

(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2021-32607
(P2021-32607A)

(43) 公開日 令和3年3月1日(2021.3.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/414 (2006.01)	GO 1 N 27/414 3 O 1 V	2 G O 4 5
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483 E	2 G O 6 0
GO 1 N 33/74 (2006.01)	GO 1 N 33/74	
GO 1 N 27/00 (2006.01)	GO 1 N 27/00 J	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 14 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2019-150267 (P2019-150267)</p> <p>(22) 出願日 令和1年8月20日 (2019.8.20)</p> <p>(出願人による申告) 令和1年度、国立研究開発法人科学技術振興機構 研究成果展開事業センター・オブ・イノベーションプログラム『さりげないセンシングと日常人間ドックで実現する自助と共助の社会創生拠点』委託研究開発、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願</p>	<p>(71) 出願人 899000068 学校法人早稲田大学 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地</p> <p>(74) 代理人 110002240 特許業務法人英明国際特許事務所</p> <p>(72) 発明者 逢坂 哲彌 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校法人早稲田大学内</p> <p>(72) 発明者 大橋 啓之 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校法人早稲田大学内</p> <p>(72) 発明者 黒岩 繁樹 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校法人早稲田大学内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 アプタマー固定化半導体センシングデバイス及び非荷電分子の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 F E Tを用いて簡便かつ高感度に非荷電分子を検出することを可能にする半導体センシングデバイス及び非荷電分子の検出方法を提供する。

【解決手段】 半導体上に反応ゲート絶縁部としてシリコン酸化物又は無機酸化物を含む第1の絶縁層が形成された電界効果トランジスタの前記第1の絶縁層の上に、反応性官能基を有する有機単分子膜からなる第1の有機単分子膜を形成し、該第1の有機単分子膜に、あらかじめターゲット分子を結合させたプローブ分子であるアプタマーを、前記反応性官能基を介して直接又は架橋分子を用いて結合させ、その後、該ターゲット分子を該アプタマーから脱離させてなる、アプタマー/有機単分子膜/絶縁層/半導体構造を検出部として備えるアプタマー固定化半導体センシングデバイス。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

半導体上に反応ゲート絶縁部としてシリコン酸化物又は無機酸化物を含む第 1 の絶縁層が形成された電界効果トランジスタの前記第 1 の絶縁層の上に、反応性官能基を有する有機単分子膜からなる第 1 の有機単分子膜を形成し、該第 1 の有機単分子膜に、あらかじめターゲット分子を結合させたプローブ分子であるアプタマーを、前記反応性官能基を介して直接又は架橋分子を用いて結合させ、その後、該ターゲット分子を該アプタマーから脱離させてなる、アプタマー/有機単分子膜/絶縁層/半導体構造を検出部として備えるアプタマー固定化半導体センシングデバイス。

【請求項 2】

前記アプタマーが、DNA アプタマーである請求項 1 記載のアプタマー固定化半導体センシングデバイス。

【請求項 3】

前記半導体上に、更に、参照ゲート絶縁部としてシリコン酸化物又は無機酸化物を含む第 2 の絶縁層が形成され、該第 2 の絶縁層の上に、前記アプタマー及び非荷電分子のいずれとも反応しない有機分子で構成された第 2 の有機単分子膜を形成してなる、有機単分子膜/絶縁層/半導体構造を参照部として備える請求項 1 又は 2 記載のアプタマー固定化半導体センシングデバイス。

【請求項 4】

請求項 1~3 のいずれか 1 項記載のアプタマー固定化半導体センシングデバイス上に固定化されたアプタマーと非荷電分子とを相互作用させる工程と、該相互作用によるゲート電極上の表面電位変化を検出する工程とを含む非荷電分子の検出方法。

【請求項 5】

前記非荷電分子が、ステロイド骨格を有する化合物である請求項 4 記載の非荷電分子の検出方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、アプタマー固定化半導体センシングデバイス及び非荷電分子の検出方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

電界効果トランジスタ(FET)は、生体分子の検出に非常に有望なツールである。FETを用いると、生体分子の吸着に伴うゲート表面の電荷密度変化を電気信号として直接検出するため、ラベルフリー検出が可能であり、低コストで迅速な生体分子の検出が可能である。それゆえ、FETを用いた生体分子の検出に関する研究が広く行われている。

【0003】

FETバイオセンサは、操作が簡便で小型、安価であるため、医療、食品、環境等の様々な分野での応用が期待されている。FETバイオセンサは、電荷検出範囲であるデバイス長内において、受容体に捕捉された生体分子の電荷に起因するゲート電極上の表面電位の変化を測定するデバイスである。そのため、電荷を持たない非荷電分子の検出は困難であった。

【0004】

そこで、プローブ分子として、測定対象である分子(以下、ターゲット分子ともいう。)の捕捉に伴い構造が変化する核酸分子(アプタマー)を利用して、センサ界面近傍の電荷量を変化させることが有効であった(非特許文献1)。これは、アプタマーがターゲット分子の捕捉に伴い構造変化することを利用して、ターゲット分子の結合により生じるデバイス長内の電荷量の変化を測定し、間接的にターゲット分子を検出する方法である。これにより、非荷電分子を検出することが可能となる。しかし、ターゲット分子の滴下時に隣

