

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6513705号
(P6513705)

(45) 発行日 令和1年5月15日(2019.5.15)

(24) 登録日 平成31年4月19日(2019.4.19)

(51) Int.Cl.
G 0 1 N 27/00 (2006.01)F I
G O 1 N 27/00 Z

請求項の数 17 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2016-567412 (P2016-567412)	(73) 特許権者	507189574
(86) (22) 出願日	平成27年5月13日 (2015.5.13)		ウェイク・フォレスト・ユニヴァーシティ
(65) 公表番号	特表2017-516100 (P2017-516100A)		・ヘルス・サイエンス
(43) 公表日	平成29年6月15日 (2017.6.15)		アメリカ合衆国ノースカロライナ州271
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/030531		57, ウィンストン-セイラム, メディカル
(87) 国際公開番号	W02015/175638		・センター・ブルヴァード
(87) 国際公開日	平成27年11月19日 (2015.11.19)	(74) 代理人	100083806
審査請求日	平成30年4月4日 (2018.4.4)		弁理士 三好 秀和
(31) 優先権主張番号	61/992, 814	(74) 代理人	100095500
(32) 優先日	平成26年5月13日 (2014.5.13)		弁理士 伊藤 正和
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100111235
(31) 優先権主張番号	62/132, 989		弁理士 原 裕子
(32) 優先日	平成27年3月13日 (2015.3.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固体状態ナノ細孔を用いた修飾生物学的分子の選択的分析

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

移行剤と複合体を形成する生物学的分子、および非複合体形成生物学的分子を含む混合物を提供するステップと；

混合物を、少なくとも1つのナノ細孔を含む膜と接触させるステップと；

ナノ細孔に電界を印加するステップと；

少なくとも1つのナノ細孔を通じて、移行剤と複合体を形成する生物学的分子を移行させるステップ

とを含む、生物学的分子組成物の分析方法であって、

複合体形成生物学的分子の移行が選択的に検出される、方法。

10

【請求項 2】

複合体形成生物学的分子の1つまたは複数の移行事象の間に、ナノ細孔を通る電流の変化を測定するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

複合体形成生物学的分子の移行事象の速度を測定するステップをさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

移行事象の速度から複合体形成生物学的分子の濃度を決定するステップをさらに含む、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

20

複合体形成生物学的分子の濃度が移行事象の速度と実質的に直線関係を示す、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

移行された複合体形成生物学的分子を回収するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

移行剤が、印加電圧により設定された印加電界を用いた複合体形成生物学的分子の選択的な移行検出を可能にするのに十分な電荷を有する化学種である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

10

複合体形成生物学的分子および非複合体形成生物学的分子が、核酸およびタンパク質からなる群から独立して選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

移行剤が、複合体形成生物学的分子の移行前に、1 つまたは複数の分子種と結合するためのアフィニティータグで修飾された一本鎖核酸を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

アフィニティータグが、1 つまたは複数のタンパク質と結合する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

アフィニティータグが、ビオチンまたはその誘導体を含む、請求項 10 に記載の方法。

20

【請求項 12】

移行剤と複合体を形成する生物学的分子が、移行剤と相補的である配列を有する一本鎖核酸である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

一本鎖核酸が、1 種または複数種の RNA を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

複合体形成生物学的分子が核酸であり、移行事象の速度が核酸の長さに対して直線的に変化する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 15】

少なくとも 1 つのナノ細孔が、5 から 30 nm の直径を有する、請求項 1 に記載の方法

30

【請求項 16】

少なくとも 1 つのナノ細孔が、10 から 20 nm の直径を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

印加電界の電圧が、1 mV から 5 V である、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願データ)

40

本出願は、2014 年 5 月 13 日に出願された米国仮特許出願第 61/992,814 号および 2015 年 3 月 13 日に出願された米国仮特許出願第 62/132,989 号への米国特許法第 119 条 (e) に基づく利益を主張し、これらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は生物学的分子組成物の分析に関し、特に、固体状態ナノ細孔を用いた生物学的分子組成物の選択的検出および定量に関する。

【背景技術】

【0003】

免疫沈降およびプルダウンアッセイは生化学において主力である。異種混合物中の特定

50

の物質を識別する能力によって、それらはプロテオミクス、エピジェノミクスおよびトランスクリプトミクスを含む、幅広い分野で重要な役割を果たす。しかしながら、幅広い有用性にもかかわらず、これらの確立された戦略には限界がある。大きな試料サイズが必要であることに加え、多くの人手を要し、本質的に定量的ではなく、それに続くPCRまたは下流分析の充実が概ね必要である。これらの理由により、単一分子の感度がある定量技術は重要な利点を提供し得る。

【発明の概要】

【0004】

一態様において、生物学的分子組成物の選択的検出および定量分析のための方法が本明細書に記載される。本明細書に記載の方法は、移行剤 (translocating agent) と複合体を形成する生物学的分子、および非複合体形成生物学的分子を含む混合物を提供することを含む。混合物を少なくとも1つのナノ細孔を含む膜と接触させ、電界をナノ細孔に印加し、少なくとも1つのナノ細孔を通じて移行剤と複合体を形成する生物学的分子を移行し、複合体形成生物学的分子の移行が選択的に検出される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、複合体形成生物学的分子の1つまたは複数の移行事象の間に、ナノ細孔を通る電流の変化を測定することをさらに含む。さらに、該方法は、複合体形成生物学的分子の移行事象の速度を測定すること、および移行事象の速度から複合体形成生物学的分子の濃度を決定することをさらに含むことができる。重要なものは、移行された複合体形成生物学的分子を溶液から回収でき、よって最初の混合物の非複合体形成生物学的分子から分離されることである。本明細書に記載の方法による分析に適する生物学的分子は、核酸およびタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、例えば、生物学的分子は一本鎖および二本鎖デオキシリボ核酸 (dideoxyribonucleic acid) (DNA)、ならびにリボ核酸 (RNA) および鎖内二重らせんを有するRNAを含む。

