

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5717634号
(P5717634)

(45) 発行日 平成27年5月13日(2015.5.13)

(24) 登録日 平成27年3月27日(2015.3.27)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 M 1/34 (2006.01)	C 12 M 1/34 B
G 01 N 33/53 (2006.01)	G 01 N 33/53 M
G 01 N 27/00 (2006.01)	G 01 N 27/00 Z
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68 Z
G 01 N 27/447 (2006.01)	G 01 N 27/26 301 C

請求項の数 48 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2011-525300 (P2011-525300)
(86) (22) 出願日	平成21年9月3日(2009.9.3)
(65) 公表番号	特表2012-501627 (P2012-501627A)
(43) 公表日	平成24年1月26日(2012.1.26)
(86) 國際出願番号	PCT/US2009/055876
(87) 國際公開番号	W02010/028140
(87) 國際公開日	平成22年3月11日(2010.3.11)
審査請求日	平成24年8月10日(2012.8.10)
(31) 優先権主張番号	61/093,885
(32) 優先日	平成20年9月3日(2008.9.3)
(33) 優先権主張国	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	511054754 ナブシス、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ロード アイランド O 2903, プロビデンス, クリフォード ストリート 60
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(74) 代理人	230113332 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】流体チャネル内の生体分子および他の分析物の電圧感知のための、長手方向に変位されるナノスケールの電極の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分析物の電圧感知のためのデバイスであって、前記デバイスは：
基板中に画定された流体チャネルと、

前記チャネル内に、その中の電圧を感知するために配置された感知電極対であって、前記感知電極対は、前記流体チャネルの長さに沿って2つの別個の位置に配置された第1および第2の感知電極を含む、感知電極対と、

前記流体チャネルに沿って電位を印加するために、前記流体チャネルの第1の端部および第2の端部に配置された起電電極対とを含み、

前記流体チャネルがナノチャネルまたはマイクロチャネルを含み、

前記感知電極対は、前記感知電極対によって感知される電圧を測定するための電圧計に接続されている、デバイス。

【請求項 2】

前記基板が、シリコン、二酸化ケイ素、石英ガラス、およびヒ化ガリウムからなる群より選択される材料を含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項 3】

前記感知電極対および起電電極対のそれぞれが、白金、金、クロム、チタン、塩化銀、銀、およびグラフェンからなる群より選択される材料を含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項 4】

10

20

前記第1の感知電極が前記流体チャネルの第1の側部に配置され、前記第2の感知電極が前記流体チャネルの反対の側部に配置される、請求項1に記載のデバイス。

【請求項5】

前記第1および第2の感知電極のそれぞれが前記流体チャネルの第1の側部に配置される、請求項1に記載のデバイス。

【請求項6】

前記第1および第2の感知電極のそれぞれが前記流体チャネルを横断している、請求項1に記載のデバイス。

【請求項7】

前記第1の感知電極が前記流体チャネルを横断しており、前記第2の感知電極が前記流体チャネルの側部に配置される、請求項1に記載のデバイス。 10

【請求項8】

前記起電電極対が、前記流体チャネル内に配置された分析物の移動のために、一定の電気泳動力、変動電気泳動力、または振動電気泳動力を前記流体チャネル内に生成するための巨視的電極を含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項9】

複数の流体チャネルをさらに含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項10】

前記基板上に配置された電圧増幅器をさらに含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項11】

前記流体チャネルが、1nm～5μmの範囲から選択される幅を有する、請求項1に記載のデバイス。 20

【請求項12】

前記流体チャネルが、1nm～5μmの範囲から選択される深さを有する、請求項1に記載のデバイス。

【請求項13】

前記流体チャネルが、1μm～10cmの範囲から選択される長さを有する、請求項1に記載のデバイス。

【請求項14】

分析物を検出するための方法であって、前記方法は：

流体チャネル内に前記分析物を配置すること、

前記流体チャネルに沿って電位を印加すること、

前記流体チャネルの第1の端部から前記流体チャネルの第2の端部に前記分析物を移動させること、および

前記分析物が感知電極対を通過するときに、前記流体チャネル内に配置された前記感知電極対の間の電圧シグナルを測定することを含み、前記感知電極対は前記流体チャネルの長さに沿って、2つの別個の位置に配置された第1の電極および第2の電極を含み、

前記流体チャネルはナノチャネルまたはマイクロチャネルを含み、

前記感知電極対は、前記感知電極対によって感知される電圧を測定するための電圧計に接続されている、方法。 40

【請求項15】

前記流体チャネルに沿って電位を印加することが、電気泳動力を前記流体チャネルの中に生成することを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記分析物を移動させることが、圧力差を使用することを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記分析物を移動させることが、化学的勾配を使用することを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

10

20

30

40

50

前記分析物が、デオキシリボ核酸、リボ核酸、およびポリペプチドからなる群より選択される生体高分子を含む、請求項1_4に記載の方法。

【請求項19】

前記生体高分子が単鎖分子を含む、請求項1_8に記載の方法。

【請求項20】

前記分析物が生体高分子を含み、前記生体高分子は、前記生体高分子に結合された少なくとも1つのプローブを有する、請求項1_4に記載の方法。

【請求項21】

前記電圧シグナルは、前記生体高分子が前記感知電極の間の体積を通って移動するときに変化し、前記電圧シグナルは、前記プローブを含有する前記生体高分子の一部が前記感知電極の間の前記体積を通って移動するときにさらに変化する、請求項2_0に記載の方法。
10

【請求項22】

電圧シグナル変化の間の時間を記録することをさらに含む、請求項2_1に記載の方法。

【請求項23】

前記電圧シグナルの変化の持続時間がプローブの存在を示し、前記電圧シグナルを使用して、前記生体高分子上の2つのプローブの間の距離を決定することをさらに含む、請求項2_2に記載の方法。

【請求項24】

前記電圧シグナルの変化の持続時間を使用して、前記分析物の長さを決定することをさらに含む、請求項1_4に記載の方法。
20

【請求項25】

生体高分子の配列を決定するための方法であって、前記方法は：

前記生体高分子を含む分析物を調製すること、

流体チャネル内に前記分析物を配置すること、

前記流体チャネルに沿って電位を印加すること、

前記流体チャネルの第1の端部から前記流体チャネルの第2の端部に前記分析物を移動させること、および

前記分析物が感知電極対を通過するときに、前記流体チャネル内に配置された前記感知電極対の間の電圧シグナルを測定することを含み、前記電圧シグナルが前記生体高分子に沿った位置に対応し、前記感知電極対が、前記流体チャネルの長さに沿って、2つの別個の位置に配置された第1の電極および第2の電極を含み、
30

前記流体チャネルは、ナノチャネルまたはマイクロチャネルを含み、

前記感知電極対は、前記感知電極対によって感知される電圧を測定するための電圧計に接続されている、方法。

【請求項26】

前記流体チャネルに沿って電位を印加することが、電気泳動力を前記流体チャネルの中に生成することを含む、請求項2_5に記載の方法。

【請求項27】

前記分析物を移動させることが、圧力差を使用することを含む、請求項2_5に記載の方法。
40

【請求項28】

前記分析物を移動させることが、化学的勾配を使用することを含む、請求項2_5に記載の方法。

【請求項29】

前記分析物を調製することが、プローブと前記生体高分子をハイブリダイズさせることを含む、請求項2_5に記載の方法。

【請求項30】

前記電圧シグナルの変化が、前記プローブを含有するハイブリダイズした前記生体高分子に沿った位置に対応する、請求項2_9に記載の方法。
50

【請求項 3 1】

コンピューターアルゴリズムを使用して前記電圧シグナルを処理して、前記生体高分子の配列を再構築することをさらに含む、請求項2 5に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記生体高分子が二重鎖生体高分子標的分子を含む、請求項2 5に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記分析物を調製することが、前記標的分子の認識部位に対する第1のプローブ特異性を有する第1のプローブと前記標的分子を接触させて、第1の複数の局所的な三元複合体を形成することを含み、前記第1のプローブは、第1の予測認識部位配列を有する、請求項3 2に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

前記電圧シグナルを使用して、前記第1の複数の局所的な三元複合体の位置情報を決定することをさらに含む、請求項3 3に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記位置情報は、2つの局所的な三元複合体の間の空間的距離に対応するパラメーターを含む、請求項3 4に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記分析物を調製することが、前記標的分子の認識部位に対する第2のプローブ特異性を有する第2のプローブと前記標的分子を接触させて、第2の複数の局所的な三元複合体を形成することをさらに含み、前記第2のプローブが第2の予測認識部位配列を有する、請求項3 4に記載の方法。

20

【請求項 3 7】

前記電圧シグナルを使用して、前記第2の複数の局所的な三元複合体の位置情報を決定することをさらに含む、請求項3 6に記載の方法。

【請求項 3 8】

少なくとも前記第1の複数の局所的な三元複合体の位置情報をおよび前記第2の複数の局所的な三元複合体の位置情報をアライメントして、前記標的のDNA配列を決定することをさらに含む、請求項3 7に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記生体高分子が二重鎖核酸標的分子を含み、前記二重鎖核酸標的分子が、その配列に沿って配置された複数の結合部位を有する、請求項2 5に記載の方法。

30

【請求項 4 0】

前記分析物を調製することが、前記二重鎖核酸標的分子に対する第1の配列特異性を有する複数のプローブ分子を添加することを含む、請求項3 9に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記第1の配列特異性を有する前記プローブ分子および前記標的分子をインキュベートして、前記標的分子の第1の結合部位および第2の結合部位の両方への前記第1のプローブ分子の優先的な結合を引き起こすことをさらに含む、請求項4 0に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記電圧シグナルを使用して、前記第1の結合部位および前記第2の結合部位の間の距離に関係するパラメーターを測定することをさらに含む、請求項4 1に記載の方法。

40

【請求項 4 3】

前記分析物を調製することが、第1のプローブと前記生体高分子を接触させて、前記第1のプローブが特異的でない、前記生体高分子の領域を複合化させないままとしながら、前記第1のプローブが公知の特異性を有する、前記生体高分子の認識部位で少なくとも1つのプローブ - 標的複合体を作ることを含む、請求項2 5に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記分析物を調製することが、第2のプローブと前記生体高分子を接触させて、前記第2のプローブが特異的でない、前記標的の領域を複合化させないままとしながら、前記第2のプローブが公知の特異性を有する、前記生体高分子の認識部位で少なくとも1つの

50

プローブ - 標的複合体を作ることをさらに含む、請求項4_3に記載の方法。

【請求項4_5】

前記電圧シグナルを使用して、前記生体高分子の複合体化した領域および複合体化していない領域を検出および記録して、前記第1のプローブの第1のプローブマップおよび前記第2のプローブの第2のプローブマップを作ることをさらに含み、前記第1のプローブマップおよび前記第2のプローブマップが前記プローブのハイブリダイゼーションの相対的位置についての情報を組み込んでいる、請求項4_4に記載の方法。

【請求項4_6】

位置情報または前記プローブ分子の重複配列および位置情報の組合せを使用して、少なくとも2つのプローブ配列を並べることによって候補配列を決定することをさらに含む、
請求項4_5に記載の方法。
10

【請求項4_7】

前記第1のプローブマップおよび前記第2のプローブマップが、それぞれのプローブについての前記位置情報の誤差についての情報を組み込む、請求項4_5に記載の方法。

【請求項4_8】

位置情報および位置情報における前記誤差に関するパラメーターまたは前記プローブ分子の重複配列および位置情報および位置情報における誤差の組合せを使用して、少なくとも2つのプローブ配列を並べることによって候補配列を決定することをさらに含む、請求項4_7に記載の方法。
20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2008年9月3日に出願された米国仮第61/093,885号（この全体は、参考として本明細書に援用される）に対する優先権の利益を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般に、生体高分子配列決定に関する。より詳細には、ある実施形態では、
30
本発明は、生体高分子の長さおよび生体高分子に結合したプローブの距離の決定に関する。
。

