チオレート化ビオチンを使用して単層全体が得られ、直接蛋白質吸着によって約80%のカバー範囲が得られたことを示す。さらに、蛋白質結合/吸着は約10秒以内に生じた。

20

【外4】

30



40

図5 ビオチンSH/AuまたはベアAu上のストレプトアビジンの表面プラズモン共鳴  
 Time(seconds): 時間(秒)  
 Response Units: 反応ユニット  
 Streptavidin on biotin-SH/Su SAM/Su: ビオチン-SH/Au SAM/Au上のスト

50

## レプトアビジン

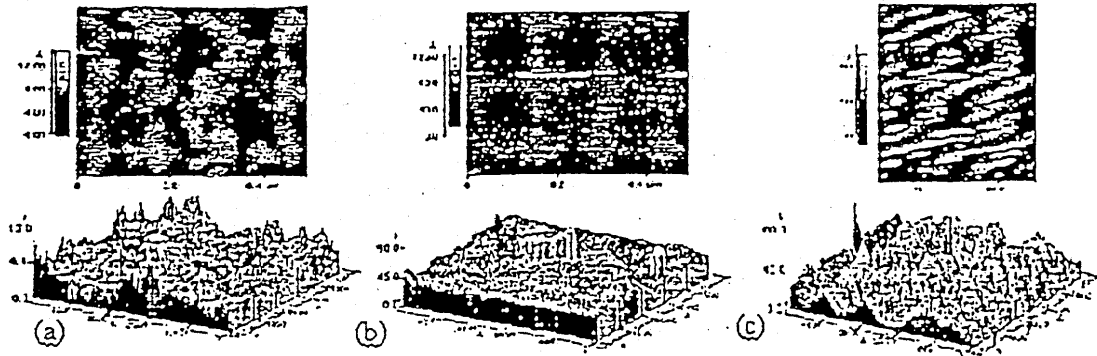
Streptavidin on bare Au: ベアAu上のストレプトアビジン

【0102】

5.0 nNの力を有するウルトラレバー・チップを使用して接触モードで原子間力顕微鏡検査(AFM)が行われた。Au基板は、ワグナー等の方法に従って準備された[7]。ベアAuは、トポグラフィ・フィーチャ<10 nmを有し(図6a)、「全」単層のコンタクトAFMは、蛋白質ドラッグの証拠をもつ滑らかな表面を示した(図6b)。「部分」単層上の蛋白質島の高さは約45 nmであり、ストレプトアビジン蛋白質の寸法と一致した。AFM観察により、1つの単層のみが堆積されたSPR結果を確認する。

【外5】

10



20

図6 Au上のSAM形成のAFM。

(a) ベアAUのみ

(b) 蛋白質ドラッグを有する全カバー範囲

(c) 蛋白質島を有する部分カバー範囲

【0103】

## 5. 結論

MEMS技術と、確立されたDNA技術との組合せにより、病原性バクテリアに関する高い特異性および感度の検出器が得られる。SAMを用いた電気化学検出を使用する生物学的同定が、1000未満のE. coli細胞を検出することができる感度で、シリコン・ウェハに正常に組み込まれた。

30

【0104】

## 参考文献

1. Y. F. チェン, J. M. ヤン, J. J. ガウ, C. M. ホー, および Y. C. タイ 「生物剤検出のためのマイクロ流体システム」技術と流体力学の相互作用に関する第3回国際会議(スイス、チューリッヒ、2000年)

2. D. イヴニツキ, I. アブデルハミッド, P. アタナゾフ, E. ウィルキンス 「レビュー: 病原性バクテリアを検出するためのバイオセンサ」バイオセンサアンドバイオエレクトロニクス 14(1999), 599-624

3. G. マラザ; I. キアネラ; M. マシーニ 「環境監視のための使い捨てDNA電気化学バイオセンサ」Analytica Chimica Acta 387(1999), 297-307

40

4. J. ワン等 「環境監視用のDNA電気化学バイオセンサ」A Review, Analytica Chimica Acta 347(1997), 1-8

5. T. ラズガス; E. コズレギ; J. エムニス; L. ゴートン; G. マルコバーガ 「ペルオキシダーゼ修正電極: 基礎と応用」Analytica Chimica Acta 330(1996), 123-138

6. S. A. ダースト; M. アーラー; P. H. メーラー; E. W. クバレク; R. ブランケンブルク; H. O. リビ; H. リングスドルフ; R. コルンベルク 「ピオチン化脂質層上でのストレプトアビジンの2次元結晶」Biophys J. 59(1991) 38

50



7 - 3 9 6

7. P. ワグナー ; M. ヘグナー ; H. J. グンテロット , G. セメンサ 「超平坦テンプレートストリップ金表面上に化学吸着された単層の形成および *in Situ* 修正」ラングミュア 11 ( 1995 ) 3867 - 75

【 0 1 0 5 】

A S M E 文書

生物学的検出のための DNA マイクロセンサ・アレイの最適化

i . 要旨

本論文は、以前の刊行物で開発されている高速生物剤検出のための再利用可能 DNA マイクロセンサ・アレイの特徴および最適化を示す ( 図 1 ) [ 1 ~ 3 ]。この MEMS ベースの DNA センサは、不特定結合を最小限に抑えるように新規のマイクロ製造構造を備える標準の 3 電極電気化学電池構成を利用する。センサ・モジュールは、様々なプロトコルに簡単に適合され、泌尿器中の尿路エシェリキア・コリ ( *E. coli* ) および中耳炎 ( 中耳感染 ) をもたらす微生物などターゲットからの高分子 ( DNA、RNA ) の高速検出のために使用することができる。尿道感染の患者の尿サンプルから、 $10^5$  未満の *E. coli* 細胞を検出することができる。適切なセンサ特徴および表面修正によって感度が高められる。試料調製を含めた総検出時間は、POD 結合オリゴヌクレオチドを使用することにより 25 分まで短縮することができる。

10

【 0 1 0 6 】

i i . 緒言

従来の電気化学検出は、システム要件および構成により、MEMS 技術および製造プロセスに全く適合していない。電気化学電池は、少なくとも 2 つの電極 ( 作業電極、基準電極 ) と電解質とからなっていないなければならない。電気化学電極は、電荷移動の機構が電子輸送とイオン輸送の間で切り換わる界面である [ 4 ]。電解質は、イオンの移動によって電荷移動を行うことができる媒体である。電気化学検出は、基準電極によって供給される第 2 の不変電位を必要とし、半バッテリーを形成する。典型的な基準電極は  $Ag / AgCl$  である。現在、シリコン基板上にこの基準電極を製造するのは困難である。ほとんどの MEMS ベースの電気化学センサは、作業電極のみをマイクロ製造することに焦点を当てている。本研究は、標準の MEMS プロセスによって製造されるシリコン上の MEMS ベース電気化学センサの特徴および適用を考察する。電気化学センサ上での DNA ハイブリダイゼーションを伴う臨床尿試料の試験は、シリコン上の MEMS ベース・センサを生医学検出に使用することができることを実証する。

20

30

【 0 1 0 7 】

i i i . 検出スキーム

化学的に分裂されたターゲット細胞からの核酸分子 ( RNA / DNA ) が、細胞デブリの存在下で、アンカリング ssDNA プロブ ( ビオチンに結合 ) とラベリング ssDNA プロブ ( フルオレセインに結合 ) の両方を用いてハイブリダイゼーションされる ( 図 2 a )。これら 2 つのプロブは、2 つの異なる保存的配列を認識し、したがって、ハイブリッドは、ターゲット生物剤からの特定の遺伝セグメントのみを用いて生成される。次いでオリゴヌクレオチド・ハイブリッドが作業電極上に、ビオチンストレプトアビジン結合によって不動化され、結合されていない成分が洗浄除去される ( 図 2 b )。次いで、ペルオキシダーゼ ( POD ) リンク・アンチフルオレセイン抗体が各ハイブリッド上に担持される ( 図 2 c )。媒介物 ( テトラメチルベンジジン、TMB ) を有する基質の追加後、酵素反応が、図 3 に示される REDOX 反応から電流測定で測定される電流信号を生じる。プロトコル全体を 40 分で完了させることができ、センサは、浄化プロセス後に再び活動化される。

40

【 0 1 0 8 】

i v . センサ特性

ほとんどのバイオセンサ・チップがオフチップ光学検出を利用する。本研究は、信号ノイズ比の改善のためにセンサ最適化および表面修正を用いるオンチップ電気化学検出に向か

50

っている。MEMS技術は、小さな寸法の導電金属電極をシリコン基板上に正確に堆積し、パターン形成することができるため、小型電気化学電池の開発を可能にする。本研究から、Auが、3つの電極（作業電極、補助電極、および基準電極）全てに対する適切な候補であり、フェロセンなどよく知られている1電子システムを使用するAu/Au/Au電極電池の特徴から、従来の可逆1電子電池が得られることが確認された。

#### 【0109】

##### v. サイクリック・ボルタンメトリ

フェロセンの可逆1電子移動に関するサイクリック・ボルタンメトリは、アノード・ピークとカソード・ピーク間の約57mVのピーク離隔距離、同じピーク最大値、およびピーク電流と[スキャン率]<sup>1/2</sup>との線形関係によって特徴付けられる[4]。図4に見られるように、様々なスキャン率でMEMSベースの電気化学センサを使用するフェロセンのボルタモグラムが、予想される挙動を示し、ピーク最大値でのピーク電流と[スキャン率]<sup>1/2</sup>とのプロットが線形である。ペルオキシダーゼを使用する電気化学電池のさらなる特徴により、酵素電流測定も実現可能であることが確認された。媒介物で行われるサイクリック・ボルタンメトリは、TMBに関して予想されるように2電子レドックス移動を示し（図5）、ペルオキシダーゼ酵素の追加により、-0.1Vバイアス電位で明らかに測定することができる還元電流の増大がもたらされる。

#### 【0110】

##### vi. 不特定結合の減少

センサ表面は、作業電極上にターゲットRNA/DNAを捕捉するために蛋白質自己組織化単層を有し、SAMは、原子間力顕微鏡検査（AFM）および表面プラズモン共鳴（SPR）によって特徴付けられる[2]。信号対ノイズは、不特定結合を減少させるための適切な表面修正によって大幅に改善することができる。第1の手法は、不特定結合する可能性がある結合部位をなくするために表面阻止蛋白質を導入することである（図6）。第2の手法は、Teflon（登録商標）またはポリイミドのシラン化処理または薄膜コーティングを用いて周辺領域の疎水性修正を追加する。蛋白質カバーされたAu作業電極の疎水性により、試薬は作業電極のみに閉じ込められて、周辺および他の2つの電極に対する酵素の堆積を最小限に抑える（図7、8）。どちらの場合にも、不特定結合によるノイズが低減された。典型的には、第2の手法（疎水性修正）がMEMS製造で使用され、第1のものはプローブ試薬に組み入れられる。

#### 【0111】

##### vii. プロトコル簡略化

試料調製は、ほとんどのバイオセンサに関して最も時間のかかるステップである。任意の追加のプロトコル・ステップが、より流動性があるデバイス、およびより長い検出時間を必要とする。簡略化されたプロトコルが図9に示されており、検出器DNAプローブ上へのPOD結合を用いた酵素担持のステップがなくなっている。ハイブリダイゼーション条件は、65℃に加熱した後、POD酵素活性を保持するように制御された。次いで、プロトコルを、40分から25分に短縮することができ、試薬の必要数を1つだけ減らすことができる。

#### 【0112】

##### viii. 結果

以前の研究から、マイクロDNAセンサの感度が約 $10^3$ 個のE.coli細胞であることが実証されている。近年のデータは、リボゾームRNA含有によって静止段階で細胞培養から10未満のE.coli細胞を検出することができることを示す。次いで、センサが、UCLAの感染症科からの臨床尿試料にさらされて試験された。図10に示されるように、尿試料中のE.coliの最小検出可能細胞数は、離隔することなく予備的結果から $10^5$ である。尿試料での感度は、さらなる最適化によって改善することができる。別のタイプのバクテリア、ボルデテラは、負の制御として使用され、希釈剤を含めた全てのE.coli試料が、負の制御よりも高い信号を有する。

#### 【0113】

マイクロDNAセンサは、従来の基準電極を利用することなく電気化学検出のために使用することができる。これは、バイアス電位が比較的 low ( $-0.1\text{ V}$ )、検出が、補助電極での電荷の蓄積を回避するのに十分短い ( $20\text{ 秒}$ ) ためである。これは、フェロセンおよびPOD溶液のボルタモグラムを用いて確認された。

【0114】

E. coli などの病原体の電気化学検出のためにマイクロDNAセンサを使用することができることを実証した。MEMS技術によってシリコン上にパターン形成されたAu/Au/Au<sub>3</sub>電極電池は、酵素反応の電流測定で正常に使用された。これらのセンサは、マイクロ・トータル分析システム ( $\mu\text{-TAS}$ ) または「Lab on a Chip」内に組み入れることができる見込みを示している。

10

【0115】

i x . 結論

従来のAg/AgCl電極を用いずに伝導電気化学検出が可能であることを実証するために、電流測定によって酵素反応を検出することができ、フェロセンおよびPODを用いたイクリック・ボルタンメトリを使用することによって特徴付けられたマイクロDNAセンサが製造された。ノイズ低減は、表面修正および阻止蛋白質の導入によって達成された。作業電極内のウェルの構造設計およびシリコン基板上の表面処理が、作業電極を覆う試薬閉込めを可能にする。試薬電極コンタクトを制御して、不特定結合を低減することができ、これは従来のピーカー・セットアップでは可能でない。尿試料試験は、このDNAセンサが、短い検出時間およびより短いシステム・サイズでの臨床診断に適していることを示す。

