

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6514692号
(P6514692)

(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.

F I

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 B

C 1 2 Q 1/6816 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6816 Z

請求項の数 9 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2016-524559 (P2016-524559)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月23日(2014.10.23)
 (65) 公表番号 特表2016-533723 (P2016-533723A)
 (43) 公表日 平成28年11月4日(2016.11.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/061854
 (87) 国際公開番号 W02015/061511
 (87) 国際公開日 平成27年4月30日(2015.4.30)
 審査請求日 平成29年5月18日(2017.5.18)
 (31) 優先権主張番号 61/894,661
 (32) 優先日 平成25年10月23日(2013.10.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 514318769
 ジェニア・テクノロジーズ・インコーポレ
 イテッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9505
 O, サンタ・クララ, スコット・ブールバ
 ード 2841
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンサウェル形成のためのプロセス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基板と、

1 平方ミリメートル当たり五百ウェルを超える密度を有する前記基板上に形成された複
 数の不連続な部位と、を備え、各不連続な部位が、

ウェルを形成するように前記基板上に配置された側壁であって、前記側壁が上に膜が形
 成されるように硬く平坦な上面を有し、前記膜が前記ウェル全体にまたがり、前記ウェル
 を封止するものであり、前記膜がナノ気孔を含むものである、および、

前記ウェルの底部に配置される電極であって、前記ウェルの前記底部に配置される前記
 電極が、電極の複数の群に整理され、電極の各群が、共通対電極を共有するものである、
 を含む、バイオチップ。

【請求項 2】

前記ウェルの前記底部に配置される前記電極が、その信号のほとんどを前記電極に最も
 近いナノ気孔または膜から導出する、請求項 1 に記載の前記バイオチップ。

【請求項 3】

前記側壁の表面が、前記表面が前記ウェル内のまたは前記ウェルに隣接する膜の形成を
 促進するように、シリル化される、請求項 1 または 2 に記載の前記バイオチップ。

【請求項 4】

前記側壁の表面が、前記表面が前記ウェル内のまたは前記ウェルに隣接する疎水性膜の
 前記形成を促進するように、疎水性である、請求項 1 に記載の前記バイオチップ。

10

20

【請求項 5】

前記ウェル内のまたは前記ウェルに隣接する膜の前記形成を促進することが、
前記膜の前記疎水性表面への接着を促進することを含む、請求項 4 に記載の前記バイオチップ。

【請求項 6】

前記側壁の表面が、前記側壁を有機官能性アルコキシシラン分子の層で被覆することによってシリル化される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の前記バイオチップ。

【請求項 7】

前記分子の層が、1 分子の厚さである、請求項 6 に記載の前記バイオチップ。

【請求項 8】

前記基板が、基板上に配置される二酸化ケイ素の層を有する半導体基板であり、前記ウェルが、二酸化ケイ素中に形成される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の前記バイオチップ。

【請求項 9】

前記電極が、実体がナノ気孔を通過するのに応答してナノ気孔を通るイオンの流れの変化を検出することができるものであり、前記ウェルが、電極を再充電することなく少なくとも 100 個の実体を電極が検出できるように、好適に大きい体積を有するものであり、および、前記電極が、ナノ気孔を通るイオンの流れからのその信号の少なくとも 80 % を検出するものである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の前記バイオチップ。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

相互参照

本出願は、2013 年 10 月 23 日出願の「Methods for Forming Lipid Bilayers on Biochips」と題される米国仮特許出願第 61/894,661 号の利益を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

バイオチップは、核酸分子の配列決定を含む、様々な種類の分子検出及び検知のために使用することができる。核酸配列決定は、核酸試料の配列情報を提供するために使用され得るプロセスである。このような配列情報は、対象の診断及び/または治療に有用であり得る。例えば、対象の核酸配列は、遺伝疾患を特定する、診断する、及び可能性としては遺伝疾患に対する治療を開発するために使用することができる。別の例として、病原体の研究は、伝染病に対する治療をもたらし得る。

【0003】

核酸を配列決定するために使用され得る利用可能な方法が存在する。しかしながら、そのような方法は高価であり、対象を診断及び/または治療するために必要とされ得る期間内及び正確さで配列情報を提供しない場合がある。

【発明の概要】

【0004】

ナノ気孔は、核酸分子等の配列決定ポリマーを含むが、これに限定されない様々な分子を検出するために使用することができる。改善されたバイオチップ及びバイオチップ（例えば、ナノ気孔を含む）を作製するための方法に対する必要性が本明細書において認識される。いくつかの場合では、従来の半導体処理技法は、バイオチップとして使用するためのケイ素装置の製造には不十分である。例えば、例えば、イオンを含む水溶液等の高度腐食環境に耐え得る（例えば、高度腐食環境と接触しながら、または接触した後に動作可能である）バイオチップを製造することができる方法が提供される。別の態様では、本明細書に記載される方法は、有機膜（例えば、脂質二重層）の形成を促すバイオチップ表面を創出する。別の態様では、本方法は、バイオチップ内のイオン電流の電気測定を実施するために必要とされる電気化学電極を提供する。

【0005】

とりわけ、本明細書に記載される方法に従って製造されるバイオチップは、核酸分子特定及びポリマー（例えば、核酸）配列決定のために使用することができる。いくつかの事例では、ポリマーは、ナノ気孔を通過し、ポリマーの様々なサブユニット（例えば、核酸のアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）、及び/またはウラシル（U）塩基）は、ナノ気孔を通過して流れる電流に影響する。本明細書に記載されるように、様々なサブユニットは、ナノ気孔及び/または膜を横断して印加される複数の電圧での電流を測定することによって特定することができる。いくつかの場合では、標識されたヌクレオチドの重合は、標識分子をナノ気孔に放出及び/または提示し、この標識分子を、ナノ気孔及び/または膜を横断して印加される複数の電圧での電流を測定することによって特定することができる。

10

【0006】

一態様では、本開示は、（a）複数の検知電極と流体連通している流体流路を含むチップを提供することと、（b）脂質溶液を流体流路中に流入することと、（c）少なくとも1つの気泡を流体流路上に流入して、それにより、検知電極に隣接して脂質二重層を形成することと、を含み、気泡は複数の検知電極にまたがり、気泡は、少なくとも約1秒間にわたって検知電極に隣接する、ナノ気孔検知装置で使用するための脂質二重層を形成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、気泡は、約1ミリ秒間～約5分間にわたって検知電極に隣接する。

20

【0007】

いくつかの実施形態では、気泡は、少なくとも約30秒間にわたって検知電極に隣接する。いくつかの実施形態では、気泡は、最大でも約5分間にわたって検知電極に隣接する。いくつかの実施形態では、脂質二重層は、検知電極の少なくとも50%にわたって形成される。いくつかの実施形態では、脂質二重層は、検知電極の少なくとも70%にわたって形成される。

【0008】

いくつかの実施形態では、本方法は、ナノ気孔を検知電極の各々に隣接する脂質二重層内に挿入することを更に含む。いくつかの実施形態では、チップは、ウェルを含み、検知電極は、ウェル内にある。

【0009】

別の態様では、本開示は、（a）複数の検知電極と流体連通している流体流路を含むチップを提供することと、（b）気泡が複数の検知電極にまたがるように、少なくとも1つの気泡を流体流路中に、かつ複数の検知電極に隣接して流入することと、（c）気泡の周辺部を脂質に接触させ、脂質が気泡の下及び流体流路の上に拡散し、それにより検知電極に隣接して脂質二重層を形成することと、を含む、ナノ気孔検知装置で使用するための脂質二重層を形成するための方法を提供する。

30

【0010】

いくつかの実施形態では、気泡は、少なくとも約30秒間にわたって脂質と接触させられる。いくつかの実施形態では、気泡は、約5ミリ秒～約5分間にわたって脂質と接触させられる。いくつかの実施形態では、脂質二重層は、検知電極の少なくとも70%にわたって形成される。いくつかの実施形態では、本方法は、ナノ気孔を検知電極の各々に隣接する脂質二重層内に挿入することを更に含む。いくつかの実施形態では、ナノ気孔は、マイコバクテリウム・スメグマチスポリンA（Ms p A）、溶血素、マイコバクテリウム・スメグマチスポリンA（Ms p A）もしくは溶血素のうちの少なくとも1つと少なくとも70%の相同性を有する任意のタンパク質、またはそれらの任意の組み合わせである。

40

【0011】

いくつかの実施形態では、ナノ気孔を挿入することは、電気刺激を、該電極を通して適用して、該脂質二重層内の該ナノ気孔の挿入を促進することを含む。いくつかの実施形態では、該脂質二重層は、約1 G を超える抵抗を呈する。

50

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、該脂質二重層及び該ナノ気孔タンパク質はともに、約 1 G 以下の抵抗を呈する。いくつかの実施形態では、該脂質は、有機溶媒を含む。いくつかの実施形態では、該気泡は、蒸気気泡である。いくつかの実施形態では、チップは、ウェルを含み、検知電極は、ウェル内にある。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、該脂質は、ジフィタノイル - ホスファチジルコリン (D P h P C)、1, 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 ホスホコリン、1, 2 - ジ - O - フィタニル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D o P h P C)、パルミトイル - オレオイル - ホスファチジル - コリン (P O P C)、ジオレオイル - ホスファチジル - メチルエステル (D O P M E)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C)、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、スフィンゴミエリン、1, 2 - ジ - O - フィタニル - s n - グリセロール；1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 3 5 0]；1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 5 5 0]；1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 7 5 0]；1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 1 0 0 0]；1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2 0 0 0]；1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - ラクトシル；G M 1 ガングリオシド、リゾホスファチジルコリン (L P C)、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【 0 0 1 4 】

別の態様では、本開示は、(a) 複数の検知電極と流体連通している流体流路を含むチップであって、該検知電極の各々が核酸取り込み事象時にイオン電流を検出するように構成される、チップと、(b) 該チップに連結される制御システムであって、(i) 脂質溶液を流体流路中に流入する、(i i) 少なくとも 1 つの気泡を流体流路中に、かつ少なくとも約 1 秒間の期間にわたって検知電極に隣接して流入する、ようにプログラムされる、制御システムと、を備え、気泡が複数の検知電極にまたがり、気泡の流体流路中への流れが検知電極に隣接して脂質二重層を形成する、ナノ気孔検知システムを提供する。いくつかの実施形態では、気泡は、約 5 ミリ秒間 ~ 約 5 分間の期間にわたって検知電極に隣接する。

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、チップは、ウェルを含み、検知電極は、ウェル内にある。いくつかの実施形態では、制御システムは、該チップの外側にある。いくつかの実施形態では、制御システムは、コンピュータプロセッサを備える。いくつかの実施形態では、本方法は、該制御システム及び該チップに動作可能に連結される流体流動システムを更に備え、該流体流動システムは、該脂質溶液及び該気泡の流れを方向付けるように構成される。

【 0 0 1 6 】

基板と、1 平方ミリメートル当たり 5 0 0 ウェルを超える密度を有する基板上に形成される複数の不連続な部位と、を備え、各不連続な部位が、ウェルを形成するように基板上に配置される側壁と、ウェルの底部に配置される電極と、を含む、バイオチップが本明細書に開示される。1 つの実施形態では、ウェルは、ウェル間のクロストークを低下させるように形成される。いくつかの実施形態では、ウェルの底部に配置される電極は、その信号のほとんどを電極に最も近いナノ気孔または膜から導出する。いくつかの実施形態では、ウェルの底部に配置される電極は、電極の複数の群に整理される。いくつかの実施形態では、電極の各群は、共通対電極を共有する。いくつかの実施形態では、ウェルの底部に配置される電極は、専用の対電極を有する。いくつかの実施形態では、側壁の表面は、表

10

20

30

40

50

面がウェル内のまたはウェルに隣接する膜の形成を促進するように、シリル化される。更なる実施形態では、側壁の表面は、表面がウェル内のまたはウェルに隣接する疎水性膜の形成を促進するように、疎水性である。追加の実施形態では、ウェル内のまたはウェルに隣接する膜の形成を促進することは、膜のシリル化された表面への接着を促進することを含む。いくつかの実施形態では、側壁の表面は、側壁を有機官能性アルコキシシラン分子の層で被覆することによってシリル化される。更なる実施形態では、分子の層は、1分子の厚さである。

【0017】

本開示の更なる態様及び利点は、本開示の例示的实施形態のみが示され、記載される、以下の詳細な説明から当業者には容易に明らかになるだろう。理解されるように、本開示は、他の及び異なる実施形態が可能であり、そのいくつかの詳細は、種々の明らかな点で修正が可能であり、全ては、本開示から逸脱しない。したがって、図面及び説明は、本質的に例示として見なされるべきであり、制限として見なされない。

【0018】

参照による組み込み

本明細書に記載される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各個別の刊行物、特許、または特許出願が、明確かつ個別に参照により組み込まれることが示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

本発明の新規の特徴は、添付の特許請求の範囲において詳細に記載される。本発明の原理が利用される例示的实施形態を示す以下の詳細な説明、及び次の添付図面を参照することによって、本発明の特徴及び利点をより良く理解することができるだろう。

【0020】

【図1】気孔式電子センサを示す。

【図2】ナノ気孔バイオチップを示す。

【図3】容器が対電極の役割を兼ねる電極アレイを示す。

【図4】共通対電極を有する電極アレイを示す。

【図5】センサのストリップが共通対電極を共有する電極アレイを示す。

【図6】各電極が個々の対電極を有する電極アレイを示す。

【図7】共通電解質プールを共有するセンサウェルの列の一例を示す。

【図8】半導体基板の一例を示す。

【図9】半導体基板上に堆積された二酸化ケイ素の層を示す。

【図10】二酸化ケイ素層上に堆積されたフォトレジストを示す。

【図11】ウェルの区域を画定するために放射線に曝露されるフォトレジストの区域を示す。

【図12】二酸化ケイ素の一部がドライエッチング手順によって除去されていることを示す。

【図13】ウェルを創出するために更なる二酸化ケイ素がウェットエッチング手順によって除去されていることを示す。

【図14】チタン接着層の堆積を示す。

【図15】白金保護層を伴う、または交互に白金が電極としての役割を果たす、窒化チタン保護層の堆積を示す。

【図16】銀電極材料の堆積を示す。

【図17】フォトレジスト及びその上に配置される材料の剥離を示す。

【図18】二酸化ケイ素のシリル化を示す。

【図19】ゲルによるウェルの充填を示す。

【図20】ウェル上のナノ気孔を有する膜の創出を示す。

【図21】銀電極がウェルの側壁上に達するバイオチップを示す。

【図22】複数の電極に隣接して保持される大気泡を示す。

【図 2 3】プライミングされたセンサチップの 1 つ以上の流路上の電極にわたって脂質層を形成するための方法の一例を示す。

【図 2 4】半導体センサチップの一例を示す。

【図 2 5 A】例となるフローセル構造を示す。

【図 2 5 B】例となるフローセル構造を示す。

【図 2 5 C】例となるフローセル構造を示す。

【図 2 6】パッケージ化されたチップの一例を示す。

【図 2 7】ポンプを用いる自動化された二重層形成及び破裂の一例を示す。

【図 2 8】自動チップ設定のためのフローチャートである。この試験は、チップ上のセルの大半が許容可能であることを確認するものである。不十分な数のセル（操作者によって決定される）が試験を通過する場合、全てのチップが不合格となるだろう。

