

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6388605号
(P6388605)

(45) 発行日 平成30年9月12日 (2018. 9. 12)

(24) 登録日 平成30年8月24日 (2018. 8. 24)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 M 1/00 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018. 01)

C 1 2 N 15/10 (2006. 01)

G O 1 N 27/62 (2006. 01)

G O 1 N 37/00 (2006. 01)

C 1 2 M 1/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 N 15/10 1 1 O Z

G O 1 N 27/62 1 O 1

G O 1 N 37/00 1 O 1

請求項の数 14 (全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-557162 (P2015-557162)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月10日 (2014. 2. 10)
 (65) 公表番号 特表2016-510218 (P2016-510218A)
 (43) 公表日 平成28年4月7日 (2016. 4. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/015574
 (87) 国際公開番号 WO2014/124365
 (87) 国際公開日 平成26年8月14日 (2014. 8. 14)
 審査請求日 平成29年1月26日 (2017. 1. 26)
 (31) 優先権主張番号 61/762, 671
 (32) 優先日 平成25年2月8日 (2013. 2. 8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 513249770
 コーネル ユニバーシティー
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 イサカ
 パイン ツリー ロード 395 スウ
 イート 310 シーシーティーイーシー
 (73) 特許権者 515218691
 ボード オブ スーパーバイザーズ オブ
 ルイジアナ ステイト ユニバーシティー
 アンド アグリカルチュラル アンド
 メカニカル カレッジ
 アメリカ合衆国 ルイジアナ州 バトン
 ルージュ イースト パーカー プールバ
 ード 340 エルイーティーシー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子処理プラットフォーム及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体分子プロセッサを含む装置であって、各生体分子プロセッサが、
 固体基板によって画定される 1 つ以上のバイオリアクターチャンバー；
 各バイオリアクターチャンバー内にありかつ前記固体基板に取り付けられた支持構造体

；
 前記支持構造体に固定化された切断酵素であって、前記切断酵素と機能的に結合したバイオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断するように前記バイオリアクターチャンバー内に機能的に配置された、切断酵素；並びに

前記固体基板内に形成されかつ前記 1 つ以上のバイオリアクターチャンバーに流体的に
 連結された 1 つ以上の飛行時間型チャンネルであって、前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネル
 のそれぞれが入力端及び出力端を有し、前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルのそれぞれが、
 少なくとも (i) 前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルの入力端の近位にある、前記 1 つ
 以上の飛行時間型チャンネルに接触する第 1 のセンサーと (i i) 前記 1 つ以上の飛行時間
 型チャンネルの出力端の近位にある、前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルに接触する第 2 の
 センサーとを含む 2 つ以上のセンサーを含む、 1 つ以上の飛行時間型チャンネル
 を含む、装置。

【請求項 2】

前記 1 つ以上のバイオリアクターチャンバー内及び前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネル
 の長さ方向に電場を生成するように機能的に配置された電場発生器をさらに含む、請求項

10

20

1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルが、幅 50 nm 以下でありかつ深さ 50 nm 以下である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 4】

前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルが、長さ 5 μm ~ 250 μm である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 5】

前記 1 つ以上のバイオリアクターチャンバーが、幅 100 ~ 1000 nm である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 6】

前記 1 つ以上のバイオリアクターチャンバー内の前記支持構造体が、幅 50 ~ 900 nm である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 7】

前記固体基板がポリマー材料で作られている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 8】

前記切断酵素がエキソヌクレアーゼ又はエキソリボヌクレアーゼである、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 9】

前記 2 つ以上のセンサーがそれぞれ、貴金属ナノワイヤ、セグメント化されたナノワイヤ、又はナノ粒子から成る、1 対の検出電極を含む、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 10】

前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルが 3 つ以上のセンサーを含む、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 11】

前記生体分子プロセッサが、前記固体基板の壁によって画定されるフィーダーチャンネルをさらに含み、前記フィーダーチャンネルが、前記固体基板の表面の近位にある入力端から前記 1 つ以上のバイオリアクターチャンバーの近位にある出力端まで延在する長さを有する、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 12】

前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルが、電荷中性の親水性壁表面、荷電した親水性壁表面、又は電荷中性の疎水性壁表面を含む、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 13】

10,000 個以上の生体分子プロセッサを含む、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 14】

以下の工程を含む、核酸分子の配列決定の方法：

請求項 1 に記載の装置を提供する工程；

前記装置の前記生体分子プロセッサに、1 つ以上の核酸分子を含む試料を、前記バイオリアクターチャンバー内の前記固定化された切断酵素が前記試料中の前記 1 つ以上の核酸分子に結合して前記 1 つ以上の核酸分子を前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルの前記入力端に 1 つずつ入る単量体ヌクレオチドへと切断するのに有効な条件下で供給する工程；

切断された前記単量体ヌクレオチドを前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルを通して輸送するために、前記 1 つ以上のバイオリアクターチャンバーを横切って及び前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルの長さ方向に電場を印加する工程；

前記印加する工程に基づいて、切断された前記単量体ヌクレオチドを、それらが前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルにおける少なくとも第 1 及び第 2 のセンサーを通過する際に検出する工程；

前記検出する工程に基づいて、切断された各単量体ヌクレオチドが前記 1 つ以上の飛行時間型チャンネルにおける少なくとも第 1 及び第 2 のセンサーを通過するのにどれくらい時間がかかるかを測定する工程；並びに

10

20

30

40

50

前記測定する工程に基づいて前記単量体ヌクレオチドを同定する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2013年2月8日に出願された米国仮特許出願、出願番号61/762, 671の利益を主張し、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる。

【0002】

本発明は、国立衛生研究所によって与えられた助成金番号NIH-R21-HG006278-01、及び全米科学財団によって与えられたNSF-EPS-0346411及びNSF-EPS-0701491のもとで政府の援助によって行われた。政府はこの発明にある特定の権利を有する。

10

【0003】

発明の分野

本発明は核酸の配列決定及びタンパク質/ポリペプチドの同定に好適な装置及び方法に関する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

1,000ドルゲノムの恩恵は文献で十分に立証されている(Kaiser, J., "DNA Sequencing - A Plan to Capture Human Diversity in 1000 Genomes," Science 319:395-395 (2008) (非特許文献1); Kuehn, B.M., "1000 Genomes Project Promises Closer Look at Variation in Human Genome," JAMA 300:2715-2715 (2008) (非特許文献2); Mardis, E., "Anticipating the \$1,000 Genome," Genome Biol. 7:112 (2006) (非特許文献3); Metzker, M.L., "Emerging Technologies in DNA Sequencing," Genome Res. 15:1767-1776 (2005) (非特許文献4); Schloss, J., "How to Get Genomes at One Ten-Thousandth the Cost," Nature Biotechnol. 26:1113-1115 (2008) (非特許文献5))。重要な帰結のいくつかには、(i)ゲノム全体にわたる配列変異の評価を通じて、さらに効果的な疾患予防に役立ち、診断及び予後診断を改善して、特定の患者と適切な治療法をマッチングさせ得る個別化医療、(ii)ゲノム全体にわたる複雑性の理解；(iii)新しい治療剤の設計；及び(iv)配列変異の型を問わないインビトロ診断(IVD)のための事実上の業界基準の開発が挙げられる。

20

30

【0005】

例えば、散発性の変異、遺伝性の変異、単一ヌクレオチド多型(SNP)、メチル化パターン(エピジェネティクス)、遺伝子発現、コピー数の違い、マイクロサテライト不安定性等のような、種々の疾患の有効な生体マーカーとして役立つ多数の異なる遺伝的变化がある。残念ながら、これらの構造的な修飾はすべて独自のアッセイ形式を必要とし、したがって、それぞれの分子アッセイを行うのに必要な特殊化した装備及び専門知識のゆえに診療所で実施するのは難しい(Thomas et al., "Biomedical Microelectromechanical Systems (BioMEMS) Using Electrophoresis for the Analysis of Genetic Mutations," Molecular Review Diagnostics 2:429-447 (2002) (非特許文献6))。操作者の専門知識はほとんどなしで単一の機器を用いて配列の違いすべての存在/非存在を明らかにすることができる「標準的な」アッセイ形式は、IVDの完全な有用性を拡大するであろう。多くの場合、ゲノムにおける選択されたエクソンの広範な再配列決定が、配列変異の型に関わりなく、必要な感度を伴って必要な臨床情報を提供することができる。

40

【0006】

DNA配列決定における進歩は、胎児検診、移植有効性、癌及び他の疾患の検出、及び個々に応じた治療を改善する非侵襲性の分子診断を標準化し、進展させる可能性を秘めている。現在、素因となる疾患又は早期疾患を持つ患者は特定されず、疾患のある者が最良の治療を受けていない。それはすべて診断レベルの失敗のためである。その結果、臨床検査室で使用され得る自動化された超高速の配列決定プラットフォームを開発する緊急の二

50

ーズがある。そのような低コストの卓上機械が、分子マーカーの発見、検証及び臨床的利用を加速させるのに必要とされる。

【 0 0 0 7 】

例えば、癌の分野では、すべて血液試料からの早期検出、治療指針及び再発のモニタリングのためのそのような技術を開発する必要がある。これには、(i) プロモータの高メチル化及び低メチル化の高感度での検出 (無細胞 DNA の 1 % ~ 0 . 0 1 % で存在する場合)、(i i) 既知の遺伝子における一般の及び稀な変異の高感度での検出 (無細胞 DNA の 1 % ~ 0 . 0 1 % で存在する場合)、(i i i) 血液における腫瘍に由来するエキソソーム又は R I S C 複合体から単離される腫瘍特異的な m R N A 及び m i R N A の正確な定量、(i v) 循環腫瘍細胞から単離される DNA における腫瘍特異的なコピー変化の正確な定量、(v) 循環腫瘍細胞から単離される DNA における変異、プロモータの高メチル化及び低メチル化の正確な定量を開発する必要性が含まれる。上記の場合はすべて (循環腫瘍細胞から単離される DNA における腫瘍特異的なコピー変化の定量を除き) ゲノムの標的とされる遺伝子又は領域での配列決定に焦点を絞ることを必要とする。さらに、元々の断片の双方の鎖からの配列情報又はメチル化状態の測定は稀な事象の決定的に必要な確認を提供する。

10

【 0 0 0 8 】

胎児検診の分野では、一般的な異数性 (例えば、21トリソミー、18トリソミー、又は13トリソミー)、小さな欠失 (例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) 遺伝子における欠失から生じるもの)、他の小さなコピー数異常 (例えば、自閉症に關与するもの)、潜在的な臨床兆候を決定する平衡転座、刷り込みに関連する疾患をもたらし得るメチル化の変化 (例えば、A n g e l m a n 症候群、P r a d e r - W i l l i 症候群)、ハンチントン病などの疾患に關与するトリプレット反復変化、点変異 (例えば、嚢胞性線維症に關与する C F T R 遺伝子におけるもの) のための非侵襲性アッセイを開発する緊急のニーズがある。

20

【 0 0 0 9 】

一分子シーケンシング (S M S) は、1000ドルゲノム計画によって示された大がかりな指令を達成するという点で、アンサンブルに基づく戦略 (例えば、P C R に基づくもの) では利用できない幾つかの独自の特質を提供する。例えば、S M S は、(i) 試料処理のパイプラインを合理化して仕上げの塩基配列決定コストを低下させ (Bayley, H., "S e q u e n c i n g S i n g l e M o l e c u l e s o f D N A," C u r r . O p i n . C h e m . B i o l . 10:628-637 (2006) (非特許文献7))、(i i) 増幅及びそれに関連する偏り、並びに試薬の必要性、及びゲノムの難しい領域 (すなわち、高度に反復性の領域) に適したプライマーを設計する必要性を排除し、(i i i) 高い同定効率でメチル化部位、稀な変異及び他の配列の違いを直接見る能力を提供し、(i v) コピー数の違いをモニタリングするための高い感度を提供し、(v) 組み立ての要求及び高反復領域を介した配列を減らすことができる長い読み取り情報を生成する。

30

【 0 0 1 0 】

S M S のアプローチのタイプの1つには、ポリメラーゼにより生成された、蛍光標識したデオキシヌクレオチドで構成される相補的 DNA 鎖の合成が含まれた (Davis et al., "Rapid DNA Sequencing Based Upon Single Molecule Detection," Genetic Analysis-Biomolecular Engineering 8:1-7 (1991) (非特許文献8) ; Goodwin et al., "Application of Single Molecule Detection to DNA Sequencing," Nucleosides & Nucleotides 16:543-550 (1997) (非特許文献9) ; Goodwin et al., "DNA Sequencing by Single Molecule Detection," Prog. Biophys. Mol. Biol. 65:SMI02-SMI02 (1996) (非特許文献10))。相補的 DNA 鎖は、ストレプトアビジン : ビオチンの結合を用いてマイクロビーズに係留される。ビーズ : DNA の複合体を、光学捕捉を用いて、高度にプロセッシブなエキソヌクレアーゼで満たされた流れの中に浮遊させ、当該エキソヌクレアーゼによって末端モノヌクレオチド (d N M P) を順に切り取り、それらを励起レーザービーム (蛍光光子パーストを色と共に生じ、それにより同定メカニズムを提供する) を通して送る。概念的には

40

50

単純であるが、単色配列決定の実証にもかかわらず (Werner et al., "Progress Towards Single-Molecule DNA Sequencing: A One Color Demonstration," J. Biotechnol. 102:1-14 (2003) (非特許文献11))、色素修飾した d N T P を専ら使用して相補体を作れないこと、スケーリングの問題から生じる拡散性の誤秩序化、及び単一分子検出の間にシグナル対ノイズ比を低下させる不純な蛍光を含む、このアプローチに伴う幾つかの難題に遭遇している (Demas et al., "Fluorescence Detection in Hydrodynamically Focused Sample Streams: Reduction of Diffusional Defocusing by Association of Analyte With High-Molecular Weight Species," Appl. Spectroscopy 52:755-762 (1998) (非特許文献12) および Goodwin et al., "DNA Sequencing by Single Molecule Detection," Prog. Biophys. Mol. Biol. 65:SM102-SM102 (1996) (非特許文献10))。

10

【 0 0 1 1 】

最近、ポリメラーゼによる蛍光標識 d N T P の取り込み事象に従い、且つ、スペクトル的に区別できる色素で標識 (d N T P のリン酸基に結合) された d N T P をモニタリングするゼロモードの導波管を用いる、代替りの蛍光系の S M S 戦略が提案されている (Eid et al., "Real-Time DNA Sequencing From Single Polymerase Molecules," Science 323:133-138 (2009) (非特許文献13))。別のアプローチは、固体支持体に並べられた単一 D N A 分子を使用し、各取り込み事象が光子の蛍光バーストを生成する (Braslavsky et al., "Sequence Information Can be Obtained From Single DNA Molecules," Proc. Nat'l. Acad. Sci., U.S.A. 100:3660-3964 (2003) (非特許文献14))。これらは単一分子から配列情報を直接確保する優れた例である一方で、それは、蛍光基質の必要性、クロストーク又は交差励起を生成する分子系間での大量のスペクトル重複及び得られる符号を読み取るための大規模な光学ハードウェアの必要性などの幾つかの共通の難題を提供する。

20

【 0 0 1 2 】

S M S 形式からの蛍光系の読み取りの必要性を回避するために、標的 D N A を含むモノヌクレオチドの電気的符号から D N A 配列データを直接読み取ることが可能にするナノポア技術が提案されており、蛍光の必要性を取り除く (Akeson et al., "Microsecond Time-Scale Discrimination Among Polycytidylic Acid, Polyadenylic Acid, and Polyuridylic Acid as Homopolymers or as Segments Within Single RNA Molecules," Biophys. J. 77:3227-3233 (1999) (非特許文献15); Deamer & Branton, "Characterization of Nucleic Acids by Nanopore Analysis," Acc. Chem. Res. 35:817-825 (2002) (非特許文献16); Meller & Branton, "Single Molecule Measurements of DNA Transport Through a Nanopore," Electrophoresis 23:2583-2591 (2002) (非特許文献17); Meller et al., "Voltage-Driven DNA Translocations Through a Nanopore," Phys. Rev. Lett. 86:3435-3438 (2001) (非特許文献18); および Meller et al., "Rapid Nanopore Discrimination Between Single Polynucleotide Molecules," Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 97:1079-1084 (2000) (非特許文献19))。ほとんどの研究では、ナノポアは - ヘモリシンであり、それは細菌、黄色ブドウ球菌 (S. aureus) によって産生されるタンパク質様の膜チャネルである。応用的見地から、この細孔の使用は、幾つかの限界を有する: (1) その機械的及び化学的な安定性が多くの場合不適切である、(2) それは選択されたタイプの分子だけの変換を可能にする固定された孔径を有する、及び (3) そのような高密度のナノポアアレイを製造する能力は疑わしい可能性がある。これらの - ヘモリシンの限界は、電子ビーム又はイオンビームを用いてポリマー又は窒化ケイ素の膜にて 1 ~ 5 0 n m のサイズで製作することができる合成ナノポアの使用をもたらしている (Rhee & Burns, "Nanopore Sequencing Technology: Research Trends and Applications," Trends Biotechnol. 24:580-586 (2006) (非特許文献20) および Storm et al., "Fabrication of Solid-State Nanopores With Single-Nanometre Precision," Nat. Mater. 2:537-541 (2003) (非特許文献21))。合成ナノポアの魅力的な特徴は、合成細孔を装飾してトンネル電流又は導電性の変化にて乱れをモニタリングする横方向電極の使用のような、異なる読み出し様式を導入する能力である (Lagerqvist et al., "Fast DNA Sequencing Via Transverse Electronic Transport," Nano Lett. 6:779-782 (2006) (非特許文献22); Lagerqvist

30

40

50

t et al., "Influence of the Environment and Probes on Rapid DNA Sequencing Via Transverse Electronic Transport," *Biophys. J.* 93:2384-2390 (2007) (非特許文献23); Zikic et al., "Characterization of the Tunneling Conductance Across DNA Bases," *Phys. Rev. E* 74(1 Pt 1):011919 (2006) (非特許文献24); および Zwolak & Di Ventra, "Colloquium: Physical Approaches to DNA Sequencing and Detection," *Rev. Modern Physics* 80:141-165 (2008) (非特許文献25)。

【0013】

原則として、DNAの構造情報は、天然のナノポアを使用しようと合成のナノポアを使用しようと、インタクトなDNA分子が細孔を通して動く際の阻止電流の大きさからヌクレオチドの同一性を推定することによって得られる。このDNA配列決定法の利点には、
(1) 大きなDNA断片(50 kbp)を配列決定する能力、(2) 増幅又はサブクロニングの技法の使用を必要としないこと、(3) 蛍光標識されたデオキシヌクレオチド又はジデオキシヌクレオチドの使用を必要としないこと、(4) ゲノム全体の配列決定に 1×10^8 台のコピーの少ない投入量のDNA試料サイズが必要とされることが、及び(5) DNA配列情報を得ることができる速度がほぼリアルタイムの読み出しを提供し得ることが挙げられる。残念ながら、ナノポアから直接DNA配列決定を行う機能している実証はまだ示されていない。

【0014】

DNA配列決定のためのナノポア技術の潜在力に焦点を置いた幾つかの概説があり、これらの概説が指摘するように、この刺激的な新しいプラットフォーム及びDNA配列決定のためのその潜在力を実現するには多数の難題が存在する(Branton et al., "The Potential and Challenges of Nanopore Sequencing," *Nat. Biotechnol.* 26:1146-1153 (2008) (非特許文献26) および Zwolak & Di Ventra, "Colloquium: Physical Approaches to DNA Sequencing and Detection," *Rev. Modern Physics* 80:141-165 (2008) (非特許文献25))。第1に、細孔を通る移動時間がかなり長く(ヌクレオチド当たり1~20 μ s)、MHz範囲で機能する読み出し電子工学のバンド幅を必要とする。第2に、読み出し分解能はDNA分子の単一塩基の間隔、約0.34 nm以下の細孔の厚さを必要とする。合成細孔及びヘモリシン細孔双方の厚さはこの間隔よりもはるかに大きい(5~15 nm)ので、複数の塩基が細孔の中で同時に存在する。この前もって必要な厚さでナノポアを製作し得るとしても、有効な電場読み取り領域は細孔のいずれかの側でおおよそ細孔1つの直径単位拡大するであろう(Liu et al., "The Effect of Translocating Cylindrical Particles on the Ionic Current Through a Nanopore," *Biophys. J.* 92:1164-1177 (2007) (非特許文献27))。第3に、ナノポアのアレイの製造は、意図される適用を受け入れるために予め必要なサイズ寸法及び低コストにて高い製造モード再現性で行われなければならない。第4に、高品質のゲノムDNAが多種多様な試料(血液、組織、骨髄、尿、唾液等)から抽出されなければならない、次いで処理されて配列決定のための投入物として使用されるDNA断片(約50 kbp)を生じなければならない。試料の調製及び配列決定のステップは、単一プラットフォームに統合されるべきであり、基本的なターンキー方式で操作して広いユーザー基盤を可能にすべきである。

【0015】

例えば、エキソヌクラーゼ酵素の使用により、DNA切り取り後、元々の順序を維持しながらヌクレオチドが互いに物理的に分離されれば、読み出し分解能の限界を軽減することができる(Davis et al., "Rapid DNA Sequencing Based on Single Molecule Detection," *In Los Alamos Science* (1992) (非特許文献28))。これは高度にプロセッシブなエキソヌクラーゼ酵素を用いて実現可能であることが実証されており、それは、インタクトなDNA断片から個々のヌクレオチドを順に切り取り、シクロデキストリンのエリで固定されたヘモリシンナノポアを通してこれらの塩基を方向づける(Wu et al., "Protein Nanopores With Covalently Attached Molecular Adapters," *J. Am. Chem. Soc.* 129:16142-16148 (2007) (非特許文献29) および Clarke et al., "Continuous Base Identification for Single-Molecule Nanopore DNA Sequencing," *Nature Nanotechnol.* 4

10

20

30

40

50

:265-270 (2009) (非特許文献30))。残念ながら、阻止電流を用いた単一塩基の同定効率は93~98%である(Astier et al., "Toward Single Molecule Sequencing: Direct Identification of Ribonucleoside and Deoxyribonucleoside 5'-Monophosphates by Using an Engineered Protein Nanopore Equipped With a Molecular Adaptor," J. Am. Chem. Soc. 128:1705-1710 (2006) (非特許文献31))。ので、阻止電流のみを用いた配列決定におけるエラーは、例えば、変異部位の同定に必要な配列決定精度をもたらさない。また、最適なエキソヌクレアーゼ活性に必要な塩条件は高精度の塩基同定に必要な条件に合致し得ないので、同定効率は90%~99%の範囲である。従って、追加の塩基同定戦略を検討しなければならない。

【0016】

10

本発明は、当該技術におけるこれら及び他の欠陥を克服する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】Kaiser, J., "DNA Sequencing - A Plan to Capture Human Diversity in 1000 Genomes," Science 319:395-395 (2008)

【非特許文献2】Kuehn, B.M., "1000 Genomes Project Promises Closer Look at Variation in Human Genome," JAMA 300:2715-2715 (2008)

【非特許文献3】Mardis, E., "Anticipating the \$1,000 Genome," Genome Biol. 7:112 (2006)

20

【非特許文献4】Metzker, M.L., "Emerging Technologies in DNA Sequencing," Genome Res. 15:1767-1776 (2005)

【非特許文献5】Schloss, J., "How to Get Genomes at One Ten-Thousandth the Cost," Nature Biotechnol. 26:1113-1115 (2008)

【非特許文献6】Thomas et al., "Biomedical Microelectromechanical Systems (BioMEMS) Using Electrophoresis for the Analysis of Genetic Mutations," Molecular Review Diagnostics 2:429-447 (2002)

【非特許文献7】Bayley, H., "Sequencing Single Molecules of DNA," Curr. Opin. Chem. Biol. 10:628-637 (2006)

【非特許文献8】Davis et al., "Rapid DNA Sequencing Based Upon Single Molecule Detection," Genetic Analysis-Biomolecular Engineering 8:1-7 (1991)

30

【非特許文献9】Goodwin et al., "Application of Single Molecule Detection to DNA Sequencing," Nucleosides & Nucleotides 16:543-550 (1997)

【非特許文献10】Goodwin et al., "DNA Sequencing by Single Molecule Detection," Prog. Biophys. Mol. Biol. 65:SM102-SM102 (1996)

【非特許文献11】Werner et al., "Progress Towards Single-Molecule DNA Sequencing: A One Color Demonstration," J. Biotechnol. 102:1-14 (2003)

【非特許文献12】Demas et al., "Fluorescence Detection in Hydrodynamically Focused Sample Streams: Reduction of Diffusional Defocusing by Association of Analyte With High-Molecular Weight Species," Appl. Spectroscopy 52:755-762 (1998)

40

【非特許文献13】Eid et al., "Real-Time DNA Sequencing From Single Polymerase Molecules," Science 323:133-138 (2009)

【非特許文献14】Braslavsky et al., "Sequence Information Can be Obtained From Single DNA Molecules," Proc. Nat'l. Acad. Sci., U.S.A. 100:3660-3964 (2003)

【非特許文献15】Akeson et al., "Microsecond Time-Scale Discrimination Among Polycytidylic Acid, Polyadenylic Acid, and Polyuridylic Acid as Homopolymers or as Segments Within Single RNA Molecules," Biophys. J. 77:3227-3233 (1999)

【非特許文献16】Deamer & Branton, "Characterization of Nucleic Acids by Nanopore Analysis," Acc. Chem. Res. 35:817-825 (2002)

【非特許文献17】Meller & Branton, "Single Molecule Measurements of DNA Transpo

50

rt Through a Nanopore," Electrophoresis 23:2583-2591 (2002)

【非特許文献 1 8】Meller et al., "Voltage-Driven DNA Translocations Through a Nanopore," Phys. Rev. Lett. 86:3435-3438 (2001)

【非特許文献 1 9】Meller et al., "Rapid Nanopore Discrimination Between Single Polynucleotide Molecules," Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 97:1079-1084 (2000)

【非特許文献 2 0】Rhee & Burns, "Nanopore Sequencing Technology: Research Trends and Applications," Trends Biotechnol. 24:580-586 (2006)

【非特許文献 2 1】Storm et al., "Fabrication of Solid-State Nanopores With Single-Nanometre Precision," Nat. Mater. 2:537-541 (2003)

【非特許文献 2 2】Lagerqvist et al., "Fast DNA Sequencing Via Transverse Electronic Transport," Nano Lett. 6:779-782 (2006)

【非特許文献 2 3】Lagerqvist et al., "Influence of the Environment and Probes on Rapid DNA Sequencing Via Transverse Electronic Transport," Biophys. J. 93:2384-2390 (2007)

【非特許文献 2 4】Zikic et al., "Characterization of the Tunneling Conductance Across DNA Bases," Phys. Rev. E 74(1 Pt 1):011919 (2006)

【非特許文献 2 5】Zwolak & Di Ventra, "Colloquium: Physical Approaches to DNA Sequencing and Detection," Rev. Modern Physics 80:141-165 (2008)

【非特許文献 2 6】Branton et al., "The Potential and Challenges of Nanopore Sequencing," Nat. Biotechnol. 26:1146-1153 (2008)

【非特許文献 2 7】Liu et al., "The Effect of Translocating Cylindrical Particles on the Ionic Current Through a Nanopore," Biophys. J. 92:1164-1177 (2007)

【非特許文献 2 8】Davis et al., "Rapid DNA Sequencing Based on Single Molecule Detection," In Los Alamos Science (1992)

【非特許文献 2 9】Wu et al., "Protein Nanopores With Covalently Attached Molecular Adapters," J. Am. Chem. Soc. 129:16142-16148 (2007)

【非特許文献 3 0】Clarke et al., "Continuous Base Identification for Single-Molecule Nanopore DNA Sequencing," Nature Nanotechnol. 4:265-270 (2009)

【非特許文献 3 1】Astier et al., "Toward Single Molecule Sequencing: Direct Identification of Ribonucleoside and Deoxyribonucleoside 5'-Monophosphates by Using an Engineered Protein Nanopore Equipped With a Molecular Adaptor," J. Am. Chem. Soc. 128:1705-1710 (2006)

【発明の概要】

【0018】

本発明の第 1 の態様は、生体分子プロセッサを含む装置を対象とする。各生体分子プロセッサは、固体基板によって画定される 1 つ以上のバイオリアクターチャンバーと、各バイオリアクターチャンバー内において固定基板に取り付けられた支持構造体を含む。当該生体分子プロセッサは、当該支持構造体に固定化された切断酵素であって、当該切断酵素と機能的に結合したバイオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断するように当該各バイオリアクターチャンバー内に機能的に配置された、切断酵素も有する。当該生体分子プロセッサは、当該固体基板内に形成されかつ 1 つ以上のバイオリアクターチャンバーに流体的に連結された 1 つ以上の飛行時間型のチャンネルも有する。当該 1 つ以上の飛行時間型のチャンネルのそれぞれは流入端と出力端を有し、当該 1 つ以上の飛行時間型のチャンネルのそれぞれは、(i) 1 つ以上の飛行時間型のチャンネルの入力端の近位にある、1 つ以上の飛行時間型のチャンネルに接触する第 1 のセンサーと (i i) 1 つ以上の飛行時間型のチャンネルの出力端の近位にある、1 つ以上の飛行時間型のチャンネルに接触する第 2 のセンサーとを少なくとも含む 2 つ以上のセンサーを有する。

【0019】

本発明の他の態様は、本発明の装置を用いた核酸の配列決定及びタンパク質又はポリペプチドの同定の方法に関する。

【0020】

本発明の別の態様は、試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法を対象とする。この方法には、そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれぞれハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程が含まれ、1つ以上の核酸分子及びハイブリッド形成したその相補体のそれぞれは、標的特異的部分と、ヘアピンの形成に好適な一本鎖3'アダプター部分とを含む。試料は、1つ以上の核酸分子及びその相補体の3'アダプター部分がヘアピンを形成するのに有効な条件に供される。当該方法にはさらに、ポリメラーゼを提供する工程、並びに、伸長混合物を形成させるために1つ以上の3'ヘアピン化核酸分子及びその相補体とポリメラーゼを混合する工程が含まれる。1つ以上の核酸分子及びその相補体は、それぞれの3'ヘアピン化領域から伸長して、1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を形成する。当該方法にはさらに、試料中の1つ以上の核酸分子を同定するために1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子の少なくとも一部を配列決定する工程が含まれる。

10

【0021】

本発明の別の態様は、1つ以上の所望の核酸分子の標的特異的な濃縮を達成するための固体支持体への固定化を含む、試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法を対象とする。この方法には、そのそれぞれの相補体とそれぞれハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程が含まれ、1つ以上の核酸分子とそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれは、標的特異的部分、5'アダプター部分、及び3'アダプター部分を含み、5'アダプター部分及び3'アダプター部分はそれぞれヘアピン形成に好適である。当該方法にはさらに、1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体の収集物を形成させるためにその相補体から1つ以上の核酸分子を変性させる工程が含まれ、1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体それぞれの5'及び3'のアダプター部分のヘアピン配列がヘアピンを形成する。1つ以上の核酸分子又はその相補体の標的特異的部分の領域に対して相補的なヌクレオチド配列を含む複数の固定化された捕捉オリゴヌクレオチドプローブを含む固体支持体が提供される。1つ以上の変性させた一本鎖核酸分子及びその相補体は、固体支持体上に固定化された相補的な捕捉オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成する。当該方法にはさらに、ポリメラーゼを提供する工程、並びに、1つ以上のハイブリッド形成した核酸分子及びその相補体を含有する固体支持体にポリメラーゼを接触させる工程が含まれる。1つ以上の核酸分子及びその相補体は、それぞれの3'ヘアピン化領域から伸長されて1つ以上の完全長ヘアピン化標的核酸分子を形成し、それによって1つ以上の核酸分子が捕捉オリゴヌクレオチド及び固体支持体から遊離する。1つ以上の核酸分子の少なくとも一部を配列決定して、試料中の1つ以上の核酸分子を同定する。

20

30

【0022】

本発明の別の態様は、試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法を対象とする。この方法は、そのそれぞれの相補体とそれぞれハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程を含み、1つ以上の核酸分子とそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれは、標的特異的部分、5'アダプター部分、及び3'アダプター部分（一本鎖ホモポリマー反復配列を含む）を含む。当該方法はさらに、一本鎖核酸分子とその相補体の収集物を形成させるために、その相補体から1つ以上の核酸分子を変性させる工程を含む。1つ以上の核酸分子又はその相補体の3'末端に対して相補的な複数のオリゴヌクレオチドプライマー及びポリメラーゼが提供され、1つ以上の核酸分子及びその相補体がポリメラーゼ及びプライマーと混合されて伸長混合物を形成する。当該方法はさらに、オリゴヌクレオチドプライマーを1つ以上の核酸分子及びその相補体の相補的な3'末端とハイブリッド形成させる工程、並びに、完全長二本鎖核酸分子を形成させるためにハイブリッド形成したプライマーを伸長させる工程を含む。1つ以上の完全長二本鎖核酸分子の少なくとも一部を配列決定して、試料中の1つ以上の核酸分子を同定する。

40

【0023】

本発明は、完全に自動化されたプラットフォームを用いて配列決定情報を得ることに関連するコスト、労働、及び時間を実質的に低減することができ、本明細書では生体分子ブ

50

ロセッサと呼ばれる、バイオポリマーの配列決定プラットフォームに関する。当該プラットフォームは、低コストのマイクロ及びナノ複製技法を用いて成形可能な固体支持体にて製作した二次元（2D）飛行時間型チャンネルを通る特徴的な飛行時間に基づいてバイオポリマー分子の単量体単位及び多量体単位を同定する、ナノ規模のセンサーを使用する。単量体単位及び多量体単位は、インタクトなバイオポリマー（例えば、生体分子プロセッサの反応器チャンバー内に含有される支持構造体に共有結合で係留される核酸分子又はタンパク質）から切断酵素を用いて生成される。切断された単量体単位又は多量体単位は飛行時間型チャンネルに搬送され、飛行時間型チャンネルを通る分子依存的な飛行時間から当該単量体又は多量体の識別が推定される。当該飛行時間はチャンネルの各端に備えられた少なくとも2対のセンサーを用いて変換され、単量体単位又は多量体単位によって誘導される電氣的応答の乱れからシグナルが生じる。

10

【0024】

本明細書で提案されるアプローチは、その全体が参照によって本明細書に組み入れられるBrantonら、The Potential and Challenges of Nanopore Sequencing, "Nat. Biotechnol. 26:1146-1153(2008)によって言及されたような、ナノポアベースのDNA配列決定技術に関連する主要な難題に直接対処する。第1に、移動速度の低下を必要とするナノポアシーケンシングに関連するバンド幅の限界は、個々の塩基は、酵素の切り取り速度及び印加される電場並びに単量体の電気泳動移動度によって決まる長さだけ間隔を空ける（ t ）という事実によって否定される。例えば、 $1,000$ ヌクレオチド s^{-1} のエキソヌクレアーゼの切り取り速度（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるMatsuura et al., "Real Time Observation of a Single DNA Digestion by Lambda Exonuclease Under a Fluorescence Microscope Field," Nucleic Acids Res. 29:e79 (2001)）及び 0.1 mm s^{-1} の線速度を用いると、ヌクレオチドの間隔は 100 nm である。開始時間及び停止時間は、飛行管内に備えられた少なくとも2つの電極対によって測定されるので、飛行管ナノチャンネル内に複数のヌクレオチドが存在することは課題ではない。第2に、ナノポアの厚さが 0.34 nm 未満であるという単一塩基分析のための要件は、エキソヌクレアーゼによって課されるdNMPの間隔、及び、ヌクレオチド塩基の識別には阻止電流を用いないという事実のために、必要ではない。実際、ヌクレオチドの識別は、ヌクレオチド実体の確立されたクロマトグラフィ特性及び電気泳動特性に基づく（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるCzarnecka et al., "Application of Solid Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography to Qualitative and Quantitative Analysis of Nucleotides and Nucleosides in Human Cerebrospinal Fluid," J. Chromatogr. B 822:85-90 (2005)）。加えて、トランスコンダクタンス又はトンネル電流の使用、及び、変換されたシグナルに対する分子配向効果に関する潜在的な課題は、本発明には存在しない（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるZikic et al., "Characterization of the Tunneling Conductance Across DNA Bases," Phys. Rev. E 74(1 Pt 1):011919 (2006)）。マイクロ流体要素及びナノ流体要素の双方が、確立された複製技法を用いて成形可能な物質にて作製されるので、それらは低コスト且つ高生産率で作製することができる。加えて、多孔性鋳型における鋳型法又は本明細書に記載されている他の方法を用いてナノ規模の電極を生成し、検出要素の高規模製造を可能にするであろう。第4に、本発明の生体分子プロセッサは、本明細書に記載されているようにマイクロ規模のモジュールに接続されることができ、配列解析にかけられる前に試料を処理する自律システムを生成することができる。例えば、DNAの標的細胞からの選択、精製、及び切り取りを、配列決定前に完全に自動化された方法で実施することができる。加えて、多種多様な成形可能な物質によりもたらされる物質特性の柔軟性及びモジュール式アプローチの採用は、適用に最適な基板物質の選択と共に、これらのシステムの組み立てを可能にするであろう。最後に、これらのモジュールの低コストでの製造及びそれらの単純な組み立て並びに組み立てられたシステムの高い機能性は低コストのプラットフォームを提供するであろうし、その自動化能力は、再配列決定又はデノボシーケンシングのためのプラットフォームを、臨床の現場又は小さな発見ベースの研究室の中で直接作製するであろう

20

30

40

50

。

[本発明1001]

生体分子プロセッサを含む装置であって、各生体分子プロセッサが、
固体基板によって画定される1つ以上のバイオリアクターチャンバー；

各バイオリアクターチャンバー内にありかつ前記固体基板に取り付けられた支持構造体；

前記支持構造体に固定化された切断酵素であって、前記切断酵素と機能的に結合したバイオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断するように前記バイオリアクターチャンバー内に機能的に配置された、切断酵素；並びに

前記固体基板内に形成されかつ前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーに流体的に連結された1つ以上の飛行時間型チャンネルであって、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルのそれぞれが入力端及び出力端を有し、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルのそれぞれが、少なくとも (i) 前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの入力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルに接触する第1のセンサーと (i i) 前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの出力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルに接触する第2のセンサーとを含む2つ以上のセンサーを含む、1つ以上の飛行時間型チャンネルを含む、装置。

10

[本発明1002]

前記1つ以上のバイオリアクターチャンバー内及び前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの長さ方向に電場を生成するように機能的に配置された電場発生器をさらに含む、本発明1001の装置。

20

[本発明1003]

前記1つ以上の飛行時間型チャンネルが、幅50 nm以下でありかつ深さ50 nm以下である、本発明1001の装置。

[本発明1004]

前記1つ以上の飛行時間型チャンネルが、長さ5 μm ~ 250 μmである、本発明1001の装置。

。

[本発明1005]

前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーが、幅100 ~ 1000 nmである、本発明1001の装置。

30

[本発明1006]

前記1つ以上のバイオリアクターチャンバー内の前記支持構造体が、幅50 ~ 900 nmである、本発明1001の装置。

[本発明1007]

前記固体基板がポリマー材料で作られている、本発明1001の装置。

[本発明1008]

前記切断酵素がエキソヌクレアーゼ又はエキソリボヌクレアーゼである、本発明1001の装置。

[本発明1009]

前記切断酵素がプロセッシブなエキソヌクレアーゼ又はエキソリボヌクレアーゼである、本発明1008の装置。

40

[本発明1010]

前記切断酵素がプロテアーゼである、本発明1001の装置。

[本発明1011]

前記2つ以上のセンサーがそれぞれ、貴金属ナノワイヤ、セグメント化されたナノワイヤ、又はナノ粒子から成る、1対の検出電極を含む、本発明1001の装置。

[本発明1012]

各検出電極対が、それらが前記飛行時間型チャンネルに接触する狭い断面を有する、本発明1011の装置。

[本発明1013]

50

前記1つ以上の飛行時間型チャンネルが3つ以上のセンサーを含む、本発明1001の装置。

[本発明1014]

前記生体分子プロセッサが、前記固体基板の壁によって画定されるフィーダーチャンネルをさらに含み、前記フィーダーチャンネルが、前記固体基板の表面の近位にある入力端から前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーの近位にある出力端まで延在する長さを有する、本発明1001の装置。

[本発明1015]

前記フィーダーチャンネルの前記入力端の近位にある、前記フィーダーチャンネルに接触するセンサーをさらに含む、本発明1014の装置。

[本発明1016]

前記フィーダーチャンネルのセンサーが1対の検出電極を含む、本発明1015の装置。

[本発明1017]

前記フィーダーチャンネルが、前記入力端と前記出力端の間に1つ以上のエントロピートラップを含む、本発明1014の装置。

[本発明1018]

前記フィーダーチャンネルが、幅100 nm以下でありかつ深さ100 nm以下である、本発明1014の装置。

[本発明1019]

前記1つ以上の飛行時間型チャンネルが、電荷中性の親水性壁表面、荷電した親水性壁表面、又は電荷中性の疎水性壁表面を含む、本発明1001の装置。

[本発明1020]

10,000個以上の生体分子プロセッサを含む、本発明1001の装置。

[本発明1021]

100,000個以上の生体分子プロセッサを含む、本発明1001の装置。

[本発明1022]

以下の工程を含む、核酸分子の配列決定の方法：

本発明1001の装置を提供する工程；

前記装置の前記生体分子プロセッサに、1つ以上の核酸分子を含む試料を、前記バイオリアクターチャンバー内の前記固定化された切断酵素が前記試料中の前記1つ以上の核酸分子に結合して前記1つ以上の核酸分子を前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの前記入力端に1つずつ入る単量体ヌクレオチドへと切断するのに有効な条件下で供給する工程；

切断された前記単量体ヌクレオチドを前記1つ以上の飛行時間型チャンネルを通して輸送するために、前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーを横切って及び前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの長さ方向に電場を印加する工程；

前記印加する工程に基づいて、切断された前記単量体ヌクレオチドを、それらが前記1つ以上の飛行時間型チャンネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過する際に検出する工程；

前記検出する工程に基づいて、切断された各単量体ヌクレオチドが前記1つ以上の飛行時間型チャンネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過するのにどれくらい時間がかかるかを測定する工程；並びに

前記測定する工程に基づいて前記単量体ヌクレオチドを同定する工程。

[本発明1023]

前記同定する工程に基づいて、前記試料中の前記1つ以上の核酸分子のヌクレオチド配列の少なくとも一部を得る工程をさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1024]

前記試料中の前記1つ以上の核酸分子のうちの1つより多くのヌクレオチド配列の少なくとも一部を得るために、前記印加する工程、前記検出する工程、前記測定する工程、前記同定する工程を繰り返す工程をさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1025]

前記繰り返す工程を行って、少なくとも10,000個の核酸分子のヌクレオチド配列又は

10

20

30

40

50

その一部を得る、本発明1024の方法。

[本発明1026]

前記繰り返し工程を行って、少なくとも100,000個の核酸分子のヌクレオチド配列又はその一部を得る、本発明1024の方法。

[本発明1027]

前記測定する工程が、切断された各単量体ヌクレオチドが前記1つ以上の飛行時間型チャンネルにおける前記第1及び第2のセンサーのうちの少なくとも一方を通過する際の前記切断された各単量体ヌクレオチドの電氣的ピークの振幅を測定することをさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1028]

前記1つ以上の核酸分子が、二本鎖デオキシリボ核酸分子(DNA)、一本鎖DNA分子、1つ以上のメチル化されたヌクレオチド塩基を含むDNA分子、1つ以上の修飾又は損傷を受けたヌクレオチド塩基を含むDNA分子、リボ核酸(RNA)分子、1つ以上の修飾又は損傷を受けたヌクレオチド塩基を含むRNA分子、及びRNA/DNAハイブリッド分子から成る群より選択される、本発明1022の方法。

[本発明1029]

前記1つ以上の核酸分子が、長い非コードRNA(lncRNA)、リボソームRNA(rRNA)、小分子核RNA(snRNA)、マイクロRNA(miRNA)、転移RNA(tRNA)及び小分子干渉RNA(siRNA)から成る群より選択されるRNA分子を含む、本発明1028の方法。

[本発明1030]

前記1つ以上の核酸分子が二本鎖DNA分子を含み、かつ、前記二本鎖DNA分子の双方の鎖に由来する単量体ヌクレオチドの少なくとも一部が同定される、本発明1028の方法。

[本発明1031]

前記1つ以上の核酸分子が、1つ以上のヌクレオチド塩基の挿入、欠失、転座、及び変異、並びに/又は損傷を受けたヌクレオチド塩基を含むDNA分子を含み、前記1つ以上のヌクレオチド塩基の挿入、欠失、転座、及び変異、並びに/又は損傷を受けたヌクレオチド塩基が、前記測定する工程に基づいて同定される、本発明1028の方法。

[本発明1032]

1つ以上のヌクレオチド塩基の挿入、欠失、転座、及び変異、並びに/又は損傷を受けたヌクレオチド塩基を有する少量の核酸分子が、前記少量の核酸分子と類似のヌクレオチド配列を有するが前記1つ以上のヌクレオチド塩基の挿入、欠失、転座、及び変異、並びに/又は損傷を受けたヌクレオチド塩基を有しない、試料中の100~10,000倍過剰な核酸分子と区別される、本発明1031の方法。