20

【0116】

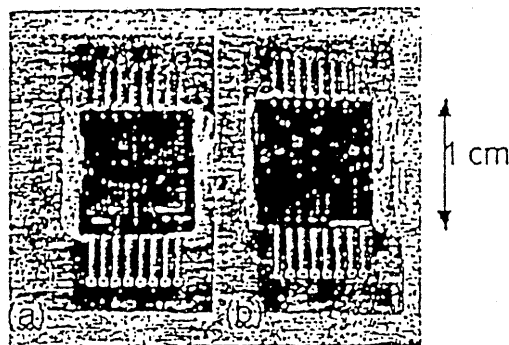
x . 参考文献

1. Y. F. チェン, J. M. ヤン, J. J. ガウ, C. M. ホー, Y. C. タイ, 2000年。「生物剤検出のためのマイクロ流体システム」技術と流体力学の相互作用に関する第3回国際会議 (スイス、チューリッヒ 2000年) の議事録
2. J. J. ガウ, E. H. ラン, B. ダン, C. M. ホー 2000年。「DNAアレイ・チップを有する酵素ベースの電気化学バイオセンサ」マイクロ・トータル分析システム ( $\mu\text{TAS}$ ) に関する第4回国際シンポジウム (オランダ、エンシェーデ) の議事録
3. J. J. ガウ, E. H. ラン, B. ダン, C. M. ホー 2000年。「E. coli バクテリアのためのMEMSベース電流測定検出器 - 自己組織化単層の使用」バイオセンサに関する第6回世界会合 (米国サンディエゴ) の議事録
4. B. エギーン 1996年 バイオセンサ (ジョン・ウィリー・アンド・サンズ, ニューヨーク)
5. E. A. H. ホール バイオセンサ (プレントイス・ホール, ニュージャージー州イーグルウッド・クリフス, pp. 97 - 139, 1991)

30

【0117】

【外6】



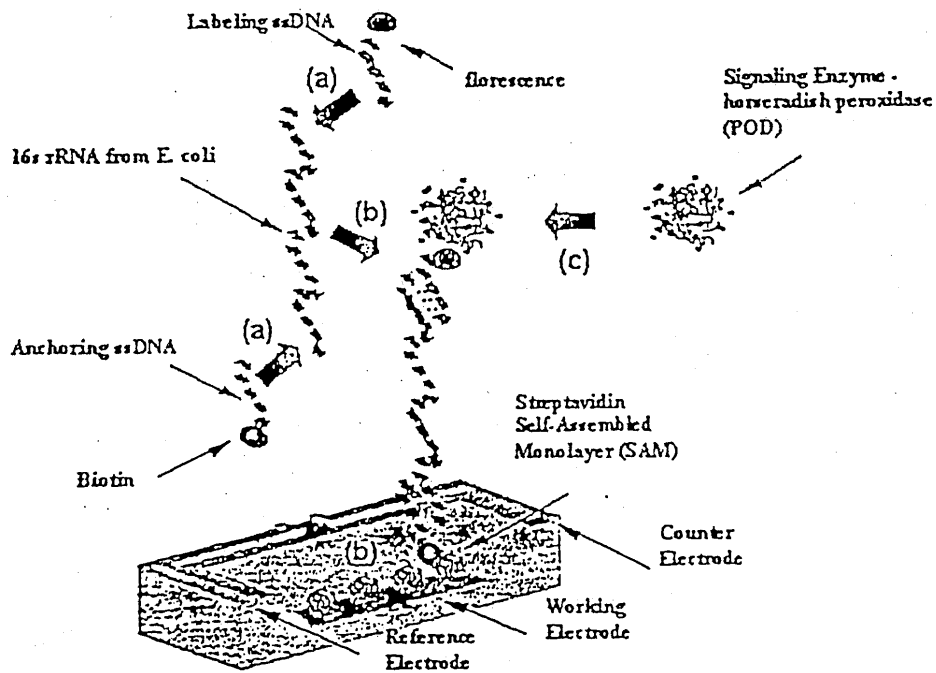
40

図1 DNAマイクロセンサ・アレイ・チップ

(a) 表面体積比を増大するための表面フィーチャを有する4つのセンサ

50

( b ) 1 c m  <sup>2</sup>  の 1 4 個 の センサ  
【 0 1 1 8 】  
【 外 7 】



10

20

図 2 センサおよびプロトコル・プロセスの流れ

- ( a ) ハイブリダイゼーション
- ( b ) 不動化
- ( c ) P O D 担持

Labeling ssDNA: ラベリング s s D N A

16srRNA from E coli: E . c o l i から の 1 6 s r R N A

Anchoring ssDNA: アンカリング s s D N A

Biotin: ビオチン

florescence: フルオレセイン

Signaling Enzyme horseradish peroxidase: シグナリング酵素 - ホースラディッシュペルオキシダーゼ ( P O D )

Streptavidin Self-Assembled Monolayer (SAM): ストレプトアビジン自己組織化単層 ( S A M )

Counter Electrode: カウンタ電極

Working Electrode: 作業電極

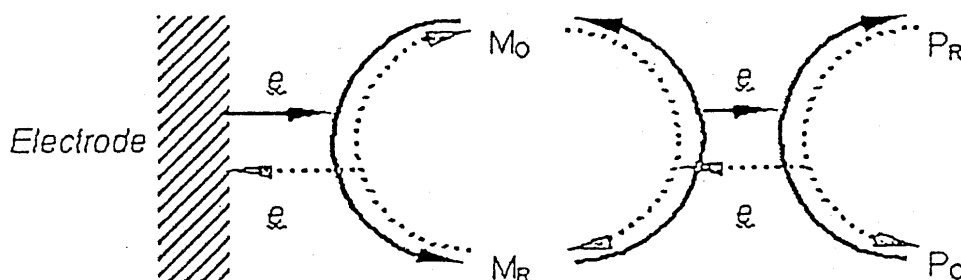
Reference Electrode: 基準電極

【 0 1 1 9 】

【 外 8 】

30

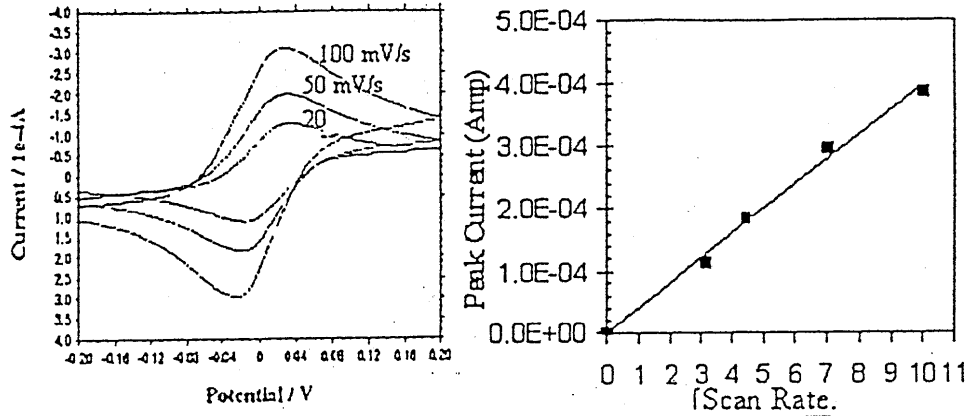
40



P<sub>R</sub> : 還元ペルオキシダーゼ、P<sub>O</sub> : 酸化ペルオキシダーゼ

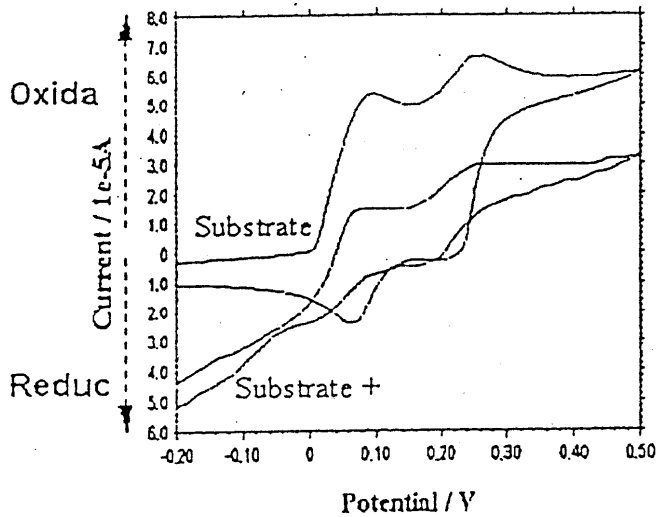
50

M<sub>O</sub> : 酸化媒介物、 M<sub>R</sub> : 還元媒介物  
 図3 ホースラディッシュペルオキシダーゼの酵素反応の電子移動  
 【 0 1 2 0 】  
 【 外 9 】



10

図4 サイクリック・ボルタンメトリによるセンサ特性  
 Potential: 電位  
 Current: 電流  
 Scan Rate: スキャン率  
 Peak current: ピーク電流  
 【 外 1 0 】

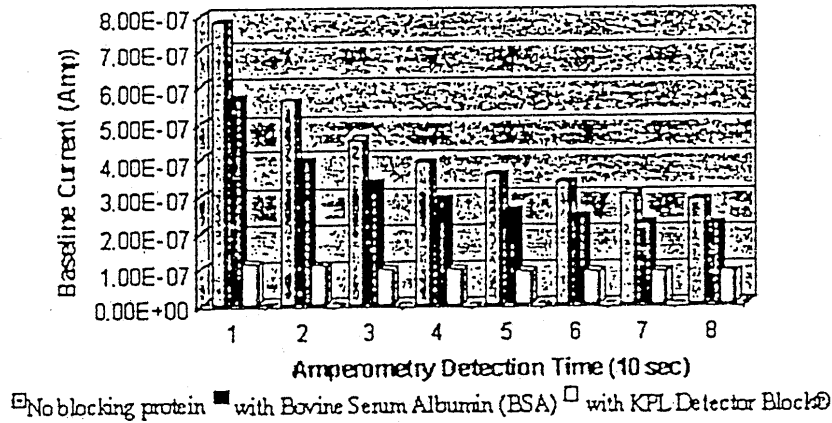


20

30

図5 HRP 酵素化を伴うセンサ特性  
 Potential: 電位  
 Current: 電流  
 Oxida: 酸化  
 Reduc: 還元  
 Substrate: 基質  
 【 外 1 1 】

40



10

図6 不特定結合をなくするために阻止蛋白質を追加することによるノイズ低減Amperometry Detection Time: 電流測定検出時間 (10秒)

Baseline Current (Amp): ベースライン電流 (アンペア)

No blocking protein: 阻止蛋白質なし

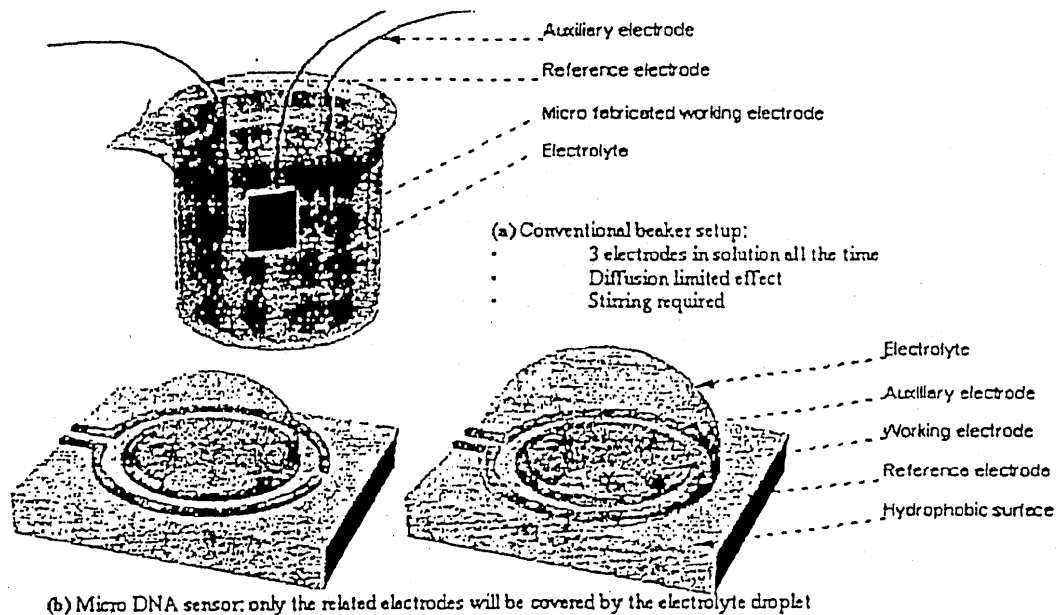
with Bovine Serum Albumin (BSA): ウシ血清アルブミン使用

