

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-534018

(P2008-534018A)

(43) 公表日 平成20年8月28日 (2008. 8. 28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

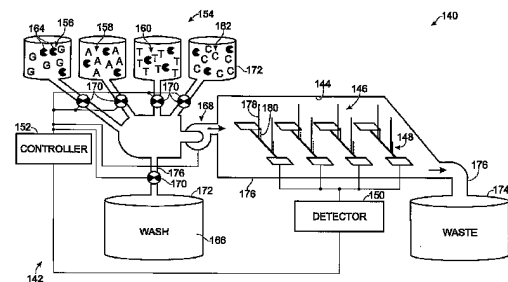
(21) 出願番号	特願2008-504404 (P2008-504404)	(71) 出願人	504366648 アブレラ コーポレーション アメリカ合衆国94404、カリフォルニア、フォスター シティ、リンカーン センター ドライブ 850
(86) (22) 出願日	平成18年3月29日 (2006. 3. 29)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(85) 翻訳文提出日	平成19年11月20日 (2007. 11. 20)	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/011806	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開番号	W02006/105360	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(87) 国際公開日	平成18年10月5日 (2006. 10. 5)		
(31) 優先権主張番号	60/666, 396		
(32) 優先日	平成17年3月29日 (2005. 3. 29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸分析ナノワイヤベースシステム

(57) 【要約】

核酸の共有結合修飾を検出するためのナノワイヤの電気特性を使用して、核酸の検出および／または分析を行うシステム。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸を検出および／または分析する方法であって、

核酸構造に基づく核酸の共有結合修飾のために核酸検体に結合されたナノワイヤを含むナノワイヤアセンブリを少なくとも 1 つの試薬に接触させる段階と、

前記少なくとも 1 つの試薬が前記ナノワイヤアセンブリの共有結合修飾を生じさせたかどうかを判断するために、前記ナノワイヤアセンブリの電気特性を測定し、それによって前記核酸検体に関する構造的情報を提供する段階とを含む方法。

【請求項 2】

前記接触させる段階は、流体連通して配置されたこのようなナノワイヤアセンブリの配列上で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ナノワイヤアセンブリは異なる核酸検体に結合され、前記測定する段階は前記異なる核酸検体それぞれに関する構造的情報を提供する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記測定する段階は、前記電気特性に実質的な変化がないことを測定し、それによって前記核酸検体が前記少なくとも 1 つの試薬によって共有結合修飾を導くことが可能な構造を欠いていることを示す段階を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記接触させる段階は、前記ナノワイヤに結合され、前記ナノワイヤに前記核酸検体を結合させるように前記核酸検体と選択的に対になる核酸プローブを含むナノワイヤアセンブリ上で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記核酸プローブは、テンプレートとしての前記核酸検体との核酸合成のプライマとして構成され、前記接触させる段階は前記プライマおよび前記テンプレートをポリメラーゼおよび前記ポリメラーゼ用ヌクレオチド基質と接触させる段階を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記測定する段階が、もしあるならば、前記電気特性の変化量を判断し、前記接触させる段階によって前記プライマに結合されたヌクレオチドサブユニットの数に前記量を相関させる段階をさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記接触させる段階および測定する段階が、ヌクレオチドであるグアノシン、アデノシン、チミジン、およびシチジンに対応する 4 つの異なるヌクレオチド基質それぞれに対して個別に繰り返される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記接触させる段階および測定する段階が、前記 4 つの異なるヌクレオチド基質と個別に接触する 2 つ以上のサイクルにわたって繰り返される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記接触させる段階はライゲーション活性を有する試薬と接触させる段階を含み、前記測定する段階は核酸ライゲーションが起こったかどうかを判断する段階を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記接触させる段階は、核酸の切断用試薬と接触させる段階を含み、前記測定する段階は核酸切断が起こったかどうかを判断する段階を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

核酸ハイブリダイゼーションに対して厳密性を調節する段階をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記厳密性を調節する段階は、温度、電界、および前記ナノワイヤアセンブリに関連す

10

20

30

40

50

る流体組成の少なくとも1つを調節することによって行われる、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記接触させる段階は、前記核酸に沿って2つ以上の間隔を置いた位置で核酸に結合されたナノワイヤを使用して行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

前記ナノワイヤは電界効果トランジスタとして働く、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

核酸を検出かつ／または分析するシステムであって、
プライマと塩基対である核酸テンプレートに結合されたナノワイヤを含むナノワイヤアセンブリと、

前記核酸テンプレートに基づき、前記プライマの伸張のために前記ナノワイヤアセンブリを異なる試薬と順次接触させることが可能な試薬運搬システムと、

前記ナノワイヤアセンブリの電気特性を測定するように構成された電気検出器と、

前記試薬運搬システムおよび前記電気検出器と情報交換し、前記異なる試薬との接触に応じた前記電気特性の変化に対応するデータを収集するように構成され、それによって前記核酸テンプレートに関する配列情報を提供する制御装置とを備えたシステム。

【請求項17】

前記ナノワイヤアセンブリは異なるテンプレートに結合された複数のナノワイヤアセンブリであり、前記制御装置は前記複数のナノワイヤアセンブリそれぞれに対してデータを収集するように構成され、それによって前記異なるテンプレートそれぞれに関する配列情報を提供する、請求項16に記載のシステム。

【請求項18】

前記ナノワイヤアセンブリは電界効果トランジスタとして働く、請求項16に記載のシステム。

【請求項19】

前記異なる試薬は、グアノシン、アデノシン、チミジン、およびシチジンの前記プライマへの選択的付加をもたらす、請求項16に記載のシステム。

【請求項20】

前記ナノワイヤアセンブリに熱を加えるように構成されたヒータをさらに備えた、請求項16に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、全ての目的で全体を参照として本明細書に組み込む、2006年3月29日出願の米国仮特許出願第60/666396号の米国特許法第119条(e)に基づく利益を請求するものである。

【0002】

本教示は、核酸の共有結合修飾を検出するためにナノワイヤを使用する、核酸の検出および／または分析用のシステムを提供する。

【背景技術】

【0003】

核酸配列のキャラクタリゼーションは、特に臨床診断および治療、法医学、ならびにバイオテロ薬剤の分析を含むますます多くの分野において、幅広い用途を有する。例えば、薬理遺伝学の比較的新しい分野は、医療の効果に対する強い遺伝子成分の認識に基づいている。特に、人口母集団の構成員の間の核酸配列の違いにより、薬剤などの医療に対する人口に応じて多くの変化を与えることができる。したがって、予測される薬剤受容者の核酸配列分析は受容者の遺伝子構造に基づいて薬剤と各受容者とをより知的に組み合わせるのに使用することができる。しかし、現在の配列技術は、薬理遺伝子および多くの他の用途によって高まる配列情報へのさらなる需要を満たすにはその能力が限られているである

う。

【特許文献1】米国仮特許出願第60／666396号

【特許文献2】米国特許出願第09／935776号（米国特許公開番号第2002／013031A1号）

【特許文献3】米国特許出願第10／020004号（米国特許出願公開第2002／0117659A1号）

【特許文献4】米国特許出願第10／033369号（米国特許出願公開第2002／0130353号）

【特許文献5】米国特許出願第10／196337号（米国特許出願公開第2003／0089899A1号）

【特許文献6】米国仮特許出願第60／612315号

【特許文献7】米国特許出願第09／935776号（米国特許出願公開第2002／013031A1号）

【特許文献8】米国特許出願第10／020004号（米国特許出願公開第2002／0117659A1号）

【特許文献9】米国特許出願第10／033369号（米国特許出願公開第2002／0130353号）

【特許文献10】米国特許出願第10／196337号（米国特許出願公開第2003／0089899A1号）

【特許文献11】米国特許第6408878号

【特許文献12】米国特許第6511810号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、核酸の共有結合修飾を検出するのにナノワイヤを使用して、核酸の検出および／または分析を行うためのシステムを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

各ナノワイヤは、核酸検体および検体と塩基対にされた核酸プローブに結合して、ナノワイヤアセンブリを形成することができる。ナノワイヤアセンブリ、またはナノワイヤアセンブリのあらゆる配列は、核酸構造に基づく核酸の共有結合修飾用の試薬と接触させることができる。例えば、試薬としては、特にポリメラーゼ、リガーゼ、またはヌクレアーゼなどの核酸を伸ばしたり縮めたりできる核酸修飾酵素を挙げることができる。ナノワイヤアセンブリに結合された（1つまたは複数の）核酸の寸法の変化は、ナノワイヤアセンブリの伝導性などの電気特性を変えることができる。したがって、電気特性が試薬の働きによって変更されたかどうかを判断するために、検出器を使用してナノワイヤアセンブリの電気特性を測定することができる。このように電気特性の変化の有無（および／またはあらゆる変化の寸法（および／または極性））により、検体に関する配列情報などの構造的情報を提供することができる。

【0006】

全体的に、核酸のナノワイヤベース分析は他のシステムを凌ぐ多くの利点を有することができる。これらの利点として、高い感度、より少ない量の検体の分析、検体の多重分析、小さな空間内での多くの分析（例えば、数百または数千）の実行、器具の小さな寸法、優れた可搬性、および／またはその他を挙げることができる。例えば、配列決定（例えば、ジデオキシヌクレオチドベース配列決定）に対する連鎖停止手法とは対照的に、本明細書に記載するナノワイヤベースシステムは、連続するプライマ伸張および測定によって核酸の配列を決定することができる。したがって、テンプレート内の異なるヌクレオチドの識別を判断する際に同じ個別のプライマおよびテンプレート分子を関与させることができ、それによって配列決定に必要なプライマおよびテンプレート分子の数を実質的に少なくすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