【0005】

これらおよび他の実施形態は下記の詳細な説明においてより詳細に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】図1は、本明細書に記載の一実施形態による生物学的分子組成物分析の方法を示す図である。

【図2】図2は、本明細書に記載のいくつかの実施形態による、共通の化学量論範囲での電気泳動移動度シフトアッセイと比較した、様々な電界での複合体形成生物学的分子の移行事象速度を示す図である。

【図3】図3は、本明細書に記載の一実施形態による、移行剤および複合体形成生物学的分子のモル比が1:1までの複合体形成生物学的分子の事象速度を示す図である。

【図4】図4は、本明細書に記載の一実施形態による、移行事象速度に対する複合体形成生物学的分子濃度の定量を示す図である。

【図5】図5は、本明細書に記載の一実施形態による、複合体形成移行剤および非複合体形成移行剤への印加電圧に対する移行事象速度を示す図である。

【図6】図6は、本明細書に記載の一実施形態による、複合体形成移行剤、非複合体形成移行および非複合体形成一本鎖核酸への印加電圧に対する移行事象速度を示す図である。

【図7】図7は、本明細書に記載の一実施形態による、複合体形成ds-DNAおよび非複合体形成ds-DNAへの印加電圧に対する移行事象速度を示す図である。

【図8】図8は、本明細書に記載の一実施形態による、複合体形成生物学的分子濃度に対する移行事象速度を示す図である。

【図9】図9は、本明細書に記載の一実施形態による、ds-DNAの長さに対する移行事象速度を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0007】

(詳細な説明)

本明細書に記載の実施形態は、下記の詳細な説明および実施例、ならびにそれらの前後

10

20

30

40

50

の説明を参照することにより、より容易に理解することができる。しかしながら、本明細書で記載される要素、装置および方法は、詳細な説明および実施例に示される特定の実施形態に制限されない。これらの実施形態は、本発明の原理の例示にすぎないことが認識されるべきである。多くの改変および適合は本発明の精神および範囲から逸脱せず、当業者には容易に明らかであろう。

【0008】

一態様において、生物学的分子組成物の選択的検出および定量分析のための方法が本明細書に記載される。本明細書に記載の方法は、移行剤と複合体を形成する生物学的分子、および非複合体形成生物学的分子を含む混合物を提供することを含む。混合物を少なくとも1つのナノ細孔を含む膜と接触させ、電界をナノ細孔に印加し、少なくとも1つのナノ細孔を通じて移行剤と複合体を形成する生物学的分子を移行し、複合体形成生物学的分子の移行が選択的に検出される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、複合体形成生物学的分子の1つまたは複数の移行事象の間に、ナノ細孔を通る電流の変化を測定することをさらに含む。さらに、該方法は、複合体形成生物学的分子の移行事象の速度を測定すること、および移行事象の速度から複合体形成生物学的分子の濃度を決定することをさらに含むことができる。重要なのは、移行された複合体形成生物学的分子を溶液から回収でき、よって最初の混合物の非複合体形成生物学的分子から分離されることである。

10

【0009】

次に特定の工程を検討すると、本明細書に記載の方法は、移行剤と複合体を形成する生物学的分子、および非複合体形成生物学的分子を含む混合物を提供することを含む。本明細書に記載の方法によって、本発明の目的と矛盾しない任意の生物学的分子を選択的に検出および定量できる。本明細書に記載の方法による分析に適する生物学的分子は核酸を含む。いくつかの実施形態において、例えば、生物学的分子はss-DNA、ds-DNA、ならびにRNAおよび鎖内二重らせんを有するRNAを含む。RNAはmRNA、miRNA、rRNA、tRNA、tmRNA、aRNAまたはそれらの混合物を含むことができる。核酸は本発明の目的と矛盾しない、任意の所望の数のヌクレオチドを有することができる。いくつかの実施形態において、例えば、分析のための核酸は25から1000のヌクレオチドを有する。加えて、核酸は表Iから選択される数多くのヌクレオチドを有することができる。

20

30

【0010】

【表1】

表 I-核酸の長さ

ヌクレオチド
100-600
200-500
250-400
50-300
100-200
1-500

40

【0011】

混合物の核酸は真核生物、原核生物および／またはウイルス源に由来し得る。さらに、生物学的分子は核酸断片またはオリゴヌクレオチドを含むことができる。本明細書に記載の方法によって、本発明の目的と矛盾しない任意の長さのオリゴヌクレオチドを選択的に検出および定量できる。さらに、分析のための生物学的分子は単一ヌクレオチドおよび／またはその誘導体を含むことができる。