with KPL Detector Block: KPL Detector Block (登録商標) の使用

【0121】

20

【外12】



30

図7

(a) 従来のセンサと

40

(b) マイクロDNAセンサとの間の電極試薬コンタクトの比較

Auxiliary electrode: 補助電極

Reference electrode: 基準電極

Micro fabricated working electrode: マイクロ製造作業電極

Electrolyte: 電解質

(a) 従来のビーカー・セットアップ

・3つの電極が常に溶液中にある

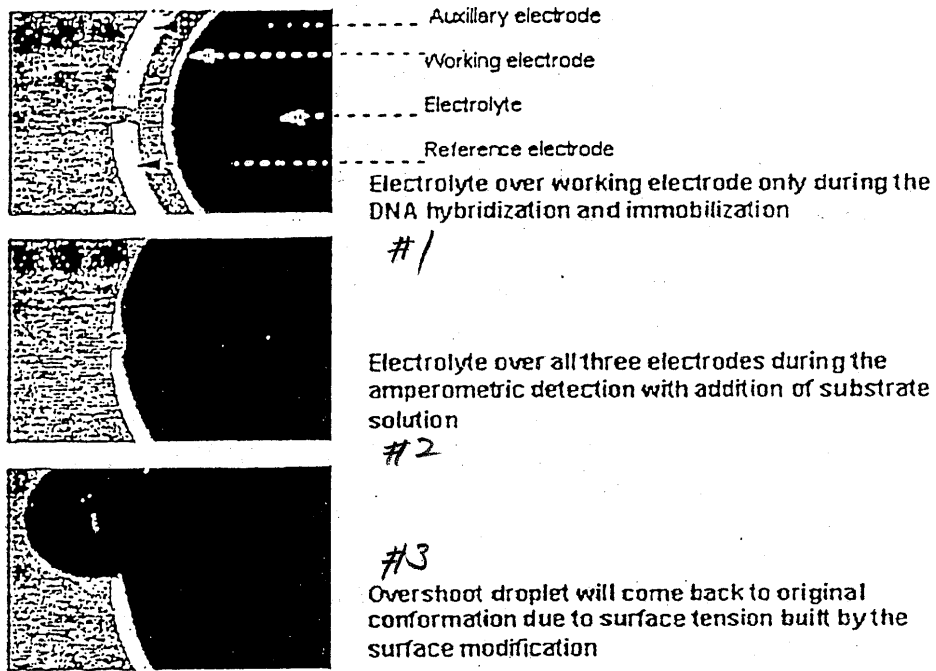
・拡散制限効果

・攪拌が必要

Hydrophobic surface: 疎水性表面

50

(b) マイクロDNAセンサ：関連電極のみが電解質小滴によってカバーされる  
【外13】



10

20

図8 マイクロDNAの電極を覆う電解質閉込めのイメージ

Auxiliary electrode: 補助電極

Working electrode: 作業電極

Electrolyte: 電解質

Reference electrode: 基準電極

#1 DNAハイブリダイゼーションおよび不動化中にのみ作用電極を覆う電解質

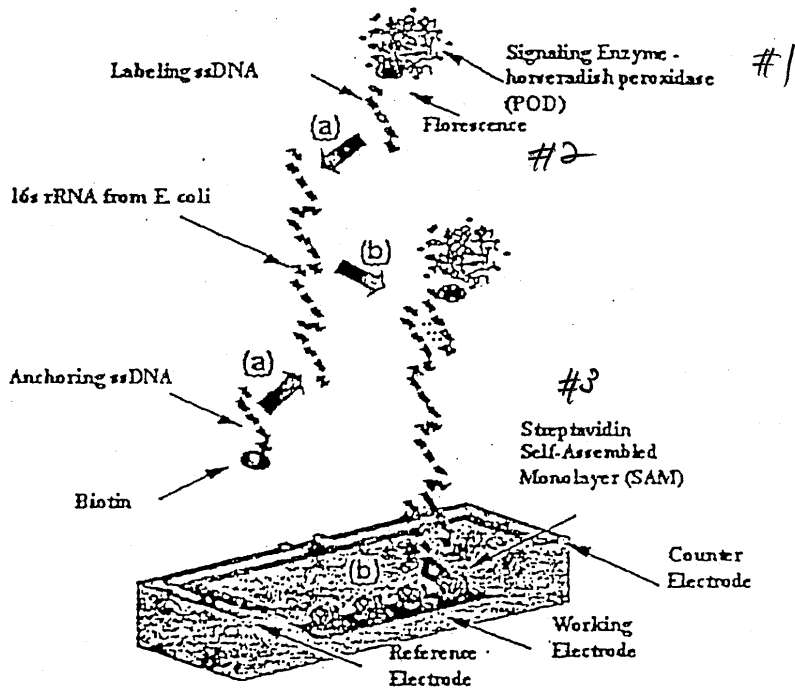
#2 基質溶液の追加によって、電流測定検出中に、3つの電極全てを覆う電解質

#3 表面修正によって構築される表面張力により、オーバーシュート小滴が元の構造に戻る

30

【0122】

【外14】



10

図9 POD結合ラベリング・プローブを用いた簡略化プロトコル

20

- (a) ハイブリダイゼーション
- (b) 不動化

Labeling ssDNA: ラベリング ssDNA

16srRNA from E coli: E. coliからの16srRNA

Anchoing ssDNA: アンカリング ssDNA

Biotin: ビオチン

florescence: フルオレセイン

Signaling Enzyme horseradish peroxidase: シグナリング酵素 - ホースラディッシュペルオキシダーゼ (POD)

Streptavidin Self-Assembled Monolayer (SAM): ストレプトアビジン自己組織化単層 (SAM)

30

Counter Electrode: カウンタ電極

Working Electrode: 作業電極

Reference Electrode: 基準電極

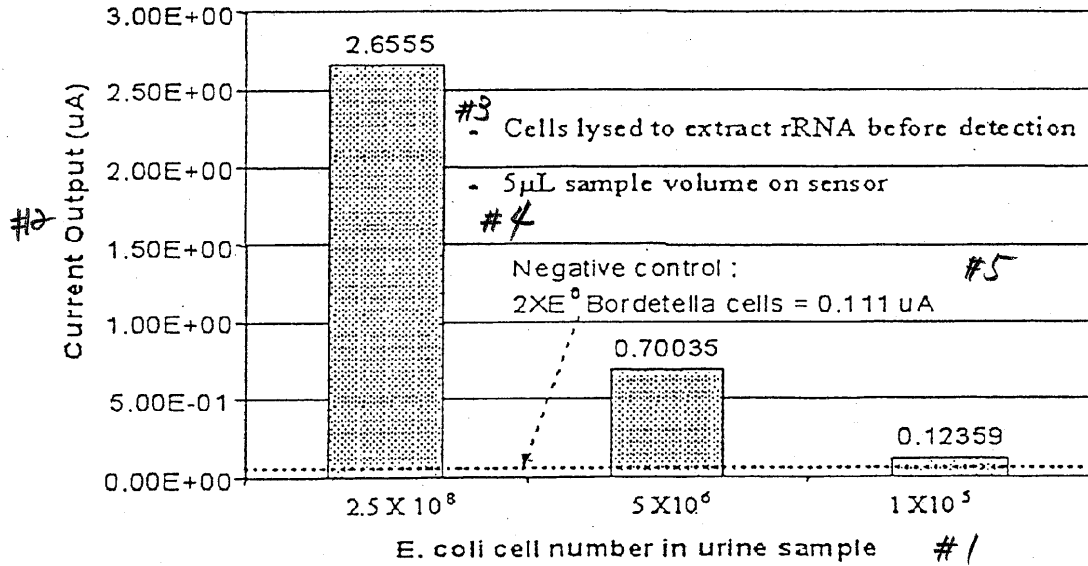
# 1 シグナリング酵素 - ホースラディッシュペルオキシダーゼ (POD)

# 2 フルオレセイン

# 3 ストレプトアビジン自己組織化単層 (SAM)

【外15】





10

図 10 尿試料を用いたマイクロDNAセンサの感度チェック

- # 1 尿試料の E . c o l i 細胞数
- # 2 電流出力
- # 3 検出前に r R N A を抽出するために溶菌された細胞
- # 4 センサ上での 5 µ L 試料体積
- # 5 負の制御 : 2 × E <sup>6</sup> ボルデテラ細胞 = 0 . 1 1 1 u A

20

【 0 1 2 3 】

自己組織化単層を使用する E . c o l i バクテリア用の M E M S ベースの電流測定検出器要旨

マイクロエレクトロメカニカル・システム ( M E M S ) 、 自己組織化単層 ( S A M S ) 、 DNA ハイブリダイゼーション、 および酵素増幅の統合に基づくエシェリキア・コリ ( E . c o l i ) の電流測定検出のためのシステムを開発した。 M E M S 技術を使用して、 S i ウェハ上に堆積された複数の電極を有する検出器アレイが製造され、完全に再利用可能であった。 S A M を使用して、蛋白質ストレプトアビジンの単層が、 E . c o l i から r R N A を捕捉するために作業電極 ( A u ) 表面上に不動化された。ペア A u 上に蛋白質を直接吸着する、 A u 上でビオチン化チオール S A M に蛋白質を結合する、 A u 上でビオチン化二硫化物単層に蛋白質を結合するという3つの異なる手法を使用して、 A u 上にストレプトアビジンを不動化することができる。ビオチン化チオール手法が最良の結果を生んだ。 E . c o l i に関する高い特異性は、 s s D N A - r R N A ハイブリダイゼーションを使用して達成され、高い感度は、酵素としてペルオキシダーゼを用いた酵素増幅を使用して達成された。分析プロトコルは、数マイクロリットル程度の溶液体積で行い、40分間で完了することができる。検出システムは、 E . c o l i と、バクテリアであるボルデテラブロンキセプチカとに関する高い特異性をもって、ポリメラーゼ鎖反応を伴わずに 1 0 0 0 個の E . c o l i を検出することができた。

30

40

【 0 1 2 4 】

キーワード

マイクロエレクトロメカニカル・システム ( M E M S ) 、 自己組織化単層 ( S A M ) 、 電流測定検出、エシェリキア・コリ・バクテリア、DNAハイブリダイゼーション

【 0 1 2 5 】

1 . 緒言

光学的なものや電気化学的なもの両方の様々なバイオセンサが、病原性バクテリアの検出に関して開発されている ( イヴニツキ等 , 1 9 9 9 年 , 2 0 0 0 年 ) 。 バクテリアを検出するための従来の方法は通常、有機体の形態学的評価、および成長可能性の試験を含むが、そのような方法は非常に時間がかかり、現場条件下で実現可能でない。高速検出および

50

携帯性に関する要求が、病原体認識をシグナル伝達と組み合わせるシステムの開発をもたらした。バクテリアの光学検出と電気化学検出の両方が報告されており、しかし電気化学方法は、小型化に関してより修正可能であるという利点を有する（イヴニツキ等，1999年、T.ワン等，2000年）。理想的な検出器に関する要件には、比較的短時間で完了させることができるプロトコルを使用した高い特異性および高感度が含まれる。さらに、小型化し、自動化することができるシステムは、特に検出が現場で必要とされる場合に、現行技術に勝る大きな利点を提供する。

#### 【0126】

マイクロエレクトロメカニカル・システム（MEMS）技術は、様々な設計適用例で感知および作動を行うためにトランスデューサを提供する。MEMS技術の重要な点は、電子回路と共に集積し、大量にバッチ製造することができるミクロンサイズの機械的部品を可能にすることである。MEMSデバイスは、マイクロ加工のプロセスによって製造され、バッチ製造プロセスはリソグラフィを採用する。マイクロ加工は、事前設計レジスト・パターン（またはマスク）を使用し、次いで、望ましくない部分を選択的にエッチング除去して3次元構造を作成するために、リソグラフィ方法の使用に大きく依拠している（ホーおよびタイ，1996年，1998年）。MEMSは、小型化デバイスを作成するための権能付与技法であり、本研究では、MEMS技術をバイオセンシング方法と組み合わせて、E. coli バクテリアを検出する。

#### 【0127】

高い特異性を達成する最も効果的な手段の1つは、バクテリアの遺伝物質を検出することである（例えばrRNA、mRNA、変性DNA）。ターゲット・バクテリアのrRNAまたはssDNAのみに配列が相補的である一本鎖DNA（ssDNA）プローブを選択することによって、ハイブリダイゼーション・イベントの監視が、ターゲット細胞の選択的感知を可能にする。感度を最大にするように、ハイブリダイゼーション・イベントと酵素反応の組合せが信号増幅をもたらす。これは、各基質から生成物への変換が信号全体に寄与するからである。酵素反応によって増幅されるDNAハイブリダイゼーションの検出に対するバイオアッセイは、依然として比較的短時間で完了することができる。最後に、電気化学プローブに固有の小型化および携帯性が、それらのプローブを、MEMSデバイスへの組み込みに優れた候補とする。

