

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4308320号
(P4308320)

(45) 発行日 平成21年8月5日(2009.8.5)

(24) 登録日 平成21年5月15日(2009.5.15)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00
B 0 1 J 3/00 (2006.01)	B 0 1 J 3/00 A
B 0 1 J 19/00 (2006.01)	B 0 1 J 19/00 J
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z

請求項の数 38 (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願平8-527072	(73) 特許権者	509025658
(86) (22) 出願日	平成8年3月7日(1996.3.7)		ビービーアイ バイオセック インコーポ レーテッド
(65) 公表番号	特表平11-501808		アメリカ合衆国 マサチューセッツ ウェ スト ブリッジウォーター ウェスト ス トリート 375
(43) 公表日	平成11年2月16日(1999.2.16)	(74) 代理人	100075258
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/003232		弁理士 吉田 研二
(87) 国際公開番号	W01996/027432	(74) 代理人	100096976
(87) 国際公開日	平成8年9月12日(1996.9.12)		弁理士 石田 純
審査請求日	平成15年3月3日(2003.3.3)	(72) 発明者	ローガン ジェームス エイ ジュニア
(31) 優先権主張番号	08/399,606		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ ィンチェスター チェスターフォード ロ ード 6
(32) 優先日	平成7年3月7日(1995.3.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	08/472,304		
(32) 優先日	平成7年6月7日(1995.6.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 圧力サイクリング反応器

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 可逆的不活性化圧力 $P_{i,x}$ の試料容器内で試料混合物を供給する工程を備え、前記試料混合物は、酵素と前記酵素の基質とを含有しており、さらに、
 (ii) 前記試料混合物を活性化圧力に晒す工程と、
 (iii) 前記活性化圧力が、期間 $t_{a,y}$ だけ維持される工程と、
 (iv) 前記試料混合物を不活性化圧力に晒し、それによって酵素反応を調節する工程とを備え、前記酵素がラムダエキソヌクレアーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼ Hind III の内の少なくとも1つから選択されることを特徴とする酵素反応調節方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法において、前記不活性化圧力が前記工程(i)において $P_{i,x}$ であり、その圧力では、酵素反応工程が可逆的に阻害され、前記活性化圧力が前記工程(ii) , (iii) において $P_{a,y}$ であり、その圧力では、前記酵素反応工程を実施可能であり、前記工程(ii) は、期間 $t_{a,y}$ で、圧力を $P_{a,y}$ まで変化させる工程を備え、前記不活性化圧力が前記工程(iv) において $P_{i,z}$ であり、その圧力では、追加される酵素反応工程が可逆的に阻害され、前記工程(ii) は、期間 $t_{i,z}$ で、圧力を $P_{i,z}$ まで変化させる工程を備え、 x はゼロ以上の整数であり、 y は1以上の整数であり、 z は1以上の整数であり、それによって、前記酵素反応を調節することを特徴とする方法。

【請求項3】

請求項 1 に記載の方法において、前記期間 $t_{a,y}$ が、単一酵素事象の平均的長さに対応する期間であることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法において、前記酵素が分布特性を有することを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法において、前記酵素が進行的特性を有することを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法において、前記基質が、前記試料容器内で固定化され、工程 (iv) の後に、前記試料容器圧力を維持しながら、前記試料容器から前記試料混合物の成分を除去する工程をさらに備えることを特徴とする方法。

10

【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法において、前記除去成分が、制限エンドヌクレアーゼ、制限エンドヌクレアーゼ開裂生成物、エキソヌクレアーゼ、ヌクレオチドまたはその組み合わせから成る群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の方法において、前記除去成分が前記試料容器から除去される時、前記試料混合物を分離する半透性物質を通過することを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の方法において、工程 (iv) の後、前記試料混合物の成分の特性を検出する工程をさらに備えることを特徴とする方法。

20

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法において、前記特性が、放射能、蛍光、化学発光、分子イオンチャージ/質量比、電気化学電位、発光、表面プラスモン共振、および赤外吸収から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 3 に記載の方法において、前記基質が核酸であり、前記酵素が制限エンドヌクレアーゼ Hind III であり、少なくとも 1 つの開裂フラグメントが前記核酸基質から開裂されることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 3 に記載の方法において、前記基質が、前記試料容器内で固定化された核酸であり、前記酵素が ラムダ エキソヌクレアーゼであり、少なくとも 1 つのヌクレオチドが前記核酸基質から開裂されることを特徴とする方法。

30

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法において、前記核酸が、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、二本鎖および一本鎖領域の両方を含む DNA、および RNA から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 1 に記載の方法において、前記基質が第 1 の基質であり、第 2 の基質をさらに備え、前記酵素が前記第 1 の基質を前記第 2 の基質に 結合させることを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の方法において、前記基質がキラルまたはプロキラル官能基を有する化合物であり、前記酵素が鏡像体特異的に前記基質上で作用することを特徴とする方法。

40

【請求項 16】

請求項 1 に記載の方法において、工程 (i) ないし (iv) における前記酵素が第 1 の酵素であり、工程 (i) ないし (iv) における前記試料混合物が第 1 の試料混合物であり、工程 (iv) の後に以下の工程 (v) ないし (vi) を含み、すなわち、

(v) 試料容器内で第 2 の試料混合物を供給する工程をさらに備え、前記試料混合物が、可逆的不活性化圧力 $P_{i,j}$ で第 2 の酵素を備え、前記第 2 の酵素は、工程 (i) ないし (iv) における前記第 1 の酵素と同一かまたは異なり、前記試料容器は、工程 (i) ないし (iv) における前記試料容器を同一であるか、またはバルブによって前記第 1 の試料容器

50

に連結した第2の試料容器であり、さらに

(vi) 前記第2の試料混合物を可逆的不活性化圧力に晒し、それによって、前記第1および第2の酵素の酵素反応を調節する工程を備えることを特徴とする方法。

【請求項17】

請求項16に記載の方法において、前記第1および第2の酵素が同一酵素であることを特徴とする方法。

【請求項18】

請求項17に記載の方法において、前記基質が前記試料容器内で固定化され、前記第2の酵素が前記第1の酵素とは異なり、工程(iv)と(v)との間に、溶離液で溶離することによって前記試料混合物圧力を維持しながら、前記試料容器から前記第1の酵素を除去する工程をさらに備えることを特徴とする方法。

10

【請求項19】

請求項18に記載の方法において、前記基質が二本鎖核酸であり、前記第1の酵素が5'-3'エキソヌクレアーゼであり、前記第2の酵素が3'-5'エキソヌクレアーゼであり、それによって、前記第1の酵素で配列決定を行って1つ以上のヌクレオチドを同定し、また前記第2の酵素で配列決定を行って1つ以上のヌクレオチドを確認することを特徴とする方法。

【請求項20】

請求項2に記載の方法において、圧力 $P_{i,x}$ での前記試料混合物が温度 $T_{i,x}$ であり、それによって前記酵素が阻害され、圧力 $P_{a,y}$ での前記試料混合物が温度 $T_{a,y}$ であり、それによって前記酵素が活性であり、圧力 $P_{i,z}$ での前記試料混合物が温度 $T_{i,z}$ であり、それによって前記酵素が阻害され、 $T_{i,z}$ および $T_{a,y}$ の各々が $T_{i,x}$ と独立して同じか、または異なることを特徴とする方法。

20

【請求項21】

請求項2に記載の方法において、 $t_{a,y}$ および $t_{i,z}$ の各々が10ミリ秒から250ミリ秒までの範囲であることを特徴とする方法。

【請求項22】

請求項2に記載の方法において、合計($t_{a,y} + t_{a,y} + t_{i,z}$)が1000ミリ秒以下であることを特徴とする方法。

【請求項23】

請求項1に記載の方法において、工程(ii)ないし(iv)が1サイクルであり、工程(ii)ないし(iv)のサイクルを少なくとも49回繰り返す工程をさらに備え、サイクルにおける各々の値 $P_{i,x}$ 、 $P_{i,z}$ 、 $t_{a,y}$ 、 $P_{a,y}$ および $t_{i,z}$ が、他のどのサイクルのそれぞれの値からも独立していることを特徴とする方法。

30

【請求項24】

請求項16に記載の方法において、工程(v)ないし(vi)が1サイクルであり、工程(v)ないし(vi)のサイクルを少なくとも49回繰り返す工程をさらに備えることを特徴とする方法。

【請求項25】

請求項1に記載の方法において、前記試料混合物の圧力を維持しながら、前記試料容器から、前記試料混合物の成分を除去する工程をさらに備えることを特徴とする方法。

40

【請求項26】

請求項1に記載の方法において、前記酵素基質は、核酸であり、前記酵素は、前記核酸基質に作用可能な酵素であることを特徴とする方法。

【請求項27】

請求項26に記載の方法において、前記核酸が二本鎖DNAであることを特徴とする方法。

【請求項28】

請求項26に記載の方法において、前記酵素が進行的特性を有することを特徴とする方法。

50

【請求項 29】

請求項 26 に記載の方法において、反応生成物を検出する工程をさらに備えることを特徴とする方法。

【請求項 30】

請求項 26 に記載の方法において、反応容器温度を調節する工程をさらに備え、前記不活性化圧力状態には、反応容器圧力を前記酵素活性化圧力まで低下させた場合に高レベルの酵素活性を許容する温度が含まれることを特徴とする方法。

【請求項 31】

請求項 30 に記載の方法において、前記反応容器を低い酵素不活性化温度および酵素活性化圧力に維持する工程と、前記圧力を酵素不活性化圧力まで上昇させる工程と、前記温度を酵素活性化温度まで下げる工程と、その後、前記圧力を酵素活性化圧力まで低下させる工程とをさらに備えることを特徴とする方法。

10

【請求項 32】

請求項 31 に記載の方法において、

前記工程 (i) は、

a) 前記酵素を 5 未満の不活性化温度に維持し、それによって、前記酵素を不活性化状態にする工程と、

b) 前記核酸基質を前記不活性化酵素に添加して、反応混合物を生成する工程と、

c) 前記試料容器の圧力を、平方インチあたり 30,000 ポンド (2.07 MPa) よりも高い酵素不活性化圧力まで上昇させる工程と、を備え、

20

前記工程 (ii), (iii) は、

d) 前記試料容器の前記反応混合物の温度を、10 よりも高く上げる工程と、

e) 調節した期間に、前記試料容器の前記圧力を平方インチあたり 20,000 ポンド (1.38 MPa) 未満の酵素活性化圧力まで下げることによって、前記酵素が前記核酸基質に作用するように前記酵素を活性化状態にする工程と、を備え、

前記工程 (iv) は、

f) 前記試料容器の前記圧力を酵素不活性化圧力まで上昇させる工程を備えることを特徴とする方法。

【請求項 33】

請求項 32 に記載の方法において、前記酵素活性化圧力が、平方インチあたり 5,000 ポンド (34.5 MPa) から 15,000 ポンド (1.03 MPa) までの圧力であることを特徴とする方法。

30

【請求項 34】

請求項 32 に記載の方法において、前記酵素活性化温度が、15 から 20 であることを特徴とする方法。

【請求項 35】

請求項 32 に記載の方法において、

g) 工程 c) ないし f) のサイクルを少なくとも 1 回繰り返す工程とを備えることを特徴とする方法。

【請求項 36】

請求項 35 に記載の方法において、工程 e) ないし f) の前記サイクルを少なくとも 5 回繰り返すことを特徴とする方法。

40

【請求項 37】

請求項 26 に記載の方法において、前記酵素不活性化圧力が前記酵素活性化圧力よりも高いことを特徴とする方法。

【請求項 38】

請求項 26 に記載の方法において、前記酵素が分布特性を有することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、一般に、化学反応を行うための装置に関する。本発明は、この装置を用いて、

50

一つ以上の化学反応を連続してコントロールするための方法も提供する。

本発明の背景

化学反応は、例えば、共有結合やイオン結合の形成および開裂；2個以上の化学化合物の会合または解離；ならびに一次、二次、三次または四次構造の変化のような分子相互作用をもたらす。化学反応は、非酵素反応および酵素反応を含む。酵素の存在に関わらず、化学反応は、通常、配座の変化、遷移状態形成、電子または陽子供与/受容、および電子転位を含む幾つかの機械論的工工程または分子相互作用から成る。一般に、一連の化学反応は、有用な化学生成物を供給する。

例えば、分子生物学において、構造および調節遺伝子配列におけるDNAセグメントの機能を探るために、部位突然変異導入により生成される一連の欠失体のセットが使用される。遺伝子内に一連の欠失体を生成することにより、エンハンサー、プロモータ、および調節機能に必要な終端部位のような領域、ならびに、タンパク質の特殊性を定めるドメインのように、構造上の機能を有する領域を細かくマッピングすることが可能となる。例えば、10ないし20塩基対程度の互いに僅かに離れた位置に欠失を生成するのが望ましい。一連の欠失体組を生成する既存の方法は、エンドヌクラーゼ、B a l 3 1, パンクレアチンD N a s e I (D N a s e I) およびエキソヌクラーゼI I I (E x o I I I) を含む種々の核酸分解酵素で二重鎖DNAを消化する。

エンドヌクラーゼを用いて、所与のエンドヌクラーゼのための多重部位を含有する鑄型DNAを部分的に消化する。この方法は、鑄型DNAの範囲内での制限部位に関する事前の知識を必要とする。鑄型DNA上の制限部位は、ランダムに分散していないため、多くの鑄型DNAは、1組の有用な欠失変異体を生成するのに十分な、または適当に間隔を置いた制限酵素部位を含有しない。これは、変異体により調節ドメインの境界を解放するような場合、特に問題となる。

他のエンドヌクラーゼによれば、B a l 3 1が、5'および3'の終端から二重鎖直鎖状DNAを消化する。一連の一方向変異体を作るために、二重鎖鑄型DNA(プラスミド、ファージまたはM13のレプリカ形態)は、ターゲットシーケンスの一端部で開裂する制限酵素により線状にされる。線状になったDNAは、B a l 3 1とともに所定の温度下で保温される。反応時間および酵素の量は、それぞれ、消化の程度および消化速度をコントロールする。最もよく市販されているB a l 3 1の製品は、2つの異なる酵素形態、速い形態と遅い形態であり、後者は、前者のタンパク質分解フラグメントである。消化の程度は、2つの形態の比に依存する。従って、B a l 3 1の各バッチを分析して、好適な消化条件を決定する。

B a l 3 1は、ターゲットDNAとブランキングベクターDNAの両方を同時に消化する進行的(プロセス)加工酵素である。B a l 3 1の活性は、鑄型DNAの一次構造に従って変化する。A-Tリッチ領域は、G-Cリッチ領域よりも速く消化する。切断されたターゲットフラグメントの回収および適当なベクターへのサブクローニングを行う必要がある。進行特性により、種々異なる欠失体を生成することになる。B a l 3 1は、RNAの存在によって抑制されるので消化前に鑄型を精製する必要がある。

第3の酵素、例えばパンクレアチックD N a s e Iが、M n ²⁺またはC o ²⁺のような遷移金属イオンが存在した状態で、両方の鎖のほぼ同じ位置で二重鎖鑄型DNAを切断する。D N a s e Iで凝縮環状(クロズドサークル)DNAと反応することにより1組の直線分子が生成し、これらは、ターゲットDNAをランダムに分散した場所で切断する。出発材料の一部は、線状にされることはない。制限酵素がターゲットシーケンスの一端部で開裂すると、DNAポリメラーゼを用いてシーケンスが修復され、再度環状になる。この技術を用いて回復したクローンの画分をかなり小さくすることができる。D N a s e Iは、例えば、プラスミド、ファージまたはM13ベクターのレプリカ形態に含まれるターゲットDNAに欠失を生成することが可能である「ジー・エフ・ホング(G. F. Hong)、J. Mol. Biol. 158: 539 (1982) およびメソッフ・エンザイモル(Methods Enzymol.) 155: 93 (1987); エス・ラバイト(S. Laibeit)他、メソッフ・エンザイモル(Methods Enzymol.) 15

10

20

30

40

50

5 : 166 (1987)」。。

一連の欠失体の組を生成する方法の一つとして、ExoIII「エル・エイチ・グオ(L. H. Guo)およびアール・ウー(R. Wu)、メソツズ・エンザイモル(Methods Enzymol). 100:60(1983); エス・ヘニコフ(S. Henikoff)、ジーン(Gene)23:351(1984)およびメソツズ・エンザイモル(Methods Enzymol). 155:156(1987)」。ExoIIIは、5'突出末端または平滑末端から3'ないし5'方向に二重鎖DNA分子を消化する。ターゲットの一端部とベクター上のユニバーサルシーケンスプライマのための結合部位との間に開裂部位が存在する2種の制限酵素で二重鎖DNAを消化することにより、一連の欠失体を生成する。ターゲットDNAの最も近くで切断する制限酵素は、平滑末端または5'突出末端のいずれかを生成しなければならない。他の酵素は、3'突出末端を生成しなければならない。ExoIIIは、3'突出末端を有するDNAを消化できないので、二重に制限した分子の消化が一方向に進む。時間の変化に伴うExoIII消化に続いて、例えばマング・ビーン(Mung Bean)ヌクレアーゼ等の一本鎖ヌクレアーゼを用いて一本鎖領域を除去する。DNAは、その後、修復されて、再度環状になる。ExoIII消化の程度は、反応時間の長さを変化することによってコントロールされる。さらに、温度を下げて、消化速度を遅くてもよい。「ジー・マーフィー(G. Murphy)DNAシーケンスプロトコルにおいて(in DNA sequencing protocols, エイチ・ジー・グリフィン(H. G. Griffin)およびエー・エム・グリフィン(A. M. Griffin)、編集、フマナ・プレス(Humana Press)(1993)p. 58」。この方法は、上記条件を満たし、且つターゲットDNAの範囲内で切断しない2個の制限酵素を必要とする。ターゲットDNAが長い場合にこの必要条件を満たすのが困難である。

10

20

発明の要約

本発明は、タイミングを正確に調節して圧力を加えることにより、化学反応、特に酵素反応を好適に同期する方法および装置を特徴とする。開示した装置は、自動化して、一般に迅速に圧力を変化させることが可能である。同様に、これらの圧力変化は、化学反応を調節し、単一の感圧化学事象、例えば、単一アミノ酸またはヌクレオチドの開裂または添加を調節可能である。化学事象の調節および検出は、特に、核酸やポリペプチドのようなヘテロポリマの合成及び特徴づけに特に有用である。

30

本発明は、反応容器圧力のプログラマブル変動を生じる圧力サイクリング反応器を特徴とする。圧力サイクリング反応器は、数百ミリ秒以下で達成できるおよそ10,000psiから30,000psi以上の容器圧力の最終的変化等の迅速なプログラマブル変動が可能であることが好ましい。1つの圧力と別の圧力との間の遷移時間は250ミリ秒、150ミリ秒、100ミリ秒、50ミリ秒、または30ミリ秒以下であってもよい。

連続して変化する間、圧力を調節する。例えば、第1の圧力 P_1 は、反応阻害圧力であり、これは、第2の圧力 P_2 、すなわち反応許容または可能圧力に変化可能である。許容圧力は、調節した期間に、維持される。その後、圧力は、反応阻害圧力である第3の圧力 P_3 に変化する。いくつかの実施形態では、反応混合物圧力を P_1 、 P_2 または P_3 のいずれかに維持しながら、反応混合物成分を添加し、除去する。

40

圧力パルスまたは圧力サイクルは、(i)第1の圧力から第2の圧力への変化、(ii)期間中における第2の圧力の維持、(iii)第2の圧力から第3の圧力への変化を含む事象である。第1の圧力および第3の圧力は、実質的に異なってよく、また実質的に同一であってもよい。第2の圧力は、反応容器の内容物に望ましい態様で影響を及ぼすのに十分な圧力であり、これによって、通常、反応または反応工程が生じる。

本発明によれば、圧力サイクリング反応器は、試料を入れるための反応容器と、反応容器に連結した容器加圧器と、加圧器へのシグナルにより反応容器内を反応不活性化圧力に維持し、加圧器へのシグナルにより所定の短くパルスした期間に反応容器の圧力を反応活性化圧力に変化させた後、反応容器の反応不活性化圧力にリサイクルするためのコントローラとを備える。

50

本発明の特定の実施形態においては、加圧器が、およそ250ミリ秒未満で、20,000 psiよりも高く圧力を変化させる。容器加圧器は、コントローラにตอบสนองして反応容器と連通するように反応容器に連結した圧力室、例えば空気ポンプシリンダと、圧力源に連結した圧力伝送器、例えば空気シリンダとを備える。圧力室は、可変容積を有し、圧力室の位置は、圧力伝送器によって調節され、圧力室の容積を調節する。

リリースバルブを用いて、圧力伝送器の圧力を急速に調整し、それによって反応容器内で圧力パルスを発生する。圧力室アウトレットバルブが、圧力室と反応容器との間に位置決めされる。反応容器と連通する流体源と、圧力室との間に、圧力室インレットバルブが位置決めされる。流体源は、貯蔵室圧力源に連結するための流体貯蔵室と、貯蔵室調節バルブとを備え、圧力室を介して、流体貯蔵室から反応容器に流体を移動し、その間、反応容器の圧力を調節する。貯蔵室の流体の温度は、流体貯蔵室に連結した温度センサと、貯蔵容器加熱および/または冷却源によって調節される。反応容器の温度は、反応容器に連結した温度センサと、反応容器加熱および/または冷却源によって調節される。コントローラは、圧力センサが反応容器に連結した状態で、反応容器の圧力をモニタする。圧力レギュレータは、圧力室の圧力を調整し、コントローラは、圧力センサからのフィードバックを利用して、圧力レギュレータを調節する。

第2の容器加圧器を反応容器に連結し、それによって、反応容器の圧力が調節される間、反応容器から流体を除去する。反応容器と第2の容器加圧器との間には、インレットバルブが配置されている。第2の容器加圧器と第2の流体貯蔵室との間には、アウトレットバルブが配置されている。第2の貯蔵室コントロールバルブは、第2の流体貯蔵室に連結されている。コントローラは、所定組の格納信号により、複数個のバルブを調節する。その信号はバルブを調節して、少なくとも1つの加圧した試薬流体を反応容器に添加し、また少なくとも1つの加圧した反応流体を反応容器から除去し、その間、反応容器には圧力をかけたままである。検出器、例えば、放射性同位元素検出器、赤外分光計、質量分析計、ガスクロマトグラフィー質量分析計、分光光度計、分光蛍光計、電気化学検出器、表面プラズモン共振検出器または光度計は、反応容器内の流体中に存在するか、または反応容器から除去した成分の特性を検出する。

反応容器は、抑制部、例えば、反応容器を2つの部分に分割する半透性バリアを備え、容器から流体を除去しながら、反応容器内で固定化試薬、例えば、非液体支持部に装着した有機化合物を保持する。

本発明は、さらに、試料の温度および圧力状態を調節することにより、試料の活性を断続的に阻害するための反応器を提供し、この反応器は、試料室と連通し、試料の活性を阻害するために選択した資料室に第1の所定圧力を加えるための第1の位置と、試料の活性を与えるために選択した第2の所定圧力に室圧力を変化させるための第2の位置との間で移動するために取り付けられた加圧器と、第1の状態と第2の状態とを有し、第1の位置と第2の位置との間で加圧器を移動させるためのスイッチと、第1および第2の状態間でスイッチを変化させるためのコントローラと、室内の温度を調整するための手段と、室と連通し、室から試料を除去するためのポートとを備える。

本発明は、さらに試料に加えた圧力を調節することにより、試料の活性を断続的に阻害するための反応器を提供し、この反応器は、室が加圧されている間、試験試薬のフローを流体貯蔵室から試料室内に供給するためのシステムを備える。このシステムは、流体貯蔵室と連通して、第1のコンジット内に配置した第1のバルブと、試料室と連通して、第2のコンジット内に配置した第2のバルブと、流体貯蔵室と室との間に置かれ、第1のコンジットおよび第2のコンジットと連通する第1の加圧器と、第1の加圧器に関連して、第1の加圧器にベントをつけるための第3のバルブとを備える。