【図 2 9】二重層形成のための自動ポンプのフローチャートである。

【図 3 0】センサチップのウェル上の様々な溶液及び／または気泡の流れの例示である。流れの方向は、図の右下角のブロック矢印で示される。この図では、イオン溶液を表す第 1 の長方形（3 0 0 1、芝生様の模様の長方形）は、既にウェル（3 0 1 0）上を流れており、脂質溶液（3 0 1 5、斜交平行陰影の長方形）はチップ上にあり（及びこの描写ではウェルの全てを被覆する）、イオン溶液並びに気泡を表す第 2 及び第 3 の長方形（3 0 0 5、中空の長方形）は、チップ上をまだ流れていない。長方形の大きさは、流体の量または気泡の大きさを表すものではない。イオン溶液 - 気泡 - イオン溶液の並びは、二重層の被覆率を増加させるために、非二重層の被覆率、例えば、ウェル上の脂質の多重層の積み重なりを減少させるために、及び／または破裂試験後に二重層を再構築するために、数回繰り返されてもよい。いったん本明細書に記載される方法が実施されると、ウェルの界面（3 0 2 0）（図示される）または実質的に平坦な電極（図示されない）において脂質二重層が形成するだろう。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 1】

本発明の様々な実施形態が本明細書に図示されかつ記載されたが、そのような実施形態は、例として提供されるにすぎないことが当業者には明らかである。当業者には、本発明から逸脱することなく多数の変形例、変更例、及び置換例が想到され得る。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替案が用いられてもよいことを理解されたい。

【0 0 2 2】

本明細書に使用する場合、「ナノ気孔」という用語は、概して、膜内に形成される、あるいは提供される気孔、チャネル、または通路を指す。膜は、脂質二重層等の有機膜またはポリマー材料で形成される膜等の合成膜であってもよい。膜は、ポリマー材料であってもよい。ナノ気孔は、検知回路、または例えば、相補型金属酸化物半導体（CMOS）もしくは電界効果トランジスタ（FET）回路等の検知回路に連結される電極に隣接または近接して配置され得る。いくつかの例では、ナノ気孔は、約 0.1 ナノメートル（nm）～約 1000 nm の特徴的な幅または直径を有する。いくつかのナノ気孔は、タンパク質である。溶血素は、タンパク質ナノ気孔の一例である。

【0 0 2 3】

本明細書に使用する場合、「ポリメラーゼ」という用語は、概して、重合反応を触媒することができる任意の酵素を指す。ポリメラーゼの例には、限定することなく、核酸ポリメラーゼまたはリガーゼが挙げられる。ポリメラーゼは、重合酵素であってもよい。

【0 0 2 4】

本明細書に使用する場合、「核酸」という用語は、概して、1 つ以上の核酸サブユニットを含む分子を指す。核酸は、アデノシン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）、及びウラシル（U）またはそれらの変異形から選択される 1 つ以上のサブユニットを含み得る。ヌクレオチドは、A、C、G、T、もしくは U、またはそれらの変異形を含み得る。ヌクレオチドは、成長する核酸鎖に組み込まれ得る任意のサブユニットを

含み得る。そのようなサブユニットは、A、C、G、T、もしくはU、あるいは1つ以上の相補的A、C、G、T、もしくはU、またはプリン（すなわち、AもしくはG、またはそれらの変異形）もしくはピリミジン（すなわち、C、T、もしくはU、またはそれらの変異形）の相補体に特有の任意の他のサブユニットであり得る。サブユニットは、個々の核酸塩基または塩基の群（例えば、AA、TA、AT、GC、CG、CT、TC、GT、TG、AC、CA、またはそれらのウラシル相対物）が分解されるのを可能にし得る。いくつかの例では、核酸は、デオキシリボ核酸（DNA）もしくはリボ核酸（RNA）、またはそれらの誘導体である。核酸は、一本鎖または二本鎖であってもよい。

【0025】

「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で定義される1つ以上のヌクレオチドを含むポリマーまたはオリゴマーである。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、DNAポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、RNAポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、あるいはDNAポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド及び/またはRNAポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドの1つ以上の部分を含み得る。

【0026】

本明細書に使用する場合、「ヌクレオチド」または「塩基」は、一次ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体であってもよい。一次ヌクレオチドは、デオキシアデノシンーリン酸塩（dAMP）、デオキシシチジンーリン酸塩（dCMP）、デオキシグアノシンーリン酸塩（dGMP）、デオキシチミジンーリン酸塩（dTMP）、アデノシンーリン酸塩（AMP）、シチジンーリン酸塩（CMP）、グアノシンーリン酸塩（GMP）、またはウリジンーリン酸塩（UMP）である。ヌクレオチド類似体は、一次核酸塩基（A、C、G、T、及びU）、デオキシリボース/リボース構造、一次ヌクレオチドのリン酸基上に修飾を有する一次ヌクレオチドの類似体または模倣体、またはそれらの任意の組み合わせである。例えば、ヌクレオチド類似体は、天然に存在するまたは人工いずれかの修飾塩基を含み得る。修飾塩基の例には、限定することなく、メチル化核酸塩基、修飾プリン塩基（例えば、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、iso dG）、修飾ピリミジン塩基（例えば、5, 6-ジヒドロウラシル及び5-メチルシトシン、iso dC）、塩基（例えば、3-ニトロピロール及び5-ニトロインドール）、非結合塩基模倣体（例えば、4-メチルベンズイミダゾール及び2, 4-ジフルロトルエンまたはベンゼン）、並びに非塩基（ヌクレオチド類似体が塩基を有しない脱塩基ヌクレオチド）が挙げられる。修飾デオキシリボース（例えば、ジデオキシグアノシン、ジデオキシアデノシン、ジデオキシチミジン、及びジデオキシシチジン等のジデオキシヌクレオチド）並びに/またはリン酸塩構造（併せて骨格構造と称される）を有するヌクレオチド類似体の例には、限定することなく、グリコールヌクレオチド、モルホリノ、及びロックされたヌクレオチドが挙げられる。

【0027】

「相同性%」という用語は、本明細書の「同一性%」という用語と本明細書で交換可能に使用され、配列アライメントプログラムを使用して整列されるとき、本発明のポリペプチドまたは本発明のポリペプチドのアミノ酸配列のうちのいずれかをコードする核酸配列間の核酸またはアミノ酸配列同一性のレベルを指す。

【0028】

例えば、本明細書に使用する場合、80%の相同性は、定義されるアルゴリズムで決定される80%の配列同一性と同じことを意味し、したがって、所与の配列の相団体は、所与の配列の長さにわたって80%を超える配列同一性を有する。配列同一性の例示的レベルは、所与の配列、例えば、本明細書に記載される本発明のポリペプチドのうちのいずれかのコード配列に対する80、85、90、95、98%以上の配列同一性を含むが、これらに限定されない。

【0029】

2つの配列間の同一性を決定するために使用され得る例示的コンピュータプログラムは

10

20

30

40

50

、インターネット上で公的に入手可能なBLASTプログラム一式、例えば、BLASTN、BLASTX及びTBLASTX、BLASTP、並びにTBLASTNが挙げられるが、これらに限定されない。Altschul, et al., 1990及びAltschul, et al., 1997も参照されたい。

【0030】

配列研究は、典型的には、GenBank DNA配列及び他の公共データベース内の核酸配列に対する所与の核酸配列を評価する場合、BLASTNプログラムを使用して行われる。BLASTXプログラムは、GenBankタンパク質配列及び他の公共データベース内のアミノ酸配列に対する全てのリーディングフレームに翻訳された核酸配列の研究にとって好ましい。BLASTN及びBLASTXの両方は、11.0のオープンギャップペナルティ及び1.0の拡張ギャップペナルティのデフォルトパラメータを使用して行われ、BLOSUM-62行列を利用する。(例えば、Altschul, S.F., et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997を参照されたい。)

【0031】

選択される配列の好ましいアライメントは、2つ以上の配列間の「同一性%」を決定するために、例えば、10.0のオープンギャップペナルティ、0.1の拡張ギャップペナルティ、及びBLOSUM 30相似行列を含む、デフォルトパラメータを用いて操作される、MacVectorバージョン13.0.7のCLUSTAL-Wプログラムを使用して実施される。

【0032】

バイオチップ及び核酸配列決定

気孔式センサ(例えば、バイオチップ)は、単一分子の電気インテロゲーションのために使用することができる。本開示の気孔式センサは、検知電極に隣接または近接して配置される膜内に形成されるナノ気孔を含むことができる。センサは、対電極を含み得る。膜は、トランス側(すなわち、検知電極に面する側)及びシス側(すなわち、対電極に面する側)を含む。

【0033】

これから図面を参照するが、ここで同様の番号は全体を通して同様の部品を指す。図面及びその中の特徴は、必ずしも縮尺通りに描かれていないことが理解されるだろう。

【0034】

図1を参照して、典型的な電気測定は、気孔と密接に会合させられる(例えば、結合は、化学的、機械的、電氣的、または電気化学的であり得る)、試験下の分子上で動作することができる。システムは、分子/気孔複合体を横断して刺激(電圧または電流)を与え、その応答を測定することができる。気孔/分子複合体の測定値を隔てるために、気孔の2つの側面は、一般的には、高度絶縁材料(例えば、脂質二重層)によって分離される。

【0035】

絶縁隔壁の反対側に囲まれる体積は、目的とする種(例えば、核酸分子または標識分子)が検出中にシスからトランスへ動くという一般的定義を有するシスウェル及びトランスウェルと称される。トランスウェルは、一般的に、チップ電極の近位にある絶縁膜の側であり、チップ電極に電氣的に接続される。

【0036】

図2は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2011/0193570号に記載される方法に従って調製され得るような、温度制御を有するナノ気孔バイオチップ(またはセンサ)の一例を示す。図2を参照して、ナノ気孔検出器は、導電性溶液(例えば、塩溶液)207と接触している上部電極201を備える。下部導電性電極202は、膜205内に挿入されるナノ気孔206の近くに、隣接して、近接している。膜205は、ウェル210上に、または直接電極上に配置され得、センサ202はウェルの表面の一部を形成する。いくつかの事例では、下部導電性電極202は、半導体基板204内に埋め込まれる電気回路である半導体203内に埋め込まれる。半導体20

3の表面は、疎水性に処理され得る。検出される分子は、ナノ気孔206内の気孔を通じて進む。半導体チップセンサは、パッケージ208内に設置され、これは次に、温度制御要素209の近辺にある。温度制御要素209は、熱電加熱及び/または冷却装置(例えば、ペルチェ装置)であり得る。複数のナノ気孔検出器は、ナノ気孔アレイを形成することができる。

【0037】

いくつかの実施形態では、バイオチップは、ウェル内に電極を有する電気回路を形成することができる対電極を備える。いくつかの場合では、複数のウェル内の複数の電極は、共通対電極を共有する。図3は、液体貯蔵周辺部(例えば、容器)が、対電極(例えば、導電性であり、回路を形成する)として作用する共通対電極を有する電極アレイを示す。対電極の別の実施形態が、図4に示され、対電極は、ナノ気孔の上部にわたるプレート(例えば、導電性金属で作製される)である。図5及び図6に示されるように、複数のウェル内の複数の電極は、共通対電極を共有する群に整理することができる。いくつかの場合では(例えば、図6)、複数のウェル内の複数の電極は、各々が、専用の対電極を有する。いくつかの場合では、複数の対電極を有することは、個々の検知電極またはほんのいくつかの検知電極が、単一の対電極と対になることを可能にし、このようにして、検知-対電極対の電気応答及び性能を潜在的に改善する。

【0038】

いくつかの場合では、複数のウェル(ウェルの総数の任意のサブセットを含む)は、共通電解質プールを含む。図7に示されるように、ウェル701は、ウェルの列がウェル上の共通電解質プールを共有するように、壁702によって列に分離され得る。バイオチップをここに記載されるように部分に分離することは、(例えば、チップの異なる部分に異なる試料を置くことによって)複数の試料が単一のバイオチップ上で分析されることを可能にし得る。

【0039】

ナノ気孔センサは、電極(例えば、下部導電性電極202)に隣接する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100、または1000個のナノ気孔(例えば、溶血素もしくはアクアポリン等またはそれらの組み合わせ)を含み得る。ナノ気孔センサは、ナノ気孔センサ(他のセンサではない)によってのみ使用される上部電極(例えば、上部電極201)を含んでもよく、または代替として、上部電極は、複数のナノ気孔センサによって使用するために提供されてもよい。

【0040】

バイオチップ処理

表面特性、ウェル空洞体積、並びに電極構成及び体積の制御は、ナノ気孔検知を目的とした拡張可能な半導体ベースのマイクロウェルの平坦なアレイの開発における大きな課題である。いくつかの事例では、理想的なナノ気孔ベースの半導体アレイ検知プラットフォームは、以下の目標を達成するであろう:(1)平坦な絶縁膜を支持するチップ表面特性、(2)良好に画定され、良好に制御された平坦な膜表面をもたらす差別化された表面特性、(3)大きいトランスウェル電解質体積、(4)大きい電極体積、(5)アレイ上の隣接するセンサ電極間の電気クロストークの低下、(6)非常に大きいアレイサイズを達成するための高密度セル、並びに(7)主要パラメータ(電圧、抵抗等)がほぼ一定に保ちながらの、かなりの長時間の安定した測定。

【0041】

例えば、目標(1)及び(2)の達成は、特に、高度な絶縁(抵抗)隔壁が、ウェルによって制御された膜区域及びトランスウェル体積で形成されることを確実にするために必要とされ得るように、難しい場合がある。

【0042】

脂質二重層膜を形成する場合、チップの設計及び処理は、疎水性(または新油性)表面及び親水性(または疎油性)表面を創出するように調整され得る。チップ表面の入念な制御は、ウェルによって画定された親水性及び疎水性区域が画定されることを可能にする。

次に、これは、形成された脂質二重層膜の構造及び特性を制御することができる。

【0043】

目標(3)は、典型的な測定期間中の結果に影響しないように、トランスウェル電解質イオンが十分に富むことを確実にするために重要な場合がある。これは、イオンのどれか一方を完全に枯渇させることによって、あるいは、様々なイオンの相対濃度を、それらが測定結果を実質的に(すなわち、濃度勾配の変化及び結果として得られるネルンスト電位を通して)変更するような度合いに変化させることによって、生じ得る。