#### 【0128】

1つの検出システムにいくつかの良く確立された技術を組み合わせることに基づいたエシエリキア・コリ（E. coli）に関するプロトタイプ電流測定検出器を開発した（チェン等，2000年、ガウ等，2000年）。MEMS、自己組織化単層（SAM）、DNAハイブリダイゼーション、および酵素増幅の技術は全て、小型化された特定の高感度のE. coli 検出器の設計に寄与する。DNA電気化学プローブは、すでに報告されており（ワン等，1997年、マラザ等，1999年）、通常はグラファイトまたは炭素電極が使用される。使い捨て試験ストリップ上のスクリーン印刷炭素電極を使用する、E. coli からのDNAの電流測定検出に関する市販ユニットも利用可能である（アンドケア社、米国ノースカロライナ州ダラム）。スクリーン印刷は、低コストであるという利点を有するが、高次元精度を達成するのは簡単でない。リソグラフィを使用して、金属（Au、Ag）および炭素を含めた広い範囲の材料の薄膜を、 $\mu\text{m}$ サイズ寸法で正確にパターン形成することができる。さらに、SAMは、MEMS表面上で分子を選択的に不動化する優れた方法である。Au、Ag、および他の金属へのSAMの結合は、良く研究されており（レベル等，1998年、モテシャライ等，1998年、シャー等，1998年、ライリ等，1999年）、蛋白質および他の生体分子を、SAMを使用してAuなどの表面上に簡単に不動化することができる（オスツーニ等，1999年、ケーン等，1999年、スピケ等，1993年、ハウスリング等，1991年）。さらに、電極上のSAMを使用する電流測定方法は、ターゲット分析物を正常に検出することができることが実証されている（サン等，1998年、ホウ等，1998年、マーシー等，1998年）。

#### 【0129】

本 E . c o l i 検出システムでは、各技術に固有の利点を活用する。DNAハイブリダイゼーションおよび酵素増幅を使用して、必要な特異性および感度を達成する。MEMSおよびSAMを使用して、小型システムを製造し、これにより携帯型器具をもたらすことができる。最後に、この検出システムが広い範囲の病原性バクテリアに適用可能であることを実証する。例えば、検出モジュールおよびアッセイ・プロトコルを、尿路 E . c o l i の検出、および中耳炎（中耳感染）をもたらす微生物の同定に適合させることができる。

【0130】

## 2. 実験

### 2.1. MEMS 検出器アレイ

二酸化珪素 ( $\text{SiO}_2$ 、1000) の層が、ベア Si ウェハ (第1級、p型 <100>、厚さ 500 ~ 550  $\mu\text{m}$ ) 上に堆積され、窒化珪素 ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ 、1000) の下でパッド層として働いて、応力を解放し、接着を改善した。MEMSアレイは、深さ 350  $\mu\text{m}$  のウェルを形成するようにエッチングされた 3.6 mm x 3.6 mm の作業電極を有して製造された。窒化物ウェハは、パターン形成され、[111] および [100] 結晶面に沿って KOH を使用してバルク・エッチングされ、ウェルの深さは、KOH エッチング時間および温度によって制御された。100  $\mu\text{m}$  幅補助電極および基準電極が、対応する電極から 200  $\mu\text{m}$  だけ離隔された。図1は、MEMSアレイを製造する際に使用されたパターンの概略図を示す。窒化物および酸化物が HF エッチングによって除去されて、内部応力が解放され、電気絶縁のために別の酸化物層 (5000) が堆積された。電極は、PR5214 フォト・レジスト・リバーズ・イメージングおよび Au (2000) / Cr (200) の電子ビーム堆積を用いたリフトオフ・プロセスによってパターン形成された。最後に、150 で10分のホット・ベークの後、ヘキサメチルジシラザン (HMDS) 蒸気中に3分間浸されて、周囲の Si 領域に疎水性表面が生成された。作業電極の3次元性質と共に、周囲領域の疎水性が、作業電極内への液体小滴の封じ込めを可能にする。この設計は、MEMSアレイの他の領域への生体分子の不特定結合を効果的に最小限に抑えた。

【0131】

### 2.2. Au 上へのストレプトアビジン SAM の堆積

1) ベア Au 上にストレプトアビジンを直接吸着する、2) ビオチン化チロール、ビオチン-DAD-C12-SH の SAM を堆積し、後でストレプトアビジンを結合する、3) ビオチン化二硫化物、ビオチン-HPDP の SAM を堆積し、後でストレプトアビジンを結合するという3つの異なる方法を使用して、ストレプトアビジン単層を Au 上に堆積した。全ての場合に、Au 表面は、濃縮「ピラニア」溶液 (70 体積%の  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、30 体積%の  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を用いて浄化され、脱イオン水を用いて完全にすすぎ洗いされた。ベア Au 上にストレプトアビジンを堆積する際、0.02 M Na 燐酸塩緩衝液、0.15 M NaCl、pH 7.2 中の 1.0 mg/ml ストレプトアビジン溶液 (シグマケミカル社 S0677) が、基板上に配置され、10分間留めることができ、脱イオン水ですすぎ洗いされた。ビオチン-DAD-C12-SH (12-メルカプト(8-ビオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル)ドデカンアミド) (ロシュ GmBH、ドイツ) の SAM を堆積する場合、スピッケ等 (1993年) の処置が使用され、試料は、 $4.5 \times 10^{-4}$  M 11-メルカプト-1-ウンデカノールを有するエタノール中の 50  $\mu\text{M}$  ビオチン-DAD-C12-SH 溶液 (アルドリッチケミカル社 44,752-8) 中で約 18 時間インキュベートされ、エタノールおよび水ですすぎ洗いされた。次いでビオチン被覆 Au 表面が約 10 分間、1.0 mg/ml ストレプトアビジン溶液に露出され、やはり水ですすぎ洗いされた。ビオチン-HPDP の SAM (N-[6-(ビオチンアミド)ヘキシル]-3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド、ピアス社、21341) を堆積する際、試料は、エタノール中の 50  $\mu\text{M}$  ビオチン-HPDP 溶液中で約 18 時間インキュベートされ ( $4.5 \times 10^{-4}$  Mメルカプトプロパノールを用いて、または用いずに)、エタノールおよび水ですすぎ洗いされた。次いで、表面が、約 10 分間 1.0 mg/ml ストレプトアビジン溶液に露出され、やはり水ですすぎ洗いされた。

## 【0132】

## 2.3.E.coliの電流測定検出に関するアッセイ・プロトコル

アッセイ・プロトコルは以下のように行われた。1) 50  $\mu$ l の溶菌試薬 (アンドケア社、4002-11) が、培養媒体中のバクテリアの250  $\mu$ l 試料に追加され、室温で5分間インキュベートされた。2) 次いで、100  $\mu$ l のプローブ溶液 (アンドケア社、4002-13) が追加され、混合物が65 で10分間インキュベートされた。3) 5  $\mu$ l の溶菌E.coli / プローブ溶液混合物が、MEMS検出器アレイのストレプトアビジン被覆作業電極上に配置され、室温で10分間インキュベートされた。4) MEMS検出器アレイがピオチン洗浄溶液で洗浄された (キルケゴールアンドペリー・ラボラトリー、50-63-06)。5) 希釈剤 (アンドケア社、4002-14) を用いて0.75 U/ml または0.15 U/ml に希釈された5  $\mu$ l のAnti-Fl-POD (アンチフルオレセインペルオキシダーゼ、150 U、ロシュ社、1426346) が、作業電極上に配置され、室温で10分間インキュベートされた。6) MEMSアレイ・チップが、やはり洗浄溶液を用いて洗浄された。7) 3つの電極 (作業電極、補助電極、基準電極) 全てが基板溶液によってカバーされるように、10  $\mu$ l のK-blue基質 (ネオゲン社300176) が検出器アレイ上に配置された。8) 電気化学測定値が即座に取られた。全プロトコルが40分以内に完了した。ピコアンプ・ブーストおよびファラデー・ケージを有するCHインストゥルメンツ660Aエレクトロケミカル・ワークステーションを使用して、電流測定電流対時間が測定された。MEMS検出器アレイ上の試料が、順次に測定された。電圧は (基準に対して) -0.1 Vで固定され、20秒のカソード電流が電流測定信号として取られた。20秒で電流値が安定状態に到達した。細胞濃度 (細胞数) は、連続的な希釈および培養皿カウンティングを使用して決定された。

10

20

## 【0133】

## 2.4.自己組織化単層の特徴

検出器の性能は、不動化されたストレプトアビジン単層の性質に大きく依存している。表面プラズモン共鳴 (SPR、バイアコアXシステム、バイアコア社) および原子間力顕微鏡検査 (AFM) を行って、単層を特徴付けた。ベアAuへのストレプトアビジン結合のSPR研究では、ベアAuチップ (J1センサ・チップ) が使用された。ピオチン-DAD-C-12-SH/Auまたはピオチン-HPDP/Auへのストレプトアビジン結合の研究では、ピオチンSAMは、SPR実験前に、すでに述べたようにベアAuチップ上に堆積された。最良の結果として、ベアAuを用いてSPRを行う、またはピオチンSAMを堆積する前に、希釈H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液で約2分間、新たなチップが洗浄された。全ての場合に、0.02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝液、0.15 M NaCl、pH 7.2 緩衝液中の1.0 mg/ml ストレプトアビジンが使用された。ベアAu上のストレプトアビジンに関する吸着実験では、流量は1~5  $\mu$ l/分の範囲にあった。ストレプトアビジンおよびピオチン-DAD-C-12-SH/Auに関する実験では、流量は10~25  $\mu$ l/分の範囲にあった。ストレプトアビジンおよびピオチン-HPDP/Auに関する実験では、流量が5~10  $\mu$ l/分の範囲にあった。脱着実験では、以下の溶液25  $\mu$ l が、25  $\mu$ l/分でチャンネルを介して順次に流れた (総露出時間は1分)。1.0 M KCl、8 M 尿素、0.5% SDS、0.1 M HCl、0.1 M NaOH、および40体積%ホルムアミド。

30

40

## 【0134】

AFM (オートプローブCP、サーモマイクロスコープ社) は、5.0 nNの力を有するウルトラレバー・チップを使用して接触モードで行われた。平坦なAu表面を保証するために、ワグナー等 (1995年) の方法が使用され、Auがまずマイカ上に電子ビーム蒸着によって堆積され、次いでSiに転写された。本実験の場合、マイカは、溶媒を使用せずにAuから清潔に除去するためにへき開された。

## 【0135】

## 3. 結果

## 3.1 マイクロエレクトロメカニカル・システム (MEMS)

50

図2は、MEMS検出器アレイの写真を示す。対応する補助電極および基準電極と共に16個の作業電極が、2.8cm×2.8cm領域内にパターン形成された。検出器アレイは、 $H_2SO_4/H_2O_2$ 溶液を使用して表面を浄化することができるので、完全に再利用可能であった。表面を適切に浄化し、作業電極上にSAMを再堆積することによって同じMEMS検出器アレイを複数回再利用した。

#### 【0136】

##### 3.2 DNAハイブリダイゼーションを使用するE.coli検出

本MEMSシステムでは、E.coli検出は、DNAハイブリダイゼーションと、それに続く酵素反応に基づく。電極表面を例示する概略図を図3に示す。ストレプトアビジン単層が、Au作業電極表面上に不動化されて、E.coliからrRNAを捕捉する。2つのssDNAセグメントがこのシステムで使用される。ストレプトアビジン結合のためにビオチンに結合された捕捉ssDNAは、E.coli rRNAの一端にハイブリダイゼーションする。酵素ペルオキシダーゼ(POD)にリンクされたアンチフルオレセインへの結合のためにフルオレセインに結合された検出器ssDNAは、E.coli rRNAの多端にハイブリダイゼーションする。捕捉ssDNAと検出器ssDNAは、2つの異なる保存的配列を認識し、それによりハイブリッドは、E.coliからの特定の遺伝子セグメントを用いてのみ生成される。オリゴヌクレオチド・ハイブリッドはAu作業電極上に、ビオチンストレプトアビジン結合によって不動化され、結合されていない成分が洗浄除去される。ストレプトアビジンは、通常は高い親和力( $K_d$  約 $10^{-15}M$ )でビオチンに結合する(ウェーバー等, 1989年)。(Anti-F1-フルオレセイン結合を介する)ハイブリッド上へのPODの担持後、基質が追加され、酵素反応が電流測定で検出される。基質溶液は、基質 $H_2O_2$ と、媒介物である3,3',5,5'テトラメチルベンジジン(TMB)との両方を含む。酵素および電極反応が図4に示される。

#### 【0137】

##### 3.3 rRNA捕捉のためのストレプトアビジン自己組織化単層

図5に示すように、電極表面上でストレプトアビジン単層を不動化するために3つの異なる手法を使用した。第1の手法では、ストレプトアビジン単層が、蛋白質吸着によってベアAu上に堆積された。第2の手法では、ビオチン化チオールを使用してビオチンのSAMがAu上に堆積され、その後、ストレプトアビジンがビオチンに結合された。第3の手法では、ビオチンのSAMが、ビオチン化二硫化物を使用してAu上に堆積され、その後、ストレプトアビジンがビオチンに結合された。

#### 【0138】

##### 3.4 ストレプトアビジン単層の特徴

ストレプトアビジン単層は、表面プラズモン共鳴(SPR)と原子間力顕微鏡検査(AFM)の両方を使用することで特徴付けられる。SPRは、溶液金属界面での分子と金属(Au、Ag)薄膜との相互作用を監視するための実行可能技法であることが実証されている。この技法を使用して、堆積層の厚さを評価し、会合および解離の速度論を測定することができる(ハウスリング等, 1991年、スピケ等, 1993年、シーガル等, 1996年、ラオ等, 1999年、ユング等, 1999年)。3つの手法全てを使用して、Au上のストレプトアビジンの堆積を監視するためにSPRを行った。SPR結果が図6に示されている。製造業者(パイアコア)による較正に基づく、SPR信号の1000レゾナンス・ユニット(RU)が、表面蛋白質濃度中の約 $1ng/mm^2$ の変化に相当する。ストレプトアビジンは、約 $55 \times 45 \times 50$  (ダースト等, 1991年)の寸法を有する。ストレプトアビジンの完全な単層は、2次元結晶単層(ユング等, 1999年、ダースト等, 1991年)に基づいて計算される約 $2.8ng/mm^2$ の予想密度を有する。図6から、本質的にストレプトアビジンの完全な単層が、ビオチン化チオールSAM/Au(約3000RU)上に堆積され、約80%の「カバー範囲」が、ベアAu(約2400RU)上に堆積されたストレプトアビジンを用いて得られ、約52%の「カバー範囲」が、ビオチン化二硫化物SAM/Au(約1550RU)上に堆積されたストレプトア