第1のバルブが開位置にあり、第2のバルブが閉位置にある状態で、貯蔵室が第1の加圧器と連通して、第1の加圧器に流体フローを与える。第1のバルブが閉位置、第2のバルブが開位置、及び第3のバルブが閉位置にある状態で、加圧器が室と連通して、室を加圧し、第1のバルブが閉位置、第2のバルブが開位置、第3のバルブが開位置と閉位置との間でサイクリングされている状態で、室の圧力がパルシングされる。

10

20

30

40

50

本発明の特定の実施形態では、室から試験物質のフローを供給するために、システムが、室と連通して、第3のコンジット内に配置した第4のバルブと、第3のコンジットの下流で、第4のコンジット内に配置した第5のバルブと、室の下流に置かれ、第3のコンジットおよび第4のコンジットと連通する第2の加圧器と、第2の加圧器に関連して、第2の加圧器にベントをつけるための第6のバルブとを備える。

第1のバルブが閉位置、第2のバルブが開位置、第3のバルブが閉位置、及び第4のバルブが閉位置にある状態で、加圧器が室と連通して、室を加圧する。第1のバルブが閉位置、第2のバルブが開位置、第3のバルブが開位置と閉位置との間でサイクリングし、さらに第4のバルブが閉位置にある状態で、室の圧力がパルシングされる。第1のバルブが閉位置、第2のバルブが開位置、第3のバルブが閉位置、第4のバルブが開位置、第5のバルブが閉位置、及び第6のバルブが開位置にある状態で、第1の加圧器が第2の加圧器と連通して、第1の加圧器から、室を介して、第2の加圧器に至るフロールーを可能にする。

10

本発明は、さらに、迅速な圧力サイクルまたは圧力パルスを有する酵素反応工程を調節する方法を特徴とする。この方法は、酵素反応工程が可逆的に阻害される圧力 $P_{i,x}$ で試料容器内に試料混合物を供給する工程を備える (x は0以上の整数である)。試料混合物は、酵素を含む。この方法はまた、期間 $t_{a,y}$ における試料混合物の圧力を、酵素反応工程が実施可能である圧力 $P_{a,y}$ に変化させる工程を備える (y は1以上の整数である)。この方法はまた、期間 $t_{i,z}$ における試料混合物の圧力を、追加酵素反応工程が可逆的に阻害される圧力 $P_{i,z}$ に変化させる工程を備え、 z は1以上の整数であり、それによっ

20

て酵素反応工程を調節する。酵素に加えて、試料混合物は、以下の各々を1つ以上、様々に組み合わせて含むことも可能である：溶媒、酵素共同因子、酵素の基質、酵素阻害剤、擬態基質、および無機または有機イオン。大部分の実施形態においては、試料混合物が基質を含む。試料混合物は、試料混合物の成分は酵素反応後の第5工程の回復のために固定化する物質を含めることができる。それによって、試料混合物の成分が試料容器の空間内で保持されるか、または酵素反応の生成物または副生物が、除去され、吸着され、会合され、または共有もしくは非共有相互作用により結合される。

従って、一実施形態は、消化程度を微細に調節して、欠失体を生成することが可能である。酵素の変化量、反応の長さ、および外界圧力での温度は、圧力に加えて、圧力がおよそ外界圧力である方法よりも、消化の程度をより微細に調節できる。この実施形態は、広く、または接近したクラスター化した長さを有する欠失体を提供する。

30

本発明は、酵素反応を調節する方法を特徴とする。これらの方法は、可逆的不活性化圧力で試料容器内で試料混合物を供給する工程を備え、試料混合物は酵素を含有しており、さらに試料混合物を活性化圧力に晒す工程と、(iii) 試料混合物を不活性化圧力に晒し、それによって酵素反応を調節する工程とを備える。試料混合物の成分(例えば、1つ以上の酵素基質、共同因子、遷移金属イオン、溶媒、塩および緩衝液)を、調節すべき特定の酵素反応または反応工程に適する順序で供給できる。酵素は、分布または進行的特性を有することが可能である。

不活性化圧力が工程(i)において $P_{i,x}$ であり、その圧力では、酵素反応工程が可逆的に阻害され、活性化圧力が工程(ii)において $P_{a,y}$ であり、その圧力では、酵素反応工程を実施可能であり、露呈工程(ii)は、期間 $t_{a,y}$ で、圧力を $P_{a,y}$ まで変化させる工程を備え、不活性化圧力が工程(iii)において $P_{i,z}$ であり、その圧力では、追加酵素反応工程が可逆的に阻害され、露呈工程(iii)は、期間 $t_{i,z}$ で、圧力を $P_{i,z}$ まで変化させる工程を備え、 x はゼロ以上の整数であり、 y は1以上の整数であり、 z は1以上の整数であり、それによって、酵素反応を調節する。

40

この方法は、以下の工程をさらに備えることが可能である。すなわち、工程(ii)と工程(iii)との間で、活性化圧力 $P_{a,y}$ が、単一酵素事象の平均的長さに対応する期間 $t_{a,y}$ だけ維持されるか、または基質が、試料容器内で固定化され、工程(iii)の後に、試料容器圧力を維持しながら、試料容器から試料混合物の成分を除去する工程か、または試料

50

容器圧力を維持しながら、試料混合物に液体を添加する工程をさらに備えることが可能である。

除去成分が、制限エンドヌクレアーゼ、制限エンドヌクレアーゼ開裂生成物、エキソヌクレアーゼ、ヌクレオチドまたはその組み合わせを含む。除去成分を、試料容器から除去する時、半透性物質を通過させることが可能である。

この方法は、工程 (iii) の後に試料混合物の成分の特性を検出する工程をさらに備えることが可能である。成分特性は、放射能、蛍光、化学発光、分子イオンチャージ/質量比、電気化学電位、発光、表面プラスモン共振、および赤外吸収を含む。

基質は、核酸であってもよい (例えば、二重鎖 DNA、一本鎖 DNA、二重鎖および一本鎖領域の両方を含む DNA、ならびに RNA、これらはいずれも試料容器内で固定化されるか、または固定化されない、ならびにその組み合わせ)。酵素は、制限エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、またはターミナルトランスフェラーゼであってもよい。

従って、この方法は、核酸基質から開裂される少なくとも 1 つの開裂フラグメント (例えば、ヌクレオチド、アミノ酸、またはオリゴマ) を生成可能である。

1 つの方法では、第 1 の基質と第 2 の基質とが存在し、酵素が第 1 の基質を第 2 の基質に装着する。一実施形態では、第 1 の基質はヌクレオチドであり、第 2 の基質は RNA オリゴヌクレオチドまたは DNA ニュクレオチドを含み、酵素は、第 2 の基質が RNA オリゴヌクレオチドであるポリリボヌクレオチドフォスホリラーゼであり、且つ第 2 の基質が DNA ニュクレオチドであるターミナルトランスフェラーゼである。

他の実施形態では、第 1 の基質はヌクレオチドであり、第 2 の基質は RNA または DNA オリゴヌクレオチドを含み、酵素は、酵素クラス 2 . 7 . 7 から選択したトランスフェラーゼである。

一実施形態では、基質は、キラルまたはプロキラル官能基を有する化合物であり、酵素は、プロテアーゼ、デヒドロゲナーゼ、オキシダーゼ、トランスフェラーゼ、リパーゼ、または基質に鏡像体特異的に作用するエステラーゼである。

さらに、工程 (i) ないし (iii) における酵素が第 1 の酵素であり、工程 (i) ないし (iii) における試料混合物が第 1 の試料混合物である。この方法は、工程 (iii) の後に、以下の工程 (iv) ないし (vi)、すなわち、(iv) 試料容器内で第 2 の試料混合物を供給する工程をさらに備え、試料混合物が、可逆的不活性化圧力 $P_{i,j}$ で第 2 の酵素を備え、第 2 の酵素は、工程 (i) ないし (iii) における第 1 の酵素と同一かまたは異なり、試料容器は、工程 (i) ないし (iii) における試料容器を同一であるか、またはバルブによって第 1 の試料容器に連結した第 2 の試料容器であり、さらに (v) 第 2 の試料混合物を可逆的不活性化圧力に晒す工程と、(vi) 第 2 の試料混合物を可逆的活性化圧力に晒し、それによって、第 1 および第 2 の酵素の酵素反応工程を調節する工程をさらに備える。

圧力 $P_{a,k}$ までの遷移時間は、第 2 の酵素の酵素反応工程が実施され得る圧力 $P_{a,k}$ までの期間 $t_{a,k}$ に生じる。第 1 および第 2 の酵素は、同一の酵素であってもよく、また異なる酵素であってもよい。期間 $t_{i,l}$ の間、第 2 の試料混合物の圧力を、第 2 の酵素の追加酵素反応工程が可逆的に阻害される圧力 $P_{i,l}$ に変化させる。幾つかの実施形態では、工程 (vi) における反応不活性化圧力 $P_{i,z}$ が $P_{i,l}$ に実質的に等しい。

一実施形態によれば、圧力 $P_{i,x}$ での試料混合物が温度 $T_{i,x}$ 下にある場合、酵素が阻害される。また、圧力 $P_{a,y}$ での試料混合物が温度 $T_{a,y}$ 下にある場合、酵素が活性状態にある。さらに、圧力 $P_{i,z}$ での試料混合物が温度 $T_{i,z}$ 下にある場合、酵素が阻害される。 $T_{i,z}$ および $T_{a,y}$ の各々は、 $T_{i,x}$ の値と同じか、または異なる。 j 、 k および l の値は、 x 、 y および z とそれぞれ等しい。これらの下付文字は、上記工程間で (例えば、工程 (i) と (ii) 間で) 圧力の追加工程を備えてもよく、必ずしも中間ではない異なる圧力を変化してもよいことを強調することを意図している。この方法における各工程は、望ましい特定の生成物により、反復サイクルとして、または圧力および時間の非反復変化として組み合わせることが可能である。さらに、遷移期間 t_s は短い、例えば 1 秒未満であるのが好ましく、500、250、200、100 または 50 ミリ秒未満であるのが好まし

10

20

30

40

50

く、 $t_{a,y}$ および $t_{i,z}$ の各々は、10ミリ秒から250ミリ秒までの間、または10ミリ秒から50ミリ秒までの間が好ましい。測定可能プラトーのないスパイク様の遷移変化から数百ミリ秒ないし数百秒までの範囲にわたる期間、例えば $t_{a,y}$ または $t_{i,z}$ において圧力を維持することが可能である(図11参照)。例えば、合計($t_{a,y} + t_{a,y} + t_{i,z}$)は、300、700または1000ミリ秒以下である。

実施の形態は、以下の方法も備えており、この方法においては、基質が試料容器内で固定化され、第2の酵素が第1の酵素とは異なり、工程(iii)と(iv)との間に、溶出液で溶出させることによって試料混合物圧力を維持しながら、試料容器から第1の酵素を除去する工程をさらに備えている。また基質は、二重鎖核酸であり、第1の酵素が5'-3'エキソヌクレアーゼであり、第2の酵素が3'-5'エキソヌクレアーゼである。それによ

10

って、第1の酵素で配列決定を行って1つ以上のヌクレオチドを同定し、また第2の酵素で配列決定を行って1つ以上のヌクレオチドを確認することができる。工程(i)ないし(iii)が1サイクルである場合、方法が、工程(i)ないし(iii)のサイクルを少なくとも49回繰り返す工程をさらに備えることが可能であり、サイクルにおける各々の値 $P_{i,x}$ 、 $P_{i,z}$ 、 $t_{a,y}$ 、 $P_{a,y}$ および $t_{i,z}$ が、他のどのサイクルのそれぞれの値からも独立している。

工程(iv)ないし(vi)が1サイクルである場合、方法が、工程(iv)ないし(vi)のサイクルを少なくとも49回繰り返す工程をさらに備えることが可能である。試料混合物の圧力を維持しながら、試料混合物(またはそれから除去した成分)に流体を添加することが

20

さらに、反応の熱力学的平衡に影響を及ぼす方法は、(i)試料容器内で試料混合物を供給する工程を備え、試料混合物は、圧力 P_0 、温度 T_0 であり、さらに(ii)試料混合物の温度を T_1 に変化させる工程と、(iii)反応混合物の圧力を、期間 t_1 の間、 P_1 まで上昇させる工程とを備え、 P_1 は、 P_0 よりも少なくとも10,000psiだけ大きく、さらに、(iv)反応混合物の圧力を P_2 まで低下させ、それによって、高圧で反応の熱力学的平衡に影響を及ぼす工程を備える。

この実施形態では、圧力上昇工程(iii)の後に、試料混合物を反応させる工程をさらに備えるか、または試料混合物中に触媒を含め、圧力上昇工程(iii)の後に、生成物を触媒から解離させる工程をさらに備え、工程(iii)の後に、試料容器から試料混合物の成分を除去する工程をさらに備える。

30

本発明は、さらに、核酸を処理する方法を提供し、この方法は、a) i) 試料容器と、ii) 核酸基質と、iii) 核酸基質に作用可能な酵素と、iv) 容器の圧力を調節する加圧器とを、いずれかの順で設ける工程と、b) 酵素および核酸を試料容器に溶液で供給し、酵素を不活性化圧力状態で維持する工程と、c) 調節した期間に試料容器の圧力を酵素活性化圧力に変化させ、その結果、この期間中に酵素が活性状態になり、核酸基質に作用する工程とを備える。

酵素は、エキソヌクレアーゼ(例えば、ラムダエキソヌクレアーゼ)、DNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼ、進行的酵素、分布酵素であってもよい。酵素は、核酸基質を改変可能であり、その後、開裂したヌクレオチド、アミノ酸または改変した基質等の反応生成物を検出する。

40

この方法は、反応容器温度を調節する工程をさらに備えることができる。この場合、不活性化圧力状態には、反応容器圧力を酵素活性化圧力まで低下させると、高レベルの酵素活性を許容する温度が含まれる。この方法は、反応容器を低い酵素不活性化温度(例えば、およそ5 未満)および酵素活性圧力(例えば、平方インチあたりおよそ5,000ポイントから15,000ポイント)に維持する工程と、圧力を酵素不活性化圧力まで上昇させる工程と、温度を酵素活性化温度(例えば、15 から20 までのインテグラル温度)まで下げる工程と、その後、圧力を酵素活性化圧力まで低下させる工程とをさらに備える。例えば、この方法は、a) 酵素をおよそ5 未満の不活性化温度に維持し、それによって、酵素を実質的に不活性状態にする工程と、b) 核酸基質を不活性酵素に添加して、反応混合物を生成する工程と、c) 試料容器の圧力を、平方インチあたりおよそ30,000

50

ポンドよりも高い酵素不活性化圧力まで上昇させる工程と、d) 試料容器の反応混合物の温度を、およそ10よりも高く上げる工程と、e) 調節した期間に、試料容器の圧力を、平方インチあたりおよそ20,000ポンド未満の酵素活性化圧力まで下げ、それによって、酵素が核酸基質に作用するように、酵素を活性状態にする工程とを備える。この方法は、f) 試料容器の圧力を酵素不活性化圧力まで上昇させる工程を備えることも可能である。

この方法はまた、試料容器の圧力を、酵素不活性化圧力に変化させる工程と、工程c) およびd) のサイクルを少なくとも1回および5回繰り返す工程とをさらに備えることが可能である。酵素不活性化圧力は、一般に酵素活性化圧力よりも高い。

本発明の他の特徴および利点は、以下の図面の説明、詳細な説明、実施例、および請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明の反応器の概略図である。

図1Aは、図1の反応器のスプリングシールおよびグランドワッシャを示す図である。

図2は、図1の反応器のハイドロリックシステムの概略図である。

図3は、図1の反応器のコントロールを示すブロック図である。

図4は、反応器の他の実施例を示す図である。

図5は、図4の反応器の構成部分の概略図である。

図5Aは、図4の反応器のハイドロリックシステムの概略図である。

図6は、図4の反応器の機械的概略図である。

図6Aは、ポンプ/バルブモジュールの詳細図である。

図6Bおよび図6Cは、反応容器の構造を示す図である。

図7は、ポンプ/バルブモジュール間の反応容器をシールするためのクランプを示す図である。

図8は、流体コントロールアルゴリズムのブロック図である。

図9は、流体コントロールアルゴリズムのステップの際のバルブ位置のリストである。

図10は、図4の反応器のコントロールを示すブロック図である。

図11は、圧力パルスの圧力-時間プロファイルを示すグラフである。

図12は、静水圧を加える手段によって核酸基体における酵素の作用をコントロールするための装置の概略図である。

図13は、ラムダエキソヌクレアーゼによるDNAの消化に加えられる静水圧の効果を示すグラフである。

図14は、ラムダエキソヌクレアーゼによるDNAの消化に加えられる種々の静水圧および温度の効果を示すグラフである。

定義

本発明を容易に理解するために、多くの用語が以下で、また開示の他の部分で定義されている。

試料混合物は流体である。流体は、液体または気体でもよい。液体は、水溶液および有機溶液を含む。応用次第で、試料混合物は、所与の工程で酵素を含んでもよいし、含まなくてもよい。

水性試料混合物は、(a) 水(例えば、タップ、蒸留、濾過、脱イオン、脱気または重水素化)と、ならびに(b) (i) 無機カチオンおよびアニオン、(ii) 有機化合物および(iii) 溶媒和ガスのうちの少なくとも一つを成分として含む。試料混合物は、溶解または懸濁した(溶解していない)溶質の流体(溶媒)に関連して、一般に溶液である。試料混合物は、ポリマー、セラミックまたは複合ビーズもしくは表面上で固定化した酵素または酵素基体も含む。これらの固定化試料混合物成分は、試料混合物内で必ずしも溶解または懸濁していないが、試料混合物成分に晒し、流体の乱れによって混合することが可能である。

無機カチオンは、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、クロム、鉄、マンガン、亜鉛、コバルト、銅およびアルミニウムを含む。無機アニオンは、フッ

10

20

30

40

50

化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硫酸塩、リン酸塩、リン酸水素塩、炭酸塩および炭酸水素塩を含む。

有機成分は、天然および合成核酸、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、 α -アミノ酸、オリゴペプチド、ペプチドミメチック、デプシペプチド、ペプチド、糖類、リポ糖類、およびこれらの混合物を含む。ヌクレオチドは、dATP、dCTP、dGTP、dTTP および dUTP 等のデオキシヌクレオシド 5'-トリリン酸塩；ジデオキシヌクレオチド；c7dGTP、dITP、c7dATP 等のあいまいな配列 (ambiguities) を決定するためのヌクレオチド；dATP のような 2'-デオキシヌクレオシド-5'-O-(1-チオトリリン酸塩)；5-メチルデオキシシチジン 5'-トリリン酸塩；リボヌクレオシド 5'-トリリン酸塩；2'-3'-ddNTP；7-デアザ 2'-dNTP を含む。

10

アミノ酸の例として、20個の共通 α -アミノ酸 (Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Ser、Thr、Asp、Asn、Lys、Glu、Gln、Arg、His、Phe、Cys、Trp、Tyr、Met および Pro) や他の天然または合成アミノ酸 (例えば、ノルロイシン、エチルグリシン、オルニチン、メチルプテニルメチルトレオニン、フェニルグリシン、 β -カルボキシグルタル酸、 β -ヒドロキシプロリン、 γ -ヒドロキシプロリン、 β -ヒドロキシリジン、メチラートアミノ酸、 γ -ヨード、1-2-ジヨード、 β -ニトロ、 β -アミノ、および O-アセチル-チロシン) が挙げられる。

糖類として、グルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、スクロースおよび他の自然発生置換糖類が挙げられる。有機化合物もまた、放射性同位元素化合物、および検出可能タグまたは信号を有する他の化合物を含む。

20

有機試料混合物は、化合物、例えば (a) 有機溶媒またはその混合物 (例としてメチレン塩化物、テトラヒドロフラン、ジメチルフォルムアミド、エーテル、ベンゼン、トルエン、ヘキサンおよび酢酸エチル)、ならびに (b) 有機試薬を含む。

他の型式の流体では、気体は、希ガス (例えば、He、Ne および Ar)；HCl、HF、二原子水素および二原子ハロゲンのような有機合成で試薬として使用されるガス；ならびに二酸化炭素、一酸化炭素および酸素のような生体システムにおいて試薬として使用される大気を含む。反応室を加圧ガス流体に晒すことにより、(a) 反応容器の圧力を増加または減少させる、(b) pH を変化させる、(c) 化学または酵素反応のための試薬を提供する、ガス流体試薬が部分的に液体に溶解してもしなくても、もしあるならば、反応室もしくは気相、または反応容器に存在する、(d) 化学または酵素反応工程を抑制する、さらに (e) 反応容器内に、または反応容器から流体内容物を移動させることが可能となる。

30

ベクター (または媒介物) は、1個のセルから他のセルまで1個以上のDNAセグメントを移動させる核酸分子である。発現ベクターは、望ましいコーディングシーケンスおよび特定の宿主生物体における動作可能に結合されたコーディングシーケンスの発現に必要な核酸シーケンスを含む組換えDNA分子である。原核生物における発現に必要な核酸シーケンスは、通常、プロモータ、任意にオペレータおよびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモータ、エンハンサーならびに終結シグナルおよびポリアデニル化信号を利用することが知られている。

40

相補性は、幾つかの塩基のみが塩基対合規則に従って適合しているような部分的なものであってもよく、また完全であってもよい。核酸のストランド間の相補性の程度は、核酸のストランド間のハイブリダイゼーションの効率および強度にかなり影響を与える。従って、相補性は、核酸間の結合に依存する検出方法と同様に増幅反応の精度に影響を与える。混成は、相補性核酸の対合である。混成および対合の強度 (すなわち、核酸間の会合の強度) は、核酸間の相補性の程度、必要条件の厳重性 (ストリンジェンシー)、形成された混成の T_m および核酸内の G:C 比のような要因に影響される。 T_m は、融解温度または、二重鎖核酸分子の占有数が一本鎖に半解離する温度である。核酸の T_m を計算する式は、従来技術においてよく知られている。標準引例で示すように、 T_m の単一推定値は、以下

50

の式で求めることができる： $T_m = 81.5 + 0.41(\% G + C)$ 。この場合、核酸は、1 M NaClの水溶液に存在する（例えば、アンダーソン（Anderson）およびヤング（Young）、核酸混成（Nucleic Acid Hybridization）（1985）における定量フィルタ混成（Quantitative Filter Hybridization参照）。他の引例は、構造上の特性およびシーケンス特性を T_m の計算に対して考慮する、より複雑な計算を含む。

ストリンジェンシーは、核酸混成が行われる温度条件、イオン強度、有機溶媒のような他の化合物の存在に関連する。ストリンジェンシーが高い場合、相補性塩基シーケンスの高周波数を有する核酸フラグメント間のみで核酸塩基対合が生じる。ストリンジェンシーが弱い、または低い場合、遺伝学上多様である生物体から得られる核酸は、たとえ相補性シーケンスの周波数が通常、よりいっそう低くても生じる。

”核酸”および”核酸基質”は、DNA、RNAおよびPNA（ペプチド核酸）を含み、一本鎖、二重鎖、もしくは断続する相補的セグメントを有する一本鎖またはその組み合わせのいずれかである。RNAおよびDNA残基の領域を有するキメラオリゴヌクレオチドは、例えば、オリゴズ・イーティーシー、インク（Oligos Etc., Inc（ウィルソンビル、オレゴン（Wilsonville, OR））から商業上入手可能である。本発明は、原則として、核酸の長さを制限せず、核酸は、ゲノムであるか、もしくは定められた長さ（例えば、短いオリゴヌクレオチド）またはそのフラグメント（単一塩基を含む）であってもよい。核酸は、いかなる由来からも得られ、それ故に、自然発生する；自然発生して精製される；または合成して、組み換えて、もしくは増幅して生成される。核酸は、核酸基体からヌクレオチドを除去するか、または末端メチル基もしくは核酸を他の分子に結合する結合基のような化学成分を添加する酵素によって形成される改変された核酸を含む。他で説明したように、核酸は、ポリマーもしくは複合ビーズ、マトリックス、または他の支持面に固定可能である。