【背景技術】

【0003】

背景

Coulter計数法として公知の技術は、赤血球の高速計数のための技術として、1940年代の後半に、最初に、Wallace H. Coulterによって提唱された。抵抗性パルス感知とも称されるが、Coulter計数法は、サイズ（体積）、電荷、電気泳動移動度、および濃度を含む、電解質溶液中の分析物の物理的パラメーターを測定するために使用され得る。この技術では、溶液の2つのリザーバーは、公知の寸法の流体コンストリクション（fluidic constriction）によって分離されている。2つのリザーバーの間の一定のDC電圧の印加は、測定されるベースラインイオン電流をもたらす。ベースライン電流の大きさは、電解質の伝導率、印加電位、チャネルの長さ、およびチャネルの横断面積に関係する。分析物がリザーバーの中に導入されると、それは、流体チャネルを通過し、電解質溶液および分析物の間の伝導率の差異により、観察される電流を低下させ得る。電流の低下の大きさは、それが流体チャネル内にある間に、分析物によって置き換えられる電解質体積に依存する。
40

【0004】

抵抗性パルス感知技術の有益性は、それが、ナノスケール流体コンストリクションの使用を通してナノスケール分析物の検出を可能にするためにスケールダウンできることであ
50

る。この性能は、DNAなどのようなナノスケール分子を検出するためのソリッドストレートナノポアの開発に至った。

【0005】

ナノポアを通してのDNA移動の場合には、物理的な移動は、印加DC電圧によって生成される電気泳動力によって駆動される。そのため、この駆動力および検出されるシグナルは、通常、密接に結びついている。物理的な移動のための最適な電位は最適な測定のものとは異なるので、これらの2つの作用の分断が望ましいことがある。

【0006】

横断電極は、ナノ流体チャネル内に閉じ込められた生体分子を感知するための横断電場および電流を提供するために提唱された。その全体が参照によって本明細書に組み込まれるLiangおよびChou 2008年の非特許文献1を参照されたい。分析物は、ナノチャネルの両端部の通電電極によって生成される電気泳動力によりチャネルを通って移動し、そのため、移動速度と測定を分断する。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Liang, X; Chou, S.Y., Nanogap Detector Inside Nanofluidic Channel for Fast Real-Time Label-Free DNA Analysis. Nano Lett. 2008年、8巻、1472~1476頁

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

概要

本発明の実施形態は、横断電流を生成するのではなく、電圧変化を感知するための電極を使用し、それによって電極の劣化を低下させるデバイスおよび方法を提供する。特に、本明細書において記載されたデバイスは、流体チャネル内の生体分子および他のナノスケール分析物の電子的感知のための、長手方向に変位される電極を利用する。実施形態は、たとえば、それに結合されたプローブを有するDNA鎖の分析を含む、ナノスケール分析物の特徴づけを可能にする。

30

【0009】

より詳細には、本発明の実施形態は、流体チャネル内の分析物、たとえばDNAの電子的感知のための感知電極を利用してよい。流体チャネル内の感知電極を使用して、分析物の長さを決定してもよく、またはそれらを使用して、DNAの標的鎖にハイブリダイズしたプローブの間の距離を決定してもよい。デバイス設計は、光学的検出のために使用されるナノチャネルデバイスに類似する。2つのマイクロスケール液体リザーバーは、100~200 μmの距離で加工され得る。1つまたは複数の流体チャネルが2つのリザーバーを接続してもよい。キャップは、それぞれのリザーバーへの流体導入を可能にして巨視的電極に対するアクセスを提供することができる穴をあけることによって加工されてもよい。使用において、2つの感知電極の間の電位差異をモニターするために、電圧計が使用され得る。

40

【0010】

分析されることとなるDNAは、マイクロ流体リザーバーのうちの1つに導入され得る。巨視的電極を使用して、電源に接続されてもよく、2つのリザーバーの間に電位を印加することができる。DNA断片は、微視的リザーバーからナノチャネルの中に電気泳動的に駆動され得る。それぞれのDNA断片が、流体チャネルを流れ下るとき、それは、流体チャネル内に配置された感知電極対に出入りし得る。

【0011】

DNAの非存在下において、流体チャネルは、イオン溶液のみを含有しており、典型的には、2つの感知電極の間で測定されるベースライン電位差異を有する。DNAが流体チ

50

ヤネルに入るとき、2つの感知電極の間で測定される電位は、DNAがイオン溶液の伝導率と異なる伝導率を有するので、変化し得る。DNAが流体チャネルに入る場合、DNAが緩衝溶液ほど伝導性でないので、2つの感知電極の間のチャネルの伝導率は、典型的には低下することになる（その全体が参照によって組み込まれるde Pablo, P. J.; Moreno-Herrero, F; Colchero, J.; Gomez-Herrero, J.; Herrero, P.; Baro, A.M.; Ordejon, P.; Soler, J.M.; Artacho, E, Absence of dc-Conductivity in Phys. Rev. Lett. 2000年、85巻、4992~4995頁を参照されたい）。DNAにハイブリダイズしたプローブを有するDNAの一部が、流体チャネルに入る場合、電位はさらに変化し得る。
測定されるシグナルを分析して、DNAの長さおよび／またはプローブの間の距離を決定。

【0012】

一態様では、本発明の実施形態は、分析物の電圧感知のためのデバイスを含む。デバイスは、基板中に画定された流体チャネルおよびその中の電圧を感知するための、流体チャネル内に配置された感知電極対を含んでいてもよい。感知電極対は、流体チャネルの長さに沿って、2つの別個の位置に配置された第1および第2の感知電極を含んでいてもよい。起電電極対は、流体チャネルに沿って電位を印加するために、流体チャネルの第1の端部および第2の端部に配置してもよい。流体チャネルは、ナノチャネルまたはマイクロチャネルを含んでいてもよいまたはそれから本質的に成ってもよい。

【0013】

1つまたは複数の以下の特徴が、含まれていてもよい。基板は、シリコン、二酸化ケイ素、石英ガラス、および／またはヒ化ガリウムを含んでいてもよいまたはそれから本質的に成ってもよい。感知電極対および起電電極対のそれぞれは、白金、金、クロム、チタン、塩化銀、銀、およびグラフェンを含んでいてもよいまたはそれから本質的に成ってもよい。

【0014】

第1の感知電極は、流体チャネルの第1の側部に配置されてもよく、第2の感知電極は、流体チャネルの反対の側部に配置されてもよい。第1および第2の感知電極のそれぞれは、流体チャネルの第1の側部に配置されてもよいまたは第1および第2の感知電極のそれぞれは、流体チャネルを横断してもよい。第1の感知電極は、流体チャネルを横断してもよく、第2の感知電極は、流体チャネルの側部に配置してもよい。

【0015】

起電電極対は、その中に配置された分析物の移動のために、流体チャネル内に一定の電気泳動力(electrophoretic force)、変動電気泳動力、または振動電気泳動力を生成するための巨視的電極を含んでいてもよい。

【0016】

感知電極対によって感知される電圧を測定するために、電圧計などのような測定ツールが提供されてもよい。デバイスは、複数の流体チャネルを含んでいてもよい。基板上に電圧增幅器が配置されてもよい。

【0017】

流体チャネルは、1nm～5μmの範囲から選択される幅、1nm～5μmの範囲から選択される深さ、および／または1μm～10cmの範囲から選択される長さを有してもよい。

【0018】

本発明の他の態様の実施形態の構成要素の記載は、本発明のこの態様に同様に適用され得る。

【0019】

他の態様では、本発明は、分析物を検出するための方法であって、流体チャネル内に分析物を配置することを含む方法に関する。電位は、流体チャネルに沿って印加され、分析物は、流体チャネルの第1の端部から流体チャネルの第2の端部に移動する。電圧シグナ

10

20

30

40

50

ルは、分析物が感知電極対を通過するときに、流体チャネル内に配置される感知電極対の間で測定され、感知電極対は、流体チャネルの長さに沿って、2つの別個の位置に配置された第1の電極および第2の電極を含む。流体チャネルは、ナノチャネルまたはマイクロチャネルを含んでいてもよいまたはそれから本質的に成ってもよい。

【0020】

流体チャネルに沿って印加される電位は、電気泳動力をその中に生成することを含んでいてもよい。分析物の移動は、圧力差および／または化学的勾配を使用することを含んでいてもよい。

【0021】

1つまたは複数の以下の特徴が、含まれていてもよい。分析物は、デオキシリボ核酸、リボ核酸、および／またはポリペプチドなどのような生体高分子を含んでいてもよい。生体高分子は、単鎖分子を含んでいてもよいまたはそれから本質的に成ってもよい。分析物は、それに結合された少なくとも1つのプローブを有する生体高分子を含んでいてもよいまたはそれから本質的に成ってもよい。

【0022】

電圧シグナルは、生体高分子が感知電極の間の体積を通って移動する場合に、変化してもよく、プローブを含有する生体高分子の一部が感知電極の間の体積を通って移動する場合に、さらに変化してもよい。電圧シグナル変化の間の時間を記録してもよい。電圧シグナルの変化の持続時間は、プローブの存在を示してもよく、電圧シグナルを使用して、生体高分子上の2つのプローブの間の距離を決定してもよい。

10

20

【0023】

電圧シグナルの変化の持続時間を使用して、分析物の長さを決定してもよい。単一分析物の分子が流体チャネルを通過するときに、それを測定するために多数の対の感知電極を使用してもよい。

【0024】

本発明の他の態様の実施形態の構成要素の記載は、本発明のこの態様に同様に適用され得る。

【0025】

さらに他の態様では、生体高分子の配列を決定するための方法は、生体高分子を含む分析物を調製することを含んでいてもよい。分析物は、流体チャネル内に配置してもよい。電位は、流体チャネルに沿って印加されてもよく、分析物は、流体チャネルの第1の端部から流体チャネルの第2の端部に移動する。電圧シグナルは、分析物が感知電極対を通過するときに、流体チャネル内に配置された感知電極対の間で測定されてもよく、電圧シグナルは、生体高分子に沿った位置に対応し、感知電極対は、流体チャネルの長さに沿って、2つの別個の位置に配置された第1の電極および第2の電極を含む。流体チャネルは、ナノチャネルまたはマイクロチャネルを含んでいてもよいまたはそれから本質的に成ってもよい。

30

【0026】

流体チャネルに沿って印加される電位は、電気泳動力をその中に生成することを含んでいてもよい。分析物は、圧力差および／または化学的勾配を使用することによって移動してもよい。

40

【0027】

1つまたは複数の以下の特徴が、含まれていてもよい。分析物の調製は、プローブと生体高分子をハイブリダイズさせることを含んでいてもよい。電圧シグナルの変化は、プローブを含有する、ハイブリダイズした生体高分子に沿った位置に対応してもよい。コンピューターアルゴリズムを使用して電圧シグナルを処理して、生体高分子の配列を再構築してもよい。生体高分子は、二重鎖生体高分子標的分子を含んでいてもよいまたはそれから本質的に成ってもよい。分析物の調製は、標的分子の認識部位に対する第1のプローブ特異性を有する第1のプローブと標的分子を接觸させて、第1の複数の局所的な三元複合体を形成することを含んでいてもよく、第1のプローブは、第1の予測認識部位配列を有す

50

る。電圧シグナルを使用して、第1の複数の局所的な三元複合体の位置情報を決定してもよい。位置情報は、2つの局所的な三元複合体の間の空間的距離に対するパラメーターを含んでいてもよい。

【0028】

分析物の調製は、第2の複数の局所的な三元複合体を形成するために、標的分子の認識部位に対する第2のプローブ特異性を有する第2のプローブと標的分子を接触させることをさらに含んでいてもよく、第2のプローブは、第2の予測認識部位配列を有する。

【0029】

電圧シグナルを使用して、第2の複数の局所的な三元複合体の位置情報を決定してもよい。少なくとも第1の複数の局所的な三元複合体および第2の複数の局所的な三元複合体の位置情報は、標的のDNA配列を決定するためにアライメントされ得る。10

【0030】

生体高分子は、その配列に沿って配置された、複数の結合部位を有する二重鎖核酸標的分子を含んでいてもよいまたはそれから本質的に成ってもよい。分析物の調製は、二重鎖核酸標的分子に対する第1の配列特異性を有する複数のプローブ分子を添加することを含んでいてもよい。

【0031】

第1の配列特異性を有するプローブ分子および標的分子をインキュベートして、標的分子の第1の結合部位および第2の結合部位の両方への第1のプローブ分子の優先的な結合を引き起こしてもよい。電圧シグナルを使用して、第1の結合部位および第2の結合部位の間の距離に関係するパラメーターを測定してもよい。20