10

20

30

40

50

接するアプタマーが互いに立体障害を起こすことで、十分な電荷量の変化が起こらず、感度が低下することがあった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】N. Nakatsuka et al., Science, 362, pp. 319-324 (2018)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、前記事情に鑑みなされたもので、FETを用いて簡便かつ高感度に非荷電分子を検出することを可能にする半導体センシングデバイス及び非荷電分子の検出方法を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、前記目的を達成するため鋭意研究を行った結果、アプタマーをプローブ分子とするFETバイオセンサにおいて、ターゲット分子を結合させたアプタマーを固定化し、その後、該ターゲット分子を脱離させることで得られるデバイスを用いることで、該ターゲット分子を高感度に検出することが可能となることを見出し、本発明をなすに至った。

【0008】

20

したがって、本発明は、下記アプタマー固定化半導体センシングデバイス及び非荷電分子の検出方法を提供する。

1. 半導体上に反応ゲート絶縁部としてシリコン酸化物又は無機酸化物を含む第1の絶縁層が形成された電界効果トランジスタの前記第1の絶縁層の上に、反応性官能基を有する有機単分子膜からなる第1の有機単分子膜を形成し、該第1の有機単分子膜に、あらかじめターゲット分子を結合させたプローブ分子であるアプタマーを、前記反応性官能基を介して直接又は架橋分子を用いて結合させ、その後、該ターゲット分子を該アプタマーから脱離させてなる、アプタマー/有機単分子膜/絶縁層/半導体構造を検出部として備えるアプタマー固定化半導体センシングデバイス。

2. 前記アプタマーが、DNAアプタマーである1のアプタマー固定化半導体センシングデバイス。

30

3. 前記半導体上に、更に、参照ゲート絶縁部としてシリコン酸化物又は無機酸化物を含む第2の絶縁層が形成され、該第2の絶縁層の上に、前記アプタマー及び非荷電分子のいずれとも反応しない有機分子で構成された第2の有機単分子膜を形成してなる、有機単分子膜/絶縁層/半導体構造を参照部として備える1又は2のアプタマー固定化半導体センシングデバイス。

4. 1～3のいずれかのアプタマー固定化半導体センシングデバイス上に固定化されたアプタマーと非荷電分子とを相互作用させる工程と、

該相互作用によるゲート電極上の表面電位変化を検出する工程と

を含む非荷電分子の検出方法。

40

5. 前記非荷電分子が、ステロイド骨格を有する化合物である4の非荷電分子の検出方法。

【発明の効果】

【0009】

本発明のデバイスを用いることで、より高感度に非荷電分子を検出することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本発明の半導体センシングデバイスを示す断面図であり、(A)は電界効果トランジスタ、(B)は電界効果トランジスタのゲート電極の絶縁層上に有機単分子膜を形成

50

した状態、(C)は有機単分子膜にプローブ分子が固定化された状態を示す。

【図2】オンチップデバイスのユニット構成例を示し、(A)は部分平面図、(B)はその拡大断面図である。

【図3】本発明の半導体センシングデバイスを用いた非荷電分子検出の概念図である。

【図4】実施例2で測定した電流-電圧曲線である。

【図5】比較例2で測定した電流-電圧曲線である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

【アプタマー固定化半導体センシングデバイス】

本発明のアプタマー固定化半導体センシングデバイスは、半導体上に反応ゲート絶縁部としてシリコン酸化物又は無機酸化物を含む第1の絶縁層が形成された電界効果トランジスタの前記第1の絶縁層の上に、反応性官能基を有する有機単分子膜からなる第1の有機単分子膜を形成し、該第1の有機単分子膜に、あらかじめターゲット分子を結合させたプローブ分子であるアプタマーを、前記反応性官能基を介して直接又は架橋分子を用いて結合させ、その後、該ターゲット分子を該アプタマーから脱離させてなる、アプタマー/有機単分子膜/絶縁層/半導体構造を検出部として備えるものである。

10

【0012】

前記検出部のうち、絶縁層/半導体構造部分は、半導体上に反応ゲート絶縁部としてシリコン酸化物又は無機酸化物を含む絶縁層が形成された電界効果トランジスタを利用することができ、その構成は、従来公知のものを利用することができる。前記絶縁層は、シリコン酸化物であることが好ましい。電界効果トランジスタは、n型でもp型でもよい。この電界効果トランジスタとしては、例えば、図1(A)に示されるものが挙げられる。なお、図1中、1はシリコン基板、2はシリコン酸化物又は無機酸化物(ガラス、アルミナ等)を含む絶縁層、4はゲート電極、5はソース電極、6はドレイン電極、7はドーブ領域を示す。

20

【0013】

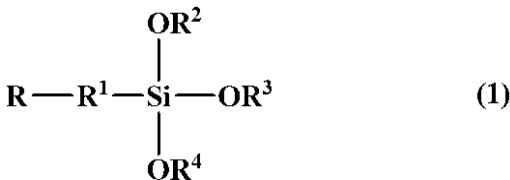
そして、図1(B)に示されるように、絶縁層2上に第1の有機単分子膜3が形成される。ここで、本発明においては、基本原理として、絶縁層表面上のプローブ分子とターゲット分子の結合反応に伴う表面電位変化を電気信号として検出する構成とする。なお、前記絶縁層の厚さは、30~300nm、特に50~150nmが好ましい。