[本発明1033]

前記1つ以上の核酸分子が、1つ以上のメチル化又は修飾されたヌクレオチド塩基を含むDNA分子又はRNA分子を含み、かつ、前記1つ以上のメチル化又は修飾されたヌクレオチド塩基が前記測定する工程に基づいて同定される、本発明1028の方法。

[本発明1034]

1つ以上のメチル化又は修飾されたヌクレオチド塩基を有する少量の核酸分子が、前記少量の核酸分子と類似するヌクレオチド配列を有するがメチル化又は修飾されていないヌクレオチド塩基を有する、試料中の100~10,000倍過剰の核酸分子と区別される、本発明1033の方法。

[本発明1035]

1つ以上のメチル化又は修飾されていないヌクレオチド塩基を有する少量の核酸分子が、前記少量の核酸分子に類似するヌクレオチド配列を有するがメチル化又は修飾されたヌクレオチド塩基を有する、試料中の100~10,000倍過剰の核酸分子と区別される、本発明1032の方法。

[本発明1036]

10

20

30

40

50

前記供給する工程の前に、前記1つ以上の核酸分子を組織、細胞、血清、血漿、血液、又はエキソソームから単離する工程をさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1037]

前記方法を実施する間に、前記1つ以上の核酸分子の200～50,000個の単量体ヌクレオチドが同定される、本発明1022の方法。

[本発明1038]

前記同定する工程に基づいて、病態を診断又は予後診断する工程及び遺伝子型又は発生段階を区別する工程をさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1039]

前記切断酵素が、エキソヌクレアーゼ又はエキソリボヌクレアーゼである、本発明1022の方法。

[本発明1040]

前記切断酵素が、プロセッシブなエキソヌクレアーゼ又はプロセッシブなエキソリボヌクレアーゼである、本発明1039の方法。

[本発明1041]

前記切断酵素が、 - エキソヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ I、エキソヌクレアーゼ I I I、T7エキソヌクレアーゼ、XRN-1、RNase I I、及びエキソソーム複合体から選択されるか又はその構成成分である、本発明1039の方法。

[本発明1042]

前記生体分子プロセッサが、前記固体基板の壁によって画定されるフィーダーチャネルをさらに含み、前記フィーダーチャネルが、前記固体基板の表面の近位にある入力端から前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーの近位にある出力端まで延在する長さを有し、

前記方法が、

前記1つ以上の核酸分子を含む前記試料を前記フィーダーチャネルに導入する工程；および

前記フィーダーチャネル内で前記1つ以上の核酸分子を引き延ばすために、前記フィーダーチャネルの長さ方向に電場を印加する工程

をさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1043]

前記フィーダーチャネルが、前記入力端と前記出力端の間に、前記1つ以上の核酸分子の方向を調整するための1つ以上のエントロピートラップをさらに含む、本発明1042の方法。

[本発明1044]

前記装置が、前記フィーダーチャネルの前記入力端の近位にある、前記フィーダーチャネルに接触するセンサーをさらに含み、

前記方法が、

前記1つ以上の核酸分子を、それらが前記フィーダーチャネルのセンサーを通り抜ける際に検出する工程；および

前記検出する工程の持続時間に基づいて、前記1つ以上の核酸分子の長さを決定する工程

をさらに含む、本発明1042の方法。

[本発明1045]

前記フィーダーチャネルのセンサーが1対の検出電極を含む、本発明1042の方法。

[本発明1046]

以下の工程を含む、1つ以上のタンパク質又はポリペプチドを同定する方法：

本発明1001の装置を提供する工程；

前記装置の前記生体分子プロセッサに、1つ以上のタンパク質又はポリペプチドを含む試料を、前記バイオリアクターチャンバー内の前記固定化された切断酵素が前記試料中の前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドに結合して前記1つ以上のタンパク質又はポリ

10

20

30

40

50

ペプチドを前記1つ以上の前記飛行時間型チャンネルの前記入力端に入るより小さなペプチド断片へと切断するのに有効な条件下で供給する工程；

切断された前記ペプチド断片を前記1つ以上の飛行時間型チャンネルを通して輸送するために、前記1つ以上のバイオリアクターチャンパーを横切って及び前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの長さ方向に電場を印加する工程；

前記印加する工程に基づいて、前記ペプチド断片が前記1つ以上の飛行時間型チャンネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過する際に前記ペプチド断片を検出する工程；

前記検出する工程に基づいて、(i) 各ペプチド断片が前記1つ以上の飛行時間型チャンネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過するのにどれくらい時間がかかるか及び / 又は (i i) 各ペプチド断片が前記1つ以上の飛行時間型チャンネルにおける第1又は第2のセンサーのうちの少なくとも一方を通過する際の各ペプチド断片の電気ピークの振幅を測定する工程；並びに

前記ペプチド断片を測定する前記工程に基づいて、前記試料中の前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドの少なくとも一部を同定する工程。

[本発明1047]

前記試料の前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドから切断された前記ペプチド断片の (i) 及び (i i) の測定値を、既知のタンパク質又はポリペプチドの切断により生成されたペプチド断片の対応する測定値と比較する工程をさらに含む、本発明1046の方法。

[本発明1048]

前記供給する工程の前に、生体試料から前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドを濃縮又は単離する工程をさらに含む、本発明1046の方法。

[本発明1049]

前記濃縮又は単離する工程が、アフィニティー精製、リガンド結合、又は抗体に基づく濃縮を用いて実施される、本発明1048の方法。

[本発明1050]

前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドが、Gタンパク質共役型受容体、核内受容体、電位依存性イオンチャンネル、リガンド依存性イオンチャンネル、受容体チロシンキナーゼ、増殖因子、プロテアーゼ、配列特異的プロテアーゼ、ホスファターゼ、プロテインキナーゼ、生物活性のある脂質、サイトカイン、ケモカイン、ユビキチンリガーゼ、ウイルス調節因子、細胞分裂タンパク質、足場タンパク質、DNA修復タンパク質、細菌リボソーム、ヒストン脱アセチル化酵素、アポトーシス制御因子、シャペロンタンパク質、セリン/スレオニンプロテインキナーゼ、サイクリン依存性キナーゼ、増殖因子受容体、プロテアソーム、シグナル伝達タンパク質複合体、タンパク質/核酸輸送体、及びウイルスカプシドから成る群より選択される、本発明1046の方法。

[本発明1051]

前記供給する工程の前に、1つ以上の細胞内区画から前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドを単離又は濃縮する工程をさらに含む、本発明1046の方法。

[本発明1052]

前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドが1つ以上の修飾されたアミノ酸残基を含み、前記測定する工程が前記1つ以上のアミノ酸の修飾を同定する、本発明1046の方法。

[本発明1053]

前記アミノ酸の修飾が、メチル化、アセチル化、及びリン酸化から選択される、本発明1052の方法。

[本発明1054]

前記切断酵素がプロテアーゼである、本発明1046の方法。

[本発明1055]

前記切断酵素が、プロテイナーゼK、黄色ブドウ球菌 (S. aureus) V - 8プロテアーゼ、トリプシン、リジンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、グルタミン酸プロテ

10

20

30

40

50

アーゼ、及びキモトリプシンプロテアーゼから成る群より選択される、本発明1054の方法。

[本発明1056]

以下の工程を含む、試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法：

そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれぞれハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程であって、前記1つ以上の核酸分子及びそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれが、標的特異的部分とヘアピン形成に好適な一本鎖3'アダプター部分とを含む、工程；

前記試料を、前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の3'アダプター部分がヘアピンを形成するのに有効な条件に供する工程；

ポリメラーゼを提供する工程；

伸長混合物を形成させるために、1つ以上の3'ヘアピン化核酸分子及びその相補体を前記ポリメラーゼと混合する工程；

1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子及びその相補体を、それらのそれぞれの3'ヘアピン化領域から伸長させる工程；並びに

前記試料中の1つ以上の核酸分子を同定するために、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子の少なくとも一部を配列決定する工程。

[本発明1057]

前記方法が、前記配列決定する工程の前に、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を1つ以上の生体分子プロセッサに導入する工程をさらに含み、

前記生体分子プロセッサが、

固体基板によって画定される1つ以上のバイオリアクターチャンバー；

各バイオリアクターチャンバー内にありかつ前記固体基板に取り付けられた支持構造体；

前記支持構造体に固定化された切断酵素であって、前記切断酵素と機能的に結合したバイオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断するように前記バイオリアクターチャンバー内に機能的に配置された、切断酵素；並びに

前記固体基板内に形成されかつ前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーに流体的に連結された1つ以上の飛行時間型チャンネルであって、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルのそれぞれが入力端と出力端を有し、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルのそれぞれが、少なくとも（i）前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの前記入力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルに接触する第1のセンサーと（ii）前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの前記出力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルに接触する第2のセンサーとを含む2つ以上のセンサーを含む、1つ以上の飛行時間型チャンネルを含む、本発明1056の方法。

[本発明1058]

前記ポリメラーゼが、前記伸長させる工程の間に、前記1つ以上の核酸分子を、そのそれぞれの相補体核酸分子から解離させる、本発明1056の方法。

[本発明1059]

前記ポリメラーゼが、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性又は鎖置換活性を含む、本発明1058の方法。

[本発明1060]

前記伸長させる工程の前に、前記1つ以上の3'ヘアピン化核酸分子及びその相補体を変性させる工程をさらに含む、本発明1056の方法。

[本発明1061]

前記1つ以上の完全長ヘアピン化核酸分子の5'末端がリン酸化されている、本発明1056の方法。

[本発明1062]

前記試料を提供する工程が、

1つ以上の核酸分子及びその相補体を含む試料を提供する工程；並びに

10

20

30

40

50

前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の前記標的特異的部分に前記アダプター部分を付加する工程を含む、本発明1056の方法。

[本発明1063]

前記アダプター部分又はその相補体が、前記1つ以上の核酸分子又はその相補体の前記標的特異的部分に、リガーゼ、ポリメラーゼ、リコンビナーゼ、ターミナルトランスフェラーゼ、エンドヌクレアーゼ、DNA修復酵素、及び逆転写酵素から成る群より選択される1種以上の酵素を用いて付加される、本発明1062の方法。

[本発明1064]

前記アダプター部分が、1種以上の一意のヌクレオチド配列タグをさらに含む、本発明1056の方法。

[本発明1065]

前記配列決定する工程の前に、前記1つ以上の完全長ヘアピン化核酸分子のヘアピン化部分に移動度変更因子 (mobility modifier) を付加する工程をさらに含む、本発明1056の方法。

[本発明1066]

以下の工程を含む、試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法：

そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれぞれハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程であって、前記1つ以上の核酸分子及びそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれが、標的特異的部分、5'アダプター部分、及び3'アダプター部分を含み、前記5'及び3'アダプター部分がそれぞれヘアピン形成に好適である、工程；

1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体の収集物を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子をその相補体から変性させる工程であって、前記1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体のそれぞれの5'及び3'アダプター部分のヘアピン配列がヘアピンを形成する、工程；

複数の固定化された捕捉オリゴヌクレオチドプローブを含む固体支持体を提供する工程であって、各捕捉オリゴヌクレオチドプローブが前記1つ以上の核酸分子又はその相補体の標的特異的部分の領域に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、工程；

変性させた前記一本鎖核酸分子及びその相補体のうちの1つ以上を、前記固体支持体上に固定化されたそれらの相補的な捕捉オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成させる工程；

ポリメラーゼを提供する工程；

前記ポリメラーゼを、ハイブリッド形成させた前記核酸分子及びその相補体のうちの1つ以上を含有する前記固体支持体に接触させる工程；

1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子又はその相補体を、それらのそれぞれの3'ヘアピン化領域から伸長させる工程であって、それによって前記1つ以上の核酸分子が前記捕捉オリゴヌクレオチド及び前記固体支持体から遊離する、工程；並びに

前記試料中の1つ以上の核酸分子を同定するために、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子の少なくとも一部を配列決定する工程。

[本発明1067]

前記方法が、前記配列決定する工程の前に、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を1つ以上の生体分子プロセッサに導入する工程をさらに含み、

前記生体分子プロセッサが、

固体基板によって画定される1つ以上のバイオリアクターチャンバー；

各バイオリアクターチャンバー内にありかつ前記固体基板に取り付けられた支持構造体；

前記支持構造体に固定化された切断酵素であって、前記切断酵素と機能的に結合したバイオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断するようにバイオリアクターチャンバー内に機能的に配置された、切断酵素；並びに

10

20

30

40

50

前記固体基板内に形成されかつ前記1つ以上のバイオリクターチャンバーに流体的に連結された1つ以上の飛行時間型チャンネルであって、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルのそれぞれが入力端と出力端を有し、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルのそれぞれが、少なくとも (i) 前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの前記入力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルに接触する第1のセンサーと (i i) 前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの前記出力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルに接触する第2のセンサーとを含む2つ以上のセンサーを含む、1つ以上の飛行時間型チャンネルを含む、本発明1066の方法。

[本発明1068]

前記試料を提供する工程が、
1つ以上の核酸分子及びその相補体を含む試料を提供する工程；並びに
前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の前記標的特異的部分に前記アダプター部分を付加する工程
を含む、本発明1066の方法。

[本発明1069]

前記アダプター部分又はその相補体が、前記1つ以上の核酸分子又はその相補体の前記標的特異的部分に、リガーゼ、ポリメラーゼ、リコンビナーゼ、ターミナルトランスフェラーゼ、エンドヌクレアーゼ、DNA修復酵素、及び逆転写酵素から成る群より選択される1種以上の酵素を用いて付加される、本発明1068の方法。

[本発明1070]

前記アダプター部分が、1種以上の一意のヌクレオチド配列タグをさらに含む、本発明1066の方法。

[本発明1071]

前記完全長ヘアピン化標的核酸分子の5'末端がリン酸化されている、本発明1066の方法。

[本発明1072]

前記配列決定する工程の前に、前記完全長ヘアピン化核酸分子のヘアピン化部分に移動度変更因子を付加する工程をさらに含む、本発明1066の方法。

[本発明1073]

以下の工程を含む、試料中の複数の標的核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法：
そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれぞれハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程であって、前記1つ以上の核酸分子及びそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれが、標的特異的部分、5'アダプター部分、及び一本鎖ホモポリマー反復配列を含む3'アダプター部分を含む、工程；

1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体の収集物を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子をその相補体から変性させる工程；

前記1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体の3'末端に対して相補的な複数のオリゴヌクレオチドプライマーを提供する工程；

ポリメラーゼを提供する工程；

伸長混合物を形成させるために、前記1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体の収集物を前記ポリメラーゼ及びプライマーと混合する工程；

前記オリゴヌクレオチドプライマーを、それらの相補的な、前記1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体の3'末端とハイブリッド形成させる工程；

1つ以上の完全長の二本鎖核酸分子を形成させるために、ハイブリッド形成させた前記プライマーを伸長させる工程；並びに

前記試料中の1つ以上の核酸分子を同定するために、前記1つ以上の完全長の二本鎖核酸分子の少なくとも一部を配列決定する工程。

[本発明1074]

前記方法が、前記配列決定する工程の前に、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を1つ以上の生体分子プロセッサに導入する工程をさらに含み、

10

20

30

40

50

前記生体分子プロセッサが、

固体基板によって画定される1つ以上のバイオリアクターチャンバー；

各バイオリアクターチャンバー内にありかつ前記固体基板に取り付けられた支持構造体
；

前記支持構造体に固定化された切断酵素であって、前記切断酵素と機能的に結合したバ
イオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断するように前記バイオリアクターチ
ャンバー内に機能的に配置された、切断酵素；並びに

前記固体基板内に形成されかつ前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーに流体的に
連結された1つ以上の飛行時間型チャンネルであって、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの
それぞれが入力端と出力端を有し、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルのそれぞれが、少
なくとも（i）前記1つ以上の飛行時間型チャンネルの前記入力端の近位にある、前記1つ以
上の飛行時間型チャンネルに接触する第1のセンサーと（i i）前記1つ以上の飛行時間型チ
ャネルの前記出力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャンネルに接触する第2のセ
ンサーとを含む2つ以上のセンサーを含む、1つ以上の飛行時間型チャンネル
を含む、本発明1073の方法。

10

[本発明1075]

前記試料を提供する工程が、

前記1つ以上の核酸分子及びその相補体を含む試料を提供する工程；

前記3'及び5'アダプター部分を、前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の前記標的的特
異的部分に付加する工程；並びに

20

前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の、一本鎖ホモポリマー反復配列を有する3'ア
ダプター部分を伸長させる工程
を含む、本発明1073の方法。

[本発明1076]

前記付加する工程及び伸長させる工程が、リガーゼ、ポリメラーゼ、リコンビナーゼ、
ターミナルトランスフェラーゼ、エンドヌクレアーゼ、DNA修復酵素、及び逆転写酵素
から成る群より選択される1種以上の酵素を用いて実施される、本発明1075の方法。

[本発明1077]

前記アダプター部分が、1種以上の一意のヌクレオチド配列タグを含む、本発明1073の
方法。

30

[本発明1078]

前記オリゴヌクレオチドプライマーが、3'アダプターに特異的な部分及び3'ホモポリマ
ー反復配列に特異的な部分を含む、本発明1073の方法。

[本発明1079]

前記5'アダプター部分が5'リン酸部分を含む、本発明1073の方法。

[本発明1080]

複数の固定化された捕捉オリゴヌクレオチドプローブを含む固体支持体を提供する工程
であって、各捕捉オリゴヌクレオチドプローブが前記1つ以上の核酸分子及びその相補体
の標的的特異的部分の領域に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、工程；並びに

標的的特異的な濃縮を達成するために、前記混合する工程の前に前記1つ以上の変性させ
た一本鎖核酸分子及びその相補体を前記固体支持体上でそれらの相補的な固定化された捕
捉オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成させる工程であって、前記伸長させる工程の前
に又はその間に前記1つ以上の核酸分子及びその相補体が前記固体支持体の前記捕捉オリ
ゴヌクレオチドから解離する、工程
をさらに含む、本発明1073の方法。

40

[本発明1081]

前記ポリメラーゼが、前記伸長させる工程の間に、前記1つ以上の核酸分子及びその相
補体を、前記固体支持体の前記捕捉オリゴヌクレオチドから解離させる、本発明1080の方
法。

[本発明1082]

50

前記ポリメラーゼが、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性又は鎖置換活性を有する、本発明1081の方法。

[本発明1083]

前記オリゴヌクレオチドプライマーをハイブリッド形成させる工程の後かつ前記伸長させる工程の前に、前記固体支持体の前記捕捉オリゴヌクレオチドから前記1つ以上の核酸分子及びその相補体を変性させる工程をさらに含む、本発明1080の方法。

[本発明1084]

前記配列決定する工程の前に、前記1つ以上の伸長させた完全長の二本鎖標的核酸分子の3'末端に移動度変更因子を付加する工程をさらに含む、本発明1073の方法。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】本発明の生体分子プロセッサの平面図である。

【図2】図2Aは、本発明の生体分子プロセッサの斜視図である。図2Bは、バイオリアクター支持構造体16に固定化され、核酸分子15と機能的に結合した切断酵素36を示す。

【図3】図3A～3Dは、本発明の生体分子プロセッサの種々の部分の走査電子顕微鏡（SEM）画像である。図3Aは、マイクロピラー及び／又はナノピラーのアレイを含有するV形状のフィーダーチャンネルの流入口28のSEM画像である。図3Bは、エントロピートラップ30を含有しかつバイオリアクターチャンバー14に連結されたフィーダーチャンネル20のSEM画像である。図3Cは、固定化された切断酵素36を有する固体支持体16を含有するバイオリアクターチャンバー14のSEM画像である。バイオリアクターチャンバーは、フィーダーチャンネル20及び飛行時間型チャンネル24に流体的に連結されている。図3Dは、チャンネル24内に位置するナノ検出電極の第1の対32及び第2の対34を有する飛行時間型チャンネル24を示す。示されているように、ナノ検出電極はそれぞれ、ナノ検出電極を装置の外部の電子コンポーネントに連結するマイクロコンタクトパッド40に接続されている。

【図4】図4A～4Bは、フィーダーチャンネルの試料流入口の種々の設計を示す。図4Aは、溝型流入口、V形状のマイクロ／マイクロ以下の溝型流入口、マイクロ／ナノピラーのアレイを有するピラー状の流入口、及び漏斗型の流入口を含む種々の流入口のSEM画像を示す。図4Bは、マイクロ流体とナノチャンネルとの境目がはっきりしたインターフェース（「オリジナル」）に比べたときの図4Aの種々の流入口設計を用いたDNA捕捉の向上を示すグラフである。

【図5】図5A～5Bは、本発明の装置のバイオリアクターチャンバー内の固体支持体に1種又は複数種の切断酵素を固定化する二通りのアプローチの模式図を示す。

【図6】図6A～6Bは、3つのナノ検出電極を含有する飛行時間型チャンネルを有する本発明の生体分子プロセッサを示す。図6Aは、フィーダーチャンネル20、バイオリアクターチャンバー14、ならびにナノ検出電極の第1の対（32）および第2の対（34）および第3の対（33）を含有する飛行時間型チャンネル24を含む生体分子プロセッサ10の平面図である。図6Bは、3対のナノ検出電極32、33、34を含有する飛行時間型チャンネル24に流入し、流出するモノヌクレオチド46を示す斜視図である。

【図7】飛行時間型チャンネルが複数の飛行管を含有し、各飛行管が、独自の表面化学的性質を有する飛行時間型チャンネルの一部によって分離された2対のナノ検出電極を有する、本発明の生体分子プロセッサの平面図である。各飛行管の第1及び第2のセンサーは、特定の飛行管の表面化学的性質に応じてバイオポリマー単位の飛行時間を検出する。

【図8A】本発明の方法に従う配列解析のための、二本鎖ゲノムDNAの双方の鎖を調製する代替法を示す模式図である。

【図8B】本発明の方法に従う配列解析のための、二本鎖ゲノムDNAの双方の鎖を調製する代替法を示す模式図である。

【図9】本発明の方法に従う配列解析のための、標的ゲノムDNAについての試料の濃縮を行い、濃縮した二本鎖ゲノムDNAの双方の鎖を調製する方法を示す図式的概観である

10

20

30

40

50

。

【図 1 0】本発明の方法に従う配列解析のための、二本鎖ゲノム DNA の双方の鎖を調製する方法を示す模式図である。

【図 1 1】本発明の方法に従う配列解析のための、標的ゲノム DNA についての試料の濃縮を行い、濃縮した二本鎖 DNA の双方の鎖を調製する方法を示す図式的概観である。

【図 1 2】本発明の生体分子プロセッサを作るのに好適な第 1 のプロセスを示す図式的概観である。

【図 1 3】本発明の生体分子プロセッサを作るのに好適な第 2 のプロセスを示す図式的概観である。

【図 1 4】本発明の生体分子プロセッサを作るのに好適な第 3 のプロセスを示す図式的概観である。

10

【図 1 5】本発明の生体分子プロセッサを作るのに使用されるシリコンマスタースタンプの形成を示す図式的概観である。

【図 1 6】図 1 6 A ~ 1 6 B は、後にマイクロ及びナノ流体ネットワークの製作に使用されるシリコンマスタースタンプから樹脂スタンプを形成するのに使用されるナノインプリントリソグラフィのプロセス（図 1 6 A）、及び本発明の生体分子プロセッサに関連する他の構造（図 1 6 B）を示す。

【図 1 7】図 1 7 A ~ 1 7 B は、本発明の生体分子プロセッサで使用するのに好適な単相ナノワイヤを形成するプロセス（図 1 7 A）及びこの方法で作製されるナノワイヤの走査電子顕微鏡（SEM）画像（図 1 7 B）を示す。

20

【図 1 8】本発明の生体分子プロセッサで使用するのに好適なセグメント化されたナノワイヤを形成するプロセスを示す。

【図 1 9】本発明の生体分子プロセッサで使用するのに好適な極薄のナノワイヤを形成するプロセスを示す図である。

【図 2 0】選択的エッチングを用いたナノワイヤ菲薄化のプロセスを示す。

【図 2 1】本発明の生体分子プロセッサにおける検出電極の位置で化学パッチを用いたナノワイヤの位置決めを説明する図である。

【図 2 2】リフトオフ（MAPL）法による分子アセンブリのパターン形成を用いた生体分子プロセッサの基板上での化学パッチの形成を示す図式的概観である。

【図 2 3】ナノステンシルマスクを用いた生体分子プロセッサの基板上での化学パッチの形成を示す図式的概観である。

30

【図 2 4】生体分子プロセッサにおける電極センサーの位置でナノワイヤの位置決めを行うためのナノステンシルマスクの使用を示す図式的概観である。

【図 2 5】印加される磁場を用いることなく電極センサーの位置にナノワイヤを磁氣的に向けるプロセスを示す図式的概観である。

【図 2 6】外側に印加される磁場を用いて電極センサーの位置にナノワイヤを磁氣的に向けるプロセスを示す図式的概観である。

【図 2 7】ナノインプリントリソグラフィを用いたナノギャップとナノチャネルの同時形成のプロセスを示す。

【図 2 8】ナノチャネル及び他の流体ネットワークが基板にて機能する場合のナノインプリントリソグラフィを用いたナノギャップ形成のプロセスを示す。

40

【図 2 9】図 2 9 A ~ 2 9 B は、飛行時間型センサーのナノ検出電極を外部の電子コンポーネントに連結するマイクロコンタクトパッドを形成する代替プロセスを概略的に説明する。

【図 3 0】図 3 0 A ~ 3 0 C は、構造的な変形を出来るだけ抑えながら熱によってカバー板を生体分子プロセッサに組み付けるプロセスを示す。図 3 0 A は、組み付けプロセスの模式図である。図 3 0 B は、組み付けプロセスで使用される圧力ヒーターの模式図である。図 3 0 C は、接合されたカバー板のイメージである。

【図 3 1】マイクロコンタクトパッドと、基板上のシグナル処理電子部品を有するプリント回路基板（PCB）との間の種々の電氣的接続を作るプロセスを示す。

50

【図 3 2】本発明の生体分子プロセッサの電子部品を示す。

【図 3 3】図 3 3 A ~ 3 3 D は、4 種の核酸塩基を含有する d N M P の構造を示す。図 3 3 A は、プロトン化 3' d A M P を示す。図 3 3 B は、非プロトン化 3' d G M P を示す。図 3 3 C は、プロトン化 5' d C M P を示す。図 3 3 D は、非プロトン化 5' d T M P を示す。図 3 3 B の構造における円で囲った原子における部分電荷と、図 3 3 A の構造における対応する原子における部分電荷との間の差異が図 3 3 C の構造に適用されて、図 3 3 D の構造における円で囲った原子における部分電荷が得られた。図 3 3 B 及び 3 3 D の構造における円で囲った原子の間の唯一の構造的な差異は、C 3' と C 5' の原子にある。4 種の異なる核酸塩基を有する図 3 3 D のような構造をシミュレーションに用いた。核酸塩基が何であるかは、リン酸基における部分電荷に影響しない。核酸塩基上の軸の標識した軸 1 を、スリット壁への d N M P の吸着及び脱着の解析に使用したが、その中で考察する。

【図 3 4】図 3 4 A ~ 3 4 B は、平衡シミュレーション及び非平衡シミュレーションの双方で使用されるシステム及び D N A の化学構造を示す。図 3 4 A は、ナノスリットにて水、塩化ナトリウム及び d N M P を含有するシミュレーションシステムを示す。灰色球体は壁原子を表し、緑色は塩化物を表し、黄褐色はリンを表し、黄色はナトリウムを表し、赤色は水のものではない酸素を表し、白色は水のものではない水素を表し、シアン色は壁のものではない炭素を表し、青色は窒素を表し、紫色は水分子を表す。明瞭にするために壁原子の一部は示されていない。x 方向及び y 方向に周期的な境界条件がある。図 3 4 B は、2 つの d N M P (極性水素のみを示す) を示す。1 つの環ピリミジン (C、T) 及び 2 つの環プリン (A、G) の核酸塩基が糖リン酸の主鎖に連結されている。 - エキソヌクレアーゼは、二本鎖 D N A の 1 つの鎖を、5' 末端から開始して一度にヌクレオチド 1 個ずつ消化することができ、遊離したヌクレオチドそれぞれの 5' 末端にリン酸を残す。

【図 3 5】吸着及び脱着の時間を決定するためのアルゴリズムにおけるステップを示す。吸着期間中の d N M P と壁との間のエネルギーの算出のために、異なる定義を吸着に用いた。当該エネルギーが -2.0 kcal/mol 未満であれば、d N M P は吸着していると見なした。

【図 3 6】4 つの d N M P の自由エネルギーを、疎水性の壁からの距離 d_w の関数として示す。これらの曲線は、異なる壁構成の組すべてにわたる平均である。

【図 3 7】z 方向 (壁表面に垂直) における d N M P の質量中心の典型的な 50 ns の軌道を示す。

【図 3 8】平衡の場合 (灰色) 及び非平衡の場合 (黒色) における吸着についての、 d_w の関数としての表面平面に対する軸 1 の角度を示す。構造における矢印は軸点の方向を示す。負は、スリットの中心平面 ($d_w = 1.5 \text{ nm}$) から離れる方向であることを示す。

【図 3 9】平衡の場合 (灰色) 及び非平衡の場合 (黒色) における脱着についての、 d_w の関数としての表面平面に対する軸 1 の角度を示す。構造における矢印は軸点の方向を示す。負は、スリットの中心平面 ($d_w = 1.5 \text{ nm}$) から離れる方向であることを示す。

【図 4 0】図 4 0 ~ 4 0 D は、核酸塩基の平面にある軸 2 の定義を示す。図 4 0 A は、d A M P を示す。図 4 0 B は、d G M P を示す。図 4 0 C は、d C M P を示す。図 4 0 D は、d T M P を示す。

【図 4 1】平衡の場合 (灰色) 及び非平衡の場合 (黒色) における吸着についての、 d_w の関数としての表面平面に対する軸 2 の角度を示す。構造における矢印は軸点の方向を示す。負は、スリットの中心平面 ($d_w = 1.5 \text{ nm}$) から離れる方向であることを示す。

【図 4 2】平衡の場合 (灰色) 及び非平衡の場合 (黒色) における脱着についての、 d_w の関数としての表面平面に対する軸 2 の角度を示す。構造における矢印は軸点の方向を示す。負は、スリットの中心平面 ($d_w = 1.5 \text{ nm}$) から離れる方向であることを示す。

【図 4 3】5.9 μm にわたる飛行時間分布を示すグラフである。0.5 nm にわたる飛行時間分布に由来する $N_{d A M P}, d G M P} = 11887$ 個の無作為試料の飛行時間を合計することによって生成される各データ点と共に合計 10,000 個の飛行時間を各 d N M P に用いた。d N M P 当たりの最小解析時間 ($t_{\text{解析}}$) は約 10 μs である。

【図 4 4】0.048 cm/s の中心線速度 (V_{max}) 及び 2.47 mm のチャンネル長

10

20

30

40

50

について推定された飛行時間分布を示すグラフである。

【図 4 5】ポリ(メチルメタクリレート)(PMMA)表面に - E x o を固定化するプロセスを概略的に示す。

【図 4 6】図 4 6 A ~ 4 6 C は、PMMA 表面上への - E x o の固定化を示す。図 4 6 A 及び 4 6 B は、 - E x o のみ(4 6 A)又は - E x o と 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)/N - ヒドロキシスクシンイミド(NHS)カップリング試薬との組み合わせ(4 6 B)に暴露した PMMA 表面の原子間力顕微鏡(AFM)による走査データである。図 4 6 C は、ポリマー表面全域にわたる固定化した - E x o 酵素のサイズ分布を示すヒストグラムである。

【図 4 7】自由溶液 - E x o 消化後及び固相反応器 - E x o 消化後の - DNA の蛍光スペクトルを示す。未消化の - DNA の蛍光スペクトルも対照として示す。

【図 4 8】 - E x o の消化活性のリアルタイム蛍光モニタリングを示すグラフである。MgCl₂ 補因子の存在下()及び非存在下()で、蛍光的に標識した - DNA を、固定化された - E x o と共にインキュベートし、 - E x o の消化活性を示す相対蛍光強度の低下を反応時間の経過にわたってモニタリングした。

【図 4 9】キャピラリー電気泳動(CE)による天然デオキシヌクレオチドリン酸(dNMP)のベースライン分離を示すグラフである。

【図 5 0】図 5 0 A ~ 5 0 B は、電気浸透流(EOF)に対する熱可塑性(PMMA)表面処理の効果を示す。図 5 0 A は、天然の未修飾 PMMA ナノチャネル()及び O₂ プラズマで処理した PMMA ナノチャネル()における EOF を示す。図 5 0 B は、天然の未修飾 PMMA ナノチャネル()、及び、プラズマ酸化して EDC/NHS カップリング試薬の存在下でエチレンジアミンにて処理した PMMA ナノチャネル()における EOF を示す。

【図 5 1】図 5 1 A ~ 5 1 C は、PMMA ナノチャネルを通る単一体の電気泳動移動度を示す。図 5 1 A は、電場強度 4 0 0 0 V / cm で実施した PMMA ナノチャネルを通る単一体の電気泳動が推進する移動時間を示すヒストグラムである。このデータを、より低い電場強度で実施したものと比較することによって、高い電場での低下した分散効果のために、移動時間の散布度は電場強度に逆相関することが示された。図 5 1 B は、電場の非存在下で PMMA ナノチャネルに配置された単一の銀ナノ粒子(Ag - NP)の画像(3D - プロット)である。図 5 1 C は、PMMA ナノチャネルにおける電氣的に推進された単一体の移動についての電気泳動移動度及び段数(図 5 1 A で示したヒストグラムの幅の測定値)を示すグラフである。

【図 5 2】図 5 2 A ~ 5 2 I は、PMMA ナノチャネルを通る T4 DNA の移動事象の光学的及び電氣的な測定を示す。図 5 2 A 及び 5 2 B は、短い DNA 分子(約 5 μm 未満)の移動によって生成されるイオン性の電流スパイクを示す。図 5 2 C は、ナノ流体装置のナノピラーアレイ及びナノチャネルを通して移動する短い DNA 分子を概略的に示す。図 5 2 D ~ 5 2 F 及び 5 2 G ~ 5 2 I は、それぞれ長い DNA (完全長ではない T4 DNA) 及び完全長の T4 DNA 分子の移動によって生成されるイオン性の電流スパイクを示す。本明細書に記載されているように、DNA 分子の長さは、生成される電流過渡の長さに相関する。

【図 5 3】図 5 3 A ~ 5 3 B は、電気化学エッチングによって作製されたナノギャップを含有するセグメント化されたナノワイヤの画像である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

発明の詳細な説明

本発明の第 1 の態様は、生体分子プロセッサを含む装置を対象とする。各生体分子プロセッサは、固体基板によって画定される 1 つ以上のバイオリアクターチャンパーと、各バイオリアクターチャンパーにおいて当該固体基板に取り付けられた支持構造体とを含む。当該生体分子プロセッサはまた、当該支持構造体に固定化された切断酵素であって、当該切断酵素と機能的に結合したバイオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断する

10

20

30

40

50

ように前記バイオリアクターチャンバー内に機能的に配置された、切断酵素も有する。当該生体分子プロセッサはまた、当該固体基板内に形成されかつ1つ以上のバイオリアクターチャンバーに流体的に連結された1つ以上の飛行時間型チャンネルも有する。当該1つ以上の飛行時間型チャンネルのそれぞれは入力端と出力端を有し、当該1つ以上の飛行時間型チャンネルのそれぞれは、(i)当該1つ以上の飛行時間型チャンネルの入力端の近位にある、当該1つ以上の飛行時間型チャンネルに接触する第1のセンサーと(ii)当該1つ以上の飛行時間型チャンネルの出力端の近位にある、当該1つ以上の飛行時間型チャンネルに接触する第2のセンサーとを少なくとも含む2つ以上のセンサーを有する。

【0027】

当該装置の生体分子プロセッサはさらに、当該固体基板の壁によってまた画定されるフィーダーチャンネルを含有し得る。当該フィーダーチャンネルは、当該固体基板の表面の近位にある入力端から、当該1つ以上のバイオリアクターチャンバーの近位にある出力端まで延在する長さを有する。

【0028】

一実施形態では、本発明の装置は、100～1,000個の生体分子プロセッサ、1,000～10,000個の生体分子プロセッサ、又は10,000～100,000個の生体分子プロセッサを含む。別の実施形態では、本発明の装置は、100,000個を超える生体分子プロセッサを含む。

【0029】

図1は、本発明の装置の生体分子プロセッサ10の平面模式図である。当該生体分子プロセッサは、試料に存在するバイオポリマー分子を同定し且つ/又はその配列決定を行うように共に機能する、種々のマルチスケールの流体ネットワーク並びにマイクロ構造及びナノ構造を含む。特に、当該生体分子プロセッサは、核酸分子又はタンパク質などのバイオポリマー分子を含有する試料を受け取ることができるフィーダーチャンネル20の入力端に位置する試料流入口28を有する。フィーダーチャンネル20はその出力端でバイオリアクターチャンバー14に流体的に連結されており、バイオリアクターチャンバー14はその中に、固体支持構造体16に固定化された切断酵素を含有する。当該切断酵素は、バイオポリマーがフィーダーチャンネル20からバイオリアクターチャンバーに入ると、当該バイオポリマーと結合してそれを単量体単位又は多量体単位へと切断する。切断された単量体単位又は多量体単位は、その後、流体的に連結された飛行時間型チャンネル24に入る。本明細書にさらに詳細に記載されているように、当該飛行時間型チャンネルは、切断された単量体単位又は多量体単位がチャンネルを通して動電学的に輸送されるとそれらを検出する、少なくとも2つのセンサー32、34を含有する。切断された単量体単位又は多量体単位が飛行時間型チャンネルにおける第1及び第2のセンサーを通過するのにかかる時間が、単量体又は多量体の「飛行時間」である。切断された単位の飛行時間を用いて、単量体若しくは多量体の単位及び/又はバイオポリマー分子の特徴付け及び/又は同定を行う。

【0030】

図2は、本発明の装置の生体分子プロセッサの斜視図である。この図には、当該装置のマイクロ流体成分を完全に封入する、当該生体分子プロセッサのカバー板が示されていない。

【0031】

生体分子プロセッサ10の固体基板12は、ポリマー物質又は他の成形可能な物質であり得る。好適なポリマー物質には、ポリ(メチルメタクリレート)(PMMA)、ポリカーボネート(PC)、エポキシ系樹脂、コポリマー、ポリスルホネート、エラストマー、環状オレフィンコポリマー(COC)、及び高分子オルガノシリコンが挙げられるが、これらに限定されない。或いは、生体分子プロセッサ10の固体基板12は、ガラス、シリカ、又は融合シリカ基板物質であり得る。

【0032】

図2を参照すると、生体分子プロセッサ10のフィーダーチャンネル20は、固体基板12内の壁によって画定されている。フィーダーチャンネル20は、入力端に試料流入口28

10

20

30

40

50

を有し、その出力端 18 にてバイオリアクターチャンバー 14 に流体的に連結されている。当該フィーダーチャンネルは、バイオポリマー分子（例えば、核酸分子 15）を受け取ってその方向を調整し、その後、当該分子を酵素処理のためにバイオリアクターチャンバーに供給する。

【0033】

1つ以上のバイオポリマー分子を含有する試料がフィーダーチャンネル流入口 28 を通って生体分子プロセッサに入る。当該試料流入口は、当該装置の別のモジュール又はコンポーネントから当該生体分子プロセッサ内へのバイオポリマー分子の捕捉及びロードを円滑にするために、種々の方法で構造的に改変され得る。例えば、試料流入口は、図 3A 及び 4A に示しているような試料マイクロ/マイクロ以下の溝型流入口、V 形状のマイクロ/マイクロ以下の溝型流入口、マイクロ/ナノピラーのアレイを有するピラー状の流入口、又は漏斗型の流入口であり得る。図 4B は、ナノチャンネル接続への急に露出したマイクロ流体ネットワーク（図 4B にて「オリジナル」として名前を付けられた）と比べて、改変された流入口構造が種々の駆動電圧でのフィーダーチャンネルへの DNA の捕捉及びロードの速度を有意に高めることを示すグラフである。

【0034】

本発明の一実施形態では、フィーダーチャンネルの寸法は幅 100 nm 以下及び深さ 100 nm 以下である。本発明の別の実施形態では、フィーダーチャンネルの寸法は幅 75 nm 以下及び深さ 75 nm 以下である。本発明の別の実施形態では、フィーダーチャンネルの寸法は幅 50 nm 以下及び深さ 50 nm 以下である。フィーダーチャンネルの長さは好ましくは約 1 μ m ~ 約 100 μ m 以上の範囲であるが、さらに長い及びさらに短いフィーダーチャンネルの長さも本発明の生体分子プロセッサには好適である。フィーダーチャンネルは任意の所望の幾何的断面、すなわち、円形、三角形、四角形、長方形、五角形、六角形、七角形又は八角形を有し得る。

【0035】

図 2 を参照すると、生体分子プロセッサのフィーダーチャンネルはさらに、フィーダーチャンネル 20 内でのバイオポリマー分子（例えば、核酸分子 15）の成形、引き伸ばし、及び位置決めを行うのに使用される 1 つ以上のエントロピートラップ 30 を含み得る。好適なエントロピー核酸トラップは当該技術で既知であり、例えば、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Han 及び Craighead, "Separation of Long DNA Molecules in Microfabricated Entropic Trap Array," Science, 288: 1026 - 1029 (2000)、O'Donnell ら、"Pressure-driven DNA Transport Across an Artificial Nanotopography," New Journal of Physics, 11: 075032 (2009)、並びに Reisner ら、"Direct Self-Organization of Single DNA Molecules in a Nanoslit via Embedded Nanopt Arrays," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 79 - 84 (2009) を参照のこと。

【0036】

フィーダーチャンネルはさらに、バイオリアクターチャンバーにおける下流の酵素的切断の前にバイオポリマー分子の方向を調整する又は処理するのに使用される 1 つ以上の事前処理チャンバー又はトラップを含有し得る。例えば、バイオポリマーが mRNA 分子であるならば、酵素的切断に好適な基質を生成するために、当該分子はキャップを取り除かれる又は脱アデニル化される必要がある。好適な処理酵素を、フィーダーチャンネルの壁又はバイオリアクターチャンバーの上流でのフィーダーチャンネル内に位置するバイオリアクターより前の処理チャンバーの壁に繋ぎ止める又は連結することができる。

【0037】

エントロピートラップ、フィーダーチャンネル、及び任意の他のバイオリアクター前処理チャンバーは、固定化された捕捉オリゴヌクレオチドも含有し得る。チャンネル、トラップ

10

20

30

40

50

又はチャンバーの中で壁又は支持構造体に固定化されているこれらの捕捉オリゴヌクレオチドは、チャンネルを介して供給されるバイオポリマー分子（例えば、核酸）の末端に対して相補的なホモポリマー反復配列を含み得る。固定化された捕捉オリゴヌクレオチドとバイオポリマー分子の相補的領域との間でのハイブリッド形成は、バイオポリマー分子がフィーダーチャンネルを通り抜ける際に当該分子の方向を調整するのを助ける。

【0038】

フィーダーチャンネル20はまた、当該フィーダーチャンネルと交差する1つ以上のセンサー26も含み得る。図1及び2に描かれている実施形態で示されているように、フィーダーチャンネル20は、センサー26（例えば、フィーダーチャンネル20に垂直である電気シグナルを測定することができるフィーダーチャンネル20の入力端の近位にある1対の検出電極）を含む。検出電極26のそれぞれは、生体分子プロセッサの外部の電気コンポーネントへの接続を提供するマイクロコンタクトパッド40に連結される。バイオポリマー分子15が検出電極26を通過すると、電気シグナルの乱れが検出され、この乱れの持続時間によって分子の長さの近似値が提供され得る（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるLiang et al., "Nanogap Detector Inside Nanofluidic Channel for Fast Real-Time Label Free DNA Analysis," Nano Lett. 8(5):1472-1476 (2008)）。

【0039】

生体分子プロセッサ10のフィーダーチャンネル20は、その出力端18にて、バイオリアクターチャンバー14に流体的に連結されている。図3Bは、バイオリアクターチャンバー14に連結された、エントロピートラップ30を含有するフィーダーチャンネル20の一部を示す、走査電子顕微鏡像（SEM）である。バイオリアクターチャンバー14も生体分子プロセッサの固体基板の壁によって画定され、約100～約1000nmの幅である。図3CのSEMに示されているように、バイオリアクターチャンバー14は、1種以上の切断酵素36（例えば、エキソヌクレアーゼ、エキソリボヌクレアーゼ、又はプロテアーゼ）が共有結合している支持構造体16（例えば、ピラー状のもの）を含有する。バイオリアクターチャンバーの支持構造体は、生体分子プロセッサの固体基板と同じ又は異なる材料を含み得る。一実施形態では、支持構造体はポリマー支持構造体（例えば、PMMA、PC又はCOCポリマー）である。バイオリアクターチャンバーの支持構造体は、幅約50nm～約900nm及び高さ約10nm～約100nmである。支持構造体の表面積は約1500～約285,000nm²である。支持構造体に固定化された切断酵素は、フィーダーチャンネル20の出力端18からバイオリアクターチャンバー14に入るバイオポリマー分子に結合し、切断する。いくつかの実施形態では、切断酵素は活性化を必要とし得る。活性化剤、例えば、Mg²⁺を含有する緩衝液又は電気泳動緩衝液は、バイオリアクターチャンバー14に流体的に連結された貯蔵チャンバー42にて保存される（図2）。