【0012】

核酸に加えて、本明細書に記載の方法による分析に適する生物学的分子はタンパク質を

50

含む。本発明の目的と矛盾しない任意のタンパク質を本明細書に記載の方法に用いることができる。

【0013】

本明細書に記載のとおり、混合物の生物学的分子は移行剤と選択的に複合体を形成する。移行剤は、印加電圧により設定された印加電界を用いた複合体形成生物学的分子の移行の選択的検出を可能にする十分な電荷および／または構造がある化学種である。いくつかの実施形態において、例えば、移行剤はタンパク質、核酸または核酸断片を含む生物学的分子である。生物学的分子は天然に存在する状態であり得る。代替的に、複合体形成生物学的分子の移行の選択的検出を可能にする特定の結合、好適な電荷および／または構造を立証するために、生物学的分子を改変することができる。いくつかの実施形態において、移行剤は、複合体形成生物学的分子の移行前に1つまたは複数の分子種と結合するためのアフィニティータグで修飾された一本鎖核酸を含む。例えば、移行剤は、一本鎖核酸がタンパク質タグで修飾された、公知の特定の配列である一本鎖核酸を含むことができる。タンパク質タグは、移行剤と複合体を形成する生物学的分子の移行前に生物学的分子の混合物中の好適なタンパク質と結合することができる。一実施形態において、一本鎖核酸の移行剤は、相補（complimentary）配列の標的核酸の移行前にストレプトアビジンと結合するためにビオチニル化されている。

10

【0014】

他の実施形態において、移行剤はナノ粒子のような非生物化学種である。本発明の目的と矛盾しない任意のナノ粒子を用いることができる。ナノ粒子は、例えば、カーボンナノ粒子（カーボンナノチューブ、グラフェン、フラーレン、等）を含む有機ナノ粒子を含むことができる。ナノ粒子は半導体ナノ粒子、セラミックナノ粒子および／または金属ナノ粒子のような無機ナノ粒子も含むことができる。

20

【0015】

移行剤を生物学的分子混合物に加え、移行剤は生物学的分子と選択的に結合し、複合体形成生物学的分子を提供する。移行剤により選択的に結合しない生物学的分子は、混合物の非複合体形成生物学的分子を形成する。

【0016】

選択的な移行検出のために生物学的分子に複合体を形成させるために、移行剤は部位特異的結合領域を含むことができる。複合体が形成される生物学的分子の同一性によって、部位特異的結合領域はDNAまたはRNA結合ドメインであり得る。例えば、いくつかの実施形態において、移行剤は核酸結合ドメインの使用を必要とする核酸に直接結合することができる。

30

【0017】

一本鎖核酸の移行剤は、生物学的分子の混合物中の相補配列の標的一本鎖核酸と選択的にハイブリダイズすることができる。選択的ハイブリダイゼーションに続く移行は、混合物中の標的一本鎖核酸の定量を可能にし得る。いくつかの実施形態において、配列が異なる複数の一本鎖核酸の移行剤を、混合物中のいくつかの標的一本鎖核酸の存在の同定および／または定量に用いることができる。高度に保存された配列を、例えば、様々な細菌種のような、混合物中の特定種の同定が可能である移行剤に用いることができる。1つまたは複数の塩基対の不一致が分析結果に示される場合、相同性をモニターすることもできる。さらに、DNAの融解および／またはアニーリング特性は、一本鎖核酸の移行剤を用いることによって解明することができる。一本鎖型（移行剤と複合体を形成していない）および二本鎖型（移行剤と複合体を形成している）間の移行は、移行事象と一時的に相関があり得る。

40

【0018】

代替的に、部位特異的結合領域はタンパク質結合ドメインであり得る。他の実施形態において、移行剤に結合するためのアフィニティータグを核酸に提供でき、それによって、タンパク質結合ドメインを必要とする。

【0019】

50

移行剤は、複合体形成生物学的分子の同一性によって、いくつかのメカニズムによる複合体形成生物学的分子の移行の選択的検出を可能にし得る。いくつかの実施形態において、例えば、目的の生物学的分子は、印加電界の選択された条件および／または他の溶液条件でのナノ細孔を通じた移行に十分な電荷を持たない。そのような実施形態において、移行剤は目的の生物学的分子に十分な電荷を提供して、選択された印加電界および／または他の溶液条件での移行を起こす。したがって、混合物の非複合体形成生物学的分子が選択された条件下で移行しないので、複合体形成生物学的分子の移行を選択的に検出することができる。

【0020】

代替的に、目的の生物学的分子は高電荷であり、ナノ細孔分析で用いられる従来の電子技術では検出できない速度で移行を起こす。タンパク質は、例えば、従来の電子技術では検出できない速度で度々移行し、それによって、ナノ細孔装置はタンパク質の検出および定量に適さない。そのような実施形態において、移行剤は十分な対立電荷および／またはサイズのものであり、従来のナノ細孔システムおよび電子技術での検出および定量のため、タンパク質移行速度を遅らせることができる。同様に、一本鎖核酸は、従来の電子技術では検出できない速度で度々移行し、それによってナノ細孔装置は核酸の検出および定量に適さない。そのような実施形態において、生物学的分子の混合物中の標的一本鎖核酸と相補的な配列を有する一本鎖核酸の移行剤が用いられる。一本鎖核酸の移行剤は、標的一本鎖核酸と形成する複合体の検出を可能にする構造を示す。本明細書に記載のとおり、一本鎖核酸の移行剤は、複合体形成標的一本鎖核酸の移行前に1つまたは複数の分子種と結合するためのタンパク質タグのようなアフィニティータグで修飾され得る。さらに、移行剤は、混合物中の他の種と十分に区別できる移行速度またはナノ細孔の滞留時間を提供し得る。