30

【0014】

前記第1の有機単分子膜は、反応性官能基を有する有機単分子膜からなる。前記反応性官能基を有する有機単分子膜は、下記式(1)で表されるアルコキシシランの単分子膜であることが好ましい。

【化1】



40

【0015】

式(1)中、Rは、アミノ基、アミノオキシ基、カルボキシ基又はチオール基である。

【0016】

式(1)中、R¹は、炭素数3~22の直鎖状アルカンジイル基である。前記直鎖状アルカンジイル基は、炭素数が3~18であるものが好ましく、炭素数が3~8であるものがより好ましい。炭素鎖が短い方が、有機単分子膜の有する疎水性が弱くなり、ターゲット分子の疎水性相互作用に起因する非特異的吸着を抑制することができるため好ましい。

【0017】

R¹で表される直鎖状アルカンジイル基の具体例としては、プロパン-1,3-ジイル基、ブタン-1,4-ジイル基、ペンタン-1,5-ジイル基、ヘキサン-1,6-ジイル基

50

、ヘプタン - 1, 7 - ジイル基、オクタン - 1, 8 - ジイル基、ノナン - 1, 9 - ジイル基、デカン - 1, 10 - ジイル基、ウンデカン - 1, 11 - ジイル基、ドデカン - 1, 12 - ジイル基、トリデカン - 1, 13 - ジイル基、テトラデカン - 1, 14 - ジイル基、ペンタデカン - 1, 15 - ジイル基、ヘキサデカン - 1, 16 - ジイル基、ヘプタデカン - 1, 17 - ジイル基、オクタデカン - 1, 18 - ジイル基、ノナデカン - 1, 19 - ジイル基、エイコサン - 1, 20 - ジイル基、ヘンエイコサン - 1, 21 - ジイル基、ドコサン - 1, 22 - ジイル基が挙げられる。これらのうち、炭素数 3 ~ 18 のものが好ましく、炭素数 3 ~ 8 のものがより好ましい。

【0018】

式(1)中、 $R^2 \sim R^4$ は、それぞれ独立に、炭素数 1 ~ 5 の直鎖状若しくは分岐状のアルキル基又は炭素数 2 ~ 5 の直鎖状若しくは分岐状のアルコキシアルキル基である。前記アルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基等が挙げられる。これらのうち、メチル基又はエチル基が好ましい。また、前記アルコキシアルキル基としては、メトキシメチル基、エトキシメチル基、2-メトキシエチル基、2-エトキシエチル基等が挙げられる。これらのうち、炭素数 2 ~ 3 のアルコキシアルキル基が好ましい。 $R^2 \sim R^4$ としては、特にメチル基、エチル基、2-メトキシエチル基等が好ましい。

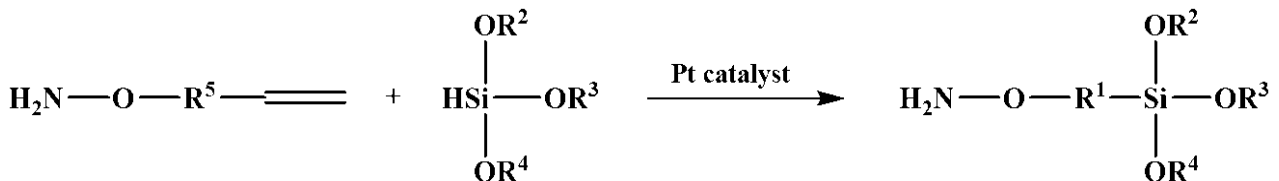
10

【0019】

前記Rがアミノ基、カルボキシ基又はチオール基であるアルコキシシランとしては、市販品を使用し得る。また、前記Rがアミノオキシ基であるアルコキシシランは、下記スキームにしたがって合成できる。

20

【化2】



(式中、 $R^1 \sim R^4$ は、前記と同じ。 R^5 は、 R^1 から炭素数が2減少した直鎖状アルカンジイル基である。)

【0020】

前記Rがアミノオキシ基であるアルコキシシランは、トリアルコキシヒドロシランとO-アルケニルヒドロキシアミンとを白金系触媒で処理することによって調製することができる。例えば、窒素雰囲気下、トリアルコキシヒドロシランとO-アルケニルヒドロキシアミンとの混合物に、ヘキサクロロ白金(IV)酸等の白金系触媒を加え、10 ~ 200 で1 ~ 1,200時間、より好ましくは60 ~ 120 で12 ~ 48時間反応させることにより調製できる。成膜操作には、過剰のトリアルコキシヒドロシランを例えば蒸留等の操作により除去したものを使用することが好ましい。

30

【0021】

第1の有機単分子膜は、前記アルコキシシランを気相化学反応又は液相反応によって絶縁層上に形成し、その最適化、例えば、有機分子の自己集積化機能によって単分子が最密パッキングされた膜が形成される。気相化学反応によって単分子膜を成膜する場合は、例えば、容器に基板及びアルコキシシランを封入し、ドライルーム中で好ましくは80 ~ 200 で1 ~ 24時間、より好ましくは100 ~ 130 で2 ~ 5時間反応させることで成膜できる。液相反応によって単分子膜を成膜する場合は、例えば、アルコキシシランを含む有機溶媒中に基板を浸漬し、好ましくは20 ~ 80 で1分間 ~ 24時間、より好ましくは55 ~ 65 で5 ~ 20分間静置することで成膜できる。