【0040】

図2Bは、バイオリアクター支持構造体16に固定化されており、かつ、核酸分子15と結合している、切断酵素36を示す。当該切断酵素は、当該技術で既知の標準のカップリングの化学的性質を用いて、バイオリアクターチャンバーの支持構造体に繋ぎ止められ得る。一実施形態では、当該酵素は、偶発的な固定化によって支持構造体に繋ぎ止められる（図5A）。種々の抗体に日常的に利用される確立されたカルボジイミド（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、EDC）の化学的性質を用いて、エキソヌクレアーゼ（New England Biolabs）又は他の酵素などの市販の切断酵素を固定化することができる（その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、McCarley et al., "Resist-Free Patterning of Surface Architectures in Polymer-Based Microanalytical Devices," J. Am. Chem. Soc. 127:842-843 (2005); Chen et al., "Functional Template-Derived Poly(methyl methacrylate) Nanopillars for Solid-Phase Biological Reactions," Chem. Mater. 19:3855-3857 (2007); および Wang et al., "Microarrays Assembled in Microfluidic Chips Fabricated From Poly(methyl methacrylate) for the Detection of Low-Abundant DNA Mutations," Anal. Chem. 75:1130-1140 (2003)）。

)。

【 0 0 4 1 】

本発明の別の実施形態では、当該切断酵素は好適な捕捉部分の固定化によって支持構造体に繋ぎ止められ、ここで当該酵素は、捕捉部分結合パートナーを含有する又は含有するように操作されている。例えば、一実施形態では、支持構造体の表面は、ヘキサヒスチジntagで操作された酵素を用いた酵素の固定化を可能にするNi(II)に結合した複数の捕捉リガンドを含有する(図5B)(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるDapprich, J., "Single-Molecule DNA Digestion by Lambda-Exonuclease," Cytometry 36:163-168 (1999))。1 - アセタト - 4 - ベンジル - トリアザシクロノナン(Ac b z t a c n)(その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Johnson & Martin, "Controlling Protein Orientation at Interfaces Using Histidine Tags: An Alternative to Ni/NTA," J. Am. Chem. Soc. 127:2018-2019 (2005); Warden et al., "Synthesis of Novel Derivatives of 1,4,7-Triazacyclononane," Organic Lett. 3:2855-2858 (2001))又はニトリロトリ酢酸(NTA)によって修飾されているCT - PMMAにNi(II)を配位させることによってNi(II)表面を生成することができる。CT - PMMAの表面をEDC / Ac b z t a c nに暴露してトリアザシクロノナンの2級アミンを介してPMMAへのAc b z t a c nのアミド結合を形成することによってAc b z t a c n - PMMA表面を形成することができる(図5Bを参照)(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるJohnson & Martin, "Controlling Protein Orientation at Interfaces Using Histidine Tags: An Alternative to Ni/NTA," J. Am. Chem. Soc. 127:2018-2019 (2005))。

【 0 0 4 2 】

切断酵素を支持構造体に繋ぎ止めるのに使用することができる別の捕捉と結合の組には、ビオチンとストレプトアビジン、マルトースとマルトース結合タンパク質、キチンとキチン結合タンパク質、アミラーゼとMBP、グルタチオントランスフェラーゼとグルタチオン - S - トランスフェラーゼ、インテグリンとインテグリン結合ペプチド、核酸オリゴヌクレオチド又は核酸類似体オリゴヌクレオチドとその相補的オリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 3 】

別の実施形態では、固定化抗体を用いて酵素が支持構造体に繋ぎ止められる。例えば、ヘキサヒスチジntagを含有するように操作されている切断酵素は、抗Hisタグ抗体を介して支持構造体に固定化することができる(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるPerkins et al., "Sequence-Dependent Pausing of Single Lambda Exonuclease Molecules," Science 301:1914-1918 (2003))。市販の抗ヒスチジntag抗体(Roche、Qiagen、又はNovagen)又は他の抗体の固定化は、種々の抗体に日常的に利用される確立されたカルボジイミド(1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、EDC)の化学的性質を用いて達成することができる(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるMcCarley et al., "Resist-Free Patterning of Surface Architectures in Polymer-Based Microanalytical Devices," J. Am. Chem. Soc. 127:842-843 (2005); Chen et al., "Functional Template-Derived Poly(methyl methacrylate) Nanopillars for Solid-Phase Biological Reactions," Chem. Mater. 19:3855-3857 (2007); 及び Wang et al., "Microarrays Assembled in Microfluidic Chips Fabricated From Poly(methyl methacrylate) for the Detection of Low-Abundant DNA Mutations," Anal. Chem. 75:1130-1140 (2003))。抗体による、操作されたペプチド捕捉配列を含有する酵素の捕捉の追加の実施形態には、抗FLAG抗体によるFLAGエピトープ; 及び抗Mycタグ抗体によるMycタグエピトープが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 4 】

切断酵素による支持構造体の表面被覆率は、固定化の前後での固定化溶液中のタンパク質含量の評価によって評価することができ(溶液差分法)(その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Smith et al., "Measurement of Protein Using Bicinchoninic

Acid," Anal. Biochem. 150:76-85 (1985); Stoscheck, C.M., "Quantitation of Protein," Methods in Enzymol. 182:50-68 (1990))、その活性は標準の速度論的方法を用いて測定されるであろう(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるChen et al., "Functional Template-Derived Poly(methyl methacrylate) Nanopillars for Solid-Phase Biological Reactions," Chem. Mater. 19:3855-3857 (2007))。

【0045】

本発明の一実施形態では、バイオリアクターチャンバーの固定化された切断酵素はエキソヌクレアーゼである。本明細書で使用されるとき、「エキソヌクレアーゼ」は、DNA分子又はRNA分子の末端からの単一ヌクレオチドの加水分解を触媒することができる任意の酵素を包含する。一実施形態では、エキソヌクレアーゼはプロセッシブな酵素であり、すなわち、それは鑄型を遊離させることなく、鑄型の一連の連続的な切断事象を触媒する。そのようなエキソヌクレアーゼは、単量体酵素、多量体酵素、又は複数のサブユニットで構成される酵素複合体であることができる。そのようなエキソヌクレアーゼには、5' - 3'の方向で二本鎖及び一本鎖のDNA基質を切断する - エキソヌクレアーゼ、3' - 5'の方向で一本鎖のDNA基質を切断するエキソヌクレアーゼI、3' - 5'の方向で二本鎖のDNA基質を切断するエキソヌクレアーゼII、5' - 3'の方向で二本鎖のDNA基質又はRNA/DNAハイブリッド基質を切断するT7エキソヌクレアーゼ; 5' - 3'の方向で一本鎖のRNA基質を切断するXRN - 1 (その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Geisler and Collier, "XRN1: A Major 5' to 3' Exoribonuclease in Eukaryotic Cells," Enzymes 31:97-110 (2012), Jinek et al., "Coupled 5' Nucleotide Recognition and Processivity in Xrn1-Mediated mRNA Decay," Mol. Cell 41:600-608 (2011), および Jones et al., "The 5' -> 3' Exoribonuclease XRN1/Pacman and its Functions in Cellular Processes and Development," WIREs RNA 3:455-468 (2012))、3' - 5'の方向で一本鎖のRNA基質を切断するRNase II (その全体が参照によって本明細書に組み入れられるZuo et al., "Structural Basis for Processivity and Single-Strand Specificity of RNaseII," Mol. Cell 24:149-156 (2006))、及び3' - 5'の方向で一本鎖のRNA基質を切断するエキソソーム複合体(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるLee et al., "Elastic Coupling Between RNA Degradation and Unwinding by an Exoribonuclease, Science 336:1726-1729 (2012))が挙げられるが、それらに限定されない。バイオリアクターチャンバーの支持構造体は前述のエキソヌクレアーゼ酵素のうち1種以上を含み得る。いくつかの実施形態では、酵素の組み合わせ(例えば、XRN - 1と組み合わせたエキソソーム複合体)は、RNA分子がバイオリアクターチャンバーに入ると、RNAの向き(すなわち、5' - 3'又は3' - 5')を問わずに確実にRNA分子を切断する。いくつかの実施形態では、プロセッシング前ステップ(例えば、メッセンジャーRNAのキャップを外してXRN - 1のための5'リン酸化基質を生成すること、又はメッセンジャーRNAを脱アデニル化してエキソソーム複合体に好適な基質を生成すること)が必要となり得る。そのような追加の酵素は、反応前チャンバー、フィーダーチャネルに存在するか、又はバイオリアクターチャンバーの支持構造体に連結され得る。

5'の方向で一本鎖のDNA基質を切断するエキソヌクレアーゼI、3' - 5'の方向で二本鎖のDNA基質を切断するエキソヌクレアーゼII、5' - 3'の方向で二本鎖のDNA基質又はRNA/DNAハイブリッド基質を切断するT7エキソヌクレアーゼ; 5' - 3'の方向で一本鎖のRNA基質を切断するXRN - 1 (その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Geisler and Collier, "XRN1: A Major 5' to 3' Exoribonuclease in Eukaryotic Cells," Enzymes 31:97-110 (2012), Jinek et al., "Coupled 5' Nucleotide Recognition and Processivity in Xrn1-Mediated mRNA Decay," Mol. Cell 41:600-608 (2011), および Jones et al., "The 5' -> 3' Exoribonuclease XRN1/Pacman and its Functions in Cellular Processes and Development," WIREs RNA 3:455-468 (2012))、3' - 5'の方向で一本鎖のRNA基質を切断するRNase II (その全体が参照によって本明細書に組み入れられるZuo et al., "Structural Basis for Processivity and Single-Strand Specificity of RNaseII," Mol. Cell 24:149-156 (2006))、及び3' - 5'の方向で一本鎖のRNA基質を切断するエキソソーム複合体(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるLee et al., "Elastic Coupling Between RNA Degradation and Unwinding by an Exoribonuclease, Science 336:1726-1729 (2012))が挙げられるが、それらに限定されない。バイオリアクターチャンバーの支持構造体は前述のエキソヌクレアーゼ酵素のうち1種以上を含み得る。いくつかの実施形態では、酵素の組み合わせ(例えば、XRN - 1と組み合わせたエキソソーム複合体)は、RNA分子がバイオリアクターチャンバーに入ると、RNAの向き(すなわち、5' - 3'又は3' - 5')を問わずに確実にRNA分子を切断する。いくつかの実施形態では、プロセッシング前ステップ(例えば、メッセンジャーRNAのキャップを外してXRN - 1のための5'リン酸化基質を生成すること、又はメッセンジャーRNAを脱アデニル化してエキソソーム複合体に好適な基質を生成すること)が必要となり得る。そのような追加の酵素は、反応前チャンバー、フィーダーチャネルに存在するか、又はバイオリアクターチャンバーの支持構造体に連結され得る。

3'の方向で一本鎖のRNA基質を切断するXRN - 1 (その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Geisler and Collier, "XRN1: A Major 5' to 3' Exoribonuclease in Eukaryotic Cells," Enzymes 31:97-110 (2012), Jinek et al., "Coupled 5' Nucleotide Recognition and Processivity in Xrn1-Mediated mRNA Decay," Mol. Cell 41:600-608 (2011), および Jones et al., "The 5' -> 3' Exoribonuclease XRN1/Pacman and its Functions in Cellular Processes and Development," WIREs RNA 3:455-468 (2012))、3' - 5'の方向で一本鎖のRNA基質を切断するRNase II (その全体が参照によって本明細書に組み入れられるZuo et al., "Structural Basis for Processivity and Single-Strand Specificity of RNaseII," Mol. Cell 24:149-156 (2006))、及び3' - 5'の方向で一本鎖のRNA基質を切断するエキソソーム複合体(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるLee et al., "Elastic Coupling Between RNA Degradation and Unwinding by an Exoribonuclease, Science 336:1726-1729 (2012))が挙げられるが、それらに限定されない。バイオリアクターチャンバーの支持構造体は前述のエキソヌクレアーゼ酵素のうち1種以上を含み得る。いくつかの実施形態では、酵素の組み合わせ(例えば、XRN - 1と組み合わせたエキソソーム複合体)は、RNA分子がバイオリアクターチャンバーに入ると、RNAの向き(すなわち、5' - 3'又は3' - 5')を問わずに確実にRNA分子を切断する。いくつかの実施形態では、プロセッシング前ステップ(例えば、メッセンジャーRNAのキャップを外してXRN - 1のための5'リン酸化基質を生成すること、又はメッセンジャーRNAを脱アデニル化してエキソソーム複合体に好適な基質を生成すること)が必要となり得る。そのような追加の酵素は、反応前チャンバー、フィーダーチャネルに存在するか、又はバイオリアクターチャンバーの支持構造体に連結され得る。

【0046】

本発明の別の実施形態では、バイオリアクターチャンバーの固定化された切断酵素はプロテアーゼ又はペプチダーゼである。本明細書で使用されるとき、「プロテアーゼ」及び「ペプチダーゼ」は相互に交換可能に使用され、ペプチド結合の加水分解によるタンパク質分解が可能な酵素を指す。好適なプロテアーゼには、セリンプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ(アスパラギン酸残基のアミノ側で切断する)、アスパラギンプロテアーゼ、リジンプロテアーゼ(リジン残基のカルボキシル側で切断する)、メタロプロテアーゼ、及びグルタミン酸プロテアーゼ(グルタミン酸又はアスパラギン酸のカルボキシル側で切断する)が挙げられるが、それらに限定されない。本発明での使用に好適である特定のプロテアーゼには、脂肪族残基、芳香族残基及び疎水性残基のカルボキシル側で切断するプロテイナーゼK、アスパラギン

ン酸残基及びグルタミン酸残基のカルボキシル側で切断する黄色ブドウ球菌のV - 8プロテアーゼ、アルギニン残基及びリジン残基のカルボキシル側で切断するトリプシン、並びに、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンのカルボキシル側で切断するキモトリプシンが挙げられるが、それらに限定されない。

【0047】

図2に示すように、バイオリアクターチャンバー14は、フィーダーチャンネル20の反対側に延びている出力チャンネル44に流体的に連結されている。出力チャンネル44は、切断されなかったバイオポリマー成分を回収するのに役立ち、例えば、バイオポリマー分子が二本鎖DNA分子であり、切断酵素によって一方の鎖のみのDNAが切断される場合、出力チャンネルは消化されなかった鎖のDNAを回収する。或いは、出力チャンネルは、消化されなかったバイオポリマー単位を回収し、それらを切断のために1つ以上の他のバイオリアクターチャンバーまで下流へと輸送する第2のフィーダーチャンネルとして役立ち得る。

10

【0048】

バイオリアクターチャンバー14はまた、生体分子プロセッサ10の固体基板12の壁によって画定される飛行時間型チャンネル24に流体的に連結されている。飛行時間型チャンネルの寸法は、幅50nm以下及び深さ50nm以下である。本発明の別の実施形態では、飛行時間型チャンネルの寸法は、幅25nm以下及び深さ25nm以下である。本発明の別の実施形態では、飛行時間型チャンネルの寸法は、幅15nm以下及び深さ15nm以下である。本発明の別の実施形態では、飛行時間型チャンネルの寸法は、幅10nm以下及び深さ10nm以下である。本発明の別の実施形態では、飛行時間型チャンネルの寸法は、幅5nm以下及び深さ5nm以下である。飛行時間型チャンネルは長さ1μm~250μm超又は長さ5μm~250μmであることができ、所望の幾何的断面、すなわち、円形、三角形、四角形、長方形、五角形、六角形、七角形又は八角形を有し得る。

20

【0049】

図2にて及び図3DのSEMにて示すように、飛行時間型チャンネル24は、少なくとも第1のセンサー32（例えば、飛行時間型チャンネル24の入力端22の近位にある、飛行時間型チャンネル24と交差する1対のナノ検出電極）と、第2のセンサー34（例えば、飛行時間型チャンネル24の出力端38の近位にある、飛行時間型チャンネル24と交差する1対のナノ検出電極）とを有する。各ナノ検出電極は、生体分子プロセッサの外部の電気コンポーネント及び検出コンポーネントに接続を提供するマイクロコンタクトパッド40に連結される。飛行時間型チャンネルは2個より多くのセンサーを含有し得る。図6Aにて示すように、飛行時間型チャンネル24は、少なくとも第1の電極32、第2の電極34、及び第3の電極33の電極（例えば、3対のナノ検出電極）を含み得る。図7にて示すように、飛行時間型チャンネルは3個より多くのセンサーを含み得る。

30

【0050】

飛行時間型チャンネルのナノ検出電極は、当該チャンネルに対して垂直の電氣的符号を測定することができる。本発明の一実施形態では、各電極対は、分子実体が電極間に滞留又は通過するときに電極間を流れる電流の変化を、溶液のコンダクタンス又はインピーダンスの変化により、検出することができる。

40

【0051】

本発明の装置は、1つ以上のバイオリアクターチャンバー内及び1つ以上の飛行時間型チャンネルの長さ方向に電場を生成するように機能的に配置された電場発生器も有する。バイオポリマー分子の切断された単位がバイオリアクターチャンバー14から出て飛行時間型チャンネルを通して動電的に輸送されるように、電場をバイオリアクターチャンバー14及び飛行時間型チャンネル24に印加する。切断された単量体単位又は多量体単位が飛行時間型チャンネル24を通して移動すると、それらは飛行時間型チャンネルにおける少なくとも第1のセンサー32、第2のセンサー34、及びさらなるセンサーによって検出される。核酸分子から切断されたモノヌクレオチドが3つのセンサーを含有する飛行時間型チャンネルを通り抜ける三次元図を図6Bに示す。本明細書に記載されているように、2つ以上の

50

センサーの間（例えば、第1及び第2のナノ電極対の間並びに／又は第2及び第3のナノ電極対の間）における各バイオポリマー単位の飛行時間を用いて、切断されたバイオポリマー単位が何であるかを同定し且つ／又は特徴づける。加えて、第1及び／若しくは第2又はそれより多くのセンサーによって検出される切断された単位の電気ピークの振幅もまた、切断されたバイオポリマー単位を同定し且つ／又は特徴づけるのを助けるのに用いられる。

【0052】

飛行時間型チャンネルを通るバイオポリマー単位の移動時間は、印加される電場、飛行時間型チャンネルの長さ、及び、バイオポリマー単位とチャンネル壁との相互作用の数、又は、個々のバイオポリマー単位の電気泳動移動度の差によって決定される。壁の相互作用又は電気泳動移動度が分子依存性である場合（例えば、モノヌクレオチド塩基）、飛行時間は、バイオポリマー単位が何であるかの直接的な指標を提供するであろう。

【0053】

バイオポリマー単位と飛行時間型チャンネルの壁との間の分子特異的な相互作用は、飛行時間型チャンネルの壁の組成及び官能化によって制御することができる。一実施形態では、飛行時間型チャンネルの壁は修飾を伴って又は伴わずに基板と同じ組成を含む。或いは、飛行時間型チャンネルの壁は、修飾を伴って又は伴わずに基板と異なる組成を含む。別の実施形態では、分子依存性の飛行時間は、各切断されたバイオポリマー単位の独自の電気泳動移動度によって決定され、したがって壁の相互作用は必要とされない。

【0054】

本発明の一実施形態では、飛行時間型チャンネルは、ポリマー物質、例えば、PMMA、PC、エポキシ系樹脂、コポリマー、ポリスルホン、エラストマー、及び高分子オルガノシリコン、又はこれらの物質の組み合わせを含む。高分子物質は未変性の状態であってもよく、又は代わりにバイオポリマー単位の識別を向上させるように改質された表面であってもよい。例えば、ポリマーの飛行時間型チャンネルの壁は、異なる程度の鎖規則性を有する中性で疎水性の炭化水素表面を含み得る。別の例では、飛行時間型チャンネルの壁表面は、電荷中性の親水性表面を含み得る。さらに別の例では、飛行時間型チャンネルの壁表面は、荷電した親水性表面を含み得る。

【0055】

異なる程度の鎖規則性を有する中性で疎水性の炭化水素表面を含む飛行時間型チャンネルの壁表面は、ポリマーのナノチャンネル表面に作られる種々の長さを有するメチルで終端するアルカン鎖の単層によって形成することができる（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるHenry et al., "Surface Modification of Poly(methyl methacrylate) Used in the Fabrication of Microanalytical Devices," Anal. Chem. 72:5331-5337 (2000)）。当該単層は、カルボン酸終端表面へのアミノアルカンの連結によって形成することができる（その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、McCarley et al., "Resist-Free Patterning of Surface Architectures in Polymer-Based Microanalytical Devices," J. Am. Chem. Soc. 127:842-843 (2005); Wei et al., "Photochemically Patterned Poly(methyl methacrylate) Surfaces Used in the Fabrication of Microanalytical Devices," J. Phys. Chem. B 109:16988-16996 (2005)）。或いは、当該単層は、アミド結合を介してポリマーに連結されたアミン官能基上で尿素に連結したアルカン層から形成することができる（その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Henry, A.C., "Surface Modification and Characterization of PMMA Used in the Construction of Microelectromechanical Systems," In Chemistry, pp. 147, Louisiana State University, Baton Rouge (2001); Henry et al., "Surface Modification of Poly(methyl methacrylate) Used in the Fabrication of Microanalytical Devices," Anal. Chem. 72:5331-5337 (2000)）。例えば、良好に秩序立ったオクタデシル単層は、アミンで終端したPMMA表面とn-オクタデシルイソシアネートの反応によってPMMA表面上に形成することができる（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるHenry & McCarley, "Selective Deposition of Metals on Plastics Used in the Construction of Microanaly

10

20

30

40

50

tical Devices: Photo-Directed Formation of Metal Features on PMMA," J. Phys. Chem. B 105:8755-8761 (2001))、これらのC₁₈-PMMA表面は、エンボス加工されたチャンネルにおけるクロマトグラフィ分離に優れている(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるGalloway et al., "Contact Conductivity Detection in Poly(methyl methacrylate)-Based Microfluidic Devices for Analysis of Mono- and Polyanionic Molecules," Anal. Chem. 74:2407-2415 (2002))。従って、種々の鎖長のn-アルキルイソシアネートを用いて異なる程度の規則性を持つ疎水性のポリマー表面を作ることができ、それは単量体(例えば、dNMP)の飛行時間に影響するであろう。ゼロではない電気浸透流(EOF)に関する課題には、未反応の土台基にキャップをすることによって対処することができる(その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Henry, A.C., "Surface Modification and Characterization of PMMA Used in the Construction of Microelectromechanical Systems," In Chemistry. Louisiana State University, Baton Rouge (2001); Wei et al., "Photochemically Patterned Poly(methyl methacrylate) Surfaces Used in the Fabrication of Microanalytical Devices." J. Phys. Chem. B 109:16988-16996 (2005))。

【0056】

後半2つの目的は、(a)グリコール及び(b)有機酸又はアミン末端を持つ物質を、カルボキシル又はアミンで終端するポリマー表面に連結することによって達成される。親水性の電荷中性の表面を生成するアプローチの1つには、適切に活性化されたカルボン酸で終端するポリマー表面を、エタノールアミン又はアミノ-トリ(エチレングリコール)と反応させることが含まれる(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるWei, S., "Multianalyte Detection of Breast Cancer by Fabrication of Hybridmicroarrays on Polymer-based Microanalytical Devices," In Chemistry. Louisiana State University, Baton Rouge (2005))。代替として、アミンで終端するPMMA及びPC表面を、表面に生成されたカルボキシル基を有するグリコール(例えば、グリコール酸又はカルボキシル-トリ(エチレングリコール))によって修飾することができる。カチオン表面(エキソヌクレアーゼに使用されるpH条件での)は、アミンで終端するポリマーを製造するための確立された方法を用いて形成することができる(その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Henry & McCarley, "Selective Deposition of Metals on Plastics Used in the Construction of Microanalytical Devices: Photo-Directed Formation of Metal Features on PMMA," J. Phys. Chem. B 105:8755-8761 (2001); Henry et al., "Surface Modification of Poly(methyl methacrylate) Used in the Fabrication of Microanalytical Devices," Anal. Chem. 72:5331-5337 (2000); McCarley et al., "Resist-Free Patterning of Surface Architectures in Polymer-Based Microanalytical Devices," J. Am. Chem. Soc. 127:842-843 (2005); Wei et al., "Photochemically Patterned Poly(methyl methacrylate) Surfaces Used in the Fabrication of Microanalytical Devices." J. Phys. Chem. B 109:16988-16996 (2005))。アニオン表面は、カルボン酸で終端する表面(その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、McCarley et al., "Resist-Free Patterning of Surface Architectures in Polymer-Based Microanalytical Devices," J. Am. Chem. Soc. 127:842-843 (2005); Vaidya et al., "Surface Modification and Characterization of Microfabricated Poly(carbonate) Devices: Manipulation of Electroosmotic Flow," Analyst 127:1289-1292 (2002))又はスルホン酸を有する表面のうちいずれかをもたらす経路から生じるであろうし、後者はほぼpHに無関係な表面電荷を有する(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるHenry, A.C., "Surface Modification and Characterization of PMMA Used in the Construction of Microelectromechanical Systems," In Chemistry, pp. 147, Louisiana State University, Baton Rouge (2001))。

【0057】

ほとんどの修飾化学は、官能基で構成される足場(例えば、カルボキシ基)の生成をベースとし、活性化されるつもりではない領域をマスクしてこのアセンブリをUV露光する

ことによって基板上の特定の位置のみが活性化されるという点で、領域特異的にパターン形成することができる（その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、McCarley et al., "Resist-Free Patterning of Surface Architectures in Polymer-Based Microanalytical Devices," J. Am. Chem. Soc. 127:842-843 (2005); Wei et al., "Photochemically Patterned Poly(methyl methacrylate) Surfaces Used in the Fabrication of Microanalytical Devices. J. Phys. Chem. B 109:16988-16996 (2005)）。マスクすること、固体支持体基板の残りとその中の構造体を元の形態のままにすることによって、単層要素をナノチャネルドメインのみに選択的に固定化することができる。ナノチャネルの寸法は活性化光（254 nm）の回折限界を下回るが、チャネルの長さは回折限界を十分上回り、これが限界寸法である。

10

【0058】

図7にて示すように、本発明の装置の生体分子プロセッサは、共に連結された複数の飛行管を含み得る。各飛行管は、飛行時間型チャネルの一部によって分離されたセンサーを有する。各飛行管は、切断されたバイオポリマー単位と特異的に相互作用する特有の又は異なる化学的性質を特徴とする。この設計形式によって、個々のバイオポリマー単位の同定及び特徴づけを向上させる多次元的なバイオポリマー単位の分離が可能になる。さらに、そのような装置は、投入試料中の1つ以上のタンパク質のタンパク質分解から生成されたペプチド断片のフィンガープリントを生成するのに使用され得る。2つ以上のセンサー及び/又は2つ以上の飛行管（チャネル当たり1つ以上の飛行時間測定値を生成する異なる壁表面化学的性質を有する）を有する飛行時間型チャネルを用いることによって、考えられるタンパク質及びその修飾体すべてを所与の画分から本質的に区別する非常に洗練されたペプチドのフィンガープリント（例えば、2次元（4つのセンサーを使用）、3次元（6つのセンサーを使用）、又は4次元（8つのセンサーを使用）のフィンガープリント）が作り出される（図7を参照）。

20

【0059】

上で記載したように、飛行時間型チャネルにおけるセンサーは、切断されたバイオポリマー単位がチャネルを通過するとき、それらを検出することができる。本発明の一実施形態では、各センサーは、1対の貴金属ナノワイヤ、セグメント化されたナノワイヤ、又はナノ粒子から形成された、チャネルを横切るナノギャップによって分離された1対の検出電極を含む。本発明の別の実施形態では、各1対の検出電極は狭い断面を有し、それらは飛行時間型チャネルに接触する。ナノワイヤは、50 nm未満、好ましくは約30 nm未満、さらに好ましくは約10 nm未満である直径を有する。本発明の別の実施形態では、ナノワイヤは約5 nm～約20 nmの間の直径を有する。検出電極間の空間、すなわち、ナノギャップは1 nm～10 nmの間であり、いくつかの実施形態では、1 nm～5 nmの間である。検出電極及びギャップの寸法は、多量体又は単量体の単位についてのシグナル対ノイズ比を制御し、ナノワイヤ及びギャップの寸法が小さければ小さいほど、高いシグナル対ノイズ比が得られる（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるLiang et al., "Nanogap Detector Inside Nanofluidic Channel for Fast Real-Time Label-free DNA Analysis," Nano Letters 8: 1472-1476 (2008), Tsutsui et al., "Identifying Single Nucleotides by Tunneling Current," Nature Nanotechnology 5: 286-290 (2010); Ohshiro et al., "Single-Molecule Electrical Random Resequencing of DNA and RNA," Scientific Reports 2: 1- 7 (2012)）。

30

40

【0060】

本明細書にさらに詳細に記載されているように、ナノワイヤは金属成分の組み合わせから形成されるセグメント化されたナノワイヤであってもよい。例となる組み合わせには、金（Au）とコバルト（Co）（Au/Co）及びAuと白金（Pt）が挙げられるが、それらに限定されない。

【0061】

生体分子プロセッサは本発明の装置の1つのモジュール又はコンポーネントであり、上で言及されたように、当該装置は、100～100,000個の生体分子プロセッサ又は

50

100,000個より多くの生体分子プロセッサを含有し得る。当該生体分子プロセッサは当該装置の1つ以上の初期段階の処理モジュールと連動してバイオポリマーの解析のための高度に統合されたシステムを生成することができる。モジュール設計のアプローチによって、システムにおける異なるモジュールを上手く組み合わせて応用ニーズに合わせる機会が可能になる。加えて、モジュールは自律的なので、それらはシステムレベルでの統合の前に性能測定基準に関して最適化することができる。当該装置の初期段階の処理モジュールには、例えば、細胞溶解物からの核酸(DNA及びRNA双方)の固相抽出のためのモジュール(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるWitek et al., "96-Well Polycarbonate-Based Microfluidic Titer Plate for High-Throughput Purification of DNA and RNA," Analytical Chemistry 80:3483-3491 (2008); Park et al., "A Titer Plate-Based Polymer Microfluidic Platform for High Throughput Nucleic Acid Purification," Biomedical Microdevices 10:21-33 (2008))又はタンパク質/ポリペプチドの単離及び濃縮のためのモジュール、生体分子プロセッサに入れるために核酸を適当なサイズに切断するためのモジュール、熱増幅モジュール(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるHashimoto et al., "Rapid PCR in a Continuous Flow Device," Lab On A Chip 4:638-645 (2004); Hashimoto et al., "Ligase Detection Reaction/Hybridization Assays Using Three-Dimensional Microfluidic Networks for the Detection of Low-Abundant DNA Point Mutations," Analytical Chemistry 77:3243-3255 (2005))、稀少細胞選択モジュール(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるAdams et al., "Highly Efficient Circulating Tumor Cell Isolation From Whole Blood and Label-Free Enumeration Using Polymer-Based Microfluidics With an Integrated Conductivity Sensor," J. Am. Chem. Soc. 130:8633-8641 (2008); Dharmasiri et al., "Capture and Enumeration of LNCaP Prostate Cancer Cells Using Aptamers Immobilized to a PMMA Microsampling Unit," Electrophoresis 30:3289-3300 (2009))、及びDNAアレイ(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるXu et al., "Polymer Microfluidic Chips with Integrated Waveguides for Reading Microarrays," Analytical Chemistry 79:9007-9013 (2007))が挙げられるが、それらに限定されない。

【0062】

本発明の別の態様は、生体分子プロセッサを含有する本発明の装置を用いて核酸分子の配列決定を行う方法を対象とする。当該方法は、1つ以上の核酸分子を含有する試料を、当該装置の生体分子プロセッサに、固定化された切断酵素が試料中の1つ以上の核酸分子と結合し、当該1つ以上の核酸分子を切断して(1つ以上の飛行時間型チャンネルの入力端に1つずつ入る)単量体ヌクレオチドにするのに有効な条件下で供給する工程を含む。当該方法は、切断された単量体ヌクレオチドを1つ以上の飛行時間型チャンネルを通して輸送するために、1つ以上のバイオリアクターチャンバーを横切って及び1つ以上の飛行時間型チャンネルの長さ方向に電場を印加する工程をさらに含む。切断された単量体ヌクレオチドは、それらが1つ以上の飛行時間型チャンネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過するとき、前記印加する工程に基づいて検出される。各切断された単量体ヌクレオチドが1つ以上の飛行時間型チャンネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過するのにどれくらい時間がかかるのかを測定し、測定する工程に基づいて、切断された単量体ヌクレオチドが同定される。

【0063】

上で記載されたように、当該装置の生体分子プロセッサはさらに、バイオリアクターチャンバーに流体的に連結されたフィーダーチャンネルを含有し得る。フィーダーチャンネルは、バイオリアクターチャンバーにおける切断の前に核酸分子の方向を調整して引き延ばす1つ以上のエントロピートラップ及び前処理チャンバーを含有することができる。従って、本発明のいくつかの実施形態では、1つ以上の核酸分子を含む試料がフィーダーチャンネルのチャンネル試料流入口に導入される。フィーダーチャンネルの長さ方向に電場が印加され、核酸分子がバイオリアクターチャンバーに入る前にフィーダーチャンネルを通して核酸分子を引き延ばす。

【0064】

本発明の方法及び装置を用いて配列決定することができる核酸分子には、デオキシリボ核酸（DNA）分子及びリボ核酸（RNA）分子が挙げられるが、それらに限定されない。具体的には、二本鎖DNA、一本鎖DNA分子、1つ以上のメチル化されたヌクレオチド塩基を含むDNA及びRNAの分子、1つ以上の修飾又は損傷を受けたヌクレオチド塩基を含むDNA及びRNAの分子。特に、本発明の方法は、特に少量で試料に存在する場合、1つ以上のヌクレオチド塩基の挿入、欠失、転座及び変異を含むDNA及びRNAの分子を容易に同定することができる。1つ以上の核酸分子が二本鎖DNA分子である場合、本発明の方法は二本鎖DNA分子の双方の鎖に由来する単量体ヌクレオチドの少なくとも一部を同定する能力を提供する。本発明の方法を用いて配列決定することができるRNA分子には、例えば、長い非コードRNA（lncRNA）、リボゾームRNA（rRNA）、小分子核RNA（snRNA）、マイクロRNA（miRNA）、転移RNA（tRNA）、及び小分子干渉RNA（siRNA）、及びRNA/DNAハイブリッド分子が挙げられる。1つ以上の核酸分子は、組織、細胞、血清、血漿、血液又はエキソソームを含むが、限定されない生物供給源から単離することができる。

10

【0065】

核酸分子の配列決定のためには、バイオリアクターチャンバーにおける切断酵素はエキソヌクレアーゼ又はエキソリボヌクレアーゼである。好適なエキソヌクレアーゼ及びエキソリボヌクレアーゼは上で記載されている。核酸分子の配列決定については、切断酵素は好ましくは、それがバイオリアクターチャンバーに入るとき、核酸分子と結合し、核酸分子を単量体単位、すなわち、個々のヌクレオチド塩基に順に切断するプロセッシブなエキソヌクレアーゼ又はエキソリボヌクレアーゼである。切断された単量体単位は、動電的にバイオリアクターチャンバーを出て、飛行時間型チャンネルの中に及びそれを通して輸送され、そこでそれらはセンサーによって検出され、チャンネルを通るその飛行時間に基づいて同定される。

20

【0066】

本明細書の実施例にさらに詳細に記載されているように、溶液中の各ヌクレオチド塩基（例えば、デオキシヌクレオチド5'-リン酸塩基）は飛行時間型チャンネルを通して移動し、個々の分子の同一性及びチャンネルの表面の化学的同一性（例えば、異なる程度の鎖規則性を有する中性で疎水性の炭化水素表面 v s 電荷中性の親水性表面 v s 上で記載されたような荷電した親水性表面）に依存する方法でチャンネルの壁と相互作用する。その結果、各モノヌクレオチド塩基は、チャンネルの少なくとも2つの空間的に分離したセンサーによって検出および測定される、飛行時間型チャンネルの通過時間に基づいて区別される。各モノヌクレオチド塩基の電気ピークの振幅が異なり得るので（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるTsutsui et al., "Identifying Single Nucleotides by Tunneling Current," Nat. Nanotech. 5:286-290 (2010)）、センサーの少なくとも1つを通過する際の各切断されたモノヌクレオチド塩基の電気ピークの振幅を測定することもできる。この測定をモノヌクレオチドの飛行時間と併せて用いて、塩基が飛行チャンネルを通り抜ける際に当該塩基を同定することができる。

30

【0067】

別の分析では、単一のモノヌクレオチドは飛行管と相互作用しなくてもよいが、それでも分子依存的な飛行時間を示す。モノヌクレオチドは飛行管を通して電気的に運ばれるので、電気泳動移動度で差異を示すことができ、それによって壁相互作用を必要とすることなく、特定のモノヌクレオチドに依存する固有の飛行時間を示す。いずれの形式でも、飛行時間は検出電極対の間の移動時間から推定される。

40

【0068】

本発明の一実施形態では、飛行時間型チャンネルは、2つのセンサー（例えば、2対のナノ検出電極）を有し、それは、個々のヌクレオチド単量体が飛行時間型チャンネルを通り抜ける際にその飛行時間を測定する。例示の目的のみで、2つの電極間の間隔が10 μm（ミクロン）であり、印加される電圧が10,000 V/cmである場合、4つのモノヌク

50

レオチドは以下の平均飛行時間値を有することとなる（従来のキャピラリー電気泳動の結果に基づいて）。

GMP : 242 μ s (マイクロ秒)

AMP : 246 μ s

CMP : 254 μ s

TMP : 266 μ s

【0069】

各ランについては、所与のモノヌクレオチドは規定の飛行時間値を有するであろう。従って、バイオポリマーの個々の単量体単位の飛行時間値はガウス分布を示すであろう。

【0070】

別の実施形態では、飛行時間型チャンネルは、ナノチャンネルに沿ってほぼ同等の間隔で3つ以上のセンサー（例えば、3つ以上のナノ検出電極対）を含有する（図6A～6Bを参照）。切断されたバイオポリマー単位は飛行時間型チャンネルに入ると第1のセンサーのそばを通り、当該センサーによって、第1のシグナルを与えるよう測定され得る第1の電気的符号が生じる。第1のシグナルは特定の時間に生じ、所与の形状及び振幅も有する。バイオポリマー単位が飛行時間型チャンネルを通過し続けると、それは第2のセンサーのそばを通り、これによって第2の電気的符号が生じ、第2のシグナルを与えるよう測定され得る。第2のシグナルはある特定の時間に生じ、所与の形状及び振幅も有する。このプロセスは第3のセンサーまで、及び第nのセンサーまで反復する。この実施形態によれば、3つのシグナルが得られ、各センサー間（1、2又は1、3又は2、3）の飛行時間を算出することができる。これは3つの飛行時間数及び3つの独立したシグナル符号を提供する。

【0071】

センサー1及び3の間の飛行時間はセンサー1及び2の間の飛行時間とセンサー2及び3の間の飛行時間との合計を表すので、3つの飛行時間数は互いに依存する。にもかかわらず、移動した距離で飛行時間を割ると、2つの独立した速度、並びに各バイオポリマー単位についての平均速度が得られる。n個の電極については、(n-1)個の独立した速度が得られ、電極の数を制御することによって各平均値の統計的な完全性が制御される。これによって飛行時間型ナノチャンネルに入る所与のバイオポリマー単位についてのコール精度を有意に改善することが可能になる（エラー率を0.25%に減らす）。さらに、振幅及び形状の追加の特徴（シグナルの増減）はバイオポリマー単位のコールの潜在的にさらなる検証の機会を提供する。例えば、AMPとCMPについての飛行時間が当該時間の2%重複するのであれば、3つのシグナルの特徴がさらなる区別に役立つであろう。

【0072】

あるバイオポリマー単位が、壁に吸着するか又はその電気泳動移動度で大きな差異を示し、且つ、別のバイオポリマー単位が飛行時間型チャンネル内にある間に離れる場合、これは順序間違いエラーをもたらし得る。しかしながら、2対より多くの検出電極の使用は直ちにこのエラーを指摘するであろう。複数の検出部の使用はベースコールの精度を有意に改善するであろう。それは、飛行時間型チャンネルに入る前に生じ得るエラー（例えば、塩基の喪失又は順序間違いエラー）については訂正できない。そのようなエラーは、本明細書で明確に述べられるように、二本鎖標的DNAの双方の鎖を配列決定することによって減らすことができる。

【0073】

飛行時間型チャンネルはさらに、共に連結された複数の飛行管を含み得、各飛行管は、固有の壁表面化学的性質を有する飛行時間型チャンネルの一部によって分離された少なくとも2つのセンサーから成る。飛行時間型チャンネル内の連結された飛行時間管の種々の構成が、多次元的な分離を提供する（図7を参照）。異なる表面化学的性質を含むチャンネルを通るバイオポリマー単位の飛行時間の測定値を得ることは、非常によく似たモノヌクレオチド間（例えば、メチル化又はヒドロキシメチル化された塩基と、メチル化されていない塩基との間）の区別を高めるであろう。

【 0 0 7 4 】

このプロセスを、順に切断された単量体ヌクレオチド塩基のそれぞれについて繰り返し、試料中の1つ以上の核酸分子の少なくとも一部のヌクレオチド配列の少なくとも一部を得る。いくつかの実施形態では、試料中の1つ以上の核酸分子の少なくとも一部のヌクレオチド配列全体が得られる。当該方法の印加する工程、検出する工程、測定する工程、及び同定する工程を繰り返して、試料中の1つより多くの核酸分子の少なくとも部分的なヌクレオチド配列を得る。いくつかの実施形態では、当該方法は、試料中の1つより多くの核酸分子のヌクレオチド配列全体又は実質的に全体を得ることができる。

【 0 0 7 5 】

現在利用可能な技術の一部を悩ます問題は、稀な変異又はメチル化の事象（例えば、プロモータの高メチル化若しくは低メチル化、又は全DNAの1%～0.01%で存在する変異）を正確に検出できないことである。例示の目的で、p53遺伝子に変異を含む血漿中で循環している腫瘍DNAの存在、又は変異し得る100個の遺伝子のいずれかが若しくはそのタイプの腫瘍でメチル化され得る100個のプロモータ領域のいずれかの存在を考慮する。そのような試料は正常な細胞から生じる無細胞DNAの大半を含有し、腫瘍DNAは無細胞DNA全体のわずか0.01%を構成し得るにすぎない。従って、全配列決定によってそのような変異体DNAの存在を見つけようと試みたとしても、変異を含む10個のゲノムを同定するには100,000個のゲノムの配列決定が必要である。これは、DNAの300,000GBの配列決定を必要とし、現在の配列決定技術には手が届かない課題であり、巨大なデータ管理の問題は言うまでもないことである。この問題を回避するために、多数のグループが特定の標的領域を捕捉しよう又は対象の領域をPCRで増幅しようと試みている。配列捕捉には脱落の問題が伴い、所望の配列のおそらく90～95%は捕捉されるが、所望の断片が欠落する。或いは、PCR増幅は、真の変異と区別できない稀なエラーを導入するリスクをもたらす。さらに、PCRは、メチル化及びヒドロキシメチル化の情報を失う。従来、亜硫酸水素塩処理を用いてプロモータのメチル化の存在を決定しているが、それもまたDNA試料に破壊的であり、無細胞DNAにおける複数のメチル化の変化を同定する能力を欠く。

【 0 0 7 6 】

単一分子の配列決定は前述の配列決定の限界の一部をなしで済ませることができるが、従来の単一分子の配列決定の主な限界は、これらの技法のほとんどに伴う高いエラー率である。エキソヌクレアーゼに基づく配列決定を使用する場合、一本の鎖が破壊され、二本鎖DNAの双方の鎖を配列決定して変異又はメチル化の状態を検証することを妨げる。これは、エキソヌクレアーゼに基づく配列決定で特に難題であり、それは、プロセス的な様式のヌクレアーゼ活性によって確実にモノヌクレオチドだけを生成するために、5'リン酸及び二本鎖DNA基質を必要とする。以下に記載されている本発明の方法は、核酸分子の双方の鎖における標的領域の直接捕捉、濃縮、及び配列決定を可能にする幾つかのアプローチを提供し、それは、非常に量の少ない変異又は配列差異の優れた校正及び確認を提供し、それによって現在の配列決定技術の上述の限界を克服する。

【 0 0 7 7 】

従って、本発明の別の態様は、試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法を対象とする。特に、当該方法は、試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上の配列差異を同定することを可能にする。この方法には、そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれぞれハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供することが含まれ、その際、1つ以上の核酸分子及びそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれは、標的特定の部分とヘアピン形成に好適な一本鎖3'アダプター部分を含む。試料は、1つ以上の核酸分子及びその相補体の3'アダプター部分がヘアピンを形成するのに有効な条件に供される。当該方法にはさらに、ポリメラーゼを提供する工程、並びに、伸長混合物を形成させるために1つ以上の3'ヘアピン化された核酸分子及びその相補体とポリメラーゼとを混合する工程が含まれる。1つ以上の核酸分子及びその相補体は、それぞれその3'ヘアピン化領域から伸長されて1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を形成する。当該方