図1は、核酸のナノワイヤベース分析のための例示的なシステム20を示している。このシステムは、試薬運搬システム22、ナノワイヤアセンブリ24、検出器26、および／または制御装置28を備えることができる。

【0008】

試薬運搬システム22は、23で示すナノワイヤアセンブリへかつ／またはそこから、核酸修飾用の1つまたは複数の試薬30、より詳細には流体試薬を運ぶことができる。試薬運搬システムは、(1つまたは複数の)ポンプ、(1つまたは複数の)弁、1つまたは複数のリザーバ、ナノワイヤアセンブリが中に配置される(1つまたは複数の)経路、および／またはその他を含むフローベースシステムであってよい。試薬運搬システムの別の態様は、例えば、セクションVおよび実施例3に記載されている。

【0009】

ナノワイヤアセンブリ24は、核酸修飾用部位を提供することができる。より詳細には、ナノワイヤアセンブリは、ナノワイヤ32、および36で示すナノワイヤに結合された1つまたは複数の核酸34を含むことができる。核酸は、分析の対象である検体38、および検体の構造分析を容易にするプローブ40を含むことができる。プローブは、42で示す検体との塩基対を形成するように構成することができ、それによって特に、プローブは本例示と同様にナノワイヤに検体を結合させることができる、または逆も同様である。いくつかの実施形態では、システムはナノワイヤ(およびナノワイヤアセンブリ)の配列を形成するように、複数のナノワイヤアセンブリを含むことができる。ナノワイヤ、ナノワイヤ配列、核酸、およびナノワイヤへの核酸の結合の別の態様が、例えば特に、セクションIおよびIIならびに実施例1および2に記載されている。

【0010】

検出器26は、ナノワイヤアセンブリの電気特性などの特性を測定することができる。したがって、検出器は例えば、ナノワイヤに沿って間隔を置いた位置に配置された1対の電極を通して、44で示すナノワイヤに電氣的に結合させることができる。いくつかの実施例では、検出器は核酸の多重分析のために、配列で配置された複数のナノワイヤそれぞれから電気特性を測定することができる。検出器の別の態様は例えば、セクションIVに記載されている。

【0011】

制御装置28は、様々な態様のシステム動作を制御することができる。例えば、制御装置は、検出器が電気特性を測定するときかつ／または配列のナノワイヤアセンブリがどの上にあるかを判断するために、46で示す検出器に結合させることができる。制御装置はまた、測定した電気特性に相当するデータなど、検出器から受信したデータを記憶かつ／または処理することができる。制御装置はまた、あるいは別の方法では、ナノワイヤアセンブリへの／からの試薬の運搬を制御かつ／または監視するように、48で示す試薬運搬システムに結合させることができる。制御装置の別の態様は、例えばセクションVIに記載されている。

【0012】

図2は、核酸のナノワイヤベース分析の例示的な方法を示すフローチャート60である。この方法は、(1)62で示される、ナノワイヤアセンブリを提供する段階と、(2)64で示される、少なくとも1つの試薬とナノワイヤアセンブリとを接触する段階と、(3)66で示される、ナノワイヤアセンブリの電気特性を測定する段階とを含むことができる。これらの段階は、あらゆる適切な順序で、あらゆる適切な組合せで、およびあらゆる適切な回数で行うことができる。

【0013】

ナノワイヤアセンブリを提供することができる。ナノワイヤアセンブリは、直接的にかつ／または検体と対になる(ハイブリッド形成する)核酸プローブを通じてナノワイヤに結合された核酸検体を含むことができる。提供する段階は、ナノワイヤアセンブリを形成

する段階を含んでよく、またはその後であってもよい。ナノワイヤアセンブリを形成する段階は、核酸をナノワイヤに共有結合および／または非共有結合させる段階を含むことができる。いくつかの実施例では、ナノワイヤアセンブリの配列を提供することができる。ナノワイヤアセンブリを提供かつ形成する別の態様は例えば、セクション I ～ I I I ならびに実施例 1 および 2 に記載されている。

【0014】

ナノワイヤアセンブリは、核酸構造に基づく核酸の共有結合修飾用の試薬と接触させることができる。例えば、試薬は特に酵素（ポリメラーゼ、リガーゼ、ヌクレアーゼなど）および／またはヌクレオチドモノマーもしくはポリマーを含むことができる。共有結合修飾は、検体および／またはプローブへのヌクレオチド付加、またはそこからの除去を含むことができる。したがって、検体の構造は例えば、共有結合修飾の有無、共有結合修飾の位置（検体および／またはプローブ内の位置など）、および／または共有結合修飾の範囲（付加したまたは除去したヌクレオチドの数など）を決定することができる。試薬および核酸の共有結合修飾の別の態様が、例えば特に、セクション V および実施例 3 ～ 5 に記載されている。

【0015】

ナノワイヤアセンブリの電気特性を測定することができる。電気特性、特にもしあるならば電気特性の変化を使用して、検体が試薬による共有結合修飾を可能にする構造を有しているかどうかを判断し、それによって検体の構造に関する情報を提供することができる。電気特性を測定し、電気特性の変化に基づく検体構造を判断する別の態様が、例えば特に、セクション I V および実施例 3 ～ 5 に記載されている。

【0016】

接触および測定段階は、あらゆる適切な回数繰り返すことができる。いくつかの実施例では、接触および測定は異なる試薬（異なる酵素および／またはヌクレオチド基質など）で繰り返すことができる、かつ／または 2 つ以上のヌクレオチドの検体領域の配列を判断するためなどに、多数回同じ基質で周期的に繰り返すことができる。

【0017】

本教示の方法はまた、あるいは別の方法では、塩基対相互作用の厳密性を調節する段階を含むことができる。厳密性は、相補的に核酸ストランドを共に保持するのに必要な塩基対相互作用の合計数、連続した長さおよび／またはタイプ（例えば、G-C 塩基対は一般的に、A-T 塩基対より安定している）を増減するなど、核酸ストランド間相互作用の安定性を変えるように調節することができる。いくつかの実施例では、厳密性を調節する段階は、より不安定な二本鎖のみおよび／または少なくともほぼ全ての二重ストランド二本鎖が解離されて対になっていない単一のストランドを形成するように、核酸二本鎖の塩基対相互作用を解離させる段階を含むことができる。厳密性を調節する段階は、ナノワイヤアセンブリの温度を変えることによって（例えば、対応する反応区画および／または区画内に配置された、またはこれに向かう流体を加熱または冷却することによって）電氣的に（例えば、ナノワイヤアセンブリを正または負にバイアスすることによって）、かつ／または化学的に（例えば、イオン強度、二価または多価陽イオンおよび／または陰イオン濃度、溶媒誘電率を調節することによって（例えば、ジメチルホルムアミドまたは別の有機溶媒の濃度を変えることによって）、かつ／または酵素的に（例えば、核酸塩基またはストランドの対または不對を助けるヘリカーゼなどの酵素を加えるまたはその濃度を調節することによって）、かつ／または特に（尿素などの）カオトロピック剤の濃度を変えることによって）行うことができる。核酸二本鎖は例えば、接触後かつ測定前に（例えば、核酸二本鎖によって生じる電気特性への寄与を除くために）、または接触後かつ測定後に（例えば、接触および測定の別のサイクルの実行を容易にするために）解離させることができる。いくつかの実施例では、厳密性を調節する段階は、電気特性の測定の感度を大きくするようにナノワイヤアセンブリと接触する流体のイオン強度を低減することを含んでよい。

【0018】

本教示の別の態様は、(I) ナノワイヤ、(II) (A) 検体および(B) プローブを含む核酸、(III) ナノワイヤアセンブリ、(IV) 検出器、(V) 試薬運搬システム、(VI) 制御装置、および(VII) 実施例を含む以下のセクションに記載する。

【0019】

I. ナノワイヤ

本教示のシステムは、1つまたは複数のナノワイヤを含んでいる。本明細書で使用するナノワイヤは、その長さに沿って1つまたは複数の(または全ての)位置でサブマイクロメータ断面寸法を有する細長い半導体である。断面寸法(および/または直交断面寸法)は、特に約500nm、100nm、20nm、5nm、または1nm未満であってもよい。

10

【0020】

ナノワイヤはあらゆる適切な長さを有することができる。例示的な長さとしては、特に少なくとも約1 μ m、5 μ m、または20 μ mが挙げられる。さらに、ナノワイヤは、細長い構造を作り出すために、あらゆる適切なアスペクト比(断面寸法および/または直交断面寸法に対する長さ)を有することができる。例示的なアスペクト比としては、少なくとも約2:1、10:1、100:1、または1000:1が挙げられる。

【0021】

ナノワイヤは、あらゆる適切な断面形状を有することができる。例示的な断面形状としては、円形、楕円形、多角形(三角形、矩形など)、でこぼこ、および/またはそれらの組合せが挙げられる。いくつかの実施例では、ナノワイヤは中空コアを有するナノチューブであってもよい。

20

【0022】

ナノワイヤは、あらゆる適切な(1つまたは複数の)材料で形成することができる。例えば、ナノワイヤはドーパントを備えていても備えていなくてもよい半導体材料(元素または合金)で形成することができる。ナノワイヤの本体(または、コーティングもしくはライニング)を形成するための例示的な半導体材料としては、特にシリコン、ゲルマニウム、および/または炭素が挙げられる。例示的なドーパントとしては、特に、それぞれ窒素およびリンなどのnタイプドーパントおよび/またはpタイプドーパントが挙げられる。ナノワイヤの本体(および/またはコーティングもしくはライニング)を形成するのに、またはその中のドーパントとして適切である可能性がある他の材料は、本明細書に参照として組み込まれる特許出願、2001年8月22日出願の米国特許出願第09/935776号(米国特許公開番号第2002/0130311A1号)、2001年12月11日出願の米国特許出願第10/020004号(米国特許出願公開第2002/0117659A1号)、2001年10月24日出願の米国特許出願第10/033369号(米国特許出願公開第2002/0130353号)、および2002年7月16日出願の米国特許出願第10/196337号(米国特許出願公開第2003/0089899A1号)に記載されている。