40

【0022】

前記有機溶媒としては、トルエン、メタノール、エタノール等が挙げられ、特にトルエン、メタノール等が好ましい。

【0023】

50

前記電界効果トランジスタの半導体上には、更に、参照ゲート絶縁部としてシリコン酸化物又は無機酸化物を含む第2の絶縁層を形成することができる。この第2の絶縁層の上には、第2の有機単分子膜として、プローブ分子であるアプタマー及びターゲット分子である非荷電分子のいずれとも反応しない有機分子で構成された単分子膜を形成し、この単分子膜/絶縁層/半導体構造を参照部とすることができる。なお、反応ゲート絶縁部と参照ゲート絶縁部とを、電位変化測定において互いに影響を与えない程度に離間させれば、反応ゲート絶縁部の第1の絶縁層と参照ゲート絶縁部の第2の絶縁層とを同一層内に設けることもできる。

【0024】

図2は、有機単分子膜/絶縁層/半導体構造を検出部9及び参照部8に適用したオンチップデバイスのユニット構成例を示す。なお、図2中、1はシリコン基板、2は絶縁層、10はテンプレート部である。このデバイスのユニット構成は図示した構成に限定されず、検出部と参照部とは必ずしも1対1の関係で配置する必要はなく、必要に応じて検出部及び参照部の数及び組合せを適宜変更して配置することができる。また、検出部及び参照部は各々数～数十μmのサイズで形成可能である。

10

【0025】

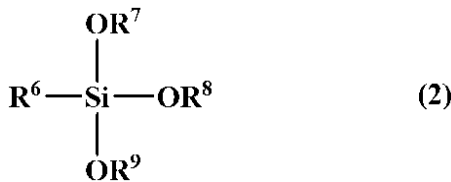
前記第2の有機単分子膜としては、フッ素化されていてもよい炭素数8～22の直鎖状アルキル基を有するアルコキシシランの単分子膜が好ましい。なお、有機単分子膜としてアルコキシシランの単分子膜を用いる場合、前記第2の絶縁層はシリコン酸化物で形成されたものが好ましい。

20

【0026】

第2の有機単分子膜は、絶縁層上に均一な膜を形成させるため、自己集積化膜であることが好ましい。具体的には、下記式(2)で表されるトリアルコキシシランの単分子膜であることが好ましい。

【化3】



30

【0027】

式(2)中、R⁶は、炭素数8～22、好ましくは炭素数10～18の直鎖状アルキル基であり、水素原子の一部又は全部がフッ素原子で置換されていてもよい。前記直鎖状アルキル基は、炭素数が10～18であるものが好ましい。前記直鎖状アルキル基として具体的には、n-オクチル基、n-ノニル基、n-デシル基、n-ウンデシル基、n-ドデシル基、n-トリデシル基、n-テトラデシル基、n-ペンタデシル基、n-ヘキサデシル基、n-ヘプタデシル基、n-オクタデシル基、n-ノナデシル基、n-エイコシル基、n-ヘンエイコシル基、n-ドコシル基等が挙げられる。

【0028】

式(2)中、R⁷～R⁹は、それぞれ独立に、炭素数1～5の直鎖状若しくは分岐状のアルキル基又は炭素数2～5の直鎖状若しくは分岐状のアルコシアルキル基である。前記アルキル基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基等が挙げられる。これらのうち、メチル基又はエチル基が好ましい。また、前記アルコシアルキル基としては、メトキシメチル基、エトキシメチル基、2-メトキシエチル基、2-エトキシエチル基等が挙げられる。これらのうち、炭素数2～3のアルコシアルキル基が好ましい。

40

【0029】

式(2)で表されるトリアルコキシシランとして具体的には、CH₃(CH₂)₇Si(OCH₃)₃、CH₃(CH₂)₇Si(OC₂H₅)₃、CH₃(CH₂)₈Si(OCH₃)₃、CH₃(CH₂)₈Si(OC₂H₅)₃、CH₃(CH₂)₉Si(OCH₃)₃、CH₃(CH₂)₉Si(OC₂H₅)₃、CH₃(CH₂)₁₀Si(OCH₃)₃、CH₃(CH₂)₁₀Si(OC₂H₅)₃、CH₃(CH₂)₁₁Si(OCH

50

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{19}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{19}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_6(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_6(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_8(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_8(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_9(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_9(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{10}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{10}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{11}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{11}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{12}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{12}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{13}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{13}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{14}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{14}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{15}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{15}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{16}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{16}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{17}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{17}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{18}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{18}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{19}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{19}(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0030】

なお、第1及び第2の有機単分子膜は、パターンングにより所望の位置に形成することができる。特に、オンチップでの集積化デバイスを形成するためには、有機単分子膜のパターンングが有効である。例えば、検出部の絶縁層表面には、プローブ分子固定化のために反応性官能基を有する有機分子で構成された第1の単分子膜を、一方で、参照部、更には非ゲート部（テンプレート部）においては、ターゲット分子の非特異的な吸着を避けるために、プローブ分子及びターゲット分子のいずれとも反応しない有機分子で構成された第2の有機単分子膜を、パターンングにより位置選択的に形成する。