【0032】

分析物の調製は、第1のプローブと生体高分子を接触させて、第1のプローブが特異的でない、生体高分子の領域を複合体化させない(uncoupled)ままとしながら、第1のプローブが公知の特異性を有する、生体高分子の認識部位で少なくとも1つのプローブ-標的複合体を作ることを含み得る。分析物の調製は、第2のプローブと生体高分子を接触させて、第2のプローブが特異的でない、標的の領域を複合体化させないままとしながら、第2のプローブが公知の特異性を有する、生体高分子の認識部位で少なくとも1つのプローブ-標的複合体を作ることを含み得る。

【0033】

電圧シグナルを使用して、生体高分子の複合体化した領域および複合体化していない領域を検出および記録して、第1のプローブの第1のプローブマップ(probe map)および第2のプローブの第2のプローブマップを作ってもよく、第1のプローブマップおよび第2のプローブマップは、プローブのハイブリダイゼーションの相対的位置についての情報を組み込んでいる。候補配列は、位置情報またはプローブ分子の重複配列および位置情報の組合せを使用して、少なくとも2つのプローブ配列をアライメントすることによって決定され得る。第1のプローブマップおよび第2のプローブマップは、それぞれのプローブについての位置情報の誤差(error)についての情報を組み込んでいてもよい。候補配列は、位置情報および位置情報における誤差に関するパラメーターまたはプローブ分子の重複配列および位置情報および位置情報における誤差の組合せを使用して、少なくとも2つのプローブ配列を並べることによって決定され得る。40

【0034】

本発明の他の態様の実施形態の構成要素の記載は、本発明のこの態様に同様に適用され得る。

本発明は、例えば、以下を提供する。

(項目1)

分析物の電圧感知のためのデバイスであって、上記デバイスは：

基板中に画定された流体チャネルと、

上記チャネル内に、その中の電圧を感知するために配置された感知電極対であって、上記感知電極対は、上記流体チャネルの長さに沿って2つの別個の位置に配置された第1お

10

20

30

40

50

および第 2 の感知電極を含む、感知電極対と、

上記流体チャネルに沿って電位を印加するために、上記流体チャネルの第 1 の端部および第 2 の端部に配置された起電電極対とを含み、

上記流体チャネルがナノチャネルまたはマイクロチャネルを含む、デバイス。

(項目 2)

上記基板が、シリコン、二酸化ケイ素、石英ガラス、およびヒ化ガリウムからなる群より選択される材料を含む、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 3)

上記感知電極対および起電電極対のそれぞれが、白金、金、クロム、チタン、塩化銀、銀、およびグラフェンからなる群より選択される材料を含む、項目 1 に記載のデバイス。

10

(項目 4)

上記第 1 の感知電極が上記流体チャネルの第 1 の側部に配置され、上記第 2 の感知電極が上記流体チャネルの反対の側部に配置される、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 5)

上記第 1 および第 2 の感知電極のそれぞれが上記流体チャネルの第 1 の側部に配置される、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 6)

上記第 1 および第 2 の感知電極のそれぞれが上記流体チャネルを横断している、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 7)

上記第 1 の感知電極が上記流体チャネルを横断しており、上記第 2 の感知電極が上記流体チャネルの側部に配置される、項目 1 に記載のデバイス。

20

(項目 8)

上記起電電極対が、上記流体チャネル内に配置された分析物の移動のために、一定の電気泳動力、変動電気泳動力、または振動電気泳動力を上記流体チャネル内に生成するための巨視的電極を含む、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 9)

上記感知電極対によって感知される電圧を測定するための測定ツールをさらに含む、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 10)

30

上記測定ツールが電圧計を含む、項目 9 に記載のデバイス。

(項目 11)

複数の流体チャネルをさらに含む、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 12)

上記基板上に配置された電圧増幅器をさらに含む、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 13)

上記流体チャネルが、1 nm ~ 5 μm の範囲から選択される幅を有する、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 14)

上記流体チャネルが、1 nm ~ 5 μm の範囲から選択される深さを有する、項目 1 に記載のデバイス。

40

(項目 15)

上記流体チャネルが、1 μm ~ 10 cm の範囲から選択される長さを有する、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 16)

分析物を検出するための方法であって、上記方法は：

流体チャネル内に上記分析物を配置すること、

上記流体チャネルに沿って電位を印加すること、

上記流体チャネルの第 1 の端部から上記流体チャネルの第 2 の端部に上記分析物を移動させること、および

50

上記分析物が感知電極対を通過するときに、上記流体チャネル内に配置された上記感知電極対の間の電圧シグナルを測定することを含み、上記感知電極対は上記流体チャネルの長さに沿って、2つの別個の位置に配置された第1の電極および第2の電極を含み、上記流体チャネルはナノチャネルまたはマイクロチャネルを含む、方法。

(項目17)

上記流体チャネルに沿って電位を印加することが、電気泳動力を上記流体チャネルの中に生成することを含む、項目16に記載の方法。

(項目18)

上記分析物を移動させることが、圧力差を使用することを含む、項目16に記載の方法。

10

(項目19)

上記分析物を移動させることが、化学的勾配を使用することを含む、項目16に記載の方法。

(項目20)

上記分析物が、デオキシリボ核酸、リボ核酸、およびポリペプチドからなる群より選択される生体高分子を含む、項目16に記載の方法。

(項目21)

上記生体高分子が単鎖分子を含む、項目20に記載の方法。

(項目22)

上記分析物が生体高分子を含み、上記生体高分子は、上記生体高分子に結合された少なくとも1つのプローブを有する、項目16に記載の方法。

20

(項目23)

上記電圧シグナルは、上記生体高分子が上記感知電極の間の体積を通って移動するときに変化し、上記電圧シグナルは、上記プローブを含有する上記生体高分子の一部が上記感知電極の間の上記体積を通って移動するときにさらに変化する、項目22に記載の方法。

(項目24)

電圧シグナル変化の間の時間を記録することをさらに含む、項目23に記載の方法。

(項目25)

上記電圧シグナルの変化の持続時間がプローブの存在を示し、上記電圧シグナルを使用して、上記生体高分子上の2つのプローブの間の距離を決定することをさらに含む、項目24に記載の方法。

30

(項目26)

上記電圧シグナルの変化の持続時間を使用して、上記分析物の長さを決定することをさらに含む、項目16に記載の方法。

(項目27)

生体高分子の配列を決定するための方法であって、上記方法は：

上記生体高分子を含む分析物を調製すること、

流体チャネル内に上記分析物を配置すること、

上記流体チャネルに沿って電位を印加すること、

上記流体チャネルの第1の端部から上記流体チャネルの第2の端部に上記分析物を移動させること、および

40

上記分析物が感知電極対を通過するときに、上記流体チャネル内に配置された上記感知電極対の間の電圧シグナルを測定することを含み、上記電圧シグナルが上記生体高分子に沿った位置に対応し、上記感知電極対が、上記流体チャネルの長さに沿って、2つの別個の位置に配置された第1の電極および第2の電極を含み、

上記流体チャネルは、ナノチャネルまたはマイクロチャネルを含む、方法。

(項目28)

上記流体チャネルに沿って電位を印加することが、電気泳動力を上記流体チャネルの中に生成することを含む、項目27に記載の方法。

(項目29)

50

上記分析物を移動させることが、圧力差を使用することを含む、項目 27 に記載の方法。

(項目 30)

上記分析物を移動させることが、化学的勾配を使用することを含む、項目 27 に記載の方法。

(項目 31)

上記分析物を調製することが、プローブと上記生体高分子をハイブリダイズさせることを含む、項目 27 に記載の方法。

(項目 32)

上記電圧シグナルの変化が、上記プローブを含有するハイブリダイズした上記生体高分子に沿った位置に対応する、項目 31 に記載の方法。

10

(項目 33)

コンピューターアルゴリズムを使用して上記電圧シグナルを処理して、上記生体高分子の配列を再構築することをさらに含む、項目 27 に記載の方法。

(項目 34)

上記生体高分子が二重鎖生体高分子標的分子を含む、項目 27 に記載の方法。

(項目 35)

上記分析物を調製することが、上記標的分子の認識部位に対する第 1 のプローブ特異性を有する第 1 のプローブと上記標的分子を接触させて、第 1 の複数の局所的な三元複合体を形成することを含み、上記第 1 のプローブは、第 1 の予測認識部位配列を有する、項目 34 に記載の方法。

20

(項目 36)

上記電圧シグナルを使用して、上記第 1 の複数の局所的な三元複合体の位置情報を決定することをさらに含む、項目 35 に記載の方法。

(項目 37)

上記位置情報は、2つの局所的な三元複合体の間の空間的距離に対応するパラメーターを含む、項目 36 に記載の方法。

(項目 38)

上記分析物を調製することが、上記標的分子の認識部位に対する第 2 のプローブ特異性を有する第 2 のプローブと上記標的分子を接触させて、第 2 の複数の局所的な三元複合体を形成することをさらに含み、上記第 2 のプローブが第 2 の予測認識部位配列を有する、項目 36 に記載の方法。

30

(項目 39)

上記電圧シグナルを使用して、上記第 2 の複数の局所的な三元複合体の位置情報を決定することをさらに含む、項目 38 に記載の方法。

(項目 40)

少なくとも上記第 1 の複数の局所的な三元複合体の位置情報をおよび上記第 2 の複数の局所的な三元複合体の位置情報をアライメントして、上記標的の DNA 配列を決定することをさらに含む、項目 39 に記載の方法。

40

(項目 41)

上記生体高分子が二重鎖核酸標的分子を含み、上記二重鎖核酸標的分子が、その配列に沿って配置された複数の結合部位を有する、項目 27 に記載の方法。

(項目 42)

上記分析物を調製することが、上記二重鎖核酸標的分子に対する第 1 の配列特異性を有する複数のプローブ分子を添加することを含む、項目 41 に記載の方法。

(項目 43)

上記第 1 の配列特異性を有する上記プローブ分子および上記標的分子をインキュベートして、上記標的分子の第 1 の結合部位および第 2 の結合部位の両方への上記第 1 のプローブ分子の優先的な結合を引き起こすことをさらに含む、項目 42 に記載の方法。

(項目 44)

50

上記電圧シグナルを使用して、上記第1の結合部位および上記第2の結合部位の間の距離に関するパラメーターを測定することをさらに含む、項目43に記載の方法。

(項目45)

上記分析物を調製することが、第1のプローブと上記生体高分子を接触させて、上記第1のプローブが特異的でない、上記生体高分子の領域を複合体化させないままとしながら、上記第1のプローブが公知の特異性を有する、上記生体高分子の認識部位で少なくとも1つのプローブ-標的複合体を作ることを含む、項目27に記載の方法。

(項目46)

上記分析物を調製することが、第2のプローブと上記生体高分子を接触させて、上記第2のプローブが特異的でない、上記標的の領域を複合体化させないままとしながら、上記第2のプローブが公知の特異性を有する、上記生体高分子の認識部位で少なくとも1つのプローブ-標的複合体を作ることをさらに含む、項目45に記載の方法。

10

(項目47)

上記電圧シグナルを使用して、上記生体高分子の複合体化した領域および複合体化していない領域を検出および記録して、上記第1のプローブの第1のプローブマップおよび上記第2のプローブの第2のプローブマップを作ることをさらに含み、上記第1のプローブマップおよび上記第2のプローブマップが上記プローブのハイブリダイゼーションの相対的位置についての情報を組み込んでいる、項目46に記載の方法。

(項目48)

位置情報または上記プローブ分子の重複配列および位置情報の組合せを使用して、少なくとも2つのプローブ配列を並べることによって候補配列を決定することをさらに含む、項目47に記載の方法。

20

(項目49)

上記第1のプローブマップおよび上記第2のプローブマップが、それぞれのプローブについての上記位置情報の誤差についての情報を組み込む、項目46に記載の方法。

(項目50)

位置情報および位置情報における上記誤差に関するパラメーターまたは上記プローブ分子の重複配列および位置情報および位置情報における誤差の組合せを使用して、少なくとも2つのプローブ配列を並べることによって候補配列を決定することをさらに含む、項目49に記載の方法。

30

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、本発明の実施形態による長手方向に変位される横断電極デバイス構成を示す模式図である。

