

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6364348号  
(P6364348)

(45) 発行日 平成30年7月25日(2018.7.25)

(24) 登録日 平成30年7月6日(2018.7.6)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

B 8 2 Y 35/00 (2011.01)

B 8 2 Y 5/00 (2011.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

G O 1 N 27/28 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 A

B 8 2 Y 35/00

B 8 2 Y 5/00

C 1 2 Q 1/6869 Z

G O 1 N 27/28 P

請求項の数 25 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2014-521721 (P2014-521721)  
 (86) (22) 出願日 平成24年7月18日(2012.7.18)  
 (65) 公表番号 特表2014-529296 (P2014-529296A)  
 (43) 公表日 平成26年11月6日(2014.11.6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/047107  
 (87) 国際公開番号 W02013/012881  
 (87) 国際公開日 平成25年1月24日(2013.1.24)  
 審査請求日 平成27年7月14日(2015.7.14)  
 (31) 優先権主張番号 61/572,843  
 (32) 優先日 平成23年7月20日(2011.7.20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 513162538  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
 ティ オブ カリフォルニア  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
 607, オークランド, フランクリン ス  
 トリート 1111, フィフス フロア,  
 オフィス オブ テクノロジー トランス  
 ファー  
 (74) 代理人 100180781  
 弁理士 安達 友和  
 (72) 発明者 ダンバー, ウィリアム  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95  
 064, ハイ ストリート 1156, ユ  
 ニバーシティ カリフォルニア アト サ  
 ンタ クルス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2細孔装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

上部チャンバ、中間チャンバおよび下部チャンバを備える装置であって、  
 前記上部チャンバは第1の細孔を通して前記中間チャンバと連通し、前記中間チャンバ  
 は第2の細孔を通して前記下部チャンバと連通し、  
 前記第1の細孔および第2の細孔は各々が独立して深さを有し、直径約1nm～約10  
 0nmであり、

前記チャンバのそれぞれは、電源に接続するための電極を備え、前記電源は、前記上部  
 チャンバと前記中間チャンバとの間に第1の電圧と、前記中間チャンバと前記下部チャン  
 バとの間に第2の電圧と、を提供するように構成され、前記第1の電圧または前記第2の  
 電圧は独立して調節可能であり、

前記第1の細孔および前記第2の細孔の両方に亘って荷電ポリマーを配置したのち、前  
 記第1の細孔および前記第2の細孔に競合電圧を印加するための前記第1の電圧または前  
 記第2の電圧を調節する専用ハードウェアおよびソフトウェアを備えた装置。

【請求項 2】

前記第1のおよび第2の細孔は実質的に同軸である、請求項1に記載の装置。

【請求項 3】

前記装置は、ケイ素、窒化ケイ素、二酸化ケイ素、グラフェン、カーボンナノチューブ  
 ,  $\text{TiO}_2$  ,  $\text{HfO}_2$  ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  , 金属層, ガラス, 生体ナノ細孔, 生体細孔挿入物を  
 備える膜, およびこれらの組み合わせからなる群から選択される材料を含む、請求項1ま

たは 2 に記載の装置。

【請求項 4】

前記第 1 の細孔および前記第 2 の細孔は深さ約 0 . 3 n m ~ 約 1 0 0 n m である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 5】

前記第 1 の電圧は、前記第 2 の細孔を横切る測定されたイオン電流に基づき調節される、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 6】

前記電源は、前記第 1 の電圧および第 2 の電圧のそれぞれを生成するために電圧クランプシステムまたはパッチクランプシステムを備える、請求項 5 に記載の装置。

10

【請求項 7】

前記中間チャンバは前記 2 つの電圧に対して接地するように調節される、請求項 5 または 6 に記載の装置。

【請求項 8】

前記中間チャンバは、前記細孔のそれぞれと当該中間チャンバ内の前記電極との間に伝導性を提供するための媒体を備える、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 9】

前記電源は更に、前記細孔のそれぞれを通る前記イオン電流を測定するように構成される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 10】

20

上部チャンバ、中間チャンバおよび下部チャンバを備える装置であって、

前記上部チャンバは、第 1 の細孔を通して前記中間チャンバと連通し、前記中間チャンバは第 2 の細孔を通して前記下部チャンバと連通し、前記第 1 の細孔および第 2 の細孔は各々が独立して深さを有し、直径約 1 n m ~ 約 1 0 0 n m であり、

前記細孔のそれぞれに電圧を印加して前記細孔のそれぞれを通るイオン電流を測定するために電圧クランプまたはパッチクランプシステムに接続するための、前記チャンバのそれぞれにある電極であって、前記中間チャンバ内の前記電極は前記 2 つの電圧クランプまたはパッチクランプシステムの共通するアースに接続されている電極と、

前記第 1 の細孔および前記第 2 の細孔の両方に亘って荷電ポリマーを配置したのち、前記第 1 の細孔および前記第 2 の細孔に競合電圧を印加するための前記第 1 の電圧または前記第 2 の電圧を調節する専用ハードウェアおよびソフトウェアとを備えた、装置。

30

【請求項 11】

細孔を通る荷電ポリマーの移動を制御する方法であって、

( a ) 荷電ポリマーを含むサンプルを請求項 10 に記載の装置の前記上部チャンバ、中間チャンバまたは下部チャンバの一つに装填するステップを備え、

( b ) 前記ポリマーが前記チャンバ間を移動するように初期の第 1 の電圧および初期の第 2 の電圧を設定するステップを備え、これにより、前記第 1 の細孔および第 2 の細孔の両方に亘って前記ポリマーを配置し、

( c ) 前記第 1 の電圧および前記第 2 の電圧の両方が前記荷電ポリマーを前記中間チャンバから引き離すための力を生成するように前記第 1 の電圧または前記第 2 の電圧を調節するステップを備え、ここで、前記荷電ポリマーが一方向にかつ制御された方法で両方の細孔を横切って移動するように前記 2 つの電圧は制御された条件下で強度が異なる、方法。

40

【請求項 12】

前記サンプルは前記上部チャンバ内に装填され、前記初期の第 1 の電圧は前記荷電ポリマーを前記上部チャンバから前記中間チャンバへ引っ張るように設定され、前記初期の第 2 の電圧は前記荷電ポリマーを前記中間チャンバから前記下部チャンバへ引っ張るように設定される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記サンプルは前記中間チャンバ内に装填され、前記初期の第 1 の電圧は前記荷電ポリマーを前記中間チャンバから前記上部チャンバへ引っ張るように設定され、前記初期の第

50

2の電圧は前記荷電ポリマーを前記中間チャンバから前記下部チャンバへ引っ張るように設定される、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

前記荷電ポリマーは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドである、請求項11から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記荷電ポリマーはポリヌクレオチドである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記ポリヌクレオチドは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、およびDNA-RNA混成物からなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

10

【請求項17】

ステップ(c)における前記調節された第1の電圧および第2の電圧は、前記2つの電圧間の強度の相違よりも約10倍～約10,000倍高い、請求項11から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記ポリマーのモノマー単位を特定するステップを更に備え、これは前記モノマー単位が前記細孔の一つを通過するときに当該細孔に亘るイオン電流を測定することによってなされる、請求項11から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記モノマー単位はヌクレオチドである、請求項18に記載の方法。

20

【請求項20】

前記モノマー単位はヌクレオチド対である、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記モノマーは分子に結合される、請求項18～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記分子は、DNA結合タンパクまたはナノ粒子である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記DNA結合タンパクは配列特異的なDNA結合タンパクである、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

30

前記ポリマーは当該ポリマーの一端にて固体支持体に接着される、請求項11から23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

ポリヌクレオチドのシーケンスを決定するための方法であって、

(a) ポリヌクレオチドを含むサンプルを請求項10に記載の前記装置の前記上部チャンバ内に装填するステップを備え、前記ポリヌクレオチドは当該ポリヌクレオチドの一端にて固体支持体に任意に接着され、

(b) 前記ポリヌクレオチドが前記上部チャンバから前記中間チャンバへおよび前記中間チャンバから前記下部チャンバへ移動するように初期の第1の電圧および初期の第2の電圧を設定するステップを備え、これにより、前記第1の細孔および第2の細孔の両方に亘って前記ポリマーを配置し、

40

(c) 両方の電圧が前記ポリヌクレオチドを前記中間チャンバから引き離すための力を生成するように第1の電圧または第2の電圧を調節するステップを備え、ここで、前記ポリヌクレオチドが一方向にかつ制御された方法で両方の細孔を横切って移動するように前記2つの電圧は制御された条件下で強度が異なり、

(d) 前記細孔の一方を通る前記ポリヌクレオチドの各ヌクレオチドを特定するステップを更に備え、これは前記ヌクレオチドが当該細孔を通過するときに当該細孔に亘るイオン電流を測定することによってなされる、方法。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願のクロスリファレンス)

本願は、2011年7月20日に出願した米国仮特許出願番号第61/572,843号の米国特許法第119(e)条に基づく優先権を主張し、その内容は本願において援用する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ナノ細孔はナノスケールの開口部であり、脂質膜(生体細孔)におけるタンパクチャネルとして自然に形成し、あるいは固体の基板において開口部(固体の細孔)を穿孔またはエッチングすることによって作られる。係るナノ細孔がこのナノ細孔によって分離される2つのチャンバを備えるナノデバイス内に組み込まれると、高感度のパッチクランプ増幅器が、膜電圧を印加して細孔を通してイオン電流を測定するのに使用することができる。

10

## 【0003】

ナノ細孔は廉価な全ゲノムDNAシーケンシングに対して成功を約束するものである。この点に関し、個々のDNA分子は電気泳動によって細孔を通して捕捉され駆動されることができ、各捕捉事象はイオン電流において一時的な移動として検出される。次にDNA分子のシーケンスは、移動されたイオン電流の記録内のパターンから推測することができ、DNAが細孔チャネルを通過する際にナノ細孔内またはナノ細孔近くの他の補助的なセンサーから推測することができる。

20

## 【0004】

原理上としては、ナノ細孔シーケンサーはサンプル増幅の必要性をなくすことができ、シーケンシング動作中に触媒決定のために使用される酵素および試薬の使用をなくすことができ、シーケンシング進捗の検出のためのオブティクスをなくすことができ、これらのいくつかまたは全ては従来のシーケンシング・バイ・シンセシス(合成によるシーケンシング)法によって必要とされる。