【0044】

目標(4)は、測定を支持する電気化学反応の一部として消費または変換される犠牲電極の場合に重要であり得る(例えば、銀-塩化物酸化反応に変換される銀)。高い電極体積を有することは、(i)実験を完全に中断させ得る、または測定されるデータにおける大きな相違をもたらし得る「再充電」測定に干渉せずに測定が連続的に実施される時間を増加させるために、並びに(ii)酸化及び還元電極成分の相対濃度の変化によって引き起こされる電気化学電位シフトを低減させるために重要であり得る。いくつかの場合では、電極材料(銀)の完全な枯渇は、実践的な連続測定時間に対する理論的な上限を設定する。

【0045】

残念なことに、これらの目標のうちのいくつかは、別の目標の犠牲にして1つの目標を達成するという対立を引き起こし得る。例えば、ケイ素表面上を深い空洞にエッチングして、銀で完全に充填することで、金属/ケイ素表面において平坦な膜を達成することができ、それにより、目標(1)、(2)、及び(4)を達成するが、しかしながら、トランスウェル電解質に使用可能な体積を残さない。同様に、電気クロストークの最小化(目標5)は、隣接するセルをかなり離して離間することによって達成することができるが、しかしながら、これは、目標(6)の達成を犠牲にして達成される。

【0046】

様々な態様では、本明細書に記載されるバイオチップ及びバイオチップを作製するための方法は、核酸分子の配列決定が可能な態様で目標(1)~(6)を達成することができる。例えば、電解質及び電極材料の両方を支持するための深いウェルの垂直な空洞構造の開発は、目標(3)及び(4)を達成することができる；ハイブリッドウェット/ドライエッチングは、目標(1)、(2)、(3)、及び(4)を達成することができる横寸法、このため、トランスウェル体積を増加することができる；酸化表面の選択的シリル化は、目標(1)及び(2)を達成することができる；ゲルの利用を使用して、目標(1)及び(2)を達成すると同時に、目標(3)及び(4)のバランスを保つことができる；分散した対電極の実装は、目標(5)及び(6)を同時に達成することができる；電極補充の使用(再充電)は、目標(7)を達成することができる；非犠牲電極の使用(実行可能な場合)は、目標(7)を達成することができる；電気メッキは、目標(4)を達成するための電極材料を増加することができる；またはそれらの任意の組み合わせである。

【0047】

バイオチップ特性

一態様では、バイオチップは、(a)半導体基板、(b)ウェルが二酸化ケイ素中に形成される、基板上に配置される二酸化ケイ素の層、(c)ウェルの内側をコーティングする耐食材料、(d)酸化物の表面と共平面になるように酸化物でウェルを完全に充填することを含む、ウェルのいくつかの断片を充填するそのウェル内の電極材料、並びに(e)二酸化ケイ素をコーティングする有機官能性アルコキシシラン層を含む。いくつかの実施形態では、バイオチップは、ウェル内の第1の流体をウェル外側の第2の流体から隔てる膜を更に含む。本明細書に記載される方法のうちのいずれかによって作製されるバイオチップ、並びに核酸分子を含むが、これに限定されないポリマーを配列決定するための本明細書に記載されるバイオチップまたは本明細書に記載される方法によって製造されるバイオチップのうちのいずれかの使用もまた、本発明内に包含される。

【0048】

いくつかの場合では、電極材料は、バイオチップの動作中に枯渇しない。一態様では、バイオチップは、ウェルにわたって配置される膜と、実体が気孔を通過するのに応答して膜内の気孔を通るイオンの流れの変化を検出することができるウェル内の電極であって、検出中に枯渇しない電極と、を有する複数のウェルを含む。いくつかの実施形態では、電極は、バイオチップの表面と実質的に平面である、すなわち、金属は、ウェル全体を充填する。

【0049】

電極（例えば、銀または白金材料）は、任意の好適な質量または体積を有し得る。いくつかの場合では、電極の体積は、約0.1フェムトリットル（fL）、約0.5fL、約1fL、約5fL、または約10fLである。いくつかの事例では、電極の体積は、少なくとも約0.1フェムトリットル（fL）、少なくとも約0.5fL、少なくとも約1fL、少なくとも約5fL、または少なくとも約10fLである。いくつかの実施形態では、電極の体積は、最大でも約0.1フェムトリットル（fL）、最大でも約0.5fL、最大でも約1fL、最大でも約5fL、または最大でも約10fLである。

【0050】

電極は、材料の混合物及び合金を含む任意の好適な材料から作製され得る。いくつかの例には、白金、銀、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。いくつかの場合では、電極材料は、電極の動作中に消費されない。電極は、少なくとも2つの酸化状態を有する材料並びに／または電子の求引及び供与の両方が可能な材料を含むことができる。

【0051】

深く密に詰められたウェルを有するチップ

バイオチップ上に高密度のナノ気孔センサを有することは、小さい装置を有するために、及び／または小さいバイオチップ装置で多数の分子を検知もしくは配列決定するために、望ましい場合がある。表面は、任意の好適な密度（例えば、所与の時間でのまたは所与の費用の核酸試料の配列決定に適した密度）の不連続な部位を含む。一実施形態では、表面は、 1 mm^2 当たり約500部位以上の密度の不連続な部位を有する。いくつかの実施形態では、表面は、 1 mm^2 当たり約100、約200、約300、約400、約500、約600、約700、約800、約900、約1000、約2000、約3000、約4000、約5000、約6000、約7000、約8000、約9000、約10000、約20000、約40000、約60000、約80000、約100000、または約500000部位の密度の不連続な部位を有する。いくつかの実施形態では、表面は、 1 mm^2 当たり少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、少なくとも約500、少なくとも約600、少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約900、少なくとも約1000、少なくとも約2000、少なくとも約3000、少なくとも約4000、少なくとも約5000、少なくとも約6000、少なくとも約7000、少なくとも約8000、少なくとも約9000、少なくとも約10000、少なくとも約20000、少なくとも約40000、少なくとも約60000、少なくとも約80000、少なくとも約100000、または少なくとも約500000部位の密度の不連続な部位を有する。

【0052】

高密度の不連続な部位を有するバイオチップは、一般的に、小さい面積のウェルをもたらす。いくつかの事例では、ウェルは、適度に深い（例えば、ウェルが好適に大きい体積を有するように）。いくつかの場合では、ウェルは、チップ表面と実質的に共平面である（すなわち、金属は、ウェル全体を充填する）。一態様では、ウェルの体積は、イオン濃度が電極の再充電前にウェル内で完全に枯渇しないように、適度に大きい。一態様では、電極は、犠牲電極（例えば、銀等の検出中に体積を減少及び／または増加させる電極）であってもよく、ウェルの体積は、電極が、電極の再充電前に完全に枯渇しないように、適度に大きい。いくつかの実施形態では、ウェルは、銀等の電極材料の十分に大きい体積を収容する。とりわけこれらの態様では、ウェルの体積は、電極が電流を検出することができる（すなわち、イオンが枯渇する及び／または電極材料が枯渇する前までの）時間を制

限し得る。

【0053】

いくつかの実施形態では、ウェルは、電極が、約50マイクロ秒間、約100マイクロ秒間、約150マイクロ秒間、約200マイクロ秒間、約250マイクロ秒間、約300マイクロ秒間、約350マイクロ秒間、約400マイクロ秒間、約450マイクロ秒間、約500マイクロ秒間、約550マイクロ秒間、約600マイクロ秒間、約650マイクロ秒間、約700マイクロ秒間、約750マイクロ秒間、約800マイクロ秒間、約850マイクロ秒間、約900マイクロ秒間、約950マイクロ秒間、約1ミリ秒間、約5ミリ秒間、約10ミリ秒間、約50ミリ秒間、約100ミリ秒間、約500ミリ秒間、約1秒間、約5秒間、約10秒間、約50秒間、約100秒間、約500秒間、約1000秒間、または約5000秒間にわたってイオン流（例えば、電流）を検出することができるように、好適に大きい体積を有する。いくつかの実施形態では、ウェルは、電極が、少なくとも約50マイクロ秒間、少なくとも約100マイクロ秒間、少なくとも約150マイクロ秒間、少なくとも約200マイクロ秒間、少なくとも約250マイクロ秒間、少なくとも約300マイクロ秒間、少なくとも約350マイクロ秒間、少なくとも約400マイクロ秒間、少なくとも約450マイクロ秒間、少なくとも約500マイクロ秒間、少なくとも約550マイクロ秒間、少なくとも約600マイクロ秒間、少なくとも約650マイクロ秒間、少なくとも約700マイクロ秒間、少なくとも約750マイクロ秒間、少なくとも約800マイクロ秒間、少なくとも約850マイクロ秒間、少なくとも約900マイクロ秒間、少なくとも約950マイクロ秒間、少なくとも約1ミリ秒間、少なくとも約5ミリ秒間、少なくとも約10ミリ秒間、少なくとも約50ミリ秒間、少なくとも約100ミリ秒間、少なくとも約500ミリ秒間、少なくとも約1秒間、少なくとも約5秒間、少なくとも約10秒間、少なくとも約50秒間、少なくとも約100秒間、少なくとも約500秒間、少なくとも約1000秒間、または少なくとも約5000秒間にわたってイオン流（例えば、電流）を検出することができるように、好適に大きい体積を有する。

【0054】

電極を横断して印加される潜在的電圧を平衡させ、それにより、二重層気孔の両側にイオンを再充電または再分散することによって、気孔のデータ収集寿命は、10、20、もしくは48時間、またはそれ以上に著しく延長され得る。一例は、二重層気孔を横断して、30秒間にわたって+120mVを印加し、その後、電圧を40秒間にわたって-120mVまで下げる、pH7.5で300mM KClイオン溶液を有するナノ気孔システムである。サイクルは、この遅い切り替えDC方法で繰り返され、二重層気孔のシス及びトランス側のイオン電荷分布は平衡のまま保たれ、1つ以上の銀電極に存在するAg及びAgClの構成もまた、平衡を維持する。その結果は、寿命の長いデータ収集気孔検出器である。正及び負電圧のレベルまたは規模並びに+または-極性で費やす時間は、塩またはイオン溶液濃度及び使用される気孔の種類に適合するように異なり得る。

【0055】

検出時間は、ナノ気孔及び/または膜を横断して印加される少なくとも部分的に電圧の規模に左右され得る（例えば、より高い電圧規模によって、より高いイオン電流、電極のより速い枯渇、及びしたがって、比較的より短い検出期間をもたらす）。いくつかの実施形態では、膜を横断する電圧差は、正または負で約0mV～約1V、例えば、約40mV、約60mV、約80mV、約100mV、約120mV、約140mV、約160mV、約180mV、約200mV、約300mV、約400mV、または約500mVである。いくつかの実施形態では、膜を横断する電圧差は、最大でも約40mV、最大でも約60mV、最大でも約80mV、最大でも約100mV、最大でも約120mV、最大でも約140mV、最大でも約160mV、最大でも約180mV、最大でも約200mV、最大でも約300mV、最大でも約400mV、または最大でも約500mVである。いくつかの実施形態では、膜を横断する電圧差は、正または負で少なくとも約0mV～約1V、例えば、少なくとも約40mV、少なくとも約60mV、少なくとも約80mV、少なくとも約100mV、少なくとも約120mV、少なくとも約140mV、少なくと

も約 160 mV、少なくとも約 180 mV、少なくとも約 200 mV、少なくとも約 300 mV、少なくとも約 400 mV、または少なくとも約 500 mV である。電圧は、一定または可変であり得る（例えば、任意の周期波形にわたって異なる）。

【0056】

いくつかの状況では、電極は、正または負で少なくとも約 0 mV ~ 約 1 V、例えば、約 40 mV、約 60 mV、約 80 mV、約 100 mV、約 120 mV、約 140 mV、約 160 mV、約 180 mV、約 200 mV、約 300 mV、約 400 mV、または約 500 mV の加電圧下で、少なくとも約 1 分間（「min」）、2 分間、3 分間、4 分間、5 分間、6 分間、7 分間、8 分間、9 分間、10 分間、15 分間、20 分間、30 分間、40 分間、50 分間、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、または 12 時間の動作寿命を有する。いくつかの例では、電極は、約 80 mV の加電圧下で少なくとも約 15 分間の動作寿命を有する。

10

【0057】

電極の動作寿命は、使用中の電極の枯渇（例えば、枯渇の速度）に基づいて評定され得る。いくつかの場合では、電極材料は、電極の使用、約 60 分、30 分、20 分、15 分、10 分、5 分、4 分、3 分、2 分、または 1 分以下の時間内に最大でも約 50 %、40 %、30 %、20 %、10 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、1 %、0.1 %、または 0.01 % 枯渇する。いくつかの実施形態では、電極材料は、電極の使用、約 60 分、30 分、20 分、15 分、10 分、5 分、4 分、3 分、2 分、または 1 分以下の時間内に枯渇しない。

20

【0058】

ウェルは、任意の好適な深さを有し得る。いくつかの場合では、ウェルの深さは、バイオチップの表面及び/または膜の下部から電極の上部及び/または電極の下部に向けて測定される。いくつかの場合では、ウェルの深さは、酸化物層の厚さとほぼ同じである（例えば、図 2 の 203）。いくつかの実施形態では、ウェルは、約 0.5 マイクロメートル（ μm ）、約 1 μm 、約 1.5 μm 、約 2 μm 、約 2.5 μm 、約 3 μm 、約 3.5 μm 、約 4 μm 、約 4.5 μm 、約 5 μm 、約 6 μm 、約 7 μm 、約 8 μm 、約 9 μm 、約 10 μm 、または約 20 μm の深さである。いくつかの実施形態では、ウェルは、少なくとも約 0.5 マイクロメートル（ μm ）、少なくとも約 1 μm 、少なくとも約 1.5 μm 、少なくとも約 2 μm 、少なくとも約 2.5 μm 、少なくとも約 3 μm 、少なくとも約 3.5 μm 、少なくとも約 4 μm 、少なくとも約 4.5 μm 、少なくとも約 5 μm 、少なくとも約 6 μm 、少なくとも約 7 μm 、少なくとも約 8 μm 、少なくとも約 9 μm 、少なくとも約 10 μm 、または少なくとも約 20 μm の深さである。

30

【0059】

一態様では、バイオチップは、ウェルにわたって配置される膜と、実体が気孔を通過するのに応答して膜内の気孔を通るイオンの流れの変化を検出することができるウェル内の電極と、を有する複数のウェルを含む。バイオチップは、1 平方ミリメートル当たり少なくとも 500 個のウェルを含んでもよく、ウェルは、電極が電極を再充電することなく少なくとも 100 個の実体を検出することができるように、好適に大きい体積を有してもよい。

40

【0060】

いくつかの実施形態では、実体は、ヌクレオチド取り込み事象中に検出される標識分子である。いくつかの事例では、ポリマーは、気孔を通過し、実体は、ポリマーのサブユニットである。いくつかの場合では、ポリマーは、核酸であり、ポリマーのサブユニットは、核酸塩基である。