【0021】

本明細書に記載のとおり、移行剤と複合体を形成する生物学的分子および非複合体形成生物学的分子を含む混合物は、少なくとも1つのナノ細孔を含む膜と接触する。いくつかの実施形態において、膜はナノ細孔の配列を含む。膜は任意の厚さを有し、本発明の目的と矛盾しない任意の材料から形成され得る。いくつかの実施形態において、膜は非金属性である。非金属性膜は、セラミック材料を含む1つまたは複数の電気絶縁材料を含むことができる。好適なセラミックは、金属酸化物、金属窒化物、金属炭化物もしくは金属炭窒化物またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態において、膜としての使用に適するセラミックは窒化ケイ素 (SiN 、 Si_3N_4) である。加えて、膜セラミックは酸化ケイ素、炭化ケイ素、酸化アルミニウムまたは遷移金属酸化物を含むことができる。

【0022】

いくつかの実施形態において、セラミック膜は本質的に多結晶である。いくつかの実施形態において、セラミック膜は本質的に単結晶である。さらに、セラミック膜は多層であり得る。多層膜の個別の層は、同じ材料または異なる材料を含むことができる。いくつかの実施形態において、セラミック膜の個別の層は遷移金属炭化物、遷移金属窒化物、遷移金属炭窒化物、遷移金属酸化物、アルミナ、シリカおよび窒化ケイ素からなる群から独立して選択される。

【0023】

さらに、膜は1つまたは複数の半導体の材料を含むことができる。いくつかの実施形態において、好適な半導体の材料はII/V半導体、IV族半導体またはIII/V半導体を含む。いくつかの実施形態において、半導体材料は三元半導体または四元半導体を含む。好適な半導体材料は非晶構造、結晶構造またはそれらの混合物を有することができる。結晶半導体材料は多結晶または単結晶であり得る。

【0024】

いくつかの実施形態において、膜は金属性である。そのような実施形態において、膜は金属または様々な金属合金であり得る。いくつかの実施形態において、例えば、好適な金属は、金のような貴金属を含む遷移金属である。代替的に、膜は、いくつかの実施形態に

おいては金ではない。金属性膜を、本明細書に記載の方法で用いられる誘電または電気絶縁材料で覆うことができる。

【0025】

いくつかの実施形態において、膜は有機材料を含む。例えば、膜は1つまたは複数の高分子材料を含むことができる。好適な高分子材料は、熱可塑性物質、熱硬化性物質またはエラストマーを含む。高分子材料は、いくつかの実施形態において、ポリエチレン、ポリプロピレンおよびポリカーボネートの1つまたは複数を含む。

【0026】

本明細書に記載の方法の使用に適する膜は任意の所望の厚さを有することができる。いくつかの実施形態において、膜は、一本鎖核酸セグメントを含む1つまたは複数の核酸セグメントの検出および／または分析の実行に適する厚さを有する。いくつかの実施形態において、膜は約200nm未満または約100nm未満の平均厚さを有する。いくつかの実施形態において、膜は表IIの平均厚さを有することができる。

【0027】

【表2】

表II-ナノ細孔膜の厚さ(nm)

膜の厚さ(nm)
<50
1-30
10-20
20-50
50-100
100-500
250-750

【0028】

さらに、膜は原子スケールの厚さを有することができる。いくつかの実施形態において、膜は、0.1nmから0.9nmのような、1nm未満の厚さを有する。いくつかの実施形態において、膜の厚さを、本明細書に記載の方法によるナノ細孔形成前に測定する。

【0029】

加えて、本明細書に記載される膜のナノ細孔は、本発明の目的と矛盾しない任意のサイズおよび形を有することができる。いくつかの実施形態において、例えば、少なくとも1つのナノ細孔は約1nmより大きいまたは約5nmより大きい直径を有する。本明細書に記載される膜のナノ細孔は表IIIの直径を有する。

【0030】

【表3】

表III-ナノ細孔の直径(nm)

ナノ細孔の直径
>10
1-20
1-10
1-5
5-10
10-15
10-20
1.5-4

【0031】

さらに、ナノ細孔は、膜の平均厚さと同じ厚さを有することができる。したがって、いくつかの実施形態において、ナノ細孔は本明細書の表IIから選択される厚さを有するこ

10

20

30

40

50

とができる。代替的に、ナノ細孔は膜の平均厚さより薄い厚さを有する。

【0032】

さらに、ナノ細孔の直径および／または厚さを、移行事象と関連がある電流測定のような、本明細書に記載される所望の信号対雑音比（S N R）の測定に基づいて選択することができる。移行事象のS N Rは、いくつかの実施形態において、大きい直径のナノ細孔ほどより高く、小さい直径のナノ細孔ほどより低い。加えて、いくつかの実施形態において、ナノ細孔の直径および／または厚さは、ナノ細孔中の移行された種の所望の滞留時間または移行事象の所望の持続期間に基づいて選択される。いくつかの実施形態において、滞留時間および／または移行事象の持続期間は、薄いナノ細孔よりも厚いナノ細孔でより長い。滞留時間は、いくつかの実施形態において、ナノ細孔での最初のコンダクタンス低下から基礎値に戻るまでの経過時間である。

10

【0033】

本明細書に記載される膜を本発明の目的と矛盾しない任意の方法で形成することができる。いくつかの実施形態において、例えば、膜を特許協力条約（P C T）出願公開W O 2 0 1 2 / 1 7 0 , 4 9 9 に記載される方法に従って形成し、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0034】