核酸は、いずれかの増幅方法によって増幅可能である。増幅可能な核酸は、通常、試料テンプレート、すなわち、試料から生じる核酸を含む。対照的には、バックグラウンドテンプレートは、試料に存在してもしなくてもよく、一般に、キャリアオーバーの不本意な結果、または試料から精製除去すべき核酸汚染物の存在である。例えば、検出したもの以外の生物体からの核酸は、テスト試料におけるバックグラウンドとして存在してもよい。増幅方法の例は、ケー・ビー・ムリス（K. B. Mullis）による米国特許第4,683,195号および4,683,202号の方法のようなポリメラーゼ連鎖反応（PCR）であり、これらはここで引用しており、クローニングまたは精製を行うことなく、ゲノムDNAの混合物におけるターゲットシーケンスのセグメントの濃度を増すための方法について述べている。

”試料”は、最も広い意味で使用される。試料は、人間や動物の試料からの標本、培養、生物学的試料、環境試料等や、自然発生する合成物質を含む。”試料容器”という用語は、試料を包囲するか（例えば、バッチフォーマットで）、または包囲装置に入れた試料を用いるか（例えば、室、チャンネルまたは流れにおける、またその間のチャンネルング）のいずれかにより、試料を含有するための手段を示すために使用される。同様に、”反応容器”は、いかなるデザインであってもよく、一般に、反応が起きる試料容器である。

反応または試料混合物は、2個以上の成分の組み合わせに関連する。最適酵素温度は、所与の圧力および溶媒システム（溶媒および塩）で、酵素が最も活性状態にある時の温度である。最適条件は各酵素と共に変化するが、一般に、10ないし80、特に25ないし37の範囲である。最適温度は、例えば、ニュー・イングランド・バイオラプズ（New England Biolabs（NEB））によって提供されている生成物の文献において見い出せる。

実質上不活性の酵素は、最適酵素温度（**および気圧？）（100%活性）における活性の20%未満であり、一般には、その10%未満である。理想的には、抑制された、または実質上不活性の酵素は、完全に不活性の状態にあるが（0%活動度）、この決定は所与の活動度検定の感度および不確実さによって制限される。可逆的に抑制された酵素は、

10

20

30

40

50

制限または抑制条件では活動度を示さないが、許容条件に晒した場合、活動度を回復する。許容条件に晒した後、また酵素活動度が回復する前に、休止または遷移状態にすることは、可能である。許容条件は、最適酵素活動度が生じる条件と、より遅いが、ある程度有用な活動度が生じる条件とを含む。

プライマはオリゴヌクレオチドであり、精製した制限消化物のように自然に発生するか、または合成的に生成されており、核酸線維に相補的なプライマ伸張生成物の合成が誘発される条件に置かれた場合（すなわち、ヌクレオチドおよびDNAポリメラーゼのような誘発剤が存在する状態で、また好適な温度およびpHで）、合成の開始点として作用することが可能である。プライマは、最大増幅効率のために一本鎖であるのが好ましいが、代わりに二重鎖であってもよい。二重鎖の場合、プライマを、伸張生成物を作るために使用する前に、まずその線維を分離処理する。プライマは、オリゴデオキシリボヌクレオチドであるのが好ましい。プライマは、誘発剤の存在する状態で、伸張生成物の合成を行うのに十分に長くなくてはならない。プライマの正確な長さは、温度、プライマの起源、および方法の利用を含む多くの要因に依存する。

プローブは、精製した制限消化物のように自然発生するか、または合成的に生成したオリゴヌクレオチドであり、これは、他のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成することが可能である。プローブは、特定の遺伝子シーケンスの検出、識別および単離に有用である。プローブ、特定の遺伝子シーケンス、またはその両方は、“レポータ分子”で分類することができるので、プローブ、特定の遺伝子シーケンスまたはその両方は、酵素（例えば、ELISAおよび酵素ベースの組織化学分析）、蛍光放射線性発光検出システムにおいて検出可能である。

ターゲットシーケンスは、検出および/または増幅に使用されるプライマにより（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応により）結合した核酸領域である。このように、他のシーケンス間でターゲットを識別するのが望ましい。セグメントは、ターゲットシーケンス内の核酸領域である。

PCR生成物または増幅生成物は、変性、アニーリングおよび伸張の各工程の2回以上のサイクルの後に結果的に生じる化合物の混合物である。これらの用語は、1つ以上のターゲットシーケンスの1つ以上のセグメントを増幅した場合を含む。

増幅試薬は、プライマ、核酸型および増幅酵素を除いた増幅に必要な試薬である。増幅試薬は、デオキシリボヌクレオシドトリリン酸および緩衝液を含む。一般に、増幅試薬および他の反応成分を、反応（例えば試料）容器（試験管、マイクロウェル、任意のアウトレットを有する圧力変形可能ケーシング等）に入れる。

エンドヌクレアーゼおよび制限酵素は、酵素（例えば細菌性酵素）に関連し、その各々は、特定のヌクレオチドシーケンスにおいて、またはその近くで二重鎖DNAを切断する。DNA分子は、“5'端部”および“3'端部”を有すると言われる。その理由は、1個のモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸塩を、フォスフォジエステル結合を介して一方向にその近隣の3'酸素に付与するように、モノヌクレオチドが反応してオリゴヌクレオチドを作るからである。従って、5'リン酸塩がモノヌクレオチドペントース環の3'酸素に結合されない場合、オリゴヌクレオチドの端部は“5'端部”と呼ばれ、その3'酸素が、後のモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸塩に結合されない場合は“3'端部”と呼ばれる。ここで使用するように、核酸配列は、たとえより大きいオリゴヌクレオチドの内部配列であっても、5'および3'端部を有するといえる。線状または環状DNA分子のいずれかにおいて、別個の元素を、“下流”または3'元素の“上流”または5'として表現できる。この用語は、DNAストランドに沿って5'から3'方向に転写が進むという事実を反映する。結合遺伝子の転写を指示するプロモータおよびエンハンサーエレメントは、一般にコーディング領域の5'または上流に置かれる。しかし、エンハンサーエレメントは、プロモータエレメントおよびコーディング領域の3'に置かれた場合でさえ、その効果を発揮することが可能である。転写終了およびポリアデニル化信号は、コーディング領域の3'または下流に置かれる。

ここで使用するように、用語“遺伝子をコードするヌクレオチドシーケンスを有するオリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチド”は、遺伝子のコーディング領域を備えるDNAシーケンス、または換言すれば、遺伝子産物をコードするDNAシーケンスを意味する。コーディング領域は、cDNAまたはゲノムDNA形態のいずれかで存在可能である。エンハンサー/プロモータ、スプライス連結、ポリアデニル化信号等のような好適な調節因子は、転写の適当な開始および/または一次RNA転写の正確な処理を可能にする必要がある場合、遺伝子のコーディング領域に最も近接して置くことができる。代わりに、本発明の発現ベクターで利用されるコーディング領域は、内因性エンハンサー/プロモータ、スプライス結合、介入シーケンス、ポリアデニル化信号等、または内在性および外来性調節因子の組み合わせを含んでもよい。

ポリマ基質を合成または消化する酵素は、各触媒事象の後、基質から解離させてもよい、すなわちそれらは非進行的（共核酸および分布）であってもよい。一方、それらは、多くの反応サイクルが完了するまで、ポリマーに結合したまま、すなわち”進行的（プロセス）”であってもよい。酵素に関して、進行的、非進行的および分布という用語は、従来技術で用いられている（例として、エー・コーンバーグ（A. Kornberg）およびティー・エー・ベーカー（T. A. Baker）DNA複製（DNA Replication）、2nd ed.（Freeman and Co. 1992）参照）。

発明の詳細な説明

A. 序論

本発明は、反応容器の圧力の迅速なプログラブル変動を生じる圧力サイクリング反応器を特徴とする。圧力変動は、多くのプロファイルを用いてプログラミング可能である。2つの圧力PおよびP'間の変動が生じる場合、例えば、種々のプロファイルは以下の通りである。a) PおよびP'の各々における時間の長さがほぼ同じである、b) Pにおける時間がP'における時間よりも長い、c) PからP'までの遷移時間は、P'からPまでの遷移時間とほぼ同じである、d) PからP'までの遷移時間がP'からPまでの遷移時間よりも長い、e) PからP'までの遷移における中間圧力での休止が幾つかあるが、P'からPまでのジャンプは非常に迅速である。さらに、圧力変動プロファイルは、ほとんど反復しない異なる圧力間の小さなステップまたは大きなジャンプの変動のような3つ以上の圧力PおよびP'を含んでもよい。

本発明はまた、反応容器の圧力を維持または増大しながら、反応容器内の成分を添加したり除去することが可能な圧力サイクリング反応器を提供する。成分は、圧力変動プロファイルを用いて多くの順列で添加または除去できる。各圧力パルスサイクルは同一である必要はない。

従って、圧力サイクリング反応器は、反応の少なくとも1つの工程が感圧的である応用において有用となる。これらの反応は、酵素、非酵素、化学的、物理的、動力学的、熱力学的相互作用を含む。換言すれば、感圧相互作用は、共有（結合破壊および結合形成）、疎水、イオン（溶媒和）、およびファンデルワールス力；疎水または親水相互作用；ならびに構造上の配座（二次、三次および四次、すなわちフォールディング、ならびにヘリックスおよびシート）を含む。

可逆感圧反応工程の速度は、低下、停止、増大または開始することができ、後者は、可逆阻害圧力が許容圧力に迅速に変化する時に達成される。一般に、多数の酵素（同一か、または異なる酵素）の速度は、阻害圧力（例えば、高い圧力）でそれらを可逆的に阻害し、その後、圧力を許容圧力に迅速に変化させることにより、同期できる。

圧力反応器は、組み合わせまたは連続動作をそれぞれ行うために、多数の試料容器を並列または直列に含むことが可能であり、少なくとも1つの反応工程は感圧的である。多数の試料容器は（より大きい反応容器でさえ）、相互連結可能であるので、反応した試料混合物の部分を1個の試料容器から他の試料容器まで転送して、次の処理を受けることが可能である。オリゴヌクレオチド（構造物の製品を含む）、ペプチドおよび他の有機化合物の組み合わせ合成を、このように行うことができる。

B. 圧力サイクリング反応器

図1を参照すると、反応器10は反応モジュール12を備えており、反応モジュール12

10

20

30

40

50

は、例えばポリエチレンから作られた試料カプセル 17 を入れるための室 (チャンバ) 15 を定める壁面 13 を有する。反応モジュール 12 におけるポート 12 a は、カプセル 17 を室 15 に配置できるようにする。ショートストローク圧力伝送空気シリンダ 14 と、室 15 に圧力を加えるための圧力伝送水圧シリンダ 16 は、ベースプレート 18 に実装されている。反応モジュール 12 は、可変体積圧力室 23 を定める、例えばステンレス鋼で形成したトラス 20 によって支持される。例えば、青銅合金から形成されたベアリング 24 によって支持され且つ案内され、室壁面 27 を定める、例えば直径 3 / 16 " のピストン 22 は、反応室 12 のボア 25 とシリンダ 14 および 16 との間で連通する。ピストン 22 は、シリンダ 14 および 16 と共に、室 15 の圧力を調節する容器加圧器 21 を形成する。反応モジュール 12 は、例えばステンレス鋼から形成され、ボア 25 は、直径がおよそ 0 . 188 " であり、長さがおよそ 1 " である。

10

図 1 A も参照すると、シール 36 , 例えばグランドワッシャ 38 によって支持された Ball Seal Engineering Co. Inc. , (Santa Ana, CA) から入手可能であるばね 36 a ならびにバックアップワッシャ 37 , 37 a および 37 b を含むばね付勢シールは、反応室 12 内でピストン 22 をシーリングする。グランドワッシャ 38 は、バックアップワッシャ 37 b の傾斜面 39 a と一致する傾斜面 39 を含む。ばね 36 a は、低圧で確実にシーリングを行い、より高圧でシーリングを援助する。バックアップワッシャおよびグランドワッシャは、圧力をかけてシール 36 の押し出しを防止する働きをする。グランドワッシャ 38 は、トラス 20 の柵 40 によって支持される。空気シリンダ 14 は、例えば直径が 2 . 5 " のピストン 14 a を備えており、延長ロッド 26 はスルーボア 28 を有する。Oリング 14 b は、ピストン 14 a と、空気シリンダ 14 の内壁面 15 との間にシールを形成する。空気シリンダを 14 を付勢すると、ピストン 22 の上向きの力を生じるロッド 26 により、ピストン 14 a にかかる圧力をガイドベアリング 24 に伝送する。この力は、インレット 30 に装着したソース (図示せず) から空気シリンダまで圧力を変化させることにより、調整可能である。空気シリンダ 14 によりピストン 22 に加えられる力は、圧力パルシングの間、反応室 12 内の低圧レベルを決定する。空気シリンダ圧力は、およそ 100 p s i (反応室 12 内でおよそ 17 , 000 p s i の圧力を生じる) まで調整可能である。

20

水圧シリンダ 16 は、例えば直径が 1 " のピストン 16 a を備え、延長ロッド 32 は、空気シリンダロッド 26 のスルーボア 28 を突き上げる。水圧ロッド 32 の端部 34 は、ガイドベアリング 24 に支えられている。延長すると、水圧ロッド 32 は、ピストン 22 を上向きに駆動する。空気シリンダ 14 によって発生する圧力に加えて、空気シリンダ 16 によって発生する圧力は、反応室における高圧レベルを決定する。水圧シリンダ圧力は、上限をおよそ 1 , 500 p s i に設定した状態で調整可能である。ピストン 22 の断面積に対する水圧ピストン 16 a の断面積の比は、28 . 4 : 1 である。

30

反応モジュール 12 は、熱硬化性ジャケット 42 によって包囲され、反応室のの温度を調節する。ジャケット 42 は、インレットおよびアウトレット取り付け部 44 , 46 をそれぞれ有し、それによって、流体が、温度調節加熱 / 冷凍浴 (図示せず) から、壁面 13 を包囲する室 48 に循環する。反応室 12 の上部および底部の周りには、熱硬化性ジャケット 42 に対して流体シールを提供する Oリング 52 , 54 が設けられている。反応室 12 には、その温度をモニタするためにサーモカップル (図示せず) が取り付けられている。反応室 12 の温度は、およそ + / - 1 の精度で、およそ - 15 から + 40 までの範囲内で調節される。試料室 15 に加える圧力に抵抗するのに十分な厚さでありながら、熱硬化室 48 から試料室 15 まで熱を伝達できるほど薄くなるように、壁面 13 の厚さ、例えば、3 / 16 " の厚さを選択する。壁面 13 の厚さおよびシール 36 の性能により決定する反応モジュール 12 の最大許容圧力は、およそ 40 , 000 p s i である。

40

アセンブリの上部には、圧力トランスジューサ 56 , 例えば, Sensotec, Inc . , Columbus , OH の部品番号 HP 5651 - 02 - 02 で入手可能な 75 , 000 p s i , + / - 0 . 5 % 精度ストレインゲージ型トランスジューサが取り付けられている。圧力トランスジューサ 56 は、反応モジュール 12 から取り外してポート 12 a に

50

接近する。

図2を参照すると、水圧は、水圧ポンプ62により、水圧シリンダ16に送られる。水圧システム60は、モータ64によって駆動される水圧ポンプ62と、流体貯蔵器63と、リリースバルブ67と、チェックバルブ65と、圧力調整バルブ66と、圧力ゲージ68と、アキュムレータ70と、マニュアルバルブ71と、4方向コントロールバルブ72と、水圧シリンダ16とを備える。

モータ64は、例えば、最大3,000psiで0.8GPMの出力の2HP電気モータである。実際のシステム圧力は、圧力調整バルブ66でコントロールされ、およそ1,500psiの設定上限まで変化可能である。

方向コントロールバルブ72は、例えば、Pearse-Pearson, Inc. (M
i
l
f
o
r
d, MA)のBosch部品#9810231072で入手可能なデュアル電
気ソレノイドによって起動する3位置ばねセンタリングスプールバルブである。両方のソ
レノイドを減勢した状態で、水圧シリンダポート19, 19aは両方ともドレインライン
74に連結され、またシリンダピストン16aは、移動自在である。使用する際、一方
のソレノイドを付勢してポート19を加圧し、他方のソレノイドを減勢してドレインライ
ン74に対してそれを開き、ピストン16aを強制的に延ばし、それによって試料室15
を加圧する。現在、試料室の圧力をパルスするために、両方のソレノイドが減勢されるの
で、ピストン16aは移動自在であり、試料室15の圧力は、ピストン22を強制的に下
げて(空気シリンダ14によって加える圧力のレベルまで)室内の圧力を低下させる。代
わりに、他方のソレノイドを付勢してポート19aを加圧し、他方のソレノイドを減勢し
てドレインパイプ74に対してそれを開き、ピストン16aを強制的に引っ込める。試料
室15からの圧力の受動低下が好ましい。その理由は、水圧応答時間がより速くなり、ま
たピストン22とロッド32との継続的接触により、ピストン、ロッド間に衝撃荷重が生
じるのを回避するからである。方向コントロールバルブ72は、時々、20msから25
msまで迅速にスイッチングして、水圧シリンダ16に圧力を加えて、試料室15の圧力
を低下させる。

方向コントロールバルブ72の近くには、水圧アキュムレータ70が取り付けられており
、応答性を向上させ、圧力変動を抑える。アキュムレータ70は、例えば、1クォート容
量を有し、ポンプ62により、水圧システムライン圧力までチャージされる。チェックバ
ルブ65の存在により、ポンプ62をオフにした後、アキュムレータ70はチャージした
ままとなる。マニュアルバルブ71を用いて、アキュムレータをディスチャージし、水圧
システムを減圧する。リリースバルブ67は、ポンプ62から送られる最大圧力を制限す
る。

図3を参照すると、反応器10は、調整可能パルス幅およびデューティサイクルを有する
タイミングリレー80によって調節される。タイミングリレー80からの出力は、方向コ
ントロールバルブ72を調節する。圧力センサデータは、コンピュータまたはオシロスコ
ープでモニタ可能である。空気シリンダ14および水圧シリンダ16によって加えられる
反応室圧力は、およそ+/-200psiの精度で調整可能である。圧力を高圧からパル
シングした後、高圧にパルシングして戻す前に、低圧でのドエルが、およそ30ms
から数分まで調整可能である。タイミング精度は、およそ+/-10msである。

使用する際、例えば酵素を用いて、およそ50µlの試料を入れたカプセル17を、例え
ば、そのカプセル内の試料を凍結させて阻害温度に維持した状態で、試料室15に配置す
る。その後、試料室15には、例えばシリコン油が充填され、加えた圧力をカプセルに伝
達可能とする。代わりに、酵素反応の開始を調節するために、反応カプセルは、圧力を加
えるまでDNAおよび酵素を偏析するバリアを備えることができる。その時、圧力トラン
スジューサ56は反応モジュール12に装着される。圧力を反応室15に最初に加えると
、カプセルバリアが破裂し、それによってDNAと酵素が化合することになる。

空気シリンダ14は、水圧シリンダ16が室12を加圧していない時、すなわち酵素が阻
害されない時、室の圧力を調節する。酵素処理が、10,000psiから20,000
psiまでの圧力で減速し始めるので、DNA配列決定の間、単一ベースステップを

10

20

30

40

50

最適化するために反応を減速するのが望ましい場合があり、空気シリンダ14は、パルシングの間、圧力降下の大きさを制限する働きをする。このように、(空気シリンダ14および水圧シリンダ16によって加えられる) 阻害圧力のレベルと、(空気シリンダ14によって加えられる) 活性化圧力との両方を個別に調節可能である。

図4を参照すると、好ましい別の実施例では、コンピュータコントロールフロースルー圧力サイクリング反応器100は、圧力変調フロー環境における選択した物質の試料を反応することが可能な電空動作の流体処理装置である。流体ポンプおよびバルブの配置を利用して、試料を、静止した、または迅速に変化する圧力環境に維持すると同時に、様々な試薬に晒すことも可能である。流体圧力は、およそ40,000 psiのレベルまで調整可能であり、流体圧力は、かなり低いレベルまで迅速に低下し、その後、およそミリ秒で、より高いレベルに戻るということが可能である。空気システムについて述べているが、他のシステム、例えば水圧システムも採用可能であることが理解される。

圧力サイクリング反応器100は、キャビネット101を備えており、このキャビネット101には、反応容器102と、第1の容器加圧器インジェクションポンプ/バルブモジュール104と、第2の容器加圧器ドレインポンプ/バルブモジュール106とが取り付けられている。モジュール104および106の役割は逆転できることが理解される。空気バルブモジュール108における一連の空気バルブ107は、さらに以下で述べるモジュール104、106において流体ポンプおよびバルブを調節する、キャビネット101に取り付けた圧力伝達空気シリンダ126、128、130、156、158および160に加圧ガスに向けてそれと切り換える。キャビネット101に取り付けた流体貯蔵室114、116は、ポンプ/バルブモジュール104、106にそれぞれ試薬を供給する。圧力源118、例えばエアコンプレッサまたは圧縮ガスボトルは、流体貯蔵室114、116を加圧し、また空気バルブ107に圧力を供給する。流体貯蔵室は、例えば、ほぼ10 psiまで加圧して、フローを助長して、フロー経路が真空状態にならないようにする。バルブモジュール、空気バルブおよび流体貯蔵室は、以下で述べるように、クランプ260に取り付ける。

コンピュータ110は、圧力パルシングおよび流体フローのタイミングを計ってコントロールし、システムの状態をモニタする。2個の信号条件付け装置112、113は、入力および出力信号の増幅およびスケールリングを提供する。

ディスプレイパネル300は、圧力ゲージ302、304、306を備えており、これらは、流体貯蔵室114、116および空気バルブ107に加えた圧力をモニタする。ノブ308、310、312は連続する圧力レギュレータ180、182、184を調整し(図5A参照)、この圧力レギュレータ180、182、184は、流体貯蔵室114、116および空気バルブ107に加える圧力を調節する。ノブ314は、バルブ118cの閉塞を調整する(図5A参照)。デジタルディスプレイ316は、圧力トランスジューサ188に示すように反応容器102内の圧力を表示する(図5参照)。パワースイッチ318、例えば照明ロッカースイッチは、マスターパワースイッチ、データ獲得パワースイッチおよび空気バルブパワースイッチである。インジケータライト320は、空気バルブの状態を示し、マニュアルオーバーライドプッシュボタンスイッチとしても作用する。

図5を参照すると、インジェクションポンプ/バルブモジュール104(図4参照)は、水圧を発生して流体経路190に沿って流体を移動させるためのピストン型インジェクションポンプ120と、それぞれ流体の移動をコントロールして流体経路190内の圧力をシーリングするための高圧オン-オフインジェクションポンプインレットおよびアウトレットバルブ122、124とを備えている。インレットバルブ122は、バルブ174(以下で述べる)からインジェクションポンプ120まで延びるコンジット121内に配置され、アウトレットバルブ124は、インジェクションポンプ120から反応容器102まで延びるコンジット123内に配置される。ポンプ120は、コンジット121および123と連通する。空気シリンダ126は、機械的力を与えてポンプ120を駆動し、空気シリンダ128はポンプインレットバルブ122を作動し、空気シリンダ130はポンプアウトレットバルブ124を作動する。位置センサ131は、インジェクションポンプ

10

20

30

40

50

120が底の手前にある時、すなわちポンプ120のピストン120bがほぼ最大限まで延びている時、信号を送る。

空気バルブモジュール108内に配置した4方向空気バルブ132、136および138は、圧力源118からシリンダ126、128および130まで、さらにシリンダ126、128および130からのガスのフローをそれぞれコントロールして、シリンダロッド126c、128cおよび130cの運動をそれぞれコントロールする。例えば、バルブ136に関して、第1のフロー経路(矢印136a)が、シリンダ128の第1の室128aを加圧してバルブ122を閉じ、第2のフロー経路(矢印136b)が、シリンダ128の第2の室128bを加圧してバルブ122を開き、排出ポート136cが大気へベントを開く。

10

キャビネット101に配置した3方向空気リリーフバルブ134は、正または負の圧力パルスが発生するために、圧力を迅速に低下させ、シリンダ126の第1の室126aをリチャージすることができる。キャビネット101に配置した3方向空気バルブ140により、室126aの圧力をゆっくりと低下させる。バルブ132を貫通する第1のフロー経路132aは、バルブ134および140を矢印134aに沿ったガスフローを与えるように位置決めした状態で、シリンダ126の第1の室126aを加圧してポンプ120のピストン120bを延ばし、第2のフロー経路132bは、シリンダ126の第2の室126bを加圧してピストン120bを引っ込める。ピストン120bは、圧力室シリンダ120aの体積をコントロールする圧力室壁面120cを定める。