【0061】

バイオチップは、電極を再充電することなく任意の好適な数の実体を検出することができる。いくつかの場合では、約 10、約 50、約 100、約 500、約 1000、約 5000、約 10000、約 50000、約 100000、約 500000、約 1000000、約 5000000、または約 10000000 個の実体が検出される。いくつかの場

50

合では、少なくとも約 10、少なくとも約 50、少なくとも約 100、少なくとも約 500、少なくとも約 1000、少なくとも約 5000、少なくとも約 10000、少なくとも約 50000、少なくとも約 100000、少なくとも約 500000、または少なくとも約 1000000 個の実体が検出される。

【0062】

密に詰められたウェル及び最小クロストークを有するチップ

一態様では、ウェルは、密に詰められ、低量のクロストークを有する（例えば、電極は、それらの信号の全てまたはそのほとんどを電極に最も近いナノ気孔及び/または膜から導出する）。一態様では、バイオチップは、ウェルにわたって配置される膜と、イオンの流れにตอบสนองして信号を検出するウェル内の電極と、を有する複数のウェルを含み、バイオチップは、1平方ミリメートル当たり少なくとも500個のウェルを含み、電極は、互いに電氣的に隔てられる。バイオチップは、本明細書に記載される面積当たり任意の好適な数のウェルを含む。

10

【0063】

いくつかの実施形態では、電極は、膜内のナノ気孔を通るイオンの流れからのその信号の約80%、約90%、約95%、約99%、約99.5%、または約99.9%を検出する。いくつかの事例では、電極は、膜内のナノ気孔を通るイオンの流れからのその信号の少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または少なくとも約99.9%を検出する。いくつかの場合では、電極は、隣接するウェル内のナノ気孔を通るイオンの流れからのその信号の20%以下、10%以下、5%以下、1%以下、0.5%以下、または0.1%以下を検出する。

20

【0064】

バイオチップを作製する方法

ある特定の方法を使用して、とりわけ、腐食性溶液に耐え、高い抵抗力を有するバイオチップ上に膜を形成することができる高品質のバイオチップを作製することができる。一態様では、バイオチップを調製するための方法は、半導体基板を提供することと、基板上または基板に隣接して電気測定を実施することができる電極を備える複数のウェルを形成することと、を含み、本方法は、(a)腐食性溶液に耐えるように基板を処理することと、(b)高い抵抗力でウェルを封止する膜の形成のために基板を調製することと、を更に含む。

30

【0065】

膜は、任意に好適な高い抵抗力を有し得る。いくつかの場合では、抵抗力は、約10メガオーム(M)、約50M、約100M、約500M、約1ギガオーム(G)、約5G、または約10Gである。いくつかの場合では、抵抗力は、少なくとも約10メガオーム(M)、少なくとも約50M、少なくとも約100M、少なくとも約500M、少なくとも約1ギガオーム(G)、少なくとも約5G、または少なくとも約10Gである。

【0066】

いくつかの実施形態では、半導体基板は、ケイ素を含む。いくつかの事例では、膜は、脂質二重層である。電極は、膜に埋め込まれたナノ気孔を通るイオン電流の流れを測定することができる。

40

【0067】

装置は、任意の好適な腐食性溶液に耐え得る。いくつかの場合では、腐食性溶液は、水性(水を含む)であり、イオン(例えば、 Na^+ 、 Cl^-)を含むいくつかの場合では、バイオチップは、何週間にもわたって1M NaCl と接触した後に動作可能である。

【0068】

一態様では、バイオチップを調製するための方法は、(a)反応性酸化物基を有する材料を半導体基板上に堆積させることと、(b)ウェルを二酸化ケイ素中にエッチングする

50

ことと、(c) ウェル内に金属電極を形成することと、(d) ウェルを除く基板の全ての区域から金属を除去することと、(e) 基板を膜の接着に適した層でコーティングすることと、を含む。いくつかの場合では、半導体基板は、ケイ素を含む。方法は、ナノ気孔を使用する核酸配列決定に使用するためのバイオチップを調製することができる。

【0069】

いくつかの実施形態では、(a) における材料は、二酸化ケイ素である。材料は、その表面と接触している溶液に対して、反応性酸化物(-OH)基の均一な被覆を呈する硬い平面を示し得る。これらの酸化物基は、その後のシリル化プロセス(e)のための結合点であり得る。あるいは、親油性及び疎水性表面材料を堆積させ、ケイ素酸化物のエッチング特性を模倣してもよい。

10

【0070】

いくつかの実施形態では、パッシベーション層が、(a)の半導体基板上に堆積し、これは、反応性酸化物基を有してもよく、有しなくてもよい。パッシベーション層は、窒化ケイ素(Si₃N₄)またはポリミドを含み得る。いくつかの事例では、写真平版操作は、膜がパッシベーション層上に形成される領域を画定するために使用される。

【0071】

図8~図20は、バイオチップをもたらすことができる操作の一例を示す。全ての図面は、必ずしも縮尺通りではない。

【0072】

図8を参照して、バイオチップを製造するための方法は、半導体基板から始めることができる。半導体(例えば、ケイ素)は、金属等の導電層を含むが、これらに限定されない、その上に配置される任意の数の層を有し得る。導電層は、いくつかの事例では、アルミニウムである。いくつかの場合では、基板は、保護層(例えば、窒化チタン)を有する。層は、例えば、化学蒸着(CVD)、原子層堆積(ALD)、プラズマ増強CVD(PECVD)、プラズマ増強ALD(PEALD)、金属有機CVD(MOCVD)、熱線CVD(HWCVD)、開始CVD(iCVD)、修飾CVD(MCVD)、軸蒸着(VAD)、外側蒸着(OD)、及び物理蒸着(例えば、スパッタ堆積、蒸発堆積)等の様々な堆積技法を用いて堆積し得る。

20

【0073】

いくつかの場合では、酸化物層は、図9に示されるように半導体基板上に堆積される。いくつかの事例では、酸化物層は、二酸化ケイ素を含む。二酸化ケイ素は、テトラエチルオルトケイ酸塩(TEOS)、高密度プラズマ(HDP)、またはそれらの任意の組み合わせを使用して堆積することができる。

30

【0074】

いくつかの事例では、二酸化ケイ素は、低温技法を使用して堆積する。いくつかの場合では、プロセスは、ケイ素酸化物の低温化学蒸着である。温度は、チップ上の既存の金属が損傷しないように、概して十分に低い。堆積温度は、約50、約100、約150、約200、約250、約300、約350等であり得る。いくつかの実施形態では、堆積温度は、約50未満、約100未満、約150未満、約200未満、約250未満、約300未満、約350未満等である。堆積は、任意の好適な圧力で実施され得る。いくつかの事例では、堆積プロセスは、RFプラズマエネルギーを使用する。

40

【0075】

いくつかの場合では、酸化物は、(例えば、1,000付近または1,000を超える温度を使用することができる)熱成長酸化物手順では、堆積しない。

【0076】

二酸化ケイ素は、電極を含むウェルの形成に適した厚さまで、並びに、電極を再充電することなく、核酸分子の少なくとも100、少なくとも1000、少なくとも10000、少なくとも100000、または少なくとも1000000個の核酸塩基を配列決定することができる電解質の体積まで、堆積し得る。

50

【 0 0 7 7 】

二酸化ケイ素は、任意の好適な厚さまで堆積し得る。いくつかの実施形態では、二酸化ケイ素は、約 0.5 マイクロメートル (μm)、約 1 μm 、約 1.5 μm 、約 2 μm 、約 2.5 μm 、約 3 μm 、約 3.5 μm 、約 4 μm 、約 4.5 μm 、約 5 μm 、約 6 μm 、約 7 μm 、約 8 μm 、約 9 μm 、約 10 μm 、または約 20 μm の厚さである。いくつかの実施形態では、二酸化ケイ素は、少なくとも約 0.5 マイクロメートル (μm)、少なくとも約 1 μm 、少なくとも約 1.5 μm 、少なくとも約 2 μm 、少なくとも約 2.5 μm 、少なくとも約 3 μm 、少なくとも約 3.5 μm 、少なくとも約 4 μm 、少なくとも約 4.5 μm 、少なくとも約 5 μm 、少なくとも約 6 μm 、少なくとも約 7 μm 、少なくとも約 8 μm 、少なくとも約 9 μm 、少なくとも約 10 μm 、または少なくとも約 20 μm の厚さである。

10

【 0 0 7 8 】

ウェルエッチング

ウェルは、様々な製造技法を使用して二酸化ケイ素基板内で創出され得る。そのような技法には、半導体製作技法が挙げられる。いくつかの場合では、ウェルは、半導体産業で使用されるもの等の写真平版技法を使用して創出される。例えば、フォトレジスト（例えば、電磁放射線に曝露されるときに性質を変化させる材料）は、図 10 に示されるように、任意の好適な厚さまで二酸化ケイ素上にコーティングされ得る（例えば、ウエハのスピコンコーティング）。次いで、フォトレジストを含む基板は、電磁放射源に曝露される。ウェルの区域を画定するために、マスクを使用してフォトレジストの一部からの放射線を遮蔽することができる。フォトレジストは、ネガ型レジストまたはポジ型レジストであり得る（例えば、マスクによって画定されるように、ウェルの区域が電磁放射線に曝露され得るか、またはウェル以外の区域が電磁放射線に曝露され得る）。図 11 では、その中にウェルが創出される場所を覆っている区域は、電磁放射線に曝露され、二酸化ケイ素層内のウェルの場所及び分散に対応するパターンを画定する。フォトレジストは、ウェルに対応するパターンを画定するマスクを通して電磁放射線に曝露され得る。次に、フォトレジストの曝露された部分は、例えば、洗浄操作（例えば、TMAH（テトラメチルアンモニウム水酸化物）の 2% 溶液または当業者に既知の他の溶液）を用いて除去される。マスクの除去された部分は、次いで、基板をエッチングするために化学エッチング液に曝露されてもよく、ウェルのパターンを二酸化ケイ素層に移す。エッチング液には、例えば、硫酸（ H_2SO_4 ）等の酸が挙げられる。二酸化ケイ素層は、異方性様式でエッチングされてもよいが、いくつかの場合では、エッチングは、等方性であってもよい。例えば、図 13 を参照して、最終ウェルの区域に正確に一致しない区域が、エッチングされてもよい（例えば、ウェルは、フォトレジスト下でエッチングされてもよい）。

20

30

【 0 0 7 9 】

様々なエッチング手順を使用して、ウェルが形成される区域内的の二酸化ケイ素をエッチングすることができる。図 12 及び図 13 に示されるように、エッチングは、等方性エッチング（すなわち、一方向に沿うエッチング速度が、直交方向に沿うエッチング速度と同じである）、もしくは異方性エッチング（すなわち、一方向に沿うエッチング速度が、直交方向に沿うエッチング速度を下回る）、またはそれらの変異形であってもよい。

40

【 0 0 8 0 】

いくつかの場合では、異方性エッチングは、ウェルの体積の大半を除去する。約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、または約 95% を含む、ウェル体積の任意の好適な割合が、除去され得る。いくつかの場合では、材料の少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 95% は、異方性エッチングで除去される。いくつかの場合では、材料の最大でも約 60%、最大でも約 70%、最大でも約 80%、最大でも約 90%、または最大でも約 95% が、異方性エッチングで除去される。いくつかの実施形態では、異方性エッチングは、半導体基板に達するまで全ての二酸化ケイ素材料を除去しない。等方性エッチングは、いくつかの事例では、半導体基板に達するまで全ての二酸化ケイ素材料を除去する。

50

【0081】

いくつかの場合では、ウェルは、ウェルを画定するために写真平版操作を使用してエッチングされ、ハイブリッドドライ - ウェットエッチングが続く。写真平版操作は、二酸化ケイ素をフォトレジストでコーティングすること、並びにウェルを画定するパターンを有するマスク（またはレクチル）を通してフォトレジストを電磁放射線に曝すことを含む得る。いくつかの事例では、ハイブリッドドライ - ウェットエッチングは、（a）写真平版操作によって、フォトレジスト内で画定されるウェル領域内の二酸化ケイ素の大半を除去するためのドライエッチング、（b）バイオチップの清浄、並びに（c）ウェル領域内の基板から残りの二酸化ケイ素を除去するためのウェットエッチング、を含む。

【0082】

バイオチップは、プラズマエッチング化学を用いて、または例えば、 H_2O_2 、 O_2 、または O_3 等の酸化剤に曝すことによって、清浄することができる。清浄は、残留ポリマーの除去、ウェットエッチングを遮断することができる材料の除去、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。いくつかの事例では、清浄は、プラズマ清浄である。清浄操作は、任意の好適な時間（例えば、15～20秒間）にわたって継続してもよい。一例では、清浄は、100mT、200W、20G、2002の設定でApplied Materials eMax - CT機械を用いて、20秒間にわたって実施されてもよい。

【0083】

ドライエッチングは、横方向（例えば、半導体基板に平行）ではなく、（例えば、半導体基板に対して）垂直にエッチングする、異方性エッチングであってもよい。いくつかの事例では、ドライエッチングは、 CF_4 、 CHF_3 、 C_2F_6 、 C_3F_6 、またはそれらの任意の組み合わせ等のフッ素系エッチング液を用いるエッチングを含む。1つの例では、エッチングは、100mT、1000W、20G、及び50 CF_4 の設定を有するApplied Materials eMax - CT機械を用いて、400秒間にわたって実施される。

【0084】

ウェットエッチングは、全方向で材料を除去する等方性エッチングであってもよい。いくつかの事例では、ウェットエッチングは、フォトレジストの下を切り取る。フォトレジストの下を切り取ることで、後の操作（例えば、フォトレジストの「剥離」）においてフォトレジストを容易に除去することができる。一実施形態では、ウェットエッチングは、バッファード酸化物エッチング（BOE）である。いくつかの場合では、ウェット酸化物エッチングは、エッチング速度を遅くさせるために（例えば、フッ化アンモニウムで）中和され得るフッ化水素酸塩基を用いて室温で実施される。エッチング速度は、エッチングされるフィルム並びにHF及び/または NH_4F の特定の濃度に左右され得る。酸化物層を完全に除去するために必要とされるエッチング時間は、典型的には、実験的に決定される。1つの例では、エッチングは、15：1のBOE（バッファード酸化物エッチング）を用いて22で実施される。

【0085】

二酸化ケイ素層は、底にある材料層までエッチングされ得る。例えば、図13を参照して、二酸化ケイ素層は、窒化チタン層までエッチングされる。

【0086】

一態様では、バイオチップを調製するための方法は、（a）ウェルを画定するための写真平版操作、（b）写真平版操作によって画定されるウェル領域内の二酸化ケイ素の大半を除去するためのドライエッチング、並びに（c）ウェル領域内の基板から残りの二酸化ケイ素を除去するためのウェットエッチング、を使用して、ウェルを半導体基板上にコーティングされる二酸化ケイ素層内にエッチングすることを含む。いくつかの場合では、本方法は、残留ポリマーの除去、ウェットエッチングを遮断することができる材料の除去、またはそれらの組み合わせを更に含む。方法は、プラズマ清浄操作を含む得る。