30

【0023】

II. 核酸

本教示のシステムは、核酸に結合されたナノワイヤを提供する。本明細書で使用する核酸(または、オリゴヌクレオチド、オリゴマー、もしくはポリヌクレオチド)は、互いに結合された少なくとも2つのヌクレオチドサブユニットのポリマーである。核酸は、特に単一ストランドまたは二重ストランド(二本鎖)であってもよい。二重ストランド核酸は一般的に、核酸の対になったストランドの整列ヌクレオチド、例えば、チミジン(T)(または、RNA内のウリジン(U))と対になったアデノシン(A)と、シチジン(C)と対になったグアノシン(G)の間の水素結合(塩基対形成)によって形成されている。

40

【0024】

核酸は、あらゆる適切な天然および/または人工的構造を有することができる。核酸は、糖およびリン酸塩部分を交互に配置した糖リン酸主鎖を含むことができ、ヌクレオチド塩基は各糖部分に結合している。あらゆる(1つまたは複数の)糖は、特にリボース(R

50

N A用)、デオキシリボース(DNA用)、アラビノース、ヘキソース、2'-フルオロリボース、および/または糖の構造的類似物を含む主鎖に含まれてよい。ヌクレオチド塩基としては例えば、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシル、イノジン、2-アミノアデニン、2-チオチミン、3-メチルアデニン、C5-プロモウラシル、C5-フルオロウラシル、C5-ヨードウラシル、C5-メチルシトシン、7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、8-オキソアデニン、8-オキソグアニン、2-チオシトシンなどを挙げることができる。本教示の核酸は、あらゆる他の適切な代替的な主鎖を含むことができる。例示的な代替主鎖としては、ホスホアミド、ホスホロチオゼート、ホスホロジチオエート、O-メチルホスホロアミジト、ペプチド核酸、正電荷主鎖、非リボース主鎖などが挙げられる。人工的な主鎖および/または部位を備えた核酸は、例えば全電荷を増減させ、塩基対安定性を増減させ、化学安定性を増減させて、試薬および/またはその他によって作動される性能を変更するのに適している可能性がある。

10

【0025】

ナノワイヤは、核酸検体(もしくは、複数の構造的に異なる検体)および/または核酸プローブ(もしくは、複数の構造的に異なるプローブ)に結合することができる。さらに、ナノワイヤは各検体および/またはプローブの単一分子または複数の分子に結合することができる。

【0026】

A. 検体

本明細書で使用する検体は、ナノワイヤベース分析の対象である核酸である。検体はあらゆる適切な源からのものであってもよく、あらゆる適切な構造を有することができ、あらゆる適切な特性に対して分析することができる。いくつかの実施例では、検体はテンプレート、すなわち、少なくとも別の核酸の領域を形成するためのモデルまたはガイドとして使用される核酸であってもよい。テンプレートは、例えば、1つまたは複数のヌクレオチドと塩基対になるテンプレートの相補的領域により、直列にまたは並列に、プローブに対して1つまたは複数のヌクレオチドを付加することができる。

20

【0027】

検体は、あらゆる適切な源からのものであってもよい。例示的な源は、特に被験者、人間以外の動物、植物、微生物、調査試料、環境試料(土壌、空気、水など)、および/またはインビトロ合成を含むことができる。

30

【0028】

被験者は、病気の患者、遺伝子検査被験者、識別される人、法医学被験者、および/またはその他であってもよい。検体は、血液、血漿、血清、精液、尿、汗、涙液、唾液、粘液、乳液、組織試料、腫瘍生検標本、培養細胞、および/またはその他からの試料を含む、被験者内のあらゆる適切な部位から得ることができる。

【0029】

検体は、あらゆる適切な処理によってあらゆる適切な形態で得ることができる。例えば、検体は粗溶解物に含めることができ、または例えば、特にイオン交換クロマトグラフィ、選択的沈殿、遠心分離、および/または増幅(ポリメラーゼ連鎖反応)によって得られる精製検体であってもよい。検体は、単一または二重ストランドであってもよく、あらゆる適切な寸法を有することができる。いくつかの実施例では、検体は剪断、制限エンドヌクレアーゼ消化、インビトロ合成、増幅、限定化学的消化、および/またはその他によって単一の寸法、または1式の寸法を有することができる。いくつかの実施例では、ナノワイヤに結合された検体は、同様または同一の長さおよび配列内容、あるいは異なる長さおよび/または配列内容の複数の別個のストランドを含んでいる。異なる長さのストランドは、例えば、プローブとのハイブリダイゼーション(塩基対合)などのために、同様または同一の配列の共通領域を含む重なり合ったフラグメントであってもよい。検体はプローブに対してあらゆる適切な寸法であってもよい。いくつかの実施例では、検体はプローブとほぼ同じ寸法である。いくつかの実施例では、検体はプローブより長く、少なくとも約2、10、または100倍など、プローブより実質的に長くてもよい。

40

50

【0030】

検体は、あらゆる適切な（1つまたは複数の）特性に関する構造的情報を得るために分析することができる。一般的に、構造的情報は配列の特徴に関する。配列の特徴は、ヌクレオチドのあらゆる適切な長さによって規定することができる。したがって、構造的情報は、関心のある配列の特徴の有無、（例えば、母集団内の単一ヌクレオチド多型性に対応する単一ヌクレオチドを特徴付けるための）検体内の特定の（1つまたは複数の）位置でのヌクレオチド識別（例えば、G、A、T、またはC）、および／または検体の、特に、少なくとも約5、10、50、200もしくは1000ヌクレオチドのストレッチの特定の配列であってもよい。配列の特徴はしたがって、ヌクレオチド識別および／または相違を探すために知られている配列と比較することができ、あるいはゲノムまたは他のポリヌクレオチド構造の前の非配列決定領域と対応することができる。

10

【0031】

B. プローブ

本明細書で使用されるプローブは、核酸検体の分析を容易にする核酸である。プローブは、あらゆる適切な源からであってもよく、あらゆる適切な構造を有することができ、あらゆる（1つまたは複数の）適切な特性に対して検体を分析するのに使用することができる。

【0032】

プローブは、自然および／または人工源から得ることができる。したがって、プローブは特に（1つまたは複数の）細胞、（1つまたは複数の）細胞溶解物、（1つまたは複数の）合成酵素、化学合成、酵素切断、化学切断、および／またはライゲーションによって合成または形成することができる。プローブはしたがって、RNA、DNA、またはそのあらゆる適切な人工誘導体であってもよい。さらに、プローブは検体と同じ構造的分類の分子（例えば、それぞれDNAまたはRNAである）、または異なる分類の分子（例えば、プローブはDNAであり検体はRNAであり（または逆である）、あるいは特にプローブは電荷を持たないかまたは正電荷の主鎖を有し、検体はホスホジエステル主鎖を有する）に属することができる。

20

【0033】

プローブは、検体に対してあらゆる適切な構造を有することができる。プローブは、塩基対相互作用により検体と二本鎖を形成するように構成することができ、それによってプローブおよび検体は共に、少なくとも部分的に二本鎖核酸を形成する。したがって、プローブの一部（または全て）は、検体の一部（または全て）と相補的であってもよい。別の方法では、または、それに加えて、プローブは、例えばプローブをナノワイヤに結合させるように、検体とは関係なく二本鎖領域を含むことができる。プローブは、検体のあらゆる領域に対してハイブリッド形成（塩基対合）するように構成することができ、例えば、プローブは検体の端部に隣接して、または端部から間隔を置いてハイブリッド形成することができる。いくつかの実施例では、プローブはプライマであってもよい。プライマは、プローブの3'一端部が検体と塩基対合され、検体の端部から間隔を置いて配置されるように構成することができ、3'一端部をポリメラーゼ（またはリガーゼ）および適切な（1つまたは複数の）ヌクレオチド基質で延長させることが可能になる。プローブは、別の核酸、特に検体と二重構造を形成するのに十分なあらゆる適切な長さを有することができる。二重構造は、例えば、（特に、ポリメラーゼまたはリガーゼなどでの）プローブへのヌクレオチド付加によって安定化させることができる。

30

40

【0034】

本教示のシステムは、1つまたは複数のプローブを含むことができる。複数のプローブは、異なる検体、同じ検体の異なる領域、または同じ検体の同じ領域と二本鎖を形成するように構成することができる（例えば、実施例4参照）。

【0035】

I I I. ナノワイヤアセンブリ

本教示のシステムは、1つまたは複数のナノワイヤアセンブリを含むことができる。ナ

50

ノワイヤアセンブリは、あらゆる適切な配置で配置することができ、あらゆる適切な数およびタイプの核酸を含むことができ、あらゆる適切な（１つまたは複数の）機構によって核酸をノワイヤに結合させることができる。