同様に、ドレインポンプ/バルブモジュール106は、ピストン型ドレインポンプ150と、高圧オン・オフドレインポンプインレットおよびアウトレットバルブ152、154とを備える。インレットバルブ152は、反応容器102からドレインポンプ150まで延びるコンジット151内に配置され、アウトレットバルブ154は、ドレインポンプ150からバルブ178(以下で述べる)まで延びるコンジット153内に配置される。ポンプ150は、コンジット151および153と連通する。空気シリンダ156は、機械的力を与えてポンプ150を駆動し、空気シリンダ158はポンプインレットバルブ152を作動し、空気シリンダ160はポンプアウトレットバルブ154を作動する。位置センサ161は、ドレインポンプ150が底の手前にある時、すなわちほぼ最小の容積である時、信号を送る。流量およびフロー速度は、ポンプ120および150によりコントロールされる。ポンプ150のピストン150bは圧力室壁面150cを定め、これによって、可変容積圧力室ポンプシリンダ150aの容積をコントロールする。シリンダ150aの最大容積は、反応容器102における流体の容積よりも実質的に大きい。

20

30

空気バルブモジュール108に配置した4方向空気バルブ162、166および168は、圧力源118から、シリンダ156、158および160までの、さらにシリンダ156、158および160からのガスのフローをそれぞれコントロールして、シリンダロッド156c、158cおよび160cの運動をそれぞれコントロールする。3方向空気バルブ170により、シリンダ156の第1の室156aから圧力をゆっくりと低下させる。

流体貯蔵室114は、多数のタンク172を備える。貯蔵室114に取り付けたマルチポジションバルブ174を用いて、望ましいタンク172を選択する。流体貯蔵室116は、多数のタンク176を備える。貯蔵室116に取り付けたマルチポジションバルブ178を用いて、望ましいタンク176を選択する。マルチポジションバルブ174および178、例えば8個のポジションフェースバルブまたはテーパードプラグバルブも、フロー経路190が大気に通じるように位置決め可能である。

40

圧力レギュレータ180、182および184は、さらに以下で述べるように、空気シリンダ126、128、130、156、158および160ならびに流体貯蔵室114および116への圧力を調整する。調整可能リリーフバルブ、例えばマニュアルスプリング負荷プランジャバルブ186または電子コンピュータコントロールバルブは、負の流体システム圧力パルスの下限を決定するシリンダ126からの排気圧力を調整する。

圧力トランスジューサ188は、例えば、反応容器102に連結した上記のストレインゲ

50

ージ型トランスジューサ56のような高速応答圧力トランスジューサは、試料圧力をモニタする。

図5Aは、空気ブランピングを示す。供給源118からのガスは、圧力をおよそ200psiまで低下させる圧力レギュレータ118aと、ガスをフィルタリングしてガスから水分を除去するドレイン119を有するガスフィルタ/水分分離器118bと、マスターバルブ118cとを介してレギュレータ180、182および184に送られる。レギュレータ180を流れるガスはシリンダ126および156を加圧し、レギュレータ182を流れるガスはシリンダ128、130、158および160を加圧し、レギュレータ184を流れるガスは流体貯蔵室114および116を加圧する。バルブ132および162は、シリンダ126および156のどの室をそれぞれ加圧するかをコントロールする。バルブ136、138、166および168は、シリンダ128、130、158および160のうちのどの室をそれぞれ加圧するかをコントロールする。

ポンプ空気シリンダ126および156への圧力は、およそ50psiから150psiまでの範囲で設定可能であり、それによって、反応室の阻害圧力をおよそ20,000psiから60,000psiまでの範囲に設定可能となる。圧力レギュレータ182は、およそ150psiをバルブシリンダ128、130、158および160に送るように設定する。上記のように、貯蔵室圧力をおよそ10psiに設定する。圧力レギュレータは、手動調整可能であるか、またはコンピュータ制御も可能である。

図6を参照すると、ポンプ/バルブモジュール104および106ならびにシリンダ126、128、130、156、158および160の機械的構造を示している。反応容器102の一方側の構造は、反応容器の他方側の構造の鏡像であり、ポンプ/バルブモジュール104およびシリンダ126、128および130のみについて述べる。シリンダ126によって駆動されるポンプ120と、シリンダ128によって駆動されるバルブ122と、シリンダ130によって駆動されるバルブ124とが、ポンプ/バルブモジュール104のハウジング250内に取り付けられる。

図6Aを参照すると、ハウジング250は、コンジット121および123(図5)によって定められた流体経路252と、コンジット121のアーム252aにおける流体インレット254とを備える。バルブ122は、バルブプランジャ256を備え、このバルブプランジャ256は、流体インレット254をブロックする延長位置と、流体がインレット254を通過するのを可能にする引っ込み位置との間で移動する。バルブ124はプランジャ258を備え、このプランジャ258は、反応容器102に至るコンジット123におけるフローをブロックする延長位置と、反応室にフローを与える引っ込み位置との間で移動する。ポンプ120のピストン120bを用いて、流体経路252を加圧する。コンジット123の流体アウトレット251は、ハウジング250によって定められた反応室シート253に至る。

ハウジング250は、例えばステンレス鋼から形成されている。バルブ122および124のプランジャ256および258は、例えば熱処理したステンレス鋼から形成されている。バルブ122および124は、例えばステンレス鋼で形成したパッキング圧縮ナット270と、例えば青銅合金で形成したパッキングスペーサ272と、例えばテフロンで形成したバルブプランジャパッキングディスク274とを備える。ポンプ120のピストン120bは、例えば熱処理したステンレス鋼から形成されている。ポンプ120は、例えばステンレス鋼で形成した保持ナット276と、例えば青銅合金で形成したシールスペーサ278と、ピストンシール36とを備える(図1A参照)。ポンプシリンダ120は、ハウジング250内のポアによって定められている。

図6B及び図6Cを参照すると、試料の性質や反応に依り、様々な大きさや型式の反応室を利用できる。図6Bに示すように、反応容器102は、試料室330を定める第1の部分102aと、第2の部分102bとを備える。試料室220は、数百マイクロリットルまでの試料容積を収容できる。2つの部分は、ねじ切りして係合され、リングシール332でシーリングされる。この2つの部分は、流路334を定める。図6Cは、通過するためではなく圧力パルシングのために設計した反応容器102の構造を示す。第1の部分

10

20

30

40

50

402は試料室430を定め、第2の部分404は、試料室430と連通して流路434を定める。2つの部分は、ねじ切りして係合され、リング432でシーリングされる。図6Bを再度参照すると、反応容器102は、周囲の流体ジャケット336によって温度調節される。代わりに、熱電加熱および冷却を採用することが可能であり、または温度を調節するために空気浴を利用することが可能である。外界温度で、またはそれより高いか、もしくは低い温度で、反応を行ってもよい。温度センサ338、例えば、熱電対、サーミスタまたはRTDは、反応容器102の温度をモニタする。ポンプ/バルブモジュール104および106、ならびに貯蔵室114および116もまた、上記方法のうちの1つによる温度調節のための温度コントローラ402および温度センサ404を備えるのが好ましい(図6参照)。

10

図7を参照すると、クランプ260は、ポンプ/バルブモジュール104、シリンダ126、128および130、ならびに流体貯蔵室114を取り付けた固定端部262と、ポンプ/バルブモジュール106、シリンダ156、158および160ならびに流体貯蔵室116を取り付けた可動端部264とを備える。反応室シートにおけるポンプ/バルブモジュール間に反応容器102を配置し、クランプを締め付けて、モジュール間の反応室を保持し、シーリングする。クランプ260は、エアクランプマシンバイスであり、マシンスクリュー(ヘックスシャフト266)で手動で大きく調整し、マルチステージタンデムエアシリンダ268で最終クランピングを行う。レギュレータ182からの空気は、クランピングシリンダに圧力を加えるマニュアルバルブである空気オン・オフバルブ261を通過することにより、クランプエアシリンダをコントロールする。最大クランピング力は、およそ5,000ポンドである。このクランピング機構は、反応容器102を迅速に交換し、様々な大きさの反応室を考慮することも可能である。

20

使用する際に、反応を行う試料を反応容器102を入れ、反応室を流路に取り付けた状態で、一般に流体が流体貯蔵室114から高圧バルブ122および124と、反応容器102と、高圧バルブ152および154とを介して流れ、バルブ178を介して排出される。しかし、システムシンメトリは、反対方向での同じフローにも備える。図8を参照すると、流路190(図5)を通過する流体のフローは、まず200で流路に流体を充填し、202で流路を加圧し、反応容器102における204での圧力パルスの生成と206での反応室を通過する流体の移動とを交互に繰り返す。

図9を参照すると、流路190に流体を充填するために、貯蔵室114からの流体のアリコート、バルブ124、152および154を閉じ、バルブ122を開き、シリンダ126を用いてポンプ120のピストン120bを引っ込めてポンプ120の可変容積圧力室ポンプシリンダ120aに引き入れる(工程1)。このアリコートが反応室を通過して流れるためには、バルブ122を閉じ、バルブ124、152、154を開き、バルブ178をそのドレーン位置に配置する。ポンプ120のピストン120bは、その時、延在し、ポンプシリンダ120aの内容物を反応室から排出する(工程2)。この動作により、バルブ174、178間の流路190を充填する。これは、反応容器102が加圧可能となる前に、必要である。

30

反応室の加圧は、以下のようにして行われる。バルブ124、152および154を閉じて、バルブ122を開く。その後、ポンプ120のピストン120bを引っ込めて、ポンプシリンダ120aに貯蔵室114からの流体を充填する(工程3)。バルブ122を閉じ、シリンダ126を加圧してポンプ120のピストン120bを延ばし、バルブ124を開く(工程4)。ポンプ120のピストン120bは、流路190における流体の非圧縮性により、ほんの僅か内側に移動する。反応容器102を加圧する。圧力レベルは、レギュレータ180のガス圧設定の関数である。

40

ポンプ120を用いてブリーフ減圧パルスを生成することにより、反応室102内にブリーフ圧力パルスを生成することもできる。圧力パルピングのために、バルブ122および152を閉じ、バルブ124を開き、ピストン120bを延ばした状態で、バルブ134を瞬間的に駆動して(工程5)、流路134bを開いて、シリンダ126の加圧側(室126a)をリリースバルブ186を介して空中に晒し、その後、そのフロー位置に戻って

50

、経路 1 3 4 a に沿ったフローを与えて、室 1 2 6 a を再加圧する（工程 6）。排出間隔において、ピストン 1 2 0 b の流体圧によって、ピストンが十分な量だけ引っ込み、反応容器 1 0 2 の流体圧を緩和する。しかし、リリースバルブ 1 8 6 は、シリンダ 1 2 6 のガス圧の低下を順に制限し、反応容器 1 0 2 の流体圧の低下を順に制限する。このように、リリースバルブ 1 8 6 の設定により、負に向かう圧力パルスのためのベースレベルを確立する。ガス圧がシリンダ 1 2 6 に再度加えられると、反応室はその前の圧力レベルに戻される。

圧力をかけて反応容器 1 0 2 を保持しながら、ポンプシリンダ 1 2 0 a から反応容器 1 0 2 に、またそれを通過して流体を移動させるために、シリンダ 1 5 6 を加圧して、ポンプ 1 5 0 のピストン 1 5 0 b を内側に駆動する（工程 7）。その後、バルブ 1 5 2 を開く（工程 8）。シンメトリのため、ピストン 1 2 0 b にかかる力はピストン 1 5 0 b にかかる力によって相殺され、流体フローが生じない。バルブ 1 7 0 をそのベント位置に切り換えることにより、シリンダ 1 5 6 の加圧した端部 1 5 6 a は、オリフィスを介して大気へとゆっくりベントを開くことになる。ガスを放出すると、ピストン 1 2 0 b は遅い速度で延び、ピストン 1 5 0 b は引っ込む。ポンプシリンダ 1 2 0 a 内の流体は、反応室 1 2 0 を通過してポンプ 1 5 0 のポンプシリンダ 1 5 0 a に送られる。ピストン 1 2 0 b が底に到達する直前に、位置センサ 1 3 1 が駆動され、電気信号を送る。この電気信号は、バルブ 1 5 2 を閉じ、バルブ 1 7 0 を切り換えてベントポートを閉じ、ポンプ 1 5 0 に圧力を再度加える（工程 9）。反応室の圧力は、ポンプ 1 2 0 によって維持され続けることに注目されたい。

ポンプシリンダ 1 5 0 a 内の流体は、バルブ 1 5 4 を開いて、バルブ 1 7 8 を介して流体を排出させることにより放出する（工程 10）。ピストン 1 5 0 b が底に到達する直前に、センサ 1 6 1 が信号を送って、バルブ 1 5 4 を閉じる。ピストン 1 5 0 a が延び続けて、ポンプ 1 5 4 および 1 5 2 間でコンジット 1 5 3 および 1 5 1 において流体を加圧する。その後、バルブ 1 5 2 を開き、バルブ 1 2 4 を閉じて、次の流体伝送サイクルを開始する（工程 11）。反応室圧力をポンプ 1 5 0 によって維持する。ポンプ 1 2 0 は、今まさに、流体貯蔵室 1 1 4 からの試薬を再度充填されようとしている。別の圧力パルスを生じるために、バルブ 1 2 2 が開いて、ピストン 1 2 0 b が引っ込み、その後、バルブ 1 2 2 が閉じ、バルブ 1 2 4 が開き、バルブ 1 5 2 が閉じて、工程 4 から処理を繰り返すことが可能となる。

一定の反応に対しては、システムから過度に放出する前に、反応室を介して流体のアリコート前後に数回移動させることが望ましい場合がある。これは、試料、試薬間の混合を改良することが望ましい場合に当てはまる。これを達成するために、ポンプ 1 2 0 から反応容器 1 0 2 を通過して試薬を搬送すると、ポンプ 1 5 0 には超過分が含まれた状態で、バルブ 1 2 4 および 1 5 2 を開き、バルブ 1 2 2 および 1 5 4 を閉じ、シリンダ 1 5 6 を加圧してピストン 1 5 0 b を延ばし、バルブ 1 4 0 を切り換えてシリンダ 1 2 6 からオリフィスを介してガスを流すことによって試薬を逆流させる。

一定の反応に対して、ある型式の試薬を一方向に流し、異なる試薬を反対方向に流すのが望ましい場合には、流体貯蔵室 1 1 6 を設けて、装置の通常の下流端部に流体源を備える。

図 10 を参照すると、コンピュータ 1 1 0 をコントロールして流体システムの機能的構成部分を作動する。圧力と、温度と、位置センサ 1 3 1 および 1 6 1 で示すピストン 1 2 0 b および 1 5 0 b の位置とをコンピュータ 1 1 0 に入力する。空気バルブ 1 3 2、1 3 4、1 3 6、1 3 8、1 4 0、1 6 2、1 6 6、1 6 8 および 1 7 0 をコントロールするための電気信号をコンピュータ 1 1 0 によって出力する。流体の配列決定および時間圧力プロファイルは、オペレータプログラマブルである。レギュレータ 1 8 0 を自動的にコントロールして、圧力センサからのフィードバックを用いて反応室の望ましい圧力レベルを設定する。

C. 使用

開示した反応器を用いて、核酸配列決定、核酸合成、タンパク質配列決定、酵素キラル合

10

20

30

40

50

成およびラセミ混合物の鏡像異性体精製を含む化学反応を調節する。非酵素反応も、調節可能である。

反応容器の内容物に圧力を加えた場合の望ましい効果として、タンパク質アンフォールディング、タンパク質フォールディング、酵素の可逆阻害、酵素の活性化、反応速度の変動および非酵素反応の熱力学平衡が挙げられる。圧力誘導阻害とは、一つの酵素反応工程か、いくつかの配列決定酵素反応工程か、または完全酵素事象を阻害することである。さらに、阻害圧力は、個々の反応分子（例えば、酵素、共同因子、または第1もしくは第2の基質）の活性を同期することができる。圧力が許容圧力に変化すると、多数の酵素分子がほぼ同時に作用し始め、その結果、酵素の活性をより均一に、正確に、しかも再現可能に調節する。基質に対して酵素がモル過剰であるならば、通常、同期作用を増進する。酵素反応工程は、生成物（P）を形成するために酵素（E）と基質（S）との反応に必要な機械論的工程を含む。これらの工程は、完全酵素事象に依り、E、S、Pの配座変化およびその組み合わせ；E - SおよびE - Pの会合または解離；共同因子とSまたはEの相互作用；S、E、共同因子間の相互作用；E、Sまたは共同因子との溶媒相互作用；Eと、S、溶媒または共同因子等の試料混合物の成分とのプロトン交換；EとSとの触媒相互作用を含む。酵素事象に依り、2つ以上の基質（S、S'、S''等）、2つ以上の生成物（P、P'、P''等）および2つ以上の共同因子が存在可能である。さらに、いくつかの実施形態では、2つ以上の溶媒または溶質（例えば、塩または金属イオン）および圧力と関連する温度を用いて、酵素反応工程を調節する阻害または許容状態を提供する。

同様に、試料混合物の圧力を、酵素反応工程を行うことが可能な圧力に変化させることで、次の酵素反応工程、一連の酵素反応工程、または1つ以上の完全酵素事象を行うことが可能となる。一般的な方法を用いて、望ましい一連の単一酵素事象をプログラミングすることにより、酵素の活性を調節することができる。高圧処理によって、多くの生体高分子、例えばタンパク質、酵素、抗体およびポリヌクレオチドが生じ、これらは1気圧で自然に作用してアンフォールドまたは変性する。このようなアンフォールディングによって、例えば酵素の活性を阻害する。逆に、いくつかの酵素またはタンパク質、特に高圧で自然に作用するもの（例えば、深海ベント生物体において）を、低圧で阻害することが可能である。

一般に、濃度、緩衝液、溶媒、酵素、基質および他の添加剤または促進分子が、従来技術において良く知られている。しかし、通常の酵素濃度よりも高くなると、より均一で再現可能な結果が得られることになる。従来技術においては、核酸、マーカー、リンカー、プライマ、緩衝液、アミノ酸、保護基、溶媒、酵素および関連の他の試薬に対する商業上の供給源に精通している（例えば、Aldrich、Milwaukee、WI；Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ；Promega Corp.、Madison、WI；Sigma、St. Louis、MO；およびStratagene、La Jolla、CA）。

1. 検出

反応の過程および反応の生成物をモニタしたい場合、圧力サイクリング反応器は、流体に存在するか、または反応容器から除去される成分の特性を検出するために連結した検出器400（図10参照）を備える。検出器は、コンピュータ制御され、分析した成分に関する情報をコンピュータにリレーすることができる。このように、反応容器内での圧力パルスの前に、その間に、またはその後、成分を分析することが可能である。成分はまた、反応容器から除去した後にも分析することも可能である。検出器の例として、放射性同位体検出器、赤外分光計、質量分析計、ガスクロマトグラフィー質量分析計、分光光度計、分光蛍光計、電気化学検出器、表面プラズモン共振検出器および光度計が挙げられる。

2. 試薬提示および生成物分離

圧力サイクリング反応器が、再使用可能または未使用の反応物を反応生成物から分離するための手段を備えている場合、反応物を効率的に使用することができる。圧力サイクリング反応器は、容器から流体を除去しながら反応容器内で試薬を保持するために抑制剤331（図6B参照）を有する反応容器を備えることも可能である。抑制剤の例として、大き

10

20

30

40

50

さ、電荷、極性、キラリティーまたはその組み合わせによって試料混合物成分を分離する膜またはマトリックス等の半透性（すなわち分離）物質が挙げられる。

半透性物質は、フィルタまたはネット状に試料容器または反応容器の全断面積を占有することも可能である。抑制剤 3 3 1、例えば半透性バリアは、反応容器を 2 つの部分に分割することができる。2 つ以上の半透性バリアは、反応容器を 3 つ以上の部分に分割する。例えば、反応容器または室は、少なくとも 2 つの異なる膜の間で、反応容器内に保持した固定化基質を入れることが可能である。1 つの膜は、酵素および生成物または小さい分子が通過できる細孔を有する。他の膜は、生成物または小さい分子のみが通過する細孔を有する。

さらに、半透性物質は、反応容器または試料容器の壁面に装着したポーチまたはバッグ（固定しているか、可撓性であるかのいずれかである）であってもよい。例えば、反応容器は、固定化反応物もしくは試薬（酵素もしくは基質のいずれか）を有する多孔プラスチックもしくはガラスプラグ；または固定化反応物を含む多孔膜を支持する反応容器の内面上の膜支持物を含むことが可能である。さらに、他の例として、固定化試薬を含む堅い中空の多孔フリットが挙げられ、このフリットは、反応室または容器の内面に装着される。いくつかの実施形態では、抑制剤を移動して半透性バリアを提供し、その後、一連のプログラミングしたサイクルの間、一時的に除去して、反応容器または試料容器からすべての成分を自由に流し出すことが可能である。

分離物質は、一般に、試料混合物成分に関して化学的に不活性であり、また特定の応用において阻害圧力と同じほど高い流体圧力に構造上耐える。サイズ識別膜またはフィルムは、0.5 KD から 300 KD までの分子量カットオフで入手可能な DIAFLO（登録商標）限外濾過膜（Amicon、Beverly、MA）を含む。例えば、膜は、遊離ヌクレオチドまたはアミノ酸から酵素を、また遊離酵素および遊離ヌクレオチドまたは溶液中のアミノ酸から固定化基質を分離することが可能である。膜またはマトリックス等の分離物質は、試料混合物の成分と相互作用する物質または共有結合した配位子が含浸もしくはコーティングされ、またそうでない場合は、その配位子を用いて、より機能的となる。非対称表面特性または非対称細孔チャネル疎水性、親水性、サイズ等を有する物質を使用することも可能である。半透性物質は、カラムクロマトグラフィーの類似体を含むことも可能であり、少なくとも 1 つの試料混合物成分が溶離される充填物質を用いてキラル分離を達成する。

調節される反応と、選択した抑制剤の制限特性に依り、除去した流体は、ヌクレオチド、アミノ酸、酵素、非結合酵素基質、共同因子および種々の溶媒または塩を含むことが可能である。同様に、試料混合物の保持成分は、溶媒、塩、酵素、遊離基質または固定化試薬を含むことも可能である。固定化試薬は、非液体支持部に装着した有機化合物を含む。支持物の例として、ポリマー、複合体、プラスチックもしくはガラスビーズ、マトリックス、ボード、またはシリンダもしくはチューブを含む他の形状が挙げられる。

いくつかの実施の形態では、溶離した成分が、さらなる圧力処理のための次の試料容器に直接流れ込む。反応容器を通過して高圧で流体を流す能力は、酵素事象の調節に加えて分離を援助するための高圧液体クロマトグラフィーに類似した方法で用いることが可能である。

高圧を含むいかなる圧力でも、また圧力パルスに関していかなる時にも（すなわち、1 つ以上の酵素反応工程を行う前、その間、またはその後）、分離は発生し得る。各圧力パルスの後、または所定数の圧力パルスの後にも、分離は発生し得る。

3. 実施の形態

これらの反応に対して、第 1 および第 3 の圧力のみ、または外界温度以下との組み合わせでは、酵素の活性を阻害するのに十分であるが、第 2 の圧力のみ、または第 1 の温度よりも高い温度との組み合わせでは、阻害しないため、酵素は基質上で作用することになる。本発明は、DNA 配列を決定するための開示した反応器を用いる方法を特徴とする。Hind III のような制限エンドヌクレアーゼは高圧状態によって可逆的に阻害可能な分布酵素である（実施例 7 参照）。ポリヌクレオチドの配列決定のためのエキソヌクレアー

10

20

30

40

50

ぜは、ラムダエキソヌクレアーゼ、E. coliのエキソヌクレアーゼI - III、ヌクレアーゼBal-31、エキソリボヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼの活性を含む。例えば、エキソヌクレアーゼIIIは、25で30,000psiおよび40,000psiで阻害される分布酵素である。減圧した後に活性が検出されたことに基づいて、この圧力誘導阻害は可逆的である。