【図2】図2は、本発明の他の実施形態による長手方向に変位される横断電極デバイス構成を示す模式図である。

【図3】図3は、本発明の他の実施形態による長手方向に変位される連続横断ナノスケール電極デバイス構成を示す模式図である。

【図4】図4は、本発明の実施形態による、ナノチャネルの同じ側部に配置された電極を有する、長手方向に変位されるナノスケール電極デバイス構成を示す模式図である。

40

【図5】図5は、DNA分子の模式図である。

【図6】図6は、RNA分子の模式図である。

【図7】図7は、ハイブリダイズオリゴヌクレオチド(またはプローブ)の模式図である。

【図8】図8は、プローブとハイブリダイズした単鎖DNA分子の模式図である。

【図9】図9は、本発明の実施形態に従って決定された、例証的な電圧シグナルのグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0036】

詳細な説明

50

流体チャネルおよび感知電極の加工

本発明の実施形態は、ハイブリダイゼーションによる配列分析（「SBH」）を実行するためのデバイスおよび方法を含む。図1を参照すると、一実施形態では、デバイス100は、流体チャネル105、たとえばマイクロまたはナノチャネルを含む。起電電極対110、110'は、流体チャネル105に沿って電位を印加するために、流体チャネルの第1および第2の端部に配置される。感知電極対115A、115Bは、流体チャネルの長さに沿って2つの別個の位置に配置される。感知電極は、感知電極によって感知される電圧を測定する測定ツール120と電気的に連通していてもよい。流体チャネル105は、シリコン、二酸化ケイ素、石英ガラス、またはヒ化ガリウムを含む基板中に画定されていてもよく、電解質溶液を含有していてもよい。¹⁰ 起電電極対110、110'は、流体チャネル105を通して、分析物125を駆動するように一定または変動電流を提供するために、電解質溶液と接触している、少なくとも1つのアノード110'およびカソード110'を含んでいてもよい。代替の実施形態では、正圧などのような圧力差が、流体チャネル105を通して、分析物125を駆動するために使用され得る。圧力は、流体ポンプまたは加圧ガス管を用いて供給され得る。圧力を加えるための他の方法が、当業者によって考えられてもよい。いくつかの実施形態では、化学ポテンシャル勾配が、流体チャネル105を通じて分子が移動するために使用され得る。分析物はまた、化学ポテンシャル勾配を使用することによって移動してもよい。化学ポテンシャル勾配は、濃度勾配を用いて作られてもよい。たとえば、流体チャネルは、チャネルの他方の端部の流体よりも高い塩濃度を有する流体中に浸された一方の端部を有していてもよい。流体チャネルの端部の塩濃度の差は、チャネルを通して分析物を駆動することができる浸透圧を引き起こす。²⁰

【0037】

ポリペプチド、DNA、またはRNAを含むが、これらに限定されない任意の生体高分子であってもよい分析物125が流体チャネル105を通過する時、それは感知電極対115A、115B（それぞれ、個々に、「A」と「B」と本明細書において称される）の間を通過することになる。流体チャネル105と接触している感知電極115A、115Bを使用して、それらの間の電解質の体積のコンダクタンスの変化を測定することができる。感知電極115A、115Bの間のコンダクタンスの変化は、測定ツール120、たとえば電圧計を使用して測定され得る。

【0038】

³⁰ 感知電極115A、115Bの間の長手方向の距離、たとえば流体チャネル105の長さを小さくすることによって、デバイス100は、それを通過する分析物125に対して高感度を保持する。対のそれぞれの感知電極115A、115Bは、図1におけるように、流体チャネル105の対向する側部に配置されてもよく、感知電極115A、115Bの先端は、電解質溶液に接触しており、全体的にもしくは部分的に、互いの向かい側にあるまたは図2におけるように、感知電極115A、115Bの先端は、互いの向かい側にないが、選択される距離分、互いに、やや長手方向に変位されている。あるいは、対のそれぞれの感知電極115A、115Bは、図3において示されるように、流体チャネル105と交差してもよい。図4を参照すると、第3の配置において、対の2つの感知電極115A、115Bは、流体チャネル105の同じ側部にあってもよい。⁴⁰

【0039】

本明細書において記載されたデバイス100は、ナノスケールの寸法を有する流体チャネル105を画定するための溝の加工およびナノスケール電極の加工によって形成され得る。典型的なデバイス100はまた、緩衝液および試料の導入のためのマイクロスケール流体構造を有していてもよい。したがって、ナノチャネルを用いる、本明細書において記載された技術はまた、マイクロチャネルを含むデバイスにも適用可能である。構造のいくつかまたはすべてはまた、閉鎖チャネルを提供するためにキャップを用いて密閉され得る。

【0040】

流体チャネルは、たとえばリソグラフィーおよびエッチングことによって基板中に形成

され得る。基板は、たとえば、たとえば(100)Si表面、Siウェハ、または石英ガラス基板を有するシリコン-オン-インシユレーターウエハであってもよい。100ナノメートル(nm)未満の体制におけるリソグラフィーは、以下を含む様々な技術によって実行され得る：電子ビームリソグラフィー(EBL)、ナノインプリントリソグラフィー(NIL)、または深紫外線光リソグラフィー(DUVOL)。Liang, X.; Morton, K.J.; Austin, R.H.; Chou, S.Y.、Single sub-20 nm wide, centimeter-long nano fluidic channel fabricated by novel nano imprint mold fabrication and direct imprinting、Nano Lett. 2007年、7巻、3774~3780頁；Austin, M.D.; Ge, H.; Wu, W.; Li, M.; Yu, Z.; Wasserman, D.; Lyon, S.A.; Chou, S.Y.、Fabrication of 5 nm line width and 14 nm pitch features by nanoimprint lithography、Appl. Phys. Lett. 2004年、84巻、5299~5301頁；およびGuo, J.、Recent progress in nanoimprint technology and its applications、J. Phys. D: Appl. Phys. 2004年、37巻、R123~R141頁を参照されたい。これらの参考文献のそれぞれは、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。
マイクロおよびナノ加工における現在の業界標準は、その低コストおよび高生産性により光リソグラフィーである。現在、光リソグラフィーは、32nmもの小さな限界寸法を有するデバイスの大量生産において使用され、成功してきた。EBLおよびNILは、10nm未満のフィーチャを再現性よくもたらすそれらの多用性および性能により、学問的研究環境において現在、広範囲に使用されている。これらの方法のいずれも、本明細書において記載された流体溝をパターン化するために使用され得る。

【0041】

流体溝の形成ための材料の除去は、たとえばエッティングによって実行され得る。ウェットエッティングは、選択的な除去が可能な溶液中への材料の液浸を含む。ドライエッティング、つまり反応性イオンエッティング(RIE)は、荷電プラズマへの試料の曝露を含む。ナノスケール加工に必要とされる解像度および制御のためには、その整合性、制御性、および効率により、RIEが好ましい。マイクロ流体チャネルまたはナノスケールチャネルに至るマイクロリザーバーは、ウェットまたはドライ法のいずれを使用してエッティングしてもよい。

【0042】

結果として生じるチャネルは、1nm~5μm、より好ましくは1nm~1μm、より好ましくは10nm~100nmの範囲の幅および深さの好ましい寸法を有する。チャネルは、たとえば1マイクロメートル(μm)~10センチメートル(cm)の範囲から選択される長さを有していてもよい。

【0043】

チャネルのサイズは、分析物の持続長に関して選ばれてもよい。たとえば、ランダムコイルポリマー(たとえばDNA)は、制限されるスペースがより小さくなる場合、伸びの範囲がより大きくなるように、制限されるスペースの中に導入される場合、伸ばされ得る。いくつかの実施形態では、長さまたはプローブの間の距離を測定するために分析物を伸ばすことは好ましいことがある。横断面のサイズおよび持続長に依存して、チャネルの幅および深さの幾何平均を分析物の持続長の5%および500%の間にすることは有用であり得る。たとえば、二重鎖DNAについて、持続長が50nmである条件下で、たとえば、2.5nmおよび250nmの間の幅および深さを有する流体チャネルを有することは好ましいことがある。他の実施形態では、RecAコートDNAなどのようなより剛性のポリマーについて、持続長が950nmである条件下で、たとえば、45nm~4.75μmの幅および深さを有する流体チャネルを有することは好ましいことがある。

【0044】

チャネルが形成された後、感知電極が加工される。エッティングおよびリソグラフィーと同様に、感知電極の加工に適した多数の金属付着技術は、従来のマイクロ加工プロセスフローにおいて存在する。それぞれの技術は、正負の属性およびその技術を使用して付着され得る材料のリストを有する。3つの主要な技術は、電子ビーム蒸着、熱蒸着、およびスパッタリングである。感知電極は、感知電極が流体チャネルと交わるポイントで、5 nm ~ 100 nmの範囲の厚さを有する。感知電極は、流体チャネルに対して遠位にあり、デバイスの周囲に配置される接触パッドに接近している領域において、より広くおよび／またはより厚くてもよい。

【0045】

デバイスを完成するために、キャップ層が、流体チャネルから液体の蒸発を予防するために導入され得る。キャップは、ナノスケール流体経路の上のみにまたは流体チャネルのすべての上に形成され得る。後者の場合では、キャップ構造は、好ましくは、流体経路の中への流体および試料の導入を可能にするための穴またはポートを有する。他の実施形態では、全基板、つまりウエハが、キャップされ得る。キャップは、ホウケイ酸ガラス、リンケイ酸ガラス、石英、石英ガラス、溶融石英、シリコンウエハ、または他の適した基板などのようなガラスプレートから作製され得る。このアノード接合を含むことを達成するのに様々な技術が適している。アノード接合では、下層にあるシリコンウエハおよびガラス基板は、大きな電場が接合部にわたって印加されながら、共に、加圧され、加熱される。アノード接合は、シリコンウエハおよびキャップ基板の間で強力な接合を形成することが実証された。直接的なシリコン接合は、2つのシリコンウエハを連結するために使用されてきた。後者的方法は、水中で2つのウエハを共に加圧することを含む。他の方法は、基板にキャップを接合するために、フォトレジストなどの接着層を使用する。

【0046】

提唱される感知素子を画定するための例証的な加工プロセスは、以下のとおりである。従来の(100)p型シリコンウエハなどの適した基板は、厚い(たとえば>1 μm)二酸化ケイ素(SiO₂)層を成長させるために、熱により含水大気中で酸化される。このSiO₂層は、続いて形成される隣接する金属感知電極の間の絶縁体として果たしてもよく、また、全体的なデバイス電気容量を低下させてもよい。

【0047】

流体チャネルのパターンは、従来の高解像度光リソグラフィーを使用して、第1のフォトレジストマスク層に対して転写され得る。C_l₂などの異方性エッティング種を用いるRIEを用いて、SiO₂層の中にパターンを転写することができる。チャネルの好ましい幅および深さは、デバイス感度に対する必要条件によって決定され得る。2つの感知電極の間のチャネルの体積が小さいほど、デバイスは、より感受性となる。チャネルのサイズ、幅、および深さはまた、分析物のサイズまたは挙動によって決定され得る。一実施形態では、本明細書において記載されたデバイスを用いて、DNAの鎖を検出することができる。チャネル内でDNA鎖を拡張する寸法を有するチャネルを加工することは望ましいことがある。たとえば、二重鎖DNAについて、100 nm以下の寸法を有するチャネルの使用により、生体高分子を拡張することができることが分かった。その全体が参照によって本明細書に組み込まれるTegenfeldt, J.Oら The dynamics of genomic-length DNA molecules in 100-nm channels. Proc. Nat. Acad. Sci. U S A、2004年、101巻、10979~10983頁を参照されたい。ドライエッティング手順の完了に際して、残りのレジストは、除去され、基板は、しっかりと浄化される。

【0048】

流体チャネルのエッティングに続いて、埋設された金属感知電極は、加工される。従来の高解像度光リソグラフィーは、第2のフォトレジストマスク層に金属電極パターンを転写するために使用され得る。C_l₂などの異方性エッティング種を用いるRIEは、S

10

20

30

40

50

iO_2 層の中にパターンを転写するために使用されることになる。好ましくは、これらの溝の深さは、流体チャネルの深さを超えるまたはそれに等しい。 SiO_2 層へのパターン転写の完了に際して、薄い金属接着促進層は、付着され得る。適した層は、電子ビーム蒸着を介して付着される、30~50 の厚さを有するタンタルである。次に、感知電極材料は、大気に基板を曝露することなく付着される。大半の感知電極に好ましい金属は、これもまた電子ビーム蒸着を介して付着される白金である。適した金属の他の例は、金、クロム、チタン、塩化銀、銀、およびグラフェンを含む。金属の厚さは、結果として生じた金属トレースが SiO_2 層の上面とほぼ平面となるように、エッチングされた溝の深さによって必然的に決められる。金属付着の完了に際して、基板は、表面から過剰な金属をとるフォトレジスト溶媒中に浸され、基板は、しっかりと浄化される。化学機械研磨 (CMP) を実行して、 SiO_2 上面にわたり、広がる過剰な金属を除去し、それによって、 SiO_2 上面と平らになるように金属の上面を平坦化してもよい。