【００３６】

本教示のシステムは、ノワイヤアセンブリの配列を含むことができる。ノワイヤアセンブリは、直線配置、二次元配置、および／または三次元配置（積層二次元配列など）で配列することができる。配列は、特に少なくとも約１０、１００、または１０００を含むあらゆる適切な数のアセンブリを含むことができる。ノワイヤアセンブリは、各アセンブリ内に異なる１つの（もしくは複数の）プローブ、または同じ１つの（または複数の）プローブ、および／あるいは各アセンブリ内に異なる１つの（または複数の）検体または同じ１つの（または複数の）検体もしくは１つ（または複数の）検体領域を含むことができる。したがって、ノワイヤアセンブリは、同じ検体の異なる領域（重なっていないまたは重なっている）、同じ検体の同じ領域、および／または異なる検体の異なる領域を分析するように構成することができる。

【００３７】

検体およびプローブは、あらゆる適切な機構によって各ノワイヤに結合させることができる。検体および／またはプローブは、共有結合または非共有結合機構によってノワイヤに直接結合させることができる。共有結合機構は、ノワイヤ上に配置された対部位を備えたあらゆる適切な反応対と核酸の間の結合形成を含んでいる。例示的な機構は、活性ノワイヤ表面と反応することができる核酸誘導体を形成するように、核酸との１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（EDC）の反応を含む。別の方法では、または、それに加えて、核酸は非共有結合特異結合対相互作用によりノワイヤに結合することができる。例えば、特異結合対の第１の部位はノワイヤに取り付けることができ、特異結合対の第２の部位は核酸検体および／またはプローブに取り付ける（または含める）ことができる。特異結合対では一般的に、特異結合、すなわちほとんどの部分への結合を除いて、互いに対する結合が行われる。特異結合は、解離定数または係数（別の方法では、親和性または結合定数または係数）によって特徴付けることができる。一般的に、特異結合の解離定数は 10^{-4} Mから 10^{-12} M以下の範囲であり、特異結合の好ましい解離定数は 10^{-8} または 10^{-9} Mから 10^{-12} M以下の範囲である。例示的な特異結合対は、表１に示されている。

【００３８】

【表１】

表 1.例示的な特異結合対

特異結合部材	相手
細胞表面受容体	分泌ホルモンまたは細胞結合リガンド
核内受容体	核ホルモンまたは DNA
抗体	抗原
アビジンまたはストレプトアビジン	ビオチン
レクチンまたは炭水化物受容体	炭水化物
DNA	アンチセンス DNA;タンパク質
RNA	アンチセンスまたは他の RNA;タンパク質
酵素	酵素基質または調節因子
ヒスチジン	NTA(ニトリロ三酢酸)
IgG	タンパク質 A またはタンパク質 G

【００３９】

特異結合対相互作用（例えば、塩基対合）はまた、検体およびプローブを互いに結合させるのに使用することができる。したがって、プローブ（または検体）は、塩基対合される検体（またはプローブ）より直接的にノワイヤに結合させることができる。さらに、

プローブおよび検体は同時に（例えば、塩基対状態で）または、例えば、プローブを最初に、その後検体を結合させる、もしくはその逆で、順次ナノワイヤに結合させることができる（実施例 2 参照）。さらに、プローブおよび／または検体は、プローブ／検体の各分子に沿って単一の位置、または多数の位置（例えば、間隔を置いた部位）でナノワイヤに結合させることができる（実施例 6 参照）。

【0040】

プローブおよび／または検体は、あらゆる適切な接触機構を使用してあらゆる適切な時にナノワイヤアセンブリを形成するようにナノワイヤに接触することができる。いくつかの実施例では、ナノワイヤは配列に配置することができ、その後、異なるプローブおよび／または検体は配列の個別のナノワイヤまたはナノワイヤのサブセットと選択的に接触する（かつ結合する）ことができる。例えば、インクジェット印刷技術などによって（例えば、インクジェットプリントヘッドで使用される、特に薄膜ヒータ要素および／または圧電要素を備えた分配ヘッドを使用して）、個別のプローブおよび／または検体（または、その異なるセット）を流体の小さな液滴で配列の領域に選択的に分配することができ、それによって領域は流体分離された状態で留まる。別の方法では、または、それに加えて、ナノワイヤの配列はプローブおよび／または検体と接触させることができ、ナノワイヤは流体連通されている。例えば、プローブおよび／または検体は、前にナノワイヤに結合された特異結合相手（特に核酸）に基づきナノワイヤと選択的に相互作用することができる。

10

【0041】

ナノワイヤ、ナノワイヤアセンブリ、およびナノワイヤで行うことができる検定の別の態様は、本明細書に参照として組み込まれる特許文献、米国仮特許出願第 60/612315 号、2001 年 8 月 22 日出願の米国特許出願第 09/935776 号（米国特許出願公開第 2002/0130311 A1 号）、2001 年 12 月 11 日出願の米国特許出願第 10/020004 号（米国特許出願公開第 2002/0117659 A1 号）、2001 年 10 月 24 日出願の米国特許出願第 10/033369 号（米国特許出願公開第 2002/0130353 号）、および 2002 年 7 月 16 日出願の米国特許出願第 10/196337 号（米国特許出願公開第 2003/0089899 A1 号）に記載されている。

20

【0042】

IV. 検出器

本教示のシステムは一般的に、ナノワイヤ配列の各ナノワイヤ（およびナノワイヤアセンブリ）の電気特性を測定するための 1 つまたは複数の検出器（また、センサとも呼ぶ）を含んでいる。いくつかの実施例では、検出器は、例えば電子切換装置を使用して、直列に各ナノワイヤに電気結合されている。したがって、検出器は繰り返し可能なサイクルでナノワイヤに結合させることができ、各ナノワイヤの電気特性は電気特性における（もしあれば）あらゆる時間依存（および一般的には試薬依存）変化を測定するように周期的に検出することができる。

30

【0043】

検出器は、あらゆる適切な電気特性を測定することができる。例示的な電気特性は、伝導性、抵抗、電流、電圧、および／またはその他を含んでいる。電気特性は、定性的に（例えば、変化および変化なし、ならびに／または正もしくは負の変化）、あるいは定量的に（例えば、もしあるならば変化の大きさを判断するように）測定することができる。電気特性は、アナログおよび／またはデジタル出力を提供することができる。

40

【0044】

V. 試薬運搬システム

本教示のシステムは、1 つまたは複数の試薬運搬システムを含むことができる。試薬運搬システムは、特に、1 つまたは複数のポンプ、弁、流体リザーバ、経路、および／または試薬を含むことができる。

【0045】

50

ポンプは一般的に、流体および／または流体内に配置された試薬を移動させるあらゆる機構を含んでいる。いくつかの実施例では、ポンプは容量の小さい通路（すなわち、マイクロ流体構造）を通して流体および／または試薬を移動させるように構成することができる。ポンプは、特に、正もしくは負圧を流体および／または流体を保持する構造に加えることによって機械的に、（１つまたは複数の）電界の適当な印加により電氣的に、あるいは両方によって動作することができる。例示的な機械ポンプは、注射器ポンプ、蠕動ポンプ、回転ポンプ、加圧気体、ピペットなどを含むことができる。機械ポンプは、マイクロ機械加工、成形などすることができる。エラストマーである流体層および制御層で作られた例示的な蠕動ポンプが例えば、本明細書に参照として組み込まれる、２００２年６月２５日発行の米国特許第６４０８８７８号に記載されている。例示的な電気ポンプは電極を含むことができ、電気泳動、電気浸透、電気毛管現象、誘電泳動（その前進波形を含む）、および／またはその他によって動作することができる。

10

【００４６】

弁は一般的に、経路を通した流体の通過を調節するためのあらゆる機構を含んでいる。弁は例えば、経路を部分的にまたは完全に閉じるように選択的に変形させることができる変形可能部材、経路を部分的にまたは完全に遮断するように経路内に選択的に延長させることができる可動突起、電気毛管構造、および／またはその他を含むことができる。弁は、例えば、１式の利用可能試薬から（１つまたは複数の）ナノワイヤアセンブリと接触させる試薬を選択するように動作可能である。したがって、弁は経路（反応区画）内の（１つまたは複数の）ナノワイヤアセンブリと２つ以上の試薬リザーバの間に選択的な流体連通を提供するように動作可能である。

20

【００４７】

流体リザーバは一般的に、１つまたは複数のナノワイヤアセンブリを保持する反応区画を通す前かつ／または後に試薬を保持するためのあらゆる区画を含んでいる。流体リザーバは、あらゆる適切な容量を有することができる。いくつかの実施例では、流体リザーバは、少なくとも反応区画容量の約１０倍、１００倍、または１０００倍の容量など、反応区画容量よりかなり大きい容量を有する。流体リザーバは、ピペットなどによる流体の添加または除去を容易にするために、システムの外側からアクセス可能なように構成することができる。

【００４８】

経路は一般的に、流体の流れ、および／または試薬の移動を可能にするあらゆる通路を含んでいる。経路は、例えば、システムの流体リザーバの間に延びることができ、（１つまたは複数の）ナノワイヤアセンブリを保持する反応区画を画定することができる。経路はあらゆる適切な寸法を有することができる。いくつかの実施例では、経路はマイクロ流体経路であってもよい。本明細書で使用されるマイクロ流体経路または区画は、長さに沿って１つまたは複数の位置で、約１マイクロメートル未満、または約１００ナノメートル未満の断面寸法を有することができる。

30

【００４９】

試薬は、核酸分析の際にあらゆる適切な機能を有することができる。試薬は、例えば、ナノワイヤアセンブリの核酸を構造的に修飾し、前に分配した試薬および／または放出した核酸を洗い流し（除去し）、対になった核酸ストランド間のハイブリダイゼーションの厳密性を調節し、実質的にもしくは完全に塩基対相互作用を分裂させる（二本鎖を単一ストランドへ変性させる）、かつ／またはその他のように構成することができる。