遺伝子ブラウジングの方法によれば、ある領域に制限エンドヌクレアーゼ処理を行い、その後、配列を決定する。エンドヌクレアーゼを繰り返し除去し、配列決定酵素を導入して、ポリヌクレオチド全体の配列決定を行うことなく長い核酸中の所定位置をスポット分析することができる。この配列マッピングまたは遺伝子ブラウジングの方法は、固定された大きな核酸基質を含有する試料混合物を与える工程と、制限酵素で基質を開裂する工程と、試料容器から制限酵素と開裂生成物とを除去する工程とを含む。この方法は、ラムダエキソヌクレアーゼ阻害圧力下でラムダエキソヌクレアーゼを添加する工程と、圧力をラムダエキソヌクレアーゼ作用圧力に変化させ、それによって固定化核酸から所定平均数のヌクレオチド（好ましくは1つのヌクレオチド）を脱離させる工程と、圧力をラムダエキソヌクレアーゼ阻害圧力に変化させる工程と、脱離したヌクレオチドを除去し分析する工程とをさらに含む。

配列決定の他の方法は、確証的配列決定である。この方法によれば、5' - 3'活性の進行的ラムダエキソヌクレアーゼは、二重鎖DNAに優先的に作用して、単一ヌクレオチドを除去する。その後、3' - 5'活性の進行的エキソヌクレアーゼI（マグネシウム依存）は、現在露出している一本鎖DNAに作用して、単一ヌクレオチドを除去する。Exo Iは、ラムダエキソヌクレアーゼが終結した場所、またはその近くの二重鎖領域で停止する。このように、一本鎖が配列決定され、相補的鎖もまた配列決定されて、第1の配列を確認する。

この方法は、固定化核酸基質を含有する試料混合物およびラムダエキソヌクレアーゼ阻害圧力でラムダエキソヌクレアーゼを供給する工程と、圧力をラムダエキソヌクレアーゼ作用圧力に変化させる工程と、圧力をラムダエキソヌクレアーゼ阻害圧力に変化させる工程と、脱離した1つ以上のヌクレオチドを除去して分析する工程とを備える。ヌクレオチド除去および分析が後に続く1つ以上の反復圧力パルスまたは圧力サイクルの後、0.2M - 0.5M NaCl溶液等の溶離液、その後67mM グリシンKOH、pH9.5、10mM 2-メルカプトエタノールおよび6.7mM MgCl₂等のExo I緩衝液を用いて、試料混合物からラムダエキソヌクレアーゼを除去する。試料容器には、エキソヌクレアーゼI - 阻害圧力での3' - 5'活性のエキソヌクレアーゼが含まれ、圧力がエキソヌクレアーゼ許容圧力に変化し、圧力がエキソヌクレアーゼ阻害圧力に変化し、放出したヌクレオチドが除去され、分析される。

さらに別の配列決定方法は、プローブ配列決定と、プライマ伸張プローブの配列決定との両方を含む。プローブ配列決定は、既知の突然変異部位（例えばシスチックフィブロシス）に対応するプライマの組として、一本鎖オリゴヌクレオチドを採用する。この方法によれば、患者のDNAの1つ以上の一本鎖転写をPCR生成物から単離して固定化する。患者次第で、既知のDNA一本鎖プローブ基を用いた反応が一本鎖プローブのハイブリダイゼーションを全く生じないか、または1つ以上の一本鎖プローブのハイブリダイゼーションを生じ、二重鎖領域を有する核酸生成物が生じる。二重鎖部分は、例えば3' - 5'鎖上の5' - 3'酵素を用いて選択的に配列決定される。

従って、この方法は、領域を表す固定化一本鎖PCRアンプリコンを含有する試料混合物を供給する工程と、既知の突然変異および野生型を含む1組のオリゴヌクレオチドプローブを試料混合物に添加する工程と、ハイブリッド形成していないオリゴヌクレオチドを除去する工程と、3' - 5'エキソヌクレアーゼを任意に添加する工程と、ラムダエキソヌクレアーゼ阻害圧力で、ラムダエキソヌクレアーゼ（5' - 3'）を含有する試料混合物を供給する工程と、圧力をラムダエキソヌクレアーゼ許容圧力に変化させる工程と、圧力をラムダエキソヌクレアーゼ阻害圧力に変化させる工程と、放出または脱離した1つ以上のヌクレオチドを除去し分析する工程とを備える。第1のプローブ配列が完了するまで、

10

20

30

40

50

配列決定工程を繰り返す。次の組のプロープは、ハイブリッド形成され、洗浄される。一本鎖は、次の二重鎖領域に到達するまで、3' - 5' エキソヌクレアーゼで消化される。その後、ラムダエキソヌクレアーゼ5' - 3' を上記のように用いて、二重鎖領域を分析する。この方法は、オペレータ工程が少ないため、PCRおよび他の増幅技術よりも速い。

可変領域において既知の突然変異に対応する種々の一本鎖オリゴヌクレオチドに配列5' を用いて、プライマ伸張プロープを配列決定する方法に、圧力サイクリング反応器を使用することが可能である。通有プライマプロープは、PCR生成物からの患者の一本鎖DNAと反応し、患者のDNAは単離され、固定化される。低ストリンジエンシー状態で反応を行って、通有プロープの非適合を調節する。プロープは、その領域を介して伸張し、伸張したプライマは、エキソヌクレアーゼIIIと3' - 5' 方向に配列決定される。この配列分析は、その領域における、既知および未知の突然変異を検出する。

上記実施例に基づいて、圧力サイクリングまたは圧力パルシングの基本原理は上で詳細に述べているので、この方法の他の実施の形態を以下のように要約することができる。上記各工程は、組み合わせてもよいし、さらに別の工程に分割してもよい。領域のPCRアンプリコンを単離して固定化する。オリゴヌクレオチドプライマを固定化アンプリコンと反応させる。ハイブリッド形成されていないプロープを洗浄または溶離によって除去する。ヌクレオチドおよびDNAポリメラーゼ（例えば、Vent_R、New England Biolabs）を、阻害圧力をかけて試料混合物に供給する。圧力パルスを採用して所定数のヌクレオチドをプライマに添加する。遊離ポリメラーゼおよびヌクレオチドを洗浄によって除去する。阻害圧力をかけて、エキソヌクレアーゼIIIを試料混合物に供給する。圧力パルスを採用して、伸張したプライマから単一ヌクレオチドを脱離する。放出したヌクレオチドを除去し、分析する。

部分的消化を行う方法を、以下で述べる。定型的な方法では、重要な試料の調製（一般に500塩基対の読みとり長さ（read-lengths）に対する切断、単離、精製およびマッピング）、配列決定、ならびにデータ分析（ギャップの解読、曖昧な配列の解読）を必要とする。本発明は、これら3つの工程の各々に、例えば長い読みとり長さのテンプレート（例えば、2,000、10,000、25,000、50,000またはそれ以上の塩基）を与え、配列決定の際、酵素反応を調節し、単一のヌクレオチドを一度に放出し、検出して分析を簡素化することにより影響を与える。ゲル電気泳動は必要ない。5000個の塩基を数時間以内で（例えば2時間未満または1時間未満）配列決定することが可能である。上記改良の結果、配列決定した1つ塩基についてのコストも削減される。開示した反応器の他の実施の形態は、DNAの合成に用いる。Eco IIIおよびDNAジデオキシヌクレオチジルエキソトランスフェラーゼ（ターミナルトランスフェラーゼ、例えばEC2.7.7.3）等の分布酵素は、高压で可逆的に阻害され、後者の酵素は、DNA合成のための鋳型を必要とはしない。DNAを合成する方法は、（a）支持部（例えば、ビーズ、マトリックスまたは表面）上で固定化された開始因子（例えばプライマ）を含有する試料容器と、（b）固定化開始因子の下流で、酵素を遊離ヌクレオチド（例えば、5、10、15、20または25KD）を分離するのに十分な分子量カットオフを有する半透性物質と供給する工程を備える。試料容器はまた、ターミナルトランスフェラーゼの超過量（例えば、開始因子の3'端部1モルあたり少なくとも2モル当量）も含有する。ヌクレオチドを含有する溶液を、ターミナルトランスフェラーゼ阻害圧力をかけて試料混合物に添加する。圧力をターミナルトランスフェラーゼ許容圧力に変化させ、この圧力は、1つのプライマにつき所定平均数のヌクレオチド（例えば、1つのプライマにつき1つのヌクレオチドまたは単一の完全酵素事象）を取り込むのに十分な時間だけ、保持される。試料容器圧力をターミナルトランスフェラーゼ阻害圧力に変化させた後、取り込まれていない、または遊離したヌクレオチドを（阻害圧力を保持した状態で）試料容器から洗浄、除去し、一方、酵素は半透性物質によって試料容器内に保持する。次に望ましいヌクレオチドを試料混合物に添加して、望ましいオリゴヌクレオチドを形成するまでサイクルを繰り返す。

10

20

30

40

50

いくつかの組み合わせた実施の形態では、試料容器は異なる複数の固定化開始因子を含めることができる。各開始因子に同時に一つのヌクレオチドが付加され、その結果これら開始因子には共通のオリゴヌクレオチド配列セグメントが形成される。半透性物質は、下流バリアとして表すことも可能であり、また試料容器は半透性物質から形成した複数の分子量カットオフポーチを含むことも可能であり、このポーチは、一定量のターミナルトランスフェラーゼおよび1つ以上のプライマを含む。ポリヌクレオチドを合成するのに有用なポリメラーゼは、SP6 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼ、シーケナーゼ(U. S. B i o c h e m i c a l C o r p . , c i t y / s t a t e から入手可能なシーケナーゼバージョン2.0)、熱安定性DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、Taq 10
ポリメラーゼ、Thermococcus sp. (株⁹⁰ Nm) DNAポリメラーゼ、Thermococcus litoralis DNAポリメラーゼ、およびPyrococcus sp. GB-D DNAポリメラーゼを含む。

クラスE.C.2.7.7の酵素は、ニコチンアミド-ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、FMNアデニリルトランスフェラーゼ、パンチテイン-フォスフェートアデニリルトランスフェラーゼ、サルフェートアデニリルトランスフェラーゼ、サルフェートアデニリルトランスフェラーゼ(ADP)、DNA依存性RNAポリメラーゼ、DNA依存性DNAポリメラーゼ、UTP-グルコース-1-フォスフェートウリジリルトランスフェラーゼ、UTP-ヘキソース-1-フォスフェートウリジリルトランスフェラーゼ、UTP-キシロース-1-フォスフェートウリジリルトランスフェラーゼ、UTP-グルコース-ヘキソース-1-フォスフェートウリジリルトランスフェラーゼ、マンノース-1-フォスフェートグアニリル-トランスフェラーゼ、エタノールアミン-フォスフェートシチジリルトランスフェラーゼ、コリンフォスフェートシチジリルトランスフェラーゼ、ニコチネート-ヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、ポリヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、tRNAシチジリルトランスフェラーゼ、マンノース-1-フォスフェートグアニリルトランスフェラーゼ(GDP)、UDP-N-アセチルグルコサミンピロフォスフォリラーゼ、グルコース-1-フォスフェートチミジリルトランスフェラーゼ、tRNAアデニリル-トランスフェラーゼ、グルコース-1-フォスフェートアデニリルトランスフェラーゼ、ヌクレオチド-トリフォスフェートヘキソース-1-フォスフェートヌクレオチジルトランスフェラーゼ、ヘキソース-1-フォスフェートグアニリルトランスフェラーゼ、フコース-1-フォスフェートグアニリルトランスフェラーゼ、ガラクトース-1-フォスフェートチミジリルトランスフェラーゼ、グルコース-1-フォスフェートシチジリルトランスフェラーゼ、グルコース-1-フォスフェートグアニリルトランスフェラーゼ、リボース-5-フォスフェートアデニリルトランスフェラーゼ、アルドース-1-フォスフェートアデニリル-トランスフェラーゼ、アルドース-1-フォスフェートヌクレオチジルトランスフェラーゼ、3-デオキシマンノオクツロソネートシチジリルトランスフェラーゼ、グリセロール-3-フォスフェートシチジリル-トランスフェラーゼ、D-リビトール-5-フォスフェートシチジリルトランスフェラーゼ、フォスファチデートシチジリルトランスフェラーゼ、グルタメート-アンモニア-リガーゼアデニリルトランスフェラーゼ、アシルノイラミネートシチジリルトランスフェラーゼ、グルクロネート-1-フォスフェートウリジリルトランスフェラーゼ、グアノシン-トリフォスフェートグアニリルトランスフェラーゼ、ゲナタミシン2"-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、ストレプトマイシン3"-アデニリルトランスフェラーゼ、RNA依存性RNAポリメラーゼ、RNA依存性DNAポリメラーゼ、mRNAグアニリルトランスフェラーゼ、アデニリルサルフェート-アンモニアアデニリルトランスフェラーゼ、RNAウリジリルトランスフェラーゼ、ATPアデニリルトランスフェラーゼ、フェニルアラニンアデニルトランスフェラーゼ、アントラニレートアデニリルトランスフェラーゼ、tRNAヌクレオチジルトランスフェラーゼ、N-メチルフォスフォ-エタノールアミンシチジリルトランスフェラーゼ、(2,3-ジヒドロキシベンゾイル)-アデニレートシターゼ、および[タンパク質PII]ウリジリルトランスフェラーゼを含む。 40
50

本発明は、RNAの合成と同様の方法を特徴とし、ここでは、例えば、酵素ポリリボヌクレオチドフォスホリラーゼの分布特性をDNAジヌクレオチジルエキソトランスフェラーゼまたは上記の他のターミナルトランスフェラーゼの代わりに用いる。ポリリボヌクレオチドフォスホリラーゼは鋳型も必要としない。多数の他のトランスフェラーゼおよびフォスホリラーゼを上記方法で代用することができる。酵素が鋳型を必要とする場合、開始因子には鋳型が含まれる。

類似の方法で、ポリペプチドを合成し、配列決定することが可能である。タンパク分解酵素は、トリプシン(黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)細胞外プロテアーゼ)、キモトリプシン、ペプシン、アミノピプチダーゼM(EC3.4.11.2)およびカルボキシペプチダーゼA、BおよびC(それぞれEC3.4.17.1; EC3.4.17.2; およびEC3.4.16.1.)を含む。ポリペプチドは、サブチリシンおよびサーモリジンのような酵素を用いて合成できる。

4. 合成化学

有機合成は、微生物と酵素の両方を採用してキラル化合物を合成する。このような酵素の例としては、プロテアーゼ、デヒドロゲナーゼ、オキシダーゼおよびトランスフェラーゼが挙げられる。ラセミ混合物から鏡像異性体を分離するのに有用な酵素は、リパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、デヒドロゲナーゼ、オキシダーゼおよびトランスフェラーゼを含む。

原則として、感圧遷移状態を有するいかなる化学反応の反応速度も、開示した反応器によって供給される単なる圧力パルスで調節(増加、減少、または停止)可能である。化学反応の例としては、ポリペプチドの非酵素合成、グリコプロテイン、リボポリ糖類、および小さいキラル分子の酵素または非酵素合成が挙げられる。非酵素反応は、感圧熱力学平衡を受け、一定の圧力をかけて特定の立体異性体を生成する。平衡は、反応体のモル体積、遷移状態錯体、生成物、またはその組み合わせを基準にすることが可能である。触媒を採用する場合、圧力パルスを(温度と組み合わせて)用いて触媒からの生成物の解離を阻害または助長し、それによって未反応試薬を触媒生成錯体から分離し、生成物を単離し、精製を助長することが可能である。いくつかの実施形態では、超音波が圧力パルスを発生することが可能である。

本発明は、反応平衡に影響を及ぼす方法を提供し、この方法は、圧力をかけて試料容器内に固定化試薬を供給し、望ましい温度および圧力状態(例えば、高圧)で1つ以上の反応物を取り込む工程とを備える。反応は、平衡選択状態で進行し、それによって特定の立体異性体を合成する。反応生成物は、高圧で、または試料容器を減圧した後に、除去される。

開示した反応器はまた、その二次、三次または四次構造配座をまず変えることにより化合物を改変する際に有用となる。例えば、高圧での処理は、タンパク質フォールディングの結果、通常埋め込まれる(タンパク質表面には露出していない)1つ以上のアミノ酸残留物を露出させる。露出したアミノ酸を改変した後、タンパク質を再フォールディングする。

5. 阻害

酵素反応工程の阻害は、完全酵素事象を達成するために、酵素反応経路に影響を及ぼすか、またはそれに関連する機械論的工程、例えばここで述べるような工程を行わないことである。酵素反応工程の可逆阻害は、後の好都合な条件の下で、酵素反応工程を行うこと、すなわち酵素が回復不可能な変性、不可逆的な結合、改変または非活性化が行われていないことを意味する。可逆的阻害状態は、工程における酵素反応機構経路を一時的に阻止するか、または一時停止する。その阻害状態は、酵素事象に依り、機械的経路に沿って、2つ以上の酵素反応工程を効果的に阻止することが可能である。圧力、温度または溶媒内容物等の条件を変えると、さらなる酵素反応工程を阻害することが可能となる。試料混合物や、温度等の試料混合物条件に依り、圧力変化から起きるさらなる酵素工程の阻害として、後の単一酵素反応工程の阻害、幾つかの酵素工程の阻害、または完全な酵素事象(例えば、ヌクレオチドもしくはアミノ酸の開裂もしくは添加、または官能基の合成有機変換)

10

20

30

40

50

の阻害が可能である。阻害圧力が許容圧力に一旦変化すると、酵素反応経路に沿った進行が、試料混合物成分、時間、温度または溶媒条件によって制限される。

必要な試料混合物成分（例えば、基質、共同因子および金属イオン）がすべて存在し、且つ温度等の他の条件が好ましい場合、阻害圧力が完全酵素事象を阻害することが可能である。この場合、後に阻害圧力を許容圧力に変化させ、許容圧力を十分な時間だけ維持することにより、酵素事象が完了する。時間と試料混合物成分の量が充分存在すれば、複数回の酵素事象が生じる。

必要な試料混合物成分および条件の全てではなく、そのうちの幾つかが存在する場合、阻害圧力が、1つ以上の酵素反応工程を阻害できる。この第2の場合、阻害圧力を許容圧力に後に変化させて、許容圧力を十分な時間だけ維持することにより、必要な試料混合物成分および条件が利用可能である同数の酵素反応工程を生じることになる。必要な試料混合物成分のうちの幾つかが存在しない場合、または温度等の条件が好ましくない場合、完全酵素事象は起こり得ない。しかし、試料混合物成分および条件によって、1つまたはそれ以上の後の酵素反応工程が生じることになる。

一実施形態においては、本発明は、酵素を核酸合成酵素または分解酵素を同期的に作用させ、同一DNAフラグメントの複数のコピーを改変することを企図している。酵素が許容圧力にある期間を調節して、核酸に作用してそれを改変する酵素事象の数を決定する。

一実施形態は、核酸を処理する方法であって、この方法は、a) i) 核酸基質（例えば、二重鎖デオキシリボ核酸基質）と、ii) 前記核酸基質に進行的に作用することができる酵素（例えば、エキソヌクレアーゼ）と、iii) 圧力を加える手段とを供給する工程と、b) 前記核酸基質と前記酵素を混合して、（例えば温度を下げて）反応混合物を生成する工程と、c) 前記酵素の前記核酸基質に対する作用を調節する（例えば、可逆的に阻害する）ような条件で圧力（例えば、高圧）を加えるための前記手段を用いて、前記反応混合物を処理する工程とを備える。

他の実施形態では、d) 前記酵素が前記核酸基質に作用するような低圧条件で圧力を加えるための前記手段を用いて、前記反応混合物を処理する工程をさらに備え、e) 工程cおよびdを少なくとも1回繰り返して、さらに改変された基質を生成する工程を任意に備える。この方法は、前記改変された基質（すなわち、酵素が作用できる各工程で発生した基質）を検出するか、または反応の他の生成物（基質から発生した1つ以上のフラグメント）を検出する工程を備えることも可能である。

D. 圧力および温度を変化させる実施形態

温度を調節することによって、工程全体をさらに調節することができる。一実施形態では、本発明は、核酸を処理する方法を企図しており、この方法は、a) i) 試料容器と、ii) 核酸基質と、iii) 前記核酸基質に作用可能な酵素と、iv) 圧力を調節する手段と、v) 温度を調節する手段とをいずれかの順に供給する工程と、b) 水溶液内の前記酵素を前記試料容器に添加する工程と、c) 前記酵素が実質的に不活性となるように、前記温度調節手段を用いて、前記試料容器内の前記水溶液の温度を下げる工程と、d) 前記核酸基質を前記不活性酵素に添加して、反応混合物を生成する工程と、e) 前記圧力調節手段を用いて、前記試料容器の圧力を高める工程と、f) 前記温度調節手段を用いて、前記試料容器の前記反応混合物の温度を上昇させる工程と、g) 前記酵素が活性状態であり、前記核酸基質に作用するように、前記圧力調節手段を用いて、前記試料容器の圧力を低下させる工程とを備える。工程(e)の圧力増大は、最適酵素温度で前記核酸基質に対する前記酵素の作用を実質的に抑制できる圧力を達成することが企図されている。また、工程(g)における酵素の前記作用により、前記核酸基質が改変されることも企図されている。この方法は、工程(g)の後に、前記改変された核酸基質を検出する工程をさらに備えてもよい。また、工程(f)における前記温度上昇は、前記酵素が活性状態である温度を達成することも意図されている。

他の実施形態では、本発明は、核酸を処理する方法を企図しており、この方法は、a) i) 試料容器と、ii) 核酸基質と、iii) 前記核酸基質に作用可能な酵素と、iv) 圧力を調節する手段と、v) 温度を調節する手段とをいずれかの順に供給する工程と、b)

10

20

30

40

50

水溶液内の前記酵素を前記試料容器に添加する工程と、c)前記温度調節手段を用いて、前記試料容器内の前記水溶液の温度をおよそ5 未満まで下げ、それによって、前記酵素を実質的に不活性にする工程と、d)前記核酸基質を前記不活性酵素に添加して、反応混合物を生成する工程と、e)前記圧力調節手段を用いて、前記試料容器の圧力を、平方インチあたりおよそ30,000ポンドよりも高くする工程と、f)前記温度調節手段を用いて、前記試料容器の前記反応混合物の温度を、平方インチあたりおよそ30,000ポンドよりも高く上昇させる工程と、f)前記温度調節手段を用いて、前記試料容器内の前記反応混合物の温度を、およそ10 よりも高くする工程と、g)前記圧力調節手段を用いて、前記試料容器の圧力を平方インチあたりおよそ20,000ポンド未満まで下げ、それによって前記酵素が前記核酸基質に作用するように、前記酵素を活性状態にする工程とを備える。一実施形態においては、工程(g)における前記圧力低下により、平方インチあたりおよそ5,000から15,000ポンドの圧力を達成し、工程(f)の前記温度上昇により、およそ15 から20 までの温度を達成する。

10

さらに他の実施形態において、本発明は、核酸を処理する方法を企図しており、この方法は、a)溶液中の酵素を第1の試料容器に、溶液中の核酸基質を第2の試料容器に、いずれかの順で添加する工程と、b)前記第1および第2の試料容器の温度をおよそ0 からおよそ5 までに下げる工程と、c)前記核酸基質を反応容器中の前記酵素と化合して、0 からおよそ5 までの温度の反応混合物を生成する工程と、d)圧力調節手段を用いて、前記反応容器の圧力を増大する工程と、e)前記反応容器中の前記反応混合物の温度を、およそ10 からおよそ80 までに上昇させる工程と、f)前記酵素が前記核酸基質に作用して、前記核酸基質が改変されるように、前記圧力調節手段を用いて、前記反応容器の圧力を低下させる工程とを備える。本発明は、工程d)およびf)を少なくとも1回繰り返し、さらに改変された基質を生成する工程をさらに企図している。

20

核酸の改変は、処理の後、改変された核酸基質を検出することにより、測定できる。代わりに、核酸の改変の性質または程度を、酵素が添加または除去された塩基の検出および同定により決定することも可能である。

一実施形態においては、欠失体を生成するために、同期させた酵素作用を採用することが企図されている。圧力を使用することにより、消化速度を細かく調節し、一定の長さを有する欠失体の群の生成を定型化することが可能である。