## 【0005】

ナノ細孔センサーは純粋に電氣的なものであり、血液または唾液試料から得られるものよりも大きくはない濃度/体積におけるDNAを検出することができる。更に、ナノ細孔はシーケンシングされたDNAの読み出し長さ(read-length)を450ベースから10,000ベース以上まで劇的に増加する。

30

## 【0006】

ナノ細孔シーケンシングに対する2つの主な障害があり、それは(1)デノボシーケンシングのための核酸における各ヌクレオチドの特定を正確に決定するのに十分な感度の欠如(単一ヌクレオチド感度の欠如)、および(2)検出中にナノ細孔を通して各ヌクレオチドユニットの送出速度を制御する能力である。多くの研究グループが障害1に対処するためにナノ細孔を開発および改良しているが、酵素またはオブティクスの使用を伴わない障害2に対処する方法がなく、酵素またはオブティクスの使用は、特化されたナノ細孔技術においてのみ効果があり、純粋な電氣的方法と比較してより複雑かつコストが高い。

40

## 【発明の概要】

## 【0007】

一実施形態において、上部チャンバ、中間チャンバおよび下部チャンバを備える装置であって、前記上部チャンバは第1の細孔を通して前記中間チャンバと連通し、前記中間チャンバは第2の細孔を通して前記下部チャンバと連通し、前記第1の細孔および第2の細孔は直径約1nm~約100nmであり、互いから約10nm~約1000nm離れており、前記チャンバのそれぞれは、電源に接続するための電極を備える、装置が提供される。

## 【0008】

一の態様において、第1のおよび第2の細孔は実質的に同軸である。

50

## 【0009】

一の態様において、この装置は、ケイ素、窒化ケイ素、二酸化ケイ素、グラフェン、カーボンナノチューブ、 $TiO_2$ 、 $HfO_2$ 、 $Al_2O_3$ 、金属層、ガラス、生体ナノ細孔、生体細孔挿入物を備える膜、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される材料を含む。

## 【0010】

一の態様において、前記第1の細孔および前記第2の細孔は深さ約0.3nm～約100nmである。

## 【0011】

一の態様において、前記電源は、前記上部チャンバと前記中間チャンバとの間に第1の電圧と、前記中間チャンバと前記下部チャンバとの間に第2の電圧と、を提供するように構成され、前記第1の電圧および前記第2の電圧は独立して調節可能である。

## 【0012】

一の態様において、この電源は、前記第1の電圧および第2の電圧のそれぞれを生成するために電圧クランプシステムまたはパッチクランプシステムを備える。一の態様において、この中間チャンバは前記2つの電圧に対して接地するように調節される。一の態様において、この中間チャンバは、この中間チャンバ内の前記細孔のそれぞれと前記電極との間に伝導性を提供するための媒体を備える。

## 【0013】

いくつかの態様において、この電源（例えば電圧クランプシステムまたはパッチクランプシステム）は更に、前記細孔のそれぞれを通して前記イオン電流を測定するように構成される。

## 【0014】

別の実施形態は、上部チャンバ、中間チャンバおよび下部チャンバを備える装置であって、前記上部チャンバは、第1の細孔を通して前記中間チャンバと連通し、前記中間チャンバは第2の細孔を通して前記下部チャンバと連通し、前記第1の細孔および第2の細孔は直径約1nm～約100nmであり、互いから約10nm～約1000nm離れており、前記細孔のそれぞれに電圧を印加するために電圧クランプまたはパッチクランプシステムに接続して前記細孔のそれぞれを通してイオンを測定するための前記チャンバのそれぞれにある電極を備え、前記中間チャンバ内の前記電極は前記2つの電圧クランプまたはパッチクランプシステムの共通するアースに接続される、装置を提供する。

## 【0015】

更に、一実施形態において、細孔を通る荷電ポリマーの移動を制御する方法であって、（a）荷電ポリマーを含むサンプルを上記実施形態のいずれかに記載の装置の前記上部チャンバ、中間チャンバまたは下部チャンバの一つに装填するステップを備え、ここで、前記装置は前記上部チャンバと前記中間チャンバとの間の第1の電圧、ならびに前記中間チャンバと前記下部チャンバとの間の第2の電圧を提供するための電圧クランプまたはパッチクランプシステムに接続され、（b）前記ポリマーが前記チャンバ間を移動するように初期の第1の電圧および初期の第2の電圧を設定するステップを備え、これにより、前記第1の細孔および第2の細孔の両方に亘って前記ポリマーを配置し、（c）両方の電圧が前記荷電ポリマーを前記中間チャンバから引き離すための力を生成するように第1の電圧および第2の電圧を調節するステップを備え、ここで、前記荷電ポリマーが一方向にかつ制御された方法で両方の細孔に亘って移動するように前記2つの電圧は制御された条件下で強度が異なる、方法が提供される。

## 【0016】

一の態様において、送出手の制御された方法は、第1のもしくは第2の電圧または両方の電圧のアクティブ制御またはフィードバック制御によって設定され、そのいずれかまたは両方が第1のもしくは第2のイオン電流測定または両方のイオン電流測定のフィードバック関数としてである。非限定的な実施例は、第2の電圧を一定に維持し、いずれかの方向に荷電ポリマーの設定されたコントロールド・デリバリーに対して第1の電圧のフィード

10

20

30

40

50

バックまたはアクティブ制御のためのフィードバックとして第 2 のイオン電流を使用することを含む。従って、一の態様において、第 1 の電圧は第 2 の細孔にて測定されたイオン電流に基づき調節される。

【 0 0 1 7 】

一の態様において、このサンプルは前記上部チャンバ内に装填され、前記初期の第 1 の電圧は前記荷電ポリマーを前記上部チャンバから前記中間チャンバへ引っ張るように設定され、前記初期の第 2 の電圧は前記荷電ポリマーを前記中間チャンバから前記下部チャンバへ引っ張るように設定される。

【 0 0 1 8 】

別の態様において、前記サンプルは前記中間チャンバ内に装填され、前記初期の第 1 の電圧は前記荷電ポリマーを前記中間チャンバから前記上部チャンバへ引っ張るように設定され、前記初期の第 2 の電圧は前記荷電ポリマーを前記中間チャンバから前記下部チャンバへ引っ張るように設定される。

【 0 0 1 9 】

一の態様において、この荷電ポリマーは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。一の態様において、この荷電ポリマーはポリヌクレオチドであり、例えば、ポリヌクレオチドは、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、二本鎖 RNA、一本鎖 RNA、および DNA - RNA 混成物である（これらに限定されない）。

【 0 0 2 0 】

一の態様において、ステップ (c) における前記調節された第 1 の電圧および第 2 の電圧は、前記 2 つの電圧間の強度の相違よりも約 10 倍～約 10,000 倍高い。

【 0 0 2 1 】

一の態様において、この方法は更に、前記ポリマーのモノマー単位を特定するステップを更に備え、これは前記モノマー単位が前記細孔の一つを通過するとき当該細孔に亘るイオン電流を測定することによってなされる。一の態様において、このモノマー単位はヌクレオチドである。別の態様において、このモノマー単位はヌクレオチド対である。いくつかの態様において、単一ヌクレオチドおよびヌクレオチド対は、一の分子において検出され得る。例えば、係る分子は、より長いポリヌクレオチドあるいは一本鎖ポリヌクレオチドにおいて二重部位を有することができ、この二重部位は、ワトソン・クリックの相補的塩基対合によって部分的または完全に形成される。

【 0 0 2 2 】

一の態様において、このモノマーは、DNA 結合タンパクまたはナノ粒子といった分子に結合される。DNA 結合タンパクの非限定的な例は、RecA および配列特異的な DNA 結合タンパクを含む（例えば、ラムダファージ・リプレッサー、NF-B および p53）。ナノ粒子の非限定的な例は、量子ドットおよび蛍光標識を含む。

【 0 0 2 3 】

一の態様において、このポリマーはその一端部でビード (bead) といった固体支持体に接合される。

【 0 0 2 4 】

更に別の実施形態は、ポリヌクレオチドのシーケンスを決定するための方法であって、(a) ポリヌクレオチドを含むサンプルを上記実施形態のいずれかに記載の前記装置の前記上部チャンバ内に装填するステップを備え、前記装置は前記上部チャンバと前記中間チャンバとの間の第 1 の電圧、ならびに前記中間チャンバと前記下部チャンバとの間の第 2 の電圧を提供するための電圧クランプまたはパッチクランプシステムに接続され、前記ポリヌクレオチドは当該ポリヌクレオチドの一端にて固体支持体に任意に接着され、(b) 前記ポリヌクレオチドが前記上部チャンバから前記中間チャンバへおよび前記中間チャンバから前記下部チャンバへ移動するように初期の第 1 の電圧および初期の第 2 の電圧を設定するステップを備え、これにより、前記第 1 の細孔および第 2 の細孔の両方に亘って前記ポリマーを配置し、(c) 両方の電圧が前記ポリヌクレオチドを前記中間チャンバから引き離すための力を生成するように第 1 の電圧および第 2 の電圧を調節するステ

10

20

30

40

50

ップを備え、ここで、前記ポリヌクレオチドが一方向にかつ制御された方法で両方の細孔に亘って移動するように前記2つの電圧は制御された条件下で強度が異なり、(d) 前記細孔の一方を通る前記ポリヌクレオチドの各ヌクレオチドを特定するステップを更に備え、これは前記ヌクレオチドが当該細孔を通過するときに当該細孔に亘るイオン電流を測定することによってなされる、方法を提供する。

【0025】

添付の図面は例示のみを目的として実施形態を記載している。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1(I)】図1(I)は、2細孔(デュアル細孔)装置を記載している。図1(I)は、独立した電圧制御( $V_1$ ,  $V_2$ )および各細孔の電流測定( $I_1$ ,  $I_2$ )のためのデュアル細孔チップおよびデュアル増幅器電子構成の概略図である。チャンバ(A~C)は共通する細孔を除き容量に関して分離されている。実現可能なチップパラメータは細孔の内部距離が10~500nmであり、膜厚0.3~50nm, および細孔直径1~100nmである。

10

【図1(II)】図1(II)は、2細孔(デュアル細孔)装置を記載している。図1(II)において、電氣的に $V_1$ および $V_2$ は、 $I_1$ および $I_2$ を効果的に減結合するために全てのアクセス抵抗を最小限にする装置を構成することによって、原則的に各ナノ細孔抵抗全体に亘る。