40

【００５０】

試薬は、核酸の分析を容易にするように、ナノワイヤアセンブリと接触することができるあらゆる化学物質を含んでいる。化学物質は、混合物、錯体、溶液、懸濁液、および／またはその他を含む試薬中にあらゆる適切な形で存在することができる。例示的な試薬は、触媒ならびに／あるいはモノおよび／またはポリヌクレオチドを含むことができる。他の例示的な試薬成分は、キャリア流体（水および／または有機流体など）、酵素共同因子（二価陽イオン（例えば、マグネシウム、亜鉛、マンガンなど）、リボヌクレオシド三リ

50

ン酸（アデノシン三リン酸（ATP）など）、S-アデノシルメチオニン（SAM）など）、還元剤（ジチオスレイトール（DTT）、ベータメルカプトエタノールなど）、塩（例えば、イオン強度を調節するための）、安定化剤（血清アルブミン（例えば、BSA））、寸法ベース排除ポリマー（ポリエチレングリコール（PEG）など）、および／またはその他を含むことができる。

【0051】

触媒は、反応によって消費または生成されることなく、化学反応（特に、核酸を修飾する反応）の速度を大きくすることができるあらゆる材料を含むことができる。核酸修飾用の例示的な触媒はタンパク質（酵素）である。あらゆる適切な酵素を試薬に含めることができる。例示的な酵素は、一般的には核酸と塩基対合された相手ストランドの配列に基づき、核酸に共有結合的に単一ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを付加することができる（つまりテンプレート付加）。個別のヌクレオチドを連続して付加する単一ヌクレオチド付加酵素は一般的に、DNAポリメラーゼ（例えば、DNAポリメラーゼI（または、そのフラグメント／誘導体（クレノウフラグメントなど））、熱安定性DNAポリメラーゼ（Taqポリメラーゼ、ベントポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼなど）、および／またはその他）、RNAポリメラーゼ（ファージ誘導ポリメラーゼ（SP6、T7、またはT3 RNAポリメラーゼなど）、RNAテンプレートに基づいてデオキシリボヌクレオチドを付加する逆転写酵素、および／またはその他などのポリメラーゼを含む。核酸に同時に2つ以上のヌクレオチドを付加するポリヌクレオチド付加酵素は、リガーゼ（T4 DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼ、大腸菌DNAリガーゼなど）を含むことができる。他の例示的な酵素は、制限酵素、リボヌクレアーゼ、またはデオキシリボヌクレアーゼ（例えば、単一または二重ストランド特異酵素）、および／またはその他などのヌクレアーゼ（切断酵素）を含むことができる。他の例示的な触媒は、ポリヌクレオチド（例えば、RNA）、合成ポリマー、遷移金属錯体、反応表面などを含むことができる。

【0052】

試薬は、ナノワイヤアセンブリと接触するための1つまたは複数のモノまたはポリヌクレオチドを含むことができる。モノヌクレオチド試薬は例えば、特に、デオキシリボヌクレオシド三リン酸（dNTP）（例えば、dATP、dCTP、dGTP、dTTPなど）、リボヌクレオシド三リン酸（NTP）（例えば、ATP、CTP、GTP、UTPなど）、および／またはその混合物を含む、ヌクレオシド三リン酸を含むことができる。ポリヌクレオチド試薬は、例えば、核酸二量体、三量体、四量体などを含むことができる。ポリヌクレオチド試薬は、検体の領域と（または、検体内での有無が検査される領域と）部分的にまたは完全に相補的であるように構成することができる。いくつかの実施例では、ポリヌクレオチド試薬は、プローブの3'-ヒドロキシルへのライゲーシヨンのために5'-リン酸塩を含むことができる。

【0053】

VI. 制御装置

本教示のシステムは、少なくとも1つの制御装置を含むことができる。制御装置は、システムの様々な部分と相互作用する（を制御する、配列する、かつ／または記録する）ことができる。例えば、制御装置は特に、試薬運搬システムおよび／または検出器の動作と連動することができる。

【0054】

制御装置は、試薬運搬システムのあらゆる適切な態様と連動することができる。いくつかの実施例では、制御装置は、ポンプが動作されときの判断、ポンプ動作の速度、動作されるポンプのサブセットの選択などの、（1つまたは複数の）ポンプの動作を制御することができる。別の方法では、または、それに加えて、制御装置は例えば、特に反応区画への添加のためにどの（1つまたは複数の）試薬が選択されるか、どの順序で、どの速度で、かつ／またはどれだけの長さでなのかを判断するように弁の動作を制御することができる。制御装置はまた、ポンプおよび／または弁の動作に関するユーザの好みに対するユーザからの入力を受けることができる、かつ／あるいは試薬運搬の態様に関するデータを

記憶かつ／または報告することができる。

【0055】

制御装置は、（１つまたは複数の）検出器のあらゆる適切な態様と連動することができる。いくつかの実施例では、制御装置は、検出器が動作されるとき、かつ／またはどのナノワイヤアセンブリが所与の時間に検出器に電氣的に結合されるか、かつ／またはどの順序か、（１つまたは複数の）ナノワイヤアセンブリを支持する基板に加えられるバックゲート電圧の大きさおよびタイミング、ナノワイヤアセンブリに加えられる電圧および／または電流、および／またはその他を判断することなどの、（１つまたは複数の）検出器の動作を制御することができる。制御装置はまた、（１つまたは複数の）検出器の動作に関するユーザの好みに対するユーザからの入力を受けることができ、かつ／または検出の態様に関するデータを収集、記憶、かつ／または報告することができる。

10

【0056】

（実施例）

V I I . 実施例

以下の実施例は、核酸のナノワイヤベース分析用システムの選択した態様および実施形態を説明している。これらの実施例は例示するために含まれているものであり、本教示の全体の範囲を制限または規定することを意図したものではない。

【0057】

（実施例１）ナノワイヤ配列

本実施例は、ナノワイヤアセンブリの例示的配列を説明している。図３を参照のこと。

20

【0058】

ナノワイヤ配列８０は、基板８４に支持された複数のナノワイヤアセンブリ８２を含むことができる。ナノワイヤアセンブリは、ここで示すように、基板上で直線配列、かつ／または２次元（もしくは３次元）配列で配置することができる。

【0059】

各ナノワイヤアセンブリは、間隔を置いて配置した電極８８の間に延びているナノワイヤ８６を含むことができる。ナノワイヤは電極に電氣的に結合させることができ、それによって電流はナノワイヤを通して電極間を通ることができる。例示的な電極は、導電性材料、一般的には（１つまたは複数の）導電性の金属または金属合金で形成することができる。例示的な実施形態では、電極は金で形成することができる。電極は、ナノワイヤの配置前または後に基板上に形成することができる。例示的な実施形態では、電極はフォトリソグラフィおよび／またはイオンビームリソグラフィによって形成することができる。

30

【0060】

基板は、あらゆる適切な構成および構造を有することができる。いくつかの実施形態では、基板は全体的に平面であってもよく、半導体層（シリコンなど）の上に配置された電気絶縁層（二酸化ケイ素など）を含むことができる。半導体層は、ナノワイヤアセンブリが電界効果トランジスタ（ＦＥＴ）として機能し、電極はソースおよびドレインとして働くとき、バックゲート電圧を印加するために使用される。

【0061】

各ナノワイヤアセンブリは、ナノワイヤに結合された核酸９２を含むことができる。核酸は、プローブ９４（プライマなど）、およびプローブと塩基対になった検体９６（テンプレートなど）を含むことができる。アセンブリ（または、２つ以上のアセンブリのサブセット）は、本例示に示すように、同じプローブを含むことができ、または異なるプローブを含むことができる。アセンブリ（または、２つ以上のアセンブリのサブセット）は、本例示に示すように、同じ検体（または、検体領域）、または異なる検体を含むことができる。

40

【0062】

（実施例２）ナノワイヤへの核酸の結合

本実施例は、ナノワイヤへ核酸を結合させる例示的な方法を記載している。図４および５を参照のこと。

50

【0063】

図4は、106の矢印で示すように、テンプレート104を受けるように準備されたナノワイヤアセンブリ102の例示的配列100を示している。各ナノワイヤアセンブリは、ナノワイヤ108、およびナノワイヤに結合された異なるプローブ110を含むことができる。プローブは、ナノワイヤが配列に配置される前または後にナノワイヤに結合することができる。テンプレート104は、配列と接触して配置し、プローブとハイブリッド形成することが可能であり、かつ／またはナノワイヤに直接結合させることが可能である。したがって、プローブはテンプレートおよび非テンプレート種の核酸混合物から相補的テンプレートを選択するように構成することができる。ハイブリダイゼーション後、対になっていないテンプレート（および非テンプレート種）を取り除くことができる。

10

【0064】

図5は、126の矢印で示すように、プライマ124を受けるように準備されたナノワイヤアセンブリ122の例示的配列120を示している。各ナノワイヤアセンブリは、ナノワイヤ128、およびナノワイヤに結合された異なる（または同じ）テンプレート130を含むことができる。テンプレートは、ナノワイヤが配列に配置される前または後にナノワイヤに結合することができる。プライマ124は、配列と接触して配置し、テンプレートとハイブリッド形成することが可能であり、かつ／またはナノワイヤに直接結合することが可能である。したがって、テンプレートはプライマ混合物から相補的プライマを選択するように構成することができる。ハイブリダイゼーション後、対になっていない（例えば、過剰な）プライマ分子を取り除くことができる。