法にはさらに、1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子の少なくとも一部の配列決定を行って試料中の1つ以上の核酸分子の1つ以上を同定することが含まれる。

【0078】

本発明のこの態様によれば、提供される試料は、同定されるべき1つ以上の潜在的な配列差異を含有する1つ以上の核酸分子及びその相補体を含有する。試料中の核酸分子は、断片化された核酸分子の各末端にアダプター（すなわち、ヘアピン形成に好適な3'アダプター部分）を付加するように無作為に断片化され、処理され得る。例えば、平滑末端である又は平滑にしたDNA分子の末端をT4ポリメラーゼ又は大腸菌ポリメラーゼ及びT4キナーゼなどの種々の酵素を用いてリン酸化することができる。3' 5'の校正活性がないポリメラーゼ（例えば、クレノウ（エキソ））を用いて3'末端に追加の「A」を付加して単一塩基3'オーバーハングを生成させる。核酸分子及びその相補体にアダプター部分を付加することは、当該技術で既知の種々の酵素反応のいずれかを用いて達成される。好適な酵素には、リガーゼ（例えば、大腸菌リガーゼ又はT4DNAリガーゼ）、ポリメラーゼ（Taqポリメラーゼ、T4ポリメラーゼ、又は大腸菌ポリメラーゼ）、リコンビナーゼ、ターミナルトランスフェラーゼ、エンドヌクレアーゼ、DNA修復酵素、及び逆転写酵素が挙げられるが、それらに限定されない。

【0079】

本発明のこの態様によれば、3'アダプター部分はヘアピン形成に好適な配列を含有する。さらに、アダプター部分は1種以上の一意のヌクレオチド配列タグ（例えば、患者を同定する配列タグ及び/又は鎖を同定する配列タグ）を含有し得る。別の任意の特徴は、散在している無作為配列を有するアダプターを設計するので、いったんアダプターが伸長されて一本鎖にされると、互いにハイブリッド形成する各末端におけるアダプターのために、それらはフライパンの取っ手のような構造を形成しない。これはまた、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を持つポリメラーゼを使用するのであれば、3'ヘアピン化末端の伸長の間に断片の一方の側におけるアダプター識別子領域が偶然に破壊される機会も減らす。

【0080】

例示のみの目的で、本発明のこの態様での使用に好適なアダプター部分を以下に描いている。この例では、任意の患者識別配列は6塩基、すなわち、CGTGAC（4,096種の異なる識別子タグを可能にする）であり、下線が引かれている。示されているように、患者識別配列は、散在している無作為なヌクレオチドを含有する（すなわち、患者同定領域内に「N」塩基を含有する（CGNTNGNANC；配列番号1のヌクレオチド1～10））。4つの「N」の使用は256倍の多様性を提供し、断片の両端に同じアダプター配列を有する機会を有意に減らす。断片識別配列は10塩基（1,048,576通りの異なる組み合わせを可能にする）であり、四角で囲ったNの文字列によって示されている。ヘアピン配列は太字で示している。さらに短いオリゴヌクレオチド（すなわち、配列番号2）は3'末端に追加の「T」を含有するので、アダプターは、Aが尾部の断片へのライゲーションに好適である。

(SEQ ID NO: 1) 5'p CGNINGNANCNNNNNNNNNN**CCGAGC** N
 (SEQ ID NO:2) 3' TCCNANCNING 5' 3' **GGCTCG** N

【0081】

各セットについて規定の患者識別配列及びヘアピン配列を用いてオリゴヌクレオチドアダプターを合成するが、残りの塩基は4つの塩基すべての混合物として付加されて、各断片に一意の識別子の組み合わせを与えるのに必要な多様性を提供する。

【0082】

図8Aは本発明のこの態様を説明する模式図である。この例では、ステップ2において、患者識別配列とヘアピン化領域を含有するアダプター部分を各DNA断片（すなわち、1つ以上の核酸分子とその相補体のそれぞれ）の末端に付加する。5' 3'エキソヌクレ

アーゼ活性又は鎖置換活性を有するポリメラーゼを用いて、各断片の3'ヘアピン化末端を伸長させることができ(ステップ3)、それによって1つ以上の核酸分子をそれぞれの相補体核酸分子から解離させる。或いは、ポリメラーゼ酵素による伸長の前に、ハイブリッド形成した相補体から3'ヘアピン化核酸分子を変性させることができる。この実施形態では、エキソヌクレアーゼ活性又は鎖置換活性を欠くポリメラーゼを利用することができる。3'ヘアピン化末端の伸長後、得られた二本鎖ヘアピン化DNA分子は、本発明の装置を用いた配列決定に最適である。

【0083】

核酸断片の両端に一意の配列識別子を付加する代替のアプローチは、「二本鎖配列決定(DuplexSequencing)」について最近開発されている(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるSchmitt et al., "Detection of Ultra-Rare Mutations by Next-Generation Sequencing," Proc Natl Acad Sci U S A 109(36):14508-13 (2012))。この方法は、12塩基のランダムタグを含有する二本鎖リンカーの使用に基づく。入力標的DNAの上下双方の鎖を増幅することによって、所与の断片は、配列決定により追跡され得るように一意の識別子(各末端にて12塩基で構成される)を得る。一意のタグセットを共有する配列の読み取り情報は、上の鎖又は下の鎖のいずれかの向きで鎖識別子を有するメンバーを有する対になったファミリーにグループ分けされる。各ファミリー対は、二本鎖DNA断片1つの増幅を反映する。1つのみ又はわずかなファミリーメンバーに存在する変異は、配列決定の誤り又はPCRにより導入されたエラー(増幅の後半に生じている)を表す。対になった1つのファミリーの多数又は全てのメンバーで生じている変異は、変異誘発性のDNA損傷部位にわたってコピーする場合に生じ得るような、1回目の増幅の間のPCRエラーから生じる。一方、DNA断片の双方の鎖に存在する真の変異は、ファミリー対のメンバーすべてに出現する。真の変異と共に人工的な変異がファミリー対で同時に生じ得るが、1回目のPCR増幅の間に生じるものを除くすべては、エラー補正一本鎖コンセンサス配列を作製する際、独立して同定し、考慮に入れないようにすることができる。次いで、個々のDNA二本鎖の2つの鎖のそれぞれから得た配列を比較して、二本鎖コンセンサス配列を得ることができ、これは1回目のPCRの間に生じた残りのエラーを排除する。このアプローチの短所は、ファミリー対で各鎖の少なくとも5つのメンバーを得るために、多数の断片の配列決定が必要であることである(すなわち、元々の断片当たり最低10回の配列読み取り、しかし、変動のためにさらに多くを必要とすることが多い)。さらに、当該方法は断片内でのCpG部位のメチル化状態の情報を提供しない。

【0084】

にもかかわらず、標的の末端に一意の配列のアダプターを付加する上記のアプローチは、本発明での使用のために改変され得る。例示のみの目的で、本発明のこの態様での使用に好適な代替のアダプター部分を以下に描いている。この例では、任意の患者識別配列は6塩基、すなわち、CGTGAC(4,096種の異なる識別子タグを可能にする)であり、下線が引かれている。示されているように、患者識別配列は、散在している無作為なヌクレオチドを含有する(すなわち、患者同定領域内に「N」塩基を含有する(CGNTNGNANC; 以下の配列番号3のヌクレオチド13~22))。4つの「N」の使用は256倍の多様性を提供し、断片の両端に同じアダプター配列を有する機会を有意に減らす。断片特定配列は10塩基(1,048,576通りの異なる組み合わせを可能にする)であり、四角で囲ったNの文字列によって示されている。ヘアピン配列は太字で示している。アダプターのさらに短いオリゴヌクレオチド(すなわち、配列番号4)は5'OH又は5'尾部(すなわち、TTT、太字)を含有し、さらに長いアダプター鎖におけるヘアピンとのライゲーションを妨げる。

(SEQ ID NO: 3) 5'p-GGNNNNNNNNNNCGNTNGNANC--CCGAGC N
3'-GCNANCNIN GGGCTCG N
T 3' N
T
T-5'(SEQ ID NO: 4)

固定化されたオリゴヌクレオチドとの一時的なハイブリッド形成に好適な単純な反復配列（例えば、 A_n 又は CA_n ）を含有するように設計することができる。ヘアピン領域は固定化された相補的配列と一時的にハイブリッド形成し、それから変性するので、電気泳動の場においてヘアピン領域は遊離末端よりもゆっくりと移動し、従って、遊離末端がバイオリクターチャンバーに達する最初の末端であるように遊離末端が移動の先頭に並ぶ。

【0089】

代替の実施形態では、ヘアピン配列は、既知の相補的配列を含有するオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成に好適なさらに長い既知の配列を含有するように設計される。相補的なオリゴヌクレオチドは「移動抵抗」又は「移動度変更因子」に連結される。DNAの移動を邪魔することができる移動度変更因子の例には、ペプチド、タンパク質、PEG、他の高分子量ポリマーが挙げられるが、それらに限定されない。そのような条件下では、同定されるべきDNAの標的特異的な領域を含有するヘアピン化分子の形成の後で、移動度変更因子を含有する相補的なオリゴヌクレオチドを、例えば、ハイブリッド形成を介してヘアピン化分子に付加する。ハイブリッド形成した移動度変更因子を負うヘアピン化末端は電気泳動の場で遊離末端よりもゆっくり移動し、遊離末端が優先的に最初にバイオリクターチャンネル入るようにバイオリクターチャンネルに入るための追加のエネルギーバリア（エントロピートラップに加えて）を提供する。

【0090】

本発明の関連する態様では、上で記載された試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上の配列差異を同定する方法にはさらに、1つ以上の所望の核酸分子の配列特異的な濃縮を達成するための固体支持体上での核酸分子の固定化が含まれる。この方法には、そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれぞれハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供することが含まれ、その際、1つ以上の核酸分子とそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれが、標的特異的部分、5'アダプター部分、及び3'アダプター部分を含み、5'及び3'のアダプター部分はヘアピンの形成に好適である。当該方法にはさらに、1つ以上の一本鎖核酸分子とその相補体の収集物を形成させるために、その相補体から1つ以上の核酸分子を変性させる工程が含まれ、その際、1つ以上の一本鎖核酸分子とその相補体のそれぞれの5'及び3'のアダプター部分のヘアピン配列がヘアピンを形成する。複数の固定化された捕捉オリゴヌクレオチドプローブを含む固体支持体が提供され、前記捕捉オリゴヌクレオチドプローブは、1つ以上の一本鎖核酸分子とその相補体の標的特異的部分の領域に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。1つ以上の変性させた一本鎖核酸分子とその相補体は、固体支持体上に固定化されたそれらの相補的な捕捉オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成する。この方法にはさらに、ポリメラーゼを提供する工程と、1つ以上のハイブリッド形成した核酸分子とその相補体を含有する固体支持体にポリメラーゼを接触させる工程とが含まれる。1つ以上の核酸分子とその相補体は、そのそれぞれの3'ヘアピン化領域から伸長されて1つ以上の完全長のヘアピン化標的核酸分子を形成し、それによって1つ以上の核酸分子を捕捉オリゴヌクレオチドから及び固体支持体から遊離させる。1つ以上の完全長のヘアピン化標的核酸分子の少なくとも一部を配列決定して試料中の1つ以上の核酸分子を同定する。

【0091】

図9は、本発明のこの実施形態を説明する模式図である。この例では、ヘアピン化配列が各断片の5'末端に付加される（図9、ステップ2）ように、患者識別子配列タグ、鎖識別子配列タグ、及びヘアピン領域を含有するアダプター部分が二本鎖DNAの末端に付加される。二本鎖DNAの3'末端はリンカー領域を含有する。3'リンカー末端は、5'

3'活性を欠くポリメラーゼを用いてヘアピンを介して伸長されて、標的特異的部分、5'アダプター部分、及び3'アダプター部分を含有する二本鎖DNA産物を形成し、その際、5'及び3'アダプター部分のそれぞれは図9のステップ3で示されているようなヘアピン形成に好適である。図9のステップ4に示されているように、二本鎖DNAは一本鎖DNAに変性される。センス及びアンチセンスのDNA鎖は双方とも、固体支持体上に固定化された相補的な捕捉オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成によって捕捉される。

微細製作された装置における固体支持体上でのハイブリッド形成時間は30～60秒程度であり、従来のアレイ(3～5時間台)に比べて迅速である(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるWang et al., "Microarrays Assembled in Microfluidic Chips Fabricated From Poly(methyl methacrylate) for the Detection of Low-Abundant DNA Mutations," Anal. Chem. 75:1130-1140 (2003))。相補鎖の間での再ハイブリッド形成を回避するよう、相補鎖は空間的に分離される。

【0092】

固定化された一本鎖DNAのヘアピン領域がヘアピンを形成し、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性又は鎖置換活性を持つポリメラーゼを用いて固定化されたDNA鎖の3'ヘアピン化末端を伸長させ(図9、ステップ5)、それによって二本鎖ヘアピン化DNAが固体支持体から遊離する。或いは、伸長の前に、固定化された核酸分子をその相補的捕捉オリゴヌクレオチドから変性させる。この場合、ヌクレアーゼ活性又は鎖置換活性を欠くポリメラーゼを利用することができる。

【0093】

本発明の別の態様は、試料中の複数の標的核酸分子のうちの1つ以上又は当該複数の標的核酸分子における配列の差異を同定する別のアプローチ(ヘアピン形成を含まないが、核酸分子の双方の鎖における標的領域を直接的に捕捉して配列決定することが可能である)を対象とする。この方法には、それぞれその相補的な核酸分子とハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程が含まれ、ここで、1つ以上の核酸分子及びハイブリッド形成したその相補体のそれぞれは、標的的特異的部分、5'アダプター部分、及び3'アダプター部分(一本鎖ホモポリマー反復配列を含む)を含む。当該方法にはさらに、一本鎖核酸分子及びその相補体の収集物を形成させるために、その相補体から1つ以上の核酸分子を変性させる工程が含まれる。1つ以上の核酸分子又はその相補体の3'末端に対して相補的な複数のオリゴヌクレオチドプライマーとポリメラーゼが提供され、1つ以上の核酸分子及びその相補体がポリメラーゼ及びプライマーと混合されて伸長混合物を形成する。当該方法にはさらに、1つ以上の核酸分子及びその相補体の相補的3'末端とオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリッド形成させ、ハイブリッド形成したプライマーを伸長させて完全長の二本鎖核酸分子を形成することが含まれる。1つ以上の完全長の二本鎖核酸分子の少なくとも一部を配列決定して、試料中の1つ以上の核酸分子を同定する。

【0094】

図10は、本発明のこの態様を説明する模式図である。示されているように、二本鎖ゲノムDNAは、本方法を用いて同定することができる例となる核酸分子である。ゲノムDNAを無作為に断片化して、分子の各末端にアダプターを付加するように処理する(図10、ステップ2)。例えば、平滑末端である又は平滑にしたDNAの末端を上で記載したようにリン酸化し、ポリメラーゼを用いて追加の「A」を3'末端に付加し、単一塩基の3'オーバーハングを生成させる。例えば、鎖識別子の配列又はタグを含有するアダプター部分をDNA断片の各末端に付加する(図10、ステップ2)。ポリメラーゼを用いて3'アダプターの末端を伸長させ、次いでターミナルトランスフェラーゼによって尾部を付ける(図10、ステップ3)。尾部導入を用いて、ポリA尾部などのホモポリマー反復配列を3'アダプター部分の末端に導入する。

【0095】

二本鎖DNAを変性させ、尾部のあるアダプター鎖の3'末端とプライマーをハイブリッド形成させる(図10、ステップ4)。ハイブリッド形成したプライマーをポリメラーゼを用いて伸長させ、本発明の装置を用いた配列決定に最適な二本鎖DNAを生成させる。配列決定される鎖は両端に鎖識別子配列を含有し、その起源の一意的検証が可能である。加えて、元々のゲノム鎖が配列決定されるので、塩基の修飾がすべて保存される。

【0096】

特定のDNA断片の標的的特異的な濃縮を達成するために、固体支持体上での選択的な標的配列特異的な捕捉を含む、上述の方法の変形を採用することができる。この実施形態を

説明する模式図を図 11 に示す。上述のような DNA 断片の各末端にアダプター部分を付加する（図 11、ステップ 2）。この例では、アダプター部分は患者識別子配列タグも含有する。ポリメラーゼで 3' アダプターの末端を伸長させ、上述のようなトランスフェラーゼを用いて尾部を付ける（図 11、ステップ 3）。二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に変性させる。固体支持体上に固定化された相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成によって上下の標的鎖双方を捕捉する（図 11、ステップ 4）。相補鎖を空間的に分離し、それらも標的鎖も互いに再ハイブリッド形成しないようにする。

【0097】

固定化された一本鎖 DNA の 3' 末端とオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリッド形成させ、ポリメラーゼを用いて伸長させて、配列決定に最適な二本鎖 DNA 分子を生成させる（図 11、ステップ 5）。本発明の一実施形態では、プライマーの伸長の前に、固体支持体上に固定化された一本鎖 DNA を相補的な捕捉プローブから変性させる。或いは、鎖置き換えポリメラーゼ（相補的な捕捉鎖をインタクトのままにする）を用いることによって、又は 5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を持つポリメラーゼ（相補的な捕捉鎖を消化してしまう）を用いることによって、固定化された一本鎖 DNA を遊離させる。

【0098】

本発明のこの態様で利用されるオリゴヌクレオチドプライマーは、鎖識別子部分の既知の配列並びにアダプター断片のホモポリマー反復配列と重複する。当該プライマーは 5' リン酸を有さず、ホモポリマー反復配列の 3' 末端に対して陥凹しているので、生成された完全長の二本鎖 DNA が本発明の装置を用いて配列決定される場合、この末端は、

【0099】

本発明のこの態様によれば、（5' リン酸化された）平滑末端が切断酵素（すなわち、エキソヌクレアーゼ）に最初に遭遇するように本発明の生体分子プロセッサ内での断片の方向を調整する機会が、3' 一本鎖ホモポリマー反復（例えば、 A_n ）によって提供される。DNA がバイオリアクターチャンバーに向かってフィーダーチャネル及びエントロピートラップを通して電気泳動で輸送される際、3' 一本鎖ホモポリマー反復を含有する末端の動きが邪魔されるので、遊離末端が最初にバイオリアクターチャンバーに入ってエキソヌクレアーゼに遭遇する可能性が高い。相補的なホモポリマー配列（すなわち、 T_n ）をフィーダーチャネル又はエントロピートラップの中で固定化することができ、3' 一本鎖ホモポリマー反復が一時的にそれとハイブリッド形成し、それから変性して 3' 一本鎖末端が遊離末端よりも電気泳動の場でゆっくり移動させられるようになる。或いは、3' 一本鎖ホモポリマー反復に対して相補的なより長いオリゴヌクレオチドであって電気泳動の場での移動抵抗として機能する付属物も含有するオリゴヌクレオチドを上述のように使用して、3' 末端の移動を遅らせ得る。

【0100】

上述の配列設計を含有するアダプターを付加することは、（i）5' 側の無作為断片 ID 配列；（ii）5' 側の患者 ID 配列；（iii）標的配列の 5' 側の接合部位；（iv）捕捉された標的の配列；（v）標的配列の 3' 側の接合部位；（vi）3' 側の患者 ID 配列；及び（vii）3' 側の無作為断片 ID 配列に基づいて各核酸断片を一意に同定する過剰な能力を提供する。2 つの無作為な配列（各 10 塩基を想定する）だけで 100,000 個のゲノム同等物から標的 DNA を一意に区別するのに十分な 1×10^{12} 程度の過剰な多様性を提供する。従って、真の変異は同一配列の上下の鎖双方における同一変異体塩基を同定することによって検証されるであろう。同様に、所与の CpG ジヌクレオチドでの真の 5 - メチル - dC 又は 5 - ヒドロキシメチル - dC は、所与の CpG ジヌクレオチド上下の鎖双方における 5 - メチル - dCMP 又は 5 - ヒドロキシメチル - dCMP のベースコールの存在として明らかであろう。

【0101】

何度も繰り返して DNA の同じ領域を配列決定することによって、高いエラー率の存在下で高いコンセンサス精度を達成することができる。しかしながら、例えば、正常 DNA

10

20

30

40

50

の存在下で癌の変異を同定しようと試みる場合、高いエラー率は少量の配列変異体を同定するのを極度に困難にする。従って、相対的に少量の変異を検出するには低いエラー率が必要である。

【0102】

本発明の装置及び方法は、少量の変異を正確に検出するのに必要な低エラー率を達成するためのいくつかのアプローチを提供する。すなわち、本発明の方法は、1つ以上のヌクレオチド塩基の挿入、欠失、転座、及び変異、並びにノ又は損傷した塩基を含有する少量の核酸分子（例えば、RNA及びDNA）を、試料中の、当該少量の核酸分子と類似のヌクレオチド配列を有するが、対応する1つ以上のヌクレオチド塩基の挿入、欠失、転座、及び変異、並びにノ又は損傷した塩基を有しない100倍～10,000倍以上多い核酸分子と区別することができる。例えば、1つのアプローチでは、 λ -エキソヌクレアーゼを切断酵素として利用してdsDNAの5'末端を消化し、ここで、双方の鎖は一意的配列識別子（上述のようなアダプター）を含有するので、それらは同一の元々の標的DNAから生じるものとして同定され得る。このアプローチでは、双方の鎖の配列決定についてのエラー率は、一方の鎖だけの場合よりも大幅に低い。一方の鎖におけるミスコールが他方の鎖における同じ位置での相補的なミスコールと合致する確率は、普通のミスコールよりも4倍低いためである。エラー率及び精度を以下の表1に示す。このアプローチはモノヌクレオチドを生成するのにどの酵素が使用されるのかに無関係であることに留意のこと。例えば、試料に由来する二本鎖DNAの両端に、一意的配列識別子を付加するのに適当なアダプターを付加した後、DNAは変性されて、エキソヌクレアーゼIによる3'末端からの消化に好適な一本鎖にされ得、適当な片方の鎖がその一意的配列識別子によって同定され得る。

【0103】

（表1）鎖識別子を含有するdsDNAの λ -エキソヌクレアーゼによる消化及び双方の鎖の解析

エラー率	精度	エラー率	精度
SS配列決定		DS配列決定	
10.0%	90.0%	0.2500%	99.7500%
4.0%	96.0%	0.0400%	99.9600%
1.0%	99.0%	0.0025%	99.9975%
0.5%	99.5%	0.0006%	99.9994%
0.2%	99.8%	0.0001%	99.9999%

【0104】

別のアプローチには、dsDNAの5'末端を消化するための λ -エキソヌクレアーゼの使用、その後の得られた一本鎖DNAを3'末端から消化するためのエキソヌクレアーゼIの使用が含まれる。この実施形態によれば、得られた一本鎖DNAを第2のフィーダーチャンネルに導入し、エキソヌクレアーゼIを含有する第2のバイオリアクターチャンバーに導く。消化されたモノヌクレオチドは、第2の消化によって遊離したヌクレオチドを分離及び同定するために第2の飛行時間型チャンネルを通して往復させられる。以下の計算は、異なるエキソヌクレアーゼによって生成されたとしても、飛行時間型チャンネルにおいてヌクレオチドを区別するエラー率には差異がないことを前提としている。

【0105】

（表2）dsDNA標的分子の第1及び第2の鎖の、連動した λ -エキソヌクレアーゼノエキソヌクレアーゼIによる消化

エラー率	精度	エラー率	精度
SS配列決定		DS配列決定	
10.0%	90.0%	0.2500%	99.7500%
4.0%	96.0%	0.0400%	99.9600%
1.0%	99.0%	0.0025%	99.9975%
0.5%	99.5%	0.0006%	99.9994%
0.2%	99.8%	0.0001%	99.9999%

【 0 1 0 6 】

別のアプローチには、二重検出（3つの飛行時間測定値を得るための3つのナノ電極対）との比較で単一検出（単一の飛行時間測定値を得るための2つのナノ電極対）を使用する、dsDNAの - エキソヌクレアーゼによる消化が含まれる。この場合の比較は、一方の鎖だけが切断される同一ヌクレオチドについての同じ潜在的エラー率の間の比較である。従って、当該エラー率は、同一の元々の標的分子の双方の鎖が調べられる上記のアプローチよりもやや高い。

【 0 1 0 7 】

（表3）dsDNAの - エキソヌクレアーゼによる消化、単一及び二重の飛行時間測定値の比較

エラー率	精度	エラー率	精度
単一検出		二重検出	
10.0%	90.0%	1.0000%	99.0000%
4.0%	96.0%	0.1600%	99.8400%
1.0%	99.0%	0.0100%	99.9900%
0.5%	99.5%	0.0025%	99.9975%
0.2%	99.8%	0.0004%	99.9996%

【 0 1 0 8 】

メチル化又はヒドロキシメチル化された塩基を、そのメチル化されていない対応塩基と区別すること（すなわち、d5meCMPをdCMPと区別すること）は、単に2つの天然の塩基を互いに区別するよりも難しい可能性がある。その結果、d5meCMPをdCMPと区別するための分類エラー率は高くなり得る。以下の表4にて示すのは、メチル化C塩基と非メチル化C塩基との区別について算出されたエラー率である。

【 0 1 0 9 】

（表4）メチル化、単一検出及び二重検出の比較

エラー率	精度	エラー率	精度
単一検出		二重検出	
20.0%	80.0%	4.0000%	96.0000%
10.0%	90.0%	1.0000%	99.0000%
5.0%	95.0%	0.2500%	99.7500%
2.0%	98.0%	0.0400%	99.9600%
1.0%	99.0%	0.0100%	99.9900%

【 0 1 1 0 】

生物学的に関連するメチル化は、CpGアイランドとして知られるG+C含量が高い領域、並びにCpGショアとして知られる隣接領域で生じることが多い。従って、CpG配列のような手掛かり用い、隣接するCpG配列のメチル化状況をスコア化することは、単一の飛行時間測定にてd5meCMPをdCMPと区別するための高いエラー率を有したとしても、5meCのスコア化における精度を劇的に改善する。これを以下の表5で例示説明する。

【 0 1 1 1 】

(表5) メチル化、単一検出及び二重検出の比較、並びに、連続してメチル化された CpG の配列決定のスコア化

エラー率	精度	エラー率	精度
単一検出		二重-連続	
20.0%	80.0%	0.1600%	99.8400%
10.0%	90.0%	0.0100%	99.9900%
5.0%	95.0%	0.0006%	99.9994%

【0112】

同様に、上で概説したように、双方の鎖の配列を決定することに二重検出を組み合わせることもエラー率を有意に低下させ、種々のプロモータ領域におけるメチル化状態のコール精度を改善する。従って、本発明の方法は、1つ以上のメチル化又は修飾のないヌクレオチド塩基を有する少量の核酸分子を、試料中の、当該少量の核酸分子と類似のヌクレオチド配列を有するがメチル化又は修飾されたヌクレオチド塩基を有する100～10,000倍以上多い核酸分子と区別することができる。同様に、本発明の方法は、1つ以上のメチル化又は修飾されたヌクレオチド塩基を有する少量の核酸分子を、試料中の、当該少量の核酸分子と類似のヌクレオチド配列を有するがメチル化又は修飾のないヌクレオチド塩基を有する100～10,000倍以上多い核酸分子と区別することができる。

【0113】

本明細書に記載されている装置及び方法は、現在利用可能な配列決定技術を悩ます、上で言及された問題を克服するであろう。本発明の装置及び方法は、血漿中の無細胞DNAにおける腫瘍DNAに由来する、100個の遺伝子における1つ以上の変異の存在又は100個のプロモータにおける1つ以上のメチル化の変化の存在を同定することができ、ここで、100,000ゲノムの正常DNA中、変異又はメチル化の変化を含有する腫瘍DNAは10ゲノムに相当する。平均的な遺伝子が2,000塩基の配列に相当し、平均的なプロモータ領域が500塩基に相当することを考慮すると、捕捉プローブ(平均長50塩基)は、250,000塩基の一意の配列を捕捉するように合成されるであろう。それは、「上」の鎖の配列を捕捉するための5,000個のプローブ及び「下」の鎖の配列を捕捉するための5,000個のプローブを表す。5,000個のプローブの各セットはまとめて合成され(又はAgilentチップ上で合成されてチップから切断され)、次いで、微細製作した装置の空間的に離れた領域に(例えば、オリゴヌクレオチドの連結に使用されたチップのその領域におけるピラー状のもの又は他のアスペクト比の高い形に)て連結されてもよい。

【0114】

患者が年を取るにつれて、加齢関連のプロモータのメチル化の結果として、一部の遺伝子は散発的にオフになる。腫瘍が拡大すると、それは全般的な低メチル化及び特定のプロモータ領域における特定の高メチル化を呈することが多い。メチル化状況におけるこれらの変化の双方は、血漿中の癌特異的DNAを早期に検出する機会を提供する。癌特異的なメチル化の変化を伴う複数の遺伝子座を同定して、加齢関連の変化による誤った偽陽性を回避することが重要である。本明細書に記載されている装置及び方法は、腫瘍組織におけるメチル化の変化を同定する迅速な方法、並びに血漿又は他の生体試料における少量の変化を同定する精度の高い方法を提供する。

【0115】

本発明の方法及び装置は、核酸分子の配列決定のための従来の方法及び装置を超える多数の利点を提供する。具体的には、本発明の方法は、1回のラン当たり、最初の塩基から最後の塩基まで高いレベルの精度での長い読み取り長さ(200～50,000塩基)、均一なカバー率、及び高速スループットを低コストで達成する。当該装置は100,000ゲノム同等物にて双方の鎖で250,000塩基(=500,000塩基)を配列決定することができる。それは $5 \times 10^{10} = 50 \text{ GB}$ のDNA配列に等しい。1回1.4時間のランで500GBのDNAの最大容量で、本発明の装置は10個の血清試料を同時に

評価し、そのメチル化状況が癌又は予後の状態に相関する100個の癌遺伝子及び100個のプロモータ領域の変異の状態の包括的な評価を提供することができる。たった20個の遺伝子及び20個のプロモータ領域のスクリーニング試験があれば、1回のランで50個の血清試料が容易に評価されることとなるであろう。

【0116】

本発明の装置及び方法を用いて得られる配列読み取り情報は、他の配列決定技術を悩ます状況固有のエラー（例えば、高いGC；長いホモポリマー）を有しない。単分子分離を達成する能力は異種の試料の特徴づけを円滑にし、他の配列決定技術では見ることができない違いの同定を可能にする。双方の鎖における標的領域の直接的な捕捉及び配列決定は、優れた校正及び非常に少量の変異の確認を提供する。長い一続きのヌクレオチド配列を配列決定する能力は、SNP、ハプロタイプ、及び大規模な構造的再構成を高い感度及び特異性で解決することができる。長い読み取りも、同じ深さのカバー率での短い読み取りの配列決定技術に比べて、コンティグの数を減らし、さらに良好なコンセンサス精度を生じることによってゲノムアセンブリを単純化し、改善する。最後に、増幅しないで投入されたDNAを直接配列決定することは、亜硫酸水素塩変換なしで、元々の塩基の修飾（例えば、5-メチル-C、5-ヒドロキシメチル-C、又は損傷したDNA塩基）の同定を可能にする。既存の単一分子DNA配列決定戦略とは対照的に、本装置は、飛行時間同定プロトコル、及び、各単量体単位によって生成される一意の電氣的符号のために、1回の配列決定ランで天然及び非天然の塩基に対して高精度のコールを生成する能力を有する。

【0117】

本発明の装置及び方法は、他の利用可能な配列決定機器では実行が難しい又は不可能である臨床研究及び診断試験を可能にする低コストの配列決定プラットフォームを提供する。例えば、血液から（例えば、血漿、エキソソーム、又は循環腫瘍細胞から）単離された核酸分子を配列決定することは、(i)プロモータの高メチル化及び低メチル化（無細胞DNAの1%～0.01%で存在する場合）の高感度検出による種々の遺伝的に関連する疾患（例えば、癌）の正確な同定、(ii)既知の遺伝子の単一塩基の変異、小さな挿入、及び小さな欠失（無細胞DNAの1%～0.01%で存在する場合）の高感度検出による遺伝的に関連する疾患の正確な同定、(iii)血液から単離される特定のmRNA及びmiRNAの定量による早期疾患発症の正確な同定、(iv)DNAにおける特定のコピーの変化の正確な同定、並びに(v)特定の疾患関連の循環細胞から単離されたDNAにおける変異並びにプロモータの高メチル化及び低メチル化の定量による早期疾患の正確な同定を提供するであろう。

【0118】

本発明の生体分子処理装置及び方法は、種々の診断アッセイを実施するのに特に良く適している。特に、本発明の生体分子処理装置及び方法は、母体血清試料を用いた出生前診断アッセイを実施するのに良く適している。最近の研究は、血清中の母体DNAに対する胎児DNAの割合は、第1、第2、及び第3のトリメスターにおいて、それぞれおよそ6%、20%及び26%であることを示している。DNAがどのように分解されるかによるが、母体DNAは通常約160塩基であって依然としてH1ヒストンに結合しているが、胎児DNAは約140塩基であってヒストンに結合していない。臨床的必要性に依存するが、知識が最良のケアを提供する場合には、適切なトリメスターで胎児DNAを検出するのに十分な感度を有する試験が開発され得る。

【0119】

遺伝子が既知のおよそ3,500種の劣性遺伝性疾患がある。最も一般的な疾患はDNAコピー数の異常から生じ、余分な染色体（例えば21トリソミー）又は遺伝子の一部の欠失（例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）遺伝子の一部の欠失）のいずれかから生じる。出生前スクリーニングの考慮においては、遺伝性疾患の可能性を手技のリスクと比較する必要がある。21トリソミー又は他の染色体異数性のリスクは200分の1で手技後の自然流産のリスクに合致するので、現在、標準的治療は35歳の妊婦につ

いては17週目での羊水穿刺を推奨している。

【0120】

出生前スクリーニングについての本明細書に記載されている核酸配列決定法の使用の考慮においては、2つのレベルの試験が推奨される。21トリソミー、13トリソミー、及び18トリソミーについての妊娠すべての低コストスクリーニングについては、本発明の配列決定法を用いて第21、第13、及び第18染色体上で差次的に発現される遺伝子を迅速に同定する、例えば、メチル化サイレンシングの結果として胎児では止まっているが、成人では作動する遺伝子を同定する。同様の領域を3つの染色体、すなわち、第2、第5、第7染色体で同定する。第1トリメスターで母体血清からDNAを単離する場合でさえ、対照染色体領域の間でメチル化されていないDNAとメチル化されたDNAとを比べることによって胎児由来のDNAの割合を迅速に算出することができ、それは本明細書の実施例では6%となろう。他の染色体のいずれかでトリソミー（すなわち、21トリソミー）があれば、その染色体からのプロモータは約9%のメチル化を示し、言い換えれば、正常な二染色体性の場合よりも約50%高い。1,000ゲノム相当をスコア化することが推奨されているので、トリソミーの場合のメチル化コピー数90のカウントは、正常試料の場合のメチル化コピー数60と容易に区別される。10箇所のプロモータ領域を調べることを考えると、試料当たり、 $\times 6$ 染色体 $\times 500$ 塩基 $\times 2$ つの鎖 $\times 1,000$ コピー $= 60$ MBのDNA配列である。1回1.4時間のランで500GBのDNAの最大容量で、本発明の装置はおよそ8,300個の血清試料を同時に評価することができる。

【0121】

欠失、点変異、又は異常なメチル化を含む、大まかに3,500種の他の疾患に関連する遺伝性又は散発性の変異を胎児が含有するかどうかを判定するには、さらに洗練された解析が推奨されるであろう。配列解析は両親における劣性対立遺伝子の存在を容易に決定する。変異が両親で異なっていれば、母体血清に由来する無細胞DNAを評価することによって、子供が疾患について複合ヘテロ接合体であるかどうかを判定することができる。母体血清中の胎児DNAの解析から完全な回答を得ることは、二つの部分からなるアッセイを必要とし得る。第1は、疾患遺伝子を取り囲む反復領域における母親のSNP又は遺伝子多型のフェーズを立証することである。これは、母親の白血球又は父親の唾液から高分子量のDNAを単離することによって達成され得る。本発明の核酸の配列決定法は長い一続きのDNAを配列決定することができるので、これを用いて、疾患遺伝子に関連する反復領域における隣接するSNP又は遺伝子多型、並びに染色体フェーズ（ハプロタイプ）を立証し得る。それはまた、欠失があるかどうか、例えば、母親がDMD遺伝子における欠失のキャリアであるかどうかを立証するであろう。

【0122】

羊水穿刺が考慮される時である17週目では、母親はすでに第2トリメスターにあり、すなわち、胎児DNAは15~20%の範囲で存在する。第1のアプローチでは、1回2.8時間のランで1,000GBのDNAの最大容量で、本発明の装置は330個のゲノム同等物を評価し、その15%が胎児由来であれば、それは約50個のゲノムであるか、又は約25個の各ハプロタイプをカバーする。このアプローチは最も包括的であり、胎児における遺伝性の変化、並びにデノボ変化であるものの双方から生じる遺伝性疾患を検出することができるであろう。このアプローチはDMDの欠失だけでなく、自閉症に關与するものなどの他の少ないコピー数の異常も検出するであろう。200の妊娠ごとに約1が平衡転座を生じ、このアプローチは接合部を正確に決定し、潜在的な臨床兆候を判定することができる。さらにこのアプローチは、刷り込み（例えば、アンジェルマン症候群又はプラダー・ウィリー症候群）に関連する疾患を生じ得るメチル化の変化を正確に定量することができる。メチル化状況を決定し、同時にSNP検出によって欠失が父親の染色体にあるのか又は母親の染色体にあるのかを決定する（すなわち、上流又は下流のシス位に存在する母方か父方を識別するSNPを検出する）本発明の能力は、刷り込み疾患の診断識別を向上させる。最終的に、本明細書に記載されている方法はクローニング又はPCR増幅を必要としないので、ハンチントン病及び脆弱X症候群などの疾患に關与するトリプレ

ット反復変化が適正にスコア化され得る。ペプチド及びタンパク質の同定並びに定量的プロテオミクスも行う本発明の能力は、以下に記載されているように、それが母体血清中の胎児タンパク質の測定に用いられるのを可能にするであろうし、胎児異数性及び神経管欠損についての出生前スクリーニングの一部である。

【0123】

或いは、第2のアプローチにおいて疾患遺伝子は20種の最も一般的な遺伝性疾患に分けられ、次いで、17群のあまり一般的ではない変異配列（平均で各200個の遺伝子をカバーする）に分けられ得る。各遺伝子群は双方の鎖についての捕捉プローブのセットによってカバーされ、次いで、親の配列決定解析の結果に応じて、母親の血液は、適正な患者識別子が与えられ、17種の特殊チップのうちの1つ以上で評価される。所与の遺伝子の長さが平均で約2,500塩基である場合、200個の遺伝子については、双方の鎖についてチップ上の捕捉プローブは1MBである。1,000個のゲノム同等物が配列決定されるべきであるなら、血清試料1つは1GBの配列を必要とするであろう。1回1.4時間のランで500GBのDNAの最大容量では、当該装置は1回のランで500個の血清試料を評価するであろう。

10

【0124】

上記アプローチのうちの第1のアプローチは、遺伝性及び散発性の変異双方を同定すると共に、胎児が母親からの変異を担う領域を遺伝で受け継いだかどうかを判定するであろう。このアプローチは、X連鎖遺伝性疾患についての欠失、他の染色体性の欠失、胎児における異常なメチル化、トリプレット反復から生じる疾患、及び染色体の転座又は他の再構成から生じる疾患の存在も決定できるはずである。

20

【0125】

第2のアプローチは、調べた遺伝子についての病態を同定するであろう。主要な課題は、家族が正しい回答を入手するのがどのように重要であるかであろう。両親がキャリアであるかどうか及び変異が異なるかどうかを判定するのは簡単であり、父親の対立遺伝子が胎児に存在するかどうかを判定するのは相対的に簡単である。それがなければ、胎児は疾患を含まない又はキャリアである。それが存在するのであれば、母親の対立遺伝子を遺伝で受け継ぎ、疾患を発症する機会は50%である。母親の対立遺伝子のハプロタイプが決定されているのであれば、ハプロタイプマーカーを用いて遺伝した母親の対立遺伝子の存在又は非存在を検証し得る。慎重を期して羊水穿刺を行い、母親の対立遺伝子の存在を直接調べ得る。現在の推奨は、上で概説したように遺伝子を配列決定することであり、父親の疾患対立遺伝子をスコア化することである。存在するならば、又は父親と母親の疾患特異的な変異が同一であるならば、医師は羊水穿刺を推奨する。

30

【0126】

本発明の方法及び装置は、染色体転座の非侵襲性出生前診断及び着床前遺伝子診断（PGD）にとってそれを理想的にする長い読み取り長さを達成することができる。染色体転座を有する個体は、不妊のリスク、流産のリスク、死産のリスク、及び／又は出生異常を有する子供を持つリスクが高い。着床前遺伝子診断は、正しい量の遺伝物質を有する胎児（均衡型／正常）と、転座の結果として遺伝物質を失っている胎児（不均衡型）とを区別することができる。一方が転座のキャリアである多数のカップルは、流産を経験しているか、又は染色体セットが不均衡型である妊娠について知る際に難しい決断に直面しなければならなかった。PGDに基づく本発明の方法及び装置は、移植される胎児が均衡型の染色体転座を有することを受胎前に知ることによって、これらの特定の状況に対処しなければならない可能性を減らす。

40

【0127】

投入された二本鎖DNAの双方の鎖の配列決定を行うことは、ベースコールにおいて最高レベルの精度を可能にする。RNA基質は、その一本鎖性の性質によって双方の鎖を調べる機会を提供しない。しかしながら、ほとんどの場合、ゲノム配列から完全に正しいRNA配列を推測することができ、それは次いで、同じ投入断片の双方の鎖の配列決定によって決定され得、最高の精度を提供する。従って、RNAの配列決定は、試料に存在する

50

、循環腫瘍細胞に由来するものであれば血清から単離される癌特異的なエキソソームに由来するものであれば、スプライシング部位の変異体すべて、長い非コードRNA (lncRNA) 分子すべて、マイクロRNA (miRNA) 分子すべてを含むそれぞれ及び全てのメッセンジャーRNAの文字通りの計数などの決定的に重要な情報を提供することができる。従って、一本鎖RNA基質を配列決定することは、二本鎖DNA基質と同じ高い忠実性を要求しないが、読み出しが依然として飛行時間型チャンネルでの検出に基づくので、RNAにおける稀な又は修飾された塩基を定量する能力は保持される。

【0128】

本発明の装置は、mRNAすべてを配列決定することにおける他の技術を超える利点を提示する。現在のマイクロアレイ技術は、転写物における異なるエクソンの発現を同定することはできるが、スプライス部位の変異体すべてを正確に決定又は定量する能力を欠く。mRNAの現在の次世代定量は、3'末端に表示を生成し、cDNAの短い断片を配列決定し、次いでそれを用いて各mRNA種のコピーの数を数える。それに対して、本明細書に記載されている現在の実施形態は、それが14,000塩基又は400塩基であるかどうかに関係なく、元々のmRNA鎖全体を配列決定することを可能にする。この方法は、治療法の腫瘍特異的な標的を同定する潜在力と共に、癌細胞における正常なスプライシング及び異常なスプライシングの双方を当該装置が決定するのを可能にする。

【0129】

既存の技術では容易に行われず、本発明の方法及び装置を用いてRNAの修飾を区別する能力は、遺伝子発現及び疾患原因の我々の理解を根本的に変えるのに役立つ。最近の研究は、ヒトmRNAの20パーセントまでが日常的にメチル化されることを示している。さらに、RNAのメチル化における欠陥は疾患をもたらすことが最近示されている。例えば、脂肪塊及び肥満に関連する(FTO)遺伝子は、RNAのメチル化を元に戻すことができる酵素をコードする。FTOの変異は、食物摂取及び代謝に異常を引き起こし、肥満をもたらす。FTOの変異は、肥満及び2型糖尿病の主な原因である。RNAの修飾は、癌、並びに、自閉症、アルツハイマー病、及び統合失調症などの神経疾患においても役割を担い得るという最近の証拠がある。

【0130】

本発明の別の態様は、本発明の装置を用いて試料中の1つ以上のタンパク質又はポリペプチドを同定する方法に関する。この方法には、当該装置の生体分子プロセッサに、1つ以上のタンパク質又はポリペプチドを含む試料を、当該試料中の1つ以上のタンパク質又はポリペプチドがバイオリアクターチャンバー内の固定化された切断酵素と結合して当該1つ以上のタンパク質又はポリペプチドが1つ以上の飛行時間型チャンネルの入力端に入るより小さなペプチド断片へと切断されるのに有効な条件下で供給する工程が含まれる。1つ以上のバイオリアクターチャンバーを横切って及び1つ以上の飛行時間型チャンネルに沿って電場が印加され、切断されたペプチド断片を1つ以上の飛行時間型チャンネルを通して輸送し、印加された電場に基づいて、1つ以上の飛行時間型チャンネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを当該断片が通過する際に、ペプチド断片が検出される。当該方法にはさらに、当該検出に基づいて、(i)各ペプチド断片が1つ以上の飛行時間型チャンネルの少なくとも第1及び第2のセンサーを通過するのにどれくらい時間がかかるか、及び/又は(ii)1つ以上の飛行時間型チャンネルにおける第1又は第2のセンサーのうちの少なくとも一方を通過する際の各ペプチド断片の電気ピークの振幅を測定する工程が含まれる。測定されたペプチド断片に基づいて、試料中の1つ以上のタンパク質又はポリペプチドの少なくとも一部が同定される。