【図1(III)】図1(III)は、2細孔(デュアル細孔)装置を記載している。図1(III)では、競合電圧が制御用に使用される(青い矢印が各電圧の力の方向を示す)。細孔が同一の電圧・力影響を備えてかつ $|V_1| = |V_2| + V$ を用いると仮定すると、値 $V > 0$  ( $< 0$ )は $V_1$  ( $V_2$ )方向において調整可能な動きのために調節される。実際には、各細孔での電圧誘起による力は $V_1 = V_2$ に一致しないが、キャリブレーション実験は、所定の2細孔チップのための同等の牽引力となる必要とされる電圧バイアスを特定することができ、そのバイアス周辺のバリエーションは方向制御のために使用することができる。

20

【0027】

【図2】図2は、流体アクセスおよびサンプル装填(load ing)のために開口部をそれぞれ有するチャンバA, チャンバBおよびチャンバCを有する2細孔ハウジング装置の外面図である。デュアル細孔チップは、ハウジング装置の各部分の各ガスケット部を備える2つのガスケット間に配置され、これら2つの部分はチップ周辺のハウジングを開閉するためにヒンジ(中間上部)を中心に回転する。

30

【0028】

図のいくつかまたは全ては例示的な概略図であり、図示された要素の実際の相対的サイズまたは位置を表しているわけではない。これらの図は一または複数の実施形態を示す目的で表されており、後述の特許請求の範囲または請求項の意味を限定するために用いられるものではないことは容易に理解されよう。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本願全体を通して、その記載内容は本発明の装置および方法の様々な実施形態を参照する。説明する様々な実施形態は様々な説明上の例を提供するものとして意図し、種発明を記載するものとして理解されるべきではない。様々な実施形態の説明は本明細書においてその範囲が重複し得ることに留意されたい。本明細書において記載された実施形態は単に例示的なものであり、本発明の範囲を限定することを意図していない。

40

【0030】

更に、本明細書の全体を通して、様々な文献、特許および公開公報が引用によって参照される。これらの文献、特許および公開公報の開示内容は本発明に関する技術を完全に記載するために本明細書に参照により組み込まれる。

【0031】

50

明細書および特許請求の範囲に使用される、単数「a」,「an」および「the」は文脈から明確である場合を除き、複数も含む。例えば、用語「an 電極」は複数の電極も含む。

#### 【0032】

本明細書において使用される用語「備える・含む」は装置および方法が、記載された部品またはステップを含むが他のものを排除するものではない。「から実質的になる」は、装置および方法を特定するのに使用される場合、その組み合わせに対して本質的な意義を有する他の部品またはステップを排除することを意味する。「のみからなる」は、他の部品またはステップを排除することを意味する。これらの移行用語のそれぞれによって定義された実施形態は本発明の範囲内である。

10

#### 【0033】

全ての数字表示、例えば、距離、サイズ、温度、時間、電圧および濃度（範囲を含む）は、0.1単位でプラスまたはマイナスに変化する近似値である。必ずしも明確には記載していないが、全ての数字表示は「約」という文言が前に付くと理解されたい。更に、必ずしも明確には記載していないが、本明細書において記載された部品は単に例であり、係る均等物も当該技術分野において知られている。

2細孔装置 (Two-Pore Device)

#### 【0034】

本発明の一実施形態は、2細孔装置を提供する。この装置は、3つのチャンバと、これらのチャンバ間の流体連通を可能にする2つの細孔とを含む。更に、各チャンバは別個の電圧をチャンバ間の各細孔に設定することができるよう電源に接続するための電極を含む。

20

#### 【0035】

本発明の一実施形態によると、上部チャンバ、中間チャンバおよび下部チャンバを備える装置が提供され、上部チャンバは第1の細孔を通して中間チャンバと連通し、中間チャンバは第2の細孔を通して下部チャンバと連通し、第1の細孔および第2の細孔は直径約1nm~約100nmであり、互いから約10nm~約1000nm離れており、更に、各チャンバは電源に接続するための電極を備える。

#### 【0036】

図1(1)を参照すると、この装置は上部チャンバ(チャンバA)、中間チャンバ(チャンバB)、および下部チャンバ(チャンバC)を含む。このチャンバは、別個の細孔(111および112)をそれぞれ有する2つの別個の層または膜(101および102)によって分離される。更に、各チャンバは電源に接続するために電極(121, 122および123)を有する。上部、中間および下部チャンバの表示は相対的な文言であり、例えば、上部チャンバが地面に対して中間または下部チャンバの上にあることを意味し、その逆も然りであることは明らかである。

30

#### 【0037】

各細孔(111および112)は大小の分子または微生物が通過できるサイズを独立して有する。一の態様において、各細孔は少なくとも直径約1nmである。あるいは、各細孔は少なくとも直径約2nm, 3nm, 4nm, 5nm, 6nm, 7nm, 8nm, 9nm, 10nm, 11nm, 12nm, 13nm, 14nm, 15nm, 16nm, 17nm, 18nm, 19nm, 20nm, 25nm, 30nm, 35nm, 40nm, 45nm, 50nm, 60nm, 70nm, 80nm, 90nmまたは100nmである。

40

#### 【0038】

一の態様において、この細孔は直径約100nm以下である。あるいは、この細孔は直径約95nm, 90nm, 85nm, 80nm, 75nm, 70nm, 65nm, 60nm, 55nm, 50nm, 45nm, 40nm, 35nm, 30nm, 25nm, 20nm, 15nmまたは10nm以下である。

#### 【0039】

一の態様において、この細孔は直径が約1nm~約100nmの間、または約2nm~

50



約 80 nm の間、または約 3 nm ~ 約 70 nm の間、または約 4 nm ~ 約 60 nm の間、または約 5 nm ~ 約 50 nm の間、または約 10 nm ~ 約 40 nm の間、または約 15 nm ~ 約 30 nm の間である。

【0040】

いくつかの態様において、細孔は実質的に円形を有する。本明細書において使用される「実質的に円形」は少なくとも約 80 または 90 % の円筒形を指す。いくつかの実施形態において、細孔は方形、矩形、三角形、楕円または六角形である。

【0041】

各細孔 (111 および 112) はある深さを独立して有する。一の態様において、各細孔は深さが少なくとも約 0.3 nm である。あるいは、各細孔は深さが少なくとも約 0.6 nm, 1 nm, 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 11 nm, 12 nm, 13 nm, 14 nm, 15 nm, 16 nm, 17 nm, 18 nm, 19 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, または 90 nm である。

10

【0042】

一の態様において、各細孔は深さが約 100 nm 以下である。あるいは、深さは約 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 25 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm, 50 nm, 45 nm, 40 nm, 35 nm, 30 nm, 25 nm, 20 nm, 15 または 10 nm 以下である。

【0043】

一の態様において、この細孔は深さが約 1 nm ~ 約 100 nm の間であり、または約 2 nm ~ 約 80 nm の間であり、約 3 nm ~ 約 70 nm の間であり、または約 4 nm ~ 約 60 nm の間であり、約 5 nm ~ 約 50 nm の間であり、または約 10 nm ~ 約 40 nm の間であり、または約 15 nm ~ 約 30 nm の間である。

20

【0044】

一の態様において、この細孔は距離が約 10 nm ~ 約 1000 nm の間の分だけ離れている。一の態様において、この距離は少なくとも約 10 nm, または少なくとも約 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 150 nm, 200 nm, 250 nm, または 300 nm である。別の態様において、この距離は約 1000 nm, 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, または 100 nm 以下である。更に別の態様において、この距離は、約 20 nm ~ 約 800 nm の間か、約 30 nm ~ 約 700 nm の間か、約 40 nm ~ 約 500 nm の間か、約 50 nm ~ 約 300 nm の間である。

30

【0045】

これら 2 つの細孔はチャンバ間の流体連通を可能にする限り任意の位置に配置されることができ、所定の大きさを有し、かつそれらの間に所定の距離を有する。一の態様において、この細孔は、それらの間に直接障害物がないように配置される。更に、一の態様において、これらの細孔は実質的には図 1 (1) に示されるように同軸である。

【0046】

一の態様において、この装置はチャンバ内の電極を通して一または複数の電源に接続される。いくつかの態様において、この電源は各細孔に電圧を供給するための電圧クランプまたはパッチクランプを備え、これは各細孔を通して電流を独立して測定することもできる。この点に関して、この電源は中間チャンバを両方の電圧源のための共通の接地 (アース) に設定する。一の態様において、この電源は、上部チャンバ (例えば、図 1 (1) におけるチャンバ A) と中間チャンバ (例えば、図 1 (1) におけるチャンバ B) の間の第 1 の電圧を提供し、かつ中間チャンバと下部チャンバ (例えば、図 1 (1) におけるチャンバ C) との間の第 2 の電圧を提供するように構成される。

40

【0047】

いくつかの態様において、第 1 の電圧および第 2 の電圧は独立して調節可能である。一

50

の態様において、中間チャンバは2つの電圧に関して接地されるように調節される（図1（I～III）に図示される）。一の態様において、中間チャンバは、各細孔と中間チャンバ内の電極との間に導電性を提供するための媒体を備える。一の態様において、中間チャンバは、各細孔と中間チャンバ内の電極との間に抵抗を提供するための媒体を備える。係る抵抗をナノ細孔抵抗に対して十分に小さく保つことは細孔において2つの電圧および電流を減結合するのに有用であり、このことは電圧の独立した調節にとって有用である。

#### 【0048】

電圧の調節は、チャンバ内の荷電された粒子の移動を制御するために使用されることができる。例えば、両方の電圧が同じ方向に設定された場合、適切に荷電された粒子が上部チャンバから中間チャンバおよび下部チャンバに移動され、または逆方向に順に移動されることができ、そこに保持される。

#### 【0049】

この装置内の電圧の調節は、同時に両方の細孔をまたぐのに十分な長さの巨大分子（例えば荷電ポリマー）の動きを制御するのに特に有用である。係る態様において、分子の動きおよび分子の動きの速度が電圧の相対強度および方向によって制御されることができ、これは更に後述する。

#### 【0050】

この装置は、液体サンプル（特に生体サンプル）を保持するために適切な材料を保持し、および/またはナノファブリケーションのために適切な材料を保持することができる。一の態様において、係る材料は誘電材料（例えば、ケイ素、窒化ケイ素、二酸化ケイ素、グラフェン、カーボンナノチューブ、 $TiO_2$ 、 $HfO_2$ 、 $Al_2O_3$ 、または他の金属層、またはこれらの材料の任意の組み合わせ（しかしこれらに限定されない）を含む。グラフェンの単一シートは、厚さ0.3 nmの膜を形成し、例えば細孔を有する膜として使用されることができる。