【0049】

センサーの加工を完成するために、漏れがないシールを提供し、流体の伝導を可能にするために、キャップ層は、好ましくは、センサー表面に接着される。好ましいキャップ材は、ホウケイ酸ガラス、石英ガラス、溶融石英、石英、またはリンケイ酸ガラスを含む。流体の入口、流体の出口、および金属感知電極へのアクセスを提供するために、穴はキャップ層中に作ってもよい。ガラスウエハ中に穴を作製するための典型的な方法は、ガラス基板への高度に制御可能なパターン転写を可能にする超音波エッチングである。次いで、アノード接合を使用して、下層にある基板、たとえばシリコンウエハにガラスキャップ層を接合してもよい。2層のアノード接合は、強力で漏れがないシールを提供する。

【0050】

1対のそのようなナノスケール感知電極 115A、115B を有する例証的なデバイスは、図1において示される、つまり電極 A、B である。電流は、流体チャネル 105、たとえばナノチャネル内に閉じ込められた電解質溶液中でイオンフローの形態で移動する。電解質の役割は、流体チャネル内で一様に分布した電場を維持することである。典型的な電解質溶液は、DNA 分子の分離に対する電気泳動の適用において記載されている。DNA の電気泳動分離のための最も一般的な電解質は、トリスホウ酸 EDTA (TBE) およびトリス酢酸 EDTA (TAE) である。たとえば Sambrook, J.; Russel, D., W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版 Cold Spring Harbor Press, 2001 年を参照されたい。しかしながら、任意の伝導性の媒体が使用され得る。

【0051】

デバイスの操作

操作の間に、一定電流は、電解質溶液と接触しており、流体チャネル 105 の対向する端部に配置された 1 対の巨視的電極、たとえば起電電極 110、110' に電位を印加することによって供給される。起電電極は、好ましくは、図1~4において示される流体チャネル 105 の端部に至るワイヤーと電気的に連通している。電位は、分析物 125 が、流体チャネル 105 の第1の端部から流体チャネルの第2の端部に移動するように、電気泳動力をその中に生成するために、流体チャネル 105 に沿って印加され得る。起電電極は、その中に配置された分析物 125 の移動のために、流体チャネル 105 中に一定または振動電気泳動力を生成してもよい。起電電極の間の電圧は、一定であってもよいまたはそれは、測定の経過にわたり変化してもよい。たとえば、感知電極の間の体積の DNA 分子の通過を遅くするために、一度、DNA 分子が流体チャネル 105 に入った後かつ DNA 分子が感知電極の間の体積に入る前に、電圧を低下させることは望ましいことがある。感知電極 115A、115B の間の体積の DNA 分子の通過の速度を制御することにより、DNA のより多用性の検出を可能にする。

【0052】

感知電極の配置の例として、20 nm の幅が、図1における感知電極 A および B のそれについてとられてもよい。電極 A は、電極 B と比較して、たとえば 10 nm または 3

0 nm、流体チャネル 105 に沿ってシフトされ得る。30 nm ~ 100 nm、または30 nm ~ 500 nm、または30 nm ~ 5 μm の感知電極の間の距離を、単一のデバイスの中に組み込むことができる。十分な長さの分析物について、たとえば500 μmまでの距離が使用されてもよく、たとえば、300 μm、200 μm、または100 μmまでが使用され得る。その間に任意の距離を有する電極が、加工され得るが、DNA は、500 μm を超える長さで得るのが困難であるので、DNA の長さが500 μm を超えない限り、500 μm を超えるあらゆる電極距離は、不必要となりうる。電極 A および B の間のより小さな変位は、たとえ、それらが互いに変位されても、電極の重複がある、実施形態の例である。いくつかの実施形態では、図 2 において示されるように、感知電極 115A、115B の間に重複がなくてもよい。

10

【0053】

感知電極 115A、115B を横切る電圧は、感知電極 115A、115B の間の流体チャネル 105 における局所的なインピーダンスに比例する。電極の間隔は、いくつかの因子によって決定される。他のすべての因子は一定で、感知対における電極の間の距離が小さいほど、感知対によって検出することができる粒子は小さくなる。しかしながら、加工限界により、小さな距離で対の電極を一貫して置くことを困難にする場合がある。したがって、選択される距離は、デバイス 100 の加工再現性および感度の間の兼ね合いとなる。分離距離、したがって電極が重複しているかまたは重複していないかの選択肢は、これらの制約に依存する。

【0054】

結果として生じる感知電極 115A、115B の配置により、電流プローブおよび電圧プローブを分離するための手段が提供され、流体チャネルにおいて 4 ポイント感知を用いるために使用することができる。一実施形態では、巨視的な起電電極 110 および 110' は、流体チャネル 105 の端部で電流を提供し、一方、流体チャネル 105 を横切って配置されるナノスケール感知電極 115A、115B は、電圧を測定するために使用される。電圧電極は、好ましくは、測定されている体積のインピーダンスよりも高い出力インピーダンスを有する。

20

【0055】

以下の計算は、このデバイス構想の実現性を実証する。流体チャネルは、チャネルの長さによって割った、チャネルの長さに沿った電位差異に等しい一定の電場にかけられてもよい、つまり、10 μm 長の流体チャネルに長手方向に印加される 100 mV は、 $100 \text{ mV} / 10 \mu\text{m} = 10 \text{ mV} / \mu\text{m}$ すなわち 0.01 mV / nm の場をもたらす。10 nm 分離した電極 A、B の間の電位差異は、次いで、電極の間の距離および電場の積となる、すなわち、

$$10 \text{ nm} \times 0.01 \text{ mV} / \text{nm} = 0.1 \text{ mV} \text{ となる。}$$

30

【0056】

同様に、間隔が 30 nm である場合、0.3 mV の電位差異は、電極 A および B の間に存在する。これらの電位のそれぞれは、従来の電子的測定ツールを用いて容易に検出可能である。DNA 分子または任意の他の分析物が感知電極対の間を通過する場合、感知電極の間のインピーダンスは、電解質および分子の間の比抵抗差異により変化する。一定電流を維持しながら、電位の結果として生じる一時的な変化が測定される。

40

【0057】

たとえば、図 1 において示されるように、実質的に一定の速度を仮定すると、感知電極 115A、115B によって検出される、それぞれの電圧パルスの持続時間は、2つの感知電極の間を通過する DNA または他の分析物 125 の長さに比例する。流体チャネルにおける分析物 125 の速度を決定した後、測定されたパルスの持続時間を使用して、分析物 125 が感知電極の間の体積を通過しながら移動した距離（速度 × 時間 = 距離）を計算することができ、これは、分析物 125 の長さに等しくなる。

【0058】

10 ~ 50 nm の距離分、流体チャネル 105 に沿って横断電極の一方をシフトするこ

50

とによっておよび約10nmの直径を有する流体チャネル105を使用することによって、2つの感知電極115A、115Bを分離する体積が、従来のソリッドステートナノポアの感度に等価な感度を有するとみなしてもよいことに留意することは重要である。

【0059】

使用において、感知電極対115A、115Bの間の電圧、たとえばV_{A B}は、感知電極115A、115B対の間の電位差異を測定するように構成された測定ツール120、たとえば電圧計によって感知され得る。好ましい実施形態では、電圧計120は、感知電極に至るナノワイヤーに接続された金属接触パッドを介して、対の感知電極115A、115Bのそれぞれと電気的に連通していてもよい。

【0060】

一般に、分析物125は、流体チャネル105において以下のように検出され得る。分析物、たとえば生体高分子鎖およびプローブは、電解質溶液中で、チャンバーから流体チャネルの中に移動する。典型的に、電解質は、ピペット、シリング、またはポンプによって流体チャネルに添加され得る。デバイスが単一分子の検出を可能にするので、分析物試料サイズは、実用的に可能な限り小さくてもよい。流体は、毛管作用によって流体チャネルを湿らせててもよい。分析物は、最初の電解質と共にまたは後に、新しい溶液にポンプに入れることによってマイクロスケールのエリアの中に導入され得る。1つまたは複数のプローブにハイブリダイズされ得るDNAなどのような分析物は電位によって流体工学チャネルに引き込まれてもよい。小さい分析物については、拡散、流体フロー、または電位を使用することができる。

10

【0061】

流体チャネルは、分析物とほぼ同じ幅よりも小さくない幅を有してもよく、分析物に結合した大きな分子が流体チャネルを通過することが可能なように、十分に大きくてよい。たとえば、流体チャネルの幅は、1nm～200nmの範囲から選択され得る。流体チャネルは、分析物に結合した大きな分子が通過することができるように十分に深くてもよく、分析物とほぼ同じサイズとなるように十分に浅くてもよい。流体チャネルの深さは、たとえば、1nm～200nmの範囲から選択され得る。流体チャネルの長さは、全分析物が流体チャネル内に含有されるように、選択され得る。

20

【0062】

一実施形態では、感知電極および流体チャネルは、好ましくは、全分析物が感知電極の間の体積に入る前に流体チャネルに入るよう配置され得る。この構成は、流体チャネルのコンダクタンスに対する分析物の影響を低下させる利点を提供する。たとえば、感知電極の間の体積の電位の変化を測定し始めている一方で、流体チャネル全体のコンダクタンスが、流体チャネルに入る分析物の増加により変動している場合、その分析は、より複雑になる。好ましい実施形態では、分析物は、それが感知電極の間の体積を出る時、完全にチャネル内に含有され得る。したがって、流体チャネルの長さは、好ましくは、分析物の長さの約3倍の最小の長さを有する（感知電極の間の体積が分析物の長さしかないと仮定すると、これは、最小限の必要条件であるが、最適ではない）。1kb片のDNAの長さは約330nmであり、したがって、流体チャネルの長さは、好ましくは、少なくとも1μmの長さである。記載された方法を用いる分析に適したDNAの最長の片は、10メガベース(Mb)であってもよく、これは、少なくとも10mmの好ましい流体チャネルに対応する。より好ましくは、流体チャネルの長さは、分析物の長さの10倍であり、したがって、チャネル長さについてのより好ましい上限は、100mm(10cm)である。したがって、流体チャネルの長さは、好ましくは、1μm～10cmの範囲から選択される。より長いおよびより短い流体チャネルの長さもまた、可能である。

30

40

【0063】

いくつかの実施形態では、流体チャネルの構造は、チャネルの中に分析物が入るのを促進してもよい、たとえば、流体チャネルは、一連の柱（たとえば、その全体が参照によって組み込まれる米国特許第7,217,562号）および／またはじょうご形を含んでいてもよい。

50

【 0 0 6 4 】

分析物は、流体チャネルの対向する端部に配置され、電解質溶液に接触している、2つの起電電極に電位を印加することによって供給される電流によって流体チャネルを通って移動する。起電電極は、その中に配置された分析物の移動のために、流体チャネル内に一定または振動電気泳動力を生成してもよい。巨視的電極の間の電圧は、一定であってもよいまたはそれは、測定の経過にわたり変化してもよい。たとえば、感知電極の間の体積のDNA分子の通過を遅くするために、一度、DNA分子が流体チャネルに入った後かつDNA分子が感知電極の間の体積に入る前に、電圧を低下させてよい。

【 0 0 6 5 】

感知電極対の間の電位の変化を反映する電圧シグナルをモニターしてもよい。分析物が感知電極の間の体積を通って移動する時、電圧シグナルは、変化する。シグナルは、分析物、たとえばプローブ - 標的複合体の長さまたはプローブを有していない介在領域の長さを反映する期間、上昇することも低下することもある。典型的な分析物は、非伝導性であり、電解質におけるイオンのフローを妨げることになる。そのため、電位および電圧シグナルは、分析物が感知電極の間の体積を通って流れる時、典型的に増加する。いくつかの実施形態、たとえば低塩電解質および電荷を運搬する分析物では、電位および電圧シグナルは、分析物が感知電極の間の体積を通って流れる時、減少し得る。電圧シグナルは、ハイブリダイズしたプローブを含有する分析物の一部が感知電極の間の体積を通って移動する場合、さらに変化する。