【0031】

参照部としては、第2の有機単分子膜として第1の有機単分子膜と同様の単分子膜に、ターゲット分子と相互作用しない化合物を固定化したものを利用することも可能である。すなわち、ターゲット分子と相互作用しない化合物/有機単分子膜/絶縁層/半導体構造を参照部とすることもできる。この場合、参照部は、前述した検出部における有機単分子膜形成方法及び後述する化合物固定化方法と同じ方法にしたがって形成することができる。

【0032】

前記半導体センシングデバイスには、前記検出部の第1の有機単分子膜にプローブ分子であるアプタマーが固定化される。例えば、図1(C)に示されるように、第1の有機単分子膜3にアプタマー11が結合される。

【0033】

本発明において、前記アプタマー固定化半導体センシングデバイスに固定化するアプタマーは、検出する対象にあわせて適宜選択すればよい。すなわち、目的とする非荷電分子と結合するアプタマーを選択すればよい。

【0034】

本発明で用いるアプタマーとしては、核酸アプタマーが好ましい。核酸アプタマーは、ヌクレオチド残基を含む分子であり、ヌクレオチド残基のみからなる分子でもよく、ヌクレオチド残基を含む分子でもよい。前記ヌクレオチドとしては、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド及びこれらの誘導体が挙げられる。前記アプタマーとしては、デオキシリボヌクレオチド及び/又はその誘導体を含むもの(DNAアプタマー)でもよく、リボヌクレオチド及び/又はその誘導体を含むもの(RNAアプタマー)でもよく、これらの両方を含むもの(DNA/RNAアプタマー)でもよい。前記アプタマーとしては、DNAアプタマーが好ましい。また、前記アプタマーは、一本鎖アプタマーでも二本鎖アプタマーでもよい。

【0035】

前記ヌクレオチドは、塩基として、天然塩基（非人工塩基）及び非天然塩基（人工塩基）のいずれを含んでもよい。前記天然塩基としては、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシル及びこれらの修飾塩基が挙げられる。前記修飾としては、例えば、メチル化、フルオロ化、アミノ化、チオ化等が挙げられる。前記非天然塩基としては、例えば、2'-フルオロピリミジン、2'-O-メチルピリミジン等が挙げられ、具体的には、2'-フルオロウラシル、2'-アミノウラシル、2'-O-メチルウラシル、2'-チオウラシル等が挙げられる。

【0036】

前記ヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチドでもよい。前記修飾ヌクレオチドとしては、2'-メチル化ウラシルヌクレオチド、2'-メチル化シトシンヌクレオチド、2'-フルオロ化ウラシルヌクレオチド、2'-フルオロ化-シトシンヌクレオチド、2'-アミノ化-ウラシルヌクレオチド、2'-アミノ化-シトシンヌクレオチド、2'-チオ化-ウラシルヌクレオチド、2'-チオ化-シトシンヌクレオチド等が挙げられる。前記アプタマーは、PNA（ペプチド核酸）、LNA（Locked Nucleic Acid）等の非ヌクレオチドを含んでもよい。

10

【0037】

前記アプタマーの塩基数は、特に限定されないが、通常25～200程度であり、好ましくは35～120程度であり、より好ましくは40～80程度である。

【0038】

前記アプタマーを前記有機単分子膜に固定化する前に、あらかじめターゲット分子と結合させてターゲット-アプタマー複合体を形成する。前記複合体の形成方法としては、アプタマーにターゲット分子を結合させる際に用いる溶液にアプタマー及びターゲット分子を加える方法が挙げられる。前記溶液としては、ターゲット分子の検出に用いられている一般的な溶液を用いることができるが、特に生理的条件を満たすものが好ましい。例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、MES緩衝生理食塩水、MOPS緩衝生理食塩水、PIPES緩衝生理食塩水、HEPES緩衝生理食塩水等が好ましく使用できる。また、前記各種生理食塩水のナトリウムイオンをカリウムイオンに置き換えたものも好適に使用できる。なお、前記溶液のpHは、5～10が好ましく、6～8がより好ましい。

20

30

【0039】

また、前記溶液に、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等のイオン、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、グリコールエーテルジアミン四酢酸（EGTA）等のキレート剤、Tween（登録商標）20、Triton（登録商標）X-100、Nonidet（登録商標）P-40等の界面活性剤等を加えてもよい。前記イオンを加える場合、その濃度は、0.1～10mMが好ましく、0.5～5mMがより好ましい。前記キレート剤を加える場合、その濃度は、0.1～10mMが好ましく、0.5～5mMがより好ましい。界面活性剤を加える場合、その濃度は、0.001～10体積%が好ましく、0.05～5体積%がより好ましい。

【0040】

アプタマーの添加量は、前記溶液中の濃度が0.01～10 μ Mとなる量が好ましく、0.01～0.1 μ Mがより好ましい。また、ターゲット分子の添加量は、アプタマーに対し、モル比で、0.001～1mMとなる量が好ましく、0.01～0.1mMがより好ましい。

40

【0041】

前記複合体を形成させるときの温度は、0～40℃が好ましく、10～30℃がより好ましく、室温（20～25℃）が更に好ましい。反応時間は、30秒間～2時間が好ましく、1分～1時間がより好ましく、5～30分間が更に好ましい。