#### 【0051】

マイクロ流体に関し、かつ2細孔マイクロ流体チップの構成を有する装置は、様々な手段および方法によって作られることができる。2つの平行する膜を備えるマイクロ流体チップにとって、両方の膜は単一のビームによって同時に穿孔されることができ、2つの同心の細孔を形成する（但し、この膜の各側部に異なるビームを用いることも任意の適切な配置技術と共に可能である）。大まかにいえば、ハウジングはチャンバA～Cの密封した分離状態を確実にする。一の態様において、このハウジングは、電圧電極（2源および1接地）とナノ細孔との間の抵抗に最小限のアクセスを提供し、各電圧は各細孔に主に印加されることを確実にする。

#### 【0052】

一の態様において、図2は、別の実施形態の装置の外観を示す。図2において、この装置は、スパーサーによって接続される2つの平行な膜からなるマイクロ流体チップ（「2核チップ（dual-core chip）」と称される）を含む。各膜は、この膜の中心を通る単一ビームによって穿孔された細孔（図示せず）を含む。更に、この装置はこのチップのためのテフロン（登録商標）ハウジングを好ましくは有する。このハウジングはチャンバA～Cの密封された分離状態を確実にし、電解質のための抵抗への最小限のアクセスを提供し、各電圧が各細孔に主に印加されることを確実にする。

#### 【0053】

より具体的には、細孔を有する膜は、厚さ5～100 nmのケイ素、窒化ケイ素、または二酸化ケイ素ウィンドウを備えるTEM（透過電子顕微鏡法）グリッドで作られることができる。スパーサーはこの膜を分離するために使用されることができ、これは、絶縁体（SU-8、フォトレジスト、PECVD酸化物、ALD酸化物、ALDアルミナ）または蒸着金属（Ag、Au、Pt）材料を用い、かつ、これらの膜間のチャンバBの他の含水部分内の小さい体積を占領することによってなされる。ホルダーは、チャンバBの最も大きい体積部分を備える水性槽に着座される。チャンバAおよびCは、（低アクセス抵抗

10

20

30

40

50

のための)膜シールに導くより大きなチャネルによってアクセス可能である。

【0054】

集中された電子またはイオンビームは膜を通して細孔を穿孔し、それらを自然に整合させるために使用されることができる。これらの細孔は正確なビーム焦点を各層に印加することによってより小さなサイズに形成(縮小)することもできる。任意の単体のナノ細孔穿孔方法は2つの膜内に1対の細孔を穿孔するために使用されることができ、所定の方法によって可能な穿孔深さおよび膜の厚さを考慮に入れる。膜厚を更に洗練するために、マイクロ細孔を所定の深さに予備穿孔し、膜の残りを貫通するナノ細孔を作ることにも可能である。

【0055】

別の態様において、ハイブリッド細孔を形成するために個体のナノ細孔内に生体ナノ細孔を挿入することを、2細孔方法において片方のナノ細孔または両方のナノ細孔において用いることができる(ホール他、Nat. Nanotech., 5(12):874-7, 2010)。生体細孔はイオン電流測定感度を増し、一本鎖ポリヌクレオチドが(例えばシーケンシングのために)2細孔装置(デバイス)において捕捉され制御されるべき場合に有用である。

【0056】

2細孔装置での分子の動きの制御

この装置の細孔に存在する電圧により、荷電された分子をチャンバ間の細孔を通して移動することができる。移動の速度および方向は、電圧の強度および方向によって制御することができる。更に、2つの電圧のそれぞれを独立して調節することができるため、荷電された分子の移動および速度を各チャンバにおいて細かく制御することができる。

【0057】

例えば、この装置は、制御された状態で2つの正に荷電された分子を混ぜるために使用されることができる。このために、第1の分子が上部チャンバに最初に装填され、第2の分子が下部チャンバに装填される。第1のポートにおける第1の電圧は、上部チャンバから中間チャンバ内に第1の分子の移動を誘発する。同様に、第1の電圧の方向とは反対の方向への第2の電圧は、下部チャンバから中間チャンバ内への第2の分子の移動を誘発することができる。電圧が反対方向であることによって、両方の分子が互いに反応するように中間チャンバ内に保持される。更に、電圧の相対強度を調節することによって、各分子の流入速度が微調整され、制御反応に導く。

【0058】

別の例は、両方の細孔の深さにこれら2つの細孔間の距離を加算して組み合わせた距離よりも長い長さを有する荷電ポリマー(例えばポリヌクレオチド)に関する。例えば、1000bp(塩基対)dsDNA(二本鎖DNA)は、長さ340nmであり、20nmだけ離れた長さ10nmの2つの細孔によって及び40nmよりも実質的に長い。第1のステップにおいて、ポリヌクレオチドは上部チャンバまたは下部チャンバのいずれかに装填される。生理的条件(~pH7.4)の下でその負電荷によって、電圧が印加された細孔をまたいでポリヌクレオチドを移動することができる。従って、第2のステップにおいて、同じ方向および同じもしくは類似する強度の2つの電圧が細孔に印加され、両方の細孔に亘るポリヌクレオチドの移動を順に誘発する。

【0059】

ポリヌクレオチドが第2の細孔に到達する頃、これらの電圧のうち一または両方を変化することができる。このポリヌクレオチドは両方の細孔をカバーする距離よりも長いので、このポリヌクレオチドが第2の細孔に到達するときには第1の細孔内にもある。従って、第1の細孔での電圧の方向の急速な変化は、ポリヌクレオチドを引っ張り第2の細孔から離す力を生成する(図1(III))。

【0060】

この時点で、第1の細孔での電圧誘起による力が第2の細孔での電圧誘起による力よりも小さい場合、このポリヌクレオチドは第2の細孔に向かって両方の細孔にまたがること

10

20

30

40

50

を続けるが、より低速にである。これに関し、ポリヌクレオチドの移動の速度および方向は両方の電圧の方向および強度によって制御されることができる。更に後述するように、係る移動の微調整は幅広い用途を有すると理解されたい。

#### 【0061】

従って、一の態様において、細孔を通しての荷電ポリマーの移動を制御する方法が提供される。この方法は (a) 上記実施形態のいずれかの上部チャンバ、中間チャンバまたは下部チャンバのうち一つにおいて荷電ポリマーを備えるサンプルを装填するステップを備え、ここで、この装置は上部チャンバと中間チャンバとの間の第1の電圧、および中間チャンバと下部チャンバとの間の第2の電圧を供給するための電源に接続され、(b) ポリマーがチャンバ間を移動するように初期の第1の電圧および初期の第2の電圧を設定するステップを備え、これにより第1のおよび第2の細孔に亘ってポリマーを所在させ、(c) 両方の電圧がこの荷電されたポリマーを引っ張り、中間チャンバから離す力を生成するように (電圧 - 競合モード)、第1の電圧および第2の電圧を調節するステップを備え、ここで、荷電ポリマーがいずれかの方向および制御された状態にて両方の細孔に亘って移動するようにこれら2つの電圧は制御状態の下、異なる強度である。

#### 【0062】

ステップ(c)における電圧 - 競合モードを設定する目的のために、各細孔における各電圧によって生じる相対力は、使用される各2細孔装置のために決定されるべきであり、これはキャリブレーション実験を伴うことで、ポリヌクレオチドの動きに対する異なる電圧値の影響を観察することによってなされる (移動はポリヌクレオチドにおける位置が分かた検出可能 (detectable) な特徴を検知 (sensing) することによって測定されることができ、係る特徴の例は後述する)。力が各共通の電圧に等しい場合、例えば、(接地された中間チャンバに比して上部および下部チャンバ内の共通する極性を備える) 各細孔での同じ電圧値を使用することで、熱運動なしにゼロ・ネット移動が生じる (ブラウン運動の存在および影響は後述する)。この力が各共通電圧にて等しくない場合、等しい力を達成することは、共通の電圧にてより小さい力を受ける細孔でのより大きな電圧の特定および使用を必要とする。電圧 - 競合モードのためのキャリブレーションが各2細孔装置のために必要とされ、かつ特定の荷電ポリマーまたは分子 (各細孔を通る特徴が力に影響するもの) のために必要とされる。

#### 【0063】

一の態様において、サンプル (試料) が上部チャンバ内に装填され、初期の第1の電圧が荷電ポリマーを上部チャンバから中間チャンバに引っ張るように設定され、初期の第2の電圧はポリマーを中間チャンバから下部チャンバに引っ張るように設定される。同様に、サンプルは最初に下部チャンバ内に装填されることができる。

#### 【0064】

別の態様において、サンプルは中間チャンバ内に装填され、最初の第1の電圧は荷電ポリマーを中間チャンバから上部チャンバに引っ張るように設定され、最初の第2の電圧は荷電ポリマーを中間チャンバから下部チャンバに引っ張るように設定される。

#### 【0065】

いくつかの態様において、荷電ポリマーはポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。特定の態様において、荷電ポリマーはポリヌクレオチドである。非限定的なポリヌクレオチドの例は、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、およびDNA-RNAハイブリッドを含む。

#### 【0066】

一の態様において、ステップ(c)にて調節された第1の電圧および第2の電圧は、これら2つの電圧間の差と同程度に強度が高い約10倍~約10,000倍である。例えば、これらの2つの電圧はそれぞれ90mVおよび100mVである。電圧の強度 (~100mV) はそれら (10mV) の間の差の約10倍である。いくつかの態様において、電圧の強度はそれらの間の差と同程度に高く少なくとも約1.5倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、5.0倍、10.0倍、15.0倍、20.0倍、25.0倍、30.0倍、40

10

20

30

40

50

0 倍, 5 0 0 倍, 1 0 0 0 倍, 2 0 0 0 倍, 3 0 0 0 倍, 4 0 0 0 倍, 5 0 0 0 倍, 6 0 0 0 倍, 7 0 0 0 倍, 8 0 0 0 倍または9 0 0 0 倍である。いくつかの態様において、電圧の強度は、電圧の強度はそれらの間の差と同程度に約1 0 0 0 0 倍, 9 0 0 0 倍, 8 0 0 0 倍, 7 0 0 0 倍, 6 0 0 0 倍, 5 0 0 0 倍, 4 0 0 0 倍, 3 0 0 0 倍, 2 0 0 0 倍, 1 0 0 0 倍, 5 0 0 倍, 4 0 0 倍, 3 0 0 倍, 2 0 0 倍, または1 0 0 倍以下である。