本明細書に記載のとおり、電界をナノ細孔に印加させ、少なくとも1つのナノ細孔を通じて移行剤と複合体を形成する生物学的分子が移行し、移行事象が選択的に検出される。電界は、本発明の目的と矛盾しない任意の印加電圧に従って設定され得る。好適な印加電圧は、例えば、1 m V から 5 V までであり得る。いくつかの実施形態において、印加電圧は、1 0 m V から 1 V または 5 0 m V から 5 0 0 m V までである。

20

【0035】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、複合体形成生物学的分子の1つまたは複数の移行事象の間に、ナノ細孔を通る電流の変化を測定することをさらに含む。さらに、該方法は、複合体形成生物学的分子の移行事象の速度を測定すること、および移行事象の速度から複合体形成生物学的分子の濃度を決定することをさらに含む。いくつかの実施形態において、例えば、複合体形成生物学的分子の濃度。

【0036】

重要なのは、移行された複合体形成生物学的分子は溶液から回収することができ、よって最初の混合物の非複合体形成生物学的分子から分離される。

30

【実施例】

【0037】

これらおよび他の実施形態はさらに、下記の非限定的な実施例で示される。

【0038】

（実施例1）

二本鎖DNAの選択的検出および定量

一価のストレプトアビジン（MS）の移行剤と結合するためのビオチンで修飾されたds-DNAの選択的検出および定量が本実施例に詳細に記載される。本実施例で用いられるモノビオチニル化されたds-DNAのSS-ナノ細孔の識別を図1に示す。図1aにおいて、電解質溶液に浸した単一のナノ細孔を有する薄膜に電気バイアスを印加する。これにより、孔を通じて分子（または分子複合体）の動電移行が容易になり、そのそれぞれがイオン電流事象を生じることができる。この技術はMS（図1b左）およびモノビオチニル化された90bpのdsDNA（bio90、図1b中央）測定に用い、それぞれ8 μMおよび1 μMの濃度で個々に測定した。50～200mVの範囲にわたって、どちらの分子についてもほとんど事象が同定されなかった。しかしながら、MSとbio90を測定前にモル比8：1（MS：bio90）で一緒にインキュベートすると、単位時間当たりの移行事象数の著しい増加（図1b右）が観察された。混合物の事象速度は常に、どちらか一方の構成分子単独と比べて1桁より大きかった；200mVの印加電圧では、例えば、MS-bio90複合体は $23.3 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$ の速度をもたらした一方、MS

40

50

および $b i o 90$ 個々の事象速度はそれぞれ $0.09 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ および $1.1 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ だった。複合体とナノ細孔との間の確率論的な相互作用よりも実際の移行に $M S - b i o 90$ 事象が対応することを立証するために、測定中に印加電圧の極性を逆にし、再捕獲事象を観察した。

【0039】

さらにシステムを調査するため、一連の $S S$ - ナノ細孔測定を、 $M S$ を $b i o 90$ の一定量 ($1 \mu M$) に対して滴定して行った。全ての調査した電圧にわたって、測定された事象速度はモル比 1 : 1 まで著しく上昇した (図 2 a)。しかしながら、単一体からモル比 8 : 1 ($M S : b i o 90$) まで、 $M S$ の追加により事象速度はさらに上昇しなかった。これは、核タンパク質複合体の形成に必要な $d s - D N A$ の供給が限られた結果であり；タンパク質はかなり低い速度 (約 10^{-5} s^{-1}) であり、各オリゴヌクレオチドは単一のビオチン部分のみ含有するので、溶液中のほとんど全ての $b i o 90$ が当モル濃度以上で結合したと予想された。同じ化学量論的範囲にわたって $M S$ および $b i o 90$ で行った電気泳動移動度シフトアッセイ (E M S A) と移行結果を比較すると、非常に類似した傾向が観察された (図 2 b)。これらのデータは、混合物に対して実質的に観察された全ての移行事象が $M S - b i o 90$ 複合体と対応したという結論を支持した。このアプローチの特異性が高いさらなる証拠は、 $M S$ とインキュベートしたビオチニル化されていない $d s D N A$ が、 $b i o 90$ 単独と等しい、ごく小さい事象速度をもたらした対照測定によって提供された。

【0040】

修飾オリゴヌクレオチドの選択的定量：図 3 において、モル比 1 : 1 までの事象速度を検証し、印加電圧の一次従属性を見出した。これは、 $M S - b i o 90$ 複合体の捕獲過程が孔との相互作用よりも拡散によって制御されていることを暗示し、以前の研究と一致した。重要なのは、事象頻度が分子濃度によって変化し得るので、観察された傾向が溶液中の $M S - b i o 90$ 複合体の定量への道を提供した。本システムで観察されたほとんど全ての事象は専ら複合体の移行によるものだったので、図 3 の直線フィットは、溶液中の $M S - b i o 90$ の濃度を、所与の電圧で生じた特定の事象速度と関連付ける。よって、これまでに記載された測定は、タンパク質に限定されたレジーム ($M S : b i o 90 < 1 : 1$) で行い、その結果、測定された事象速度はコンジュゲートされていない $b i o 90$ のバックグラウンドで $M S - b i o 90$ 複合体の定量を容易にした。しかしながら、同じア