【0042】

前記アプタマーは、直接又は架橋分子を介して前記有機単分子膜に固定化される。架橋分子としては、グルタルアルデヒド等が挙げられる。この場合、前記有機単分子膜をグル

50

タルアルデヒドで修飾する方法は、特に限定されないが、例えば0.01~25質量%のグルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で、10~50 で1分~24時間反応させればよい。

【0043】

次に、ターゲット-アプタマー複合体のアプタマー中の反応性官能基をグルタルアルデヒドと反応させることでターゲット-アプタマー複合体を固定化する。具体的には、例えば、前記複合体を含む溶液(溶媒は超純水又はPBS)中で、好ましくは10~50 で1分~24時間、より好ましくは10~35 で1分~60分間反応させればよい。前記複合体の濃度は、0.01~10 μ Mが好ましく、0.01~0.1 μ Mがより好ましい。

【0044】

最後に、前記ターゲット-アプタマー複合体からターゲット分子を脱離させることで、アプタマー固定化半導体センシングデバイスが得られる。前記脱離方法としては、尿素水溶液に浸漬する方法、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウム水溶液に浸漬する方法、界面活性剤を含む水溶液に浸漬する方法等が挙げられる。尿素水溶液に浸漬する場合は、例えば、5~10M尿素水溶液に20~30 で5~60分間浸漬すればよい。

【0045】

[非荷電分子の検出方法]

本発明の非荷電分子の検出方法は、前記アプタマー固定化半導体センシングデバイス上に固定化されたアプタマーと非荷電分子とを相互作用させる工程と、該相互作用によるゲート電極上の表面電位変化を検出する工程とを含む。

【0046】

図3に、本発明のアプタマー固定化半導体センシングデバイスを用いたアプタマー-非荷電分子相互作用に基づく非荷電分子の検出方法の概念図を示す。この検出方法では、有機単分子膜上に直接固定化されたアプタマーに対し、非荷電分子を相互作用させ、この相互作用により生じる絶縁層の表面電位変化を電気信号として検出する。なお、図3中、12は非荷電分子である。また、他の構成は、図1と同一の参照符号を付して、その説明を省略する。

【0047】

アプタマーはリン酸基を有しているため、デバイス上に固定化されたアプタマーと非荷電分子とが相互作用した場合、ターゲット分子の捕捉に伴いアプタマーの構造が変化することでデバイ長内の電荷量に変化し、ゲート電極上の表面電位がシフトする。この場合、電流一定下においては電位シフトを、電圧一定下においては電流のシフトをシグナルとして検出することができる。なお、n型の電界効果トランジスタを用いた場合もp型の電界効果トランジスタを用いた場合も、閾値電圧のシフトは同様の挙動を示す。

【0048】

デバイス上に固定化されたアプタマーと非荷電分子とを相互作用させるには、該非荷電分子を含む溶液を、必要に応じて希釈して、ゲート電極上に載せればよい。このとき、前記溶液としては、非荷電分子の検出に用いられている一般的な溶液を用いることができるが、特に生理的条件を満たすものが好ましい。例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、MES緩衝生理食塩水、MOPS緩衝生理食塩水、PIPES緩衝生理食塩水、HEPES緩衝生理食塩水等が好ましく使用できる。また、前記各種生理食塩水のナトリウムイオンをカリウムイオンに置き換えたものも好適に使用できる。なお、前記溶液のpHは、5~10が好ましく、6~8がより好ましい。

【0049】

また、前記溶液に、Ca²⁺、Mg²⁺等のイオン、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、グリコールエーテルジアミン四酢酸(EGTA)等のキレート剤、Tween(登録商標)20、Triton(登録商標)X-100、Nonidet(登録商標)P-40等の界面活性剤等を加えてもよい。前記イオンを加える場合、その濃度は、0.1~10mMが好ましく、0.5~5mMがより好ましい。前記キレート剤を加える場合、その濃度は、0.1~10mMが好ましく、0.5~5mMがより好ましい。界面活性剤を加える場合、その濃度は、0.001~

10

20

30

40

50

10体積%が好ましく、0.05~5体積%がより好ましい。

【0050】

デバイス上に固定化されたアプタマーと非荷電分子とを相互作用させるときの温度は、0~40が好ましく、10~30がより好ましく、室温(20~25)が更に好ましい。反応時間は、30秒間~2時間が好ましく、1分~1時間がより好ましく、5~30分間が更に好ましい。

【0051】

本発明において検出の対象となる非荷電分子は、アプタマーと相互作用する性質を有するものであれば特に限定されない。例えば、ステロイド骨格を有する化合物、ペプチド、アミノ酸誘導体、芳香族化合物、糖等が挙げられる。

10

【0052】

前記ステロイド骨格を有する化合物としては、コルチゾール、コレステロール、プロゲステロン、11-デオネシコルチコステロン、コルチコステロン、アルドステロン、コルチゾン、デヒドロエピアンドロステロン、デヒドロエピアンドロステロンサルフェート、ジヒドロテストステロン、アンドロステロン、エピアンドロステロン、テストステロン、17-エストラジオール、エストロン、エストリオール等が挙げられる。

【0053】

前記ペプチドとしては、カルシトニン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、バソプレッシン、副腎皮質刺激ホルモン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン、オキシトシン、グルカゴン、セクレチン等が挙げられる。