【 0 0 6 6 】**分析物の長さおよびプローブ位置の決定**

一実施形態では、生体高分子にハイブリダイズしたプローブの相対的位置および / または生体高分子の長さを検出するための方法。ナノポアは、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許公開第2007/0190542 A1号において記載されるように、ハイブリダイゼーション部位の間の距離を決定するための検出器として使用され得る。電圧検出器を組み込むナノチャネルデバイスの構築は、本明細書において記載されている。ナノポアおよび流体チャネル（たとえばナノチャネル）の両方において、標的生体高分子上のハイブリダイゼーション部位の間の距離は、生体高分子がナノポアまたは流体チャネルを通って移動する時に、第1のハイブリダイゼーション位置および続くハイブリダイゼーション位置の検出の間の時間から推測され得る。本明細書において開示された技術は、生体高分子の長さおよびハイブリダイゼーション位置の間の距離の決定を可能にする。

【 0 0 6 7 】

特に、本明細書において使用されるように、「プローブ」は、標的分子に配列特異的に共有結合もしくは非共有結合することができる任意の分子または分子の集合体を意味する。プローブは、DNA配列、RNA配列、抗体、または抗体断片であってもよいが、これらに限定されない。用語「ヌクレオチド」および「塩基」は、区別なく使用され、DNAまたはRNAのポリヌクレオチド鎖またはストランドを構成することができるリン酸基、糖、および5つの窒素含有塩基のうちの1つから成る分子を意味する。DNAについては、窒素含有塩基は、シトシン(C)、アデニン(A)、グアニン(G)、およびチミン(T)を含み、糖は、2-デオキシリボースである。RNAについては、デオキシリボース糖は、デオキシリボースの代わりにリボース糖と交換され、チミン塩基(T)の代わりにウラシル塩基(U)と交換される。

【 0 0 6 8 】

DNAプローブ「ライブラリー」は、多数のまたは恐らくすべての可能な配列の並べ換えを含む固定長のDNAプローブの収集物である。複数のプローブは、同じ配列選択性を有する、同じプローブの複数のコピーから構成され得るまたは異なる配列選択性を有する2つ以上のプローブから構成され得る。「プローブマップ」は、プローブが優先的に結合する標的配列に沿った部位に関する情報を含有するデータセットを意味する。部分的にハイブリダイズした生体分子は、配列選択性のプローブの全長が標的生体分子の長さの一部

10

20

30

40

50

に結合する場合に作られる。データセットは、公知の配列を参照する絶対的な位置情報、結合部位の間の距離に関する相対的な情報、またはその両方を含んでいてもよい。データセットは、コンピューター媒体中に保存され得る。プローブの特徴およびスペクトルマップのさらなる詳細については、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許公開第2009-0099786 A1号において見つけられ得る。

【0069】

「標的」、つまり分析物は、長さ、同一性、または配列情報が本発明の実施形態を使用して決定されることとなる生体高分子である。分析物は、デオキシリボ核酸、リボ核酸、タンパク質、またはポリペプチドなどのような生体高分子であってもよい。標的DNAは、単鎖または二重鎖であってもよく、いくつかの実施形態では、分析物は、プローブがハイブリダイズした生体高分子である。10

【0070】

DNAは、生命過程において必要とされるゲノム情報をすべて含有している基本的な分子である。RNA分子は、転写と呼ばれるプロセスにおいてDNA鎖の相補的なコピーとして形成される。次いで、タンパク質は、翻訳と呼ばれるプロセスにおいてRNAパターンに基づいてアミノ酸から形成される。これらの分子のそれぞれにおいて見つけることができる一般的な関係は、それらがすべて、結果として生じる生体高分子が最終的に果たすことになる最終的な目的に基づいて様々な配列で共につなぎ合わせられる、塩基またはアミノ酸などの小さなグループの構成要素を使用して構築されていることである。20

【0071】

たとえば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許公開第2007/0190542号において開示されるように、分析物を調製して分析できる。図5を参照すると、DNA分子500は、模式的に表され、互いに逆平行の関係で位置する2つの鎖505、510で構築されることが分かる。2つの対向する鎖505、510のそれぞれは、ヌクレオチド515の繰り返しのグループから順次形成され、それぞれのヌクレオチド515は、リン酸基、2-デオキシリボース糖、および4つの窒素含有塩基のうちの1つから成る。窒素含有塩基は、シトシン(C)、アデニン(A)、グアニン(G)、およびチミン(T)を含む。DNA鎖505は、いわゆる5'または「5プライム」末端からいわゆる3'または「3プライム」末端に特定の方向で読まれる。同様に、RNA分子600は、図6において模式的に表されるように、デオキシリボースの代わりにリボース糖を有し、チミン塩基(T)の代わりにウラシル塩基(U)を有することによって、DNA500のものとは異なるポリヌクレオチド鎖である。30

【0072】

従来より、これらの有機分子における塩基515の特定の配置およびそれによって分子の配列を決定する際に、ハイブリダイゼーションと呼ばれるプロセスが利用される。ハイブリダイゼーションプロセスは、2つの遺伝子配列が互いに一体となるまたは結合することである。分子中の塩基515が互いに等しい親和性を共有しないので、このプロセスは、予測可能なプロセスである。T(またはU)塩基は、A塩基と結合する傾向があるが、C塩基は、G塩基と結合する傾向がある。この結合は、対向する塩基対の間に存在する水素結合によって媒介される。たとえば、A塩基およびT(またはU)塩基の間に、2つの水素結合があるが、C塩基およびG塩基の間に、3つの水素結合がある。40

【0073】

次いで、興味のある分子中のこれらの塩基515の配列を決定し、同定するために使用される主要なツールは、一般にプローブ700と呼ばれるハイブリダイズオリゴヌクレオチドである。図7が示すように、DNAプローブ700は、公知の長さおよび配列組成を有するDNA配列である。プローブ700は、それらが含む塩基515の数に依存して任意の長さであってもよい。たとえば、6つの塩基515を含むプローブ700は、6merと称され、プローブ700中の6つの塩基515のそれぞれは、公知の4つの天然塩基タイプA、T(U)、C、またはGのいずれか1つであってもよく、あるいは、非天然塩基を含んでいてもよい。この点では、ライブラリーのプローブ700の総数は、それぞれ50

のプローブ 700 内に含有される塩基 515 の数に依存し、式 4^n (4 の n 乗) によって決定され、式中 n は、それぞれのプローブ 700 中の塩基 515 の総数に等しい。したがって、プローブライブラリーのサイズについての一般的な表現は、 $4^n n - m e r$ プローブ 700 と表現される。例示の目的のために、6mer プローブとの関連において、可能な固有の同定可能なプローブの組合せの総数は、 4^6 (4 の 6 乗) または 4096 の固有の 6mer プローブ 700 を含む。非天然塩基の包含が、プローブ認識のライブラリーの範囲の多用性を増やす形で、スペースまたはワイルドカードをその中に有するプローブの生成を可能にすることがさらに留意されたい。天然塩基を有するパターンに編成された普遍的な塩基を含むプローブ、たとえば、それぞれ、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第 7,071,324 号、第 7,034,143 号、および第 6,689,563 号において記載されたものもまた、使用され得る。10

【0074】

単鎖 DNA などの標的生体分子が適切な状態下で配列選択的プローブとインキュベートされる場合、プローブは、特異的な部位で生体分子にハイブリダイズするまたはそれに結合する。ハイブリダイゼーション部位の相対的位置の決定は、標的生体分子のマップを構築するのにおよび標的分子を同定するのに有用である。

【0075】

分析されることとなる生体高分子が二重鎖 DNA 500 である場合、図 8 において表されるプローブ 700 を使用するハイブリダイゼーションのプロセスは、生体高分子鎖が変性と称されるプロセスにおいて調製されることを最初に必要とする。変性は、熱または化学薬品の適用を通して通常、達成されるプロセスであり、このプロセスにおいて本来の二重鎖 DNA の 2 つの鎖の間の水素結合は、壊れており、塩基が水素結合に利用可能な DNA の单鎖を残す。生体高分子 800 が変性した後、单鎖プローブ 700 は、プローブ 700 中に見つけられる配列に相補的である塩基配列を有する、生体高分子 800 の部分を位置づけるために、生体高分子 800 に導入される。プローブ 700 と生体高分子 800 をハイブリダイズさせるために、変性生体高分子 800 および公知の配列を有する複数のプローブ 700 は、共に、溶液に導入される。溶液は、好ましくはイオン溶液であり、より好ましくは、塩含有溶液である。混合物は、プローブ 700 が、生体高分子 800 鎖に、一致する相補的配列を有するその部分に沿って結合するのを促進するために攪拌される。一度、生体高分子鎖 800 およびプローブ 700 がハイブリダイズしたら、鎖 800 は、配列決定装置のチャンバーの 1 つに導入される。チャンバーに生体高分子鎖 800 を置く前にハイブリダイゼーションが達成されていてもよいが、ハイブリダイゼーションがこれらのチャンバーの 1 つにおいて同様に実行され得ることもまた可能であることもまた、当業者に十分に理解されるべきである。この場合、変性生体高分子がシス (cis) のチャンバーに添加された後、公知の配列を有するプローブ 700 を含有する少量の緩衝液もまたシスのチャンバーに添加され、ハイブリダイズ生体高分子が移動する前に、生体高分子 800 とハイブリダイズすることを可能にする。20

【0076】

分析物調製の特定の例として、DNA または RNA などのヌクレオチド試料は、50 mM 塩化カリウムおよび 10 mM Tris - HCl (pH 8.3) の緩衝液中で、プローブの選択の存在下において、典型的に、DNA については 90 °C を超える変性温度および典型的に、RNA については 60 ~ 70 °C の変性温度まで加熱され得る。ハイブリダイゼーションは、シスのチャンバー中でまたはチャンバー中に分析物を置く前に達成され得る。次いで、ヌクレオチド鎖およびプローブの混合物は、プローブの長さおよび組成に依存する温度でプライマー結合を可能にするように冷却される。たとえば、6'-ヌクレオチドプローブは、室温以下に冷却されることになる。ヌクレオチド鎖およびプローブは、分析のために流体チャネルを通過する前に、5 分までの間、低温でアニールさせ得る。正確な温度は、不必要的実験を伴わないで当業者によって容易に決定され得る。30

【0077】

図 1 を参照すると、いくつかの実施形態では、感知電極 115A、115B の間の体積40

に対応する電気的シグナルは、分析物 125、たとえば生体高分子が流体チャネル内に配置される時、感知電極 115A、115B によって検出される。生体高分子が感知電極の間の体積に入る時、電気的シグナルの変化が記録される。図 10 を参照すると、分析物が感知電極の間の体積に入る時、電気的シグナルは、時点 T₁ で直線的に増加する。感知電極の間の体積が完全に埋められる場合、シグナルは本質的に一定のままである。分析物が感知電極の間の体積を出るとき、シグナルは、時点 T₄ でベースラインに戻る。感知電極は、感知電極の間の体積に対応する電気的シグナルを取り込むために、測定ツール、たとえば電圧計へ接続するように構成される。測定ツールによって取り込まれた電気的シグナルは、データ収集デバイスたとえば Stanford Research Instruments SIM970 電圧計によって、時間の関数として記録され得る。電圧シグナル変化の間の時間間隔が、記録され得る。ベースラインを超える電圧シグナルの変化の持続時間は、分析物の存在を示してもよい。時点 T₂ および T₃ の間の、図 9 において示される、それを超える他の増加は、分析物とハイブリダイズしたプローブの存在を示してもよい。電気的シグナルは、ノイズ由来のおよび DNA などのような長い分析物が典型的にその中に小さい屈曲を有するという事実から変動を有してもよい。屈曲を有する部分が感知電極の間の体積に入る場合、電気的シグナルはわずかに増加してもよく、次いで、屈曲が感知電極の間の体積を出る場合、わずかに減少してもよい。電気的シグナルの較正は、そのため、長さを決定するために必要であってもよい。分析物の長さを決定するために、それぞれの生体高分子の長さのパルス持続時間および速度を決定するために、1つまたは複数の標準物質、たとえば公知の様々な長さの生体高分子を用いて系を較正してもよい。
不变の電圧および電解質の条件下で、このデータを使用して、分析物のパルス持続時間をその長さと関連づけるための標準曲線を作ることができる。