20

【0065】

（実施例3）ナノワイヤベース配列決定システム

本実施例は、ナノワイヤベース配列決定装置、方法、およびデータを含む例示的システムを記載している。図6～8参照のこと。

【0066】

ナノワイヤベース配列決定システム140は、ナノワイヤアセンブリ148の配列146を保持する反応区画144と流体連通する試薬運搬システム142を含むことができる。システムはまた、ナノワイヤアセンブリの配列に電気的に結合された（結合可能な）検出器150と、検出器および試薬運搬システムと流体連通する制御装置152とを含むことができる。

30

【0067】

試薬運搬システム142は、配列146と接触するように反応区画144を通して流体を移動させるように構成されている。したがって、試薬運搬システムはそれぞれDNAポリメラーゼ分子164と共に水溶液内に配置された、4つの異なるヌクレオシド三リン酸（dNTP）156、158、160および162などの核酸の共有結合修飾用の複数の流体試薬154を含むことができる。流体試薬はまた、例えば、ナノワイヤアセンブリと接触した後に、反応区画からdNTP試薬を洗うのに使用することができる、洗浄試薬166を含むことができる。流体試薬の移動は、例えば、流体試薬の下流側に配置されたポンプ168によって駆動することができる。ポンプは、反応区画へ（かつこれを通して）各流体試薬を駆動することができる。流体試薬は、試薬リザーバ172と反応区画の間に配置された弁170の選択開閉に応じて選択することができる。試薬運搬システムは、試薬リザーバ、反応区画、反応区画の下流側に配置された排水リザーバ174、およびこれらの構造の間に延びるか／またはこれらの構造を画定する経路176を含む、流体を保持するための複数の区画を画定することができる。いくつかの実施例では、試薬運搬システムは平面基板上に配置することができ、流体を保持かつ担持するマイクロ流体（またはより大きい）通路が、基板に当接された流体層によって平面基板にかつ／またはその上に形成されている。

40

【0068】

ナノワイヤ配列146は、プライマ180と塩基対になったテンプレート178に対応する核酸にそれぞれ結合されたナノワイヤアセンブリを含むことができる。動作において

50

、ヌクレオチド付加試薬 1 5 6 ~ 1 6 2 は反応区画に個別に分配することができる。各付加前、その間、かつ／またはその後、検出器は各ナノワイヤアセンブリの伝導性を測定することができ、各ヌクレオチドがテンプレートの配列に基づきプライマに付加されたかどうか、または付加された場合、いくつのサブユニットが付加されたかを判断することが可能になる。

【0069】

図7は、図6で示す配列決定システムで行うことができる、核酸テンプレートの配列決定の例示的な方法200を示している。この方法は、202で示す、ナノワイヤアセンブリを提供する段階を含むことができる。ナノワイヤアセンブリは、ナノワイヤ、テンプレート、およびテンプレート用プライマを含むことができる。ナノワイヤアセンブリは、アセンブリの配列の一部であってもよい。この方法は、204で示す、ナノワイヤアセンブリをヌクレオチド付加試薬と接触させる段階を含むことができる。ヌクレオチド付加試薬は例えば、ポリメラーゼおよびヌクレオシド三リン酸を含むことができる。この方法は、206で示す測定する段階を含むことができる。測定は、1つまたは複数のヌクレオチドが各ナノワイヤアセンブリに（共有結合的に）付加されたかどうかを判断するように、接触させる段階前、その間、かつ／またはその後、各ナノワイヤアセンブリの電気特性を検出することができる。接触させる段階および測定する段階は、208で示すように、他のヌクレオチド試薬（または、そのサブセットのみ）で繰り返すことができる。いくつかの実施例では、4つの異なるヌクレオチド試薬（または、2つの知られている単一ヌクレオチド多型性に対応する2つの異なるヌクレオチド試薬などの、その適切なサブセット）がそれぞれナノワイヤアセンブリに別々に接触するまで、これらの段階を繰り返すことができる。プライマの端部にすぐ隣接したテンプレートの単一のヌクレオチド位置のみに関心がある場合、方法は210で示すように終了することができる。しかし、制御装置がテンプレートの追加のヌクレオチド位置に関する配列情報を得るためにさらにテンプレートを配列決定することができるかつ／または配列決定すべきであると判断した場合、接触、測定、および繰り返し段階は、もう1つ追加のサイクル中に、212で示すように再び行うことができる。

【0070】

図8は、図7の方法200を使用して得ることができる例示的データを示している。4つのdNTP（ポリメラーゼを含む）はそれぞれ、220で示すように、1対のナノワイヤアセンブリ222に段階的に分配される。グラフ224は、228で示される各付加後に測定される伝導性に対して、226で示される分配された各ヌクレオチド試薬を描いている。特定のヌクレオチドとの接触中かつ後の伝導性の増加は、テンプレートストランド内の対応する位置での、特定のヌクレオチドと相補的な相手ヌクレオチドを示す。増加の大きさは、どれだけのヌクレオチドサブユニットが結合されたかを示し、増加はナノワイヤアセンブリの各プライマ分子に結合されたヌクレオチドサブユニットの数にほぼ比例している。したがって、230で示す上側の図は、AGGTTCAAの共有結合付加を示し、232で示す下側の図はGAGTCCAの共有結合付加（したがって、テンプレートの対応する領域での相補的配列の存在）を示す。

【0071】

（実施例4）ライゲーションを利用したナノワイヤベース分析

本実施例は、ナノワイヤに関連した核酸のライゲーションを使用した核酸分析を記載している。図9参照のこと。

【0072】

人間は実質的に同一のゲノムを有する。したがって、母集団内の配列変異の位置（例えば、単一ヌクレオチド多型性）を利用して、特に、個体または血統を（例えば、法医学的目的で）特定し、遺伝子的疾病もしくは状態を診断し、および／または治療計画に対する反応を予測する（例えば、薬剤の選択を容易にする）ことができる。ライゲーションベース分析は、母集団の配列変異の個別の位置を配列決定するのに適している可能性がある。特に、ライゲーションベース分析は、母集団の個体中の知られている変異のヌクレオチド

位置の配列決定を可能にするプローブを発生させるように、核酸検体の多く知られている配列を利用することができる。

【0073】

図9は、ライゲーションを使用したナノワイヤベース配列決定方法のフローチャート250、およびこの方法を使用して得ることができる例示的データを示している。

【0074】

ナノワイヤアセンブリ252、254を設けることができる。アセンブリは、ナノワイヤ256、および各ナノワイヤに結合された異なるプローブ258、260を含むことができる。プローブは、人間母集団内のヌクレオチド配列変異の領域を含むことができる。特に、プローブ（または、その領域）は1つ（またはいくつかの）ヌクレオチドのみによって異なることができ、各プローブは母集団の多型性の異なる配列変種（sequence version）に対応している。さらに、プローブ間の配列の違いをプローブの端部に、またはその近くに配置することができ、それによってテンプレートとのプローブの非対合がプローブの端部で起こる。

【0075】

（母集団内に）多型性ヌクレオチド264を有するテンプレート262は、266に示すようにナノワイヤアセンブリに接触することができる。テンプレートは、核酸二本鎖268、270を形成するように、各プローブと塩基対になることができる。しかし、プローブ258は272に示すように二本鎖268内で部分的に対合されない可能性がある。というのは、このプローブは多型性ヌクレオチドとの塩基対を形成しないからである。プローブ260は、274に示すように二本鎖270内のテンプレートと完全に対合される。というのは、このプローブは多型性ヌクレオチドとの塩基対を形成するからである。

【0076】

伸張した核酸276およびリガーゼ酵素は、278で示すように、ナノワイヤアセンブリと接触することができる。伸張した核酸は、各プローブに隣接する位置でテンプレートと対になるように構成された（5'-リン酸化）オリゴヌクレオチドであってもよい。したがって、アセンブリ283内のプローブ260の伸張変種（extended version）であるライゲーション生成物282を生成するように、伸張した核酸およびプローブの併置端部を280で示すようにリガーゼ酵素によって結合することができる。しかし、伸張した核酸およびプローブ258の端部は、アセンブリ284内の十分なライゲーションのために実質的には併置されていない。

【0077】

285に示すように、核酸二本鎖を解離することができる。この解離は、元のプローブ258およびライゲーション生成物282をそれぞれのナノワイヤに結合させたまま、テンプレートを両方のナノワイヤから、かつ（非ライゲーション）伸張した核酸を上側ナノワイヤのみから解放することができる。

【0078】

ナノワイヤの伝導性は、それぞれ286および288に示すように、一連の動作前後に検査することができる。得ることができる例示的データが、グラフ290に示されている。プローブ258はライゲーションによって長くならず、したがって関連するナノワイヤの伝導性は292に示すように変わらない。プローブ260はライゲーションによって延長され、したがって関連するナノワイヤの伝導性は294に示すように大きくなる。

【0079】

上に示した方法は、様々な方法で変更することができる。例えば、単一プローブを異なる伸張で順次使用することができる。特に、プローブは多型性ヌクレオチドに隣接したテンプレートとハイブリッド形成することができ、その後、多型性ヌクレオチドの異なる変種とハイブリッド形成する異なる電位の伸張した気質が別個に付加されてよく、プローブにライゲーションされる能力を検査することができる。

【0080】

ライゲーション状態の別の例示的議論、およびライゲーションの他の態様が、例えば、

10

20

30

40

50

本明細書に参照として組み込まれる米国特許第 6 5 1 1 8 1 0 号（第 1 7 欄、5 8 行目から第 1 8 欄、4 7 行目までなど）に記載されている。