ビジンを用いて得られた。ビオチン化二硫化物に関して、溶液中のメルカプトプロパノールの存在は、SPR信号がわずかに約10%（約1700RU、データは図示せず）しか増大しないので、表面カバー範囲に対する効果を無視できる。全ての場合に、蛋白質溶液の第2の注入時の追加の蛋白質堆積が最小限になった。さらに、流量は、堆積された蛋白質の割合または量に対する効果を無視できる。SPR結果は、3つの手法全てで、多層ではなくストレプトアビジンの単層のみがAu上に堆積したことを示す。最後に、これらの結果は、ストレプトアビジンビオチン結合およびAu上へのストレプトアビジン吸着のほとんどが数秒以内で生じ、数分程度で完了させることができることを立証している。

#### 【0139】

ストレプトアビジンを脱着することができるかどうか、すなわち表面を再生成するために、ストレプトアビジンをペアAuから、またはビオチンへの結合から解離できるかどうかを判定するための実験を行った。表Iは、蛋白質リガンド結合および/または変性蛋白質を解離するために知られている様々な試薬を用いた処理後のSPR信号(RU)の損失を列挙する。表Iに見られるように、わずかに8Mの尿素、0.5%のSDS、および0.1M NaOHが、表面からストレプトアビジンを脱着するのに幾分効果的であった。1.0M KCl、0.1M

#### 【0140】

HCl、および40%ホルムアミドは効果的でなかった。ストレプトアビジンは、任意の試薬によって完全には脱着することができず、全ての試薬に表面をさらした後にいくらかの蛋白質が残った。これらの結果は、ストレプトアビジンが、ビオチンSAMとペアAuとの両方にかなり良好に結合し、ストレプトアビジンアン単層が比較的安定であったことを示す。

#### 【0141】

AFMの使用により、ペアAuに直接吸着されたストレプトアビジンのイメージングによって表面をさらに特徴付けることができる。ペアAuは、トポグラフィ・フィーチャ<10nmを有し、「部分」単層上の蛋白質島は約45nmであり、ストレプトアビジンの寸法に適合していた(図7)。AFM結果は、Au上にただ1つの単層が堆積されるというSPRの知見を確認する。「完全な」蛋白質単層に関する接触モードでのAFMが、蛋白質ドラッグの痕跡があるフィーチャレス表面を示し(データは図示せず)、したがって表面カバー範囲に関する追加の情報は提供しなかった。以前に報告されているように、ビオチン化SAMを使用し、その後、ストレプトアビジンを結合するときにも単層堆積が得られる(スピンケ等, 1993年、ユング等, 1999年)。

#### 【0142】

3.5 MEMS検出器アレイを用いた電気化学測定  
本MEMS検出器アレイでは、3つの電極、すなわち作業電極、補助電極、および基準電極の全てに関してAuを用いた3電極システムを使用した。通常、Ag/AgClまたは飽和カロメル電極(SCE)が、基準電極で固定電位での可逆酸化/還元が生じるように、基準電極として使用された。しかし、本MEMS検出器アレイでは、基準電極としてAuを使用して、製造を簡略化し、完全に再利用可能なアレイを可能にした。一定の電位の維持は、(2電極システムに対して)3電極システムの使用によって可能になった。TM Bの還元が監視されるこの特定の適用例では、基準電極としてAuを正常に使用することができる。これは、低い電圧差(-0.1V)が短い時間(<1分)維持されたためである。

#### 【0143】

2つの個別の実験によって電気化学検出に関してAu/Au/Au電極システムを特徴付けた。第1の実験では、フェロセン被膜が電極上に配置され、サイクリック・ボルタンメトリが、レドックス反応を監視するために行われた。従来の可逆の1電子移動に関するサイクリック・ボルタンメトリは、アノード・ピークとカソード・ピークのための約57mVのピーク離隔距離、ピーク最大値での同じピーク電流、およびピーク電流と[スキャン率]<sup>1/2</sup>との線形関係によって特徴付けられる(ホール, 1991年)。図8は、様々な

10

20

30

40

50

スキャン率でフェロセンを用いて得られるボルタモグラムを示す。図8に見られるように、従来のレドックス挙動が観察され、ピーク電流対[スキャン率]<sup>1/2</sup>のプロットが線形である(図9)。

#### 【0144】

Au/Au/Au電極システムを用いた第2の実験では、サイクリック・ボルタンメトリが、基質溶液(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+TMB)のみに対して行われ、次いで再びPOD酵素を用いて同じ溶液に対して行われた。スキャン率10mV/秒で-0.2V~+0.50Vでサイクルして、基質溶液が、TMBの2電子レドックス挙動を示した(図10)。基質溶液へのPODの追加は、還元電流の増大をもたらした。次いで、POD酵素活性の測定に関して、(基準に対する)-0.10Vの定電位が選択された。この電位では、電流バックグラウンドがゼロに近く、基質酸化が行われない。この電位は、酵素活性判定に最適であり、少量の生成物(酸化TMB)が、高濃度の基質の存在下で測定された。

10

#### 【0145】

##### 3.6 E. coliの検出

E. coli rRNAの電流測定検出に関して、まず、3つの異なるストレプトアビジン単層表面の性能を比較した。ストレプトアビジンは、前述した3つの異なる手法を使用してAu上で不動化され、バクテリアE. coliおよびボルデテラブロンキセプチカ(ボルデテラ)に関してアッセイ・プロトコルが行われた。ssDNAプローブはE. coliに特有なものであるため、ボルデテラ・バクテリアは負の制御試料として働いた。この実験の目的は、ピオチン-rRNA-PODハイブリッドを捕捉するために不動化ストレプトアビジンの効率を比較することであった。E. coliの2つの濃度が使用され、一方の試料を他方の10倍の濃度にした。さらに、ボルデテラからの信号が、不特定結合のレベルまたは達成可能な「ベースライン」を示す。この実験からの結果が図11に示される。同じバクテリア溶液(E. coliまたはボルデテラ)が使用されたので、異なる表面の直接の比較を行うことができる。図11に見られるように、ピオチン化チオールによって不動化されたストレプトアビジンが、E. coli検出に関する最良の条件であった。ピオチン-チオールSAMを使用して、ボルデテラからの低いベースライン信号を達成しながらE. coliに関する良好な信号を得た。Auに対してピオチン二硫化物によって不動化されたストレプトアビジンでは、E. coliに関する電流信号(両方の濃度)が大幅に低くなり、ベースラインは、ピオチン-チオール/ストレプトアビジンに関するものと同じであった。Auに直接吸着されたストレプトアビジンの場合、ボルデテラからの信号ははるかに高く、表面に対するPODのより高レベルの不特定結合を示した。

20

30

#### 【0146】

Au/ピオチン-SH/ストレプトアビジンが最適なストレプトアビジン表面になったことを確かめた後、システムの感度を求めるためにE. coliおよびボルデテラを使用してプロトコルを繰り返した。ピオチン-SH SAMによってストレプトアビジンを不動化して、負の制御としてボルデテラを有して、一連のE. coli希釈液に対するアッセイを行った。その結果を図12に示した。データは、MEMSシステムを使用して少なくとも1000個のE. coli細胞を検出することができることを示す。予想されるように、電流信号は、試料溶液中のE. coli細胞の数の増加の関数として増大した。さらに、アッセイ・プロトコルで使用されるPOD濃度を低下させる(0.75U/mlから0.15U/mlに)ことにより、より少ないE. coli細胞数で、信号のより良い区別を達成した(図13)。図13に見られるように、1000個のE. coli細胞に関する電流信号は、2.5×10<sup>5</sup>のボルデテラ細胞に関するものの2倍よりも大きかった。本MEMSシステムを使用する結果は、E. coliバクテリアが、バクテリアrRNAを捕捉するために電流測定およびSAMを使用して正常に検出されたことを確認する。

40

#### 【0147】

##### 4. 考察

本結果は、MEMS技術をSAM、DNAハイブリダイゼーション、および酵素電流測定と組み合わせることで、E. coliなどのバクテリアに関する高い特異性および感度を

50

もつ電気化学検出器がもたらされることを示す。各成分からの寄与は、システムの全体の正常性に重要である。MEMS技術は、複数の3電極「電池」のアレイをSiウエハ上に堆積することができるようにし、説明したMEMS検出器アレイは、SAMを除去することができ、適切な浄化を用いてAu表面が再生成されるので十分に再利用可能である。さらに、マイクロ加工チャネル、弁、ポンプ、および集積電子回路を用いて、試料調製およびアッセイ・プロトコルを完全に自動化することができる。

#### 【0148】

SAMは、捕捉生体分子、例えばストレプトアビジンを不動化するようにAu作業電極を機能させる効果的な手段を提供する。DNAハイブリダイゼーションは、ssDNAプローブの配列をターゲットのみと相補的になるように注意深く選択することができるので、病原性バクテリアに対する高い特異性をもつことができるようにする。ハイブリダイゼーション・イベントを酵素反応と組み合わせることで、信号増幅が提供され、感度が高まる。最終的に、電気化学変換を使用することによって、最少電力消費の小型化携帯型システムを開発することができる。

#### 【0149】

高速検出および携帯型器具は、病原体センシングに望ましい。このシステムを使用して約40分以内で検出を達成することができることが実証された。小さい寸法および小さい試料体積により、DNAハイブリダイゼーションおよび酵素結合に関して現在使用されているインキュベーション時間(10分)を短縮することによって、アッセイ時間をさらに短縮することができる。MEMSの明らかな利点は、非常に小さな体積(数 $\mu\text{l}$ )および電極表面積(現在、作業電極では $0.13\text{ cm}^2$ 、補助および基準電極では $<0.02\text{ cm}^2$ )を使用することができることである。本実験の結果は、少なくとも約 $10^3$ 個の細胞を、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)を用いずにこのシステムを使用して検出することができることを示す。MEMSシステムでの小さな体積および作業電極表面積により、絶対細胞数に関する検出限界は、細胞濃度(細胞/ml)に関する検出限界を報告するよりも適している。 $10^2 \sim 10^3$ 細胞/ml程度の検出限界が報告され、しかし通常は、約 $1\text{ cm}^2$ の作業電極表面積を有する約 $1.0\text{ ml}$ の試料体積が使用された(アブデルハミッド等, 1998年, 1999年)。電流測定酵素免疫濾過アッセイでは、信号は、 $1.0\text{ ml}$ 試料を使用するときよりも $0.1\text{ ml}$ 試料を使用するとき1桁以上大きかった。

#### 【0150】

E. coli rRNAを検出するための電流測定実験の結果は、ビオチン化チオールSAM手法によって不動化されたストレプトアビジン単層が最良の結果を生み出すことを示している。SPRデータが、ビオチン化チオールを使用するとき最大のストレプトアビジン表面密度または「カバー範囲」を示しているので、この知見は驚くべきものではない。よく秩序化された自己組織化単層は、ビオチン化チオールを用いてのみ生成され、最大のストレプトアビジン表面密度をもたらす可能性が高い。ビオチン化二硫化物の場合、Au表面へのビオチンの取付けはAu-S結合によって行われるが、追加の有機基はおそらく稠密単層の形成を妨げる。Auへの直接の吸着によって不動化されたストレプトアビジンは、作業電極に対するPOD酵素の非常に大きい不特定結合をもたらした。様々な蛋白質(例えばストレプトアビジン、免疫グロブリン)に取り付けられたコロイド状Au粒子が市販されている(ナノプローブ社、ニューヨーク州ヤップハンク)ので、Auへの蛋白質吸着がよく知られている。ストレプトアビジンは、システインまたはメチオニンの残留物を含まず(ウェーバー等, 1989年)、したがって、Au-S結合によってAuに付着しない。Auへの蛋白質吸着は、カルボキシル基とAuとの相互作用によって生じる場合があり(オーカ等, 1999年)、ストレプトアビジンAu付着に関する有望な機構である。ストレプトアビジン単層を直接吸着によってAuに付着することができるが、自己組織化または分子秩序が生じるかどうかは疑問である。SPR脱着実験は、ストレプトアビジンAu付着がストレプトアビジンビオチン結合と同じくらい頑強になることを示した。すなわち尿素、SDS、およびNaOHによって除去されるストレプトアビジンの量は、ビオチンに付着されたストレプトアビジンと異なり、Au上に直接吸着されたストレブ

10

20

30

40

50



トアビジンの場合と同様であった。しかし、E. coli に関するアッセイ・プロトコルを行うとき、試料溶液は、オリゴヌクレオチド、および溶菌 E. coli からの細胞デブリを含んでいた。本データは、他の蛋白質および生体分子の存在が、Au からのストレプトアビジンの脱着を加速し、表面への酵素 POD の不特定結合の増大をもたらしたことを示唆している。