#### 【0067】

一の態様において、ステップ(c)にて第1の電圧および第2の電圧のリアルタイム調節またはオンライン調節が行われ、これは、専用ハードウェアおよびソフトウェアを用いて数百メガヘルツまでのクロックレートにてアクティブ制御またはフィードバック制御によって行われる。第1の電圧もしくは第2の電圧または両方の電圧の自動化された制御は第1のイオン電流もしくは第2のイオン電流または両方のイオン電流測定のフィードバックに基づく。

10

#### 2 細孔装置を使用した分子の分析

#### 【0068】

本願の2細孔装置は、細孔に印加された制御電圧によってこの装置内を動くかこの装置内に保持される分子または粒子の分析を行うために用いられることができる。一の態様において、この分析は細孔のいずれかまたは両方にて行われる。各電圧クランプまたはパッチクランプシステムは各細孔を通るイオン電流を測定し、この測定された電流は、通過する荷電された粒子または分子の存在を検出するのに使用され、または通過する荷電された粒子または分子に関連する特徴を検出するのに使用される。

20

#### 【0069】

上記の様に、ポリヌクレオチドは同じ方向を有する2つの電圧によって両方の細孔内に装填されることができる。この例において、一旦、第1の細孔に印加された電圧の方向が反転され、新たな電圧誘起による力の強度が第2の細孔に印加された電圧誘起による力よりも僅かに小さくなると、ポリヌクレオチドは同じ方向への移動を継続するが、著しく低い速度にてである。これに関し、第2の細孔に電圧を供給する増幅器も第2の細孔を通過する電流を測定し、次にイオン電流は、各異なるヌクレオチドの通過が(例えば、イオン電流振幅における移行に基づく)異なる電流界シグナチャーを引き起こすため、細孔を通過するヌクレオチドの特定をする。従って、ポリヌクレオチドにおける各ヌクレオチドの特定はポリヌクレオチドのシーケンスを明らかにする。

30

#### 【0070】

いくつかの態様において、ポリヌクレオチドを再シーケンシングするための繰り返しのコントロールド・デリバリーはシーケンシングの質を更に改善する。各電圧は、各方向においてコントロールド・デリバリーのためにより大きくなりながら極性が反転される。更に、2つの細孔を通る2つの電流が、正確性の改善に関係づけられると考えられる。ブラウン運動は分子の動きに変動を与えることができ、分子のコントロールド・デリバリーに影響を与えることが考えられる。しかしながら、係る影響は、例えば、DNAシーケンシング中に、DNAの繰り返しのコントロールド・デリバリーによって、およびシーケンシング測定値を平均化することによって最小限にするか、または避けることができる。更に、巨大分子(例えばポリヌクレオチドおよびポリペプチド)の制御された動きへのブラウン運動のインパクトは、特に競合力が巨大分子を引っ張りこの分子内に張力を生成するときには取るに足らないと考えられる。

40

#### 【0071】

係る方法は、先行技術において解決されていない問題への解決策を提供する。

#### 【0072】

例えば、ナノ細孔シーケンシングに必要なコントロールド・デリバリーおよび正確な検知を達成するためには2つの矛盾する障害があることが知られている。一方は、十分なシーケンシング感度を提供するために細孔にて比較的高電圧が必要とされることである。他方において、高電圧によってポリヌクレオチドが細孔を速く通過することになり、各ヌクレオチドの特定のために十分な時間がなくなる。

50

## 【0073】

より具体的には、ナノ細孔シークエンシングのプラットフォームは、細孔を通過するポリヌクレオチドの速度が  $1 \text{ ms} / \text{ヌクレオチド (nt)}$  またはそれ以下に制御されることを要求する一方、なおシークエンス感応性電流を生成することを要求する。このことは電流シグナチャーを検出するために十分な高信号対雑音（高電圧がよい）を必要とするが、測定値が確実に記録帯域幅内にあるようにするために細孔を通る分子の動きが十分に遅いこと（低電圧がよい）を必要とする。単一細孔の態様において、ポリヌクレオチド速度は、電圧に比例し、よって電圧が高いほど、検知のために良いが、ポリヌクレオチド速度を低下させるためにはより悪くなる：速度はポリヌクレオチド捕捉を促進する電圧にて  $1 \mu \text{ s} / \text{nt}$  およびこれより速い（ $> 1000$  倍は速すぎる）。一方、電圧が低くなると検知性能を減じ、読み出しの正確性を害するブラウン運動によって引き起こされる速度変動の相対的な寄与度も増す。

10

## 【0074】

これらの障害に対処する方法のうち、特化したナノ細孔技術においてのみ作用する酵素または光学機器の使用を伴わない方法は、本明細書に記載したもの以外に現在存在しない。

## 【0075】

いくつかのアプローチが検出能力の欠如および低電圧に関する問題に対処するために提案されている。一つは、生体ナノ細孔の感度を向上させるためにこれらの生体ナノ細孔を作りかえることである。別のものは、グラフェン膜を使用するものであり、これは、単一シートとして  $\text{ssDNA}$ （単鎖DNA）においてヌクレオチド間の距離よりも薄い。更に別のものは、ナノ細孔に近接して測定された補助電流の使用である（例えば、トンネル電流）。

20

## 【0076】

生体ナノ細孔は、第1のアプローチにおいてテストされた。溶血素ナノ細孔は、研究において最も一般に使用される生体細孔である。研究結果は、溶血素が、ホモポリマー内の単一ヌクレオチド置換を解像し、あるいはさもなければ全てが核酸塩基であるDNAのなかの脱塩基（ $1'$ 、 $2'$ -ジデオキシ）残基を解像可能であることを示した。しかしながら、単一ヌクレオチド感度は、（イオン電流がチャネルにおいて  $\sim 10$  ヌクレオチドによって影響を受ける）野生形（WT）溶血素を用いた異種DNAにおいては可能ではない。溶血素のタンパク質工学はDNA分析およびシークエンシングに対するその感度を向上させるために使用されている。係る突然変異の細孔の1つは、4つのヌクレオチド  $5'$ -ーリン酸塩分子を高精度で識別することができる、共有結合された分子アダプター（クラーク他、Nat. Nanotech., 4(4): 265-70, 2009）を備える溶血素を使用する。しかしながら、この突然変異の細孔は、細孔を通過する完全な異種  $\text{ssDNA}$  をシークエンシングするための感度を有しないと思われる。

30

## 【0077】

別の例示的な生体細孔はMspAであり、これは、イオン電流の感度をチャネルの底に集中させる漏斗状の形状を有する。更に、MspAおよび溶血素を通過するDNAの速度の減少は、酵素を用いることによって達成することができる。（マンラノ他、Nature Biotechnology, 30: 349-53, 2012）の図1に示されるように、DNAの速度の減少はMspAナノ細孔上に位置する酵素によって達成される。しかしながら、このことは、非決定性の検知期間、引き返しによって引き起こされる繰り返しの読み出し、およびホモポリマー領域を検出することができないといった結果となる。phi29（ファイ29）ポリメラーゼ媒介性DNA変位の機構は、溶血素について（チャーフ他、Nat. Biotech., 30(4): 344-8, 2012）で開発され、より感度の高いMspAナノ細孔（マンラオ他、Nature Biotechnology, 30: 349-53, 2012）上で実施された。重合触媒された変位の段階的速度は  $2.5 \sim 40 \text{ nt/s}$  であり、DNA速度低下のための要件に合う。しかしながら、生体細孔上の酵素が変位の速度を低下させることができる一方、各ヌクレオチ

40

50

ドの滞留時間の制御を欠き、このことは繰り返しのブラインドトラッキングを非常に困難なものにするだろうし、単一ヌクレオチド読み出しの長い中止時間と区別することを困難にするだろう。感度に関し、(Manrao他、Nature Biotechnology, 30:349-53, 2012)の図3に示されるように、繰り返しのDNAテンプレートを読み出すことは、MspA上のファイ29によって達成することができる。図(3a)は、繰り返しのCATトリヌクレオチドからなるDNAテンプレートに対する追跡例を示し、このシーケンスの間には1つのCAGトリプレットという例外がある。  
 \*は、2つのレベル間の繰り返しの遷移(これは酵素に基づく制御方法に本来備わっており、読み出しエラーを引き起こす)として(人の分析によって)検出された「トグル(toggles)」を表す。図(3b)は(3a)の理想化も示し、公知のDNAシーケンスと合致するレベルの平均電流を備え、(3a)に示された測定された期間の差異を除く。理想化は、単一dG置換によって妨害された3つのレベルの繰り返しパターンを示す。4つのレベルは、置換の最も近くで最も大きな偏差を備えるように単一dGによって影響され、これは残留電流が~4ヌクレオチド程度で主に影響を受けることを示唆している。MspAを流れるイオン電流が開口に最も近接する~4ヌクレオチドによる影響をうけることは、シーケンスを特定するのに相当な複雑性を加える。当該技術において示唆されるように $4^4 = 256$ の組み合わせのそれぞれをマッピングする明確な電流振幅のライブラリを作ることが理想的であるが、係るライブラリは実現が困難である。その理由は、チャンネル電流の記録における特定ステップの遷移は、片振幅法を伴う少なくとも2の信号対雑音比(SNR)を必要とするからである(マルコフに基づく方法ではSNR 1.5)。記録帯域幅にて0.5 pAのRMS雑音を伴うと、振幅シフトは必要とされるSNRを有するために少なくとも1 pAでなければならず、MspAを用いて40 pAの振幅レンジ内で~40段の検出可能レベルのみ(またはSNR 1.5にて最大でも53段のレベル)という結果になる。更に、このレンジは一樣には利用されないだろうから、観察されるレベルは40段より少なくなり、更なるフィルタリングが雑音を減少して振幅弁別を加えることができるけれども、それは既に存在するより速いssDNA運動遷移をより多く失うという結果にもなる。

#### 【0078】

現在、核酸シーケンシングに対してイオン電流検出が単一ヌクレオチド感度を提供することができるナノ細孔はない。依然として、生体細孔および固体の細孔(グラフェン)の感度の改善は活発であり、継続中の研究分野である。問題の一つは、イオン電流検出が、ホモポリマー領域(塩基反復)の進行を直接的に追跡できないことである。なぜなら、細孔を通してホモポリマーssDNAが移動する際のヌクレオチド毎の信号が区別できないからである。反復を追跡することは必要不可欠である。というのも例えば、ヒトミトコンドリアDNA内の特定のモノヌクレオチド反復(7,9nt)の削除および挿入がいくつかの種類の癌に関与しているからである(サンチェス-セスベデス, 他、Cancer Research, 61(19):7015-7019, 2001)。生体細孔上の酵素は、変位の速度を低下させることができる一方、各ヌクレオチドの滞留時間の制御を欠く。他方では、2細孔制御による一定の送出速度を用いることで、偶発的な中断がなくなり、リピート長さ(反復長)の正確な推定をなしうる。何度もリピートセクションを再読み出しすることで推定誤りも向上し、誤り限界をも特定することができ、このことは酵素によってもたらされる重合化学を逆行させる必要なくなされうる。