【0081】

（実施例 5）切断でのナノワイヤベース分析

本実施例は、ヌクレアーゼでの核酸の選択的切断を使用した例示的なナノワイヤベースシステムを記載している。図 1 0 参照のこと。

【0082】

別個の核酸二本鎖 3 0 4、3 0 6 を含むナノワイヤアセンブリ 3 0 0、3 0 2 は、ヌクレアーゼを使用して、3 0 8、3 1 0 に示すように、二本鎖の異なる切断によって区別することができる。ヌクレアーゼは、一次配列、塩基対不一致、非対端部、二本鎖の存在、二本鎖の不在、および／またはその他により二本鎖を選択的に切断することができる。プローブ 3 1 2、3 1 4 の異なる切断は、別個の二本鎖解離段階があってもなくてもナノワイヤアセンブリの伝導性を測定することによって検出することができる。いくつかの実施例では、プローブの適当な選択により、本例示に示すように、切断を二本鎖の切断誘導不安定化として検出することが可能になる。

【0083】

（実施例 6）ナノワイヤに対する核酸の例示的な結合

本実施例は、各核酸に沿った 2 つ以上の位置でのナノワイヤに対して核酸を結合させる例示的方法を記載している。図 1 1 参照のこと。

【0084】

各核酸（すなわち、検体および／またはプローブ）は、核酸に沿って 1 つまたは複数の位置でナノワイヤに結合することができる。いくつかの実施例では、核酸は 2 つ以上の間隔を置いて配置した（すなわち、核酸の 1 つまたは複数のヌクレオチド分だけ離れた）位置で結合することができる。多数の位置での結合は、単一の部位での結合よりも、ナノワイヤにより平行である配向に核酸を制約することができる。したがって、多数の結合位置の使用により、核酸の異なる領域に対してナノワイヤから間隔を置いた小さな変異で、ナノワイヤのより近くに核酸を位置決めすることができる。核酸をナノワイヤにより近くに、より制約した構成で配置することによって、電気特性の変化を測定することができる感度を大きくすることができ、また核酸の異なる領域に対して測定される変化のばらつきを小さくすることができる。その結果、核酸分子毎の多数の結合部位の使用により、特に（1）各検体に対するより多くの配列情報（すなわち、より長い読取）、（2）ナノワイヤ毎のより少ない検体分子での配列分析、および／または（3）検体のより一貫した配列分析などの、単一位置結合を凌ぐいくつかの利点が可能になる。

【0085】

図 1 1 は、核酸に沿った 2 つ以上の位置（例えば、位置 3 5 6、3 5 8）でのアセンブリのナノワイヤ 3 5 4 への核酸 3 5 2（検体および／またはプローブ）の分子の結合中の例示的なナノワイヤアセンブリ 3 5 0 を示している。各結合位置は、特異結合対 3 6 0 によって形成することができる（上記セクション I I I 参照）。例えば、ナノワイヤ 3 5 4 は第 1 の結合部位 3 6 2 に連結することができ、核酸 3 5 2 は第 1 の結合部位に特異結合する第 2 の結合部位 3 6 4 に連結することができる。核酸の各分子は、核酸に沿って 2 つ以上の結合位置を提供するように、第 2 の結合部位の 2 つ以上の部分に連結する（または、一体的に含まれる）ことができる。前記部分は、ナノワイヤへの核酸の 2 つ以上の別個の領域の連結を容易にするために、互いに間隔を置いて配置されてよく、例えば核酸の対向端部にほぼ向かって配置されてよい。例示的な第 1 および第 2 の結合部位はそれぞれ、特に（1）ストレプトアビジンおよびビオチン、（2）ビオチンおよびストレプトアビジン、および／または（3）相補的核酸を含むことができる。塩基対合が 2 つ以上の間隔を置いた位置でナノワイヤに核酸を結合させるために使用される場合、核酸自体の間隔を置いた領域を塩基対合相互作用に使用することができる。間隔を置いた領域の 1 つまたは複数に配置された（かつ、ナノワイヤにより直接連結された）塩基対相手はまた、プローブ／プライマとして働くことができ、または個別のプローブ／プライマは核酸とハイブリッ

ド形成させることができる。

【0086】

上記開示は、独立した使用で多数の個別の発明を含むことができる。これらの発明はそれぞれ（1つまたは複数の）形態で開示されているが、本明細書で開示および例示したその特定の実施形態は限定的な意味で考えられるべきものではない。というのは、多くの変更が可能であるからである。発明の主題は、本明細書に開示された様々な要素、特性、機能、および／または性状の全ての新規かつ非自明の組合せおよびサブコンビネーションを含む。特許請求の範囲は特に、新規かつ非自明であるとみなされる特定の組合せおよびサブコンビネーションを指摘している。特性、機能、要素、および／または性状の他の組合せおよびサブコンビネーションで具体化された発明は、これによる優先権を主張する応用例、または関連する応用例で請求することができる。このような特許請求の範囲はまた、異なる発明または同じ発明を対象としているかどうか、かつ元の特許請求の範囲より広いのか、狭いか、同一であるか、または異なるかどうかに関わらず、本開示の発明の主題内に含まれるとみなされる。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1】本教示の態様による、核酸のナノワイヤベースの検出および／または分析用の例示的なシステムの略図である。

【図2】本教示の態様による、核酸のナノワイヤベース分析の例示的な方法のフローチャートである。

【図3】本教示のシステムに含むことができるナノワイヤアセンブリの例示的配列の多少概略的な図である。

【図4】本教示の態様による、ナノワイヤアセンブリの配列を作り出すように、ナノワイヤにテンプレートを結合する例示的な手法の多少概略的な図である。

【図5】本教示の態様による、ナノワイヤアセンブリの配列を作り出すように、ナノワイヤにプライマを結合させる例示的な手法の多少概略的な図である。

【図6】本教示の態様による、核酸のナノワイヤベース配列決定のための例示的システムの多少概略的な図である。

【図7】本教示の態様による、核酸のナノワイヤベース配列決定のための例示的方法のフローチャートである。

【図8】本教示の態様による、ナノワイヤアセンブリの配列を使用した核酸配列決定の例示的な手法、およびこの手法で得ることができる例示的なデータのグラフの多少概略的な図である。

【図9】本教示の態様による、ライゲーションを使用した核酸のナノワイヤベース分析の例示的方法の多少概略的なフローチャートである。

【図10】本教示の態様による、切断を使用した核酸のナノワイヤベース分析の例示的方法の多少概略的なフローチャートである。

【図11】本教示の態様による、核酸に沿った2つ以上の間隔を置いた位置でのアセンブリのナノワイヤへの核酸（検体および／またはプローブ）の結合中の例示的なナノワイヤアセンブリの多少概略的な図である。

【符号の説明】

【0088】

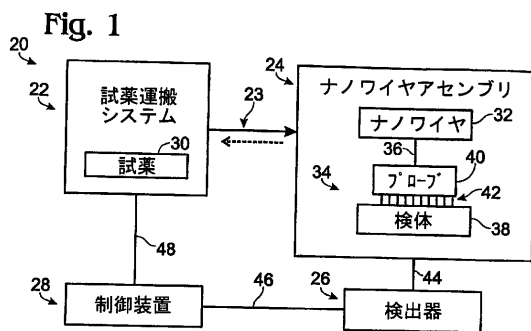
- 20 システム
- 22 試薬運搬システム
- 23 ナノワイヤアセンブリ
- 24 ナノワイヤアセンブリ
- 26 検出器
- 28 制御装置
- 30 試薬
- 32 ナノワイヤ

3 4	核酸	
3 6	ナノワイヤ	
3 8	検体	
4 0	プローブ	
4 2	検体	
4 4	ナノワイヤ	
4 6	検出器	
4 8	試薬運搬システム	
8 0	ナノワイヤ配列	
8 2	ナノワイヤアセンブリ	10
8 4	基板	
8 6	ナノワイヤ	
8 8	電極	
9 2	核酸	
9 4	プローブ	
9 6	検体	
1 0 0	配列	
1 0 2	ナノワイヤアセンブリ	
1 0 4	テンプレート	
1 0 8	ナノワイヤ	20
1 1 0	プローブ	
1 2 0	配列	
1 2 2	ナノワイヤアセンブリ	
1 2 4	プライマ	
1 2 8	ナノワイヤ	
1 3 0	テンプレート	
1 4 0	システム	
1 4 2	試薬運搬システム	
1 4 4	反応区画	
1 4 6	配列	30
1 4 8	ナノワイヤアセンブリ	
1 5 0	検出器	
1 5 2	制御装置	
1 5 4	流体試薬	
1 5 6	ヌクレオシド三リン酸	
1 5 8	ヌクレオシド三リン酸	
1 6 0	ヌクレオシド三リン酸	
1 6 2	ヌクレオシド三リン酸	
1 6 4	DNAポリメラーゼ分子	
1 6 6	洗浄試薬	40
1 6 8	ポンプ	
1 7 0	弁	
1 7 2	試薬リザーバ	
1 7 4	排水リザーバ	
1 7 6	経路	
1 7 8	テンプレート	
1 8 0	プライマ	
2 2 2	ナノワイヤアセンブリ	
2 5 2	ナノワイヤアセンブリ	
2 5 4	ナノワイヤアセンブリ	50