【0151】

##### 5. 結論

E. coli バクテリアは、MEMS に SAM、DNA ハイブリダイゼーション、および酵素増幅を組み込むことによって正常に検出された。E. coli に関して特有であり、PCR を用いずに 1000 個の細胞を検出することができる MEMS ベースの検出システムを実証した。プロセス時間は 40 分以下にすることができる。さらに、数マイクロリットル程度の溶液体積を用いてアッセイを行うことができる。SAM、DNA ハイブリダイゼーション、および酵素増幅方法を MEMS 技術と統合することにより、病原性検出に関する新世代のデバイスを可能にする。

【0152】

##### 参考文献

I. アブデルハミッド, D. イヴニツキ, P. アタナゾフ, E. ウィルキンス 1998 年 部分的に浸漬された免疫電極を使用する E. coli 0157:H7 に関する高速電流測定アッセイ (エレクトロアナリシス 10 (11), 758 - 763)

I. アブデルハミッド, D. イヴニツキ, P. アタナゾフ, E. ウィルキンス, 1999 年 E. coli 0157:H7 の高速検出のためのフロースルー免疫濾過アッセイ・システム (Biosens. Bioelect. 14, 309 - 316)

Y. F. チェン, J. M. ヤン, J. J. ガウ, C. M. ホー, Y. C. タイ, 2000 年 生物剤検出のためのマイクロ流体システム (技術と流体力学の相互作用に関する第 3 回国際会議 (スイス、チューリッヒ) の議事録)

S. A. ダースト; M. アーラー; P. H. メーラー; E. W. クバレク; R. ブランケンブルク; H. O. リブ; H. リングスドルフ; R. D. コルンベルク 1991 年 ピオチン化脂質層上でのストレプトアビジンの 2 次元結晶およびピオチン化高分子との相互作用 (Biophys. J. 59, 387 - 396)

J. J. ガウ, E. H. ラン, B. ダン, C. M. ホー 2000 年 DNA アレイ・チップを有する酵素ベースの電気化学バイオセンサ (マイクロ・トータル分析システム (μTAS) に関する第 4 回国際シンポジウム (オランダ、エンシェーデ) の議事録)

E. A. H. ホール 1991 年。バイオセンサ (ブレンティス・ホール, ニュージャージー州イングリウッド・クリフス)

L. ハウスリング, H. リングスドルフ, F. J. シュミット, W. クノール 1991 年 金上でのピオチン機能化自己組織化単層: 特定の認識反応の表面プラズモン光学研究 (ラングミュア 7 (9), 1837 - 1840)

C. M. ホー, Y. C. タイ 1996 年。レビュー: 流れ制御のための MEMS およびその応用 (J. Fluids Eng. 118, 437 - 447)

C. M. ホー, Y. C. タイ 1998 年。マイクロエレクトロメカニカル・システム (MEMS) と流体の流れ (Ann. Rev. Fluid Mech. 30, 579 - 612)

S. F. ホウ, K. S. ヤン, H. Q. ファン, H. Y. チェン 1998 年。自己組織化単層表面上の多層でグルコースオキシダーゼを不動化することによる電流測定グルコース酵素電極 (タランタ 47, 561 - 567)

D. イヴニツキ, I. アブデルハミッド, P. アタナゾフ, E. ウィルキンス 1999 年。病原性バクテリアの検出のためのバイオセンサ (Biosens. Bioelect. 14, 599 - 624)

D. イヴニツキ, I. アブデルハミッド, P. アタナゾフ, E. ウィルキンス, S. ストリッカー 2000 年。食物病原性バクテリアを検出するための電気化学バイオセンサの

10

20

30

40

50

- 応用 (エレクトロアナリシス 12 (5), 317 - 325)
- L. S. ユング, K. E. ネルソン, C. T. キャンベル, P. S. ステートン, S. S. イー, V. ペレスルナ, G. P. ロペス 1999年。混合ビオチン含有アルキルチオレート単層上のワイドタイプおよび変異ストレプトアビジンの結合および解離の表面プラズモン共鳴測定 (センサーズ・アクチュエータズ B 54, 137 - 144)
- R. S. ケイン, S. タカヤマ, E. オスツーニ, D. E. イングバー, G. M. ホワイトサイズ 1999年。ソフトリソグラフィを使用する蛋白質および細胞のパターン付け (バイオマテリアルス 20, 2363 - 2376)
- J. ライリ, E. オスツーニ, G. M. ホワイトサイズ 1999年。マイクロコンタクト印刷による反応性SAM上へのリガンドのパターン付け (ラングミュア 15 (6) 2055 - 2060) 10
- G. マラザ; I. キアネラ; M. マシーニ 1999年。「環境監視のための使い捨てDNA電気化学バイオセンサ」Anal. Chim. Acta 387, 297 - 307
- K. モテシャライ, D. C. ミレス 1998年。金上へのアルカンチオール機能化自己組織化単層に関する分子認識 (J. Am. Chem. Soc. 120 (29), 7328 - 7336)
- A. S. N. マーシー, J. シャルマ 1998年。金電極でのビス(4-ピリジル)二硫化物の自己組織化単層に結合されたグルコースオキシダーゼ: グルコースの電流測定算出 (Anal. Chim. Acta 363, 215 - 220)
- A. A. オオカ, K. A. クーア, N. チョ, G. L. ガレル 1999年。コロイド状銀および金上での、a, w-アミノ酸の相同な列の表面相互作用 (バイオスペクトロスコピー 5, 9 - 17) 20
- E. オスツーニ, L. ヤン, G. M. ホワイトサイズ 1999年。金および銀上での、蛋白質および細胞とアルカンチオレートの自己組織化単層との相互作用 (コロイド表面 B 15, 3 - 30)
- J. ラオ, L. ヤン, B. スー, およびG. M. ホワイトサイズ 1999年。D-Ala-D-Alaを表す自己組織化単層に対するバンコマイシンおよびそのダイマーの結合を研究するための表面プラズモン共鳴の使用 (J. Am. Chem. Soc. 121 (11), 2029 - 2030)
- D. J. レベル, J. R. ナイト, D. J. プリス, A. H. ヘインス, D. A. ラッセル 1998年。自己組織化炭水化物単層: 形成および表面選択分子認識 (ラングミュア 14 (16) 4517 - 4524) 30
- G. B. シーガル, C. バンダッド, A. バルベリス, J. ストロミンガー, G. M. ホワイトサイズ 1996年。表面プラズモン共鳴によるヒスチジンタグ付き蛋白質の結合および研究のための自己組織化単層 (Anal. Chem. 68, 490 - 497)
- J. スピンケ, M. リリー, H. J. グデー, L. アンゲルマイヤー, W. クノール 1993年。自己組織化単層での分子認識: 多成分多層の構成 (ラングミュア 9 (7), 1821 - 1825)
- X. サン, P. ヘー, S. リュー, チャンイー, Y. ファン 1998年。DNA電気化学センサ適用例のための自己組織化アミノエタンチノール単層を用いた金電極上での一本鎖デオキシリボ核酸の不動化 (タランタ 47, 487 - 495) 40
- P. ワグナー; M. ヘグナー; H. J. グンテロット, G. セメンサ 1995年。「超平坦テンプレートストリップ金表面上に化学吸着された単層の形成および*in situ*修正」ラングミュア 11, 3867 - 75
- T. H. ワン, Y. F. チェン, S. マセット, C. M. ホー, Y. C. タイ 2000年。分子ビーコンベースの微生物検出システム (医学および生物学における数学および設計技術に関する2000年国際会議 (METMBS'2000 米国ネバダ州カリフォルニア)の議事録)
- J. ワン, G. リバス, X. カイ, E. パレセック, P. ニールセン, H. シライシ, N. ドンサ, D. ルオ, C. パラド, M. チッチャロ, P. A. Mファリアス, F. S. バ 50

レラ, D. H. グラント, M. オズソス, M. N. フレア 1997年。環境監視用のDNA電気化学バイオセンサ (A Review. Anal. Chim. Acta 347, 1-8)

P. C. ウェーバー, D. H. オーレンドルフ, J. J. ウェンドロスキー, F. R. サレメ 1989年。ストレプトアビジンに対する高親和カビオチン結合の構造起源 (サイエンス 243, 85-88)

Y. シー, G. M. ホワイトサイズ 1998年。ソフトリソグラフィ (Angew. Chem. Int. Ed. 37, 550-575)

【0153】

【表1】

10

表I

表面プラズモン共鳴によって求めたときの、表面からのストレプトアビジンの脱着に関する様々な試薬の比較

処理条件	ベアAu上のストレプトアビジン約2400RUの堆積信号の損失 (RU)		ビオチン-DAD-C12-SH/Au上のストレプトアビジン約3000RUの堆積信号の損失 (RU)		ビオチン-HPDP/Au上のストレプトアビジン約1700RUの堆積信号の損失 (RU)	
1.0 M KCl	0	0	0	0	0	0
8 M 尿素	280 (12%)	370 (15%)	790 (26%)	1050 (35%)	360 (21%)	300 (18%)
0.5% SDS	40 (2%)	150 (6%)	390 (13%)	230 (8%)	330 (19%)	690 (40%)
0.1 M HCl	0	0	0	0	0	0
0.1 M NaOH	400 (17%)	550 (23%)	630 (21%)	690 (23%)	400 (24%)	200 (12%)
40%ホルムアミド	0	0	0	0	0	0

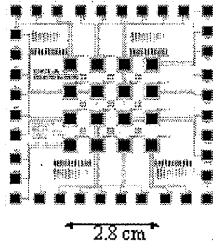
20

【0154】

【外16】

30

Figure 1



SENSOR ARRAY  
GOLD LAYER

Figure 2

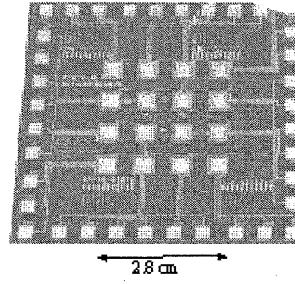


Figure 3

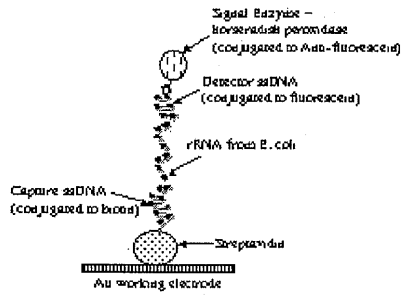
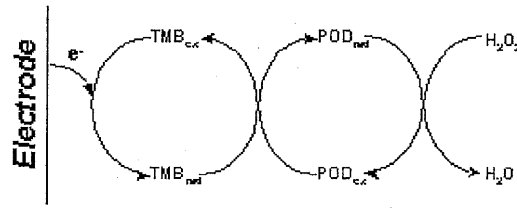