#### 【0079】

最近の研究が示したことは、単一ナノ細孔では、速度の低下は単に電圧の低下のみによって是实现することができないということである(ルー他、Biophysical Journal, 101(1):70-9, 2011)。代わりに、電圧が減少されると、一本鎖DNA(ssDNA)の速度はよりランダムになる(引き返しを含む)。なぜなら、ブラウン運動の速度変動への寄与が大きくなるからである。研究はまた、ブラウン運動によって引き起こされる速度変動(この速度変動はさもないとシーケンシング測定を失敗させる)を抑制するために高電圧力が必要とされることも示し、これは理想化され

10

20

30

40

50

た単一ヌクレオチド感応性ナノ細孔センサーを用いた場合でさえもである。

【0080】

本願において提供される、2細孔装置に基づくこのシーケンシング方法は、これらの問題への解決策を提供し、既存の方法に対する付加的な利点を提供する。シーケンシングのために十分な感度を有する1つまたは2つの細孔と連携して、高電圧または低電圧におけるこの2細孔制御は、単一ナノ細孔態様のシーケンシング速度制御の問題を解決する。係る細孔には固体の基板に内蔵された生体細孔、固体の基板全体に形成された膜における生体細孔、または固体の細孔（例えば、グラフェン、ケイ素、または他の基板において）が含まれる。一の態様において、MspAといった生体細孔上のファイ29といった酵素を一または両方の細孔にて使用することができ、これには、シーケンシングのための大信号を生成するのに使用される高電圧、および、各細孔上の適所に酵素を保持し重合触媒されたDNA移動を可能にするのに十分な、各酵素に力を生成する作動電圧（但しその酵素を失速させるか解離させるほど大きくはない）を伴う。係る構成は、測定信号を著しく増大させ、2細孔が同時にDNAの1ストランドを読み出すことを可能にすることによって、チャーフ他（Nat. Biotech., 30(4):344-8, 2012 およびマンラオ他、Nature Biotechnology, 30:349-53, 2012）における方法を改善することができる。

10

【0081】

更に、本願に開示された方法は、イオン電流検出を用いた細孔における検出感度を保証するために十分高い電圧を細孔にて生成することができる。高電圧は、各細孔を一定速度で通過することを保証するのに十分なほど、ブラウン運動を抑制し、各細孔の外側のDNAの構成がどちらかの方向へのDNAの移動のエネルギー特性に影響すると考えられる。更に、この方法（図1（III））において用いられる電圧競合は、分子が分析に十分な時間を細孔にて過ごすように調節されることができ。更に、本方法は、酵素、光学部品、またはDNAのアタッチメントの必要性がない。従って、この方法は、分子送出速度を規制しつつ、ナノ細孔を通る高SN比の検出電流を提供し、これは単一ナノ細孔態様では不可能な能力である。

20

【0082】

この方法は荷電ポリマーにおけるモノマーの組成を特定するのに使用されることができ。一の態様において、モノマー単位はポリマーが単鎖のDNAまたはRNAである場合にヌクレオチドである。別の態様において、モノマーユニットはポリマーが二重鎖である場合にヌクレオチド対であり得る。

30

【0083】

一の態様において、この方法は、特に結合した分子が荷電される場合に、ポリマーへの修飾（例えばモノマーへの分子結合）を特定するのに使用されることができ。結合分子は電荷されなくてもよいが、中性分子はそのサイズによってイオン電流を変化させることができる。

【0084】

別の態様において、この修飾はポリマーに対する分子の結合を含む。例えば、DNA分子のために、結合分子はDNA結合タンパク（例えばRecA, NF- およびp53）であり得る。更に別の態様において、この修飾は特定のモノマーまたはフラグメントに結合する粒子である。例えば、遺伝子型決定またはDNAマッピングの目的のために特定のDNA箇所に結合された量子ドットまたは蛍光標識がこの装置によって検出されることができ。従って、本願に開示された装置は、遺伝子型決定およびDNAマッピングの廉価な方法も提供する（これらに限定されない）。

40

【0085】

一の態様において、ポリマーがその一端部でビード（bead）といった固体支持体に接合される。

【0086】

一実施形態において、ポリヌクレオチドのシーケンスを決定する方法を提供し、この

50



方法は、(a)上記実施形態のいずれかの装置の上部チャンバにおいてポリヌクレオチドを含むサンプルを装填するステップを含み、ここで、この装置は上部チャンバと中間チャンバとの間の第1の電圧と、中間チャンバと下部チャンバとの間の第2の電圧とを提供する電源に接続され、このポリヌクレオチドはポリヌクレオチドの一端で固体支持体に任意に接合され、(b)ポリヌクレオチドが上部チャンバから中間チャンバおよび中間チャンバから下部チャンバに移動するように、初期の第1の電圧および初期の第2の電圧を設定するステップを備え、これにより、前記第1の細孔および第2の細孔の両方に亘って前記ポリマーを配置し、(c)両方の電圧が前記荷電ポリマーを前記中間チャンバから引き離すための力を生成するように第1の電圧および第2の電圧を調節するステップを備え、前記ポリヌクレオチドが一方向にかつ制御された方法で両方の細孔に亘って移動するように前記2つの電圧は制御された条件下で強度が異なり、(d)前記ヌクレオチドが細孔を通過するときに前記細孔のうちいずれかのイオン電流を測定することによって、当該細孔を通過するポリヌクレオチドの各ヌクレオチドを特定するステップを備える。

10

実施例

【0087】

本技術は、以下の実施例を参照して更に定義される。系および方法に対する多くの変更が本発明の範囲を逸脱せずに行われ得ることは当業者には明らかであろう。

【0088】

実施例1．細孔内の個別のdsDNA分子の捕捉および制御

この実施例は、2細孔装置において各細孔内へのDNAの捕捉が、測定された各独立したイオン細孔電流の変化として容易に検出されることを示す。

20

【0089】

この実施例は、一端に接着されたビードを伴うdsDNAおよびこれを伴わないdsDNAを用いてデュアル細孔捕捉を実証する。ビードに連結されたssDNAを用いた実験も詳しく探り得る。

【0090】

DNAの捕捉および失速の際、ビードに最も近い細孔電圧( $V_1$ ，図1(I)(チャンバAからの捕捉の場合))は、当該DNAに働く競合力がこれをチャンバAに向かって引き戻すまで反転され、増大される。いずれかの細孔のイオン電流は、実験の間、当該DNAの捕捉および退出を容易に検出する。

30

【0091】

ビードが使用される際、このビードは細孔のいずれかまたは両方を通過することができない適切なサイズを有する。ビード対DNAが1対1であることを確実にする方法は、当該技術分野にて開発されてきた。例えば、ビオチン化DNA重複部位(またはssDNA)に共役する一価のストレプトアビジン被覆された量子ドット(QDs; QD655, インビトロゲン)は、直径が20~30nmのビードを提供することができ、金粒子またはラテックスを使用することによってより大きなビード(30~100nm)も可能である。流体力学および荷電へのビードの影響は、これが捕捉速度に関係することから、実験を設計する際に検討され得る。

【0092】

40

ビードなしでは、dsDNAは $\sim 0.1 \text{ ms/kbp}$ にて細孔を通過する。長さ500bpおよび4kbpのDNA，およびファージdsDNA分子( $\sim 48 \text{ kbp}$ )が使用される。DNAサンプルは、チャンバAからの捕捉とチャンバBを通じたチャンバCへの通過とを促進するために各細孔に対して共通の電圧極性を用いてチャンバAから両方の細孔内に配送される(図1(I))。dsDNAの持続長が長ければ(1クーン(Kuhn)長は100nm)、各細孔内部のDNAセグメントがおそらく完全に伸びて棒状になることが確実になる。電圧およびイオン濃度は適切な捕捉速度を特定するために変えることができる。様々な緩衝されたイオン濃度が、捕捉速度と、各細孔においてDNAの存在を示すコンダクタンスシフト値とを高めるか変化させるために各チャンバにおいて使用される。

50

## 【0093】

直径が10 nm以上のナノ細孔を用いることで、dsDNAとナノ細孔壁との間の干渉（例えば、摩擦および固着）は最小限になる。細孔が大きくなると、dsDNAが、折り畳まれた構造および折り畳まれていない構造で捕捉されうるが、一列縦列の（折り畳まれていない）構造は、より高電圧かつより短い（3 kbp）dsDNAにてより生じ易い。500 nm以下の細孔内の距離に対して、（チャンバAとBとにある）第1の細孔での捕捉に引き続いてデュアル細孔捕捉が起きる可能性は、1 M KCl中、200 mV以上の電圧において非常に高い。

## 【0094】

電圧の影響が熱拡散より優位でかつ高い確率で捕捉をもたらす半径距離は、一定の細孔サイズ範囲（直径6～15 nm）、電圧（120～500 mV）に対して、少なくとも4 kbpの長さのdsDNAについて、少なくとも900 nm（細孔内の距離よりも大きい）であると推定されている（ガーショーおよびゴロブチェンコ、Nature Nanotechnology, 2: 775 - 779, 2007）。これらの発見は、dsDNAの単一（第1の）細孔捕捉に引き続いて、高い確率でdsDNAの迅速なデュアル細孔捕捉があることを裏付ける。

## 【0095】

2細孔によるDNAの捕捉および制御は、アクティブ制御ハードウェアおよび実時間アルゴリズムから利益を得ることができる。発明者らは、DNA制御のためのアクティブ制御ハードウェア/ソフトウェアを開発した。例えば、ギアーフラス、Biophys. J., 100: 1509 - 16, 2011；ウィルソン他、ACS Nano., 3(4): 995 - 1003, 2009；およびベンナー他、Nat. Nanotech., 2(11): 718 - 24, 2007を参照。有用なソフトウェアはFPGA（フィールド・プログラマブル・ゲート・アレイ）システム（PCI-7831R, National Instruments）において実装されたLabVIEWソフトウェア（Version 8, National Instruments, Austin, TX）である。参照したFPGAは4つの増幅器まで同時に制御することができる。更に、PC上でデータをデジタル化して記録（ログ）するために使用されるAxon Digidata 1440Aデータ収集システム（Data Acquisition System）は、並列の8つの増幅器までの電圧および電流を記録するのに十分な16個の入力チャンネルを有する。実時間制御および測定のためのハードウェア/ソフトウェアに合う他の実時間オペレーティングシステムは、増幅器を制御し、データをデジタル化して記録するために使用されることもできる。