20

【0054】

前記アミノ酸誘導体としては、メラトニン、甲状腺ホルモン、カテコールアミン等が挙げられる。

【0055】

前記芳香族化合物としては、トルエン、エチルベンゼン、クメン、ベンジルアルコール、アニソール、ベンズアルデヒド、アセトフェノン、ニトロベンゼン、チオフェノール、ベンゾニトリル、スチレン、キシレン、ピフェニル、ベンゾフェノン、トリフェニルメタン、ナフタレン、アントラセン、テトラセン、ペンタセン、フェナントレン、クリセン、トリフェニレン、テトラフェン、ピレン、ピセン、ペンタフェン、ペリレン、ヘリセン、コロネン等が挙げられる。

30

【0056】

前記糖としては、グルコース、アロース、タロース、グロース、アルトロース、マンノース、ガラクトース、イドース、セドヘプツロース、コリオース、プシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース、リボース、リキソース、キシロース、アラビノース、アピオース、リブロース、キシルロース、エリトロース、トレオース、エリトルロース、グリセルアルデヒド等の単糖、これらの単糖からなるオリゴ糖又は多糖が挙げられる。

【0057】

検出可能な非荷電分子の濃度はその種類によって異なるが、通常10nM~10mM程度であり、100nM~1mM程度が好ましい。

【0058】

本発明のデバイスは、非荷電分子を高感度に検出することが可能である。また、生理的条件下における非荷電分子の検出が可能となる。本発明のデバイスは、生体試料中のバイオマーカー検出等に好適に使用できる。

40

【実施例】

【0059】

以下、実施例及び比較例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されない。なお、実施例で使用したアプタマーは、NECソリューションイノベータ(株)より提供されたものである。

【0060】

[1] 半導体センシングデバイスの構築

50

[実施例 1] アプタマー固定化半導体センシングデバイスの構築 1

(1) 有機単分子膜の形成

凸版印刷(株)製の $10\mu\text{m}$ 長、 $1,000\mu\text{m}$ 幅のn型FETからアセトンを用いて超音波処理することでフォトレジストを除去した。ゲート表面にヒドロキシ基を導入して活性部位を作製するため、プラズマリアクターPR301(ヤマト科学(株)製)を用いて、 200W の O_2 プラズマに1分間暴露した。

アミノプロピルトリエトキシシラン(APS、Sigma-Aldrich社製)を1質量%含むトルエン中にデバイスを浸漬し、アルゴン雰囲気下、 60°C で7分間静置することで、ゲート上へ単分子膜を成膜した。単分子膜を形成したFETをメタノール/トルエン混合溶媒(質量比1:1)を用いて超音波洗浄し、エタノールでリンスし、ゲート表面にAPSの単分子膜が形成されたFETを作製した。

【0061】

(2) アプタマーの固定

前記単分子膜のアミノ基とアプタマーとを架橋するための架橋分子として、グルタルアルデヒドを反応させた。反応は、2.5質量%のグルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝生理食塩水(137mM NaCl 、 2.7mM KCl 、 $8.1\text{mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $1.5\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{pH}7.4$ 、以下 $1\times\text{PBS}$ ともいう。) $10\mu\text{L}$ を前記単分子膜が形成されたデバイスの検出部に滴下し、室温で30分間静置することにより行った。

【0062】

次に、 $1\times\text{PBS}$ のナトリウムイオンを全てカリウムイオンに置き換えた緩衝液(140mM KCl 、 $8.1\text{mM K}_2\text{HPO}_4$ 、 $1.5\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ 、以下、 $1\times\text{PBSSK}$ ともいう。)に、アプタマー及びコルチゾールがそれぞれ 100nM 及び $50\mu\text{M}$ になるように添加し、室温で60分間静置し、コルチゾール-アプタマー複合体(C-A複合体)を形成させた。

【0063】

グルタルアルデヒドによって架橋を行ったゲート電極部を、前記C-A複合体を含む $1\times\text{PBSSK}$ に1時間浸漬し、C-A複合体を有機単分子膜上に固定化した。C-A複合体を固定化したデバイスを、 8M 尿素水溶液に浸漬し、室温で1時間静置することでC-A複合体からコルチゾールを脱離し、アプタマー固定化デバイス1を構築した。

【0064】

[比較例 1] アプタマー固定化半導体センシングデバイスの構築 2

C-A複合体を含む $1\times\text{PBSSK}$ のかわりに、 100nM のアプタマーを含む $1\times\text{PBS}$ を用いた以外は、実施例1と同様の方法で、アプタマー固定化デバイス2を構築した。

【0065】

[2] 非荷電分子の検出

[実施例 2]

デバイス1を洗浄後、ホルダーに設置し、デバイスの検出部を $0.04\times\text{PBSSK}0.5\text{mL}$ に3分間浸漬した。浸漬後、室温で、アプタマー固定化デバイスの電流-電圧曲線を、 Ag/AgCl 参照電極を用い、デジタルソースメータ(ケースレー社製、2612)で測定した。測定条件は、ゲート電圧(V_g)を $-3.0\sim 0.5\text{V}$ 、ドレイン電圧(V_d)を 0.1V とした。続けて 1mM コルチゾールを含む $1\times\text{PBS}20\mu\text{L}$ をアプタマー固定化デバイスのゲート表面上に添加し、30分間静置した後、 $1\times\text{PBS}3\text{mL}$ 及び $0.04\times\text{PBSSK}3\text{mL}$ を用いてリンスを行った。その後、ゲート表面上に $0.04\times\text{PBSSK}$ を 0.5mL 添加して3分間静置した後、コルチゾール吸着デバイスの電流-電圧曲線を測定し、コルチゾール添加前後でのゲート電圧シフト V_g を評価した。結果を図4に示す。