【0041】

この可能性を調査するために、第三者によって調製された 2 つの試料で盲検試験を行った。これらのサンプルはそれぞれ、総濃度 $1 \mu M$ (上述の測定濃度と等しい) に混合した、ビオチニル化されたおよびビオチニル化されていない 90 bp の $d s - D N A$ の異なる混合物を含有した。全ての $b i o 90$ が複合体を形成したことを確認するために、両溶液を $M S$ と共に $4 \mu M$ の濃度でインキュベートする。以前のセクションに記載したように、 $M S$ 単独では測定できる事象はごく少数しか生じなかったため、過剰のタンパク質は測定を不安定にしなかった。 $S S$ - ナノ細孔分析は、予想されたように、両試料で印加電圧と事象速度との間で直線関係を示した。2 つの盲検試料から得られた事象速度と以前の測定との比較 (図 4) は、それぞれの $b i o 90$ 濃度の値を導いた： $850 \pm 35 \text{ nM}$ (試料 1) および $520 \pm 20 \text{ nM}$ (試料 2)。注目すべきことに、これらの実験で決定された濃度はそれぞれ調製された値である 800 ± 20 および $480 \pm 20 \text{ nM}$ に非常に一致していた。これらの結果は、我々の $S S$ - ナノ細孔アプローチは、混合試料中においても、単一ヌクレオチドビオチン修飾を選択的に有する $D N A$ を一意的に定量できることを立証する。

【0042】

(方法)

$S S$ - ナノ細孔デバイスの製造および電氣的測定

ナノ細孔を、他にWO2012/170,499に記載されているような技術を用いて製造した。簡単には、走査型ヘリウムイオン顕微鏡(Carl Zeiss Orion Plus)のビームの焦点を、シリコン支持チップの吊るされたシリコン窒化物薄膜(厚さ30nm)に合わせた。較正された露出時間を用いて、7.3~7.7nmの直径のナノ細孔を摩砕した。そして、個別の孔を含有する支持チップを膜の両側への流体通路を有するカスタムフローセルに配置した。測定溶液(900mMのNaClおよび6mMのPBS緩衝液)をフローセルの両側に導入し、Ag/AgCl電極を溶液に浸した。デバイスが低いRMSノイズ(一般的には、 $<20\text{ pA}$)および較正されたナノ細孔の直径と一致する直線電流-電圧特性を示すことを立証するために、電氣的測定(Axopatch 200B)を用いた。移行の測定は、生体分子を含有する測定溶液を有するデバイスの一方の側の溶液を交換することによって行った。コンダクタンスは200kHzの帯域幅で記録し、四極ベッセルフィルターを用いて100kHzでろ過した。分析は全ての測定に対して25kHzの追加のローパスフィルターを適用したカスタムソフトウェアを用いて行った。分析の事象閾値について4つの標準偏差を設定し、12~2000 μs の持続期間での事象のみについて検討した。

【0043】

生体分子

Bio90のオリゴヌクレオチド配列は購入した(Integrated DNA Technologies、Coralville、IA): TGT ATA CCA TGG CCA GGA TCC TGG GCC ATC TGG TAT^B GTA AAT CAT AAA GAA TTC TCA TTC TGC AGG TGC ACA TGT TAA CAC TAG TCG TGA。T^Bは、内部がビオチニル化された単一のdTを表す。対立鎖(dsDNAを形成する)は修飾されていないヌクレオチドを含有していた。混合物(盲検測定)に用いたビオチニル化されていないオリゴヌクレオチドは同じ配列を有していたが、ビオチン部分は有していなかった。用いたストレプトアビジン変異体(SAe1D3)は1つの活性ビオチン結合部位を含有し、Howarth lab(Oxford University)から供給された。この変異タンパク質(54.5kDa)は野生型ストレプトアビジンと類似の結合アフィニティーおよび安定性を保持し、同等のpH条件下で-17.1eの負電荷を与える絶縁で用いられるヘキサグルタミン酸タグを含有する。

【0044】

電気泳動移動度シフトアッセイ

MSをbio90と0:1から8:1までのモル比(MS:bio90)で、室温で20分インキュベートした。そして混合物を可視化のためのエチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルにロードした。電気泳動ユニットの緩衝液槽を氷浴に浸し、タンパク質-DNA複合体の解離を最小限にした。

【0045】

(実施例2)

二本鎖DNAの選択的検出および定量

2種のDNA分子により与えられる牽引力の変動によって、ビオチニル化されたdsDNAおよびssDNAを区別する能力を立証した。この効果はMSの存在下、ナノ細孔による一本鎖(ss)および二本鎖(ds)バージョンの34塩基対(bp)モノビオチニル化されたオリゴヌクレオチドの両方を分析することにより立証した。図5に示すように、事象速度の顕著な増加がdsDNA-MSで観察され、ssDNA-MSでは増進が観察されなかった。この結果に基づいて、ビオチニル化されたssDNAは、生物学的分子の混合物中の相補標的配列と結合することができる配列特異的移行剤として用いることができる。34bpのビオチニル化されたssDNAの配列特異的移行能力を、相同性配列の一本鎖核酸および4つの非相同性ssDNA配列のバックグラウンドを含む混合物で試験した。MSを混合物中に導入し、熱サイクルを行い、アニーリングを促進した。図6は、ビオチニル化されたdsDNA-MSのハイブリダイズされた複合体の移行が観察され

た結果を示す。重要なのは、非複合体形成 ssDNA および非複合体形成ビオチニル化された ssDNA-M S 移行剤の移行が観察されなかったことである。

【0046】

(実施例 3)