【0087】

図13に示されるように、フォトレジストは、いくつかの場合では、写真平版操作また

10

20

30

40

50

はハイブリッドウェット - ドライエッチングに続いて、二酸化ケイ素から除去されない。フォトレジストを残すことは、後の操作において、二酸化ケイ素の上部表面上にではなく、ウェル内のみに金属を方向付けるために使用され得る。いくつかの場合では、半導体基板は、金属でコーティングされ（例えば、図 13 におけるアルミニウム）、ウェットエッチングは、金属を腐食から保護する成分を除去しない（例えば、図 13 における窒化チタン（TiN））。いくつかの場合では、しかしながら、フォトレジスト層は、SPM（硫黄 / 過酸化物の混合物）または有機溶媒等の湿式化学を用いて除去され得る。他の実施形態では、フォトレジスト層は、酸素プラズマを用いて除去されてもよい。

【0088】

電極金属化

10

本明細書に記載されるバイオチップは、ナノ気孔及び電気検出を用いて、分子を検出する、及び / または核酸分子を配列決定するために使用することができる。電気検出は、ウェル内の電極及びウェルの外に位置する対電極を用いて実施することができる。金属電極等の電極を創出するための方法が本明細書に提供される。電極は、検出中に可逆的に消費される、検出中に消費されない、または検出中にかなり消費されない場合がある。

【0089】

分子検出中に可逆的に消費され得る電極の一例は、銀である。検出中にかなり消費され得ない電極の一例は、白金である。

【0090】

電極は、様々な堆積技法を用いて基板に隣接して形成することができる。例えば、電極は、電気メッキを用いて形成することができる。別の例としては、電極は、例えば、化学蒸着（CVD）、原子層堆積（ALD）、プラズマ増強CVD（PECVD）、プラズマ増強ALD（PEALD）、金属有機CVD（MOCVD）、熱線CVD（HWCVD）、開始CVD（iCVD）、修飾CVD（MCVD）、軸蒸着（VAD）、外側蒸着（OVD）、及び物理蒸着（例えば、スパッタ堆積、蒸発堆積）等の蒸着技法を用いて形成することができる。

20

【0091】

一態様では、バイオチップを調製するための方法は、（a）ウェルが二酸化ケイ素中にエッチングされる、二酸化ケイ素の層でコーティングされた半導体基板を提供することと（例えば、図 13 に示されるように）、（b）保護層をウェル表面上に堆積させることと（例えば、図 15 に示されるように、窒化チタンまたは白金）、（c）電極材料をウェル表面上に堆積させることと（例えば、図 16 に示されるように銀）、を含む。方法は、金属層と金属層の下層との接着及び電気伝導率を提供するために、接着材料のフィルムをウェル表面上に堆積させることを更に含み得る。接着材料は、チタン、タンタル、窒化チタン（TiN）、クロム、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。図 14 を参照して、チタンを含む接着材料は、例えば、電気メッキまたは蒸着（例えば、化学蒸着）によって、窒化チタン層に隣接して堆積する。いくつかの場合では、金属の単一層は、2 つ以上の層（例えば、単一金属層は、接着層と保護層との両方）に置き換えられる。

30

【0092】

いくつかの場合では、保護層は、耐食性金属（例えば、白金、金）を含む。制限することなく、保護層は、（i）底にある伝導体（例えば、図 14 のアルミニウム、または窒化チタン）に電気接続性を提供する、（ii）底にある伝導体を反応溶液（例えば、水中の塩化ナトリウム等の腐食性溶液）による攻撃から保護する、（iii）酸化還元反応において電極材料が消費されないように電子源及び / もしくはシンクを提供する（例えば、白金は、電極が銀を含むとき、ソース及び / またはシンクとして作用し得る）、または（iv）それらの任意の組み合わせが可能である。

40

【0093】

金属の様々な層（例えば、接着層、保護層、電極材料等）は、スパッタリング、堆積、電気メッキ、またはそれらの組み合わせ等の任意の好適な技法で堆積することができる。いくつかの事例では、電極材料は、例えば、マグネトロンスパッタリング等のスパッタリ

50

ングによって堆積する。

【 0 0 9 4 】

電極は、バイオチップの操作に必要とされる任意の好適な測定を行うことができる。いくつかの場合では、電極材料は、ウェル内の分析物の電気測定を行う。分析物は、核酸、アミノ酸、タンパク質、標識分子、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。電気測定は、可逆酸化還元反応であり得る。いくつかの実施形態では、ウェル内の分析物に関わる酸化還元反応の検出を提供するために、電極材料の十分な体積がウェル中に堆積される。

【 0 0 9 5 】

剥離手順

10

図 1 6 に示されるように、電極の金属化に続いて、フォトレジスト上に堆積された金属の 1 つ以上の層が存在し得る。いくつかの事例では、フォトレジスト上に堆積された金属は、ウェル内に堆積された金属をウェル内に残したまま、バイオチップから除去される。ウェルの創出後、フォトレジストを残すことは（例えば、図 1 3 に示されるように）、ウェルではなくバイオチップの表面のみからの金属除去を達成するために有利であり得る。

【 0 0 9 6 】

いくつかの状況では、ウェル及び電極の形成後、フォトレジストは省かれてもよく、電極ウェルの外側の金属は、化学機械研磨、及び所望に応じて、その後のウェットまたは反応性イオンエッチング（R I E）によるエッチングを用いて除去されてもよい。一例では、CMP を使用して、それをウェル内に保ったまま、チップの表面上の電極金属の積み重なりを除去する（ダマシンプロセス）。別の例では、フォトレジスト及び任意の覆っている層は、アセトンまたは別のレジスト溶剤を使用して除去される（剥離プロセス）。

20

【 0 0 9 7 】

バイオチップ表面のシリル化

ウェル及びウェル内の電極の形成後、二酸化ケイ素層は、ウェル内またはウェルに隣接して膜を形成するのに適した二酸化ケイ素層を与えるように処理されてもよい。いくつかの場合では、例えば、二重層（例えば、脂質二重層）等の疎水性膜は、ウェルにわたって形成される。膜は、例えば、エッチングされたウェルを、少なくとも約 1 0 ギガオームの抵抗力で覆っている液体から隔てることができる。本明細書に記載されるように、二酸化ケイ素表面のシリル化（例えば、表面を疎水性にするための）は、膜の形成に適した表面を形成する。

30

【 0 0 9 8 】

膜を半導体界面に安定化させるための方法は、膜が、シリル化された表面を接着し、例えば、少なくとも約 1 0 ギガオームの抵抗力で、第 1 の流体（例えば、膜のシス側上）を第 2 の流体（例えば、膜のトランス側上）から分離できるように、半導体表面をシリル化することを含む。

【 0 0 9 9 】

バイオチップを調製するための方法は、（ a ）二酸化ケイ素及び／もしくは金属（例えば、図 1 7 に示される）を含む表面を有するパッケージ化されたバイオチップまたはバイオチップ前身を提供することと、（ b ）例えば、有機官能性アルコキシシラン分子を使用して表面（例えば、図 1 8 に示される）をシリル化することと、を含む。いくつかの場合では、有機官能性アルコキシシラン分子は、ジメチルクロロ - オクトデシル - シラン、ジメチルメトキシ - オクトデシル - シラン、メチルジクロロ - オクトデシル - シラン、トリクロロ - オクトデシル - シラン、トリメチル - オクトデシル - シラン、トリエチル - オクトデシル - シラン、またはそれらの任意の組み合わせである。

40

【 0 1 0 0 】

有機官能性アルコキシシラン分子は、二酸化ケイ素表面を被覆することができる（図 1 8 に示される）。シラン層は、1 分子の厚さであり得る（図 1 8 ）。

【 0 1 0 1 】

シリル化に続いて、本方法は、漱ぎプロトコルによって残留シランを基板から除去する

50

ことを更に含み得る。一例となる漱ぎプロトコルは、デカン、アセトン、エタノール、水、及びエタノールによる5秒間の漱ぎに続く、空気乾燥及び97で30分間にわたる加熱である。漱ぎプロトコルはまた、シラン層への適用前にチップを清浄するために使用することもできる。

【0102】

図21は、銀及びその下の保護金属がウェルの側壁上でスパッタリングすることができ、このため、シリル化がウェル中にまで達し得ないことを示す。いくつかの事例では、ウェルの側壁の4分の3以上が、銀及びその下の保護層で被覆される。

【0103】

二重層の形成

半導体ナノ気孔センサチップを作り出す、電極のアレイ上に脂質二重層及びナノ気孔（例えば、個別に制御される）を創出するための方法が、本明細書に記載される。チップは、核酸配列等のポリマー配列または任意の標識された分子の存在を決定するために使用することができる。

【0104】

半導体センサチップ上の電極のアレイにわたって脂質二重層を形成するための技法が、本明細書に記載される。一実施形態では、脂質分子を含有する液体が、チップの表面に挿入される。液体は、気泡によって分離され得る。脂質分子は、表面上に分散されてもよく、気泡は、電極の各々にわたって脂質二重層を自然発生的に形成するように脂質を菲薄化する。更なる電気刺激が、二重層形成を促進するために電極に適用されてもよい。ナノ気孔タンパク質を含有する溶液が、堆積する脂質の上部の上に更に適用されてもよい。更に多くの気泡が、二重層へのナノ気孔の挿入を促進するためにチップを横断して転がされてもよい。これらの技法は、フローセルの有無に関わらず行うことができる。いくつかの場合では、更なる刺激が、二重層または気孔の創出を誘導するために適用されてもよい。そのような刺激には、圧力、超音波処理、及び/または音波パルスが挙げられる。刺激は、緩衝剤（約5.0～約8.5のpH範囲）、イオン溶液（例えば、NaCl、KCl；約75mM～約1M）、気泡、化学物質（例えば、ヘキサン、デカン、トリデカン等）、物的移動、センサチップへの電気刺激もしくは電気刺激パルス、圧力もしくは圧力パルス、温度もしくは温度パルス、超音波処理パルス、及びまたは音波パルスの任意の組み合わせを含み得る。

【0105】

図22に示されるように、気泡2205は、大きく、複数のウェル2210に隣接して保持されることができ、各ウェル2210は、電極を備える。気泡は、脂質を電極に隣接する領域からずらし、電極（複数可）を被覆する（a）脂質二重層（複数可）を生み出すことができる。いくつかの場合では、気泡の縁部は、脂質溶液2215と接触させられ、脂質溶液のうちの一部は、気泡2205の下2220に拡散して、ウェル2210及び電極（複数可）を被覆する（a）脂質二重層（複数可）を形成する。気泡は、気体（または蒸気）気泡であり得る。気泡は、例えば、空気、酸素、窒素、アルゴン、ヘリウム、水素、または炭素 dioxide 等の単一気体または気体の組み合わせを含み得る。同様に、図30は、本明細書に提供される二重層形成方法の別の例示を提供する。

【0106】

気泡は、任意の好適な数の電極を被覆する及び/またはそこに隣接することができる。いくつかの場合では、気泡は、約100、約1000、約10000、約100000、約1000000、または約10000000個の電極に隣接する。いくつかの事例では、気泡は、少なくとも約100、少なくとも約1000、少なくとも約10000、少なくとも約100000、少なくとも約1000000、または少なくとも約10000000個の電極に隣接する。

【0107】

気泡は、任意の好適な時間（例えば、脂質二重層を形成するのに十分長い間）電極に隣接したままであってもよい。いくつかの場合では、気泡は、約10ミリ秒間～約10分間

10

20

30

40

50

、例えば、0.5秒間（複数可）、約1秒間、約3秒間、約5秒間、約10秒間、約20秒間、約30秒間、約45秒間、約60秒間、約1.5分間（min）、約2分間、約3分間、約4分間、約5分間、または約10分間にわたって電極に隣接して保持される。いくつかの場合では、気泡は、少なくとも約0.5秒間（複数可）、少なくとも約1秒間、少なくとも約3秒間、少なくとも約5秒間、少なくとも約10秒間、少なくとも約20秒間、少なくとも約30秒間、少なくとも約45秒間、少なくとも約60秒間、少なくとも約1.5分間（min）、少なくとも約2分間、少なくとも約3分間、少なくとも約4分間、少なくとも約5分間、または少なくとも約10分間にわたって電極に隣接して保持される。いくつかの場合では、気泡は、最大でも約0.5秒間（複数可）、最大でも約1秒間、最大でも約3秒間、最大でも約5秒間、最大でも約10秒間、最大でも約20秒間、最大でも約30秒間、最大でも約45秒間、最大でも約60秒間、最大でも約1.5分間（min）、最大でも約2分間、最大でも約3分間、最大でも約4分間、最大でも約5分間、または最大でも約10分間にわたって電極に隣接して保持される。いくつかの事例では、気泡は、約1秒間～約10分間、約10秒間～約5分間、または約30秒間～約3分間にわたって電極に隣接して保持される。

10

【0108】

一態様では、ナノ気孔検知装置において使用するための脂質二重層を形成するための方法は、複数の検知電極と流体連通している流体流路を含むプライミングされたチップを提供することと、脂質溶液を流体流路中に流入し、気泡を流体流路上に流入して、それにより、検知電極の各々に隣接して脂質二重層を形成することと、を含む。本明細書に使用する場合、プライミングされたチップは、ウェルまたはチャネルの全てを充填する、チップ上のKClまたはイオン溶液の初期流動を有するチップである。図7は、2つの流体流路を有する装置の一例を示し、図24は、5つの流体流路を有する装置の一例を示す。いくつかの実施形態では、気泡は、複数の検知電極にまたがり、少なくとも約1秒間にわたって検知電極に隣接する。気泡は、少なくとも約10ミリ秒間～約10分間、例えば、5秒間、少なくとも約10秒間、少なくとも約30秒間、及び/または最大でも約1分間、2分間、3分間、4分間、5分間、もしくは10分間にわたって検知電極または検知電極を含有するウェルに隣接し得る。いくつかの場合では、ナノ気孔は、検知電極の各々に隣接する脂質二重層内に挿入される。

20

【0109】

一態様では、ナノ気孔検知装置において使用するための脂質二重層を形成するための方法は、複数の検知電極と流体連通している流体流路を含むプライミングされたチップを提供することと、気泡を流体流路上に流入することであって、気泡が複数の検知電極にまたがることと、気泡の周辺部を脂質と接触させることと、を含む。脂質は、気泡の下及び流体流路上に拡散し得る（例えば、それにより、検知電極の各々に隣接して脂質二重層を形成する）。いくつかの場合では、本方法は、ナノ気孔を検知電極の各々に隣接する脂質二重層内に挿入することを更に含む。