Figure 4

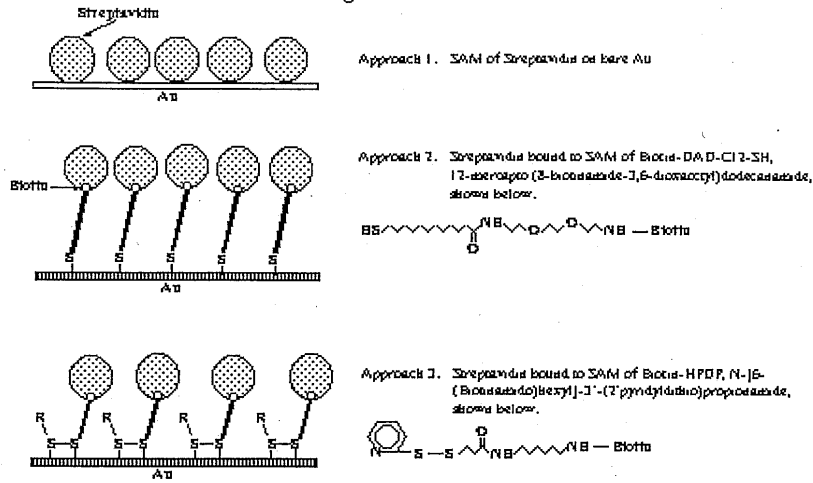


10

20

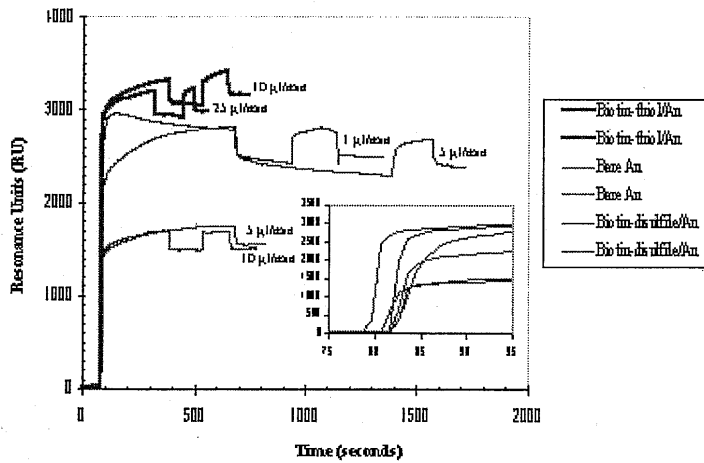
【外 17】

Figure 5



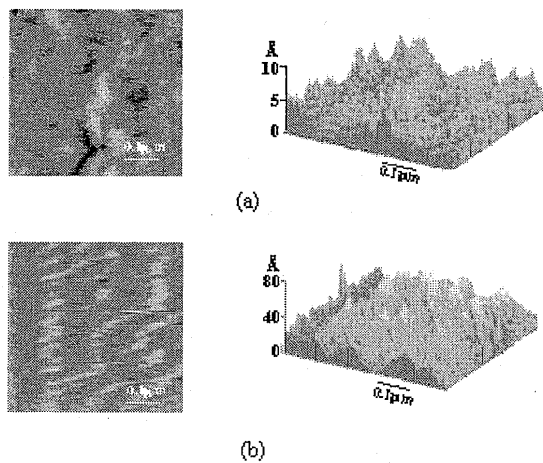
10

Figure 6



20

Figure 7



30

40

【外 1 8】

Figure 8

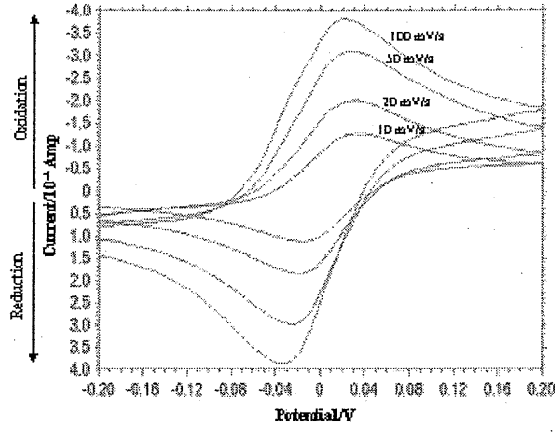
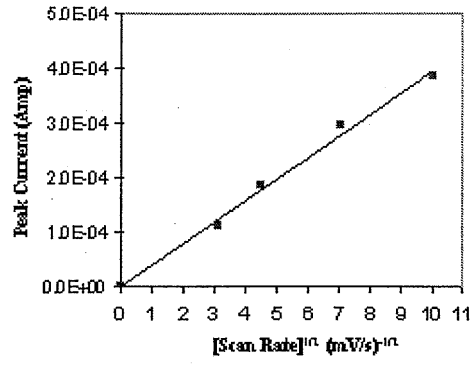
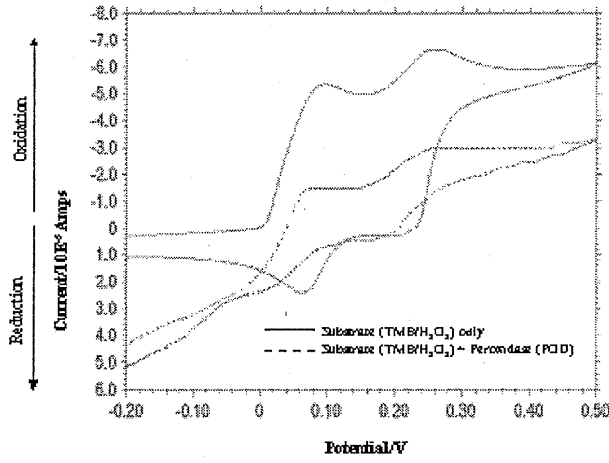


Figure 9



10

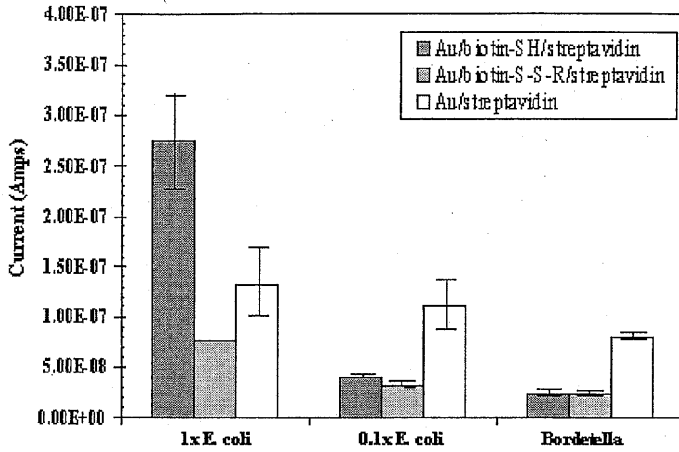
Figure 10



20

【外 1 9】

Figure 11



10

Figure 12

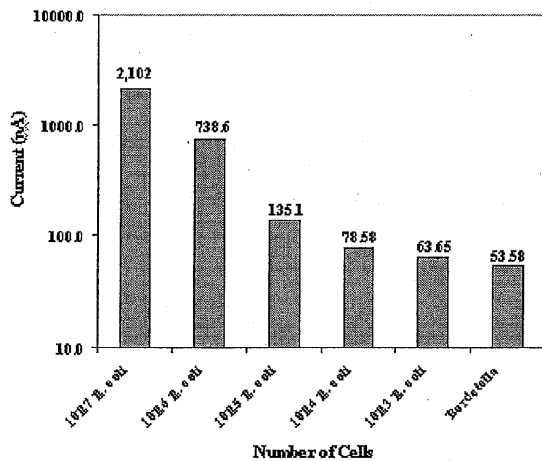
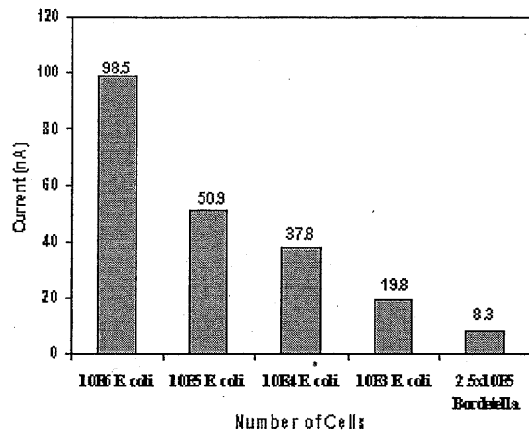


Figure 13



20

【図面の簡単な説明】

30

- 【図1】 従来の基準電極の一実施形態の概略図である。
- 【図2】 電気化学方法で使用されるポテンシostatの一実施形態の概略図である。
- 【図3】 本発明による円形基板ウェハ上の複数の電気化学バイオセンサの一実施形態の概略図である。
- 【図4】 本発明による正方形基板上の複数の電気化学バイオセンサの代替実施形態の概略図である。
- 【図5】 本発明による基板上の電気化学バイオセンサの別の実施形態の概略図である。
- 【図6】 時間の経過に伴うサイクリック・ボルタンメトリ(CV)スキャン電位のグラフである。
- 【図7】 本発明によるバイオセンサによって取られる1サイクル・サイクリック・ボルタンメトリ(電流対バイアス電位)である。
- 【図8】 本発明によるバイオセンサによって取られる様々なスキャン率でのサイクリック・ボルタンメトリ(電流対バイアス電位)である。
- 【図9】 本発明によるバイオセンサによって取られるスキャン率対ピーク電流の平方根のグラフである。
- 【図10】 本発明によるバイオセンサによって取られる一定のスキャン率での複数のサイクルにおけるサイクリック・ボルタンメトリ(電流対バイアス電位)である。
- 【図11(a)、(b)、および(c)】 本発明による表面張力および処理による試薬および/または溶液閉込めを示す線図である。
- 【図12】 本発明によるバイオセンサ上の作業電極のみを選択的に覆う試薬および/ま

40

50

たは溶液閉込めを示す線図である。

【図13】 本発明によるバイオセンサ上の全ての電極を覆う試薬および/または溶液閉込めを示す線図である。

【図14】 本発明のバイオセンサの一実施形態を製造することができる方法の第1のステップを示す側面図である。

【図15】 バイオセンサを製造することができる方法の第2のステップを示す線図である。

【図16】 バイオセンサを製造することができる方法の第3のステップを示す線図である。

【図17】 バイオセンサを製造することができる方法の第4のステップを示す線図である。

【図18】 バイオセンサを製造することができる方法の第5のステップを示す線図である。

【図19】 バイオセンサを製造することができる方法の第6のステップを示す線図である。

【図20】 不特定結合を防止するように本発明のバイオセンサの一実施形態の表面を修正することができる方法を示す線図である。

【図21】 図20での表面修正プロセスのバイオセンサ表面上での最終結果を示す線図である。

【図22】 バイオセンサが集積回路構成要素と集積されている、バイオセンサ・システムの本発明の一実施形態の断面図である。

【図23】 集積回路構成要素と集積された複数のバイオセンサの本発明の一実施形態の線図である。

【図24】 他の同様のユニットと共に、図24の集積回路構成要素と集積された複数のバイオセンサを作成するバイオセンサ・ユニットの断面図である。

【図25】 CMOSデバイスがバイオセンサ(センサチップ)自体に集積して、本発明のバイオセンサ(センサチップ)の一実施形態を集積回路(IC)技術によって製造することができる方法の第1のステップを示す線図である。

【図26】 バイオセンサ(センサチップ)を集積回路(IC)技術によって製造することができる方法の第2のステップを示す線図である。

【図27】 バイオセンサ(センサチップ)をIC技術によって製造することができる方法の第3のステップを示す線図である。

【図28】 バイオセンサ(センサチップ)をIC技術によって製造することができる方法の第4のステップを示す線図である。

【図29】 バイオセンサ(センサチップ)をIC技術によって製造することができる方法の第5のステップを示す線図である。

【図30】 バイオセンサ(センサチップ)をIC技術によって製造することができる方法の第6のステップを示す線図である。

【図31】 本発明のバイオセンサの一実施形態を使用してイオン分析物(または分子)を検出することができる方法を示す線図である。

【図32】 図31のセンサによって取られたサイクリック・ボルタンメトリ(CV)(電流対バイアス電位)グラフである。

【図33】 本発明のバイオセンサの一実施形態を使用して高分子(例えばDNS、RNA、蛋白質)を検出することができる方法の第1のステップを示す線図である。

【図34】 高分子の検出の第2のステップを示す線図である。

【図35】 高分子の検出の第3のステップを示す線図である。

10

20

30

40



【図1】

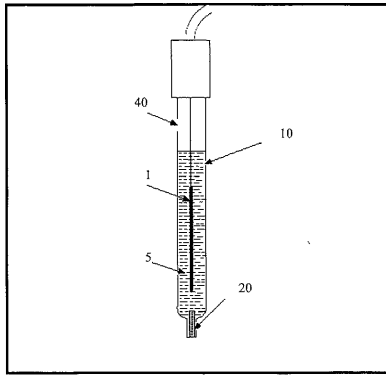


FIG. 1

【図2】

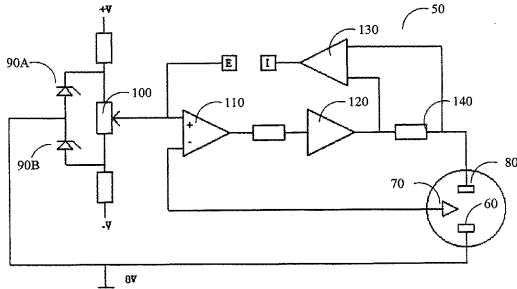


FIG. 2

【図3】

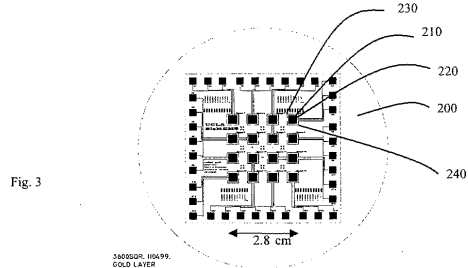


Fig. 3

【図4】

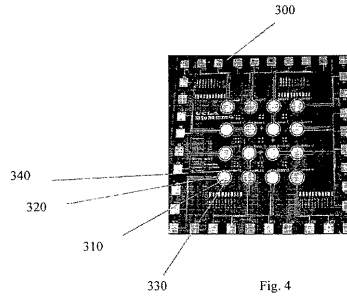


Fig. 4

【図5】

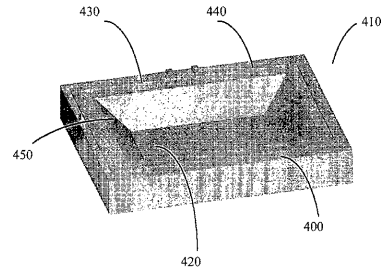
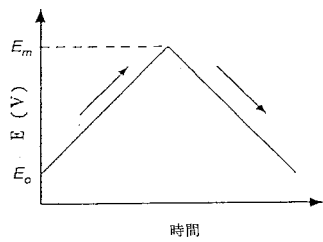
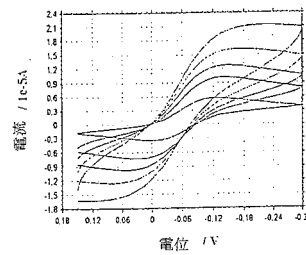