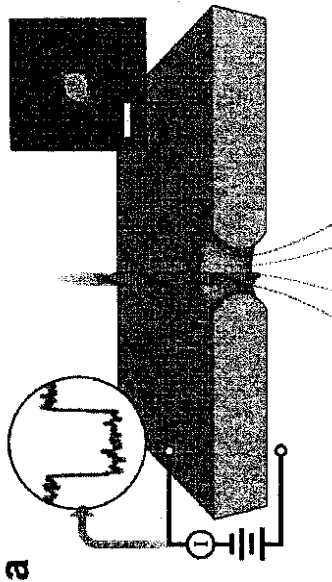
ds-DNA の移行の特徴付け

一連の S S ナノ細孔の測定は、ビオチンで酵素的に標識され、続いて M S に結合した単一ヒドロキシメチルシトシンを有する 150 bp の ds-DNA 鎖の移行事象速度を、ナノ細孔の印加電圧および 150 bp の ds-DNA 鎖の濃度に対して測定して行った。ナノ細孔の構築および操作パラメーターは、50 ~ 600 mV までの印加電圧である実施例 1 で得たもの一致した。図 7 は、ds-DNA-ビオチン-M S の移行事象速度が電圧の上昇と共に増加した試験結果を示す。比較のために、ビオチン-M S 移行剤構造を用いていない 150 bp の ds-DNA 鎖を試験し、移行反応は記録されなかった。ds-DNA-ビオチン-M S 濃度への移行事象速度の依存性もまた調査した。図 8 に示すように、移行事象速度は、200 mV の一定の印加電圧で ds-DNA-ビオチン-M S 濃度に対して概ね直線的に変化した。図 8 の影の部分はノイズフロアを表す。ds-DNA の長さへの移行事象速度の依存性もまた調査した。図 9 に示すように、移行率は、ds-DNA の長さへの実質的な一次従属性を示した。これらの立証された関係によって、本明細書に記載の方法は、核酸を含む生物学的分子の特徴付けおよび定量に対して強力なツールを提供する。

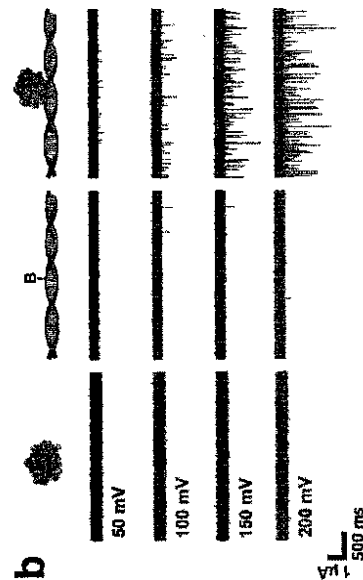
【0047】

本発明の様々な実施形態は、本発明の様々な目的の履行として記載されている。これらの実施形態は、本発明の原理の単なる例示であることを理解されたい。発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者には多くの修正および適応が容易に明らかであろう。