30

【0110】

気泡は、任意の好適な時間（例えば、脂質二重層を形成するのに十分長い間）にわたって脂質と接触させられ得る。いくつかの場合では、気泡は、約0.5秒間（複数可）、約1秒間、約3秒間、約5秒間、約10秒間、約20秒間、約30秒間、約45秒間、約60秒間、約1.5分間（min）、約2分間、約3分間、約4分間、約5分間、または約10分間にわたって脂質と接触させられる。いくつかの場合では、少なくとも約0.5秒間（複数可）、少なくとも約1秒間、少なくとも約3秒間、少なくとも約5秒間、少なくとも約10秒間、少なくとも約20秒間、少なくとも約30秒間、少なくとも約45秒間、少なくとも約60秒間、少なくとも約1.5分間（min）、少なくとも約2分間、少なくとも約3分間、少なくとも約4分間、少なくとも約5分間、または少なくとも約10分間にわたって脂質と接触させられる。いくつかの場合では、気泡は、最大でも約0.5秒間（複数可）、最大でも約1秒間、最大でも約3秒間、最大でも約5秒間、最大でも約10秒間、最大でも約20秒間、最大でも約30秒間、最大でも約45秒間、最大でも約

40

50

60秒間、最大でも約1.5分間(min)、最大でも約2分間、最大でも約3分間、最大でも約4分間、最大でも約5分間、または最大でも約10分間にわたって脂質と接触せられる。いくつかの事例では、気泡は、約1秒間～約10分間、約10秒間～約5分間、または約30秒間～約3分間にわたって脂質と接触せられる。

【0111】

方法は、任意の割合の電極にわたって脂質二重層を形成することができる。いくつかの場合では、脂質二重層は、検知電極の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%にわたって形成される。いくつかの例では、脂質二重層は、検知電極の約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、または約90%、または約100%にわたって形成される。

10

【0112】

二重層は、脂質二重層のシス側の溶液と二重層のトランス側の溶液との間に電気抵抗を提供することができる。いくつかの場合では、抵抗は、約100メガオーム(M)、約500M、約1ギガオーム(G)、約10G、または約100Gである。いくつかの場合では、抵抗は、少なくとも約100メガオーム(M)、少なくとも約500M、少なくとも約1ギガオーム(G)、少なくとも約10G、または少なくとも約100Gである。いくつかの実施形態では、抵抗は、約1テラオーム(T)である。

20

【0113】

ナノ気孔を挿入することは、脂質二重層内のナノ気孔の挿入を促進するために電極を通して電気刺激(例えば、電圧パルスまたは電流パルス)を適用することを含み得る。代替として、または加えて、ナノ気孔は、例えば、圧力パルス、または緩衝剤(約5.0～約8.5のpH範囲)、イオン溶液(例えば、NaCl、KCl;約75mM～約1M)、気泡、化学物質(例えば、ヘキサン、デカン、トリデカン等)、物的移動、センサチップへの電気刺激もしくは電気刺激パルス、圧力もしくは圧力パルス、温度もしくは温度パルス、超音波処理パルス、及びまたは音波パルスの任意の組み合わせ等の1つ以上の他の刺激を適用することによって挿入され得る。ナノ気孔は、任意のナノ気孔(例えば、タンパク質ナノ気孔)であり得る。いくつかの実施形態では、ナノ気孔は、マイコバクテリウム・スメグマチスポリリンA(MspA)、溶血素、スメグマチスポリリンA(MspA)もしくは溶血素のうちの少なくとも1つと少なくとも70%の相同性を有する任意のタンパク質、またはそれらの任意の組み合わせである。

30

【0114】

いくつかの事例では、二重層を横断する抵抗は、ナノ気孔の挿入に応じて低減される。ナノ気孔挿入後の二重層は、脂質二重層のシス側の溶液と二重層のトランス側の溶液との間に電気抵抗を提供することができる。いくつかの場合では、ナノ気孔挿入後の抵抗は、約1メガオーム(M)、約10M、約100M、約500M、約1ギガオーム(G)である。いくつかの場合では、ナノ気孔挿入後の抵抗は、最大でも約1メガオーム(M)、最大でも約10M、最大でも約100M、最大でも約100M、最大でも約500M、最大でも約1ギガオーム(G)である。

40

【0115】

脂質は、任意の好適な脂質または脂質の混合物であり得る。いくつかの場合では、脂質は、有機溶媒中で溶解される。いくつかの実施形態では、脂質は、ジフィタノイルホスファチジルコリン(DPhPC)、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、リゾホスファチジルコリン(LPC)、1,2-ジ-O-フィタニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPhPC)、パルミトイル-オレオイル-ホスファチジルコリン(POPC)、ジオレオイル-ホスファチジル-メチルエステル(DOPME)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、スフィンゴミエリン、1,2-ジ-O-フ

50

イタニル - s n - グリセロール ; 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 3 5 0] ; 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 5 5 0] ; 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 7 5 0] ; 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 1 0 0 0] ; 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2 0 0 0] ; 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - ラクトシル ; G M 1 ガングリオシド、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

10

【 0 1 1 6 】

一態様では、ナノ気孔センサで使用するための脂質二重層を形成するための方法は、その上に材料層を有する電極（または電極を備えるウェル）を含む流路に緩衝液を方向付けることを含む。緩衝液は、導電性であってもよく、材料層は、1つ以上の脂質を含み得る。次に、緩衝液は、材料層と接触してもよく、1つ以上の電圧が、二重層形成を促すために電極に印加されてもよい。続いて、電極を通る電流を測定して、材料層の少なくとも一部が電極を被覆しかつ封止しているか、及び/または電極の全てもしくは一部分にわたって二重層を形成しているかどうかを決定することができる。印加電圧は、電極上の二重層封止を破るのに十分であってもよく、短絡電流の流れを生じる。材料層の少なくとも一部が電極を被覆しかつ封止しているか、及び/または電極の全てもしくは一部分にわたって二重層を形成しているかの決定に基づいて、刺激は、材料層の少なくとも一部が電極に隣接して脂質二重層を形成するように、電極の全て、電極の群、または個々の電極に同時に適用されてもよい。

20

【 0 1 1 7 】

いくつかの実施形態では、刺激には、電極アレイの表面上の液体流、アレイの表面上の1つ以上の異なる液体の後続の流れ、アレイの表面上の1つ以上の異なる液体及び気泡の任意の組み合わせの後続の流れ、電気パルス、超音波処理パルス、圧力パルス、または音波パルスのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、刺激は、緩衝剤（約5.0～約8.5のpH範囲）、イオン溶液（例えば、NaCl、KCl；約75mM～約1M）、気泡、化学物質（例えば、ヘキサン、デカン、トリデカン等）、物的移動、電気刺激もしくは電気刺激パルス、圧力もしくは圧力パルス、温度もしくは温度パルス、超音波処理パルス、及びまたは音波パルスの任意の組み合わせを含む。いくつかの場合では、材料層は、少なくとも2つの種類の脂質を含む。いくつかの例では、刺激は、アレイの表面上の1つ以上の液体及び気泡の後続の流れを含む。

30

【 0 1 1 8 】

一態様では、個別に制御された電極のアレイを作り出す多重電極の各々1つの上部の上に脂質二重層を創出するための自動化方法、及び半導体センサ上の個別に制御された電極のアレイ内の各電極の上の各二重層内に単一の気孔を挿入するための方法が記載される。適切な外部刺激（例えば、電気刺激、圧力刺激、超音波処理、または音）を本質的に平面上の電極に密接している脂質層に適用することによって、二重層は、電極のアレイ内の電極にわたって形成されるように誘導され得る。更に、適切な外部刺激（例えば、電気刺激、圧力刺激、超音波処理、または音を含む）を、1つ以上の電極上に脂質二重層を有し、かつナノ気孔タンパク質を含有する溶液で被覆されているセンサチップ全てに個々の電極から適用することによって、気孔は、二重層内に挿入するように誘導され得る。結果として、刺激に応答して及び決定的な様式で、個別に制御された電極のアレイ内の多重電極にわたって二重層が人手を介さず自動的に創出される。いくつかの場合では、単一のナノ気孔は、刺激に応答して及び決定的な様式で、多重電極/二重層内に挿入され、したがって、個別に制御された電気ナノ気孔センサの高度に並行なアレイを創出することができる。個別に制御されたナノ気孔センサのこれらのアレイは、本質的に平坦な半導体表面上に創出されてもよく、半導体材料内で、個々の電極を操作及び制御するために必要とされる電

40

50

気回路構成の一部または全てが創出される。

【0119】

二重層及び気孔を創出する上述のアプローチに加えて、本開示は、費用効率が高く、比較的単純であり、1)既にセンサ上にある(事前に適用された)脂質または脂質-ポリーリタンパク質混合物を活性化して、自然発生的な二重層創出または二重層-気孔創出を引き起こすことと、2)既にセンサ上にある(事前に適用された)脂質または脂質-ポリーリタンパク質混合物を活性化して、二重層及びもしくは気孔を創出するための電極における電気刺激またはシステムへの刺激を介して二重層及びまたは気孔を直接創出することと、3)既にセンサ上にある(事前に適用された)脂質または脂質-ポリーリタンパク質混合物を活性化して、気泡をセンサチップの表面に接触させるか、またはセンサチップの表面を横断して気泡を流すことによって、二重層及びまたは気孔を直接創出することと、4)既にセンサ上にある(事前に適用された)脂質または脂質-ポリーリタンパク質混合物を活性化して、二重層及びもしくは気孔を創出するための電極における後続の電気刺激またはシステムへの刺激のために表面を調製する、気泡を使用して混合物をセンサアレイの表面上に分散して菲薄化することと、5)二重層がアレイ内の個々の多重電極にわたって創出されるように、気泡を使用してセンサアレイの表面上に脂質混合物を適用、分散、及び菲薄化することと、6)気泡を使用して脂質混合物を適用、分散、及び菲薄化して、多重電極にわたって二重層を創出するための電極における後続の電気刺激またはシステムへの刺激に対して表面を調製することと、7)気孔がアレイ内の個々の多重電極にわたって挿入されるように、気泡を使用してポリーリタンパク質混合物を、脂質混合物を用いて調製されたセンサアレイの表面上に適用、分散、及び菲薄化することと、8)気泡を使用して、ポリーリタンパク質混合物を適用、分散、及び菲薄化して、アレイ内の多重電極にわたって単一の気孔を創出するための電極における後続の電気刺激またはシステムへの刺激に対して表面を調製することと、9)電極の表面にわたる気泡の生成または適用を必要としない、電極の表面にわたって二重層を創出するために電気刺激を使用することと、10)1つ以上の電極もしくはセンサチップ全てに適用される超音波処理または圧力刺激を使用して、電極もしくは多重電極の表面にわたって二重層及び/または気孔を創出することと、11)上述の二重層及び気孔を確立するための方法と適合するナノ気孔電気検知のために、電極の半導体アレイ上の電極の密度を上昇させることと、12)多重電極-ナノ気孔センサのアレイを備えるフローセルもしくは単一オープンセンサチップが、本明細書の上もしくは他の箇所の方法を支持できない、または多重電極-ナノ気孔センサのアレイを備える単一センサチップ上の単一フローセルが、本明細書の上もしくは他の箇所の方法を支持することができる、または多重電極-ナノ気孔センサのアレイを備える単一センサチップ上の多重フローセルが、本明細書の上もしくは他の箇所の方法を支持することができる、配置を使用することと、13)液体または気泡の圧力を変化させて、成功する二重層または気孔創出を改善することと、14)センサチップ及び液体の温度を変化させて、二重層または気孔創出を改善することと、を含む、個別に制御される電気/ナノ気孔センサのアレイ上に二重層及び気孔を創出するための方法を提供する。

【0120】

本開示は、脂質二重層を創出し、気孔を二重層内に挿入するための様々なアプローチを提供する。一実施形態では、多重電極を有する半導体チップが存在する。液体脂質溶液は、チップのシリル化調製された表面に適用される。液体脂質溶液は、例えば、デカン、ヘキサン、トリデカン等の有機溶媒と、ジフィタノイルホスファチジルコリン(DPhPC)等の脂質分子及び/または上述の脂質のうちのいずれかとの溶液であってもよい。溶液は、流入、注入、噴霧、及び/またはスキージによって表面上に適用され得る。溶液は、表面上まで乾燥させられる。溶液は、DPhPC分子の粉末形態のみが残るように実質的または完全に乾燥させられ得る。代替として、溶液は、粘着状態まで乾燥させられてもよい。したがって、チップの表面は、粉末形態または粘着溶液形態で事前に適用された脂質分子によって官能化され得る。チップは、封止され、処理され、出荷されてもよい。

【0121】

半導体チップは、カバーを備えてもよく、カバーは、ユーザはチップを横断して液体を送り込む及び送り出す（さもなければ、液体の動きを方向付ける）ことを可能にする。いくつかの例では、ユーザは、乾燥状態または実質的に乾燥状態であり得る脂質分子を活性化するために塩水等の緩衝液体（または溶液）をチップ中に適用する。いったん脂質分子が緩衝液と接触すると、脂質分子は、水和される。流入する緩衝液体の圧力は、各電極表面の上部の上に脂質二重層の形成を促進することができる。脂質二重層の形成は、自然発生的であり得る。

【0122】

いくつかの状況では、半導体チップは、カバーを備えなくてもよく、ユーザは、ピペットまたは他の流体転移及び／もしくは移動装置（または器具）を使用して塩水等の緩衝液体（または溶液）をチップ表面上に適用して、脂質分子を活性化する。いったん脂質分子が緩衝液と接触すると、脂質分子は、水和される。流入する緩衝液体の圧力は、各電極表面の上部の上に脂質二重層の形成を促進することができる。

10

【0123】

半導体チップがカバーを備える状況では、緩衝液体がチップ中に適用された後、気泡が、送り込まれてもよく、気泡の背面には、気泡の前面よりも多くの緩衝液が存在する。気泡は、チップを横断して素早く通過し、新たに水和された事前に堆積された脂質混合物を滑らかにして／菲薄化して、表面を横断して脂質分子を素早く通過させる。気泡が通して流れた後、脂質二重層は、各電極表面の上部の上に形成され得る。

20

【0124】

いくつかの場合では、気泡が適用され、チップを横断して素早く通過した後、電気信号は、電極（複数可）に適用され、電気刺激は、電極（複数可）上に二重層（複数可）を形成することができる。電位を有する電気刺激は、電極の表面と電極の周りの脂質材料との間の界面を分断することができ、二重層の急な即時形成を引き起こす。

【0125】

いくつかの実施形態では、液体脂質溶液は、マイコバクテリウム・スメグマチスポリンA（Ms p A）または溶血素等の気孔タンパク質を更に含有し得る。脂質分子及び気孔タンパク質を含有する溶液は、乾燥させられる。チップの表面は、表面を疎水性にするようにシラン分子で調製される。脂質分子及び気孔タンパク質は、粉末形態または粘着状態で堆積する。ユーザは、緩衝液をチップに適用することによってチップを活性化することができる。脂質分子及び気孔タンパク質は、水和される。挿入されたナノ気孔を有する脂質層は、各電極表面の上部の上に形成され得る。脂質層は、自然発生的に形成し得る。