## 【0096】

発明者らは、省スペースおよびマルチチャネル装置における一または複数のナノ細孔の使用を機能化および最適化するために、「ナノクランプ」と称する低雑音電圧クランプ増幅器（キム他、IEEE Trans. On Biom. Circ. And Syst. In press, May 2012；キム他、Elec. Lett., 47(15): 844 - 6, July, 2011；およびキム他、Proceedings of the IEEE International SoC Design Conference (ISOC), November, 2010）も開発した。任意の他の商業的卓上電圧クランプまたはパッチクランプ増幅器、または一体型電圧クランプまたはパッチクランプ増幅器は、2つの細孔制御および測定のために使用されることができる。

## 【0097】

様々な固体細孔材料および直径に対し、0.1～10 kbpが変位するのに～1 msかかる。FPGAで制御された増幅器によって、0.020 ms（ミリ秒）以内に捕捉を検出し競合電圧制御を開始することができ、これは1 kbp DNAの合計通過速度1 msよりもかなり速く、よって、（ビードアタッチメントを有しない）DNAが逃げる前に制御方法を動作させる可能性も高い。制御の実証として、分子が細孔から退出するまでの時間および退出方向を、競合電圧間の強度および差異の関数として実証することができる（

図1 ( I I I ) )。単一の細孔実験において、長い ( 1 k b p ) d s D N A が細孔を通る速度は、大きく変動することが実験的に観察され、これらの変動は拡散ブラウン運動に帰するには大きすぎる。(ルー他, *Biophysical Journal*, 101 ( 1 ) : 70 - 79, 2011)において、正味速度変動(すなわち、合計通過時間で除したDNA長さ)の主要源は、誘引する電圧領域が延びている、細孔に入ったDNAの部分に加えて、細孔にまだ入っていないDNAのうち、電圧に影響を受ける部分によって誘発される粘性抵抗によるものとしてモデリングされた。このモデルは実験データと妥当に適合した。注目すべきは、d s D N A の質量中心が捕捉の際に細孔と同一線上にある場合、正味速度は速くなるが、もし細孔の中心から外れた場合には、正味速度は遅くなる。競合電圧が2細孔装置内で使用されるとき、d s D N A 速度は、電圧差が十分に高くないのであれば、この粘性抵抗によってもたらされる摂動によって影響を受けない。この理由は、細孔および競合電圧の両方によるd s D N A 捕捉がなされた後に、細孔間のd s D N A は完全に延びて棒状となっており、したがっていずれの細孔入口付近でも構造体を作ることに関与できないからである。一方、細孔の外側上のd s D N A 構造体は各局所細孔電圧によって常に中間チャンネルから離れるように強制されることから、細孔入口動力学を複雑化する可能性はより低い。斯かる構造体は、コントロールド・デリバリー動力学に影響を与えることができ、動力学への影響を定量化するためにキャリブレーション実験を使用することができる。

10

【0098】

ランダムな横方向のDNA運動によってもたらされる力の不確実性はおそらく最小限である。更に、電圧力は、DNA運動の逆方向に電気浸透流(E O F)を起こし、対イオン流がない場合よりも低速でDNAを移動させる。分子の半径位置が様々に異なることで、ナノ細孔に様々なE O Fフィールドを生じることから、問題の一つは、実効電荷密度そして正味駆動力が、速度変動をもたらしDNA半径位置の変動の間に十分変化するかどうかである。1 M K C l におけるDNAの実効電荷密度は細孔壁とDNAとの間の1 n m 以上の距離に対して安定していると考えられる。

20

【0099】

更に、S i N ナノ細孔は、本来DNAを排除する負の表面電荷を有する。それゆえに、分子は半径位置変動を受けるけれども、数ナノメートルよりも大きい直径を備えるS i N 細孔を用いることによって、各一定電圧値が2細孔のそれぞれにて一定の実効的な力をもたらし易く、したがって2細孔設定において2つの競合電圧を使用するときにより大きな力の方向において一定速度をもたらし易い。他の細孔材料表面を処理することにより、S i N に匹敵する効果を生じ得る。

30

【0100】

ブラウン運動によってもたらされるランダムなDNAの並進運動によって引き起こされる速度の不確実性は、競合電圧を高めることによって減少し得る。そのような減少が起こるか否かを決定するために、実験が行われうる。単一ナノ細孔の研究は(ルー他, *Biophysical Journal*, 101 ( 1 ) : 70 - 79, 2011)競合力を高めることでブラウン運動によって生じる不確実性を減少することができることを裏付ける。研究は、ブラウン運動(速い(ナノセカンド)タイムスケールにおいて生じる)によってもたらされる速度変動およびかかる変動に起因するシークエンシングエラーを分析した。仮想的かつ理想化された単一ヌクレオチドセンサー(> 22 M H z 帯域幅にてノイズフリーの検出)を前提とすると、ブラウン運動だけで75%読み出しエラーになる。エラーを予測するための関連パラメータは、 $k_B T / F \cdot (0.34 \text{ nm})$ と表され、熱エネルギーとDNAを変位するためになされる仕事との比率であり、その距離はヌクレオチド間の距離 $a$  (0.34 nm)である。この比率において力 $F = V$ は電荷密度(d s D N A について $0.2 e^- / b p$ )を備えるDNAを駆動する電圧 $V$ である。当該制御方法については、電圧を50倍に高めることで5%読み出しエラーになり、より高電圧は更にエラーを改善する。しかしながら、単一細孔について、平均速度(注: の上にハイフン。以下同じ)は、拡散定数を $d$ として $F \cdot d / (k_B T)$ と表されることから、D

40

50

N A 速度も F につれて高まり、シーケンシング帯域幅により非現実的な要求をする。

【 0 1 0 1 】

2 2 M H z 帯域幅を維持するために、単一ナノ細孔についての力が 5 0 倍に増加すると、同じ ( - ) を維持するために溶液粘度を 5 0 倍に増加しなければならないであろう。しかしながら、実際には、2 2 M H z 帯域幅は、単一ヌクレオチドシーケンシングについて任意の実験的ナノ細孔プラットフォームが実証したか実証することを約束するレベルよりも既にはるかに高い。更に、粘度を増加させることによって、単一ナノ細孔で 1 0 倍までしか D N A を遅くすることができない ( フォロゲア , 他、N a n o L e t t . , 5 ( 9 ) : 1 7 3 4 - 7 , 2 0 0 5 ) 。 2 細孔プラットフォームを用いれば、各電圧を十分に高く維持することができ、これによりブラウン運動によって生じる変動を抑制することができ、一方、正味 D N A 速度を決定する差動電圧は、制御速度が確実に実際のシーケンシング帯域幅 ( 名目上 1 k H z ) 以内となるように調節されうる。ブラウン運動によってもたらされる速度変動を抑制する別の方法は、帰還制御を用いることである。一の態様において、1 0 k H z 帯域幅での第 1 の細孔電圧の作動に 1 0 k H z 帯域幅の第 2 の細孔電流をフィードバックすると、ブラウン運動は、D N A にある検出可能な特徴をこれらの k H z 閉ループ帯域幅で第 2 の細孔内およびこの付近に留めるように制御するよう相殺され得る。この能力は、H z 閉ループ帯域幅における分子に取り付けられたビードの光学的強制により、2 つの空間次元および仕事においてブラウン運動を抑制した反ブラウン動電学的 ( A B E L ) トラップの一次元アナログである ( ワングおよびモエナー , A C S N a n o , 5 : 5 7 9 2 - 9 , 2 0 1 1 ) 。

10

20

【 0 1 0 2 】

実施例 2 . D N A に結合した R e c A フィラメントの検出および局所化

この実施例は、2 細孔装置が特知恵のシーケンスを有するかこれに結合しないタンパク質のために、d s D N A への D N A 結合タンパクの結合をマッピングするために使用することができることを示す。

【 0 1 0 3 】

実施例 1 において実証されるように、D N A サンプルはチャンバ A から捕捉することができる。R e c A タンパクは、壊れた D N A を損傷を受けていない D N A の相補領域とペアにする A T P 依存 D N A 鎖交換反応を触媒する。不十分に加水分解する A T P 類似体 A T P S を用いて、d s D N A に結合された R e c A フィラメントは、第 1 に生理食塩水内で組み立てられる際に高い塩において非常に安定している ( 例えば、1 M K C l ) 。ゆっくり加水分解される A T P S に対する代替として、この実施例は A D P - A l F 4 ( 四フッ化アルミニウム ) も使用することができ、これは全く入れ替わることがなく、R e c A をより強固に D N A に結合させる。

30

【 0 1 0 4 】

2 0 ~ 3 0 n m ナノ細孔を通して - D N A に結合された R e c A フィラメントの検出は、実証されているが ( コワルクジク他、N a n o L e t t . , 1 0 ( 1 ) : 3 2 4 - 8 , 2 0 1 0 ; スミーツ他、N a n o L e t t . 9 ( 9 ) : 3 0 8 9 - 9 5 , 2 0 0 9 ; およびホール他、N a n o L e t t . 9 ( 1 2 ) : 4 4 4 1 - 5 , 2 0 0 9 ) 、長さ < 2 0 b p のフィラメント ( 6 個以下の R e c A タンパク ) は、単一ナノ細孔を用いても、変位速度と測定 S N R との間の結合によって解決することができない。

40

【 0 1 0 5 】

この実施例の初期実験は、ほぼ被覆されていない、部分的に被覆されている、および完全に被覆されている D N A を生成するために、R e c A の変化する濃度にされているビード結合および非結合 - D N A を用いる。各細孔電流の実時間監視は、コントロールド・デリバリーの進捗状況を計るために使用することができ、フィラメントの位置マッピングのために相関される。各 D N A の繰り返し測定は R e c A マッピングの正確性を向上させる。