本発明をうまく使用して、核酸配列決定を行うことも企図されている。さらに、本発明の他の実施形態は、タンパク質配列決定、多糖配列決定およびタンパク質合成にも有効に利用できる。一実施形態では、核酸配列決定方法を自動化する。一実施形態では、本発明は、二重鎖または一本鎖ポリヌクレオチドを配列決定するための方法を企図しており、この方法は、a)第1の端部を有するポリヌクレオチドを固定化する工程と、b)前記第1の端部に結合可能な進行的酵素を添加し、この結合を生じさせる工程と、c)前記酵素を阻害可能な静水圧を加える工程と、d)前記酵素が前記ポリヌクレオチドに作用して生成物を産生させる時間間隔で、前記静水圧を非阻害レベルまで下げる工程と、e)高压フローストリームを与えて、前記生成物を検出器に輸送する工程と、f)前記検出器を用いて前記生成物を検出する工程と、g)工程(c)から(f)までを繰り返し、その結果、前記酵素が前記ポリヌクレオチドの全長を転位させる工程とを備える。一実施形態においては、前記ポリヌクレオチドは一本鎖であり、工程(d)から(g)までは、複数の前記一本鎖ポリヌクレオチドに対して同期して行われることが企図されている。

30

40

この方法を実施する場合、固定化を反応室内で行うことも可能である。一実施形態では、上記固定化は、前記ポリヌクレオチドを前記反応室に共有結合された相補的フラグメントにハイブリッド形成させることを含む。酵素は、DNAポリメラーゼであってもよく、前記反応室内への(第1のデオキシヌクレオチドトリフォスフェートと共に)ポンピングにより供給してもよい。

本発明は、検出方法に限定されるものではない。例えば、検出器は、質量分析計または蛍光計であってもよい。

本発明は、酵素の活性を調節することに関し、特に、同期した酵素活性を用いて、核酸の

50

ような基質を処理することに関する。この新規なアプローチは、低圧のパルスによって阻害された反応システムに高い静水圧を加えることにより、DNAの合成または分解に必要な酵素の活性を正確に調節する能力に基づく。各々がDNA（例えば、固定化DNA）の鎖に結合された、酵素の多数の転写体の活性を正確に調節する能力により、酵素触媒化反応の同期循環を生じる。各循環の際、生成物を緩衝液の流れで検出器に輸送する時に検出するのに十分な可溶性生成物を形成する。例えば、エキソヌクレアーゼが同期され、その結果、DNAの多数の転写体に作用する多数の酵素がすべて前方に移動し、同じ塩基を同時に放出する。逆に、DNAポリメラーゼはすべて前方に移動し、同じ塩基を添加する。電気化学的検出のような利用可能な技術、質量分析計および蛍光計を用いて、反応産物が容易に検出される。

10

E. 酵素

本発明は、進行的特性を有する酵素と、非進行的（分布）特性を有する酵素とを使用することを企図している。塩またはイオン状態を変化させることにより、幾つかの酵素は、進行的または分布的特性を備えることが可能である（例えば、ある一定のフォスホリラーゼ）。進行的酵素は、化学反応を繰り返し触媒化するものであり、一方で、特定の基質に結合されたままで、且つそれに沿って移動する。一実施形態では、本発明は、単一塩基を増加して、DNAテンプレートに沿った進行的酵素の移動を調節することを企図している。これは、反応システムに高い静水圧を加えて、酵素活性を阻止するか、または阻害することにより達成される。その後、静水圧を短期間だけ変化（例えば、低下）させて、酵素をDNAテンプレートに沿って隣の塩基まで移動させる。この移動は、酵素に沿ったDNAの転位としてここで定義されている。

20

一実施形態においては、本発明の方法に採用される酵素が、優れた進行性を示す。モノマー酵素が好ましいが、本発明の反応条件で解離しないオリゴマー酵素もまた適当である。温度、pH、塩の濃度および緩衝液成分等の二次反応パラメータの改変により、圧力によって誘導されるサブユニット解離を逆転させることが可能となる。

DNA配列決定に有用な酵素は、DNAポリメラーゼおよびエキソヌクレアーゼを含む。本発明に有用であるエキソヌクレアーゼの例は、ラムダエキソヌクレアーゼである。この酵素は、5'末端のモノヌクレオチドに対する進行的かつ段階的な加水分解および解離を触媒化して、二重鎖DNAの5'-リン酸末端を形成する。J. W. Little et al., J. Biol. Chem. 242: 672 (1967) 参照。酵素は商業上入手可能である（例えば、Novagen, Inc., Madison, WI）。

30

適当な酵素を選択する際、一般的ではない物理化学的特性を示す酵素が有用となる。例示したものは、(1) 2,010メートルのサブマリンサーマルベントから単離された *Pyrococcus species* GB-D等の“ベント”生物体の酵素（Deep Vent（登録商標）、New England Biolabs）および広い範囲の反応条件を許容する能力と配列決定生成物の産生量の向上との両方を備えた遺伝子学的に処理した酵素を含む。しかしこれらに限定されない。後者の例はシーケナーゼであり、これは、2つのサブユニットを有し、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有さないバクテリオファージT7 DNAポリメラーゼの遺伝子学的に処理した（商業上入手可能な）バージョンである。他の例は、*Thermus thermophilus*由来のDNAポリメラーゼを含み、これは、検出可能3'-5'または5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を持たないが、広い温度範囲を有する単量体酵素である。バクテリオファージT4のDNAポリメラーゼは、5'-3'および3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する単一ポリペプチドチェーンである。

40

本発明の方法により、使用可能なエキソリボヌクレアーゼがいくつかある。これらの酵素は、基質としてRNAを利用する。N. G. Nossal and M. F. Singer, J. Biol. Chem. 343: 913 (1968); C. B. Klee and M. F. Singer, J. Biol. Chem. 243: 923 (1968) 参照。適当な進行的酵素を選択するために、特定の条件の下での酵素の作用を調査することにより以下の疑問点を解決する必要がある：(1) DNA基質が存在する状態で、また存在し

50

ない状態で酵素が安定したままである圧力範囲は？ (2) 酵素が可逆的に阻害される圧力は？ またこの阻害は、酵素のDNA基質からの解離によるものか？ (3) 加圧の際、反応パラメータの調整により、酵素の安定性および性能が改良されるか？ (4) 同期性は、圧力パルス動作速度の関数としてどの程度維持されるか？ また許容圧力でのDNA基質に沿った酵素の推定移動速度は？

ここで実証されるように、テストした酵素のうちの幾つかは、同期DNA配列決定に十分な安定性プロファイルを示す。ここで示す条件は、特定の酵素に適する圧力パルスの最適な作働圧力範囲および作働時間を提供する。

F. 高圧の適用

本発明は、圧力装置の性質によって限定されることはない。411 MPaの圧力を発生可能な“手動”器具システムは、商業上入手可能であり、このシステムは加圧媒体としてシリコン油を使用し、2 mL反応容器を有する(High Pressure Equipment Company, Erie, PA)。このシステムは、図1に概略的に示す。幾つかの実験を行う際(以下参照)、以下の成分を有する装置として、高圧装置を用いた：圧力発生器1つ(最大圧力60,000 psi) cat # 37-5.75-60；圧力ゲージ1つ cat # 6PG75；バルブ2つ cat # 60-11HF4；ティー2つ cat # 60-23HF4；1/4" x 6" ニップル4つ cat # 60-8M4-2；1/4" x 2 3/4" ニップル2つ cat # 60-8M4-1および2 mL反応室1つ。5 MPa増量圧力ゲージも、このシステムに連結される。

加圧する溶液を、端部がクリンプシーリングされた小型の変形可能ポリエチレンカプセルに入れる。酵素/基質溶液を10 µlから50 µl含有するカプセルを反応容器に配置して、その後、それをシステムに連結して加圧する。

本発明の圧力特性は、温度と組み合わせで利用可能であることが、意図されている。これは、特に、非反応時間(例えば、圧力処理の前に試料を混合してロードするための時間、および分析のために試料をアンロードして除去するための時間)の間、酵素を調節するために有用である。幾つかの実験では(以下参照)、別々の酵素および基質溶液を氷上で保持する。反応室は、冷蔵庫に保持した(およそ5)。ピペットの先端、カプセル、ピンセット、かみそりの刃、および作業面(共にテーピングしたガラスプレート3枚)をすべて、-20 に保持した。冷却前に、カプセルの一端部をクリンプシーリングした。すべての作業は、-20 のガラスプレート上で行った。DNA基質および酵素溶液を、先端の冷たいカプセルに流し入れた。その後、カプセルの端部をクリンプして、シーリングした。(これはおよそ5分かかる。)その後、反応室を圧力装置に連結して、酵素が活性状態にない圧力を加えた(例えば、50,000 psi)。反応室を、望ましい温度に設定した。その後、望ましい時間、望ましい圧力まで上げ(例えば、酵素を活性化するための15,000 psi)、酵素を停止する圧力(例えば、30,000 psi)まで戻した。反応室を(圧力をかけて)取り外し、-70 の冷凍庫に配置した(45分間)。カプセルの端部を切り離して、凍結した試料を回復し、その後、さらなる酵素反応を阻害する停止緩衝液を含むマイクロヒュージチューブ内でカプセルを遠心分離した。非反応時間調節は、許容圧力での反応と同期間、50,000 psiから30,000 psiまで圧力を高めて、実験試料と同じ処理を行った。

上記のように、圧力に関連して温度を使用し、酵素活性を調節することも可能である。例えば、実施例4は、酵素消化速度を調節するためにいかにして温度を変化させることができるかについて例示している。この実施例で述べた条件では、消化(すなわち、1秒あたりDNA配列から除去される塩基数として表す)は、温度が20 の時には、温度が15 の時の10倍速く進み、その場合、その両温度での圧力は10,000 psiに設定される。温度降下が比較的小さいため(例えば、5)、消化速度をかなり落とすことができるという事実により、酵素活性の調節をさらに向上させて調査を行える。これは、非反応時間において特に重要となる可能性があり、その場合には、圧力をかけていない時に(酵素を害することなく可能な程度まで)消化が起きないようにすることが都合よい。

G. 自動化配列決定装置

本発明は、配列決定するための自動装置を企図しており、この装置は、静水圧での正確で迅速な自動変化を利用して、多数の酵素 - 基質錯体を同期する。この装置は、高压反応室を高速ポンプおよび高速検出器に連結する。この装置は、1秒あたり数個の塩基を配列決定することができ、5,000から10,000個の塩基の読みとり長さを有しており、同一の固定化された基質を再初期化して、配列決定を継続できる可能性がある。

この技術の基づく自動装置は、以下の工程を実施する：(1)フロー室内で配列決定するDNAの一端部を固定化する；(2)触媒作用がわずか1つの塩基に限定される条件で、DNA“端部”に酵素を結合させる；(3)高压で、酵素活性を可逆的に阻害する；(4)酵素が1つの塩基だけ前方に同期的にステップングするように、ある時間間隔で圧力のみを低下させることにより、酵素を活性化する；(5)阻害圧力で、高压、高フローストリームで、検出器まで生成物を高速移動させる；(6)工程(3)、(4)および(5)を繰り返し循環させる。

3つの異なる組の工程は、自動装置に用いることが可能である。配列決定に用いられる酵素の特性により、いずれの組の工程を使用するかが決定される。酵素の特性は、以下のグループのうちの一つである。

A．触媒活性を阻害するのに用いる圧力は、基質への酵素の結合を妨げない。

B．触媒活性を阻害する圧力はまた、基質への初期結合を阻害するが、基質結合酵素を解離しない。他の条件を変えて、触媒活性を調節する。これらの条件は、温度、pH、イオン強度、マグネシウムイオンの濃度および他の共同因子の濃度を含む。

C．触媒活性を阻害する圧力はまた、結合を抑制し、触媒活性を他の条件によって効果的に変えることができない。

グループAの酵素に基づき自動装置は、以下の工程を行う：

(1)フロー室内で配列決定するDNAの一端部を固定化する；(2)高压で、酵素溶液の活性を可逆的に阻害し、この溶液をフロー室に注入する；(3)酵素をDNAに結合させ、その後、結合していない酵素を洗い出す；(4)酵素が1つの触媒作用により同期的に進むように、ある時間間隔で圧力のみを低下させて、酵素を活性化する；(5)、高压、高フローストリームで検出器まで生成物を高速移動させる；(6)工程(4)および(5)を繰り返し循環させる。

グループBの酵素に基づき自動装置は、以下の工程を行う：

(1)フロー室内で配列決定するDNAの一端部を固定化する；(2)その活性が圧力以外の条件、例えば遊離マグネシウムイオンが存在しない状態で阻害される酵素溶液をフロー室に流し入れる；(3)酵素をDNAに結合させ、その後、圧力を阻害レベルまで上げる；(4)阻害剤の条件を、圧力を低下させることにより酵素作用を許容するという条件に変える、例えば遊離マグネシウムイオンを添加する；(5)酵素が1つの触媒作用により同期的に進むように、ある時間間隔で圧力のみを低下させることにより、酵素を活性化する；(6)活性状態を維持する高压、高フローストリームで、検出器まで生成物を高速移動させる；(7)工程(5)および(6)を繰り返し循環させる。

グループCの酵素に基づき自動装置は、以下の工程を行う：

(1)フロー室内で配列決定するDNAの一端部を固定化する；(2)高压で、酵素溶液の活性を可逆的に阻害し、この溶液をフロー室内に注入する；(3)酵素が1つの触媒事象を通過して同期的に結合して進むように、ある時間間隔で圧力を単に低下させることにより、酵素を活性化する；(4)高压、高フローストリームで、検出器まで生成物を高速移動させる；(5)工程(3)および(4)を繰り返し循環させる。フローストリームは、生成物とともに、洗い出された酵素と置換するための酵素を含有させるか、または半透性物質のようなフローセルに酵素を保持する手段を使用する。

本発明で企図している装置は、ポンプおよび検出器に連結した反応室を備える。反応室は、固定化DNAを含み、試薬およびDNA結合酵素を取り入れるためのバルブが備わっている。ポンプは、システム内の緩衝液の流れを供給する。圧力パルスは、圧力パルスを発生する手段によって調節され、反応室における酵素触媒反応を同期化するためのものである。検出器は、反応室からの緩衝液により輸送される生成物を同定する。

10

20

30

40

50

本発明で企図するように、圧力瞬時昇降（ジャンプ）実験で使用されるパルシングシステムを適当に改変するべきである。このようなパルシングシステムは、6ミリ秒で圧力を変えることができる液圧駆動装置である。（Brower, K. R., (1968) "A method for measuring the activation volumes of fast reversible reactions," J. Am. Chem. Soc., 90:5401-5403）。圧電トランスジューサを使用して100マイクロ秒で圧力を変えることができるパルシングシステムも、好適である（Clegg, R. M., Elson, E. L. and B. W. Maxfield, (1975) "A new technique for optical observation of kinetics of chemical reactions perturbed by small pressure changes," Biopolymers, 14:883-887）。

10

水の断熱圧縮に関連する温度急騰は、 1×10^{-3} deg/atmである（Brower, K. R., (1968) "A Method For Measuring The Activation Volumes Of Fast Reversible Reactions," J. Am. Chem. Soc., 90:5401-5403）。

DNAの固定化のための幾つかの化学的方法が、述べられている（Goodchild, J., (1990) "Conjugates of Oligonucleotides And Modified Ologonucleotides: A Review Of Their Synthesis And Properties," Bioconjugates Chem 1:165-187）。一本鎖DNAは、反応室に共有結合した相補的フラグメントに対するハイブリダイゼーションによって固定化できる。種々の検出器を、このシステムと共に使用するのが好適である。配列決定のために使用する酵素の型式は、検出器の選択に影響を与える。

20

A. DNAポリメラーゼをこの装置に用いる場合、蛍光計の質量分析計を、以下のフォーマットで検出器として使用可能である：

1. ベータまたはガンマリン酸塩位置での改変を有するヌクレオシドトリリン酸塩の使用。各ヌクレオシドトリリン酸塩は、テンプレートに沿ったポリメラーゼ工程として生成される種々のピロリン酸生成物間を質量分析計により区別することを可能にする独特の改変を有する。例えば、ピロリン酸塩は、0、1または2チオ置換体を含むことが可能である。これにより、3つのヌクレオシドトリリン酸塩が独自に標識化される。第4のものは、 ^{18}O または ^{34}S 等の安定同位体で標識付け可能である。フライト質量分析計の時間は、迅速に配列決定するのに必要な速度および感度を有する。

30

2. 質量分析計検出器を使用することにより、同時に反応室に存在する4つのdNTPのうち2つのみを有することも可能となる。再度、チオ基をdNTPのうち1つに取り込むことにより、ピロリン酸塩生成物の起源を同定することができる。このフォーマットは、2つの異なるdNTP溶液を反応室内で洗浄するか、または反応室から洗い出す必要があるため、より時間を要する。このフォーマットを選択するには2つの理由がある； a) ポリメラーゼ活性をさらに調節する；および b) 各塩基が付加された生成物の生成量を向上させる方法を提供する（すなわち、工程効率を改善する）。以下の方策により、工程効率を上げることができる。現在のdNTP溶液から塩基を添加した回数に等しい回数だけ、反応室をパルシングすることが可能である。これにより、ポリメラーゼが塩基添加の2つのチャンスが与えられるため、各付加体の生成量が改善されることになる。この効率改善により、10,000以上の塩基対を含む核酸の配列決定が可能になる。

40

3. さらに別のフォーマットは、検出器として蛍光計を使用する。4つの蛍光的に標識付けされたdNTPすべての溶液を、反応室内にポンピングする。この溶液内のdNTPの濃度は、ポリメラーゼの K_m 未満である。これにより、1つの塩基を添加した後、dNTPの濃度をさらに相対的に変化させ、どの塩基を添加したかを決定することがより容易になる。検出器は、発光スピクトルまたは蛍光寿命により、異なる標識を区別することができる。検出器が添加した塩基を同定すると、適当に標識付けされていないdNTPの高

50

濃度溶液を反応室内にポンピングしてパルシングする。これは、その工程で付加される塩基数を高めることを保証するのに必要である。次に、標識付けされたdNTP溶液を再度、反応室内にポンピングし、次の塩基を決定する。

B. 配列決定にエキソヌクレアーゼを使用する場合、基質は固定化DNAであり、生成物は、酵素によって放出したヌクレオシドモノリン酸塩である。反応室をパルシングする度に、次のヌクレオシドモノリン酸塩を放出する。その結果得られる生成物は、その後、検出器にポンピングされる。

例えば：

1. 再度、検出器として、どの塩基が放出したかを同定する質量分析計を使用することができる。このフォーマットは、鋳型作成を簡素化する標識付けされたDNAを用いることを必要としない。

10

2. 他のアプローチとして、温度を下げて、HCl等のエンハンサを添加することにより、dNMPの固有蛍光性を向上する(Ishikawa, M., (1993) "Superfast Determination of Nucleotides in DNA," Japanese Patent JP05,126,739 [93,126,739] May 21)。この方法は、蛍光シグナルを発生させるために蛍光標識された基質を使用する必要はない。

3. さらに他のアプローチとして、電気化学的検出を採用し、それによって、4つの異なるdNMPを区別できる。

配列決定装置の一実施形態として、以下のような操作を行う。反応室内に添加した既知の第1のdNTPと同時に酵素をポンピングすることにより、ポリメラーゼを固定化DNAに結合させる。添加する第1の塩基は、以下の理由から既知のものである。すなわちプライマ配列のいずれも既知であり、またはベクターを線状にする際に用いられる制限エンドヌクレアーゼの配列が知られているためである。圧力を抑止レベルまで上げ、結合していない酵素やdNTPを除去する。酵素のポリメラーゼ活性を用いる場合、dNTPを含有する試験溶液を反応室内にポンピングし、圧力パルスを減少させる。代わりに、酵素の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を用いる場合、dNTPを洗い出した後、圧力パルシングを開始する。一本鎖DNAに対するエキソヌクレアーゼの結合が、選択した配列決定方法である場合、高い圧力をかけて、酵素を反応室内にポンピングして、パルシングを行い、酵素のうちの幾つかを結合させる。再度、結合していない酵素を配列決定開始前にポンピングする。本発明の一実施形態では、低温および非最適pHを使用することを企図しており、それによって、結合パルス間で、2つ以上の塩基によって酵素がステップングしないことが保証される。

20

30

配列決定装置の他の実施形態が、企図されている。一実施形態では、反応室および検出器に至る流路の体積を減少させることにより、パルス間の時間間隔をかなり短縮することになる。他の実施形態では、単一分子配列決定のために提案された技術を用いて、フローストリーム内で固定化DNAを懸濁する(Jett, J. H. Keller, R. A., Martin, J. C., Marrone, B. L., Moyzis, R. K. Ratliff, R. L. Seitzinger, N. R., Shera, E. B. and Stewart, C. C., (1989) "High-Speed DNA Sequencing; An Approach Based Upon Fluorescence Detection Of Single Molecules," J. Biomol. Struct. Dyn, 7:301-309)。さらに他の実施形態では、多数の検出器を使用し、反応室からのフローストリームを1つの検出器から次の検出器に迅速に移動させて、検出速度を増す。これらの改良を組み合わせる場合、単一圧力パルスを用いてまず基質上にエキソヌクレアーゼを結合させることが企図される。結合していない酵素を洗い出す。その後、圧力を降下することによって、酵素が通常の方法でDNAを加水分解する。酵素がすべて同時点で始動し、すべて同一の基質を利用しているので、比較的長い時間、同期したままとなる。E. coliのエキソヌクレアーゼIによる加水分解の速度は、275塩基/秒であると報告されている(Brody, R. S., Doherty, K. G

40

50

. and Zimmerman, P. D., (1986) "Processivity and kinetics of the reaction of exonuclease I from E. coli with polydeoxyribonucleotides," J. Biol. Chem., 261: 7136-7143). 200塩基/秒の速度で、DNAの10,000塩基長を1分以内で配列決定できる。

H. 酵素の評価

一般に、特定の基質に結合したままで、それに沿って移動しながら化学反応を繰り返し触媒化する進行的酵素が、好ましい。酵素活性を調節する方法において用いるポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼの候補は、スクリーニングにより決定する。スクリーニングの手順は、以下で述べており、表1に要約している。

スクリーニング工程に必要な一時的工程は、以下の通りである：

I. 基質溶液に酵素を添加し、酵素が不活性状態になるまで圧力を加え（すなわち、阻害剤圧力）、その後減圧して、酵素が活性（すなわち、許容圧力）が維持されているかどうかを決定する。

II. 活性が維持された酵素に対しては、酵素が可逆的に阻害可能であり、かつ許容できる活性を示す圧力範囲を（工程Iの手順を繰り返すことにより）決定する。

III. 酵素が可逆的に活性を保持し得る温度範囲を決定する。

IV. 酵素によって基質の同期処理を維持するための温度および圧力の最適条件を決定する。

表1

工程	決定	結論
I	酵素可逆阻害	酵素生存不可能候補
I	酵素活性保持	工程IIに進む
II	圧力範囲	工程IIIに進む
III	温度範囲	工程IVに進む
IV	最適条件（温度/圧力）	酵素を用いて発明実施

以下で例示するように、上記手順の思慮深い考察により、いかなる酵素（“X”）も本発明への適用のために評価することが可能である。

酵素（“X”）は、企図された圧力調節方法（すなわち、同期化させた酵素活性を用いて、核酸等の基質を処理する）において使用するために評価可能である。酵素Xは、最初に、適当な条件（例えば、低温）で、基質溶液にXを添加することにより、工程Iに従って評価する。その後、Xが不活性状態になるまで圧力を加え、さらに減圧してXが通常活性状態である圧力に復帰させる。これによって、Xが活性を維持できたかどうかを決定する。幾つかの酵素は、高圧処理の後、活性を回復するまでに、低圧での回復期間を必要とする可能性がある。Xが活性を回復しない場合は、Xはその二次および三次構造で不可逆変化により既に変性している。しかし、可逆阻害が可能な酵素に過剰な高さの圧力を与えた場合、不可逆阻害を生じる可能性があることを認識しておくことが重要である。従って、酵素が活性を回復しない時、より低い圧力では、酵素がうまく可逆阻害しないことを確信すべきである。