【図 1 a】



【図 1 b】



【図 2】

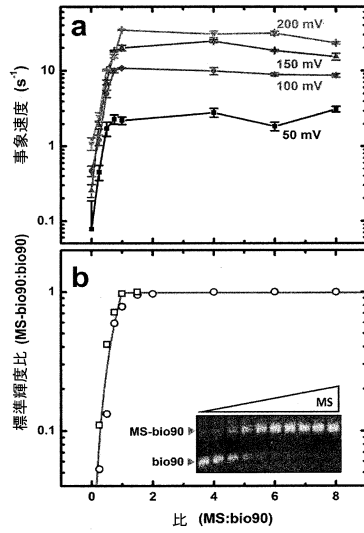


FIGURE 2

【図 3】

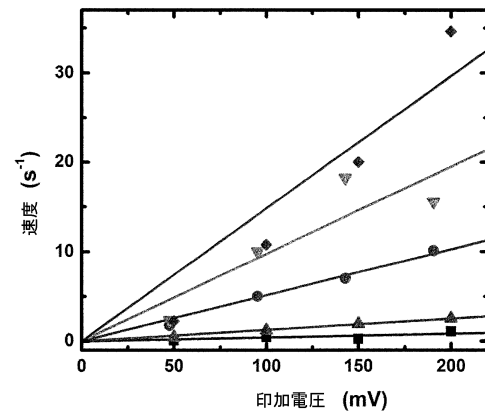


FIGURE 3

【図 4】

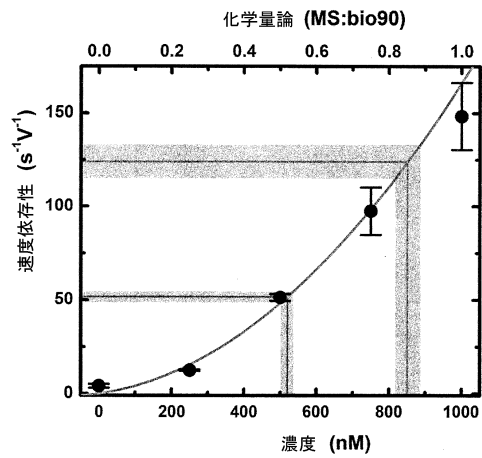


FIGURE 4

【図 5】

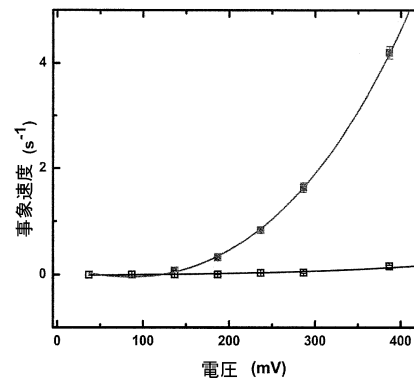


FIGURE 5

【図 6】

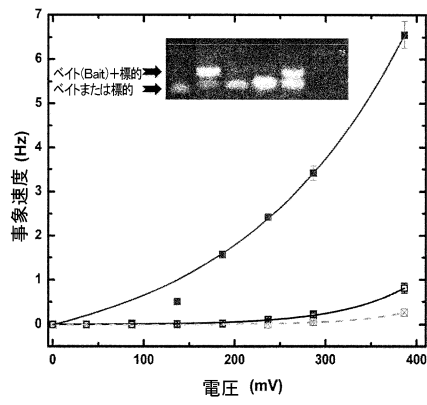


FIGURE 6

【図 7】

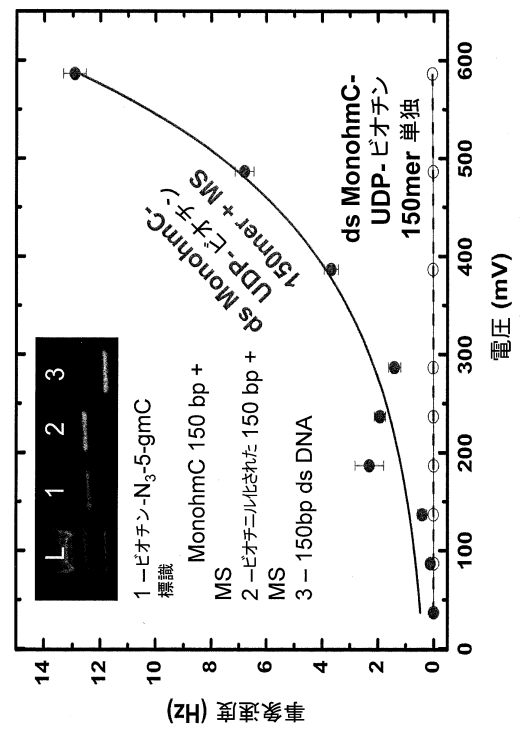


FIGURE 7

【図 8】

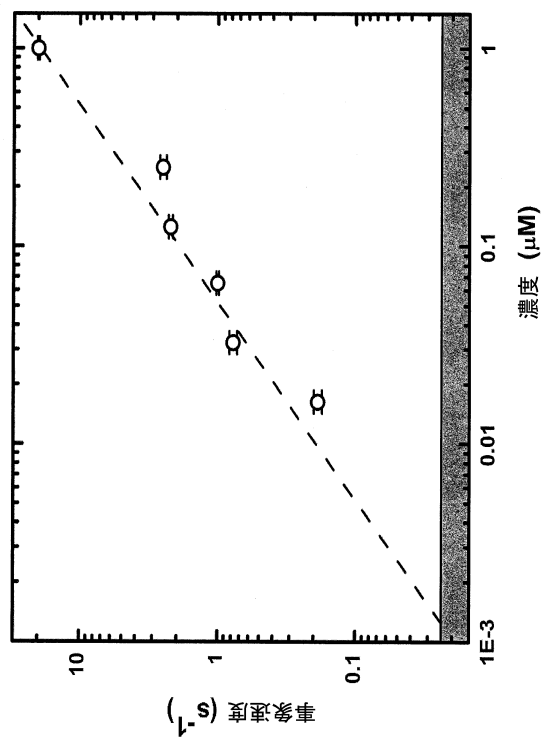


FIGURE 8

【図 9】

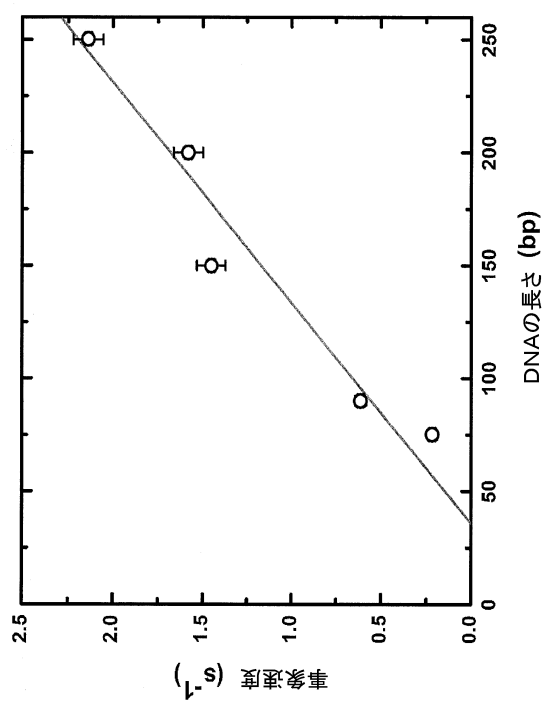


FIGURE 9

フロントページの続き

(72)発明者 ホール、 アダム アール.
アメリカ合衆国 27012 ノースカロライナ州 クレモンズ クラグモア ロード 1720

審査官 吉田 将志

(56)参考文献 特開2006-113057 (JP, A)
米国特許出願公開第2006/0073489 (US, A1)
特表2014-521956 (JP, A)
国際公開第2013/016486 (WO, A1)
特開2014-173936 (JP, A)
米国特許出願公開第2014/0378331 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 27/00-10
14-24