【0078】

同様に、電圧シグナルの変化の持続時間を使用して、第 1 の複数のプローブのハイブリダイゼーションの位置および生体高分子上の 2 つのプローブの間の距離を決定することができる。流体チャネルの感知電極の間の体積に対応する、検出される電気的シグナルは、感知電極の使用によって検出され得る。図 9 において示されるように、時点 T₁ で、電気的シグナルは、生体高分子が感知電極の間の体積を通って移動する場合、最初に変化し、ハイブリダイズしたプローブを含む生体高分子の一部が感知電極の間の体積を通って移動する場合、T₂ でさらに変化してもよい。検出された電気的シグナルは、生体高分子に沿ってハイブリダイズしたプローブの位置を示してもよい。電気的シグナルの変化および変化の持続時間は、生体高分子の長さに沿った、公知の配列特異性を有するプローブの位置を決定するために分析され得る。スパイクの持続時間が生体高分子の長さを決定するために使用されるのと同様に、プローブの間の距離は、ハイブリダイズしたプローブを示す、電圧スパイクの間の持続時間に基づくものであってもよい。たとえば、ハイブリダイズしたプローブの間の距離を決定する場合、電圧シグナルの平均値を考慮に入れてもよい。異常値が、同じ分子について得られる他の測定値を大幅に逸脱する場合、それらは、除外され得る。この分析は、視覚的にまたは本明細書において記載された分析を実行するコンピュータープログラムの支援で行われてもよい。

【0079】

プローブの間の距離の計算を使用して、以下のように生体高分子の配列を決定することができる。分析物は、部分的にハイブリダイズした生体分子を産生するために生体分子の部分に第 1 の複数のプローブが結合するように、生体高分子と、公知の配列を有する第 1 の複数のプローブをハイブリダイズさせることによって調製され得る。分析物は、流体チャネル内に配置され得る。電位は、分析物が、流体チャネルの一方の端部から流体チャネルの他方の端部に移動するように、電気泳動力をその中に生成するために、流体チャネルに沿って印加され得る。電圧の変化を使用して、上記に記載されたように、ハイブリダイズしたプローブを検出する。

【0080】

生体高分子の配列の少なくとも一部は、第 1 の複数のプローブのハイブリダイゼショ

10

20

30

40

50

ンを検出することによって決定され得る。生体高分子上のその位置は、生体高分子の末端からハイブリダイゼーションのプローブの部位までの距離またはハイブリダイゼーションのプローブ部位からハイブリダイゼーションの他のプローブ部位までの距離を使用することによって決定され得る。コンピューターアルゴリズムを使用して、生体高分子の配列を決定するのを支援するように、電気的シグナルを処理することができる。

【0081】

いくつかの実施形態では、標的分子上の認識部位に対する特異性を有する第2の複数のプローブは、個々の複数のハイブリダイゼーションを形成するために、第1のプローブに続いてまたはそれと平行して、生体高分子とハイブリダイズしてもよく、検出、分析、および決定が、続く複数のプローブを用いて繰り返され得る。

10

【0082】

生体高分子は、二重鎖生体高分子標的分子を含んでいてもよい。標的分子の認識部位に対する第1のプローブ特異性を有する第1のプローブと生体高分子、つまり標的分子を接触させることによって分析物を調製して、第1の複数の局所的な三元複合体を形成することができる。

【0083】

電気的シグナルを使用して生体高分子の複合体化した領域および複合体化していない領域を検出および記録して、第1の複数のプローブの第1のプローブマップおよびそれぞれの続く複数のプローブについての続くプローブマップを作ることができ、第1のプローブマップおよび続くプローブマップは、それぞれ、ハイブリダイズした第1のおよびそれぞれの続く複数のプローブの相対的位置についての情報を含む。それぞれのプローブマップは、プローブの間の距離を示す一連の番号を含んでいてもよい。番号は、塩基対の単位としての距離またはナノメートルの単位としての距離を示してもよい。生体高分子の少なくとも一部についての候補配列は、位置情報ならびに／または重複するプローブ結合配列および位置情報の組合せを使用して、少なくとも2つのプローブ配列を並べることによって決定され得る。

20

【0084】

第1のプローブマップおよび第2のプローブマップは、それぞれのプローブについての位置情報の誤差についての情報を含んでいてもよい。たとえば、それぞれの示される距離は、関連する標準偏差、たとえば $100\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ を有していてもよい。さらに、候補配列は、(i)位置情報および位置情報における誤差に関するパラメーターまたは(ii)プローブ分子の重複配列および位置情報および位置情報における誤差の組合せの少なくとも1つを使用して、少なくとも2つのプローブ配列を並べることによって決定され得る。

30

【0085】

三元複合体を形成するためのプローブのハイブリダイゼーションによる生体高分子の配列決定は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許出願第12/243,451号においてさらに議論されている。検出／配列決定についてのさらなる背景的情報は、それが、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる Gracheva, M. E. ; Xiong, A. ; Aksimentiev, A. ; Schulten, K. ; Timp, G. Leburton, J. - P. Simulation of the electric response of DNA translocation through a semiconductor nanopore-capacitor, Nanotechnology 2006年、17巻、622～633頁；および Zwolak, M. ; Di Ventra, M. Physical approaches to DNA sequencing and detection, Rev. Mod. Phys. 2008年、80巻、141～165頁において見つけられ得る。

40

【0086】

長さの決定の例

50

2つのマイクロ流体チャンバー、2つのマイクロ流体チャンバーを接続する1つまたは複数の流体チャネル、およびそれぞれの流体チャネルの長さに沿って配置された感知電極対から構成される感知デバイスは、イオンの流体が充填される。典型的に、流体は、塩を含有する水であってもよい。

【0087】

未知の長さのDNAの断片の複数のコピーは、感知電極対を含有する流体チャネルに接続されている一方のマイクロ流体チャンバーの中に導入され得る。巨視的電極は、マイクロ流体チャンバーから1つまたは複数の流体チャネルの中にDNA鎖を電気泳動するためには使用される。DNAが流体チャネルに入る時、それは直線状の立体構造をとる。それが直線化される程度は、多くの因子に依存する。いくつかのそれらの因子は、たとえば、DNA鎖の持続長、温度、イオン条件、ならびに流体チャネルの幅および深さである。10

【0088】

起電電極によって印加される電位によって、DNA鎖が流体チャネルの長軸流れ下る。断片が流体チャネルを下方に移動する時、それは、感知電極の間の体積を通過する。DNAの先端が感知電極の間の体積に入る場合、2つの感知電極の間の交差チャネル電流または電位などのようないくつかの電気的な特徴の変化が、記録され得る。記録されたシグナルは、時刻表示および電位または他の電気的な特性の変化の表示から構成される。電気的な特性の値もまた、記録され得る。値は、バックグラウンドシグナルから引き算され得るまたは絶対値であってもよい。表は、感知電極の間の体積において生じるすべての応答およびそれぞれの応答についての時刻表示を列挙するコンピューターによって生成され得る。コンピュータープログラムは、続いて、シグナルの持続時間を決定してもよい。DNA鎖の終端が感知電極の間の体積を出るとき、電気的な応答は、典型的に、DNAが体積に入る前に観察された値に戻る。電気的な応答の大きさは、実験の設定に依存し、好ましくは、電気的な応答は、系についての二乗平均ノイズの大きさの少なくとも3倍に等しい。20

【0089】

較正された標準曲線は、分析物の正確な長さを計算するために測定された長さに適用され得る。たとえば、デバイスは、分析物と同じ条件、たとえばイオン強度、温度、pH下で流体チャネルを通して電気泳動される、公知の長さの一連のDNA断片を用いて較正され得る。断片は、好ましくは、未知の断片の長さを測定するために、実験において使用され得る範囲を包含するのに十分な異なる長さに及ぶ。30

【0090】

DNA配列決定の例

公知または未知の配列の標的DNA鎖は、変性され得る。二重鎖DNAの変性は、熱または化学薬品の適用を通して典型的に達成され、これによって対の鎖の間の水素結合が壊される。変性DNA試料は、公知の配列および塩基長のプローブと共にインキュベートされるまたはそれが標的DNA上に自己の特異的認識配列を有する多数のプローブとのインキュベーションのために分割され得る。1つまたは複数のプローブをこれらの1つまたは複数の認識配列にハイブリダイズするために、インキュベーションについての条件は、1つまたは複数のプローブが他の部位またはミスマッチ部位に優先して公知の特異的認識部位に結合するように選ばれる。条件はまた、変性DNA鎖上により多くのプローブ結合部位が、プローブに結合しないよりもプローブに結合するように選ばれる。溶液は、緩衝イオン溶液であってもよい。溶液は、プローブの結合を促進するために攪拌してもよい。溶液の温度は、インキュベーションの経過の間に変動してもよい。たとえば、インキュベーションの温度は、ハイブリダイゼーションの経過にわたり徐々に冷却され得る。40

【0091】

一度、変性標的DNAが、1つまたは複数のプローブとハイブリダイズしたら、試料は、流体チャネルデバイスの一方の端部のマイクロ流体チャンバーの中に導入される。流体チャネルデバイスは、イオン溶液、たとえば食塩水が充填される。溶液はまた、緩衝溶液であってもよい。1つまたは複数の過剰なプローブは、マイクロ流体チャンバーの中への試料の導入前に除去され得る。ゲル濾過は、DNAのより長い鎖から短いプローブを除去50

する 1 つの方法である。あるいは、他の市販で入手可能な精製法が利用可能である。一度、ハイブリダイズしたプローブを有する標的 DNA 鎖が、マイクロ流体チャンバーの中に導入されたら、マイクロ流体チャンバーから 1 つまたは複数の流体チャネルの中に DNA を駆動するために、電位が起電電極を介して印加される。

【 0 0 9 2 】

標的 DNA は、流体チャネルに入る際、典型的に、直線化された立体構造をとる。流体チャネルが狭いほど、DNA は、より直線化されるよう強いられる。巨視的起電電極に印加された電圧は、DNA を、流体チャネルを下方に電気泳動的に駆動する。DNA およびハイブリダイズしたプローブが流体チャネルを下方に移動する時、それらは、流体チャネル内の感知電極の間の体積に入る。

10

【 0 0 9 3 】

DNA の非存在下において、感知電極の間の体積は、イオン溶液のみを含有していてもよく、典型的に、2 つの感知電極の間で測定されるベースライン電位差異を有していてよい。DNA が感知電極の間の体積に入る時、2 つの感知電極の間で測定される電位は、DNA がイオン溶液の伝導率と異なる伝導率を有するので、変化する。DNA が感知電極の間の体積に入る場合、2 つの感知電極の間のチャネルの伝導率は、イオン性の流体のみが感知電極の間に存在する場合の伝導率と比較して典型的に低下する。それにハイブリダイズしたプローブをも有する DNA の一部が、感知電極の間の体積に入る場合、電位は、さらに変化する。

【 0 0 9 4 】

20

分子が感知電極の間を通過する時、モニターされる電圧は、検出可能で測定可能な量、変動する。電極は、時間の関数として電圧のこの変動を検出し、記録する。電圧のこれらの変動は、任意の所与の時間に感知電極の間を通過している分子の相対的な直径の結果である。たとえば、それに結合されたプローブを有する生体分子の部分は、ハイブリダイズされておらず、そのため、プローブを欠く生体分子の部分の直径の 2 倍である。

【 0 0 9 5 】

感知電極の間を通過する生体分子の体積のこの相対的な増加は、感知電極の間の抵抗性の一過性の増加を引き起こし、測定可能な電圧変動をもたらす。プローブを含む生体分子の部分が感知電極の間を通過する時、電流は、さらに妨げられ、結合した部分の通過の間に記録される電圧の相対的なスパイクを形成し、これは、ハイブリダイズした部分が通過した後、再び減少する。感知電極は、モニターされる電流のこれらの変動を検出し、反映する。さらに、電圧変動の測定値は、時間の関数として測定され、記録される。その結果として抵抗性における周期的な中断または変動は、相対的なまたは絶対的な位置の関数として、公知のプローブ配列が生体分子に結合している場所を示す。

30

【 0 0 9 6 】

DNA または標的 DNA 上のプローブが流体チャネルに入る場合、電気的シグナルが記録される。電気的シグナルは、時刻表示および変化した電気的な特性の値から構成される。電気的な特性の値は、バックグラウンドシグナルから引き算され得るまたは絶対値であってもよい。表は、感知電極の間で生じるすべての応答およびそれぞれの応答についての時刻表示を列挙するコンピューターによって生成され得る。コンピュータープログラムは、続いて、生体高分子の長さおよび生体高分子上のハイブリダイズしたプローブの位置を決定してもよい。生体高分子上のプローブの位置は、ナノメートル、塩基対、または全生体高分子長の百分率の単位として決定され得る。