酵素Xの可逆阻害を実証できた場合には、次に、Xが可逆阻害可能であり且つ許容可能な活性レベルを示す圧力範囲を評価する（工程II）。工程IIは、望ましい範囲が確認されるまで、工程Iを進行的に繰り返すことにより、容易に実施できる。すなわち、不可逆阻害が達成されるまで工程Iの不活性圧力を進行的に高めることにより（幾つかの酵素は同一装置の圧力限界で安定する可能性がある）、またXがこれ以上阻害されないようになるまで工程Iの不活性圧力を進行的に低下させることにより、不活性圧力範囲（例えば、

20,000 psi から 50,000 psi) を容易に決定できる。X が受容可能な活性レベルを示す圧力範囲は、一連の同じ工程を行って確認できる。不活性圧力範囲は、各圧力パルス間で、酵素を可逆的に阻害することができる圧力を示す。一方活性圧力範囲は、酵素により基質を調節的に処理することができる圧力を示す。

次に、工程 III では、工程 II で予め決定された圧力下において、酵素 X が可逆的に活性状態を維持できる温度範囲を決定する。工程 III は、工程 II で述べたものと類似の態様で行うことが可能である。すなわち、温度範囲（例えば、5 から 60 ）は、X が不可逆的に不活性化されるまで徐々に温度を上げ、その後、同様に温度を下げることに
10

最終工程、工程 IV では、X により基質の同期的処理を維持するための温度および圧力の最適条件を決定する。工程 IV では、幾つかの異なる温度を決定することに注目すべきである。例えば、低温（例えば、5 から 10 ）では、圧力の結合パルス間で、2 つ以上のヌクレオチド塩基だけ X がステップングしないことが確実となる。同様に、種々の温度対圧力比が、X の活性速度の細かい調節を援助することができる。

以下の実施例は、本発明の、ある実施の形態および局面を例示しており、その範囲を限定するものではないと解釈するべきである。

実施例

下記の実験開示では、以下の省略形を適用する：（摂氏）；MPa（メガパスカル）；psi（平方インチあたりのポンド）； μg （マイクログラム）； μl （マイクロリットル）；ml（ミリリットル）；および mM（ミリモル）。圧力の単位は、以下のように変換
20

実施例 1

ラムダエキソヌクレアーゼ

この実施例では、静水圧を用いたラムダエキソヌクレアーゼの活性調節を示す。これらの実験では、以下の検定緩衝液を用いた：67 mM グリシン - KOH (pH 9.4)、2.5 mM MgCl_2 および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アセチル化 BSA。これらの実験に用いる基質は、ラムダ DNA の Hind III 消化物であった。Hind III によるラムダ DNA の消化により、大きさが 125 から 23,130 までの塩基対の範囲である 8 個のフラグメントが生成される。検定成分は、以下の割合で混合した：1.0 μl の 10x 検定緩衝液 + 2.0 μl の Hind III 消化ラムダ DNA (0.24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) + 0.5 μl のアセチル化 BSA (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) + 1.0 μl のエキソヌクレアーゼ（望ましい濃度）+ 5.5 μl の H_2O 。ラムダエキソヌクレアーゼの保存液（2.0 単位/ μl 、Life Technologies）を、望ましい濃度まで検定緩衝液内で希釈した。一般的な高圧実験では、上記成分を、特定の割合で混合して、最終体積 40 μl を得た。冷却した試薬（0 から 5 ）を外界圧力下で混合し、最後に酵素を添加して、反応を開始した。次に、この溶液から 10 μl を、1.5 ml マイクロヒュージチューブに分注した。これを、非反応時間参照サンプルとして用いた。混合液の残りのものを、使い捨て全量ピペットの端部から引き出して作成した小型のポリエチレンカプセルに注入した。カプセルは、縮小端部を折り曲げてシーリングし、その折り曲げた縮小端部は、その上に小さなアルミニウムバンドをクリンピングして所定位置に保持される。その後、手動圧力装置の反応室に、カプセルを置く。この手動圧力装置は、圧力が望ましいレベルまで急速に上昇させることができる。カプセルに混合液を注入して圧力をかけるのに要する時間と、圧力を解除してカプセルから試料を回復するのに要する時間との合計を、非反応時間と呼ぶ。非反応時間は、8 分から 10 分であった。非反応時間調節用試料を用いて、圧力をかけない時に起きる反応の程度を決定する。ゲルローディング緩衝液 4 μl (250 mM EDTA、0.25% キシレンシアノール、0.25% プロモフェノールおよび 30% グリセリン) を添加することにより、すべての反応を停止させる。望ましい時間だけ選択した圧力で、試料を反応させる。その後、圧力を解除し、回復した混合物のアリコート 10 μl にゲルローディング緩衝液 4 μl に添加して反応を停止させる。回復後の試料の残りは、15 分間、外界圧力で反応させて、加圧後の酵素活性の回復の程
40
50

度を決定することが可能である。

酵素反応後、DNAフラグメントをTBE緩衝液を用いて0.5%アガロースゲル上で分離した。DNAバンドは、エチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネータで撮影した。酵素活性により基質が、ほとんど染色されない極小さい一本鎖生成物に分解されると、基質バンド自身の強度減少することになる。

結果(図13)は、ラムダエキソヌクレアーゼ活性が20 から21 の温度で、10,000 psiの圧力の下ではほとんど影響されないことを実証した。酵素活性の阻害は、15,000 psiで明白である。酵素活性の阻害は、17,500 psiおよび20,000 psiでさらに増大し、30,000 psiで完全に阻害されることが示唆された。反応混合物を1時間、阻害圧力で保持した後、15分間、外界圧力に急速に戻すと、酵素活性は、完全に回復することが示された。この酵素は、高圧に対して非常に安定している。しかし、60,000 psiで基質存在下で15分間の反応を行った結果は、回復性を示さなかった。これらの結果は、ラムダエキソヌクレアーゼが、高い静水圧で可逆的に反応可能であること実証している。1つのサイクリング実験を行った。この実験では、17.7秒30,000 psi未満の、平均時間43サイクルで250 psi、30,000 psi間で圧力を循環させた。その結果生じた基質バンディングパターンは、アガロースゲル電気泳動の後、進行的酵素のパターンになった。従って、酵素は、30,000 psiの圧力では基質から解離しなかった。

10

実施例2

T4 DNAポリメラーゼ

20

この実施例では、DNAサイズマーカーを基質として使用し、サイズマーカーをアガロースゲル電気泳動によって分離し、マーカーをエチジウムブロマイド検出で視覚化することにより、T4 DNAポリメラーゼの二重鎖3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を測定した(Sambrook, J., Fritsch, E. F. and T. Maniatis, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., p. 6.3 - 6.19)。エキソヌクレアーゼ活性により、バンドが、ゲル上のより小さいサイズに変わる。

製造業者によって供給される酵素緩衝液内で、室温で圧力をかけ、さらに本質的には実施例1の述べたように、T4 DNAポリメラーゼ(United States Biochemical)の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を測定した。0.5%アガロースゲル上のバンド変化によって明らかであるように、およそ100個の塩基対を20分間、大気圧で消化した。基質が存在しない場合、30,000 psi以上の圧力での1時間の反応により、酵素が完全に、しかも不可逆的に不活性化された。基質が存在する場合、1時間の反応の間、酵素を完全に、しかも不可逆的に不活性化するために、40,000 psiの圧力を必要とした。0.5%アガロースゲル上のバンド変化によって示すように、基質が存在する場合の30,000 psiでの1時間の反応によりラムダDNAからのおよそ100個の塩基対の欠失体を生じる。これらのデータは、カプセルに適当な圧力を加えることにより、酵素の活性を不可逆的に終結することができ、それによって、DNAの消化の程度を正確に調節する手段を提供することになる。

30

実施例3

40

ラムダエキソヌクレアーゼによる調節された消化

この実施例では、ラムダエキソヌクレアーゼによる消化の程度を調節するために、静水圧を用いる。これらの実験のためのDNA基質は、プラスミドpBR322であり、この基質を線形にするためにEcoRVで消化した。これらの実験では、10 µlの検定容積を用いた。これらの実験では、5 µlの基質混合物と5 µlの酵素混合物を生成して、氷上で冷却した。基質混合物は、4 µlの1.33x検定緩衝液+1 µlの線状pBR322 DNA(およそ0.25 µg)を含有した。酵素混合物は、4 µlの1.33x検定緩衝液+1 µlのラムダエキソヌクレアーゼ(3.3単位)を含有した。1.33x検定緩衝液は、10 µlの10xラムダエキソヌクレアーゼ緩衝液+4 µlのアセチル化BSA(1.0 µg/µl)+61 µlの蒸留水を含有した[10xラムダエキソヌクレアーゼ

50

緩衝液は670 mM グリシン - KOH (pH 9.4) および25 mM MgCl₂を含有した。実験を開始するために、酵素混合物を氷上の基質混合物に添加した。その後、この溶液を、上記のようにカプセルにローディングした (p 18 参照)。その後、カプセルを5 の反応室に置き、圧力を50,000 psiまで急上昇させた。反応室に至るバルブを閉じ、さらに圧力をかけて、バルブと共に反応室を装置から取り外し、30分間、20 の水浴に入れた。その後、バルブおよび反応室を装置に再連結して、圧力を10,000 psiまで急降下させ、望ましい期間だけ、そこで保持した。その後、圧力を30,000 psiまで上昇させた。それから、バルブおよび反応室を装置から取り外し、-70 の冷凍庫に入れた。その後、凍結した試料を上記のように回復させた (p 18 参照)。

10

上記のように、基質DNAをアガロースゲル電気泳動により分析した。これらの実験において用いられる酵素の濃度が高くなると、酵素消化が進むにつれて、基質バンドがより小さいサイズに変化する。

結果として、ラムダエキソヌクレアーゼによる消化の程度を、許容圧力で浪費する時間を制限することにより調節できることが実証された。非反応時間対照サンプルレーンと実験レーンとの比較により、10,000 psiで浪費する時間が長くなると、消化の程度も増大することが実証された。

実施例 4

ラムダエキソヌクレアーゼにより消化速度における圧力の効果

この実施例では、ラムダエキソヌクレアーゼによる消化速度 (すなわち、1秒あたりに除去される塩基の数) が、種々の圧力および2つの温度で決定された。この実施例では、基質は、ラムダDNAのHind III消化物を用いた。これらの実験では、最初の加圧の際、反応室の圧力を設定し、実験の間中、一定であり、反応室は、実験の期間中、水浴に入れたままであった。上記の例外としては、実施例3で述べたように実験を行った。

20

ヌクレオチドモノリン酸塩が基質バンドの端部から取り外される速度は、アガロースゲル電気泳動の後に見られる変化したバンドの塩基対のサイズを評価して決定された。酵素で処理されていないHind IIIフラグメントのログ [塩基対] 対移動距離を描くことにより、標準曲線を形成した。

20 の温度で、10,000 psi以下の圧力は、ラムダエキソヌクレアーゼの速度にほとんど影響を与えない。20,000 psi以上の圧力は、反応速度をかなり減速させる。15 の温度では、10,000 psi以上の圧力により、反応速度がかなり減少する。データ (図14) は、初期の実験から現れるが、30,000 psiで酵素が完全に阻害されたことを示しているが、事実は異なる。ここで示された阻害は、採用した検定法があまり感応的でないためであった。

30

実施例 5

許容圧力での同等時間の1回の圧力サイクルと5分割の圧力サイクルとの比較

この実施例では、圧力を2分サイクルにより5回与えた場合に生じるバンド変化を10分サイクルを1回で与えた場合と比較する。両方の場合、50,000 psiを阻害圧力として用い、5,000 psiを許容 (作用) 圧力として用いた。実施例3で述べたように実験を行った。但し、以下の点で実施例と異なる。基質混合物として0.34 μgのHind III消化DNAを含有させた。酵素化合物として0.8単位のラムダエキソヌクレアーゼを含有させた。圧力サイクルは上記の通りであり、50,000 psiで凍結停止を行った。

40

図6に示す結果は、両方のサイクリングプロトコルが同一パターンのバンドを生成することを実証しており、それによって、5分割サイクル実験におけるさらに4回の開始および停止によって、消化の程度に検出可能な効果が得られなかったことを示している。この結果はまた、元の長さの基質バンドもゲル上に見られるという事実に基づいて、酵素が50,000 psiで解離していないことも示唆している。

上記から、本発明が基質上の酵素活性を調節する改良した方法を提供することが明らかとなるはずである。核酸の場合、本発明は、核酸の処理や一連の欠失体の生成の実施を考慮

50

し、消化の程度を調節することが可能である。消化の程度を調節する能力は、欠失変異体を最終的に使用するかどうか依存して、広くまたは接近してクラスター化された長さを有する欠失群の生成を定型化することができる。

実施例 6

シーケナーゼ 2.0

進行的酵素 T7 DNAポリメラーゼ (E.C. 2.7.7.7) (U.S. Biochemical Corp., Cleveland, Ohio) の合形成態であるシーケナーゼ 2.0 の活性を、基質としてラムダ Hind III を用いて検定した。

ラムダフラグメントは、T4 DNAポリメラーゼ (New England Biolabs, Beverly, MA) の 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性により、3' - 5' 方向で部分的に消化した。以下のものは、0.65 ml の微小遠心チューブ中で混合した：5X (5倍濃度) シーケナーゼ緩衝液 (12 µl)、ラムダ Hind III (0.34 µg / µl) および 36 µl の水。5X シーケナーゼ緩衝液は、200 mM Tris-HCl、pH 7.5、100 mM MgCl₂ および 250 mM NaCl を含有する。チューブを、3分間 65 °C の水浴に入れ、その後、氷浴に入れた。6 µl の T4 DNAポリメラーゼ (3単位 / µl) をチューブに加えた後、チューブを 1時間、37 °C の水浴で反応させた。氷上で 2分間から 5分間、チューブを冷却させた後、チューブの内容物をカプセルに移し、カプセルをバージョン 1 の冷却反応室にローディングした。カプセルは特注のものであり、ポリエチレン分注ピペットの一端部を熱シーリングし、短く切断したものである。反応室の圧力を 50,000 psi まで上昇させ、1時間維持して T4 DNAポリメラーゼの活性を阻害した。反応室の圧力を 2分間から 4分間、大気圧に戻した後、カプセルから基質混合物を除去した。

32 µl の溶液あたり 2 µl の 100 mM DTT を添加することにより、上記基質溶液を DTT 5.9 mM にした。この希釈液を 8.5 マイクロリットルだけ、カプセルに入れて、1 µl の希釈したシーケナーゼ (3単位 / µl) を添加した。その後、カプセルをバージョン 2 の開放した冷却 (-5 °C) 反応室に置き、2分間反応させて、カプセルを冷却した。開放した反応室内で、1 µl の冷却 (およそ 0 °C) dNTP 溶液をカプセルにピペットで移した後、カプセル内の溶液を、およそ 20 µl の冷却シリコン油 (melting point bath oil, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) で覆った。dNTP 溶液は、4 mM dATP、4 mM dCTP、4 mM dGTP、4 mM dTTP、40 mM Tris-HCl、pH 7.5、20 mM MgCl₂ および 50 mM NaCl を含有した。その後、反応室をシーリングして、望ましい圧力まで加圧した。

20 ± 1 °C にサーモスタットで調温した溶液を反応室の周りで循環させ、反応室およびカプセルの温度を酵素作用温度まで上げた。選択した試験圧力での標準 10分反応を行い、カプセル温度を作用温度に到達させた。続いて、3つの異なる圧力プロファイル (1) から (3) までを行い、圧力に対する酵素活性の応答を決定した。これらの実験では、温度を用いたため、遷移時間が必要以上に長くなった。

(1) あらゆる圧力で (20,000、30,000 および 40,000 psi)、非反応時間実験を行った。この実験は、試料のローディングおよび回復の際、酵素活性が存在するかどうかを決定した。プロファイル：40,000 psi、サーモスタットで調温した溶液 20 °C、10分間 (上記参照)；40,000 psi、サーモスタットで調温した溶液 -12 ± 2 °C、12分間；圧力を大気圧まで降下させ、凍結試料を回復させる。

(2) 圧力で酵素活性を決定するために、以下のプロファイルを使用した：40,000 psi、サーモスタットで調温した溶液 20 °C、10分間 (大気から 40,000 psi までの遷移時間は 5秒から 15秒までである)；40,000 psi、サーモスタットで調温した溶液 20 °C、さらに 20分間、40,000 psi、サーモスタットで調温された溶液 -12 ± 2 °C、12分間；圧力を大気圧まで降下させ (遷移時間は 5秒から 15秒までであった)、凍結試料を回復させる。

(3) 圧力処理の後、酵素活性を決定するために、以下のプロファイルを使用した：4

10

20

30

40

50

0, 000 psi、サーモスタットで調温した溶液 20、10 分間；40, 000 psi、サーモスタットで調温した溶液 20、さらに 20 分間；25 msec の遷移時間で圧力を 300 ± 150 psi まで降下、サーモスタットで調温した溶液 20、10 分間；圧力を大気圧まで降下する。サーモスタットで調温した溶液 20、試料を回復する。カプセルのシーリング端部を切断して、4 µl の 50 mM EDTA pH 8.0、0.35% 硫酸ドデシルナトリウム、17.5% グリセリンでカプセルの内容物を遠心分離して、各試料をカプセルから回復した。0.5% アガロースゲル上の電気泳動により、試料内の DNA フラグメントのサイズを決定した。以下の実施例 8 のように、この検定では、シーケナーゼ活性により、拡散小型基質バンドが一定のサイズのより大きいサイズのバンドに変化した。電気泳動の後、エチジウムブロマイドで染色して、ゲルを撮影した。写真を目視検査して、シーケナーゼ活性を評価した（表 2 参照、結果は ± 10%）。所定の圧力を加え酵素反応を行い得られたバンドパターンが非反応時間実験によるバンドパターンと同一である場合には、その圧力では検出可能な酵素活性を示さないものと判定された。後圧力試料（3）における一定サイズのバンドの存在は、圧力処理後の酵素活性の回復を示すものと解釈された。

10

表 2

圧力活性	活性	後圧力
20, 000	少し	未決定
30, 000	なし	全活性
40, 000	なし	元の活性の 25%

20

制限エンドヌクレアーゼ Hind III

2つの Hind III 開裂部位を有するピオチニル化 PCR 生成物を基質として用いて、分布酵素である制限エンドヌクレアーゼ Hind III (E.C. 3.1.21.4) を 37 で検定した。

PCR 生成物は、ピオチニル化 Lac Z フォワードプライマおよび Lac Z リバースプライマ (Genosys Biotechnologies Inc., Woodlands, TX) を用いて生成した。dCTP は、Promega、Madison、WI のものを使用した。対照テンプレートおよび PCR 反応のための他のすべての成分は、Life Technologies、Gaithersburg、MD の PCR 非放射性標識付けシステムからのものであった。このシステムの PCR 生成物は、Hind III 開裂部位に対して含有する 898 塩基対フラグメントである。一つは、ピオチニル化端部からのおよそ 126 個の塩基対であり、もう一つは、ピオチニル化端部からのおよそ 348 個の塩基対である。DNA 混合物は、0.5 µl の PCR 生成物（およそ 25 ng）、0.5 µl の 10X 緩衝液および 4 µl の水を含む。酵素混合物は、1 µl の Hind III (100 単位/µl、New England Biolabs、Beverly, MA)、0.5 µl の 10X 緩衝液、および 3.5 µl の水を含む。10X 緩衝液は、100 mM Tris-HCl、pH 7.9、100 mM MgCl₂、50

30

40

0 mM NaCl および 10 mM DTT を含む。上記 DNA および酵素混合物は、別々のチューブで氷上で冷却される。5 マイクロリットルの酵素を 5 µl の DNA 溶液に添加し、氷上で混合し、冷却したカプセルに迅速に移し、冷却（およそ -15）シリコン油で覆った。冷却した（-5）反応室（バージョン 2）にカプセルをローディングした後、反応室を 30, 000 psi まで加圧した。サーモスタットで調温した 37 の溶液が 10 分間、反応室を循環する状態で、圧力を 30, 000 psi に維持した。4 秒間の単一圧力パルスを加えた。パルスは、圧力を 300 psi ± 200 psi に変化させ、反応室をサーモスタットで 37 に調温した。遷移時間は、およそ 25 ミリ秒であった。圧力を 30, 000 psi に維持しながら、サーモスタットで -12 に調温した溶液を 12 分間、反応室を循環させて、次の工程で酵素阻害を

50

確実にした。次の工程では、圧力を大気圧まで下げ、冷却カプセルを取り外した。単一サイクル時間が8秒、12秒、16秒および20秒であることを除いて、上記のように、さらに他の試料を検定した。負の圧力をかけない非反応時間も、検定した。実施例6のように、試料を回復した。2%アガロースゲル上の電気泳動により試料を分析し、エチジウムブロマイドで染色した。非反応時間試料は、生成物由来のバンドは現れなかった、すなわち、30,000 psiでは検出可能活性が存在しなかった。4秒パルス試料が、わずかな生成物バンドを有しており、パルス時間が4秒から20秒まで長くなると、生成物バンドの強度が増大した。20秒パルス試料は、わずかな基質バンドを有し、これによって、20秒の酵素活性の後、消化が完全でないこと示した。

酵素活性は、30,000 psi ($\pm 6\%$)で阻害された。300 psi \pm 200 psiの外界圧力まで減圧することで、酵素活性を回復した。

10

実施例 8

多数の短い圧力パルスを有するラムダエキソヌクレアーゼ

この実験では、ラムダHind IIIフラグメントのラムダエキソヌクレアーゼ消化を、多数の短い圧力パルスを用いて研究した。1回の検定につきDNA混合物は、2 μ lのラムダHind IIIフラグメント(0.34 μ g/ μ l、IBI、New Haven、CT)および8 μ lの1.33X検定緩衝液を含有させた。酵素混合物は、1回の検定につき、1 μ lのラムダエキソヌクレアーゼ(5単位/ μ l、Life Technologies Inc., Gaithersburg、MD)、1 μ lの水、および8 μ lの1.33X検定緩衝液を含有させた。[1.33X検定緩衝液は、89 mMグリシン-KOH、pH 9.4、3.3 mM MgCl₂、BSA 34 μ g/mlを含む]上記DNAおよび酵素混合物は、別々のチューブで氷上で冷却した。その後、10 μ lの酵素を10 μ lのDNA溶液に添加して、氷上で混合した。その直後に、この混合物を冷却ブロック(およそ-20 から-10)内の冷却カプセル(およそ-15 から-5)に移して、冷却した(およそ-20 から-15)のシリコン油で覆った。その後、カプセルをバージョン2の冷却(-5)反応室にローディングし、加圧した。それから、圧力は30,000 \pm 2,000 psiに保持され、サーモスタットで20 に調温した溶液を12分間、反応室を循環させた。その後、反応室の圧力を2.02 \pm 0.02秒のサイクル時間で、210 \pm 20 m秒間、300 \pm 100 psiまでパルスングした。パルス時間は、30,000 psi未満の合計時間のオシロスコープ測定による推定値であり、 $t_{a,y} + t_{a,y} + t_{i,z}$ に等しい。オシロスコープは、170 \pm 20 m秒である15,000 psi未満の合計時間を測定したのみであった。1つのパルスからパルス時間を含む次のパルスまでの時間は、2.02秒であった。反応室および試料は、合計594 \pm 2回パルスングが加えられた。30,000 psiの圧力では、サーモスタットで-12 に調温した溶液を12分間、反応室を循環させて、カプセル内の試料を凍結させた。その後、およそ30 m秒で、圧力を大気圧まで降下させた。8 μ lの停止緩衝液を用いたことを除いて、実施例6と同様に試料を回復させた。また、非反応時間に17分を加えた時間、30,000 psiで、パルスングを行わないで試料を検定した。1.3 μ g/mlのエチジウムブロマイドと、0.5X TBE(45 mM Tris-borate、1 mM EDTA)とを含有する0.5%アガロースゲル上で、上記試料を検定した。ゲルは、23ボルトで16時間、検定し、その後、撮影した。非反応時間に17分を加えた時間による対照試料を用いて、パルスング実験中に30,000 psiで生じた酵素活性を評価した。30,000 psiおよび20 では、酵素はおよそ0.1塩基/秒の速度である。パルスングした試料でのバンド変化は、非反応時間に17分を加えた時間による対照のバンドよりも大きかった。パルスングした試料において除去した塩基の合計から、非反応時間で17分を加えた時間による対照実験で除去した塩基の数を引くことにより、パルス間で除去した塩基の数が得られる。パルスングの際に除去した塩基の平均数は、350 \pm 60であり、これによって、酵素は1パルスにつき、平均0.6個の塩基を加水分解したことになる。