30

【0126】

いくつかの場合では、緩衝液体がチップ中に適用された後、気泡が送り込まれる。気泡の背面には、気泡の前面よりもより多くの緩衝液が存在し得る。気泡は、チップを横断して素早く通過することができ、新たに水和された事前に堆積された脂質及び気孔の混合物を滑らかにして菲薄化し、脂質及び／または気孔分子を、表面を横断して素早く通過させる。気泡が通して流れた後、脂質二重層は、本明細書の上または他の箇所に記載される様式で各電極表面の上部の上に形成されてもよく、気孔タンパク質は、二重層内に挿入され、ナノ気孔を形成することができる。

40

【0127】

代替として、または加えて、気泡が適用されてチップを横断して素早く通過した後、電気信号が電極に適用されてもよく、その電気刺激は、電極上に二重層を形成し、ナノ気孔を二重層内に挿入させ得る。電位を有する電気刺激は、電極の表面を分断することができ、電極の周りの脂質材料に作用して、二重層及び二重層内のナノ気孔の急な即時形成を引き起こす。

【0128】

別の実施形態では、半導体チップは、単にシリル化され、チップの表面を官能化する脂質分子または気孔タンパク質等の任意の事前に適用される分子を有しない。チップの表面は、最初に、塩水を使用して洗い流される、すなわち、プライミングされる。次いで、例

50

えば、デカン等の有機溶媒中の脂質のアリコートは、チップ上に挿入される。気泡は、続いて、脂質材料を塗抹し、チップの表面上に脂質材料を分散して菲薄化する。脂質二重層は、気泡の接触及び分散を介して多重電極にわたって創出される。脂質二重層は、自然発生的に形成し得る。

【0129】

別の関連実施形態では、脂質二重層は、気泡の後に自然発生的に創出され得る。後続の電気刺激及び／または他の刺激が、電極に適用される。電気パルス及び／または他の刺激は、多重層を破壊して、電極上の単一の二重層の形成を促すことによって、単一の二重層の創出を助けると考えられる。電気パルスは、二重層を電極上で形成するか、または破壊する。

10

【0130】

更に別の関連実施形態では、KCLは、チップを横断して流れ、チップが濡れる、すなわち、プライミングされる。次いで、少量の脂質溶液は、チップに適用され、チップを横断して流れ、その直後に、気泡は、チップを横断して脂質を菲薄化し分散する。次に、塩水が、チップを横断して流れる。これに続いて、気孔タンパク質溶液は、チップ中に挿入される。別の気泡は、続いて、気泡との接触または気泡からの圧力の形成を介して、気孔がアレイ内の個々の多重電極にわたって挿入されるように、気孔タンパク質混合物をチップの表面上に塗抹して菲薄化する。

【0131】

更に別の関連実施形態では、気孔タンパク質溶液及び第2の気泡が挿入された後、後続の電気刺激が電極で適用され、アレイ内の多重電極にわたって脂質二重層内にナノ気孔を創出する。

20

【0132】

別の実施形態では、例えば、デカン等の有機溶媒中の脂質のアリコートは、イオン溶液（塩水等）で充填されたまたは被覆されたチップ内に挿入される。後続の電気刺激が、電極に適用される。電気パルスは、二重層を電極上に形成する。この実施形態では、二重層形成を促進するために挿入される気泡は存在しない。脂質は、チップの表面上で電極の周りに分散されるウェルである。電極上に印加される電圧は、電極の縁部で脂質材料の分断を生じさせ、脂質二重層の形成を誘導する。

【0133】

30

半導体ナノ気孔センサチップは、液体、溶液、及び試薬がそこを通して流れることができる1つ以上のチャンネルを備えてもよい。いくつかの実施形態では、各チャンネルは、2つのレールをチャンネルの両側に1つずつ有する。電極は、チャンネルの底面上にあってもよい。電極は、更に、チャンネルの側壁面上（レール上）にあってもよい。各チャンネルに対する電極の密度は、底面及び側壁面上に電極を創出することにより、上昇し得る。

【0134】

1つ以上のフローセルは、半導体チップ上で利用され得る。各フローセルを使用して、溶液及び気泡をチップ上のチャンネルのうちの1つに対して挿入することができる。フローセルは、液体、気泡、及び試薬がそこを通過することができる経路である。フローセルの全体または一部として作用するチップ上のチャンネルは、チップが個別に及び同時に複数の異なる試料を処理することができるように、独立していてもよい。

40

【0135】

いくつかの実施形態では、チップ上にチャンネルまたはフローセルが存在しない。チップは、液体脂質溶液または液体脂質 - 気孔混合物溶液を事前に適用される。溶液は、粉末形態または粘着状態に乾燥させられてもよい。液体緩衝液は、脂質または脂質 - 気孔混合物を達成するためにチップに適用される。電気信号は、電極に適用され、電気刺激は、二重層を電極上に形成することができる。電位を有する電気刺激は、電極の表面を分断させ、電極の周りの脂質材料に影響して、二重層の急な即時形成を引き起こすことができる。更に、活性化された気孔タンパク質が存在する場合、電気刺激は、気孔分子の脂質二重層内への挿入を更に促進することができる。

50

【0136】

いくつかの実施形態では、液体または気泡の圧力は、二重層またはナノ気孔の創出を改善するために異なり得る。いくつかの実施形態では、チップ及び液体の温度は、二重層または気孔の創出を改善するために異なり得る。例えば、二重層が形成されるときに、室温よりも若干冷たい温度が適用されてもよく、ナノ気孔が脂質二重層内に挿入されるときに、室温よりも若干温かい温度が適用されてもよい。

【0137】

チップは、空いたままであり、接近することができる、封止されたチップの4つの側面のうちの1つを有し得る。反対側もまた、管が接触及び接続することができる単一の穴を有し得る。下部における穴及び管並びに上部におけるチップの開口端に垂直なように、チップが位置付けられるか、さもなければ配置される場合、緩衝液体及び試薬を、上部を通して添加することができ、次いで、気泡は、制御された速度で下部から放出され、封止される空洞を上方に移動し、チップを横断して流れることができる。このシステムは、チップを横断して転がる液体断片を分離する気泡の繋がりを有し得る。それは、パッケージ化されたチップの開口上部を通して添加される任意の物質を除去し、チップ内側の表面を流れ落ちる。反対に、機器の下部における単一の管を通して液体及び試薬を挿入することが可能であり、試薬の自動化された時系列の追加が必要とされ得るとき、これは有利であり得る。

【0138】

いくつかの状況では、センサチップは、二重層の自動化された創出、気孔の創出、それらの再創出を含む二重層及び気孔の維持、ナノ気孔センサチップに適用される生体分子の捕捉及び読み出しを生じ、全てのセンサのステータス及び器具の性能の全ての特性のリアルタイム及び/またはエンドポイント詳細を提供するために、液体、試薬、気泡、電気刺激パルス、圧力もしくは圧力パルス、温度もしくは温度パルス、超音波処理パルス、及びまたは音波パルスの任意の組み合わせのセンサチップまたはセンサチップ内の液体、試薬、もしくは気泡への適用を自動化することができる機器に連結され得るか、またはその中に設置され得る。機器は、任意のレベルの操作者マニュアルの介入または特別試験の創出を可能にし得る。機器は、機器が完全にまたは実質的に自動的に動作することを可能にする事前の試験信号または試薬の追加の結果に応じて、異なる信号及び/もしくは試薬を適用する、または試料もしくはチップに従って作動することができる。そのようなシステムは、経時的実験を操作者なしで実行することができる、または試験を続けるためにセンサチップの表面を再び官能化するようにナノ気孔システムをリフレッシュすることができる。

【0139】

また、二重層の創出または気孔の創出を誘導するための刺激の適用には、所望の、さもなければ所定の二重層/気孔創出事象(複数可)を刺激するための、緩衝剤(約5.0~約8.5のpH範囲)、イオン溶液(例えば、NaCl、KCl;約75mM~約1M)、気泡、化学物質(例えば、ヘキサン、デカン、トリデカン等)、物的移動、センサチップへの電気刺激もしくは電気刺激パルス、圧力もしくは圧力パルス、温度もしくは温度パルス、超音波処理パルス、及びまたは音波パルスの任意の組み合わせの適用が挙げられる。

【0140】

半導体チップは、カバーを備えてもよく、ユーザは、ピペットまたは他の器具を使用して手動であらゆる緩衝剤、試薬、及び気泡を適用することができる。これらの技法のこの手動適用は、所望の二重層及び/または気孔形成を誘導するために、本明細書に概説される任意の適用される刺激を伴ってもよい。

【0141】

本開示のフローセルまたは単純な気泡システムはまた、気孔タンパク質溶液をセンサチップ表面の周りに均一に適用して、自然発生的な気孔挿入を生じることによって、または緩衝剤(約5.0~約8.5のpH範囲)、イオン溶液(例えば、NaCl、KCl;約

10

20

30

40

50

75 mM ~ 約 1 M)、気泡、化学物質(例えば、ヘキサン、デカン、トリデカン等)、物的移動、センサチップへの電気刺激もしくは電気刺激パルス、圧力もしくは圧力パルス、温度もしくは温度パルス、超音波処理パルス、及びまたは音波パルスの任意の組み合わせの刺激が二重層内への気孔の即時挿入を促すことができるように表面を設定することによって、気孔の挿入を大きく支援することもできる。フローセルまたは単純な気泡システムはまた、気泡の有無に関わらず適切な緩衝剤中で滑らかにするまたは混合させた後、自然発生的な二重層及び気孔の両方を形成し得る乾燥した脂質 - 気孔 - タンパク質混合物を水和することもできる。

【0142】

図23は、プライミングされたセンサチップの1つ以上の流路上の電極にわたって脂質層を形成するためのサンプル方法を例示する。センサチップは、流路の表面上に位置する非導電性または半導体表面内に埋め込まれる、及び/または非導電性または半導体表面に本質的に平坦である多重電極を含む平坦なチップであり得る。本方法は、流路の各々を通して少なくとも1種類の脂質を含む脂質溶液を流入する第1の操作2301を含む。次に、第2の操作2302では、脂質は、電極の表面上に、及び/または電極に隣接して堆積される。第3の操作2303では、堆積される脂質は、流路の各々における後続の気泡で滑らかにされ、菲薄化される。次に、第4の操作2304では、流路の各々は、再び、緩衝液で充填される。緩衝液は、導電性であってもよい。第5の操作2305では、電流は、電極を通して測定され、脂質二重層が、各電極にわたって適切に形成されたかどうかを決定する。次に、第6の任意の操作2306では、任意の、全ての、または実質的に全ての電極上に脂質二重層が適切に形成されていない場合、刺激(例えば、電気刺激)が適用され、電極にわたって脂質二重層を形成するために表面上に脂質を誘導する。しかしながら、いくつかの事例では、二重層を創出するための電圧は適用されない。

【0143】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、少なくとも2つの種類の脂質を含む。脂質溶液は、少なくとも1種類の気孔タンパク質を更に含み得る。気孔タンパク質は、マイコバクテリウム・スメグマチスポリンA(MspA)または溶血素を含み得る。気孔タンパク質を含有する非脂質溶液は、流路の各々において堆積された脂質にわたって方向付けられてもよい。次いで、気孔タンパク質及び堆積された脂質は、気泡で流路の各々に菲薄化され得る。次に、気孔タンパク質溶液、追加の空気(または気体)気泡、及び追加の液体溶液は、流路を通して方向付けられ得る。気孔タンパク質溶液及び液体溶液は、空気気泡によって分離され得る。次いで、電気刺激は、電極の少なくとも一部を通して適用され、脂質二重層内への気孔タンパク質の挿入を促進し得る。流入溶液及び気泡の操作は、脂質二重層形成及び二重層内へのナノ気孔の挿入を達成するために任意の順序及び組み合わせで繰り返されてもよい。いくつかの例では、脂質は、ジフィタノイルホスファチジルコリン(DPhPC)、パルミトイル - オレオイル - ホスファチジル - コリン(POPC)、ジオレオイル - ホスファチジル - メチルエステル(DOPME)、リゾホスファチジルコリン(LPC)、1,2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3ホスホコリン、1,2 - ジ - O - フィタニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン(DOPhPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジイノシトール、ホスファチジルグリセロール、1,2 - ジ - O - フィタニル - sn - グリセロール; 1,2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ(ポリエチレングリコール) - 350]; 1,2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ(ポリエチレングリコール) - 550]; 1,2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ(ポリエチレングリコール) - 750]; 1,2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ(ポリエチレングリコール) - 1000]; 1,2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ(ポリエチレングリコール) - 2000]; 1,2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 -

ホスホエタノールアミン - N - ラクトシル ; G M 1 ガングリオシド、またはスフィンゴミエリンである。液体脂質溶液は、デカン等の有機溶媒を更に含有し得る。

【 0 1 4 4 】

いくつかの実施形態では、緩衝液は、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム溶液等のイオン溶液を含有し得る。緩衝液は、シアン化第一鉄またはアスコルビン酸、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸カリウム、塩化テトラメチルアンモニウム、塩化テトラエチルアンモニウム、塩化アンモニウム等を更に含有する。また、トレハロース、蔗糖、または任意の他の糖を含有してもよい。緩衝剤はまた、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、塩化ストロンチウム、塩化マンガン等の二価物を含有し得る。いくつかの実施形態では、気泡及び/または流体の圧力は、二重層形成またはナノ気孔の挿入を改善するために実質的に気圧に、または気圧を若干上回ってもしくは下回って調節される。

10

【 0 1 4 5 】

図 2 4 は、本開示の実施形態に従って、サンプル半導体センサチップを例示する。センサチップ 2 4 0 0 は、複数の流路 2 4 1 0 を含む。各流路は、流路 2 4 1 0 の表面上に位置する非導電性または半導体表面内に埋め込まれる、及び非導電性または半導体表面に平坦もしくは実質的に平坦な多重電極 2 4 2 0 を有する。電極以外の流路の表面は、疎水性である。電極以外の流路の表面は、疎水性、親水性、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。異なる壁は、異なる特性のために処理され得る。流路 2 4 1 0 は、流路に沿うガイドレール 2 4 4 0 によって分離される。チャンネル幅は、2 つ以上の列電極を収納するのに十分広い場合がある。電極は、図 2 4 に示されるように流路の底面並びにガイドレールの側壁上に製作され得る。いくつかの実施形態では、流路の上部は、封止される。