Fig. 5

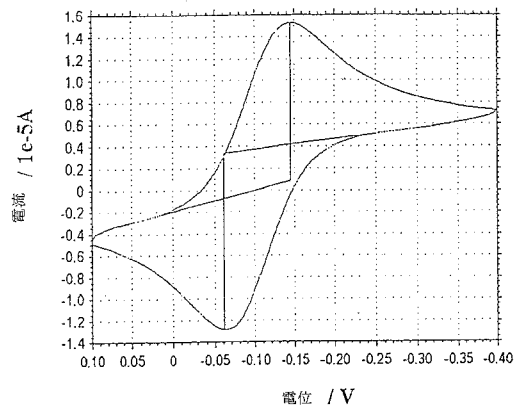
【図6】



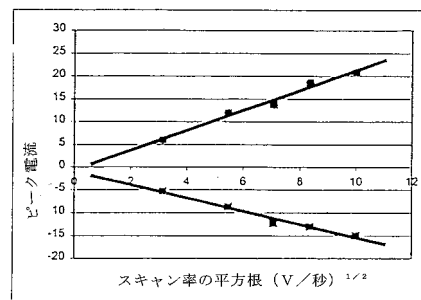
【図8】



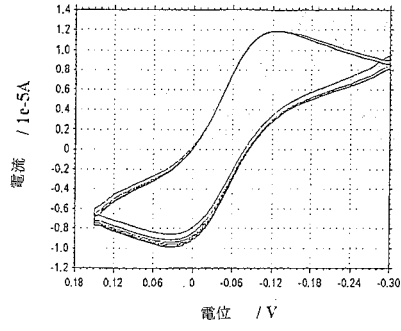
【図7】



【図9】



【図10】



【図11】

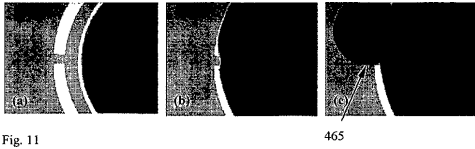


Fig. 11

【図12】

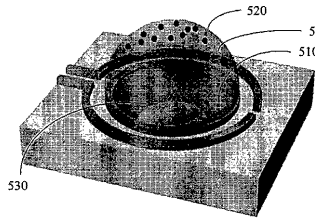


Fig. 12

【図17】

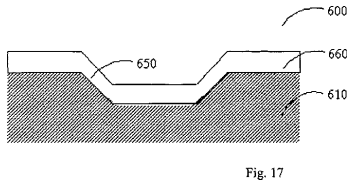


Fig. 17

【図18】

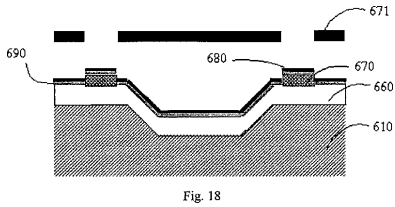


Fig. 18

【図19】

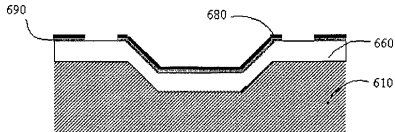


Fig. 19

【図13】

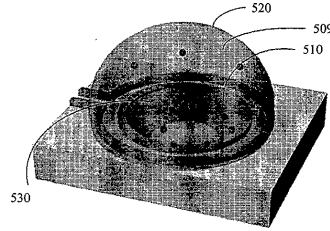


Fig. 13

【図14】

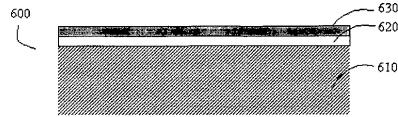


Fig. 14

【図15】

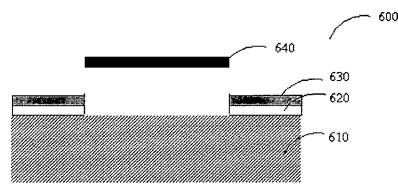


Fig. 15

【図16】

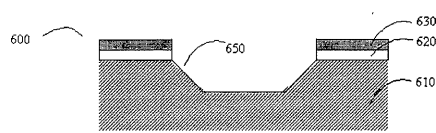
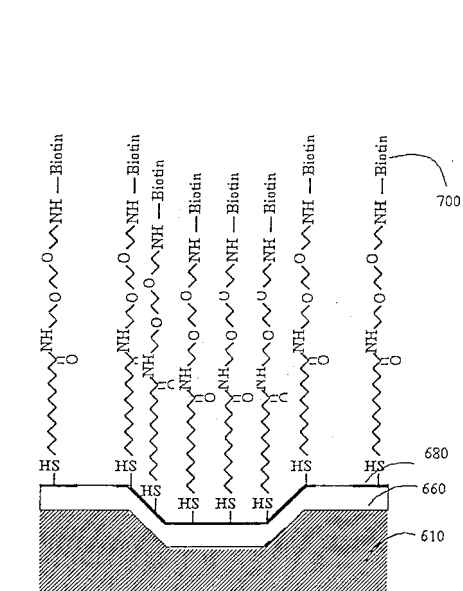
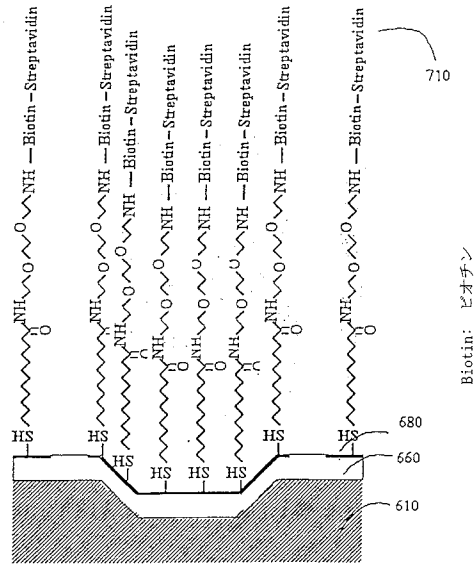


Fig. 16

【図20】



【図 2 1】



【図 2 2】

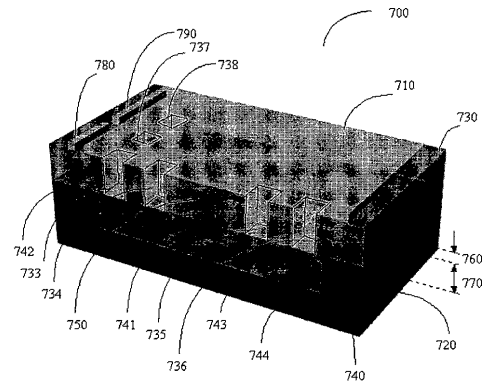


Fig. 22

【図 2 3】

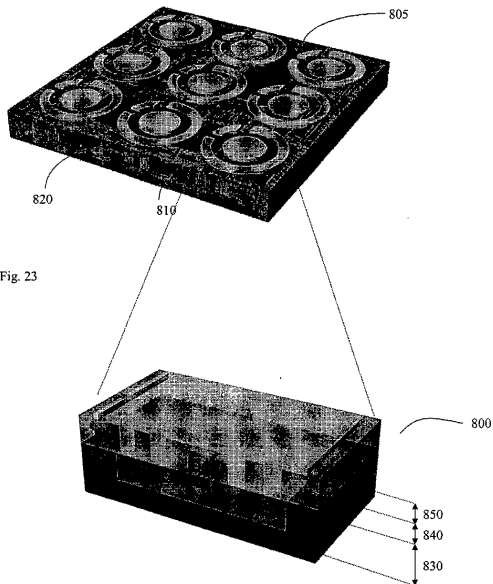


Fig. 23

Fig. 24

【図 2 4】

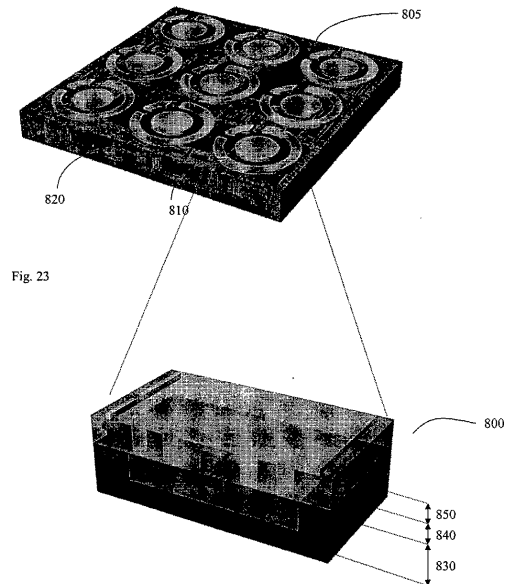


Fig. 23

Fig. 24

【図 2 5】

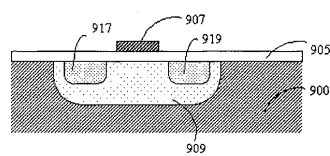


Fig. 25

【図26】

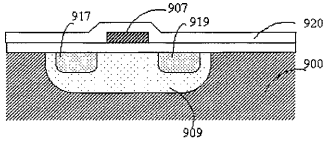


Fig. 26

【図27】

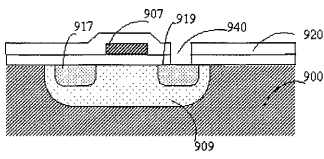


Fig. 27

【図28】

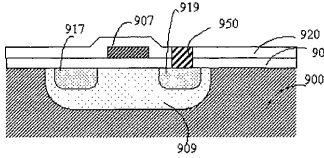


Fig. 28

【図29】

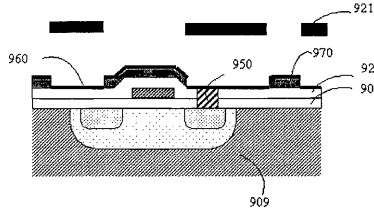


Fig. 29

【図30】

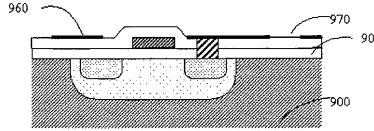


Fig. 30

【図31】

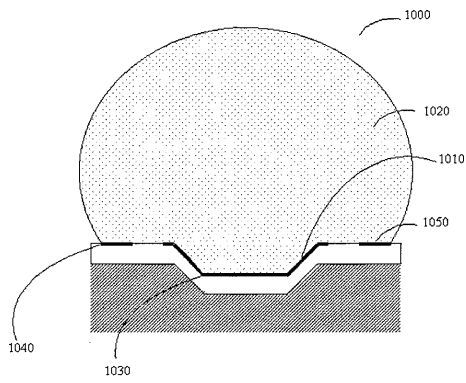
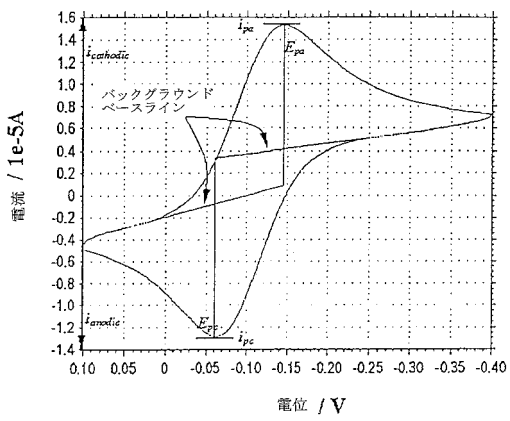


Fig. 31

【図32】



【図34】

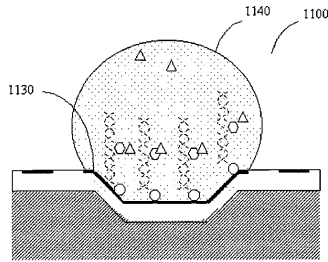


Fig. 34

【図33】

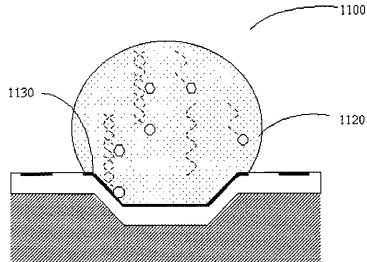


Fig. 33

【図35】

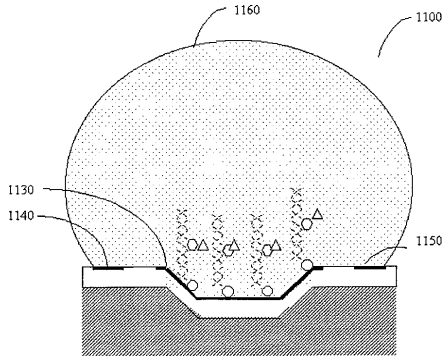


Fig. 35

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
<b>G 0 1 N 33/483 (2006.01)</b>		G 0 1 N 27/30 3 3 1 A
<b>G 0 1 N 37/00 (2006.01)</b>		G 0 1 N 27/30 3 3 1 M
		G 0 1 N 27/30 3 3 1 N
		G 0 1 N 27/46 3 3 6 N
		G 0 1 N 27/46 S
		G 0 1 N 27/48 3 1 1
		G 0 1 N 27/30 B
		G 0 1 N 27/30 3 1 1 Z
		G 0 1 N 33/483 F
		G 0 1 N 37/00 1 0 2

- (56)参考文献 特開平04 - 118554 (JP, A)  
 特開平08 - 233773 (JP, A)  
 特開平11 - 042098 (JP, A)  
 特開平02 - 129541 (JP, A)  
 特開平08 - 327584 (JP, A)  
 特開平08 - 189913 (JP, A)  
 国際公開第99 / 067425 (WO, A1)  
 特表平08 - 505123 (JP, A)  
 特表平11 - 508044 (JP, A)  
 国際公開第00 / 062048 (WO, A1)  
 特開昭64 - 088354 (JP, A)  
 米国特許第04225410 (US, A)  
 A Yasuda, N Yamaga, K Doi, T Fujioka, and S. Kusanagi, A planar electrochemical carbon monoxide sensor, J Electrochem Soc, 米国, 1992年 4月, Vol.139 No.4, 1091-1095

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N27/26 ~ 27/49、33/48 ~ 33/98  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)