【0131】

本発明のこの態様によれば、切断されたペプチド断片について得られる測定値(すなわち、各ペプチド断片の飛行時間及び電気ピークの振幅)を、既知のタンパク質又はポリペプチドの切断によって生成されたペプチド断片の対応する測定値を含有するデータベースと比較して、試料中の1つ以上の未知のタンパク質又はポリペプチドを同定する又は特徴づける。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 2 】

ヒトのゲノムは、同定された約 21,000 個のタンパク質のコーディング遺伝子を有し、選択的スプライシングによってこれらは約 100,000 個の異なる細胞性タンパク質を生じる。これらのタンパク質の大半は、リン酸化、アセチル化、及びメチル化などの翻訳後修飾を受け、そのような修飾はタンパク質の機能及び活性状態において決定的な役割を担うことが多い。

【 0 1 3 3 】

本発明のこの態様の一実施形態では、複数のタンパク質を含有する試料から所望のタンパク質を分画又は濃縮する最初のステップを加えることによって、解析の複雑さを減らすことができる。この分画ステップは、モジュール集積アプローチを用いて本発明の装置に別個のモジュールを集積することによって容易に加えられる。この分画ステップは物性に左右され得、例えばクロマトグラフィを用いて、例えばサイズ、電荷、又は疎水性により分離され得る。分画は、抗体、小分子、又は高分子に対する親和性にも左右され得る。例えば、抗体濃縮ステップ、又は所与の転写因子と相互作用するタンパク質の単離（同様に特異的抗体によるプルダウンが行われる）。或いは、タンパク質は、リン酸化された、メチル化された、若しくはアセチル化されたペプチド、又は他のタンパク質ドメイン、又はメチル化された DNA、又は特定の DNA 配列のファミリー、又は DNA 配列、ATP 若しくは GTP 若しくはその類似体などの一般的な基質のファミリーの 1 つ以上に結合することによって濃縮されてもよく、共有結合した基質又はその類似体を含有する固体支持体上でのアフィニティ精製によって分画されてもよい。投入タンパク質を分画する他のアプローチは、核、細胞質、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ、細胞膜、核膜、リソソーム又は DNA、RNA、クロマチン、他のタンパク質足場との会合などの細胞内部分による分離が挙げられる。分画は、G タンパク質共役受容体、核内受容体、電位依存性イオンチャネル、受容体チロシンキナーゼ、増殖因子、プロテアーゼ、配列特異的プロテアーゼ、ホスファターゼ、プロテインキナーゼ、生物活性のある脂質、サイトカイン、ケモカイン、ユビキチンリガーゼ、ウイルス調節因子、細胞分裂タンパク質、足場タンパク質、DNA 修復タンパク質、細菌リボソーム、ヒストン脱アセチル酵素、アポトーシス制御因子、シャペロンタンパク質、セリン/スレオニンプロテインキナーゼ、サイクリン依存性キナーゼ、増殖因子受容体、プロテアソーム、シグナル伝達タンパク質複合体、タンパク質/核酸輸送体、及びウイルスカプシドを含むがこれらに限定されないタンパク質の群について濃縮するように設計されてもよい。

【 0 1 3 4 】

個々のタンパク質がバイオリアクターチャンバーに供給されると、固定化された切断酵素（すなわち、プロテアーゼ）がタンパク質を完了するまで消化し、キャピラリー電気泳動又はキャピラリー電気クロマトグラフィを用いて 1 つ以上の飛行時間型ナノチャンネルにて断片が分離され、検出される。この分離及び検出が所与のタンパク質についてのフィンガープリントを生成する。特定の残基が修飾されていると、例えば、リジンがアセチル化されていれば、断片の移動度はアセチル化されていないリジンを含有する同じ断片に比べて変更される。或いは、アセチル化は通常生じるその位置での酵素的切断を妨げてよく（例えば、トリプシンはアセチル化された残基を切断しない）、ペプチドのフィンガープリントを変化させる。既知の修飾を有する既知のタンパク質から切断されたペプチド断片の測定値又はフィンガープリントを含有するデータベースを用いて、試料中の未知のタンパク質/ポリペプチドについて取得されたパターンをデータベースと比較し、試料中のタンパク質/ポリペプチドの同定及び特徴づけを行うことができる。この実施形態の独自の態様は、それが単一の分子レベルで行われるので、質量分光法の多数の異なる形式を利用する従来のタンパク質処理プロトコルを用いて明らかにされない稀な修飾を観察することができることである。

【 0 1 3 5 】

チャンネル当たり 1 つ以上の飛行時間測定値を生成するために、2 つ以上の検出電極及び/又は異なる壁表面化学的性質を有する 2 つ以上の飛行管を有する、1 つ以上の飛行時間

10

20

30

40

50

型ナノチャネルを利用することによって、非常に洗練されたフィンガープリント（例えば、二次元、三次元又は四次元のフィンガープリント）が生成され、タンパク質及びその修飾体の考えられるすべてが本質的に区別される。異なる壁表面化学的性質を有する2つ以上の飛行管によってn次元のフィンガープリントを生成するための装置構造の例を図7にて提供する。修飾には、スレオニン又はチロシンのうちの1種以上のアミノ酸残基における、メチル化、アセチル化、リン酸化、グリコシル化、及び他の翻訳後修飾が挙げられるが、これらに限定されない。

【0136】

個々のタンパク質を区別するのに有効であるタンパク質のフィンガープリントについては、プロテアーゼは同じ断片を生成するのに時間の大部分を必要とし、すなわち、それは特異的な切断を示すことを必要とする。これを達成する最も容易な方法は、認識ポケットに特定の型の残基を必要とするプロテアーゼを使用することである。本発明での使用に好適な特定のプロテアーゼは上に記載されている。

【0137】

本発明の方法及び装置を用いたタンパク質/ポリペプチドの解析を用いて、細胞のDNA、RNA、クロマチン、若しくは他のタンパク質足場と相互作用するタンパク質について、基質若しくはその類似体と結合するタンパク質について、又は高分子（例えば、タンパク質、糖質、脂質、メチル化DNA、特定のDNA配列、若しくはDNA配列のファミリー）と結合するタンパク質について、細胞内区画から濃縮された試料中のタンパク質レベルの変化又はタンパク質の共有結合修飾の変化から生じる疾患を正確に同定する（すなわち、診断及び予後診断する）ことができる。

【0138】

タンパク質解析のための本発明の装置の使用は、生殖及び寿命のメカニズム、病原性細菌、不妊、癌の形質転換、糖尿病、加齢性疾患、クローン病、アルツハイマー病、インスリン抵抗性、病原性真菌の進行、及び前立腺癌の予後の研究を含む多種多様な健康関連の研究分野における先進的な知識及び理解に極めて重要な役割を担うであろう。本発明は、複合試料中の少量のタンパク質についての、タンパク質配列カバー率、正確な定量、及び信頼性の高い同定を最大化するショットガン定量プロテオミクスの成功の中心にもあるだろう。本発明の方法は、関心対象のタンパク質及び複合体が非常に少量で低いダイナミックレンジの範囲内にあることが多い異なる組織、細胞、及び細胞小器官の中でのタンパク質複合体の正確な定量及びタンパク質修飾の動的調節の感度の高い測定を提供するであろう。

【0139】

本発明の方法及び装置を用いて血清マーカーを検出し、悪性前立腺疾患と良性前立腺疾患を区別することができる。前立腺癌（CaP）は男性において最も一般的な非皮膚悪性腫瘍である。前立腺特異抗原（PSA）スクリーニングの導入は死亡率を有意に減らしているが、診断用血清マーカーとしてのPSAの使用は完璧からは程遠い。本発明は、CaPの存在及び進行を予測し、高い感度と特異性で悪性疾患と良性疾患を差別化する追加の血清マーカーの検出に使用することができる。特に、本発明は、入手し易い体液にて検出可能であり、正常で良性の前立腺肥大（BPH）、前立腺上皮内腫瘍、及び皮膚前立腺組織の間で区別する前立腺特異的生体マーカーの検出に使用することができる。良性疾患と悪性疾患の間で異なる発現を提示し、PSAの役割を補完する又は満たす潜在力を有する血清生体マーカーには、トロンボスポンジン-1（TSP-1）、エングレイルド-2（EN2）、BCL-2、Ki-67、ERK5、クロモグラニン-A（CgA）、ヒト腺カリクレイン2（hK2）、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子（u-PA）、形質転換増殖因子-1（TGF-1）、インターロイキン-6（IL-6）、前立腺膜特異抗原、前立腺特異的細胞抗原、-メチルアシル-CoAラセマーゼ（AMACR）自己抗体、早期前立腺癌抗原（EPCA）、GSTP1高メチル化、性ホルモン、及び性ホルモン結合グロブリン（SHBG）が挙げられる。例えば、EPCA及びhK2は可能性のある診断用因子であり、CgA、IL-6、及びTGF-1は可能性のある予後予

測因子である。単一のマーカーでは所望のレベルの感度及び特異性を達成しそうにない。マーカー又は血清プロファイルの組み合わせがCaPスクリーニングの診断精度と同様に治療を改善するための予後精度を改善するであろう。本発明の方法及び装置の高い感度及び高いサンプリング率は、この多重因子の診断及び予後診断のアプローチについてそれを理想的にする。前立腺癌の正確な又は早期の診断を提供する血液タンパク質マーカーの検出及び同定のための本発明の使用は、不必要な前立腺生検の回数を減らし、前立腺癌の治療及び管理を有意に改善する潜在力を有する。

【0140】

本発明の方法及び装置を用いてアルツハイマー病患者の異なる組織にてN-グリコシル化タンパク質部位を同定することができる。N-結合グリコシル化は窒素原子（普通、アスパラギン残基のN4）へのオリゴ糖の連結であり、分泌タンパク質又は膜結合タンパク質で生じる。部位特異的なグリコシル化とアルツハイマー病の間に、アミロイド前駆タンパク質（APP）をアルツハイマー病関連の短いペプチド、アミロイドに処理すること

10

に含まれるプロテアーゼの1つである - セクレターゼタンパク質複合体の一部であるタンパク質、プレセニリン-1を介して直接の関連付けがなされている。本発明の方法は、タンパク質におけるN-グリコシル化部位がアルツハイマー病及びさらなる理解において重要な役割を担っているという発見を基礎として、当該疾患の診断及び予後診断を改善するために用いることができる。

【0141】

現在、慢性肝疾患の診断は、線維症段階及び神経炎症活性の評価並びに肝硬変の検出のために、肝生検を必要とする。これらの患者の大きな亜群では、肝硬変は肝細胞癌の発症の主なリスク因子である。従って、肝線維症の進行を日常的に評価して肝硬変の病期を信頼できるように検出することができる血清マーカーに対するニーズがある。全血清タンパク質N-グライコームは、肝硬変を検出するための優れた生体マーカーである。本発明の方法及び装置を用いて、高い特異性と良好な感度でN-グライコームなどの肝硬変の血清マーカーを検出し、それにしたがって肝硬変患者における生検の代替を提供することができる。

20

【0142】

本発明の方法及び装置は、治療用のタンパク質製品の評価にも使用することができる。モノクローナル抗体は、癌から神経変性疾患に及ぶ種々の疾患を標的とする重要な治療剤である。本発明の方法は、開発段階及び臨床使用前において、現在の分析技法にのっ

30

ての深刻な難題を提示する目的である、これらの分子の特徴決定に用いることができる。さらに、組換えDNA法を用いて製造された治療用タンパク質は一般に複雑であり、不均質であり、発現、精製及び長期保存の間に様々な酵素修飾又は化学修飾にさらされる。組換えタンパク質配列の評価のための本発明の使用は、治療用タンパク質製品の安全性及び活性に影響を及ぼす可能性を有するアミノ酸の修飾及び配列の変化に関する情報を提供し得る。翻訳後修飾、タンパク質分解、又は転写/翻訳のエラーから生じる配列の違い、及び処理又は最終製品の保存の間に形成される分解生成物から生じる組換えタンパク質の不均質性の評価に当該装置を用い得る。本発明の方法及び装置は、多種多様な不均質の治療用タンパク質製品についてモノクローナル抗体のグリコシル化、脱アミノ化、及びジスルフィドマッピングの解析に使用することができる。

40

【0143】

本発明の方法及び装置を用いて、食物に起因する病気を検出することもできる。細菌、*Listeria monocytogenes*が原因で、米国では年間約1,600人のヒト回旋病症例及び250人の死亡を生じ、食物に起因する病気による米国死亡例すべての約10%を表す。本発明を用いて、伝染及び病原性に寄与する遺伝子を同時制御する*L. monocytogenes*のタンパク質を同定することができる。本発明の方法は、制御ネットワークの重要な部分であり得る少量のタンパク質の感度の良い検出（複合試料における正確な定量を伴う）を可能にし、*L. monocytogenes*の制御性タンパク質によって調節されるレギュロンを画定するのを助ける。

50

【0144】

本発明は、*Clostridium difficile*の病原性の判定に役立つことができる。*C. difficile*は、ヒト及び種々の動物種で多様な疾患に關与するグラム陽性の孢子形成性の嫌気性細菌である。臨床的な症状は、無症状のコロニー形成及び軽い下痢から、命を脅かす偽膜性大腸炎及び死に及ぶ。*C. difficile*の毒素はよく研究されているが、*C. difficile*の病原性はよく理解されていない。本発明を用いて、診断又は治療の対策のための潜在的な候補を同定する目的で、生体内の感染を模倣するインビトロの条件下で*C. difficile*の時間依存性のタンパク質の発現の変化を測定することができる。

【0145】

クローン病(CD)は、細胞内への微生物の侵入に応答して抗原提示細胞によって産生されるサイトカインであるIL-12及びIL-23が關与する慢性の病的なT細胞介在性の自己免疫炎症状態である。しかしながら、免疫におけるその役割を考えると、治療法においてIL-12/IL-23を直接標的とすることは望ましくない結果を有し得るので、他の標的がさらに有効であり得る。本発明の方法及び装置を用いて、IL-12/IL-23の産生を刺激するCD患者の血清から細胞外の可溶性因子を同定するのを助けることができる。

【0146】

本発明の別の態様は、本明細書に記載されているような生体分子プロセッサを製作する方法に關する。製作プロセスは一般に、以下のステップ、すなわち(1)基板におけるマイクロ流体ネットワーク及びナノチャネルを含むナノ流体構造の製作、(2)基板におけるナノワイヤの位置決め、(3)ナノチャネル/ナノワイヤの接合部でのナノワイヤにおけるナノギャップの形成、(4)ナノワイヤセンサーに対するマイクロコンタクトの形成、及び(5)カバー板と接合させてナノ流体センサー装置を完成させることから成る。ステップ(1)~(3)についての製作プロセスの順序は任意で選択することができ、且つ/又はそのうちの2つを任意で組み合わせることができる。各ステップを以下にさらに詳細に記載する。

【0147】

製作プロセスの順序の1例を図12に示す。この実施形態では、ステップ1には、事前に構造化されたスタンプを用いる単一ステップのナノインプリントリソグラフィ(NIL)を用いて、基板(例えば、ポリマー基板)にマイクロ及びナノチャネル構造を形成することが含まれる。ステップ2では、ナノワイヤ又はナノ粒子が、基板の形成されたチャネルに対して垂直に置かれ、これらのチャネルはフィーダーチャネル及び飛行時間型チャネルになる。ステップ3では、チャネルの上方に置かれたナノワイヤにナノギャップが形成され、各飛行時間型チャネルと交差する1対の検出電極が形成される。ステップ4では、当該検出電極が、外部リード接続のためのマイクロコンタクトに接続される。ステップ5では、製作された構造体がカバー板に接合されて、封入された流体装置が完成する。

【0148】

代わりの製作プロセスの順序を図13に示す。この実施形態では、ステップ1には、ナノチャネル形成の前にナノワイヤ又はナノ粒子をセンサー位置に置くことが含まれる。ステップ2では、NILを用いてマイクロ流体及びナノ流体の構造、チャネルが形成される。ナノギャップはNILプロセスの間又はその後形成されることができ、NILの間に部分的に形成され、追跡プロセスで完成する。ナノギャップの形成に続いて、外部リード接続のためにセンサー電極がマイクロコンタクトパッドに接続され(ステップ3)、製作された構造体がカバー板に接合されて流体装置が封入される(ステップ4)。

【0149】

別の代わりの製作プロセスの順序を図14に描いている。このプロセスには、後で導電性金属ナノ粒子で満たされてその導電性を改善することができる横断液体イオンコア電極を用いてナノ流体装置を作ることが含まれる。NILを用いてマイクロ/ナノ流体ネットワーク、構造及びチャネル並びに液体コアナノ電極構造が製作される(ステップ1)。次

10

20

30

40

50

いで、製作された構造体がカバー板に接合されて流体装置が封入され（ステップ２）、金属ナノ粒子が液体コア電極に加えられる（ステップ３）。

【０１５０】

採用される製作プロセスの順序にかかわらず、NILによるナノ流体構造の製作に続いてサイズ低下プロセスのステップを含め、流体ネットワーク、特に飛行時間型チャンネルのサイズを低下させることができる。例えば、このプロセスのステップは、基板ポリマーのガラス転移温度（ T_g ）よりは低い高温にてブランクのプラテンで圧力を加えることを含んでもよく、それは、ナノ流体構造のサイズを低下させ、ナノ流体構造の側壁の粗さを低下させるであろう。

【０１５１】

製作プロセスすべてに共通するのは、ナノインプリントリソグラフィに基づいてマイクロ／ナノ流体ネットワーク及び構造を形成するための「マスタースタンプ」の使用である。

【０１５２】

図１５は、シリコン基板におけるマスタースタンプ構造の例示的製作プロセスを描く。ステップ１では、フォトリソグラフィ及びクロムエッチングと、反応性イオンエッチング又は湿式化学エッチングを用いたSiエッチングステップとの組み合わせを実施し、シリコン基板における流体ネットワークのマイクロ構造を画定及び形成する。異なる深さのマイクロ構造を必要とするのであれば、フォトリソグラフィ及びSiエッチングのステップを繰り返す。ステップ２では、集束イオンビーム加工又は電子ビームリソグラフィを用いて、ナノチャンネル（例えば、飛行時間型チャンネル）、ナノチャンネル流入口構造、及びバイオリアクターチャンバーの支持構造体を含むセンサー装置のナノ構造を形成することができる。

【０１５３】

製作されたマスタースタンプをNILスタンプとして直接使用してポリマー基板にて流体構造を製造するか、又はそれらをマスター金型として用いてマスタースタンプにおける構造に関してネガティブトーン構造を持つ樹脂NILスタンプを製造する。後者に関して、熱又はUVのNILプロセスを介して、その全体が参照によって本明細書に組み入れられるWuら, "Complete Plastic Nanofluidic Devices for DNA Analysis via Direct Imprinting with Polymer Stamps," Lab Chip 11(17):2984-9(2011)によって記載されたようなポリマー基板における流体構造を製造するためにその後NILスタンプとして使用される種々の材料に製作されたマスタースタンプを複製することができる。NIL樹脂スタンプのための材料には、例えば、基板上にコーティングされる熱可塑性ポリマーシート、熱可塑性ポリマー層、基板上にコーティングされるUV硬化性樹脂、及び基板上にコーティングされるゾル-ゲル物質が挙げられる。使用することができる基板には、ポリマーシート、金属、シリコン、ガラス、石英、及び複合材料が挙げられる。ポリマー基板上にコーティングされるUV硬化性樹脂の使用は、成形の間に接触する物質のヤング率を下げることによって成形されたポリマー基板への低い接着を生じるので、好ましい材料の１つである。UV樹脂／ポリマーのスタンプとポリマー基板の類似する熱膨張係数のために、熱応力も低下する。

【０１５４】

図１６Ａは、UVナノインプリントリソグラフィを介してシリコンマスタースタンプから樹脂スタンプを製造するプロセスを示す。このプロセスでは、まず、適当量の低粘性のUV硬化性樹脂をガラス基材上に分配する又はスピコーティングする（ステップ１）。次いで、シリコンマスター上でUV硬化性の樹脂／基板を穏やかに圧迫する（ステップ２）。シリコンマスターの構造体を樹脂が完全に満たした後、UV光を使ってUV樹脂を硬化又は重合させる。硬化したUV樹脂／基板をシリコンマスターから離型して、シリコンマスタースタンプからのUV樹脂スタンプの製作を完成させる（ステップ３）。

【０１５５】

図１６Ｂは、製作された樹脂スタンプを用いて熱NILを介して熱可塑性ポリマー基板

10

20

30

40

50

に生体分子プロセッサのマイクロ/ナノ流体ネットワーク構造を製造するプロセスを示す。スタンプ/基板のアセンブリを基板ポリマーのガラス転移温度 (T_g) を上回って (普通、 T_g を $10 \sim 100$ 上回って) 加熱する (ステップ 1)。これにスタンプ表面への圧力の印加が続く (ステップ 2)。2つの平行なプラテンを用いた加力又は圧縮空気のいずれかによって圧力を加えることができる。NILスタンプとポリマー基板の間で均質な圧力印加及びコンフォーマルな接触を達成するには、圧縮空気が望ましい。基板ポリマーがスタンプ構造に完全に満たされた後、スタンプ/基板アセンブリを T_g 未満に冷却し、成形された基板から離型させる (ステップ 3)。熱NILに好適なポリマー基板には、PMA、PC、及びCOCが挙げられるが、それらに限定されない。

【0156】

生体分子プロセッサの製作プロセスすべてに共通する別の特徴は、センサーとして役立つ基板内のナノワイヤ又はナノ粒子の製作及び位置決めである。好適なナノワイヤは、当業者に既知のプロセスを用いて形成することができる。一般的な製作プロセスの模式的な概観を図17Aにて示す。手短には、電子ビームリソグラフィを用いてプラスチック基板又は酸化アルミニウム基板からナノ多孔性の鋳型又は膜を形成し、当該膜のベース上に導電性基板 (例えば、銀、金、又は酸化スズインジウム) をスパッタリングによって堆積させる (ステップ 1)。導電性基板を有するナノ多孔性膜への金属又は合金の電着によってナノワイヤを形成する (ステップ 2)。ナノ多孔性膜を溶解し (ステップ 3)、導電性基板を取り除いて (ステップ 4) ナノワイヤを解放する。図17Bはこのプロセスを介して形成された 10 nm の直径を有するSEM又はNiWのナノワイヤである。

【0157】

セグメント化されたナノワイヤを形成するための1種以上の似ていない金属又は合金のナノ多孔性鋳型への電着は、通常、2つの異なる技法 (例えば、異なる電解溶液及び異なるメッキ条件を使用する二槽法、又は1つの溶液を用いて電流若しくは電位をパルスして似ていない層を生成する一槽法) を用いて実施される (例えば、その全体が参照によって本明細書に組み入れられるLiu et al., "Perpendicular Giant Magnetoresistance of Multilayered Co/Cu Nanowires," Physical Review B 51: 7381-7384 (1995); Blondel et al., "Wire-Shaped Magnetic Multilayers for 'Current Perpendicular to Plane' Magnetoresistance Measurements," Journal of Magnetism and Magnetic Materials 148:317-318 (1995); Blondel et al., "Comparative Study of the Magnetoresistance of Electrodeposited Co/Cu Multilayered Nanowires Made by Single and Dual Bath Techniques," Journal of Magnetism and Magnetic Materials 165:34 (1997); Piroux et al., "Arrays of Nanowires of Magnetic Metals and Multilayers: Perpendicular GMR and Magnetic Properties," Journal of Magnetism and Magnetic Materials 175: 127-136 (1997); Evans et al., "Current Perpendicular to Plane Giant Magnetoresistance of Multilayered Nanowires Electrodeposited in Anodic GMR in Electrodeposited CoNiFe/Cu Multilayered Nanowires and Nanotube Aluminum Oxide Membranes," Applied Physics Letters 76:481 (2000); Davis et al., "GMR in Electrodeposited CoNiFe/Cu Multilayered Nanowires and Nanotube," ECS Transactions 1:71-77 (2005); and Pratt et al., "Perpendicular Giant Magnetoresistances of Ag/Co Multilayers," Physical Review Letters 66: 3060-3063 (1991)を参照)。これらの技法の共通点は、境界領域が破壊に供され、それを用いて、生体分子プロセッサに必要な予め必要なナノギャップを形成できる点である。

【0158】

アニーリングステップは大きな粒子を生成するのに役立つことができ、したがって単一の単量体単位の電極測定を行う能力を高めるナノワイヤ抵抗性を下げることができる。しかしながら、難題は、隣接するセグメントの熱膨張係数を合致させることである。従って、出願人は、組成が調整されたパルス電着を用いてFeNiCoをナノワイヤとして電着させる条件を開発した。印加した電流密度を変えること又は2-ブチン-1,4-ジオール (BD) などの添加剤を加えることによって、付着物の組成を変えることができ、そ

のようにして熱膨張係数を調整することができる。二槽構成にて金（又は銀）のセグメントを別の電解質から電着し、硫酸処理を含めて、AuとFeNiCoステップの間でセグメント化された堅牢なナノワイヤを生成する。

【0159】

図18は、本発明の生体分子プロセッサでの使用に好適なセグメント化された堅牢なナノワイヤを生成するのに使用される上述のプロセス及び条件の模式的概説である。ステップ1では、導電性基材（例えば、銀）がスパッタリングによってナノ多孔性膜のベース上に堆積される。FeNiCoの電気化学パルス堆積（ステップ3）の前に表面が空気にさらされる（ステップ2）。パルス堆積は、50%のデューティサイクル（2秒オン/2秒オフ）及び25mA/cm²以下の印加電流密度で行うことができる。さらに高い電流密度を用いてFeの量を減らすことができるが、パルス堆積のオフ時間は増やされるべきである。0.1g/Lの2-ブチン-1,4-ジオール（BD）の添加は、これらの条件でNiがより多い合金を生じる。BDは、熱膨張係数の調整、及び、パルスのオフ時間中の腐食防止にも用いられる。ステップ4では、DCメッキを用いてAuが別の電解質から電気化学的に堆積される。その後のFeNiCoの電気化学堆積（ステップ6）の前に、硫酸溶液（5容積%）で表面を処理する（ステップ5）。ステップ4～6を繰り返して完全にセグメント化されたワイヤを形成する（ステップ7）。膜を溶解し、ナノワイヤを解放する（ステップ8）。

【0160】

生体分子プロセッサのナノワイヤは、好ましくは5～20nmの範囲の直径を有する。20～200nmのワイヤの製造のためのナノ多孔性膜における電着を含む手法は当該技術で既知であるが、さらに細いワイヤの製作はナノ多孔性膜又は代わりの技法の改良を必要とする。

【0161】

後者に関して、図19は、犠牲ナノチューブ（すなわち、改変したナノ多孔性膜）を用いた極薄のナノワイヤの製作プロセスを示す模式図である。メッキ条件の制御をマスポート制御下とすることによって、銅又はポリピロールなどの類似しない金属又はポリマーから成るナノチューブをナノ多孔性鑄型の中に堆積させる（ステップ1）。次いで、ワイヤ及びそのセグメントをナノチューブの中に電気化学的に堆積させる（ステップ2）。孔口での堆積を回避するために、ボトムアップ充填を促進するSuperfilling添加剤を使用する。膜を溶解することによってチューブ/ワイヤの複合材を解放し（ステップ3）、チューブを選択的にエッチングすることによってワイヤを解放する（ステップ4）。

【0162】

代わりの実施形態では、図20に描かれている電気化学的なエッチング法を用いて極薄の電極が形成される。上で記載されたように製作されたセグメント化されたナノワイヤを当該装置のセンサーの位置に置く（ステップ1）。犠牲ギャップ領域を先ずチャンネル内で化学的にエッチングする（ステップ2）。電流分布が大部分一次であり（例えば、低いWagner数）且つ/又はエッチングが拡散によって駆動されるという条件で、残りの電極における鋭い端は、電気化学的なエッチングのための優先的な領域を提供する。当該装置の中に組み込まれた電気的コンタクトを用いて両側面がエッチングされ（ステップ3）生体分子プロセッサに好適な極薄電極を生成する。

【0163】

製作プロセスの別の不可欠のコンポーネントには、生体分子プロセッサのセンサーの位置にナノワイヤ又はナノ粒子を置く方法が含まれる。これは特に20nm未満のナノワイヤでは困難である。一実施形態では、表面をプログラムしたアセンブリが使用される。図21に示すように、表面をプログラムしたアセンブリにおいて、ナノワイヤが特異的に「接着する」化学パッチが基板の表面に形成される。化学パッチを含有する基板をナノワイヤ又はナノ粒子が分散している溶液に暴露すると、当該基板の表面において、ナノワイヤ又はナノ粒子は化学パッチの位置に位置付けられる。

【 0 1 6 4 】

化学パッチは、リフトオフ (M A P L) 法による分子アセンブリパターン形成を用いて、基板の表面に形成することができる (例えば、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる Falconnet et al., "A Novel Approach to Produce Protein Nanopatterns by Combining Nanoimprint Lithography and Molecular Self-Assembly," Nano Lett. 4(10):1909-1914 (2004); Park et al., "Nanostructuring of Anti-Adhesive Layers by Hot Embossing Lithography," Microelectron Eng. 67-68: 252-258 (2003); Park et al., "Chemical Patterning of Sub-50-nm Half Pitches Via Nanoimprint Lithography," Microelectron. Eng. 78-79:682-688 (2005); and Park et al., "Chemical Nanopatterns Via Nanoimprint Lithography for Simultaneous Control Over Azimuthal and Polar Alignment of Liquid Crystals," Adv. Mater 17(11): 1398-1402 (2005)を参照のこと)。このプロセスの概要を説明する一般的な模式図を図 2 2 に示すが、それは、例として、金系の物質に対する高い親和性を有するチオール基で終端化されたアルカンから成る化学パッチの生成を示す。この目的のために、図 2 2 に描かれているように、ガラス転移温度 (T_g) が基板 (高 T_g 物質) に比べて低いレジストを、この基板の上にスピコートする (ステップ 1)。ステップ 2 では、熱 NIL を利用してこの低 T_g のレジストにパターンを移す。これに続いて、残りのレジストを破壊してポリマー基板上に官能基も生成する反応性イオンエッチングステップが実施される (ステップ 3)。ペンダント - C O O H 表面官能基のアルカンチオールとの化学反応 (ステップ 4) に続いて、残りのレジストを表面から取り外す (ステップ 5)。これらのチオールは、自己アセンブリを介した金又は銀のナノワイヤの係留点として役立つ。

10

20

【 0 1 6 5 】

代替の実施形態では、化学パッチが図 2 3 に示すようにステンシルマスクを介して基板の表面に形成される。P M M A 及び P C などの熱可塑性プラスチックは例となる基板である。一般に、このプロセスには、ナノステンシルマスクを基板の表面に適用して、化学パッチが所望されない表面の領域をマスクすることが含まれる (図 2 3、ステップ 1)。化学パッチの添加のために、露出された表面を反応性イオンエッチング (R I E) 及び/又は他の化学修飾に供する (ステップ 2 及び 3)。マスクを除去する (ステップ 4) 際に、化学パッチは所望の位置に置かれる。代替の実施形態を図 2 4 に描いている。この実施形態では、ナノステンシルマスクの適用 (ステップ 1) 並びに R I E 及び/又は他の化学修飾による化学パッチの添加 (ステップ 2) の後、マスクがインタクトなままナノワイヤが置かれる (ステップ 3)。ナノワイヤが基板の表面に置かれるのに続いてマスクが取り外される (ステップ 4)。

30

【 0 1 6 6 】

それぞれ図 2 5 及び図 2 6 に描いているように、場の印加なし又はありで基板上のナノ検出位置にナノワイヤを磁氣的に方向付けることができる。図 2 5 で示す実施形態では、ナノインプリントリソグラフィを用いて、基板内にマイクロ/ナノ流体のチャネル及び構造を形成する。続いて、金のコンタクト (電極) を、基板表面上、ナノチャネルの両側のセンサー位置に堆積させる (ステップ 1)。金のコンタクトの上に鉄を堆積させて磁場を創り (ステップ 2)、ナノワイヤはチャネルに垂直に並ぶ (ステップ 3)。図 2 6 の実施形態では、金のコンタクト (電極) を、基板表面上、ナノチャネルの両側のセンサー位置に堆積させる (ステップ 1)。ナノワイヤは、金のコンタクトの堆積の後、印加された外部磁場に平行に並べられる (ステップ 2)。

40

【 0 1 6 7 】

置かれたワイヤにおけるナノギャップの形成は、図 2 7 及び 2 8 に描かれている種々の方法で達成することができる。図 2 7 は、ナノインプリントリソグラフィを用いたマイクロ/ナノ流体ネットワーク (すなわち、チャネル及び構造) 及びナノギャップ形成の同時形成を示す。この実施形態では、上述の好適な方法のいずれかを用いてナノワイヤを基板上に位置付ける (ステップ 1)。ステップ 2 では、ナノギャップ及びナノチャネルを形成するのに好適な薄い樹脂スタンプを、位置付けられたワイヤを含有する基板に、圧力 (例

50

えば、圧縮空気)を用いて適用する。応力の集中に応じて、完全な又は部分的な破断が達成される。マイクロコンタクトを基板表面に堆積させ、カバー板を接合してナノ流体装置を封入する(ステップ3)。部分的な破断しか達成されないのであれば、その後の電氣的絶縁破壊(すなわち、ナノワイヤを介して高電場を印加すること)、化学エッチング、又は他の好適な手段によって完全な破断を形成させる(ステップ4)。

【0168】

図28は、マイクロ/ナノ流体ネットワーク(すなわち、チャネル及び構造)が基板にて機能する場合のナノインプリントリソグラフィによるナノギャップ形成のプロセスを描く。この実施形態では、ナノワイヤは、上で記載された方法を用いてチャネルの上に置かれる(ステップ1)。置かれたナノワイヤは薄いポリマーと基板の間に挟まれ、圧力が印加されてチャネルを横切るナノワイヤの完全な又は部分的な破断を達成する(ステップ2)。マイクロコンタクトを基板表面に堆積させ、カバー板を接合してナノ流体装置を封入する(ステップ3)。部分的な破断しか達成されないのであれば、その後の電氣的絶縁破壊、化学エッチング、又は他の好適な手段によって完全な破断を形成する(ステップ4)。

【0169】

例えば、走査プローブ、ワイヤ交差、鋳型合成物質、シャドウマスク蒸発、機械的切断接合技法、電気メッキ、及びカーボンナノチューブの局所酸化切断を含む、当該技術で既知の方法によってもナノギャップを製作することができる(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるChen et al., "On-Wire Lithography-Generated Molecule-Based Transport Junctions: A New Testbed for Molecular Electronics," J. Am. Chem. Soc. 130(26):8166-8168 (2008); Hu et al., "A Self-Assembled Nano Optical Switch and Transistor Based on a Rigid Conjugated Polymer, Thioacetyl-End-Functionalized Poly(para-phenylene ethynylene)," J. Am. Chem. Soc. 127:2804-2805 (2005); Kushmerick et al., "Effect of Bond-Length Alternation in Molecular Wires," J. Am. Chem. Soc. 124:10654-10655 (2002); Mbindyo et al., "Synthesis and Assembly of Nanowires for Molecular Electronics," Abstracts of Papers of the Am. Chem. Soc. 223:155-PHYS (2002); Mbindyo et al., "Template Synthesis of Metal Nanowires Containing Monolayer Molecular Junctions," J. Am. Chem. Soc. 124:4020-4026 (2002); Reed et al., "Conductance of a Molecular Junction," Science 278:252-254 (1997); Tang et al., "Encoding Molecular-Wire Formation Within Nanoscale Sockets," Angew. Chem. Int. Ed. 46:3892-3895 (2007); Xu & Tao, "Measurement of Single-Molecule Resistance by Repeated Formation of Molecular Junctions," Science 301:1221-1223 (2003))。

【0170】

電極によって検出されたシグナルを変換する外部の電子コンポーネントにナノワイヤ又は検出電極を連結する手段として、基板表面にマイクロコンタクトパッドを形成する。当該マイクロコンタクトパッドは、例えばAu(金)の薄層をナノ粒子が堆積されている部分のみに無電解析出させるのを可能にする「シード」層として役立つように基板上にパターン形成された貴金属ナノ粒子による無電解析出プロセスを用いて形成することができる。

【0171】

2つの異なる可能なプロセス戦略を用いてマイクロコンタクトパッドを形成するプロセスを図29A及び29Bに描いている。図29Aに描いている戦略については、流体ネットワークを形成するNIL及びナノワイヤの位置決め及びギャップ形成に続いて、ポリマー基板は従来の光マスクを介してUV(254nm)に暴露される(ステップ1)。これは、ポリマーがUV光で照射された部位のみでカルボン酸を生成する。ステップ2では、ウエハー全体がEDC/NHSの存在下でエチレンジアミンと反応し、これは表面カルボン酸とエチレンジアミンの一方のアミノ末端との間でアミド結合を生成することにより、アミン終端基を形成する。アミン終端基はUV照射にさらされた部位でのみ形成される。次に、ウエハーをAgナノ粒子を含有する溶液に浸漬し(ステップ3)、それは文献で確

立されているように、アミン基との強い錯体を形成する。これらの表面の疎水性及び係留点（この場合はアミン基）の欠如に起因して、A g ナノ粒子はU V 照射にさらされていないポリマー基板には接着しない。最終ステップには、A u 無電解メッキ浴にウエハーを入れること及び所望のA u ベースのマイクロコンタクトパッドを形成することが含まれる。

【0172】

図29Bに描いているように、ポリマー基板上の光マスクの設置に続いて、当業者によく知られた種々の直接堆積法を用いて金属のマイクロコンタクトを形成することができる（ステップ1）。これらの技法には電子ビーム堆積、金属標的のスパッタリング、又はマグネトロン堆積が挙げられるが、これらに限定されない。堆積に続いて、ステンシルマスクが外される（ステップ2）。

【0173】

本発明の生体分子プロセッサの製作プロセスにおける最終ステップには、カバー板を接合してマイクロ/ナノ流体の装置を封入することが含まれる。カバー板の接合手順を図30Aに描いている。当該プロセスには、成形された基板にカバー板を組み付け、組み付けた産物を真空密封したバッグに入れることが含まれる。真空密封は、熱プロセス全体を介した構造の変形を最少限に抑える。脱気した真空密封バッグを圧力ヒーター（図30B）に入れ、基板及びカバー板のガラス転移温度に近い溶媒の沸点まで加熱し、接合後にアセンブリを冷却する。溶媒を沸騰させることは均一な温度及び蒸気圧を提供し、それは、当該装置全体に圧力が均一に分配されることを保証する。このプロセスを用いた結果は、ナノメートル規模でさえ、低アスペクト比のマイクロ構造へのカバー板の接合について構造的な変形を示さない（図30C）。

【0174】

組み立てた装置におけるマイクロコンタクトを、側面の、上面の、又は底面の電子接続（図31）を用いて、図32に示すような適当なシグナル処理電子機器に相互接続することができる。ワイヤを直接ナノ検出装置上でマイクロコンタクトに封止することによって、側面接続を作る。上面又は底面の接続は、マイクロコンタクトに対して垂直に作られており且つ図32に描写されている追加の電子チップ上に含有されている、金属コンタクトを有する。シグナル処理に必要な電子コンポーネントは、当業者に共通する技法を用いて印刷回路基板（PCB）上に備えられる。

【0175】

集積された二重電極ナノギャップ装置についての同等の回路を図32に示す。電氣的読み出しに対する主な寄与因子は、ナノギャップ抵抗（ R_N ）、緩衝液との接触におけるナノ電極表面のキャパシタンス（ C_{ne} ）、及びナノ電極の電気抵抗（ R_{ne} ）である。

【0176】

ナノギャップが R_2 によって接続されるので、結果は、入口ナノギャップを横切る乱れが R_2 を介して出口ナノギャップを横切って同時に観察されるであろうということである。また、各ナノギャップを横切って生じる電流は、不定であって時間と共に変化する比にて、各ナノギャップの間で分かれる。従って、1つのナノギャップを横切るコモンを他から分離する（浮かせる）ことによって、 R_2 を介する両ナノギャップ間のクロストークを妨げる電子回路を設計することが必要である（図32を参照）。これを達成するために、2つの電流対電圧（ $I-E$ ）変換器を2つの独立した非接地電源（ $\pm 15V$ のDC）と共に使用する。さらに、システムの増幅端とデジタル化端との間の効果的な絶縁を保証するために、 A/D 及び D/A の変換器の前後に集積リニア光アイソレータ（光カプラ）を使用する。光アイソレータは、光を利用して入力端から出力端まで電気信号を伝達するように設計された電子装置である。それらは、電氣的な絶縁との連結を提供し、回路の一方の端での変化が他方に影響するのを防ぐ。各光アイソレータ回路は、光チップと4つの演算増幅器を備える。プラスチック遮蔽したBNCケーブル及びコネクタをデジタイザと $I-E$ 変換器の間の接続すべてで使用する。

【0177】

$I-E$ 変換器の主要コンポーネントは前置増幅器である。電流メータは低い入力インピ

10

20

30

40

50

ーダンスを有するべきであるが、測定される電流は非常に小さい（通常、ピコアンペア、 pA ）ので、 $I-E$ 変換器における電子コンポーネントはすべて高い入力インピーダンスを持たなければならない。1,000のゲインを達成し且つ高いバンド幅（約80kHz）を維持するために、2段階増幅器を用いることができる。振動を防ぐために、デジタル的に選択できるフィードバックコンデンサ C_F （1pF）を R_f に並列に接続することもできる。増幅器の非反転入力、遮蔽された3軸ケーブルを介してナノギャップ電極に接続され、それによって指令電圧が提供され、出力電流が受け取られ、且つ容量結合からのシグナルラインを外部ノイズから遮蔽する。外部ノイズからの遮蔽は、1つの増幅器のコモンに接続され且つ他のものからは絶縁されたデュアルファラデーケージを用いて達成される。

10

【0178】

当業者に一般的な実践を用いて、上記の回路設計を単一チップで多重化することができる（図32を参照）。データ記憶スペースをできるだけ減らすために、ピーク検出回路を、ピーク振幅も記録する単一チップで使用する。多重化チップをフィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA）に接続して、この多重化チップからの出力を処理する。

【実施例】

【0179】

本発明の実施形態を説明するために以下の実施例が提供されるが、それらは決して本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

【0180】

20

実施例1～5についての材料及び方法

以下の実施例及びシミュレーションの結果は、電気クロマトグラフィを用いた単一のモノヌクレオチドの飛行時間同定のプロセスを表す。dNMPおよびイオンの相互作用のために、CHARMM27力場（その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Foloppe & MacKerell, "All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: I. Parameter Optimization Based on Small Molecule and Condensed Phase Macromolecular Target Data," J. Comput. Chem. 21:86-104 (2000)）を、水についての剛体CHARMM TIP3Pモデルと共に用いた。静電気学についての短距離のカットオフは1.0nmであった。Lennard-Jonesの相互作用は0.8～1.0nmの間隔でゼロに切り替えた。長距離静電相互作用については、シミュレーションボックスの長さを非周期方向については3倍とした、平板体系用に補正した三次元の粒子-粒子-粒子-メッシュ法を用いた（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるYeh & Berkowitz, "Ewald Summation for Systems with Slab Geometry," J. Chem. Phys. 111:3155-3162 (1999)）。

30

【0181】

5'末端にリン酸基を持つ、デオキシヌクレオチドリン酸又はdNMP（dAMP、dCMP、dGMP、dTMP）を、例えば、二本鎖DNAにエキソヌクレアーゼを用いて、インタクトな二本鎖又は一本鎖のDNAの切断から作製することができる。酵素活性にとって最適なpHが7.5であることに基づいて、dNMPはプロトン化されていないものとしてシミュレーションを行った。なぜならdNMPの pK_a は約6.8であり（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるNucleic Acids in Chemistry and Biology; Blackburn, Eds.; IRL Press: Oxford, (1990)）、dNMPは正味電荷 $-2e$ （ e は電子電荷である）を与えられるからである。CHARMM27トポロジーファイルは、5'末端に非プロトン化リン酸を有するDNAについて末端断片を含有しない。パッチを用いて、原子を付加する又は差し引くこと及び部分電荷を改変することによって、既存のトポロジーを改変する。トポロジーファイルは、5'末端におけるプロトン化リン酸、3'末端におけるプロトン化リン酸、及び3'末端における非プロトン化リン酸を有するDNAについての末端パッチを含有する。従って、3'非プロトン化版と3'プロトン化版の間における影響を受けた原子における部分電荷の差異を、5'非プロトン化版のための部分電荷に加えた。当該影響を受けた原子には、リン酸基及びそれに直接結合した炭素原子のみが含まれた。

40

50

【 0 1 8 2 】

5'末端に非プロトン化リン酸基を有するデオキシヌクレオチドリン酸を用いた分子動力学 (MD) シミュレーションを可能にするために、以下の「パッチ」を既存のCHARRMM力場に加えた。

PRES 5PO3 -2.00 ! 5'terminal PHOSPHATE patch

! same shifts in charge as between 3PHO and 3PO3

GROUP

ATOM C5' CN8B -0.18

ATOM H5' HN8 0.09

ATOM H5" HN8 0.09

ATOM P P 1.10

ATOM O1P ON3 -0.90

ATOM O2P ON3 -0.90

ATOM O5' ON2 -0.40

ATOM O3P ON3 -0.90

BOND O3P P

ACCE O3P P

! Built in B-DNA-like conformation (NF)