20

30

40

実施例 9

50

パルス長の異なる多数の短い圧力パルスをもつラムダエキソヌクレアーゼ

この実験では、ラムダHind IIIフラグメントに対するラムダエキソヌクレアーゼの作用を、様々な圧力パルス長で研究した。1回の検定あたりのDNA混合物は、2 μ lのラムダHind IIIフラグメント(0.34 μ g/ μ l、IBI)と、8 μ lの1.33X検定緩衝液とを含有する。酵素混合物は、1回の検定につき、1 μ lのラムダエキソヌクレアーゼ(5単位/ μ l、Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD)、1 μ lの水、および8 μ lの1.33X検定緩衝液を含有する。[1.33X検定緩衝液は、89 mMグリシン-KOH、pH 9.4、3.3 mM MgCl₂およびBSA 34 μ g/mlを含有した]上記DNAおよび酵素混合物は、別々のチューブで氷上で冷却した。その後、10 μ lの酵素を10 μ lのDNA溶液に添加して、氷上で混合した。その直後に、この混合物を冷却ブロック(およそ-20から-10)内の冷却カプセル(およそ-15から-5)に移して、冷却したシリコン油(およそ-20から-15)で覆った。その後、カプセルをバージョン2.0の冷却(-5)反応室にローディングし、加圧した。それから、圧力は40,000 \pm 2,000 psiに保持され、サーモスタットで20に調温した溶液を8分間、反応室を循環させた。その後、反応室の圧力を2.02 \pm 0.02秒のサイクル時間で、430 \pm 20 m秒間、300 \pm 100 psiまでパルスングした。パルス時間は、40,000 psi未満の合計時間の推定値であり、 $t_{a,y}$ (40,000 psiから300 psiまでの遷移時間) + $t_{a,y}$ (300 psiでの時間) + $t_{i,z}$ (300 psiから40,000 psiまでの遷移時間)に等しい。サイクル時間は、パルス時間に $t_{i,z}$ 後で $t_{a,y+1}$ 前に40,000 psiでの時間を加えたものに等しい。オシロスコープによれば、20,000 psi未満のパルス時間は、370 \pm 20 m秒であった。1つのパルスからパルス時間を含む次のパルスまでの時間は、2.02秒であった。反応室および試料は、合計500 \pm 2回パルスングした。40,000 psiの圧力では、サーモスタットで-12に調温した溶液を12分間、反応室を循環させて、カプセル内の試料を凍結させた。その後、およそ15 m秒で、圧力を大気圧まで降下させた。8 μ lの停止緩衝液を用いたことを除いては、実施例6のと同様に試料を回復させた。590 \pm 20ミリ秒のパルス時間を用いて、上記のように、さらに他の試料を検定した。パルスングを行わず、非反応時間に40,000 psiで12分23秒を加えた時間を必要とする調節試料も検定した。上記試料は、実施例7で述べたように、0.5%アガロースゲル上で、検定した。非反応時間に12分23秒を加えた時間の試料は、検出可能な活性を示さなかった。バンドは、酵素調節を行わないバンドと同様であった。パルスングした試料に対して、変化したバンドのリーディングエッジを用いて、エキソヌクレアーゼによって消化した塩基の数を決定した。430 m秒のパルス時間で、酵素は、1つのパルスにつき平均0.6 \pm 0.2個の塩基を加水分解し、590 m秒のパルス時間で、酵素は、1つのパルスにつき平均1.1 \pm 0.2個の塩基を加水分解した。

実施例10

迅速なパルスを用いたバージョン3.0フロースルー

既知の配列のターゲットDNAを用いて、PCR生成物を得る。1つは5'-NH₂プライマであり、もう1つは5'-リン酸プライマである。このPCR生成物は、アミン反応性固体支持部に固定化される(例えば、EMPHAZE ビーズ、3M、St. Paul, MN)。PCR生成物の固定化は、ラムダエキソヌクレアーゼによる消化を遊離の5'-末端部(すなわち、リン酸化端部)のみに限定する。固定化DNAを有する固体支持部を反応室に置き、バージョン3.0にローディングする。反応室には、ビーズを保持するのに十分な細孔サイズの2つのフリットが取り付けられており、反応生成物を後に検出するのに十分なビーズ容積を含む。

反応室を、緩衝液A(67 mM グリシン-KOH、pH 9.4)を用いて大気圧で洗浄する。反応室およびそれに流れ込む洗浄液を、20の温度に平衡させる。その後、50 μ l/mlのBSAおよび5単位/20 μ lのラムダエキソヌクレアーゼも含有する緩衝液Aを用いて、反応室を洗浄する。Mg⁺⁺が存在しない状態で、酵素はDNAに結合する

10

20

30

40

50

が、触媒として活性状態ではない。反応室の圧力を40,000psiまで上げ、その後、反応室を2.5mM MgCl₂(緩衝液B)を含有する緩衝液Aを用いて洗浄する。その後、反応室の圧力を、590m秒間、300±200psiにパルシングする。圧力を、パルスの端部で40,000psiに戻す。その後、反応室を100μlから300μlまでの緩衝液Bを用いて、40,000psiで洗浄して、ラムダエキソヌクレアーゼの作用で放出した遊離ヌクレオチド5'-モノリン酸塩を除去する。洗浄液は、後の分析のために集める。後の590m秒パルスおよび洗浄液は、上記のように繰り返し適用される。分析のために洗浄液を集める。

集めた洗浄液を質量分析計によって分析し、各洗浄液に存在するヌクレオチド5'-モノリン酸塩を同定する。この情報を用いて、ラムダエキソヌクレアーゼによって消化される鎖のヌクレオチド配列を決定する。

10

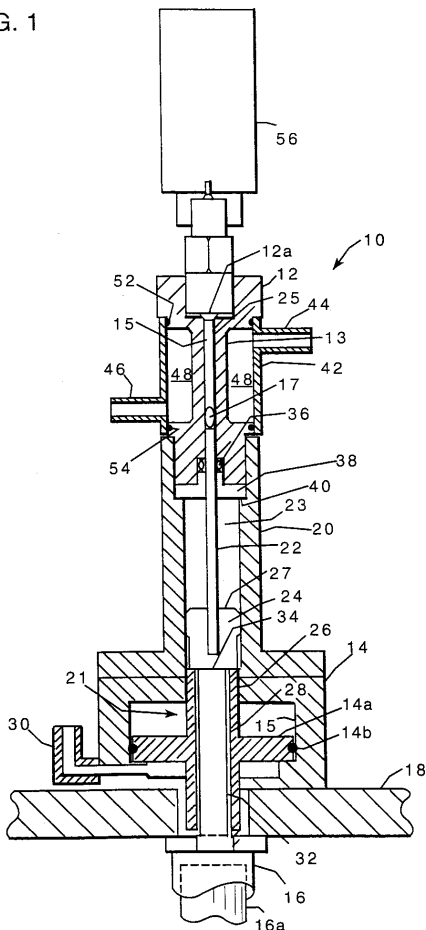
他の実施形態

上記から、当業者は、発明の精神および範囲を逸脱することなく、その本質的特徴を確認することが可能であり、また、発明の種々の変更および変形を行って、様々な利用および条件に適合させることが可能である。ここで述べた引例はすべて、参考文献として組み入れられている。

例えば、開示した反応器は、殺菌、滅菌、タンパク質毒素の不活性化、食肉軟化、液体中のガスの可溶化、液体脱気、脱水または抽出、物質交代の変化および微生物の遺伝子発現、好圧微生物の研究、物質の結晶化および精製、ならびにコーティングの含浸等の工業用表面処理のような工程でも使用できる。

20

【図1】
FIG. 1



【図2】

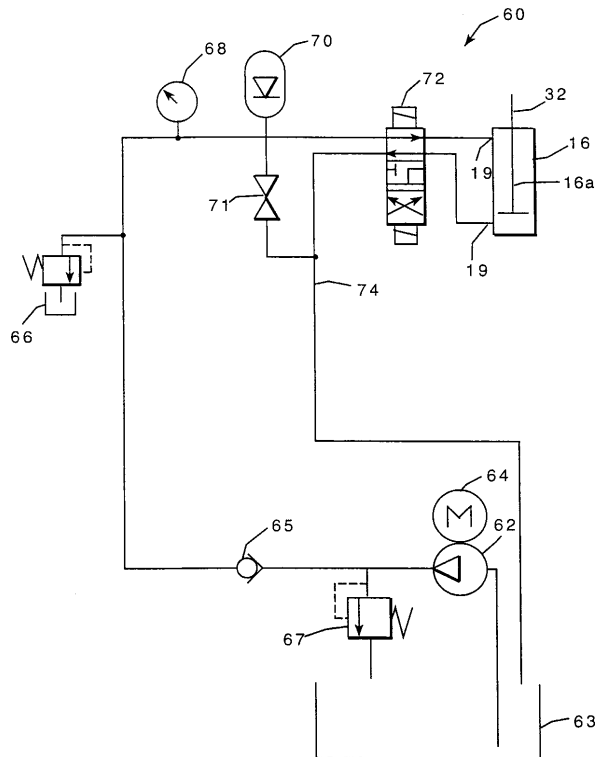


FIG. 2

【図1A】

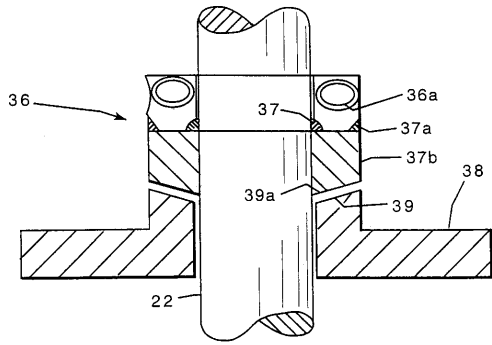


FIG. 1A

【図3】

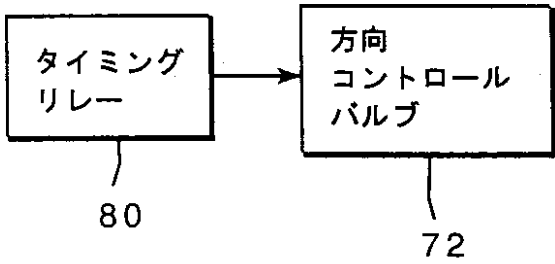


FIG. 3

【図4】

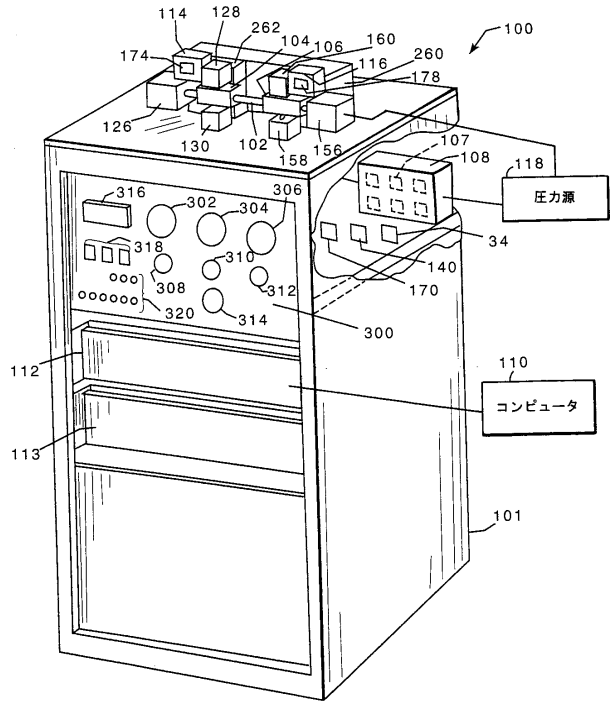


FIG. 4

【図5】

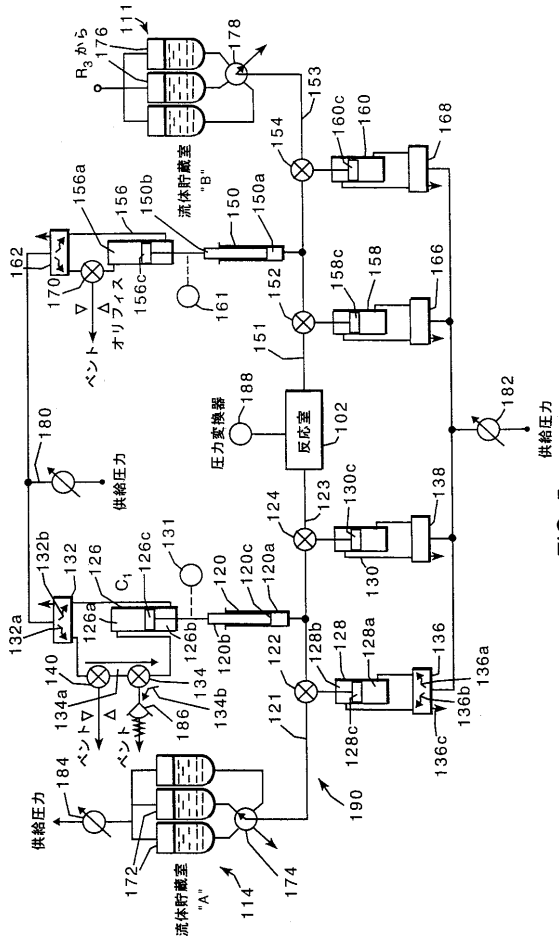


FIG. 5

【図5A】

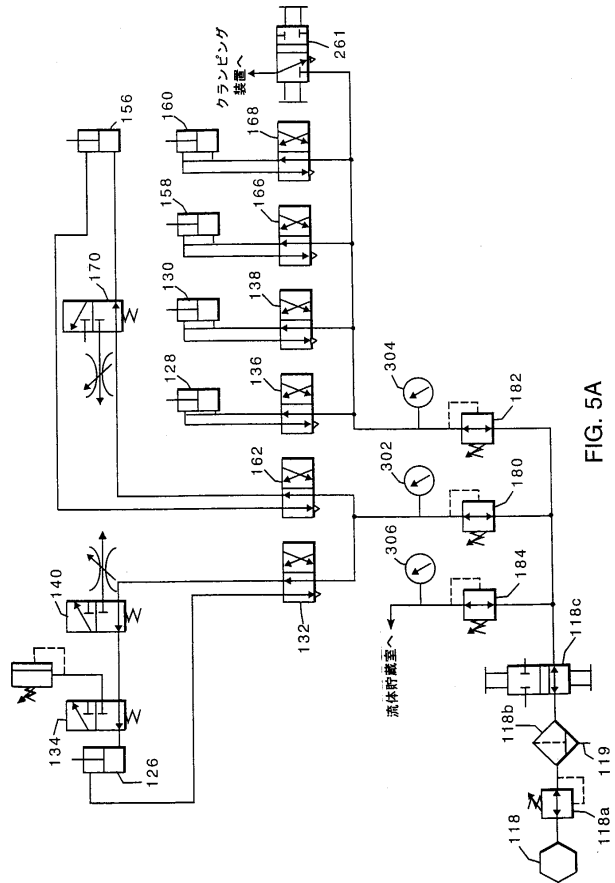
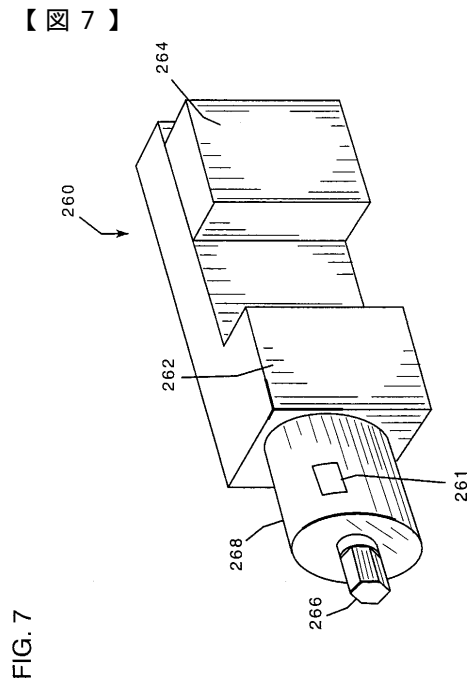
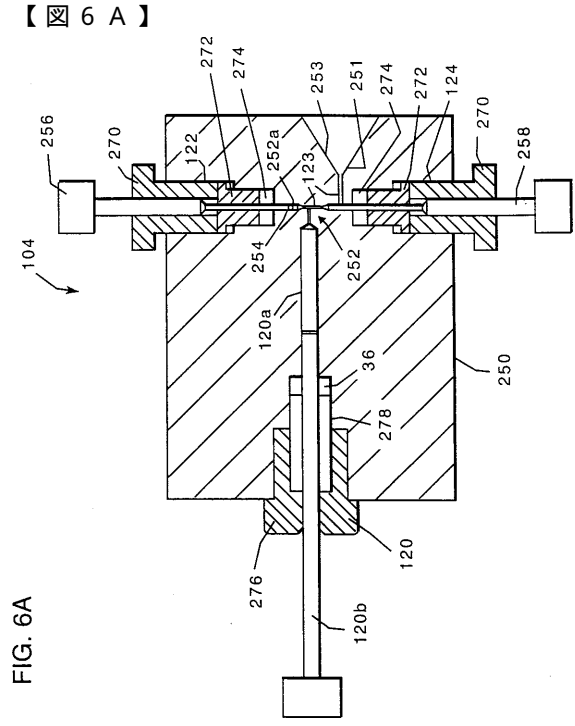
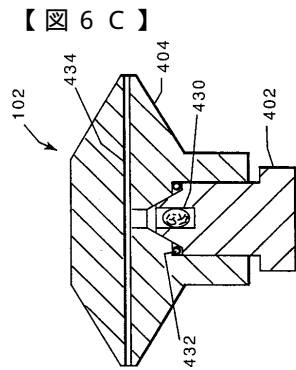
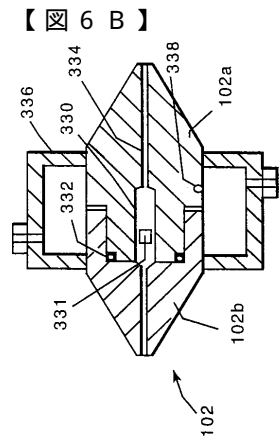
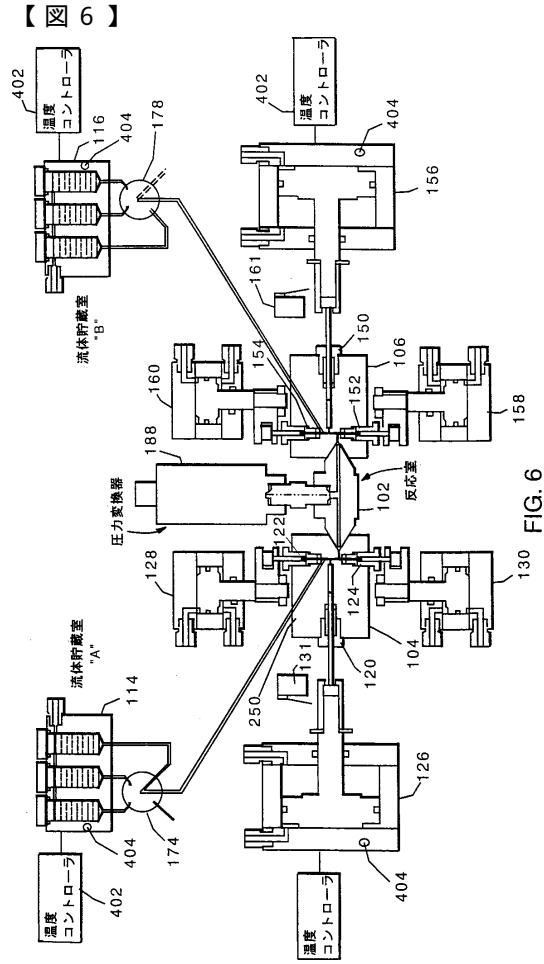


FIG. 5A



【 図 1 2 】

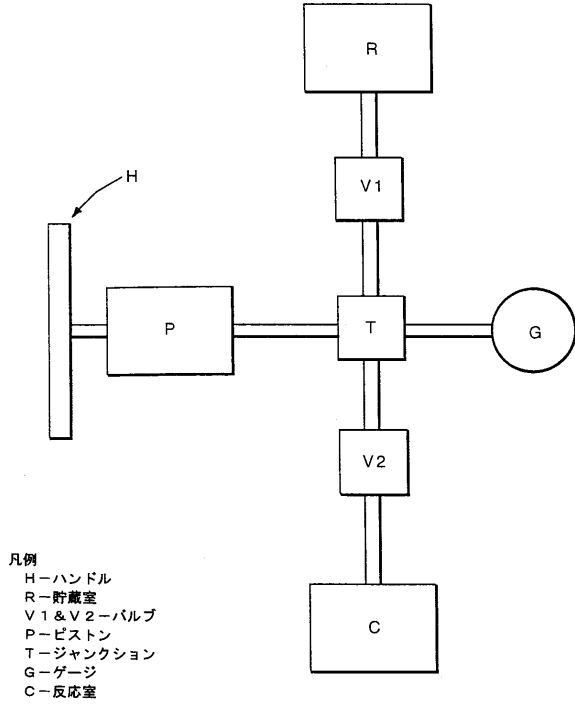


FIG. 12

【 図 1 3 】

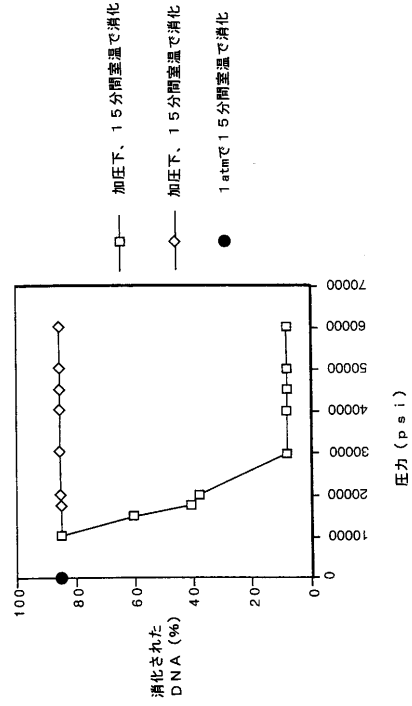


FIG. 13

【 図 1 4 】

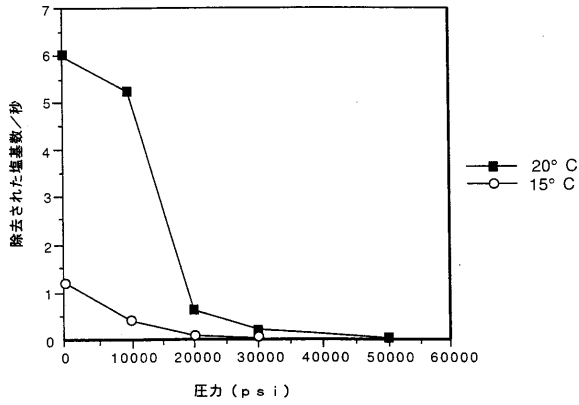


FIG. 14

フロントページの続き

- (72)発明者 ドライヤー グスタフ エイチ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ジェファーソン モックスレイ ストリート 189
- (72)発明者 ルド エドウィン エイ
アメリカ合衆国 ニューハンプシャー州 サレム ブルック ダール ロード 52
- (72)発明者 グリーン デイビット ジェイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウィンチェスター アンバー ウッド ドライブ 51

審査官 田中 晴絵

- (56)参考文献 特表昭57-501519(JP,A)
Biochemistry,1988,Vol.27,p.6704-6710
Archives of Biochemistry and Biophysics,1993,Vol.306,No.2,p.495-500

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 9/00
B01J 3/00
B01J 19/00
C12N 15/00 - 15/90
C12M 1/00
WPI(DIALOG)