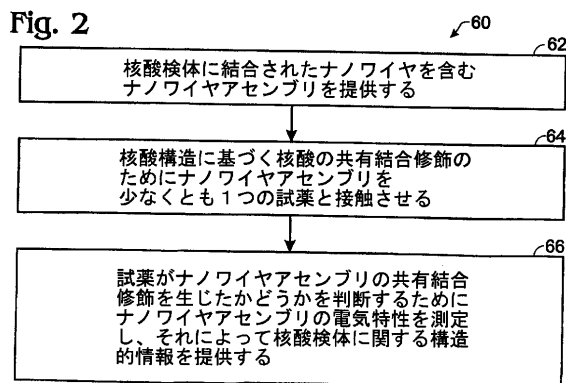
2 5 6 ナノワイヤ
 2 5 8 プロブ
 2 6 0 プロブ
 2 6 2 テンプレート
 2 6 4 多型性ヌクレオチド
 2 6 8 核酸二本鎖
 2 7 0 核酸二本鎖
 2 7 6 核酸
 2 8 2 ライゲーション生成物
 2 8 3 アセンブリ
 3 0 0 ナノワイヤアセンブリ
 3 0 2 ナノワイヤアセンブリ
 3 0 4 核酸二本鎖
 3 0 6 核酸二本鎖
 3 5 0 ナノワイヤアセンブリ
 3 5 2 核酸
 3 5 4 ナノワイヤ
 3 6 2 結合部材
 3 6 4 結合部材

10

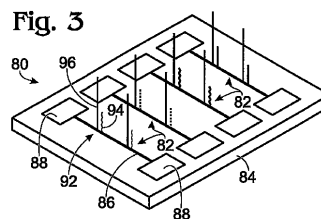
【図 1】



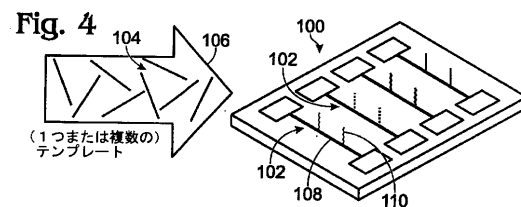
【図 2】



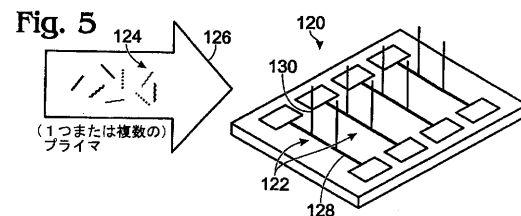
【図 3】



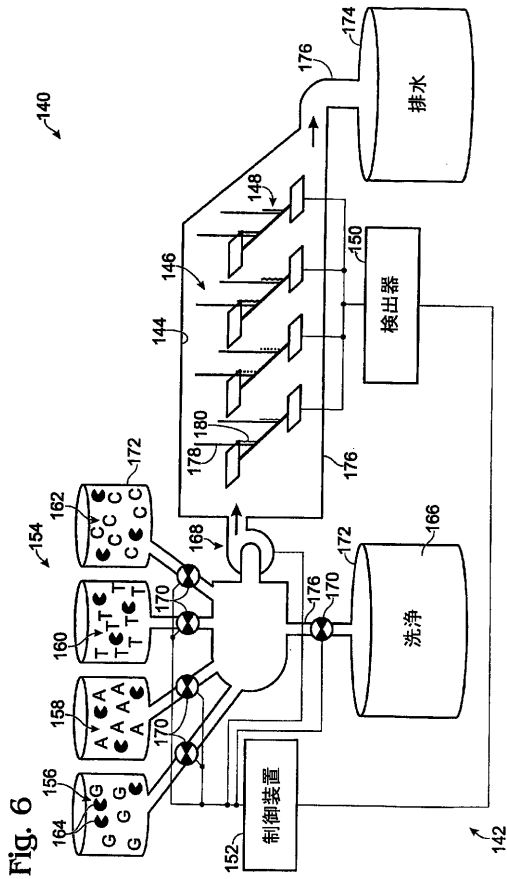
【図 4】



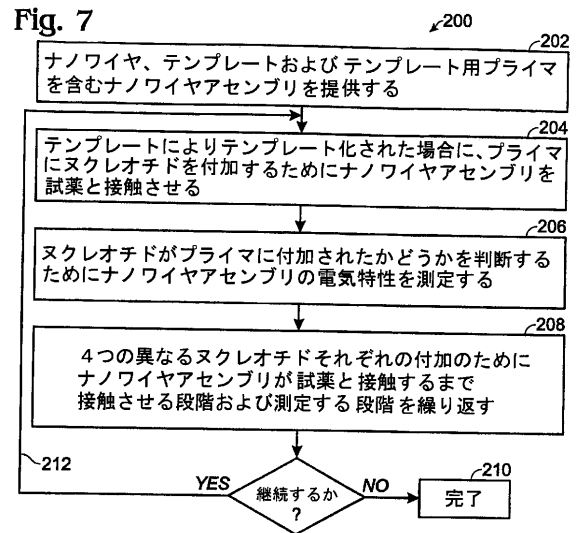
【図 5】



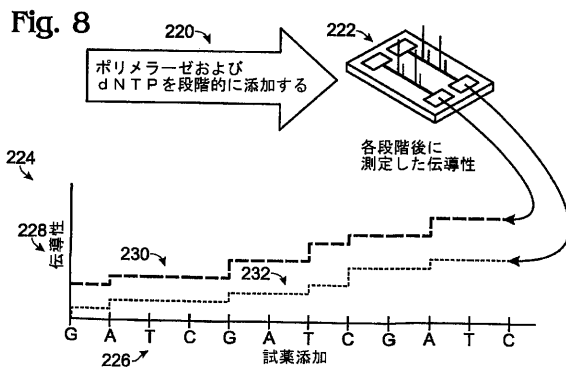
【図 6】



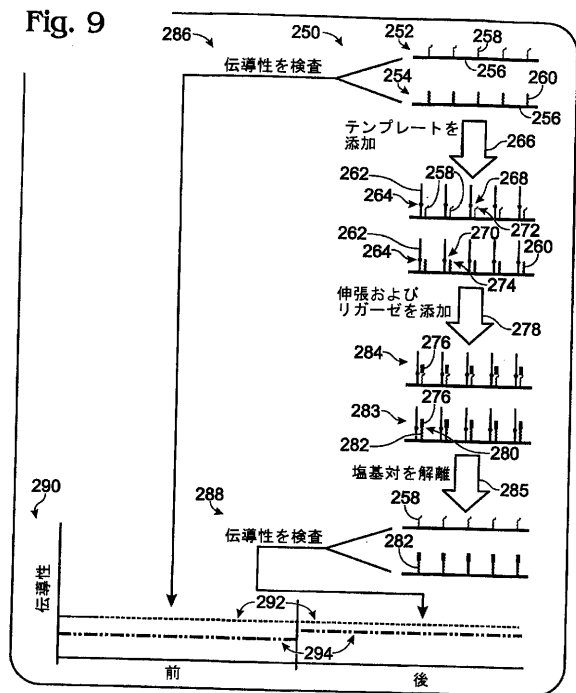
【図 7】



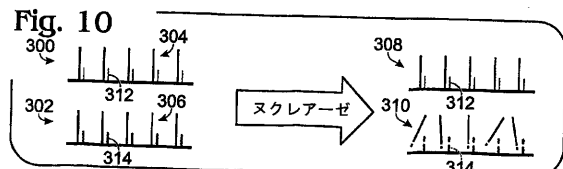
【図 8】



【図 9】

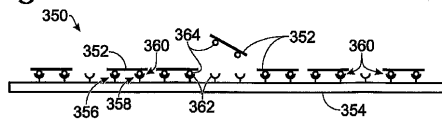


【図 10】



【図 11】

Fig. 11



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/011806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/31183 A (BIOFORCE LABORATORY, INC; HENDERSON, ERIC; MOSHER, CURTIS) 18 April 2002 (2002-04-18) example 3	1-20
X	WO 2004/027093 A (THE CHANCELLOR, MASTER AND SCHOLARS OF THE UNIVERSITY OF OXFORD; MIR,) 1 April 2004 (2004-04-01) claims 30,39,43,45,48,51,76,81,82	1-20
X	WO 2004/003535 A (NANOSYS INC; PONTIS, GEORGE; STONAS, WALTER; CHOW, CALVIN; PARCE, WALL) 8 January 2004 (2004-01-08) paragraphs [0006], [0104], [0106]; figure 2	1-20
A	WO 03/100096 A (INTEL CORPORATION) 4 December 2003 (2003-12-04) abstract	1-20
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 August 2006		Date of mailing of the international search report 06/09/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Knudsen, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/011806

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0231183	A	18-04-2002	AU 1158702 A	22-04-2002
			CA 2425412 A1	18-04-2002
			CN 1468316 A	14-01-2004
			EP 1330536 A1	30-07-2003
			JP 2004511762 T	15-04-2004
WO 2004027093	A	01-04-2004	AU 2003267583 A1	08-04-2004
			EP 1556506 A1	27-07-2005
			US 2005244863 A1	03-11-2005
WO 2004003535	A	08-01-2004	AU 2003258969 A1	19-01-2004
WO 03100096	A	04-12-2003	AU 2003228627 A1	12-12-2003
			CN 1653194 A	10-08-2005
			EP 1513950 A1	16-03-2005
			JP 2005526512 T	08-09-2005
			US 2003215816 A1	20-11-2003
			US 2004209280 A1	21-10-2004
			US 2005026163 A1	03-02-2005

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ホンギェ・スン
アメリカ合衆国・カリフォルニア・94404・サン・マテオ・アンカー・ロード・425・#1
04

(72)発明者 スティーヴン・フン
アメリカ合衆国・カリフォルニア・94306・パロ・アルト・アドビ・プレイス・420

(72)発明者 サム・リー・ウー
アメリカ合衆国・カリフォルニア・94061・レッドウッド・シティ・カルロス・アヴェニュー
・450

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB20 CC01 CC02 FA15
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR50 QR55 QR59
QR62 QS25 QS32 QX01 QX04