BILD C4' C5' O5' P 0.0000 000.00 -146.00 000.00 0.0000

BILD C5' O5' P O3P 0.0000 000.00 -46.90 000.00 0.0000

BILD O3P O5' *P O1P 0.0000 000.00 -115.82 000.00 0.0000

BILD O3P O5' *P O2P 0.0000 000.00 115.90 000.00 0.0000

10

20

【 0 1 8 3 】

図 3 3 は、4 つすべての末端及び影響を受けた原子が標識されている d N M P を示す。

【 0 1 8 4 】

スリット壁を、 $x y$ 面に平行で $z = \pm 1.5 \text{ nm}$ に置かれた (壁原子の中央が $z = 1.5 \text{ nm}$ (底面) 及び $z = -1.5 \text{ nm}$ (上面) に置かれた) 2 つの平面によって画定した。炭素原子についての Lennard-Jones の 12-6 パラメータ (炭素-炭素 = 0.11 kcal/mol 、炭素-炭素 = $0.4/2.1/6 \text{ nm}$) を有する原子で構成されるバルク流体のシミュレーションを行うことによって、スリット壁を構築した。当該原子の質量を 12.011 から 14.30226 amu に増やし、P M M A の融合原子 (united atom) 表示における当該原子の平均質量と等しくするようにした (水素原子はないが、水素原子が結合した原子の質量が上昇している)。このシミュレーションは 500 K で実行し、それが流体でありかつその密度が非晶質 P M M A の密度に近いことを確保した。スリット壁の所望のサイズに合致させるために x 及び y 方向のシミュレーションボックスのサイズは 5.0 nm であるように選択した。スリット壁の最初の構成は、この流体の $5.0 \times 5.0 \times 1.2 \text{ nm}^3$ の長方形領域から取った。原子の中心が長方形領域の中にある場合、それは壁に含めた。これは原子的には平滑 (原子のサイズ未満の粗さ) である表面を生じたが、不均質であった。スリット壁の各セットは 10 ps 間隔を空けて流体シミュレーションの間に異なる時間から取った。 3 nm のスリット幅を選択して、 5 nm より小さい寸法で実際のチャネルを製作しているが (その全体が参照によって本明細書に組み入れられる Menard et al., Nano Lett. 11: 512-517 (2011))、無駄なシミュレーション時間を回避して長い間スリットの中心付近で d N M P を拡散させた。小さな完全に疎水性のナノ規模の形状を使用することは、水がその中に入る困難さのために実用的ではないとも言及されるべきである。スリット壁は物理的に現実的であるようには選択されなかったが、この最初の試験のための単純な系として選択された。

30

40

【 0 1 8 5 】

いったん壁が構築されると、d N M P がスリット壁の間に動かされ、V M D を用いて水及びイオンが加えられた。使用された体系については L A M M P S において 3 8 N P T シミュレーションを実施できなかったため、水の量は試行錯誤によって決定した。V M D に

50

おける *S o l v a t e* の機能を用いて、設定：境界 = 2 . 4、結合した x 及び $y = \pm 25$. 65、結合した $z = \pm 15$ で水を加えた。これらの設定を試行錯誤によって決定し、水とスリット壁しか含有しない平衡シミュレーションにて水（スリットの中央）の理に適った嵩密度を得た。平衡嵩水密度は約 1.015 g/cm^3 であった。*d N M P* を溶媒和した後、*V M D* における *A u t o i o n i z e* の機能を用いて4つの水分子を取り除き、3つのナトリウムイオンと1つの塩化物イオンで置き換えた。平衡シミュレーション及び非平衡シミュレーションの双方で使用したシミュレーションシステム及び *D N A* の化学構造を図34A及び34Bにて示す。

【0186】

以下に、シミュレーションの実施に用いた方法及び一般的なパラメータを記載する。壁原子は、 $83860 \text{ kcal/mol} \cdot \text{nm}^2$ のバネ定数を持つバネによって初期位置に取り付けた。流れシミュレーションについては、 0.1 ps の時間定数で *B e r e n d s e n* サーモスタットを用いて 300 K にて壁原子のみを温度調節した。定常状態での流れの間の流体の温度は、粘性の流れによる流体の加熱のために、温度調節した壁の温度よりも約 3 K 高かった。平衡シミュレーションについては、同じ時間定数で追加のサーモスタットを流体に使用した。各 *d N M P* については、異なる壁構成で3回又は4回のシミュレーションを実行して特定の壁構成による偏りを減らした。 x 方向（図34Aを参照）に一定の物体力 f_i を各原子に適用することによって流れを誘導した。 f_i の大きさは $f_i = m_i a$ であるように選択し、式中、 m_i は原子 i の質量であり、 a は加速度であり、原子すべてについて同じものを選択した。このアプローチは、圧力駆動流（その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Zhu et al., "Pressure-induced Water Transport in Membrane Channels Studied by Molecular Dynamics," *Biophysical Journal* 83:154-160 (2002)、Carr et al., *IEEE Trans. Nanotechnol.* 10:75-82 (2011)) または毛管力により起こる流れ（その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、Han et al., *J. Colloid Interface Sci.* 293: 151-157 (2006)) への近似である。流体の全 n 個の原子に適用された力 f_i による流れの方向に沿った圧力勾配は、

$$\frac{dP}{dx} = \frac{\sum_{i=1}^n f_i}{A_{\text{流体}} L_{\text{ボックス}}}$$

によって与えられ、式中、 $L_{\text{ボックス}}$ は外部から加えられた力の方向（ x ）に沿ったシミュレーションボックスの長さであり、 $A_{\text{流体}}$ は加えられた力の方向に垂直の面（ yz 面）における流体の面積である。 $a = 263.592 \text{ nm/ns}^2$ を選択し、かつシミュレーションシステムを記述するパラメータの固有値（すなわち、流れ領域の原子の数及びその質量、流れに垂直な面積、及びシミュレーションボックスの長さ）を用いると、ナノスリットにおける流れを駆動する圧力勾配はおよそ $dp/dx = 2.836 \text{ パール/nm}$ である。加えられた力は、最大流速約 1.5 m/s を特徴とする、 z 方向を横切るほぼ放物線の速度プロファイルを生成する。*M D* シミュレーションでは、アクセス可能な相対的に短い時間（普通はわずか数百ナノ秒）のため、ナノ規模の流れの典型的な速度に比べてそのように速い速度でのシミュレーションが必要である。後で考察されるように、非常に速い速度にもかかわらず、*d N M P* の壁への吸着及び壁からの脱着を記述する特徴的なパラメータは、流れによる実質的な影響を受けないようである。定常状態の条件が達成されるのを可能にするために、各流れシミュレーションの最初の 15 ns を解析から捨てた。平衡シミュレーションでは、 1 ns の平衡時間を捨てた。

【0187】

ヌクレオチドの吸脱着事象を判定するためのアルゴリズム

吸脱着の時間を測定するのに用いるアルゴリズムを、下壁に対する単回の吸脱着事象についての図35にて説明し、以下のように実施した。まず、長さ 0.5 ns の移動平均を用いて d_w を平滑化した（ $d_{\text{平滑}}$ と表示した）。 d_1 と表示されている、 $d_{\text{平滑}}$ が $\pm 0.8 \text{ nm}$ と交差した点を画定した。これは *P M F* 曲線が平坦になり始めるおよその位置であ

る(図36)。これらの点を、それらが $\pm 0.8 \text{ nm}$ の境界と交差した方向によって、吸着事象の前であるか又は脱着事象の後であると仮定した。ステップの残りは元々の非平滑化 d_w を用いた。 d_1 と同じ時間だが d_w に対応する点のセット(d_2 と表示する)を画定した。 d_2 から出発し、PMF曲線(図36)における最小点から離れて、 d_w の値 1.0 nm まで、時間における前方(脱着)又は後方(吸着)にデータをトレースした。次いでトレースの方向を逆転させ、 $d_w = d_{\text{上}}$ (上壁に近づく場合)まで、 $d_w = d_{\text{下}}$ (下壁に近づく場合)まで、又はデータの開始又は終了に達するまで、トレースを実施した。ほとんどの場合、 $d_{\text{上}}$ 及び $d_{\text{下}}$ を、PMF曲線(図36)における大域的最低点よりもわずかに壁に近い 0.42 nm に設定した。場合によっては、明らかな吸脱着事象が見逃されないように、それらの1つを微修正する必要があった。これは必要であった。なぜなら、各壁における原子の構成は異なるので、各壁の吸着はわずかに異なっていたからである。当然、アルゴリズムは、事象を正確に捕捉するために当初の $d_{\text{上}}$ 及び $d_{\text{下}}$ を手動で調整することがないように、当該 $d_{\text{上}}$ 及び $d_{\text{下}}$ を決定するように工夫され得る。しかしながら、正確な出発値は吸着及び脱着の時間の最終的な値に影響しなかった。このトレースから得られた点を d_3 として示した。 d_3 又はデータセットの最初の時間若しくは最後の時間に等しい時間で繰り返しがあった場合、これらの点は吸着事象又は脱着事象の近傍ではない d_2 点に対応したので、これらの点を排除した。点を排除した後、 d_{NMP} が上壁及び下壁に吸着した際の d_w の平均値を、吸着点及び脱着点としての d_3 を用いて算出した。次いでトレースステップを繰り返したが、ただし、 $d_{\text{上}}$ 及び $d_{\text{下}}$ を、算出したばかりの当該平均値と置き換え、 d_3 を更新し、吸着中の d_w の平均値を再算出した。2~3回繰り返した後、 d_3 を一定値に変換した。平滑化及び d_1 を決定するための $d_w = 0.8 \text{ nm}$ の選択によって、表面からの短い時間又は距離の逸脱が脱着事象として分類されるのが排除され、当初の d_3 を決定するための $d_{\text{上}}$ 及び $d_{\text{下}}$ の当初の選択によって、 d_{NMP} が表面から跳ね返った事象が吸着事象として分類されるのが妨げられた。

【0188】

PMFの不確定度の推定

図36に示すPMFにおける不確定度を、各ピンにおける生成時間を3つの部分に分割することによって算出した。さらに、これらの部分から、次いで、各モノヌクレオチドについて3つのPMF曲線を生成した。これによって、得られる平均化されたPMF曲線上の各点の平均値及び平均値の標準偏差を評価することが可能になった。4つのPMFでの最大値の位置における及び平均吸着自由エネルギーにおける不確定度を推定するために、以下の数値誤差伝搬法を用いた：(i)曲線上の各点についての平均値及び平均値の標準偏差が各ピンについての正規分布を規定すると仮定した；(ii)各点についての分布から100,000個の無作為試料を取って100,000個のPMF曲線を生成した。PMFでの最大値の位置における及び平均吸着自由エネルギーにおける不確定度は、100,000個の最大値からの100,000個の自由エネルギー曲線と、これらの曲線から算出された平均吸着自由エネルギーから得られた。不確定度は標準偏差の2倍であると見なされた。

【0189】

d_{NMP} が壁に吸着している又はしていない間のみ算出された流れの方向における速度と角度については、以下のように不確定度を推定した。ブロック平均化を用いたが、あらゆるブロックの長さが等しい通常のやり方ではなかった。その代わりに、各 d_{NMP} についての全シミュレーションについて、各吸着又は脱着期間を別個のブロックとして利用した。各ブロックにおけるデータの平均値を用いてブロック平均値 x_i を得た。重み w_i が各ブロックのデータ点の数である n 個のブロック平均値の加重平均によって全体の平均値を得た。 x_i の加重平均及び分散は以下を用いて算出した。

$$w_i' = w_i / \min(w_i) \quad (S1)$$

$$\bar{x}_w = \sum_{i=1}^n w_i' x_i / \sum_{i=1}^n w_i' \quad (S2)$$

$$s_w^2(x_i) = \frac{\sum_{i=1}^n w_i' (x_i - \bar{x}_w)^2}{\left(\sum_{i=1}^n w_i' \right) - 1} \quad (S3)$$

10

【 0 1 9 0 】

加重平均値の分散は、重みが等しい場合は n に減る有効な基数 (b) で割ることによって算出し、不確定度 (u) は加重平均値の標準偏差の 2 倍と見なされた。

$$s^2(\bar{x}_w) = s_w^2(x_i) / b \quad (S4)$$

$$b = \left(\sum_{i=1}^n w_i \right)^2 / \sum_{i=1}^n w_i^2 \quad (S5)$$

20

$$u(\bar{x}_w) = 2\sqrt{s^2(\bar{x}_w)} \quad (S6)$$

流れの方向における全体平均速度及びその不確定度は以下を用いて算出した。

$$\bar{v} = f_{\text{吸着}} \bar{v}_{\text{吸着}} + (1 - f_{\text{吸着}}) \bar{v}_{\text{脱着}} \quad (S7)$$

$$u(\bar{v}) = 2\sqrt{f_{\text{吸着}}^2 s^2(\bar{v}_{\text{吸着}}) + (1 - f_{\text{吸着}})^2 s^2(\bar{v}_{\text{脱着}})} \quad (S8)$$

30

式中、 $f_{\text{吸着}}$ は、各 d N M P について、全シミュレーションの吸着時間を、全シミュレーションの合計時間で割ったものである。

【 0 1 9 1 】

吸着している時間の割合の平均値、吸着事象の平均頻度、及びそれらの不確定度も、方程式 S 1 ~ S 6 を用いて算出した。違いは、「ブロック」は各 d N M P についてのシミュレーション全体であること、吸着している時間の割合についての重み (w_i) は合計シミュレーション時間であること、及び、吸着の頻度についての重みは流れの方向に移動した合計距離であることのみであった。吸着中の d N M P - 壁のエネルギーについては、等しいブロックの長さによるブロックの平均化を用いた (w_i はすべて方程式 S 1 ~ S 6 において等しい)。ブロックの長さは 1 3 0 0 点であり、0 . 5 2 n s に相当した。

40

【 0 1 9 2 】

軸 2 の壁表面との角度

図 3 5 にて定義される軸 2 の、最も近位の壁表面の平面に対する平均角度を、 d_w の関数として、平衡と非平衡双方の場合において、吸着については図 4 1 にて、脱着については図 4 2 にて示す。(以下の)表 7 は、吸着期間中か脱着期間中かに関わりなく、d N M P が吸着している間に算出された軸 2 の平均角度を示す。軸 2 について図 4 1 及び 4 2 で示す所与のヌクレオチドについての吸着及び脱着の曲線は、角度の変化がノイズと同等であるので、容易には互いに区別できない。ヌクレオチドが吸着中に壁の近くにある場合、d N M P における最も疎水性の側が概して壁に近いが、d T M P は例外である。メチル基

50

は疎水性であるが、非平面のメチル基は、ヌクレオチドにおける当該基が存在する側を壁から離す。壁の近くの軸 2 の配向度は、脱着の間、さほど強くない。ノイズのレベルを考えると、dAMP、dCMP、又はdGMPについての軸 2 の角度において有意な最小値又は最大値はない。dTMPについては、疎水性のメチルと表面との相互作用が、吸着中及び脱着中の軸 2 の角度に有意な最大値をもたらす。脱着についてのdTMPの最大角度は、平衡の場合、吸着についての角度よりも小さい。また、この最大値は、非平衡の場合に比べて平衡の場合に小さい。dTMPの脱着の場合、軸 2 の角度は、最大値の後に最小値も存在する。

【0193】

飛行時間分布を分離するのに必要なチャンネル長の決定

10

モノヌクレオチドの飛行時間(TOF)分布を分離するのに必要な最小のチャンネル長Lの決定についての詳細は、以下のとおりである。飛行時間分布についての従来の形態は想定しなかった。代わりに、台形法則を用いて長さ0.5nm(d^{TOF})の軌跡セグメントにわたる飛行時間分布の確率ヒストグラムの数値積分によって連続分布関数(CDF)を推定した。その後、各CDFが値0.00135(μ⁻)及び0.99865(μ⁺)に達した点(μは平均TOFである)を、線形補間によって推定した。これらの点は試料分布の幅を画定する。以下の方程式では、これらの点はTOF分布の境界と見なされた。数値0.00135及び0.99865は、どれだけの重複が許されるかを画定し、分布の分離において精度の増減を得るために変化し得る。単純化するために、この解析では、主文書で画定されたDTOF_{0.5×N}を、正規化された形態で使用した(すなわち、無作為変数TOFの値をすべてNで割った)。その結果、正規化された形態では、任意のヌクレオチドについてのDTOF_{0.5×N}は、平均TOF値μを特徴とし、Nの平方根と共に減少する幅を有する。ヌクレオチドの各対(、)の分布が重複しないために必要なNの最小値は、方程式(S9)と(S10)の組み合わせである方程式(S11)によって与えられる。必要な最小のチャンネル長(L)は方程式(S12)によって与えられる。

20

$$\mu_a + \frac{H[\mu_a - \mu_b] \delta_a^+ - H[\mu_a - \mu_b] \delta_a^-}{\sqrt{N_a}} = \mu_b + \frac{-H[\mu_b - \mu_a] \delta_b^- + H[\mu_a - \mu_b] \delta_b^+}{\sqrt{N_b}}, \quad (S9)$$

30

$$N_b = \frac{d_a^{TOF}}{d_b^{TOF}} N_a = N_a = N_{a,b}, \quad (S10)$$

$$N_{a,b} = \frac{H[\mu_a - \mu_b] (\delta_b^- + \delta_a^+)^2 + H[\mu_a - \mu_b] (\delta_a^- + \delta_b^+)^2}{(\mu_a - \mu_b)^2}. \quad (S11)$$

$$L = \max[N_{a,b} d^{TOF}], \quad (S12)$$

【0194】

これらの方程式において、μは平均値であり、⁻及び⁺は、当該平均値から、CDFが0.00135及び0.99865に等しい点への距離である。H[x]はHeaviside階段関数(x=0の場合はH[x]=0であり、x>0の場合はH[x]=1である)であり、それは、分布の2つの考えられる構成(型の分布の平均が型の分布の平均より小さい(μ<μ)、又は型の分布の平均が型の分布の平均より大きい(μ>μ)のいずれか)を区別するのに用いられる。型及び型のヌクレオチドに必要な試料の数(N_a及びN_b)は、方程式(S1)を満たす多くの考えられる組み合わせを有する。しかしながら、それらは、2つのヌクレオチドが同じ全体距離を移動しなければならないという事実(d^{TOF}_{N_a}=d^{TOF}_{N_b})によって制約される。型及び型の飛行時間の算出に用いられる距離(d^{TOF}及びd^{TOF})はいずれも0.5nm(d^{TOF})なので、そのときN_a=N_b=Nである。Nは今や方

40

50

程式 (S 9) で唯一未知であり、それを解くことによって方程式 (S 1 1) が与えられる。 $N \times d^{T O F}$ の最大値が、必要なチャンネル長である。

【 0 1 9 5 】

実施例 1 - 平衡シミュレーション及び吸着自由エネルギー

平衡シミュレーションの目的は、流れのない状況での個々の d N M P の吸脱着のメカニズム及びエネルギー特性を調べることである。各 d N M P について、異なる壁構成で幾つかのシミュレーションを実行した (表 8 を参照) 。各シミュレーションの持続時間は約 6 5 n s であったが、4 つの d N M P すべて及び種々の壁構成のすべてについての合計シミュレーション時間は約 9 6 6 n s であった。個々の d N M P とスリット壁との相互作用は、ナノスリットを横切るそれらの自由エネルギープロファイルによって最良に説明される。反応座標 (平均力又は P M F のポテンシャル) の関数としての、基準状態に対する自由エネルギーの差異 ΔF は、d N M P が反応座標の所与の値に位置する確率 P_r に関連する。d N M P が平滑な表面に吸着する又はそれから脱着する確率が対象であったので、反応座標は、 $z = \pm 1.5$ n m に位置する最も近いスリット壁平面から d N M P の質量中心までの距離 d_w と見なされた。自由エネルギープロファイルは、 $P_r (d_w)$ の値を用いて

$$\Delta F(d_w) = -kT \ln \left[\frac{Pr(d_w)}{Pr(d_{w,ref})} \right] \quad (1)$$

によって与えられ、式中、 k は B o l t z m a n n の定数であり、 T は温度であり、 $d_{w,ref}$ はナノスリットの中心 ($z = 0$) における壁から離れて選択される基準状態である。

【 0 1 9 6 】

平衡シミュレーションの間、4 つの d N M P すべてが壁表面に対して複数回吸着及び脱着した。従って方程式 (1) を直接適用できた。d N M P が合計シミュレーション時間と同等の (例えば、数ナノ秒より長い) 時間にわたってスリット表面に吸着する場合の自由エネルギーを計算するには、バイアスを受けた平衡シミュレーション、例えばアンブレラサンプリング (その全体が参照によって本明細書に組み入れられる Torrie & Valleau, Chem. Phys. Lett. 28:578-581 (1974); Novak et al., "Umbrella Sampling Simulations of Biotin Carboxylase: Is a Structure With an Open ATP Grasp Domain Stable in Solution?" J. Phys. Chem. B 113:10097-10103 (2009); and Novak et al., "Behavior of the ATP Grasp Domain of Biotin Carboxylase Monomers and Dimers Studied Using Molecular Dynamics Simulations," Proteins: Struct. Funct. Bioinform. 79:622-632 (2011)) を必要とし得る。複数回の吸脱着事象は、サンプリングされる不均質な表面上の異なる吸着部位についても可能なので、方程式 1 における ΔF はそれら異なる部位にわたる平均である。実際、d N M P はそれらがもっと多くの壁表面をサンプリングするのを可能にする壁に吸着した場合でさえ、壁平面に対して接線方向で可動性であった。このことは、壁表面に強い d N M P 吸着部位がないこと、及び、当該表面全域で吸着強度にほとんど違いがないことを示している。これらは、飛行時間に基づく配列決定を実現可能にするために望ましい壁表面の特徴である。しかしながら、当該壁表面は現実の物質から作られておらず、現実の表面よりも平滑である。非晶質シリカ表面上の異なる部位における吸着の強さは 0 k T から 1 0 k T まで様々であることが見いだされている (その全体が参照によって本明細書に組み入れられる Carr et al., J. Phys. Chem. Lett. 2: 1804-1807 (2011)) 。P M M A 表面上の d N M P 吸着の強度のばらつきは将来の研究の主題である。

【 0 1 9 7 】

図 3 6 は、4 つの d N M P すべてについての d_w の関数としての自由エネルギープロファイルを示す。当該プロファイルは類似しており、明確に画定された最小値の存在を特徴とする。熱エネルギー $k T$ の多くても数倍の深さを持つ井戸型ポテンシャルの存在は、d N M P は疎水性の壁に吸着するが強くは吸着しないという事実を反映している。4 つの曲線の最小値は、ほぼ同じ距離 (壁から約 0 . 4 7 5 n m) に位置する。次のセクションで考察するように、d N M P が壁に吸着し、最小の自由エネルギー状態で位置する場合、そ

の主な分子単位のうち2つ（窒素含有塩基と糖基）は壁表面に関して類似の幾何学的配置にあるので、それらはすべて、壁からほぼ同じ距離に位置する質量中心を有する。4つの曲線はすべて、吸着領域とスリットの中心に近いバルク溶媒との間に位置する（ kT 以下の）小さなバリアの存在を示している。ここで、吸着領域は、井戸型ポテンシャルの最小値へと牽引する力をdNMPが経験する、壁に近い領域として画定される。図36に見られるように、4つのヌクレオチドの吸着領域の外側の範囲は、小さなエネルギーバリアの対応するピーク

$$d_w^M$$

の位置によって区切ることができる。自由エネルギープロファイル及び対応する大域的な最小値 F_{\min} （表6に示す）によって、dNMPと壁との相互作用の強度の直接的な尺度が得られるが、スカラーパラメータ $F_{\text{吸着}}$ （いわゆる吸着の正味自由エネルギー）は、実験との比較にさらに適する（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるRaut et al., "Molecular Dynamics Simulations of Peptide-Surface Interactions," *Langmuir* 21:1629-1639 (2005)）。自由エネルギープロファイルから、吸着の正味自由エネルギー $F_{\text{吸着}}$ は

$$\Delta F_{\text{吸着}} = -\ln\left(\frac{C_{\text{吸着}}}{C_{\text{バルク}}}\right) = \int_0^{d_w^M} PD(d_w) \Delta F(d_w) dd_w \approx \sum PD_i \Delta F_i(\Delta d_w)_i = \sum Pr_i \Delta F_i \quad (2)$$

のように、吸着した状態のdNMPを特徴づける状態すべての自由エネルギーの加重和を評価することによって得られる。この方程式では、 $F_{\text{吸着}}$ 及び F は kT の単位で表される。 $C_{\text{吸着}}$ は吸着領域における濃度であり、 $C_{\text{バルク}}$ は壁から離れたバルク溶液における濃度である。下付き文字 i はピン番号を示す。 $(d_w)_i$ は、幅 $(d_w)_i$ を有するピン i の位置である。 Pr_i は、dNMPが所与のピンにある確率を表す。 $PD_i = Pr_i / (d_w)_i$ は所与のピンにおける正規化された確率密度を表す。表6は、エネルギー特性及びdNMPのスリット疎水性壁への吸着の吸着領域の範囲を特徴づける関連する量の概要を提供する。

【0198】

（表6）疎水性スリット壁と相互作用する4つのdNMPについての自由エネルギープロファイルの最小値（ F_{\min} ）及び吸着の平均自由エネルギー $F_{\text{吸着}}$ 、並びに吸着領域を区切るのに使用される自由エネルギー最大値の位置

$$(d_w^M)$$

ヌクレオチド	$\Delta F_{\min}/kT$	$\Delta F_{\text{吸着}}/kT$	d_w^M (nm)
dAMP	-1.6 ± 0.4	-0.69 ± 0.07	0.71 ± 0.09
dCMP	-1.0 ± 0.7	-0.21 ± 0.05	0.71 ± 0.05
dGMP	-2.2 ± 0.7	-1.19 ± 0.03	0.70 ± 0.04
dTMP	-3.4 ± 0.4	-2.62 ± 0.04	0.88 ± 0.03

【0199】

実施例2 - 吸着及び脱着の動力学

吸着及び脱着の統計的特性及び動力学的特性を他の特性（例えば飛行時間）と関連づけることは大いに興味深い。シミュレーション結果の解析は、dNMPが吸着している間、相対的に疎水性の核酸塩基の環は表面上でほぼ平坦である傾向があり、親水性のリン酸基は表面から離れる方向にあり、糖も表面と何らかの接触を有したことを示している。（図34Aを参照）。表面への核酸塩基のこの疎水性の接着は、窒化ケイ素ナノポアを介したDNA鎖の輸送のシミュレーションにおいて以前観察されており（その全体が参照によ

10

20

30

40

50

て本明細書に組み入れられるAksimentiev et al., Biophys. J. 87: 2086-2097 (2004) 、グラフェンシートについては、グラフェンナノポアを介したDNA鎖の輸送のシミュレーションにおいて以前観察されている(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるWells et al., Nano Lett. 12: 4117-4123 (2012))。図37は、流れシミュレーション中のdNMPの質量中心の軌道のz成分の50ns間のセグメントを示す。平衡シミュレーションについての軌道も同様である。吸着事象の頻度及び長さの差異によって示されるように、4つのdNMPの軌道の間には明瞭な差異がある。吸着及び脱着の統計データを定量するために、吸着及び脱着の時間を決定する手法を導入し、上で詳細に説明している。

【0200】

PMF曲線における大域的最小値及び小さなバリアは、吸着及び脱着のメカニズムに関連する。dNMPの平面環が壁に吸着する傾向があるので、核酸塩基の平面と壁表面の平面とによって画定される2つの軸の間の角度は、吸着/脱着のメカニズムを見るのに有用である。核酸塩基における糖が付着している原子又はその近くから当該核酸塩基の他の末端を向く軸(軸1)の、最も近い壁表面の平面との間の平均角度を、 d_w の関数として、平衡の場合及び非平衡の場合双方で、吸着については図38にて、脱着については図39にて示す。核酸塩基の平面における軸1と直交する軸(軸2)の、最も近い壁表面との間の平均角度を、 d_w の関数として、平衡の場合及び非平衡の場合双方で、吸着については図41にて、脱着については図42にて示す。当該軸は、図33(軸1)及び図40(軸2)において、並びにプロットの挿入図において示されている。当該平均角度を算出する目的については、前の脱着時間と所与の吸着時間との間の中間点から、当該吸着時間と次の脱着時間との間の中間点までを、吸着期間とした。同様のアプローチを用いて脱着期間を決定した。表7は、これが吸着中であるか又は脱着中であるかを問わず、dNMPが吸着している間に算出した軸1及び軸2の平均角度を示す。

【0201】

(表7) 平衡及び非平衡の場合のdNMPが吸着している間の軸1及び軸2の壁表面との間の平均角度。不確定度は平均値の標準偏差の2倍であり、上述のように算出する。

ヌクレオチド	平衡		非平衡	
	軸1	軸2	軸1	軸2
dAMP	-8.60 ± 1.15	-0.63 ± 1.66	-9.00 ± 1.10	-0.67 ± 0.83
dCMP	-7.86 ± 1.33	-0.81 ± 1.29	-6.16 ± 3.25	-2.72 ± 3.04
dGMP	-4.63 ± 0.58	0.82 ± 0.82	-4.37 ± 2.09	0.72 ± 0.70
dTMP	-8.84 ± 0.93	-3.18 ± 0.89	-8.91 ± 0.66	-2.99 ± 0.66

【0202】

図38及び図39における曲線は、核酸塩基における糖に付着している末端が、最後に吸着し、最初に脱着することを示している。これは、糖基及びリン酸基は核酸塩基よりも親水性であり、核酸塩基の方がより好都合に疎水性のスリット壁と相互作用するからである。軸1の角度における大域的最小値の大きさは、核酸塩基の疎水性($G < C < A < T$)と同じ傾向に従う(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるShih et al., "Hydrophobicities of the Nucleic Acid Bases: Distribution Coefficients from Water to Cyclohexane," J. Mol. Biol. 280:421-430 (1998) and Munoz-Muriedas et al., "A Hydrophobic Similarity Analysis of Solvation Effects on Nucleic Acid Bases," J. Mol. Model. 13:357-365 (2007))。疎水性の点で糖により近い核酸塩基については、軸1の角度の最小値はさほど厳密ではない。PMF曲線における $d_w = 0.475$ nm前後の最小値は、核酸塩基の糖末端が他方の末端よりも表面からやや離れているもののまだ吸着している場合に生じた。表面からの糖末端の解離は、自由エネルギーを上昇させる。

$$d_w = d_w^M$$

での P M F 曲線におけるバリア（表 6 を参照）は、核酸塩基における糖末端とは反対側の末端（d N M P における最後に表面から離れる部分）の吸脱着に関連する。

【 0 2 0 3 】

軸 1 について図 3 8 及び図 3 9 で示されている所与の d N M P の吸着及び脱着の曲線は同一ではない。d A M P、d C M P、及び d G M P については、軸 1 の角度の大域的最小値の規模は、吸着の場合よりも脱着の場合の方が大きかった。d T M P については、軸 1 の角度の大域的最小値の規模は吸着の場合よりも脱着の場合の方が小さく、脱着曲線には有意な最大値があった。d T M P の最小値の規模がより大きいのは、疎水性メチル基が表面に付着するためである。

10

【 0 2 0 4 】

軸 2 について図 4 1 及び図 4 2 で示されている所与のヌクレオチドの吸着及び脱着の曲線は、角度の変化がノイズと同等であるので、互いに容易には区別できない。ヌクレオチドが吸着中に壁の近くにある場合、d N M P における最も疎水性の側が概して壁により近いが、d T M P は例外である。メチル基は疎水性であるが、非平面のメチル基は、ヌクレオチドにおける当該基がある側を壁から離す。壁の近くの軸 2 の配向度は、脱着の間、それほど強くない。ノイズのレベルを考えると、d A M P、d C M P、又は d G M P についての軸 2 の角度において有意な最小値又は最大値はない。d T M P については、疎水性のメチルと表面との相互作用が、吸着中及び脱着中の軸 2 の角度に有意な最大値をもたらす。脱着についての d T M P の最大角度は、平衡な場合、吸着についてよりも小さい。d T M P の脱着の場合、軸 2 の角度は、最大値の後に最小値も存在する。

20

【 0 2 0 5 】

軸 1 の壁表面との間の角度は、普通、平衡の場合と比べて非平衡の場合に、同じ質的及びしばしば量的に非常に似た挙動を有する。質的挙動の例外は、ピリミジン塩基（d A M P 及び d G M P）の脱着中に、非平衡の場合には最大値があるが、平衡の場合にはないことである。量的例外は、d T M P の脱着中の軸 2 の角度の最大値が、平衡の場合により小さいことである。

【 0 2 0 6 】

実施例 3 - 種々の平衡及び流れの特徴における、d N M P とチャネル壁の相互作用の役割

30

表 8 はシミュレーションから算出された種々の量を示す。これらは、とりわけ、(i) 4 つの d N M P のそれぞれについて、非平衡の場合の吸着時間の割合が平衡の場合とほぼ同じであることを示している。これは、d N M P の吸着 / 脱着の挙動がこれらのシミュレーションで使用される相対的に高速の流速によっては有意に変化しないことを示している。使用される流速は、それでも、秒速数百メートルの桁である分子の最大瞬時熱運動速度に比べると小さい。(i i) d C M P 及び d T M P の飛行時間がたった 5 0 n m の移動距離であっても上手く分離され、これは、例えば、これらのシミュレーションで使用されるもののような非荷電の疎水性表面は、これら 2 つの d N M P を区別するのに十分であることを意味する。これは、ヌクレオチドの疎水性の差異（G < C < A < T）に起因し得る（その全体が参照によって本明細書に組み入れられる Shih et al., "Hydrophobicities of the Nucleic Acid Bases: Distribution Coefficients from Water to Cyclohexane," J. Mol. Biol. 280:421-430 (1998) and Munoz-Muriedas et al., "A Hydrophobic Similarity Analysis of Solvation Effects on Nucleic Acid Bases," J. Mol. Model. 13:357-365 (2007)）。チミンは疎水性のメチル基を有するのに対して、シトシンは親水性のアミン基を有する。(i i i) 疎水性の増加傾向は飛行時間の増加傾向と合致したが、例外として d G M P と d C M P の順序が逆転した。これは、d N M P と壁の相互作用が原因である。吸着中の d G M P - 壁のエネルギー（ $V_{\text{ヌクレオチド-壁}}$ ）の大きさは、吸着中の d C M P - 壁のエネルギーより大きかった。核酸塩基における様々な基と壁表面との間に強い特異的な相互作用はないので、及び核酸塩基は表面上でほぼ平坦に存在するので、 $V_{\text{ヌクレオチド-壁}}$ は、核酸塩基における溶媒がアクセス可能な表面積（ $A_{\text{塩基}}$ ）と同じ傾向

40

50

に従う。グアニンはシトシンより大きな面積を有するので、dGMPはdCMPよりも壁との接触でより大きな面積を有し、より大きな $V_{\text{ヌクレオチド-壁}}$ を有する。(i v) dAMPは、dGMPより2倍多い吸着事象を有したが、吸着している時間の割合はやや小さく、飛行時間はdGMPより長かった。これは、dGMPの方が、再び脱着又は吸着する前に、より長い時間にわたって壁に吸着又は脱離しているという事実、及び、dGMPの方がやや大きな壁滑り速度を有したという事実から生じた。表8で示すデータを表6で示すデータと比較すると、平衡シミュレーションから算出された自由エネルギーは予想された傾向を示しており、吸着自由エネルギーの最小値又は平均値が小さいほど飛行時間が長いことが示されている。dGMP及びdAMPについての自由エネルギーは、これに対する例外である。

【0207】

(表8)最後の3行を除いて、量は、流れシミュレーションから算出した。塩基の面積は単一の構成から得て、最後に残った2行は平衡シミュレーションから得た。括弧内の不確定度は平均値の標準偏差の2倍であり、その算出は上に記載されている。

dNMP	dCMP	dGMP	dAMP	dTMP
$N_{\text{シミュレーション}}^1$	3	4	4	4
$T_{\text{シミュレーション}}(\text{ns})^2$	155.9	252.9	213.1	305.2
$D(\text{nm})^3$	50.0	48.0	32.0	32.0
$n_{\text{吸着}}^4$	0.21(0.06)	0.08(0.03)	0.18(0.03)	0.09(0.06)
$f_{\text{吸着,非平衡}}^5$	0.38(0.15)	0.68(0.23)	0.63(0.10)	0.93(0.03)
$t_{\text{飛行}}(\text{ns})^6$	52(7)	66(22)	77(19)	121(30)
$v_{\text{全}}(\text{m/s})^7$	0.99(0.23)	0.80(0.17)	0.63(0.18)	0.41(0.13)
$v_{\text{滑り}}(\text{m/s})^8$	0.68(0.61)	0.42(0.24)	0.33(0.28)	0.38(0.14)
$V_{\text{ヌクレオチド-壁}}/(\text{kT})^9$	-10.9(0.4)	-14.5(0.3)	-13.2(0.3)	-12.4(0.2)
$A_{\text{塩基}}(\text{nm}^2)^{10}$	2.4270	2.7963	2.6446	2.6197
$f_{\text{吸着,平衡}}^{11}$	0.38(0.09)	0.68(0.14)	0.60(0.05)	0.90(0.09)

¹ 壁構成の数(シミュレーション)

² 全構成の合計シミュレーション時間

³ 各構成についての流れの方向での移動距離

⁴ 1 nmの移動当たりの吸着事象の数

⁵ 吸着している時間の割合、非平衡

⁶ 50 nmの距離にわたる飛行時間

⁷ 流れの方向における平均速度

⁸ 吸着している間の流れの方向における平均速度

⁹ 吸着している間のdNMP-壁の位置エネルギー

¹⁰ 溶媒がアクセス可能な核酸塩基の表面積

¹¹ 吸着している時間の割合、平衡

【0208】

実施例4 - 非平衡MDシミュレーションに基づくdNMPの分離に必要なチャネル長

dNMPの飛行時間の信頼できる分離を達成するのに必要なチャネル長を、対応するMD軌道の全長からサンプリングした0.5 nmのセグメントにわたるdNMPの飛行時間分布($DTOF_{0.5}$)から算出した。これらの軌道の全長は、dTMPとdAMPについては128 nmであり、dCMPについては150 nmであり、dGMPについては192 nmである(表8の1行目と3行目を参照)。0.5 nmの選択は任意であり、0.5 ~ 50.0 nmの間の他の長さを使用してほぼ同じ結果が得られる。

【0209】

$DTOF_{0.5}$ を用い且つ従来の中心極限定理（その全体が参照によって本明細書に組み入れられる Wasserman L.W., All of Statistics: A Concise Course in Statistical Inference (2004)）を採用して、各 $dNMP$ について、より長い距離 $d = 0.5 Nnm$ （ N は正の整数）にわたる飛行時間分布（ $DTOF_{0.5N}$ ）を算出することができる。各 $dNMP$ について、 $DTOF_{0.5}$ を用いて、無作為変数 $T_N = t_1 + t_2 + \dots + t_N$ （式中、 $\{t_1, t_2, \dots, t_N\}$ は、 $DTOF_{0.5}$ から無作為に抽出された独立した飛行時間値 t_i （ $i = 1, N$ ）の組である）の分布を記載する関数として、対応する $DTOF_{0.5N}$ を構築することができる。新しい無作為変数 T_N はそれぞれ $d = 0.5 Nnm$ にわたる $dNMP$ の飛行時間を表す。中心極限定理によると、 μ 及び σ^2 がそれぞれ平均値及び分散である場合、 N の大きな値の極限で必ずしも正規分布又は偶対称分布である必要はない $DTOF_{0.5}$ を特徴づけると、 $DTOF_{0.5N}$ は正規分布に近似し、平均値 $N\mu$ と分散 $N\sigma^2$ （又は $(N)^{1/2}$ に等しい標準偏差）を特徴とするであろう。セグメントの数 N が増えるにつれて、 $DTOF_{0.5N}$ の幅は、 N と共に線形に増える平均値と比較して、 N の平方根として増えるにすぎない。従って、 N の増加は、この場合、飛行距離の増加に変換され、 $DTOF_{0.5N}$ のより良好な分離をもたらす。明らかに、分離のために必要な最小のチャンネル長 $d_{min} = 0.5 Nnm$ を推定する場合、分布の重複の許容可能なレベルを画定する必要がある。我々のアプローチでは、 N が、平均値の分布の 1 つの 0.27% 未満が平均値の平均値の他の分布の 1 つと重複するような場合、 $d_{min} = 0.5 Nnm$ は $dNMP$ によって移動される距離として推定された。この割合（％）は、正規分布の平均値からの 3 標準偏差に相当する。C 及び T についての同定ミスの割合は 0.27% であり、A 及び G についての当該割合は 0.46% である。 N の算出及び必要な長さの詳細は上に記載されている。

【0210】

表 9 は、6 つの異なる $dNMP$ の対のそれぞれについての飛行時間を分離するのに必要な距離の値を示す。 $dNMP$ すべてを完全に区別するのに必要な長さは、 $dAMP$ と $dGMP$ の飛行時間を分離するのに必要な距離、 $5.9 \mu m$ である。近似ではあるが、現実の系で再現するのは難しいシミュレーションの条件について、この数を異なる表面の比較についての基準として用い得る。

【0211】

（表 9） $dNMP$ 対の飛行時間を分離するのに必要な距離（ μm ）

	dCMP	dGMP	dAMP	dTMP
dCMP	∞	1.31	0.43	0.06
dGMP	1.31	∞	5.94	0.24
dAMP	0.43	5.94	∞	0.56
dTMP	0.06	0.24	0.56	∞

【0212】

図 43 は、 $0.5 nm$ の飛行時間分布に由来する $N = N_{dAMP}, dGMP$ 個の試料を合計することによって生成した各飛行時間と共に、 $5.9 \mu m$ にわたる飛行時間分布を示す。この距離で $dAMP$ と $dGMP$ の分布は辛うじて分離される。順序ミスを防ぐためにチャンネルに入る $dNMP$ 間の時間は少なくともこの長さでなければならないので、分布の全セットの幅は $dNMP$ 当たりの最小解析時間（ $t_{解析}$ ）である。

【0213】

実施例 5 - 現実的な流速の推定

MD シミュレーションでは $dNMP$ 当たりの最小解析時間 $10 \mu s$ 台でマイクロメートルの桁の短い距離にわたって $dNMP$ を分離することができるが、現実的な流速は 2 ~ 3

桁小さいであろう。それらの条件下では、拡散のために飛行時間分布の有意により大きな広がりがあるだろう。このサブセクションでは、必要なチャンネル長及びd N M P当たりの最小解析時間に対する拡散の影響を推定する。おそらく、現実的な流速の効果を推定する最良の方法（極めて高価なM Dシミュレーションを遅い流速で行うのは問題外として）は、C a r r らによって導入された戦略を使用することであり、それには、3つのデカルト次元すべてにおいてd N M Pと壁の間の平均力のポテンシャル（P M F）を算出し、次いで、得られた力をブラウン動力学（B D）シミュレーションにおける位置の関数として用いることが含まれる（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるCarr et al., Lab Chip 11: 3766-3773 (2011)）。平衡P M F計算により算出された力は非平衡条件下では厳密には正しくないが、C a r r らは、B DシミュレーションとM Dシミュレーション（圧力により駆動された流れを伴う）は良く一致すること示した（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるCarr et al., Lab Chip 11: 3766-3773 (2011)）。この3DのP M F + B D戦略の利点は、P M Fの計算は高価であるが、B DシミュレーションにはM Dシミュレーションと比べてはるかに大きな時間規模とチャンネル幅を可能にする単一のd N M Pのみが含まれることである。

10

【0214】

d N M Pの拡散性及び速度のプロファイルについて並びに方程式1によるP M Fに関連する壁からの距離の関数としてd N M Pを観察する確率についての幾つかの仮定を用いて、3DのP M Fを算出する必要なしでチャンネル長の桁及びd N M P当たりの解析時間を得ることができる。

20

以下の仮定を用いた：

（1）壁からの任意の距離でのd N M Pのすべての拡散性は同じであり、 $4.44 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{s}$ である環状A M Pの拡散性（その全体が参照によって本明細書に組み入れられるDworkin et al., J. Biol. Chem. 252:864-865 (1977)）に等しい。

（2）d N M Pの速度プロファイルは、最大速度（ v_{max} ）が 0.048 cm/s である放物線状であるが、当該最大速度は、 1000 V/cm の電場のもとでバルク水溶液における電気泳動によってd N M Pが移動する速度くらいであり、吸着中のd N M Pの平均位置以下の d_w の値についての速度はゼロである。滑り速度をゼロと仮定することはおそらく正しくないが、遅い速度で且つ粗い壁で滑り速度の平均速度に対する比はM Dシミュレーションよりもはるかに小さいであろう。異なる形状の速度プロファイルを仮定することは平均速度を幾分変えるであろうが、推定値の桁を変えることはない。

30

（3）流れの方向（x）における平均速度は

$$\bar{v}_x = \int_0^{d_w} PD(d_w) v_x(d_w) d(d_w) \\ \approx \sum_i PD_i v_{x,i}(\Delta d_w)_i = \sum_i P_i v_{x,i} \quad (3)$$