【0066】

[比較例 2]

デバイス1のかわりにデバイス2を用いた以外は、実施例2と同様の方法でコルチゾー

10

20

30

40

50

ル吸着デバイスの電流 - 電圧曲線を測定し、コルチゾール添加前後でのゲート電圧シフト V_g を評価した。結果を図 5 に示す。

【 0 0 6 7 】

図 4 及び 5 中、点線はコルチゾール添加前のデバイス特性を表し、実線はコルチゾール添加後のデバイス特性を表す。アプタマー固定化デバイス 1 にコルチゾールを添加した場合、電流 - 電圧曲線が正方向に大きくシフトした。C - A 複合体を形成させてからアプタマーを固定化したデバイスを用いた方が、C - A 複合体を形成させずにアプタマーを固定化したデバイスを用いた場合に比べて、検出感度の点で有利であることが示された。

【 符号の説明 】

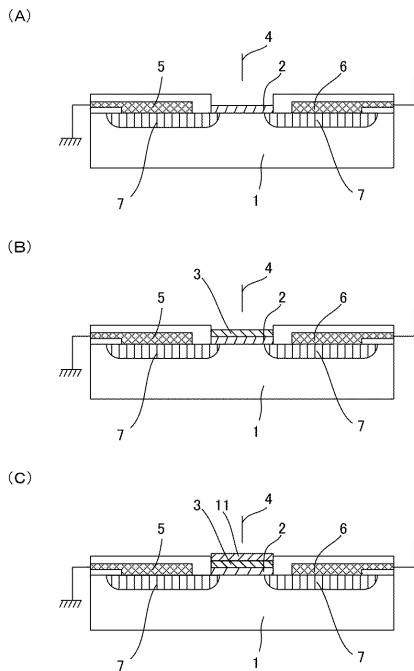
【 0 0 6 8 】

- 1 シリコン基板
- 2 絶縁層
- 3 第 1 の有機単分子膜
- 4 ゲート電極
- 5 ソース電極
- 6 ドレイン電極
- 7 ドープ領域
- 8 参照部
- 9 検出部
- 10 テンプレート部
- 11 アプタマー（プローブ分子）
- 12 非荷電分子

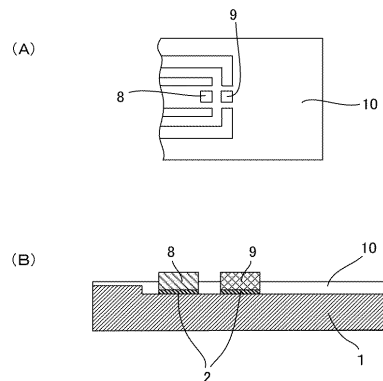
10

20

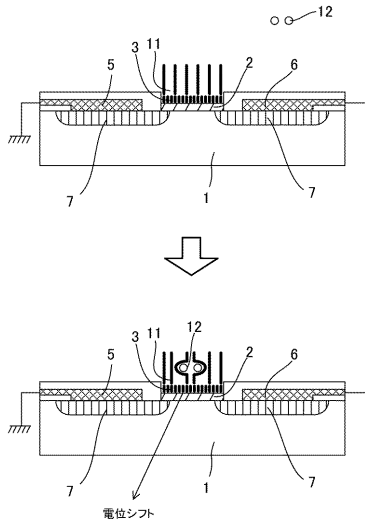
【 図 1 】



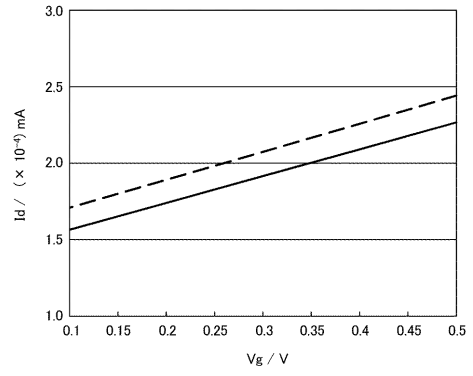
【 図 2 】



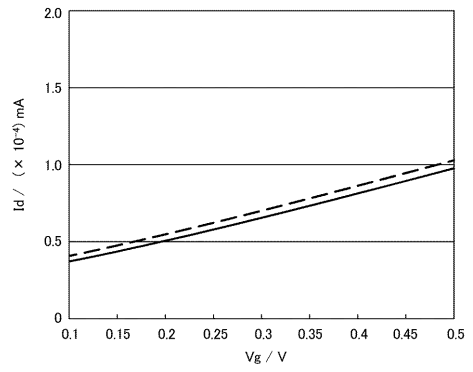
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(72)発明者 林 宏樹

東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校法人早稲田大学内

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA18 DA54 DA56 DA69 FA34 GC17

2G060 AA15 AA19 AD06 DA15 KA09