【 0 1 0 6 】

R e c A が D N A に結合されるときに、加えられた電荷およびバルク、ならびに高濃度

50

の塩における安定性は、提案された器具を伴うコントールド・デリバリーの間に検出および位置マッピングを試みるために理想的な候補となる。

【0107】

更に、RecA結合されたDNAの制御は、変位を止めるためにビードを取り付けることなく試みることができる。実施例1のdsDNA実験と同様に、能動的電圧制御は、DNAがナノ細孔を出る前に競合電圧制御を迅速に開始するために使用することができる。ssDNAに結合する荷電された種(species)がDNAの正味荷電および剛性を変えることによって電場におけるDNAの機動性に影響するため、移動制御調整実験は、dsDNAの移動を制御するために使用される力平衡への、dsDNAに結合するRecAの影響を試験することができる。

10

【0108】

この実施例は、低いRecA濃度で観察された最も短いフィラメント長さを高いSNRかつ十分に遅い制御された速度にて測定することができ、分離して結合された任意のRecAタンパクが存在しているかを検出することができる。

【0109】

従って、2細孔装置は基本的な調査のために全く新しい単一分子の器具を提供し、なぜなら付加的なタンパクがRecA-DNAフィラメントに結合するのを検出する能力を試験することができるからであり、このことはフィラメント幅を広くし、よって観察された電流の減少によって検出される。例えば、RecA-DNAフィラメントに結合するタンパクは、LexAおよびバクテリアフォージラムダリプレッサーを含み、これらは細胞の状態を検出して下流の調節事象をオンまたはオフに切り替えるためにRecAを使用する。

20

【0110】

キャリブレーション実験はDNAの特定のシーケンス(位置)に結合するタンパクを検出することを含み、タンパクによってもたらされた電流シフトが細孔を通してDNAの速度および速度制御性能の推定を可能にする。dsDNAの特定の箇所に結合する例示的なタンパクは、Lacリプレッサー(21bpセグメントに結合する)、ラムダファージ・リプレッサー(-DNAの複数のオペレーター部位を有する)、および他のタンパクを含む。

【0111】

実施例3. 一本鎖DNA内の二本鎖セグメントの検出および局所化

この実施例は、可変長の二本鎖セグメントを備える10kbまでのssDNAの生成を実証する。

【0112】

第1のステップにおいて、10kbpのdsDNAはロングレンジPCRによって作ることができる。鎖の一端はビードアタッチメントのためのビオチン化であり、この鎖は化学変性によって分離される。その後、ビードのない10kb ssDNAは2細孔実験において測定された鎖として機能する。所望のサイズを備える相補的一本鎖セグメントは、PCRによって作られ、ビード捕捉および鎖状分離(strand separation)が続く。

40

【0113】

測定された10kb ssDNA内の複数の箇所に可変長のssDNAセグメントを使用することができ、1セットの100ntセグメントで始まる。単一固体細孔を通るイオン電流は、dsDNAをssDNAホモポリマーならびにプリンおよびピリミジンホモポリマーから識別するために使用された(スキナー他、Nano Lett., 9(8): 2953-60, Jan 2009)。よって、DNAの単一鎖セグメントを二本鎖セグメントから識別する可能性は2細孔装置を用いて十分な高電圧にて高いものとなる。ssDNAセグメント対dsDNAセグメントをマッピングすることで、ハイブリダイゼーションでアシストされた方法(hybridization-assisted process)(提案されたこの方法は高価なハイブリダイゼーションでアシストされた処理

50

に依存する)を用いてナノ細孔シーケンシングを可能にし、長距離において目標DNAシーケンスの位置および特定を明らかにするために使用することができる(目標とされたシーケンシング)。単一鎖DNA結合(SSB)タンパクの使用の可能性を探ることにもできる(ssDNAに結合することによってイオン電流においてssDNA対dsDNAの差異を更に拡大し、dsDNAよりも大きなインピーダンスを作るビードとして)。

実施例4: 長いssDNAの捕捉および制御ならびにRecAの局所化

#### 【0114】

この実施例は長いssDNAの捕捉および制御ならびにRecAの検出および局所化を実証する。更に、この2細孔装置はssDNA内のプリン対ピリミジンホモポリマーセグメントを検出することができる。

10

#### 【0115】

20nmのSiN膜における10nmの細孔を通しての7kbのssDNAの確率的なもつれは、ステファン他、Nano Lett., 10:1414-20, 2010に示されるように行うことができる。ステファン他2010における単一ナノ細孔方法が、もつれたssDNAと細孔/膜表面との間の機械的接触力によってssDNAをほぐす一方、2細孔の競合電圧セットアップは、各細孔に最も近いDNA骨格への各電圧力の作用によって、ssDNAを十分に高い競合電圧にて細孔の近くかつ細孔の間でもつれを電気泳動的力的にほぐさせることができると考えられる。

#### 【0116】

ほぐしおよびこれに続く2細孔セットアップによるssDNAの速度の正確な制御は、長いssDNA分子の最終的なシーケンシングのために重要である。十分に高い電圧(~400mV)にて、ssDNA内のプリンおよびピリミジンホモポリマーセグメントを区別することが可能であり、(スキナー他、Nano Lett., 9(8):2953-60, Jan 2009), このことは診断用途および癌の研究のために有用である。

20

#### 【0117】

この実施例は、ssDNAに結合してより大きなインピーダンスを作ることによってssDNAイオン電流から区別可能な検出可能な「速度 - bumps」として、RecAあるいはおそらく他の一鎖およびDNA結合(SSB)タンパクの使用の可能性も探る。これらの速度抑止物(speed bump)は、制御されたssDNA速度の直接定量化を可能にし、そして必要とされる1ms/ntが達成可能であることを実証する。RecAは特定のトリヌクレオチドシーケンス箇所に結合する必要はないが、好ましくはTGG繰り返しシーケンスに結合し、RecAフィラメントが既に形成されたところに結合する傾向もあるため、キャリブレーション実験は、特定の既知のシーケンス箇所に結合する他のssDNA結合分子の使用を必要とする。結合箇所が各細孔を通過するときに検出可能な結合箇所を知っていることは、競合電圧値の関数として分子の速度を決定するために必要である。非限定的な実施例は、一または複数の既知の箇所に融合する二重鎖(あるいはビードで拘束された二重鎖)を使用することであり、これから電流のシフトが各細孔を通して各重複部位の経路を検出するために使用することができ、そして選択された電圧値のための通過する鎖速度を推定する。続いて、RecAフィラメントが形成され、係る分子において検出され、ベンチマーク検出点として重複部位の特徴を維持し、これに関連してRecAフィラメントが検出され、それらの位置が推定される。

30

40

#### 【0118】

遺伝的なハプロタイプを決定する方法および蛍光標識をdsDNA内に組み込むことによるDNAマッピングの方法(シヤオ他、米国特許第7771944号B2, 2010)も、2細孔装置を使用することができ、なぜなら、ビードラベル(例えば、量子ドット、または任意の蛍光標識)はよりバルキーであり、ちょうどdsDNA上の結合タンパクがなすように電流においてシフトを生じさせるからである。更に、2細孔方法はより単純で、ラベル位置を検出してマッピングするために、高分解能撮像方法(すなわち、完全内部反射蛍光顕微鏡法)を使用するよりも非常に廉価である。コントロールド・デリバリー中

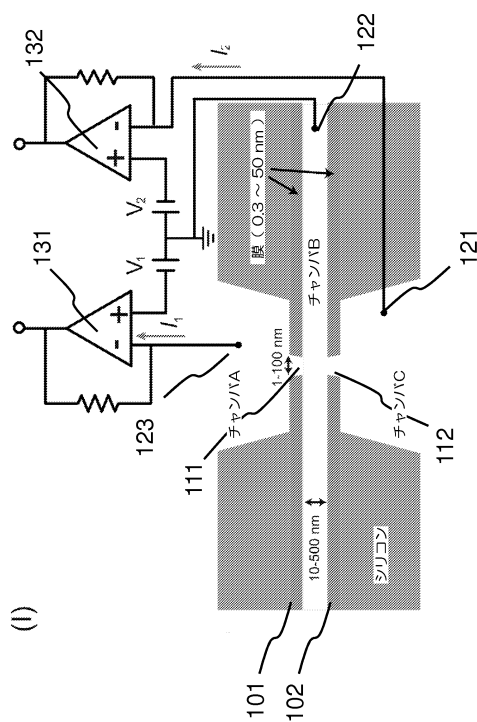
50

のブラウン運動によって生じる速度変動は、小さな特徴を検出するためよりも大きな特徴（タンパク、重複部位セグメント、ビードアタッチメント）を検出するための害がより少ない。

【 0 1 1 9 】

本発明は上記実施形態とともに記載したが、上記記載および例は本発明を説明するためのものであり本発明の範囲を限定するものではないと理解されよう。本発明の範囲内の他の態様、利点および変更は当業者には自明であろう。

【 図 1 ( I ) 】



(I)

【 図 1 ( I I ) 】

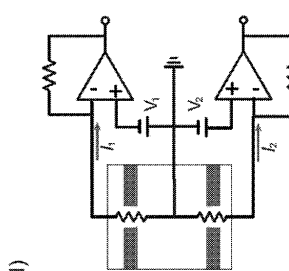
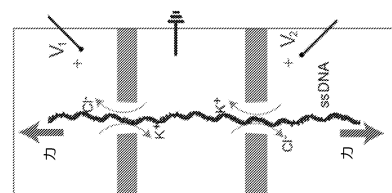


FIG. 1

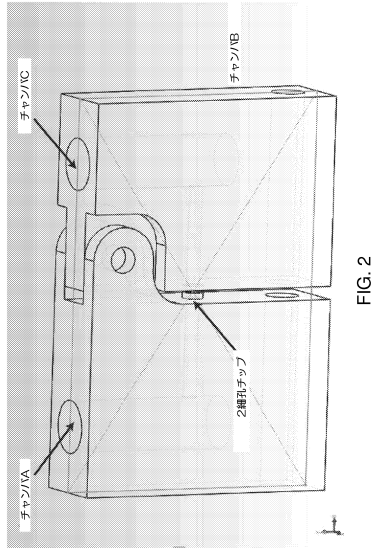
【 図 1 ( I I I ) 】



(III)

FIG. 1

【図 2】





---

フロントページの続き

(72)発明者 キム, ユンスク

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95064, ハイ ストリート 1156, ユニバーシティ  
カリフォルニア アト サンタ クルス

審査官 福間 信子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0243449 (US, A1)

特開2006-113057 (JP, A)

特開2006-119140 (JP, A)

特開2006-105985 (JP, A)

特表2006-526777 (JP, A)

特開2012-026986 (JP, A)

特表2011-501806 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 3/10