である。

これは方程式2に類似しており、 $v_{x,i}$ （ビンiにおける流れの方向での速度）及び d_w^{CL} （スリットの中心線における壁からの距離）を除いて同じ記号を使用する。方程式3の使用は、当該確率は流れの状況において平衡シミュレーションと同じであると仮定する。非常に速い速度での非平衡M Dシミュレーションにおいてさえ吸着時間の割合が類似することを考えると、これは正当な仮定である。

40

（4）所与のチャンネルの長さL、平均速度

\bar{v}_x

及び拡散性Dについては、飛行時間の確率密度分布は

$$\rho(t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left[\frac{-(L - \bar{v}_x t)^2}{4Dt}\right] \quad (4)$$

50

であり、それはまさに、時間依存性の平均位置が

$$\bar{v}_x t$$

である一次元拡散についての分布である。

(5) 分布の許される重複はMDシミュレーションの解析で用いたものと同じであった。

【0215】

これらの仮定を適用して、分布の所望の重複及び対応する $t_{\text{解析}}$ を乱さない L の最小値を見いだすことを目標とした。 $v_{\text{max}} = 0.048 \text{ cm/s}$ について決定された L 及び $t_{\text{解析}}$ の値は、それぞれ約 2.5 mm 及び 3.9 秒 であると推定された。図44は、距離 2.5 mm にわたる飛行時間分布を示す。 1 cm までの長さで 20 nm 以下の寸法のチャンネルが製作されているが(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるLiang et al., Nano Lett. 7: 3774-3780 (2007))、何百万又は何十億のdNMP(ヒトゲノムは約30億の塩基対を有する)を配列決定する必要があることを考慮すると、各dNMPを解析する時間は長すぎる。その速さで1日のうちにヒトゲノムを配列決定するには、冗長性を含まないで並行して約140万個のチャンネルが必要である。幸いにも、 L のみが速度に反比例する一方で、 $t_{\text{解析}}$ は速度の平方に反比例する。速度が10の倍数で増加したら、必要な長さは $250 \mu\text{m}$ であり、 $t_{\text{解析}}$ は 390 ms である。

【0216】

所与の v_{max} については、推定することができる最小の可能な $t_{\text{解析}}$ がある。上記の仮定1、4及び5に加えて、dNMP型の1つを

$$\bar{v}_{x,1} = v_{\text{max}}$$

を有すると仮定し、それは壁によって影響されないと仮定する。第2のdNMP型を

$$\bar{v}_{x,2} = \bar{v}_{x,1} - \Delta v_x$$

を有すると仮定し、第3及び第4の型を上記の考えられる所与の仮定5の範囲までは分布のすべてが互いに混み合うようにさらに遅い速度

$$(\bar{v}_{x,4} < \bar{v}_{x,3} < \bar{v}_{x,2})$$

を有すると仮定する。 v_x を変化させることによって $t_{\text{解析}}$ の最小値を見つけることができる。 $v_{\text{max}} = 0.048 \text{ cm/s}$ では、 $t_{\text{解析}}$ の最小値は約 5.0 s であり、 L は約 1.29 mm である。 $v_{\text{max}} = 0.48 \text{ cm/s}$ では、 $t_{\text{解析}}$ の最小値は約 0.5 ms であり、 L は約 $129 \mu\text{m}$ である。

【0217】

実施例1～5の考察

DNAにおいて一般に見いだされる4つのデオキシdNMP 5'-リン酸を、その飛行時間及び動力学を比較するために、不規則なLennard-Jones炭素原子で構成された 3 nm 幅のナノスリットにて水溶液中でシミュレーションを行った。溶液は、物体力(圧力差又は毛管力により誘導されるものと類似する流れを誘導することが知られている)によって作動させた。比較のために、及びdNMPをスリット壁に吸着させる自由エネルギーを算出するために、外力がない場合も考慮した。dNMPは流れがなくてもナノ秒範囲内で吸着し、脱着する。流れはdNMPの吸着及び脱着の挙動に大きな影響を有さず、dNMPが吸着する時間の割合は、平衡シミュレーションと非平衡シミュレーションでほぼ同じであった。疎水性の炭素スリット壁を用いて最も疎水性のdNMP(dTMP)及び最も親水性のdNMPの1つ(dCMP)の飛行時間が容易に分離されるということは、飛行時間がほぼ同じなのでdAMP及びdGMPにおける化学基の壁表面における他の基との相互作用も重要であろうが、壁物質の濡れ性を改変することがナノチャンネルを通るdNMPの飛行時間に基づいてdNMP間を識別することにおいて高い信頼性を達成する有望な方法であり得る。dAMP及びdGMPに関する重要な疑問は、平衡条件に比べて流れの条件下での脱着の間の質的に異なるその挙動がその飛行時間を分離する能力において役割を担うかどうか及びこの挙動が現実的な装置で使用されるはるかに遅い速度で持続するかどうかである。現実的な流速での拡散の効果の解析は、dNMPの速度がdNMP当たり理に適った最小解析時間を得るために比較的に速くすべきであることを示している。

10

20

30

40

50

【0218】

実施例6 - エキソヌクレアーゼ (Exo) の固相への固定化

- エキソヌクレアーゼ (Exo) を熱可塑性 (PMMA) 固相表面に固定化した。Exo に 10 × 反応緩衝液 (670 mM のグリシン - KOH, pH 9.4, 25 mM の $MgCl_2$, 0.1% (v/v) の Triton X-100) (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD) を提供した。使用前に精製工程を実施しなかった。

【0219】

- Exo が固定化される PMMA 基板への PMMA カバー板の熱融合接合 (その全体が参照によって本明細書に組み入れられる Henry et al., "Surface Modification of Plastics Used in the Fabrication of Microanalytical Devices," Analytical Chemistry 72: 5331-5337 (2000); McCarley et al., "Resist-Free Patterning of Surface Architectures in Polymer-Based Microanalytical Devices," J. Am. Chem. Soc. 127: 842-843 (2005)) に続いて、酵素の連結を容易にするために、スクシンイミジルエステル中間体を形成させた。これを、0.1 M の 2 - (4 - モルフォリノ) - エタンスルホン酸、pH 5.1 (MES, Fisher Biotech, Fair Lawn, NJ) 中の 200 mM の 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC)、及び 50 mM の N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を含有する溶液で固相反応器を室温にて 15 分間満たすことによって実施した。次いで、EDC / NHS 試薬を、0.03 µg / µL の Exo 酵素から成る溶液で流体力学的に置き換えた。4 にて一晚反応を進めさせた。酵素で官能化した装置を 1 × Exo 反応緩衝液ですすぎ、PMMA 表面から未結合の試薬すべてを取り除いた。図 45 は、Exo 固定化のプロセスを要約する模式図である。

【0220】

AC (タッピング) モードで 1.00 Hz の走査速度で Asylum Research MFP3D 原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて表面に固定化された Exo の性状分析を行った。AFM に使用した試料は、固定化された Exo 酵素を含有する PMMA シートから成った。PMMA シートは、1.7 cm × 1.7 cm 四角へと切断された厚さ 3 mm のものであった。切断後、上に記載されたように基板を清浄にし、乾燥させ、UV で活性化させた。当該シートを EDC / NHS カップリングに供し、上述のように酵素付加を完了させた。試料を反応緩衝液、ddH₂O ですすぎ、AFM 解析の前に圧縮空気ですぐやかに乾燥させた。

【0221】

基板表面上に生成されたカルボン酸基に対して外部のタンパク質上のアミン基を EDC / NHS を介してコンジュゲートさせることによって、PMMA への Exo の固定化を行った。PMMA への Exo の連結の成功は、AFM 解析によって確認した。酵素非特異的な吸着を測定するために、UV 光で PMMA 基板を活性化し、EDC / NHS カップリング試薬の非存在下で Exo 酵素溶液と共に 4 で一晩インキュベートした。図 46 A は、EDC / NHS カップリング試薬の非存在下で行った PMMA / Exo の反応の AFM 走査である。この走査は、Exo 酵素のサイズ及び形状に一致する表面組織の証拠を示しておらず、これらの進行中の条件下ではポリマー表面への酵素の物理吸着は生じなかったことを裏付けている。図 46 B は、EDC / NHS カップリング試薬の存在下で行った PMMA / Exo の反応の AFM 画像である。図 46 A の走査と比べると、図 46 B の走査は Exo のサイズと一致する表面形体を示す。EDC / NHS カップリング試薬なしで酵素が存在した基板の平均 RMS 粗さが 0.34 ± 0.01 nm であったのに比べて、共有結合したタンパク質を含有する基板の平均 RMS 粗さは 1.58 ± 0.18 nm であった。従って、PMMA 表面への酵素の共有結合は EDC / NHS カップリングの存在下でのみ観察され、物理吸着は生じなかった。表面の種々の領域 (n = 6) を横切る 15 µm の領域にわたって行った複数の走査から、表面形体の AFM の高さプロファイルは、これらの形体の平均高さが 15 nmであることを示唆したが、それは X 線結晶学データに基づいて報告された Exo の外径 (約 150) に相当する。図 46 C は、これらの形体のサイズ分布を決定するように作製した形体の高さのヒストグ

ラムである。このデータから検出された形体の71%は、 14.3 ± 2.3 nmの高さ範囲の範囲内に入った。高さのばらつきは、試料の崩壊を減らすために使用される非接触モードの画像化又は解析の間での移動に起因し得る。このデータは、形体の大半が、活性化された表面へのExoの単一点連結に一致することを示している。従って、固定化された酵素の大半は、dsDNAを取り込むためのそれらのアクセス孔によって、基板表面にほぼ垂直に方向付けられる。固定化反応に用いたUV照射量及び酵素濃度の下での酵素は、表面の立体評価に基づいて酵素とdsDNAをアクセス不能にする、酵素及びそのアクセス孔が表面に対して平行に存在する表面架橋をもたらさなかったことが、ヒストグラムに形体の高さの二重分布が存在しなかったことにより示されている。固定化からのAFMのデータは、完全なホモ三量体のコンジュゲーションが達成されたこと、及び、連結プロセスの結果として酵素がその単量体単位へと解離することは認められなかったことも確認している。

10

【0222】

実施例7 - 固相におけるExo-エキソヌクレアーゼを用いたDNAの消化

Exoで修飾した反応器内で二本鎖DNA(48,502 bp)(New England Biolabs, Ipswich, MA)を種々の時間インキュベートした(当該時間は、所望の滞留時間を提供するのに適当な速度でDNA溶液をポンプで流体力学的に固相反応器を通すことによって選択した)。ポンプによる流体力学的な輸送は、機械的なポンプ(PHD2000シリジポンプ, Harvard Apparatus, Holliston, MA)を用いて制御した。反応器アッセイは、特注の熱電温度計加熱ステージによって37°Cに温度制御した。下流の解析のために当該装置の流出口にて流出物を回収した。

20

【0223】

酵素反応器を通過した後に残っているdsDNAの量を測定するために、二本鎖DNA(dsDNA)挿入色素であるPicoGreen(登録商標)(Life Technologies, Grand Island, NY)を用いた。PicoGreen(登録商標)は、dsDNAへの結合に対して高い特異性を示し、当該結合の結果として蛍光が増強する(dsDNAに挿入されるとその蛍光量子効率がおよそ1,000倍上昇する)。当該色素は一本鎖DNA(ssDNA)又はモノヌクレオチドに結合せず、それに関連する蛍光の上昇もないので、当該色素は、ssDNA、dsDNA、及びモノヌクレオチドから成るはずであるExo固相反応からdsDNAの含量を特異的に決定するのに好適である。インタクトなdsDNAの量の定量のために、消化後に当該色素を加えた。以前の報告によると核染色の際にExoの酵素活性が低下すると言及されている(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるSubramanian et al., "The enzyme bias of processivity in lambda exonuclease," Nucleic Acids Research 31: 1585-96 (2003))ので、消化前とは対照的に消化後に添加を行った。色素標識した試料を480 nmで励起させ、Fluorolog-3分光蛍光計(Horiba JobinYvon, Edison, NJ)及びDataMaxソフトウェア2.20を用いて490 nm~700 nmで蛍光スペクトルを収集した。

30

【0224】

図47は、自由溶液でのExoで消化したDNA及び固相反応器でのExoで消化したDNA(同じ有効な反応時間)の蛍光スペクトルを示す。反応器におけるDNA消化の量を測定するために、核染色色素であるPicroGreen(登録商標)を反応器床流出物又は酵素反応の自由溶液に加え、溶液中に残るdsDNAの量を示す蛍光スペクトルを取得した。図47のグラフにて示すように、自由溶液での消化で見られる蛍光の量は、固相反応器での消化から検出されるものよりも相当に多く、固相消化に比べて自由溶液消化ではさらに多いdsDNAが存在したことを示している。

40

【0225】

実施例8 - 表面に固定化されたExo-エキソヌクレアーゼによる消化のリアルタイムモニタリング

固定化されたExoの消化速度を測定するために、リアルタイム蛍光モニタリングを採用した。この試験で利用した顕微鏡は、Zeiss100x/1.3 NA油浸対物

50

レンズ及びAndor iXon3 EMCCDカメラを備えたZeiss Axiover 200M倒立顕微鏡(75WのXeランプ, Zeiss, Germany)から成った。分析の間、組み立てられたPMMA装置を顕微鏡試料台に保持するために、特注のマウントを機械製作した。全ての画像の取得及び解析は、MetaMorph Advanced 7.7.6.0ソフトウェア(Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA)及びImageJ 1.46(National Institutes of Health, Bethesda, MD)を用いて行った。これらの実験での使用のために、補因子を含まない - Exo 10×反応緩衝液(pH 9.4での超純水中のグリシン-KOH、0.1%(v/v) Triton X-100)を調製し、dsDNAの酵素消化の開始を制御した。 - Exo酵素をPMMAに連結させた後、1:50の色素対塩基対の比でYOYO(登録商標)-1標識した - DNAを反応器内で約3時間インキュベートして、酵素-DNA複合体を生成した。25mMのMgCl₂補因子を含有する反応緩衝液(1×)を当該装置に導入し、37℃に加熱した後、酵素活性のリアルタイムモニタリングのために画像化した(図48を参照)。試薬及びdsDNAをポンプで反応器に通すことを可能にするために、PHD 2000シリンジポンプ(Harvard Apparatus, Holliston, MA)を用いた。エポキシを介した流入口/流出口のリザーバへの密封ピーク配管によってポンプを反応器に接続し、流入口の管はルアーロックコネクタを用いてシリンジに接続した。

【0226】

- DNAの塩基対の総数(48, 502bp)及び総消化時間に基づいて決定された、表面に固定化された - Exoの平均消化速度は、 1135 ± 124 ヌクレオチド/秒であった($n=4$)。この消化速度は、以前報告されたもの(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるMatsuura et al., "Real Time Observation of a Single DNA Digestion by Lambda Exonuclease under a Fluorescence Microscope," Nucleic Acids Research 29: e79 (2001))と一致したが、消化効率は上昇した(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるAyub et al., "Nanopore Based Identification of Individual Mononucleotides for Direct RNA Sequencing," Nano Letters 13: 6144-6150 (2013); Matsuura et al., "Real Time Observation of a Single DNA Digestion by Lambda Exonuclease under a Fluorescence Microscope," Nucleic Acids Research 29: e79 (2001))。この情報は、 - Exoのプロセッシブな挙動によって、以前の報告よりも10倍多い値である30,000超のヌクレオチドの消化が得られることを示唆している。蛍光強度の低下が消化の結果であって光退色又は光切断の結果ではないことを確定するために、補因子の非存在下で通り抜けた - DNA分子を、観察された消化の総時間より長い間、励起光にさらすことによって、対照実験を行った。反応が酵素の補因子で補強されない場合(すなわち、酵素活性が0.0に等しい)、図48に描いているように典型的な消化実験の持続時間全体にわたって相対的に一定の蛍光が認められた。

【0227】

実施例9 - モノヌクレオチドのマイクロチップ(PMMA)キャピラリー電気泳動

254nmでのUV検出と共にBeckman Coulter CE機器を用いてキャピラリー電気泳動(CE)を行った。Molex Polymicro Technologies(Phoenix, AZ)製の内径50µmのコーティングなし溶融シリカをCE(全長=33cm、有効長さ=20cm)に用いた。0.1MのNaOHで30分間、CEカラムを予備調整し、濾過した0.5×TBE緩衝液(18Mの超純水中の45mMのTris, 45mMのホウ酸塩, 1mMのEDTA, pH 8.3)で洗い流すことによってすすいだ。最終的に、0.5×TBE、pH 8.3における2%(w/v)ポリビニルピロリドン(PVP, Mr=40,000; Sigma Aldrich St. Louis, MO)を含有する動的コーティングによってキャピラリー表面を処理し、電気浸透流を抑えた。CEの泳動用緩衝液は、カチオン性界面活性剤、この場合、臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)も含有した。10kVで180sの動電注入によって試料の導入を行った。CEは、天然のデオキシヌクレオチドリン酸(dNMP、メチル化Cを含む4種)について1µMの濃度で行った。

【0228】

本明細書に記載されているCEの条件を用いて、図49に描いているように天然のdNMPのベースライン分離を得た。しかしながら、これは長さほぼ20cmのカラムを用いて達成され、8分間の展開時間を要した。飛行時間解析については、分離時間は1ms台であり、カラムの長さは約50μmであろう。この短い展開時間とカラムにもかかわらず、分離はdNMPの電気泳動移動度のピーク幅と差異のみに依存するので、分離の質は低下しないであろう。電気泳動移動度は、電場強度、カラムの長さ、及びCEの展開時間に無関係である。

【0229】

実施例10 - PMMAナノチャネルにおける熱可塑性電気浸透流に対する表面処理の効果

10

ナノインプリントリソグラフィ(NIL)を用いてPMMAナノ流体装置を製作した。手短には、ナノチャネルに基づく流体装置は3つの主な部分、すなわち(a)リザーバと幅75μm及び深さ20μmの輸送チャネルを含むマイクロ流体ネットワーク、(b)ナノチャネルの流入口における勾配のついたインターフェース(漏斗様の流入口は30μmから75nmに減る幅と10μmから75nmに減る深さを持つ16の台形プリズムから成る)及び(c)幅75nm及び深さ75nmであるナノチャネルのアレイから成った。

【0230】

製作ステップは、4つの主要なステップ、すなわち(1)凹型のナノチャネル及び階層的なマイクロ規模の流体ネットワークを有するシリコンマスターを形成する工程、(2)UV-NILを介してシクロオレフィンポリマー(COC)基板にコーティングしたUV硬化性樹脂層にシリコンマスターのパターンを移し、突出構造を持つポリマースタンプを作製する工程、(3)PMMA基板にUV樹脂スタンプをナノインプリントしてナノ流体構造を生成する工程、及び(4)基板にPMMAカバーガラスを接合して流体システムを形成する工程に分けることができる。

20

【0231】

シリコンマスターを作るために、シリコン湿式エッチングと集束イオンビーム(FIB)加工を組み合わせることで階層的な構造を作った。リザーバ及び輸送チャネルを従来の光リソグラフィによって画定し、シリコンの表面にて30% KOH溶液によって異方性にエッチングした。次いで、FIB(FEI Quanta 3D FEG)を用いて漏斗型の流入口及びナノチャネルアレイを段階的に加工した。最終的に、真空チャンバーにて気相から1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシルトリクロロシランの単層をコーティングした。

30

【0232】

基剤としての69重量%のトリプロピレングリコールジアクリレート(TPGDA)と、架橋剤としての29重量%のトリメチロールプロパントリアクリレートと、光開始剤としての2重量%のIrgacure 651を含有するUV硬化性のポリマーブレンドをポリマースタンプの材料として選択した。ピペットで分配することによってシリコン金型をUV樹脂でコーティングした。次いで、UV樹脂でコーティングしたスタンプの上にCOC基板(COC-TOPAS 6017, TOPAS Advanced Polymers, Florence KY)を置き、樹脂が確実に金型空洞を完全に満たすために穏やかに圧迫した。続いて、硬化のために20秒間、UVに暴露した。硬化に使用したUVランプは、1.8W/cm²の強度、400nmのカットオフ角度を持つ広域帯波長、及び約365nmの最大波長強度を有した。硬化の後、UV硬化性樹脂をシリコン金型から穏やかに離型させ、UV硬化性樹脂上にネガコピーを得た。

40

【0233】

次いで、パターン形成されたUV硬化性樹脂をスタンプとして用いて、リザーバ用に予め加工した孔を有する厚さ3mmのPMMAシート(Lucite CP)に熱型押しした。NIL(Obducatナノインプリントシステム)によって130及び20バールで5分間インプリントを行った(圧縮空気を用いてスタンプ及び基板に圧力を加えたが、インプリント領域全体にわたって圧力の均一性を確保した)。スタンプと基板の双方を所

50

望の成形温度にて30秒間、予備加熱した後に圧力を加え、インプリントプロセスの間、システムが70℃に冷却されるまで保持した。スタンプ及び基板が室温まで冷却された後、PMMAのコピーはUV樹脂スタンプから容易に離型され得る。

【0234】

厚さ1.25mmのPMMAシート(Goodfellow Corporation)をカバーガラスとして使用した。パターン形成されたPMMAシート及びカバーガラスの双方を15Wのもとで15秒間酸素プラズマによって処理し、表面を活性化させた。プラズマ処理の直後に熱接合を行った。20バールの圧力、80℃の温度、及び10分間の時間を用いて、PMMA上の構造に影響を及ぼすことなく所望の接合強度を達成した。接合プロセスの間、NILの機械を用いて均質な圧力を提供した。

10

【0235】

ナノチャネルを1μMのKCl溶液で満たした後、陽極のリザーバを2μMのKClで満たし、陰極のリザーバを1μMのKClで満たすという不連続緩衝液系を用いて、電気浸透流(EOF)を測定した。200V/cmの電場を印加した電気泳動の間、Axopatch電流増幅器を用いて電流をモニタリングした。EOFは、特に言及されない限り、チャネル壁の表面の負の荷電のために、陰極リザーバに向かって流れた。アミンで修飾されたPMMAナノチャネル壁の場合、EOFは陽極の方向に流れた。

【0236】

未変性のPMMAナノチャネル(図50A)の場合は、EOFは、全pH値において陰極の方向に動いた。見て分かるように、EOFは、マイクロチャネルの以前の結果に一致して、溶液のpHにはほとんど無関係である。しかしながら、PMMAナノチャネルをO₂プラズマで処理した場合、EOFはpH3を超えると大幅に速くなった。O₂プラズマが表面限定のカルボン酸基を生成するPMMA表面の酸化を誘導するので、この有意なEOFの上昇は、表面限定のカルボン酸基の脱プロトン化に起因し得る。これらの基が脱プロトン化される場合、表面電荷密度は上昇し、EOFにおける有意な変化を生じる。従って、ポリマーナノチャネル上の表面電荷密度はO₂プラズマ処理を用いて改変することができる。PMMAナノチャネルがプラズマ酸化され、その後、EDC/NHSカップリング試薬(図50B)の存在下でエチレンジアミン(EDA)によって処理された場合、EDAのアミン基の1つがPMMAナノチャネル表面で生成されたペンダントカルボン酸基に共有結合で係留される。この修飾がEOFの逆転(陰極から陽極へ移動)をもたらし、このことは陽極から陰極に移動するEOFについての負に比べて表面電荷が正であることを示している。このデータで見られる傾向はPMMAマイクロチャネルで以前認められたものに類似する。

20

30

【0237】

実施例11 - ポリマーナノカラムを用いたSMEの評価：蛍光標識dNMPの追跡

上述のようにナノチャネルを調製した。しかしながら、この場合は、チャネルは、熱NILを用いて環状オレフィンコポリマー(COC)で製作した。ナノチャネルは長さ100μmで100nm×100nmであった。当該チャネルを、同じくCOCで作製されたカバー板と同様にO₂プラズマで処理し、当該装置を、未変性の熱可塑性物質のガラス転移温度よりやや低い温度78℃で熱組み立てした。これらの実験については暗視野顕微鏡を用いて単一分子を追跡した。当該分子は、クエン酸イオンでコーティングされた直径10nmの単一の銀(Ag)ナノ粒子(NP)から成り、当該コーティングによって当該Ag-NP表面に負の電荷が付与されていた。当該Ag-NPを陰極リザーバに入れ、種々の電場強度で陽極リザーバへと電気泳動した。当該電気泳動は、ナノチャネルにおける電氣的二重層の厚さを減らすために10mMのKClも加えたTBE緩衝液(1×、pH=8.0)にて行った。

40

【0238】

図51Bは、ポリマーナノチャネルに置かれた際の(定常状態の)当該粒子について高い強度を示す単一のAg-NPの画像(3D-プロット)である。ポリマーナノチャネルを通じた単一分子の電気泳動を種々の電場強度で行い、当該分子の移動を光学的に追跡し

50

た。移動時間をヒストグラム化して、測定された飛行時間における分散を電場強度の関数として決定した。最小の分散は、図5 1 Aに示す最高の電場強度(4 0 0 0 V / c m)について確認された。図5 1 Cから見て分かるように、A g - N P (1 0 n m) の電気泳動移動度は、印加された電場と無関係であったが、飛行時間分布における分散と逆相関する段数は、電場強度が高くなるにつれて増加した。このことは、当該分散は主として長手方向の拡散に起因し、移動事象に関連する他の人為的結果ではないという事実と一致する。拡散移動は $(2 D t)^{1/2}$ (式中、DはA g - N Pの拡散係数であり、tは時間である) に比例するからである。電場強度が高いほど、移動時間が短くなり、したがって拡散移動時間も短くなる。

【0 2 3 9】

10

実施例 1 2 - T 4 D N A 及び D N A についての縦電流の遮断事象

P M M A ナノ流体装置の製作を、上で記載したように行った。倒立顕微鏡 (Zeiss Axiovert 200) を用いて、当該装置を介したD N Aの移動事象の光学的測定を行った。蛍光顕微鏡をE M C D D カメラ (iXon3 888 Andor) に装着した。電氣的測定のための流体チップを遮蔽するのに2つのファラデーケージを用い、一方は試料台を遮蔽するのに用い、他方は顕微鏡全体を覆った。M e t a M o r p h (Molecular Devices) によって、ビデオ画像の記録及び処理を行った。ビデオ記録中、E M C C Dのオーバーラップモードを用いた(シャッター時間: 5 m s ~ 2 0 m s)。

【0 2 4 0】

20

A x o p a t c h 2 0 0 B 増幅器及びD i g i d a t a 1 4 4 0 A (Molecule Devices) の全セルモードを用いて電流測定を行った。p C L A M P 1 0 ソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った。内部ベッセル・ローパスフィルターを1 0 k H z に設定して速度1 0 0 k H z でシグナルをサンプリングした。A g / A g C l ワイヤを電極として用いた。測定すべてについて、パッチクランプによって印加された1 VのもとでD N Aを駆動した。

【0 2 4 1】

1 x T B E 緩衝液 (8 9 m M のトリス - ホウ酸及び2 m M のE D T A , p H 8 . 3) にてT 4 D N A 溶液 (0 . 5 μ g / m l) を調製した。2 0 : 1 の比 (b p / 色素) にてY O Y O (登録商標) - 1 によってD N A を染色した。 - メルカプトエタノール (3 %) を光退色防止剤として加え、0 . 2 m g / m l のグルコースオキシダーゼと0 . 0 4 m g / m l のカタラーゼと4 m g / m l の - D - グルコースから成る酵素的酸素スカベンジャー系も緩衝液に加えて酸素を取り除いた。真空ポンプを用いて先ずチャンネルを濡らし、D N A 溶液を当該装置に導入した。

30

【0 2 4 2】

図5 2 A ~ H は、P M M A ナノチャンネルを通して電氣的に移動する、T 4 D N A についてのD N A 移動事象の光学的及び電氣的な描写である。これらの移動事象は電流応答を生成し、光学的に見られるようにD N A がナノチャンネルを通して移動すると正確にスパイクが生じた。移動事象の開始時は、低い電場強度のためにD N A 分子はマイクロチャンネル内をゆっくり移動した。ナノチャンネルの入力端に置かれたナノピラーアレイ内をD N A 分子が通り抜けるとき、当該分子は、ナノピラーとの衝突及びフッキングによって引き延ばされた。いったんナノチャンネルに達すると、強い電場のためにD N A はナノチャンネルを迅速に通過し、それは高い抵抗性のためにナノチャンネル内で濃縮された。ナノチャンネルから離れた後、D N A 分子は迅速に減速して再コイル化した。これらの移動プロセスのうち、D N A がナノチャンネルを通過するプロセスだけがイオン性の電流降下を生じた。D N A がナノチャンネルに入った時点のイオン性の電流降下から、電流がベースラインからスパイクの底まで降下するのに1 ~ 3 m s かかった。イオン性の電流は、約1 5 p A の電流降下が、D N A 分子の長さ に比例する時間持続した。T 4 D N A 鎖全体をナノチャンネルを通して移動させるには、蛍光画像から示されるように2 ~ 3 フレーム (4 0 ~ 6 0 m s) かかった。当該時間はI - t 曲線からの読み取りに合致し、インタクトなT 4 D N A 分子についてのスパイクの幅は5 2 m s であった (図5 2 G 及び5 2 H)。

40

50

【0243】

ここで、 t_T は電流降下スパイクの持続時間（DNAの移動時間）を表し、 I_D は電流降下の振幅を表す。図52A～52Cは短いDNA分子の移動によって生成されたイオン性の電流スパイクを示す。それらの小さなDNA断片は普通、蛍光励起光のもとでの光切断又は試料調製中の剪断力によるT4 DNAの損傷から生成される。蛍光画像から測定されたこれらのDNA断片の長さは普通5 μm 未満であった。より速い電気泳動移動度及び短い長さによって、それらDNAが短時間内にナノチャネルを通して移動するのが可能になった： $t_T = 5 \sim 10 \text{ ms}$ であり、 I_D は5～10 pAの幅があった。

【0244】

図52D～52Fは、ナノチャネルを通して移動する、より長いDNAを示す。それらのDNAは20～60 msで通過し、 I_D は15 pA前後であった。それらはニックのあるDNA分子であると想定されたが、完全長のT4 DNA分子には対応しなかった。ナノチャネルを通して移動する完全長のT4 DNA分子を図52G～52Iに示す。ここで、電流過渡の持続時間は完全長のT4 DNA分子にさらに一致した。

【0245】

このデータは、DNA分子が専ら電氣的測定によって検出することができ、DNA分子の長さは、生成される電流過渡の長さと相関することを示している。これらの測定では、電流過渡は、ナノ電極を使用しないが代わりに当該装置の陽極リザーバ及び陰極リザーバに置かれたマイクロ電極を使用する縦方向の測定から推定された。これらの縦方向の電流測定は、電氣的に駆動された移動事象の間行うことができる。これらの測定から、過渡の持続時間はDNAの長さと相関させることができる。これらの場合は光学的測定を行ったが、それらは電氣的変換には必要ではない。光学的測定は、電氣的測定の性質を実証するためにのみ行われた。

【0246】

実施例13 - 電気化学を用いた層状ナノワイヤにおけるナノギャップの生成

セグメント化されたナノワイヤにナノギャップを生成するために2ステップの手法を開発した。これらステップには、(1)多重セグメント化されたナノワイヤを電着することと、(2)埋め込まれた犠牲層からギャップを電気化学的にエッチングすることが含まれる。電着技法の実証として、ナノ多孔性のポリカーボネート鋳型（Whatman、約 10^8 ナノポア/ cm^2 、100 nmの公称孔直径を持つ）を2つの電極セルの陰極として用いた。導電性電極を作製するために、ポリカーボネート鋳型の一方の面を金でスパッタリングした。陽極は白金メッシュであった。以下の順序、すなわちFeNiCo/Au/Cu/Au/FeNiCoで5つのナノワイヤセグメントを製作した。FeNiCoナノワイヤセグメントがナノワイヤの最上部と最下部であり、他のワイヤを磁氣的に操作する手段として役立った。FeNiCoは、 -25 mA/cm^2 （20%の多孔性）、0.5のデューティーサイクル及び2秒間のオン/オフ時間のパルス堆積を用いて、0.72 Mのスルファミン酸ニッケル、0.155 Mの硫酸第一鉄、0.005 Mの硫酸コバルト、0.5 Mホウ酸、0.001 Mのラウリル硫酸ナトリウム、0.011 Mのアスコルビン酸を含有する電解質からpH 2及び40の温度で堆積させた、Feが豊富な合金（約64重量%のFe、31重量%のNi、5重量%のCo）であった。金のセグメントは市販の金溶液（TG-25E RTU, Technic Inc.）を用いて -1 mA/cm^2 の電流密度で60の温度にて製作した。銅の中間層は -3 mA/cm^2 にて定電流で堆積させた。銅電解質は0.15 M硫酸銅、0.01 Mの硫酸ナトリウム、0.45 Mのクエン酸ナトリウム及び0.40 Mのホウ酸を含有した。堆積の後、膜をジクロロメタンに溶解し、次いでエタノールで3回洗浄した。銅は犠牲層として役立ち、堆積の時間はギャップのサイズに比例した。第2のステップでは、導電性炭素表面に置いたナノワイヤをエッチングすることによって銅層の溶解を電気化学的に制御した。印加された作動電位はSCEに対して+0.1 Vであり、溶液は銅のメッキに使用したのと同じクエン酸 - ホウ酸電解質であった。

【0247】

当該手法は、異なる寸法で制御され得るギャップを有するナノワイヤを生成することに

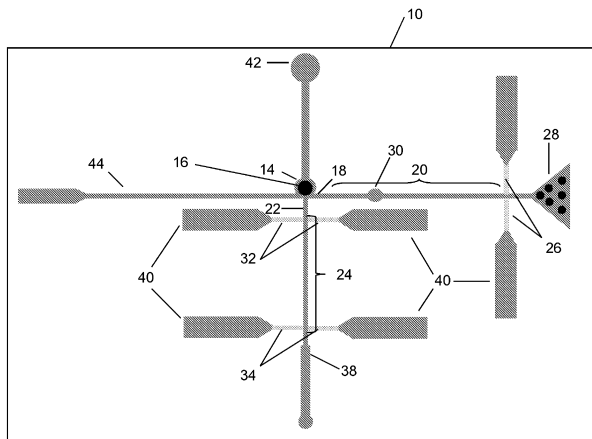
成功した（図 5 3 A ~ 5 3 B を参照）。決定的な特徴は、印加される電位の選択に基づいて、エッチング中に F e N i C o 領域及び A u 領域が攻撃されないことである。電位及び電解質はコア - シェル型の構成でその表面上にポジフィルムを生成するように選択されるので、A u は銅より貴金属であり、F e N i C o は攻撃されないので、A u は溶解されない。当該技法を開発するのに厚い大きな直径のナノワイヤを用いたが、より小さな直径のワイヤに拡張されるであろう。より別々のギャップ及びより細いギャップサイズを生成するために、パルスメッキ及び P R メッキのスキームでの銅層の堆積を調べている。

【 0 2 4 8 】

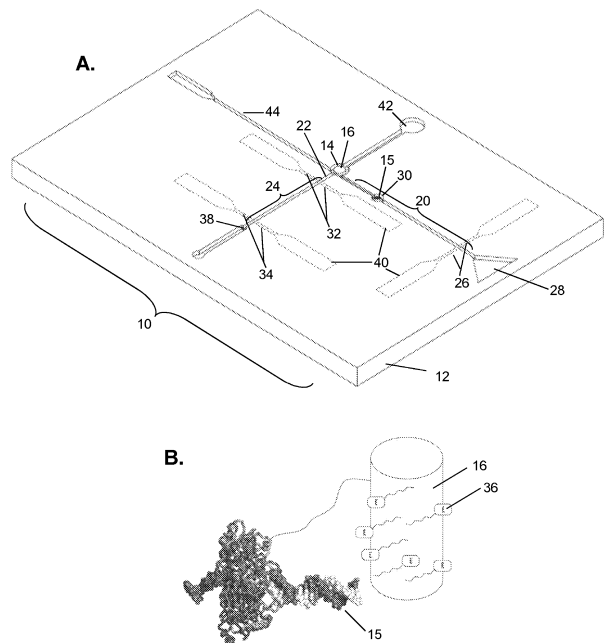
本明細書では好ましい実施形態を詳細に叙述し記載してきたが、種々の改変、付加、置換等を本発明の精神から逸脱することなく行うことができる、これらは後に続く特許請求の範囲にて規定される本発明の範囲内にあると見なされることが当業者に明らかであろう。

10

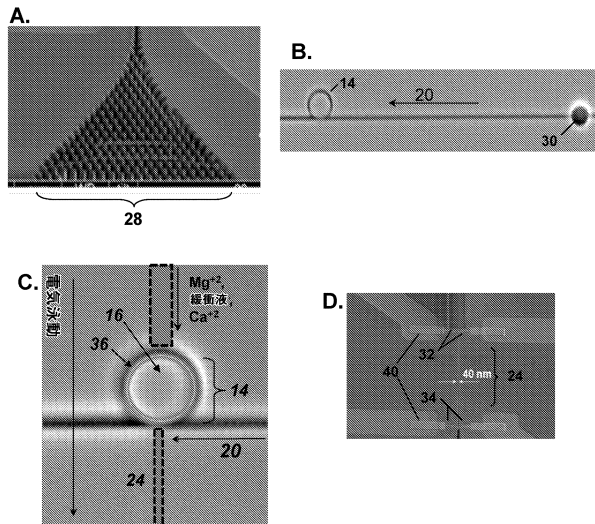
【 図 1 】



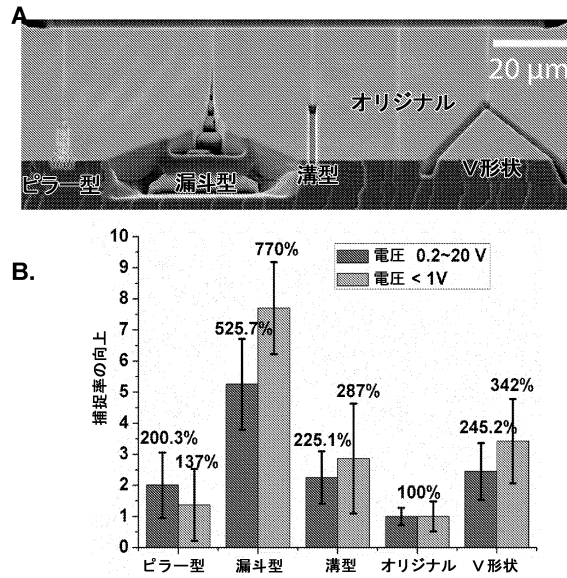
【 図 2 】



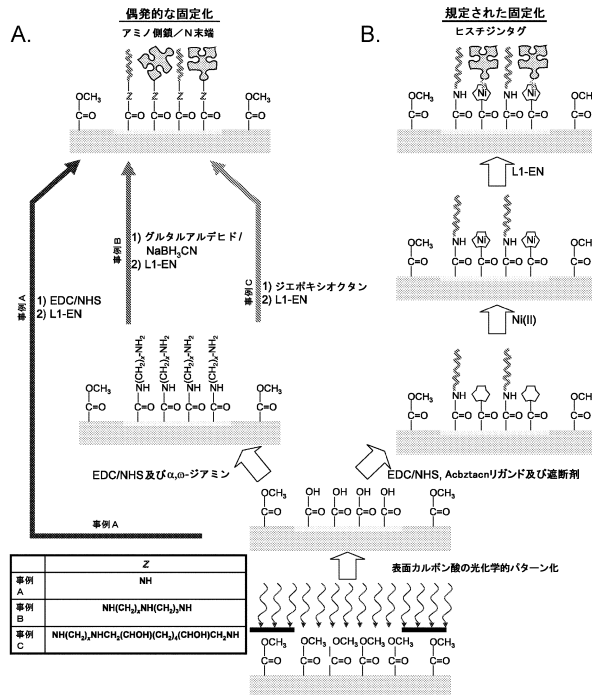
【図 3】



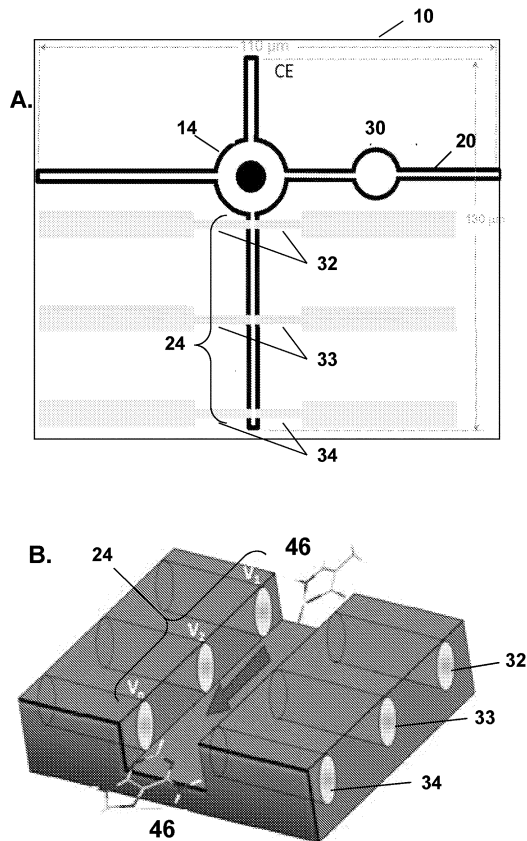
【図 4】



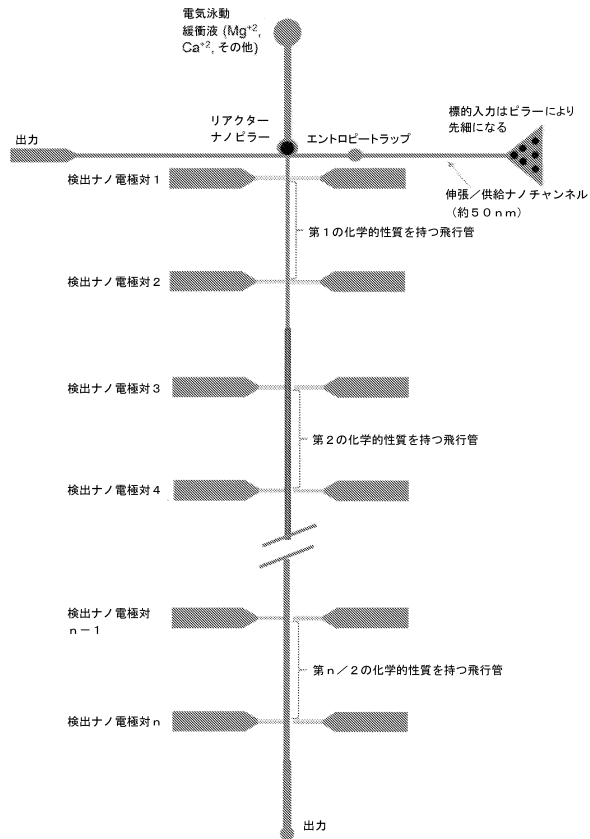
【図 5】



【図 6】

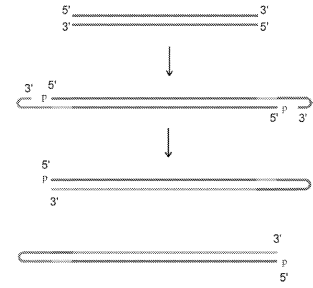


【図 7】



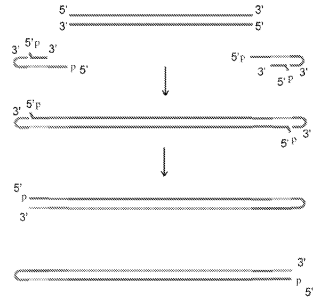
【図 8 A】

1. (ゲノム二本鎖 DNA 断片を 1 つだけ示す)
2. 各 DNA 断片へのユニバーサルアダプターのライゲーション。アダプターは任意の鎖 ID と短いヘアピン領域を含有する。
3. 鎖置換活性を有するポリメラーゼを用いて 3' ヘアピン化末端を伸長する。得られた二本鎖 DNA は、X-TOF 配列決定に最適である。配列決定される鎖は両端に鎖 ID を含有し、その起源の一意の検証が可能である。さらに、元々のゲノム鎖が配列決定されるので、塩基の修飾はすべて保存される。



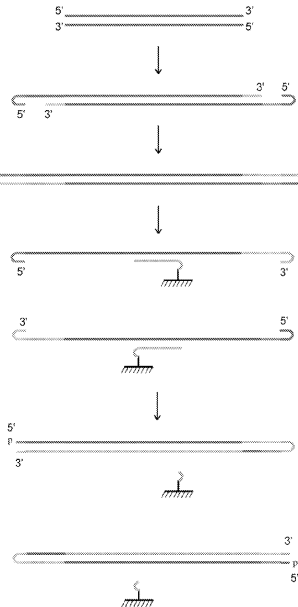
【図 8 B】

1. (ゲノム二本鎖 DNA 断片を 1 つだけ示す) ユニバーサルアダプターを伸長し、尾部を付ける。
2. 各 DNA 断片へのユニバーサルアダプターのライゲーション。アダプターは、任意の鎖 ID と短いヘアピン領域を含有する。
3. 鎖置換活性を有するポリメラーゼを用いて 3' ヘアピン化末端を伸長する。得られた二本鎖 DNA は、X-TOF 配列決定に最適である。配列決定される鎖は両端に鎖 ID を含有し、その起源の一意の検証が可能である。さらに、元々のゲノム鎖が配列決定されるので、塩基の修飾はすべて保存される。