40

【 0 0 9 7 】

プローブの生体高分子上の位置は、生体高分子の末端からのその距離に従って決定することができる。これは、較正された標準物質を使用して、生体高分子の全長の決定を通して行われてもよい。生体高分子シグナルの持続時間は、分析物の正確な長さを計算するために較正された標準曲線と比較され得る。たとえば、デバイスは、分析物と同じ条件、たとえばイオン強度、温度、pH 下で流体チャネルを通して電気泳動される、公知の長さの一連の DNA 断片を用いて較正され得る。断片は、好ましくは、未知の断片の長さを測定

50

するために感知電極を較正するのに十分な異なる長さに及ぶ。

【0098】

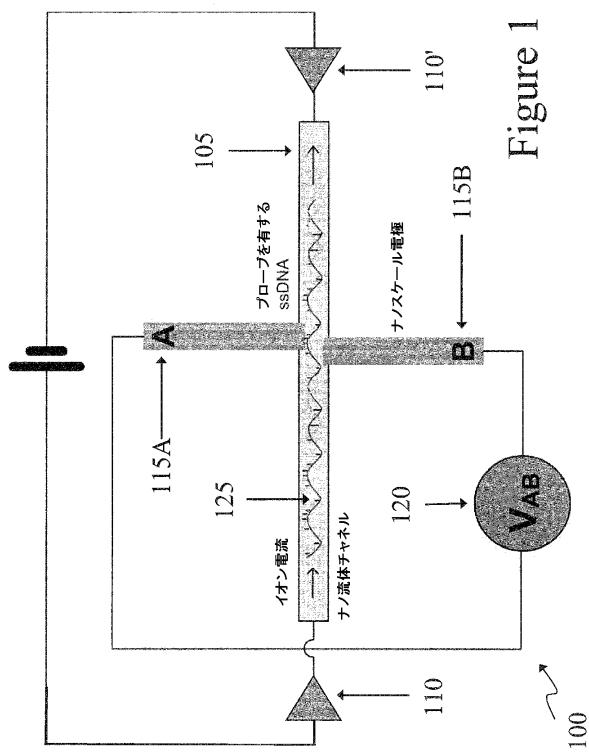
より多くの配列は、第2の複数のプローブとの続くまたは平行のハイブリダイゼーションを通して決定することができ、検出、分析、および決定が、続く複数のプローブを用いて繰り返され得る。本明細書において記載された設計は、ナノポアおよび流体チャネルの技術を合併し、検出されるシグナルから駆動電気泳動力を分断する。電圧感知を使用し、感知電極が置かれる基板上に電圧増幅器を直接加工することによって、デバイスは、以前の構造を用いて可能であったものよりも高い頻度で作動してもよい。

【0099】

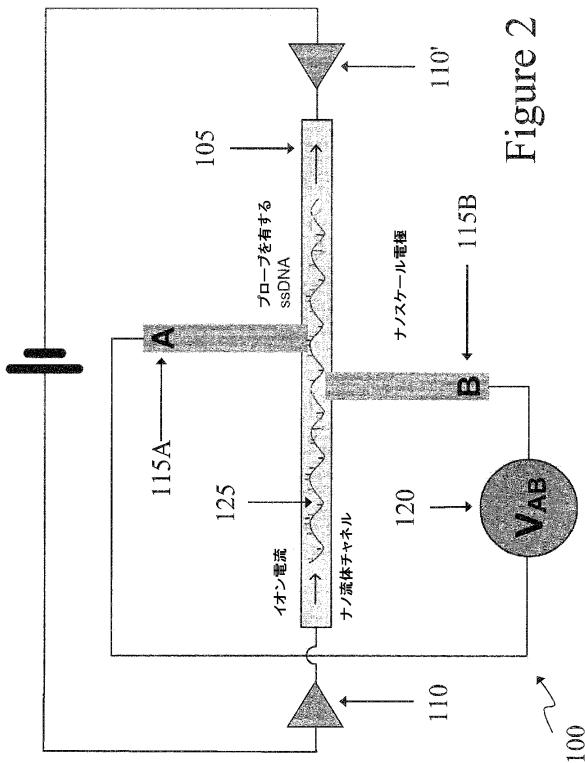
本発明の記載された実施形態は、単に例証的なものとなるように意図され、多数の変形形態および変更形態が、当業者らに明らかであろう。そのような変形形態および変更形態はすべて、添付の特許請求の範囲において定義されるように本発明の範囲内にあることが意図される。

10

【図1】



【図2】



【図3】

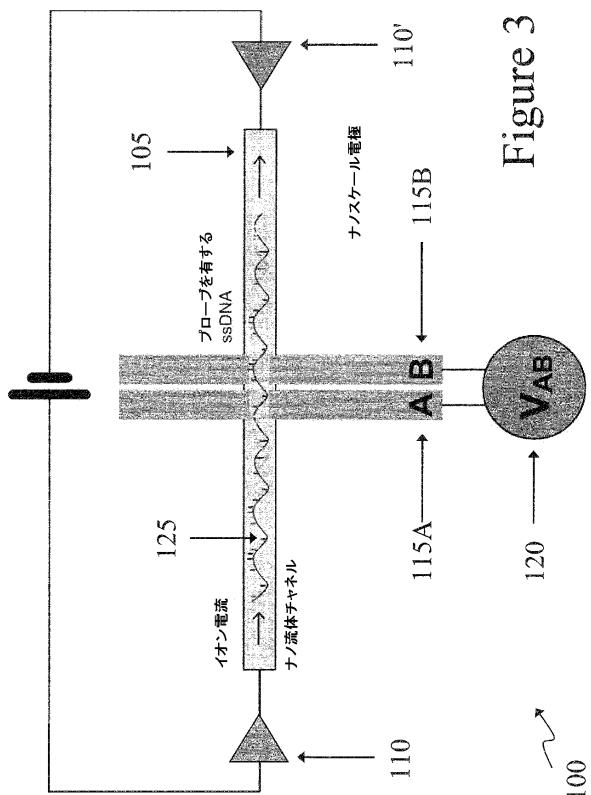


Figure 3

【図4】

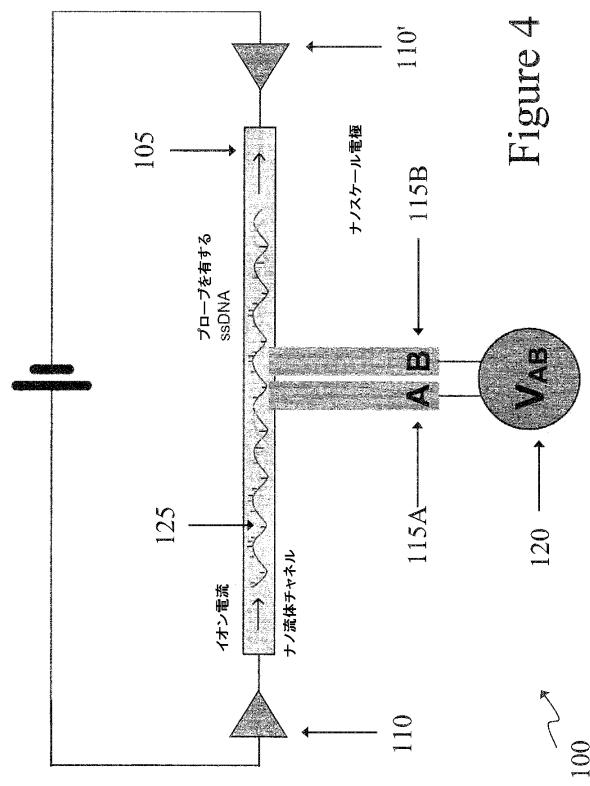
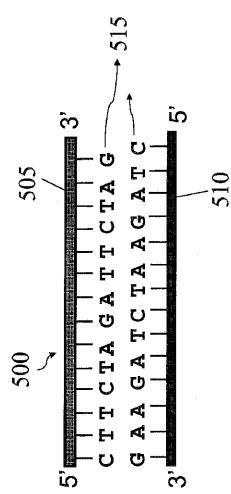


Figure 4

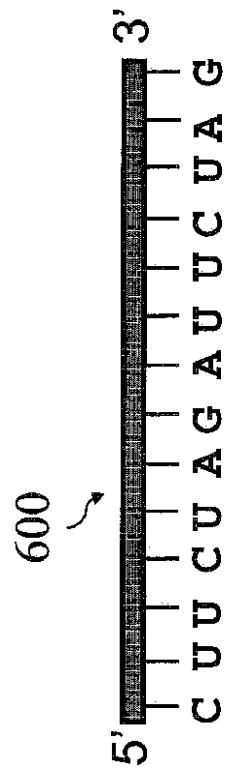
【図5】

Figure 5



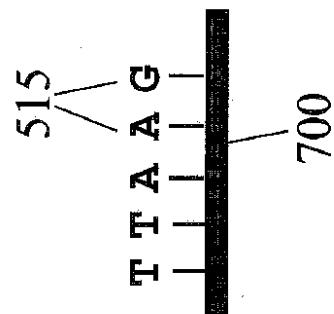
【図6】

Figure 6



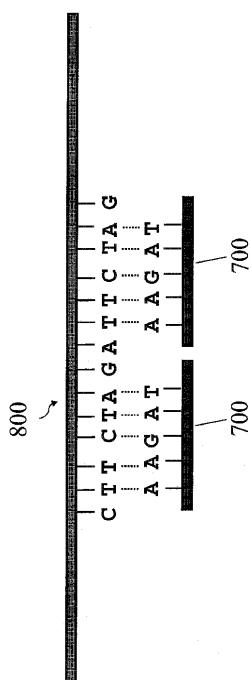
【図7】

Figure 7



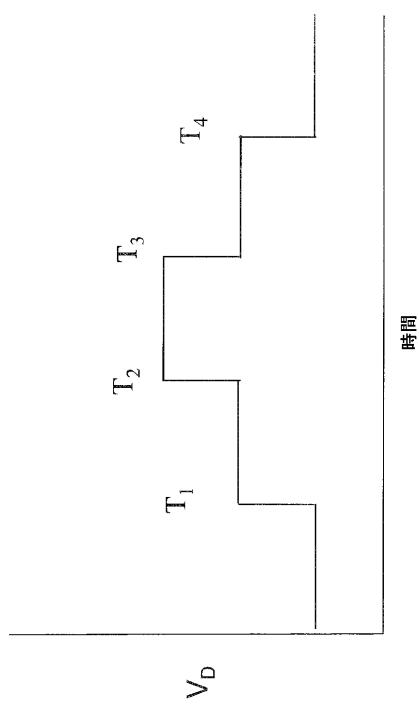
【図8】

Figure 8



【図9】

Figure 9



フロントページの続き

- (72)発明者 リン， シンシェン
アメリカ合衆国 ロード アイランド 02818， イースト グリーンウィッチ， リバー
ファーム ドライブ 105
- (72)発明者 ブレッディ， バレット
アメリカ合衆国 ロード アイランド 02906， プロビデンス， スティムソン アベニュー
- 24
- (72)発明者 オリバー， ジョン エス.
アメリカ合衆国 ロード アイランド 02809， ブリストル， パートン ストリート 3
5
- (72)発明者 ジャウジー， マリーアム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138， ケンブリッジ， マサチューセッツ アベニ
ュー 1039， アパートメント 305
- (72)発明者 ペトロシアン， レオ
アメリカ合衆国 ロード アイランド 02908， プロビデンス， プロムナード ストリー
ト 255

審査官 高山 敏充

- (56)参考文献 特表2003-510034 (JP, A)
特開2003-028826 (JP, A)
特表2002-526759 (JP, A)
特表2003-513279 (JP, A)
国際公開第2007/109228 (WO, A1)
特開2007-068413 (JP, A)
特開2004-004064 (JP, A)
特開2003-098146 (JP, A)
米国特許出願公開第2003/0031090 (US, A1)
NANO LETTERS, 2008年 5月, Vol. 8, No. 5, pp.1472-1476

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 3/10
C12Q 1/00 - 3/00
CAplus / MEDLINE / EMBASE / WPIDS / BIOSIS (STN)