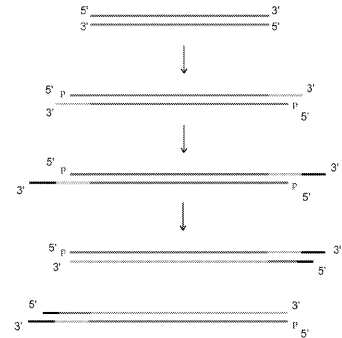
【図 9】

1. (濃縮対象の標的二本鎖 DNA だけを示す。)
2. 各 DNA 断片へのユニバーサルアダプターのライゲーション。アダプターは、任意の鎖 ID、鎖 ID、及び短いヘアピン領域を含有する。
3. 5' → 3' 活性を欠くポリメラーゼを用いてヘアピンを介して 3' リンカー末端を伸長する。
4. 二本鎖 DNA を変性させ一本鎖 DNA にする。固体支持体に固定化された短鎖鎖とのハイブリッド形成によって上下両方の標的鎖が捕捉される。相補鎖は、それら及び標的鎖が互いに互いに再ハイブリッド形成しないように空間的に分離される。
5. 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を持つポリメラーゼを用いて 3' ヘアピン化末端を伸長する。これによって固体支持体から二本鎖標的 DNA が遊離し、また、X-TOF 配列決定に最適な 5' リンカ末端が遊離する。配列決定される鎖は両端に鎖 ID と鎖 ID を含有し、その起源の一意の検証が可能である。さらに、元々のゲノム鎖が配列決定されるので、塩基の修飾はすべて保存される。



【図 10】

1. (ゲノム二本鎖 DNA 断片を 1 つだけ示す)
2. 各 DNA 断片へのユニバーサルアダプターのライゲーション。アダプターは、任意の鎖 ID を含有する。
3. ターミナルトランスフェラーゼを用いて 3' リンカー末端に尾部を付ける。
4. 尾部を付けたアダプター鎖の 3' 末端とプライマーをハイブリッド形成させ、ポリメラーゼを用いてプライマーを伸長させ、これは X-TOF 配列決定に最適な二本鎖 DNA を生成する。配列決定される鎖は両端に鎖 ID を含有し、その起源の一意の検証が可能である。さらに、元々のゲノム鎖が配列決定されるので、塩基の修飾はすべて保存される。



【図 1 1】

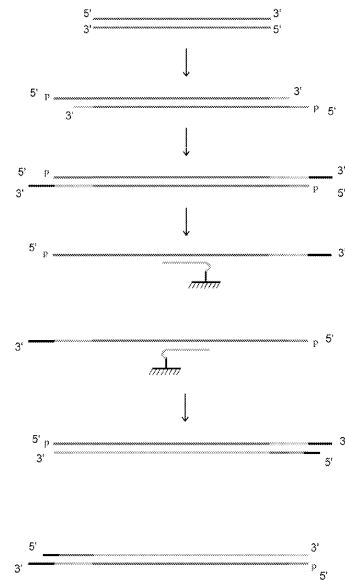
1. (選定対象の標的二本鎖DNAだけを示す。)

2. 各DNA断片へのユニバーサルアダプターのライゲーション。アダプターは任意の患者ID及び鎖IDを含有する。

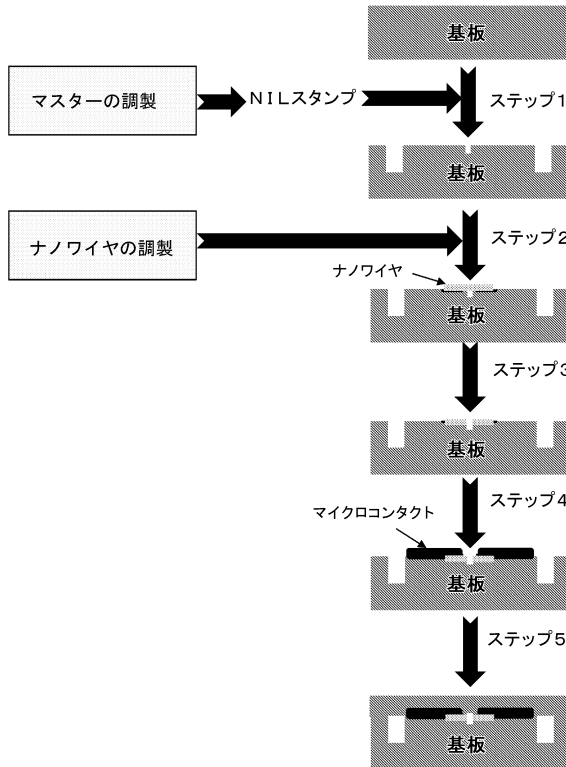
3. 3'リンカー末端をポリメラーゼで伸長し、ターミナルトランスフェラーゼを用いて尾部を付ける。

4. 二本鎖DNAを変性させ一本鎖DNAにする。固体支持体に固定化された相補鎖とのハイブリッド形成によって上下両方の標的鎖が捕捉される。相補鎖は、それら及び標的がいずれも互いに再ハイブリッド形成しないように空間的に分離される。

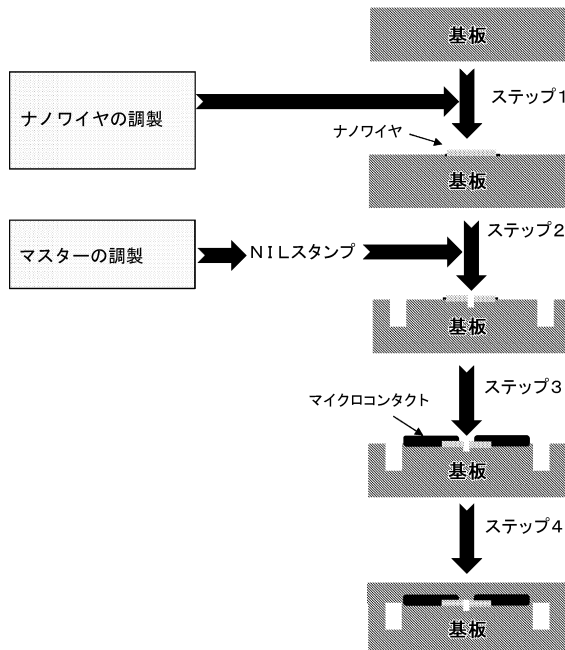
5. 標的一本鎖の3'末端とプライマーをハイブリッド形成させ、ポリメラーゼを用いてプライマーを伸長する。これはX-T O F配列決定に最適な二本鎖標的DNAを生成する。配列決定される鎖は両端に患者IDと鎖IDを含有し、その配列の一意の検証が可能である。さらに、元々のゲノム鎖が配列決定されるので、塩基の修飾はすべて保存される。



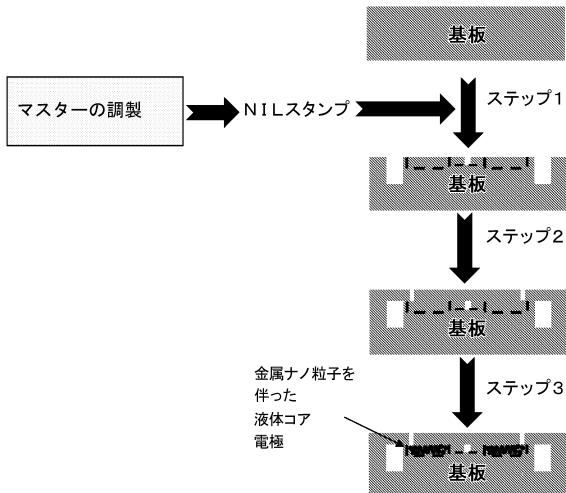
【図 1 2】



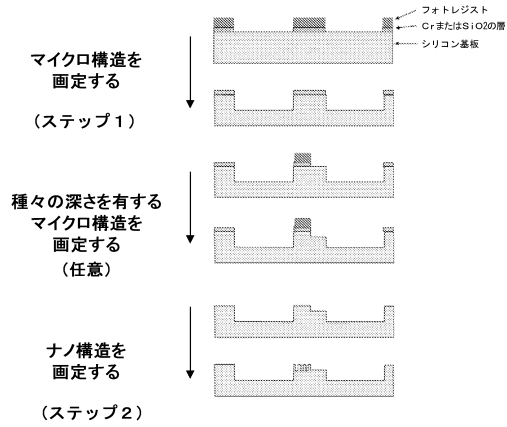
【図 1 3】



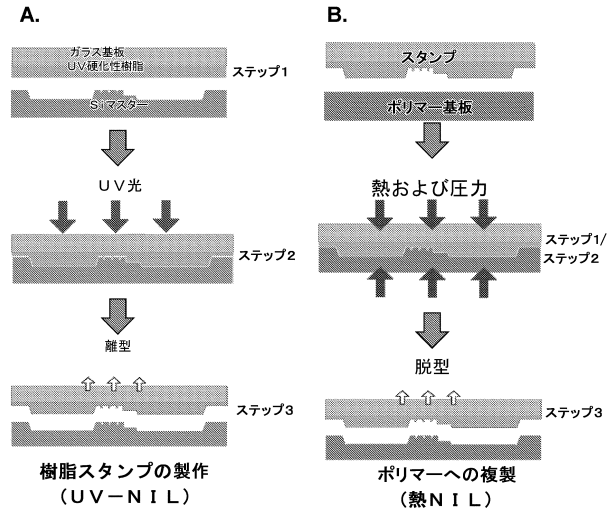
【図 1 4】



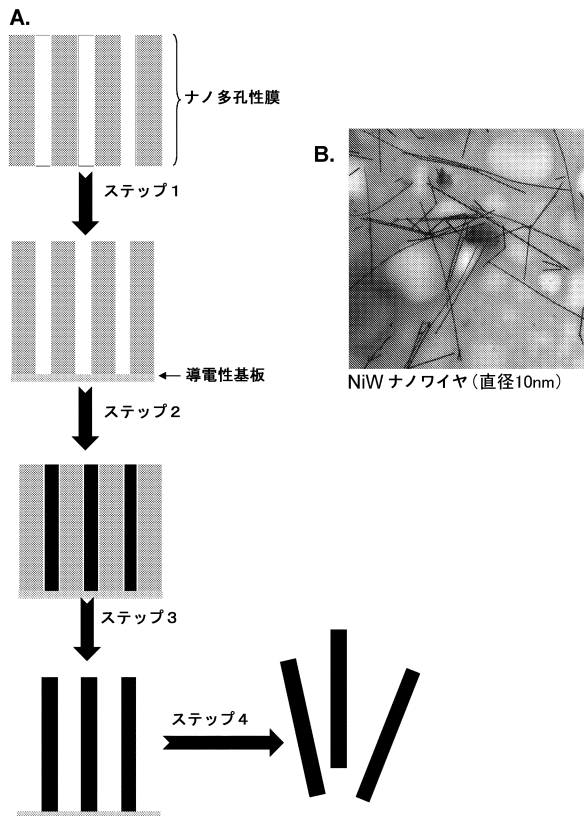
【図 15】



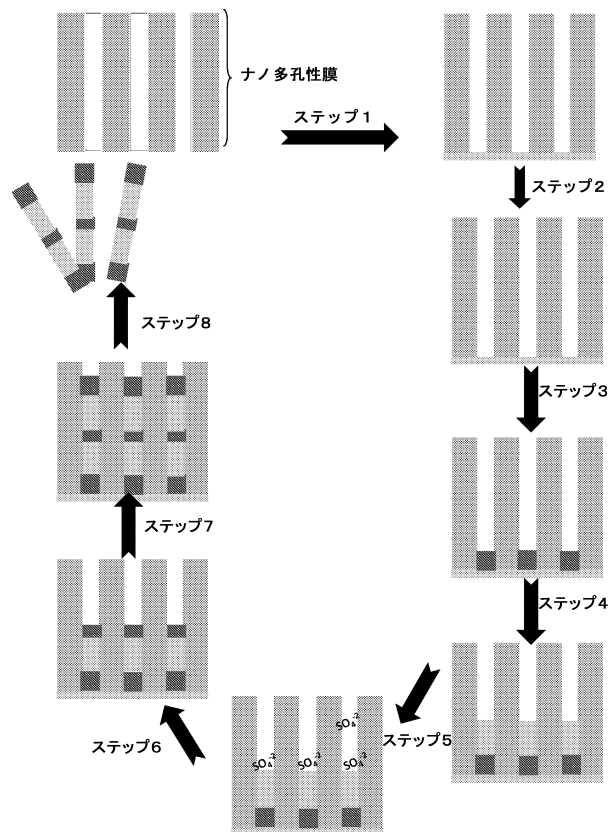
【図 16】



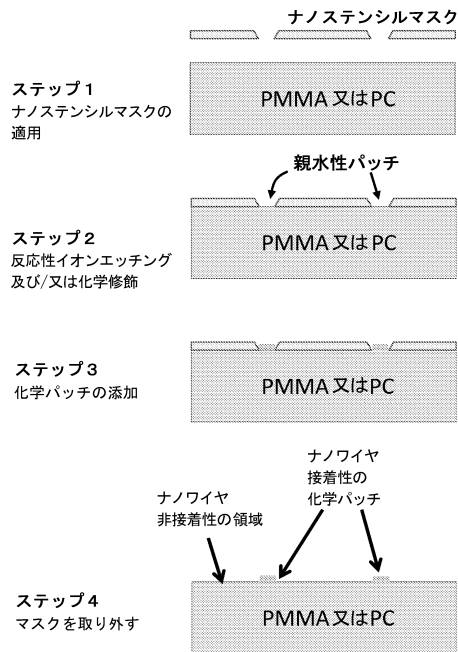
【図 17】



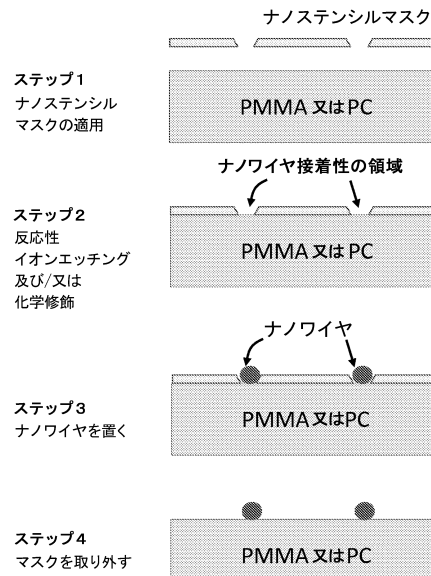
【図 18】



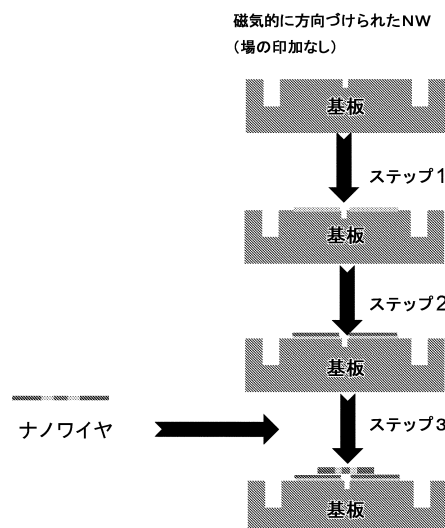
【図 2 3】



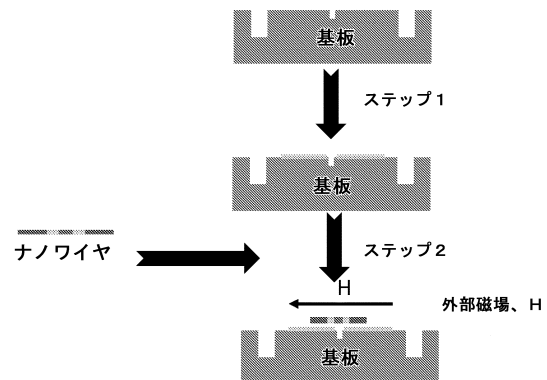
【図 2 4】



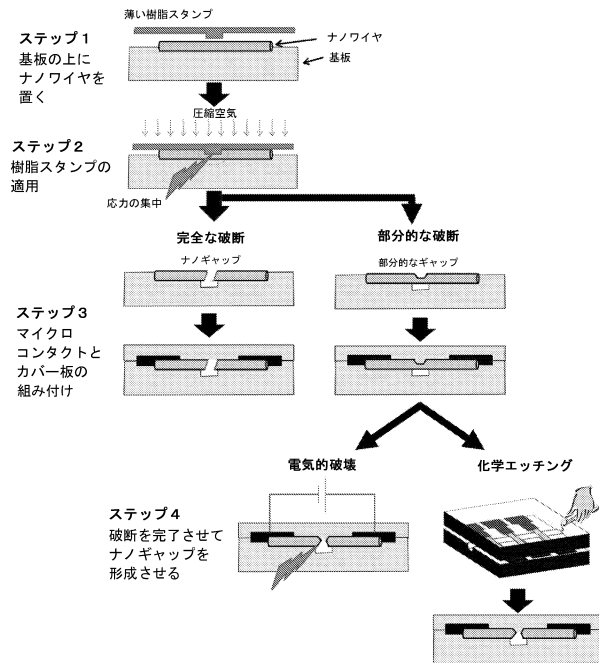
【図 2 5】



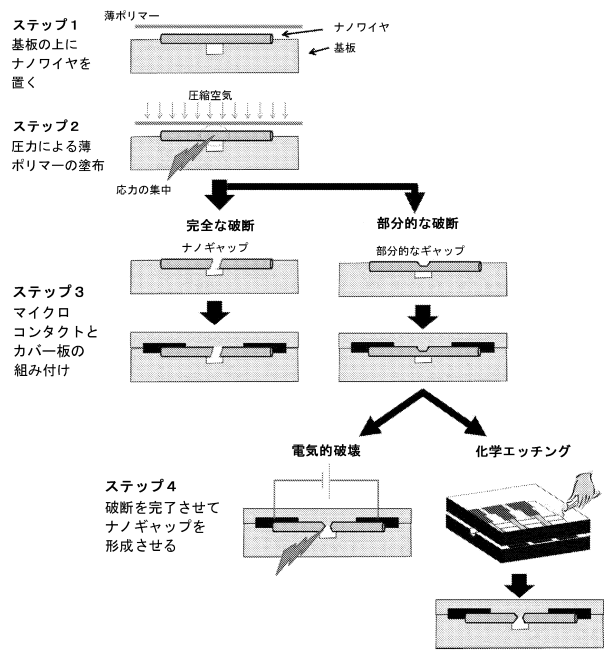
【図 2 6】



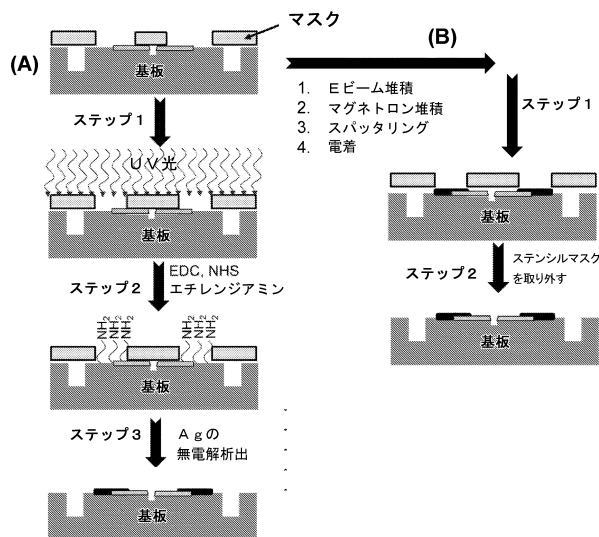
【図 27】



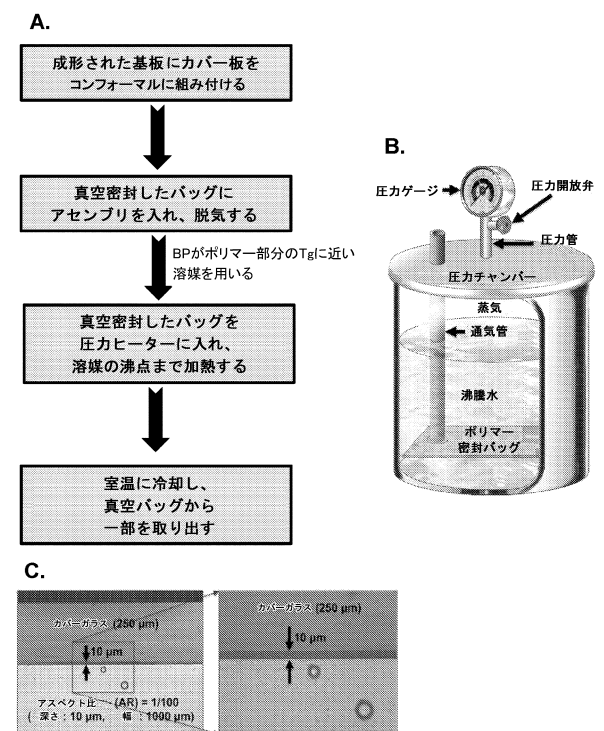
【図 28】



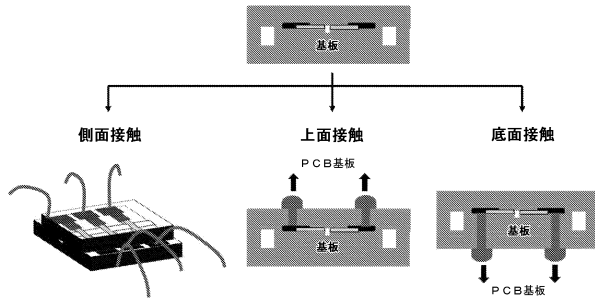
【図 29】



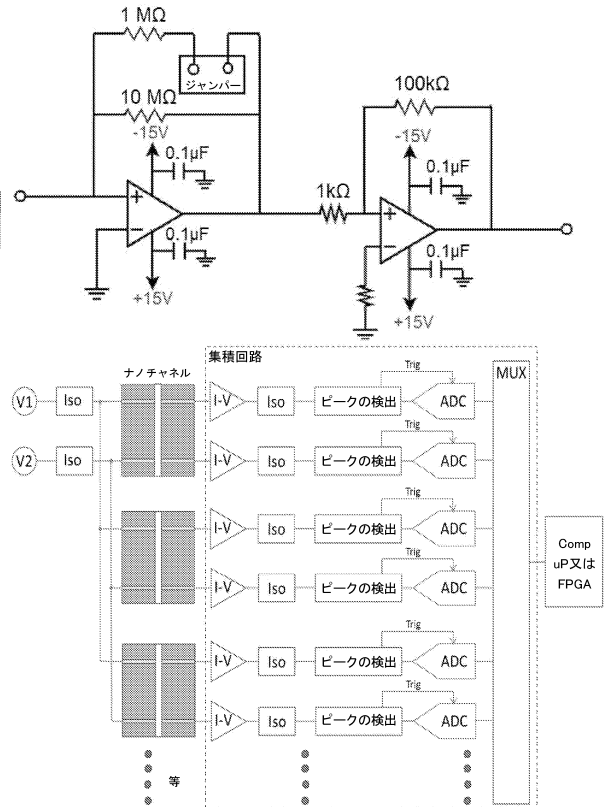
【図 30】



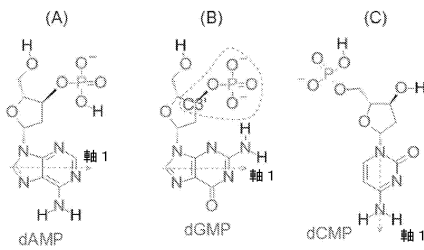
【図 3 1】



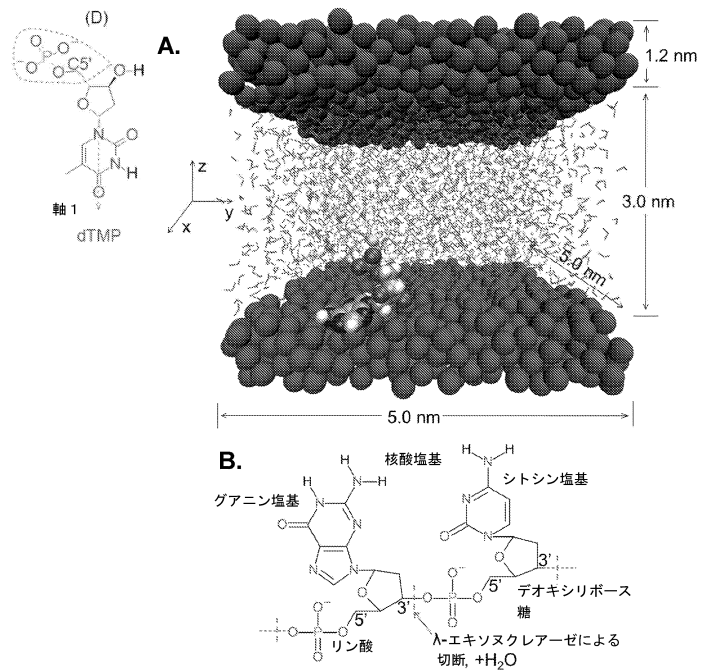
【図 3 2】



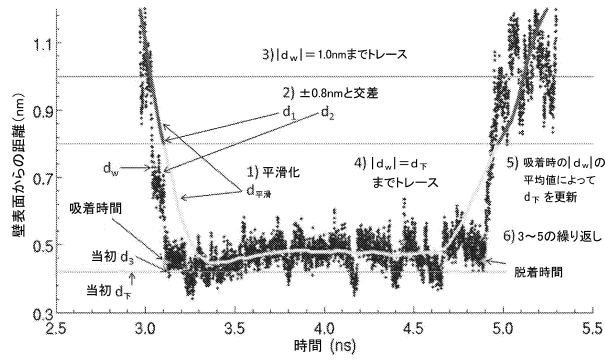
【図 3 3】



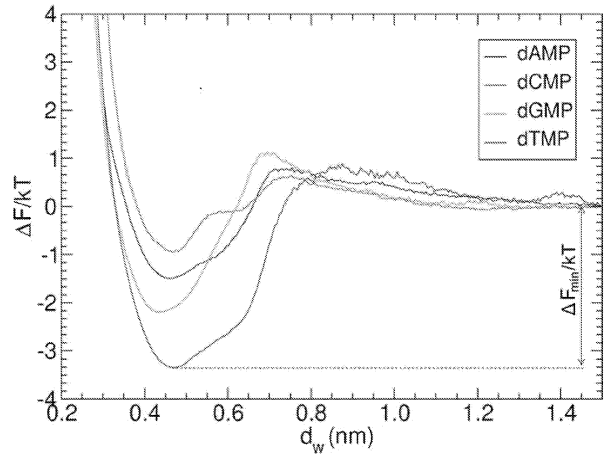
【図 3 4】



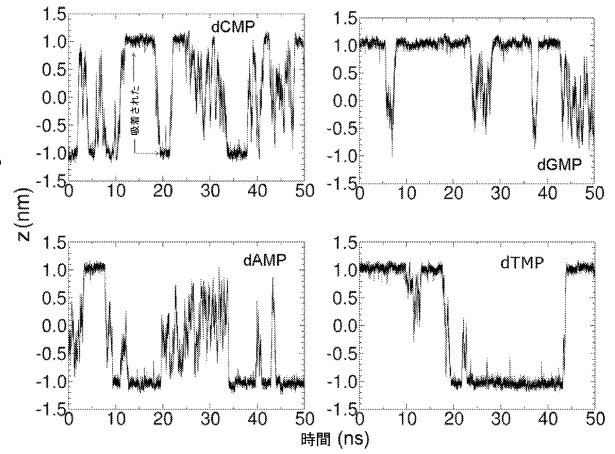
【図 3 5】



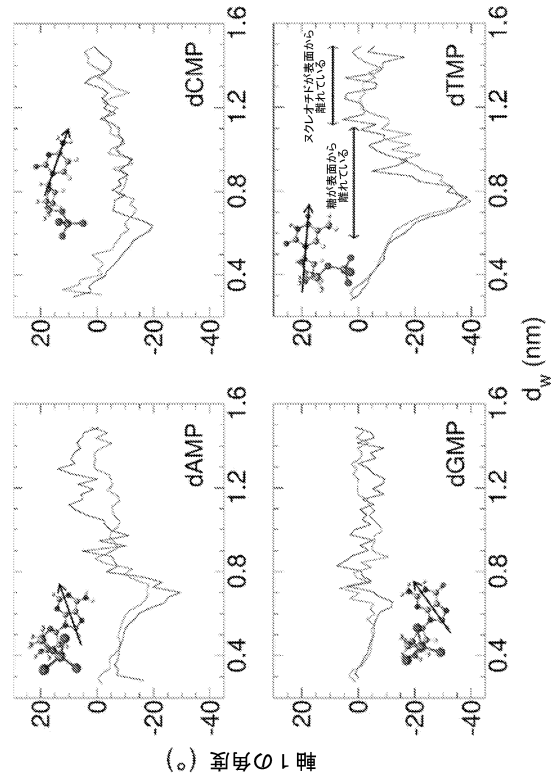
【図 3 6】



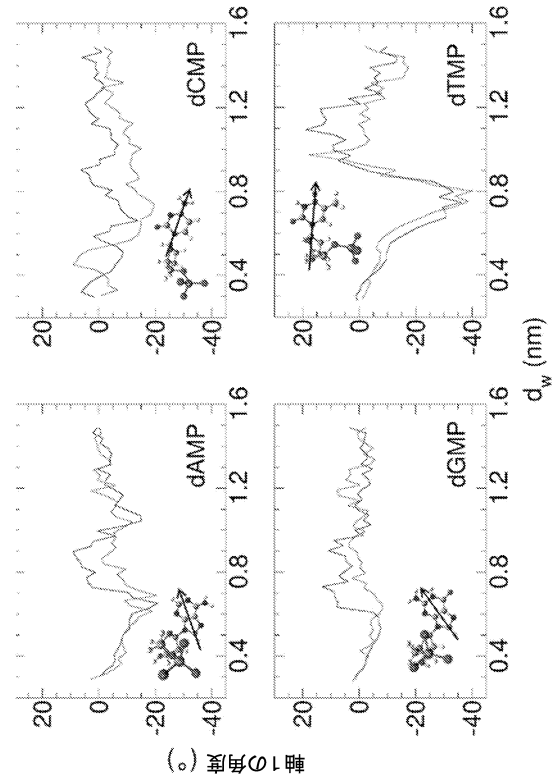
【図 3 7】



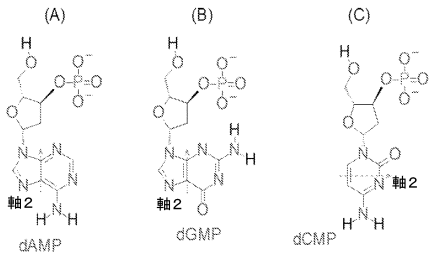
【図 3 8】



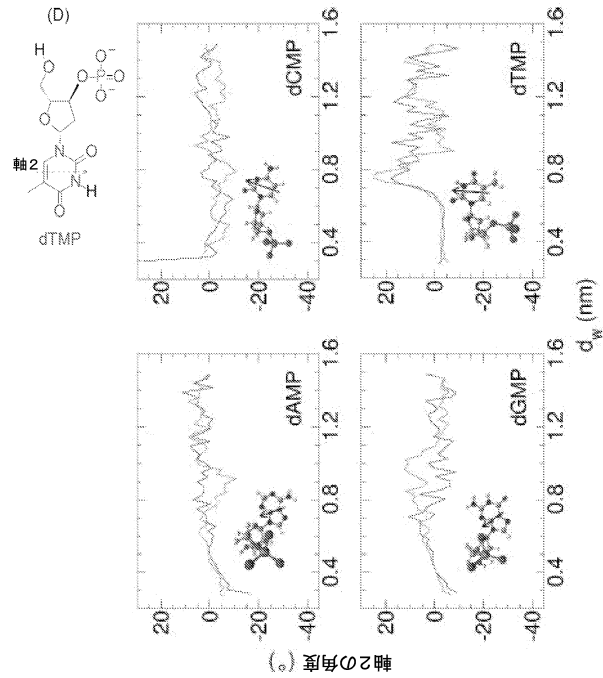
【図 3 9】



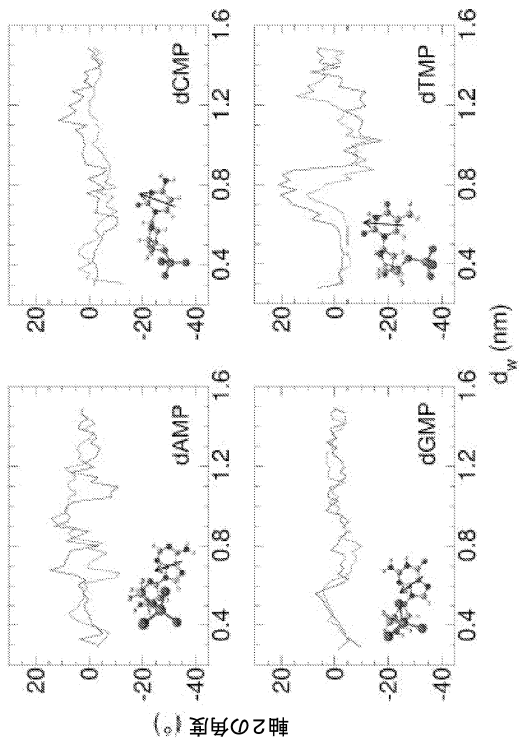
【図 40】



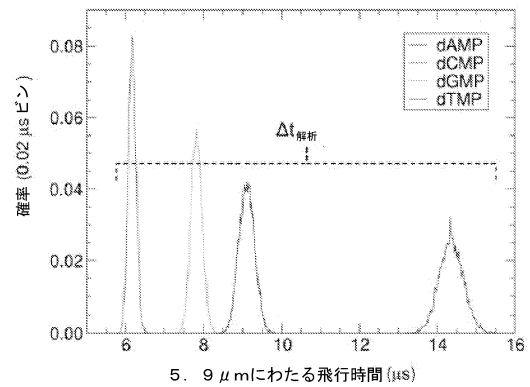
【図 41】



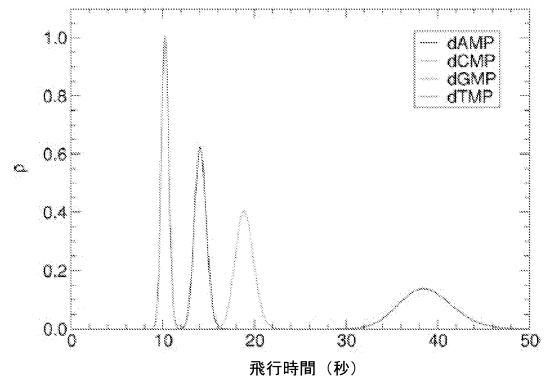
【図 42】



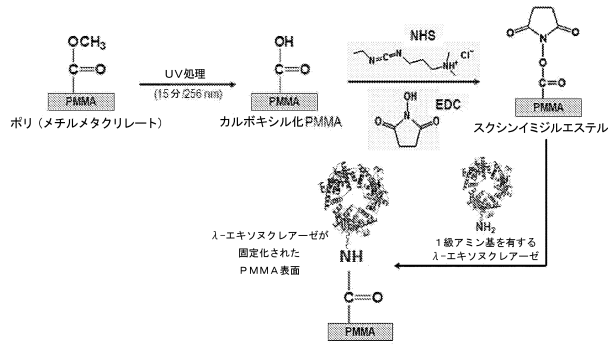
【図 43】



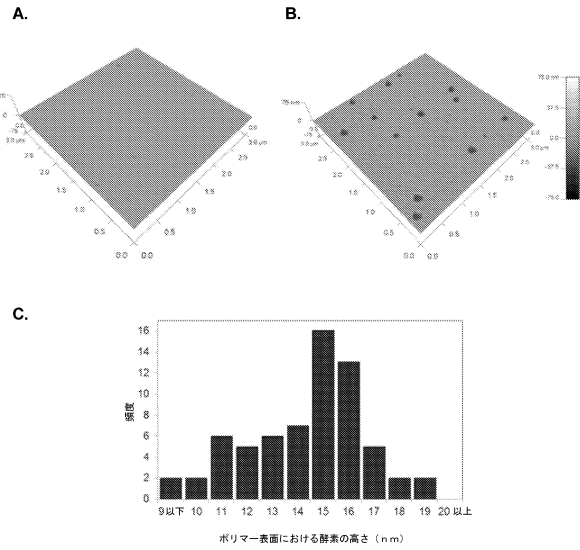
【図 44】



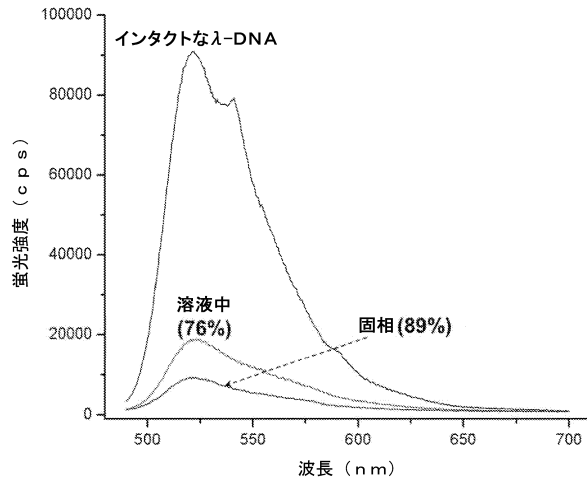
【図 45】



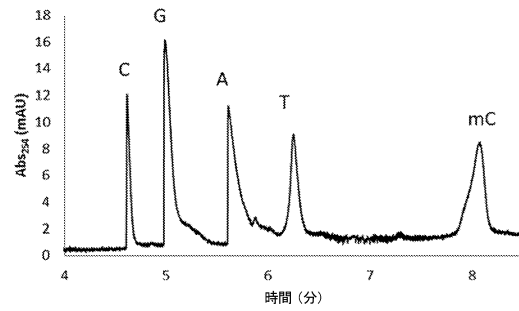
【図 46】



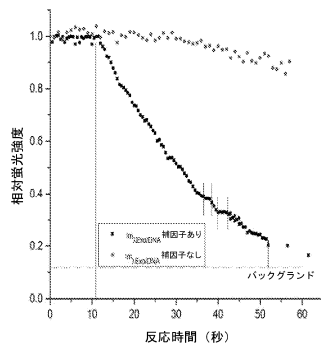
【図 47】



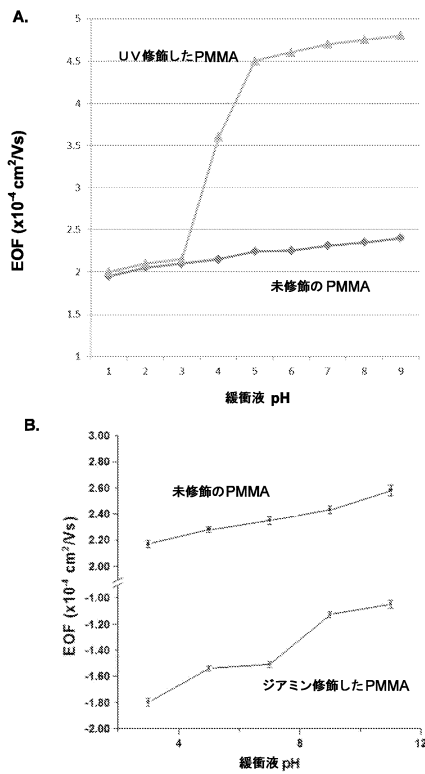
【図 49】



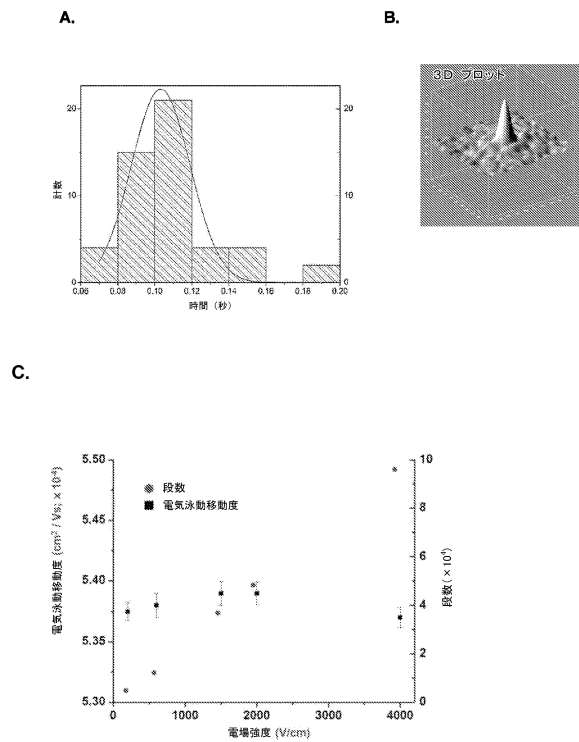
【図 48】



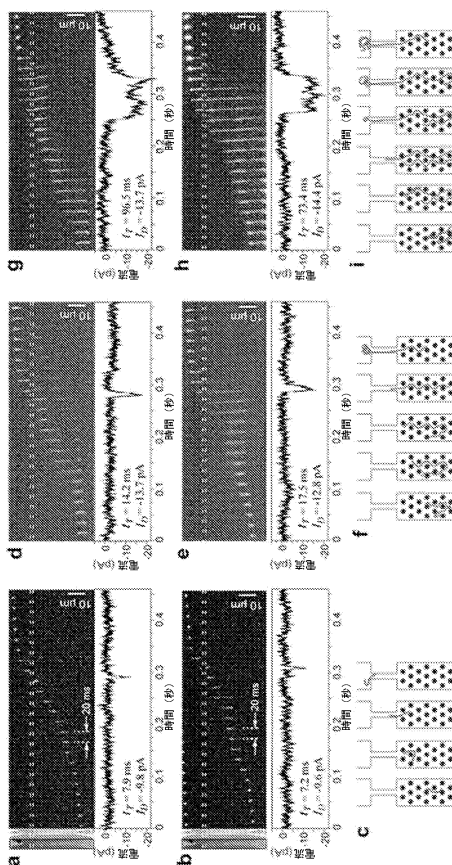
【図 50】



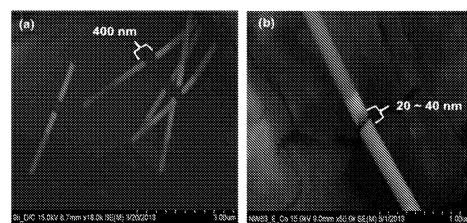
【図 51】



【図 52】



【図 53】



【配列表】

0006388605000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 27/26 (2006.01)		G 0 1 N 27/26	U
G 0 1 N 33/68 (2006.01)		G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)		G 0 1 N 33/48	A
G 0 1 N 33/483 (2006.01)		G 0 1 N 33/483	F
C 1 2 N 9/22 (2006.01)		C 1 2 N 9/22	
C 1 2 N 9/16 (2006.01)		C 1 2 N 9/16	
C 1 2 N 9/50 (2006.01)		C 1 2 N 9/16	Z
		C 1 2 N 9/50	

(73)特許権者 515218705

ユニバーシティ オブ ノース カロライナ アット チャペル ヒル
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チャペル ヒル イースト キャメロン アベニュー 2
 22 バイナム ホール 308 キャンパス ボックス 4105

(73)特許権者 515218716

ノースイースタン ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ハンティントン アベニュー 360 ルネサ
 ンス パーク 900

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ソーパー スティーブン エイ.

アメリカ合衆国 ルイジアナ州 バトン ルージュ ビラ クリーク アベニュー 11855

(72)発明者 バラニー フランシス

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト シックスティサード ストリート
 450 アpartment 12シー

(72)発明者 グリルズ ジョージ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 トゥルーマンズバーグ カユガ ストリート 17

(72)発明者 マッカーリー ロビン エル.

- アメリカ合衆国 ルイジアナ州 プレイリービル プランテーション コート ドライブ 185
37
- (72)発明者 マッキニー コリン ジェイ .
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 ダーラム ゴールデンビュー コート 1101
- (72)発明者 モールドバン ドレル
アメリカ合衆国 ルイジアナ州 バトン ルージュ スウィートブルック アベニュー 1053
6
- (72)発明者 マーフィー マイケル シー .
アメリカ合衆国 ルイジアナ州 バトン ルージュ ハイランド ノル コート 621
- (72)発明者 ニキトボウロス ディミトリス イー .
アメリカ合衆国 ルイジアナ州 バトン ルージュ ケンウッド アベニュー 446
- (72)発明者 バク スンゴク
アメリカ合衆国 ルイジアナ州 バトン ルージュ パスチャービュー ドライブ 414
- (72)発明者 ボドラハ マーフィー エリザベス ジェイ .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウェスト ロックスベリー シャーブルック ストリート
56

審査官 坂崎 恵美子

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0023146 (US, A1)
特開2007-044043 (JP, A)
米国特許出願公開第2012/0129716 (US, A1)
国際公開第2005/076837 (WO, A1)
国際公開第2013/012440 (WO, A1)
Polymer based modular systems with nanosensors for DNA/RNA sequencing, NIH Project Information 1R21HG006278-01, 2012年, 平成29年8月23日検索, URL, https://projectreporter.nih.gov/project_info_description.cfm?aid=8179098&icde=32749880&ddparam=&ddvalue=&ddsub=&cr=1&csb=default&cs=ASC&pball=
American Society for Mass Spectrometry, 2008年, Vol.19, p.964-972
15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2011年, p.401-403

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/6869

G01N 27/26

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)