20

【 0 1 4 6 】

別の態様では、プライミングされたセンサチップ、すなわち、チップ上を流れる緩衝液を有しているチップの 1 つ以上の流路上の電極にわたって脂質二重層を形成するための方法は、(a) 流路の各々を通して少なくとも 1 つの種類の脂質を含む脂質溶液を流入することと、(b) 脂質をチップの表面上に堆積することと、(c) 流路の各々の後続のまたは追加の気泡で堆積された脂質を滑らかにして菲薄化することと、(d) 導電性である緩衝液を流路の各々を通して更に流入することと、(e) 電極を通る電流を測定して、脂質二重層が各電極にわたって形成されるかどうかを決定することと、(f) 電極のうちのいずれかの上に脂質二重層が形成されない場合、任意に、電極のうちの少なくとも 1 つに刺激を適用し、表面上に脂質を誘導して、電極にわたって脂質二重層を形成することと、を含む。刺激には、電気パルス、超音波処理パルス、圧力パルス、及び音波パルス、または緩衝剤 (約 5 . 0 ~ 約 8 . 5 の p H 範囲) 、イオン溶液 (例えば、NaCl、KCl ; 約 7 5 m M ~ 約 1 M) 、気泡、化学物質 (例えば、ヘキサン、デカン、トリデカン等) 、物的移動、センサチップへの電気刺激もしくは電気刺激パルス、圧力もしくは圧力パルス、温度もしくは温度パルス、超音波処理パルス、及びまたは音波パルスの任意の組み合わせのうちの少なくとも 1 つが挙げられる。

30

【 0 1 4 7 】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、少なくとも 2 つの種類の脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質溶液は、少なくとも 1 種類の気孔タンパク質を更に含む。

40

【 0 1 4 8 】

いくつかの実施形態では、(c) の後、気孔タンパク質を含有する非脂質溶液は、流路の各々に堆積された脂質にわたって方向付けられる。次いで、気孔タンパク質及び堆積された脂質は、流路の各々の第 2 の気泡によって菲薄化することができる。上述の操作は、任意の順序または組み合わせで少なくとも 1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、またはより多くの回数繰り返され得る。

【 0 1 4 9 】

いくつかの場合では、気孔タンパク質溶液、追加の空気気泡、及び追加の液体溶液は、流路を通して方向付けられ得る。気孔タンパク質溶液及び液体溶液は、空気気泡によって分離され得る。次に、刺激、例えば、緩衝剤 (約 5 . 0 ~ 約 8 . 5 の p H 範囲) 、イオン

50

溶液（例えば、NaCl、KCl；約75mM～約1M）、気泡、化学物質（例えば、ヘキサン、デカン、トリデカン等）、物的移動、センサチップへの電気刺激もしくは電気刺激パルス、圧力もしくは圧力パルス、温度もしくは温度パルス、超音波処理パルス、及びまたは音波パルスの任意の組み合わせが、脂質二重層内への気孔タンパク質の挿入を促進するために電極の少なくとも一部、全て、または実質的に全てを通して適用され得る。

【0150】

いくつかの実施形態では、脂質は、ジフィタノイルホスファチジルコリン（DPHPC）、パルミトイル - オレオイル - ホスファチジル - コリン（POPC）、1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、1, 2 - ジ - O - フィタニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン（DOPHPC）、ジオレオイル - ホスファチジル - メチルエステル（DOPME）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、リゾホスファチジルコリン（LPC）、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、1, 2 - ジ - O - フィタニル - sn - グリセロール；1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ（ポリエチレングリコール） - 350]；1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ（ポリエチレングリコール） - 550]；1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ（ポリエチレングリコール） - 750]；1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ（ポリエチレングリコール） - 1000]；1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ（ポリエチレングリコール） - 2000]；1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - ラクトシル；GM1ガングリオシド、またはスフィンゴミエリンである。

【0151】

いくつかの場合では、液体脂質溶液の少なくとも一部分は、有機溶媒（例えば、デカン）を含有する。気孔タンパク質は、いくつかの例では、マイコバクテリウム・スメグマチスポリンA（MspA）または溶血素を含み得る。いくつかの場合では、緩衝液は、1つ以上のイオン（例えば、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）を含有するイオン溶液を含有する。いくつかの事例では、緩衝液の少なくとも一部は、シアン化第一鉄またはアスコルビン酸を含有する。いくつかの事例では、緩衝液はまた、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸カリウム、塩化テトラメチルアンモニウム、塩化テトラエチルアンモニウム、塩化アンモニウム、フェロシアン化物、フェリシアン化物、酢酸カリウム等も含有し得る。いくつかの事例では、緩衝液はまた、トレハロース、蔗糖、または任意の他の糖も含有し得る。いくつかの事例では、緩衝液はまた、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、塩化ストロンチウム、塩化マンガン等の二価物も含有し得る。

【0152】

いくつかの実施形態では、気泡及び/または流体の圧力は、実質的に気圧であるか、または気圧を若干上回る。気泡は、101kPa～1013kPaの規模である圧力等の気圧よりも大きい圧力を有し得る。

【0153】

金属電極の表面は、親水性である。導電性ケイ素等の電極が金属でない可能性がある場合において、潜在的電圧または異なる潜在的電圧が、シランが非金属電極に接着及び反応することを止めるために、シリル化プロセス中に電極に適用されてもよい。低イオン緩衝剤とシランとの混合物の±10mV～最大±2Vの電圧及び異なる濃度が、使用され得る。電極における電圧を循環させて、堆積後のシランを「消散する」ことによって、任意の反応または残留したシランを金属または非金属電極から除去することも可能である。非金属電極に関して、疎水性シランを消散するステップの後、親水性シランステップが追加されてもよく、電極上の空間のみが、シランに反応するために開けられるだろう。その結果、電極表面は、疎水性ではなく、親油性ではなく、親水性であるべきである。

【 0 1 5 4 】

いくつかの事例では、電極以外の流路の表面は、疎水性である。いくつかの実施形態では、流路の表面（電極以外）は、疎水性、親水性、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。異なる表面（壁またはチャネル床）は、異なる特性のために処理され得る。

【 0 1 5 5 】

いくつかの実施形態では、（ a ）の前に、電極以外の流路の表面は、シリル化、化学処理、または特定の材料の電極以外の流路の表面を使用もしくは設計することによって疎水性にされてもよく、複数の流路がチップの表面上に形成されてもよく、電極が流路の各々の表面上に製作されてもよく、流路が流路に沿ってガイドレールを築くことによって分離されてもよく、電極がガイドレールの各々の側面上に製作されてもよく、及び／または流路の各々の上側が封止されてもよい。

10

【 0 1 5 6 】

いくつかの状況では、二重層を有するチップは、チップを横断してイオン溶液を流入することによって創出され得る。その流れは、散在した脂質溶液及びイオン溶液アリコート「繋がり」であり得る（例えば、交互の脂質溶液及びイオン溶液）。その流れは、供給管を通して及びチップを横断して進み得る。いくつかの例では、繋がり、脂質の少なくとも、またはおよそ 0 . 1 μ L、1 μ L、2 μ L、3 μ L、4 μ L、もしくは 5 μ L、次いで、イオン溶液の少なくともまたはおよそ 0 . 1 μ L、1 μ L、2 μ L、3 μ L、4 μ L、もしくは 5 μ L を有してもよく、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の回数繰り返され得る。溶液の繋がり、バイオチップの表面を横断して、約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の回数押し戻し、かつ押し進められ得る。次いで、被覆率及び／または封止を電気的に確認することができる。いくつかの実施形態では、脂質及び／またはイオン溶液（複数可）の繋がり、約 0 . 1 μ L ~ 約 1 0 0 0 μ L であり得る。

20

【 0 1 5 7 】

いくつかの場合では、溶液の繋がり、組立操作が続く。組立操作は、チップを横断して気泡を流入することを含み得る。いくつかの事例では、電気的方法を使用して、セルの被覆率（電極を含む）及び／または各電極における漏出もしくは封止抵抗を確認することができる。

【 0 1 5 8 】

30

いくつかの場合では、組立操作は、以下の試験結果の少なくとも一部または全てが得られるまで繰り返される：（ 1 ）少なくとも約 1 0 0、1 5 0、1 6 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 0 0、2 1 0、2 2 0、2 3 0、2 4 0、2 5 0、またはそれ以上の電極が被覆される、（ 2 ）少なくとも約 1 0 0、1 1 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、1 6 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、または 2 0 0 個の膜（例えば、脂質層）が、- 1 V 未満の印加電圧で破裂する、（ 3 ）（ 2 ）において破裂する脂質層の少なくとも 4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、またはそれ以上が、約 - 3 0 0 mV ~ - 7 0 0 mV で破裂する、（ 4 ）約 5 0 ギガオーム未満の封止抵抗を有する電極の数が、3 0、2 0、1 5、または 1 0 未満である、並びに（ 5 ）任意の記録された漏出電流を示すセルの数が 5 0 を超える場合、封止抵抗の中央値は、1 5 0 ギガオームを上回る。いくつかの場合では、組立操作は、以下の試験結果の少なくとも一部または全てが得られるまで繰り返される：（ 1 ）少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、またはそれ以上、例えば、1 0 0 % の電極が被覆される、（ 2 ）少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、またはそれ以上、例えば、1 0 0 % の膜（例えば、脂質層）が \pm 1 V 未満の印加電圧で破裂する、（ 3 ）（ 2 ）において破裂する脂質層の少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、またはそれ以上、例えば、1 0 0 % が、約 \pm 3 0 0 mV ~ \pm 7 0 0 mV で破裂する、並びに（ 4 ）セルの最小数が 1 0 G O h m s を超える（例えば、少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、または 1 0 0 % ）。

40

50

【 0 1 5 9 】

これらの基準の一部または全てが満たされる場合、約 10 マイクロリットル (uL) ~ 約 1000 uL の任意の大きさの気泡は、チップを横断して流れてもよく、ある量の緩衝剤 (例えば、約 10 uL ~ 約 10 mL) が続き、(1)、(4)、及び(5)の最終試験を実施することができる。 <これを通過する場合、プログラムは、気孔挿入プロトコルに移動する。プログラムは、コンピュータシステムを用いて実装されてもよい (例えば、プロセッサによる実行時)。

【 0 1 6 0 】

いくつかの場合では、気孔挿入プロトコルは、気孔を二重層内に挿入するために、少なくともまたは約 0.1 uL、1 uL、2 uL、3 uL、4 uL、5 uL、もしくは最大約 1 mL の気孔タンパク質溶液をチップに適用すること、並びに刺激を適用すること、例えば、電気穿孔することと、を含む。電気穿孔操作の最後に、チップは、気孔率に関してチェックされてもよく、基準を通過する場合、試料及び試験試薬が適用される。

【 0 1 6 1 】

二重層創出及び気孔挿入の合計時間は、任意の好適な値であり得る。いくつかの場合では、合計時間は、約 1 分間、約 5 分間、約 10 分間、約 20 分間、約 30 分間、約 45 分間、約 1 時間、または約 2 時間である。いくつかの場合では、合計時間は、約 1 分間未満、約 5 分間未満、約 10 分間未満、約 20 分間未満、約 30 分間未満、約 45 分間未満、約 1 時間未満、または約 2 時間未満である。いくつかの事例では、合計時間の約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、または約 90 % が、二重層形成に関する。合計時間の任意の割合が、二重層形成と気孔挿入とに分けられ得る。いくつかの場合では、二重層が形成され、同時にナノ気孔が挿入される。いくつかの事例では、二重層及び気孔挿入に対する合計時間は、平均で、二重層創出に対して 15 分間、気孔挿入に対して 20 分間の合計 35 分間である。

【 0 1 6 2 】

任意の数のウェルが、挿入された気孔 (例えば、気孔率) を有する膜 (例えば、脂質二重層) で被覆され得る。いくつかの場合では、気孔率は、約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、約 90 % 等である。いくつかの場合では、気孔率は、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 % 等である。

【 0 1 6 3 】

いくつかの実施形態では、電極チップ及び試験設定に適用されるパラメータは、1 M KCl または 300 mM NaCl、pH 7.5 (約 5.0 ~ 約 8.5 の pH 範囲)、電流流動性流速 (例えば、約 1 uL / 秒 ~ 約 1000 uL / 秒)、海面気圧、及び室温である。

【 0 1 6 4 】

膜を支持するためにゲルを使用する。

一態様では、バイオチップまたはセンサを形成するための方法は、基板を膜 (例えば、ナノ気孔を含む脂質二重層) の接着に適した層でコーティングすることを含む。基板は、有機官能性アルコキシシラン分子でシリル化されてもよい。図 18 は、膜がシリル化された表面上に配置され得るバイオチップを示す。

【 0 1 6 5 】

いくつかの場合では、膜は、形成することが難しく、及び/またはシリル化された二酸化ケイ素上で支持されているが、ウェルにわたって支持されていない膜により、少なくとも部分的に不安定である。ウェルをゲルで充填することは、ウェル区域にわたって膜を支持することができ、それによって、膜を容易に形成することができ、及び/または膜を安定化させることが、本明細書において認識及び記載される。いくつかの実施形態では、ウェルの空の部分は、図 19 に示されるようにゲルで充填される。ゲルは、ウェルにわたって配置される膜に対する機械的支持を提供することができる。

【0166】

他の実施形態では、膜は、トレハロース、または他の糖を含む緩衝剤の使用によって化学的に安定化させることができる。

【0167】

一態様では、バイオチップを調製するための方法は、(a)ゲルを、電極及び検知回路に近接しているウェル内にゲルを堆積することと、(b)ウェルにわたって膜を形成することと、を含み、膜は、少なくとも部分的にゲルによって支持される。

【0168】

様々な実施形態では、ゲルは、非反応性、架橋され、液体電解質、またはそれらの任意の組み合わせを含む。ゲルは、アガロース及び市販の専売ゲルマトリクス等の標準的試薬ゲルが挙げられるが、これらに限定されない。例としては、Collagen、Laminin、Hydrogels、QGel、及びHydroMaxゲルがある。

【0169】

ナノ気孔の挿入

いくつかの事例では、ナノ気孔は、膜内に挿入される(例えば、電気穿孔によって)。ナノ気孔は、電気刺激、圧力刺激、液体流刺激、気体気泡刺激、超音波処理、音、振動、またはそれらの任意の組み合わせ等の刺激信号によって挿入されてもよい。ナノ気孔は、溶血素もしくはマイコバクテリウムスメグマチス(MspA)ナノ気孔等のタンパク質ナノ気孔または溶血素もしくはMspAのいずれかと少なくとも70%の相同性を有するナノ気孔であり得る。

【0170】

いくつかの実施形態では、ナノ気孔を挿入することは、該ナノ気孔の挿入を促進するために該電極を通して刺激(例えば、電気穿孔パルス)を適用することを含む。いくつかの場合では、これに、該ナノ気孔の該脂質二重層内への挿入を検出するための第2の電気検出パルスが続く。検出パルスが続く電気穿孔パルスの使用は、電気穿孔パルスに対して使用される電圧レベルを順次変化して、気孔が挿入され、検出が達成されるまで数回及び/または何回も繰り返され得る。一実施形態では、最初の電気穿孔パルスは、約50mV(正または負)で1~10回繰り返され、前の電気穿孔パルスから約1mV~最高約±700mVに上昇する、すなわち、上昇電圧の階段である、電気穿孔パルス(複数可)の各後続パッチが続く。検出パルスは、各電気穿孔パルス間で+160mVである。このため、例えば、ナノ気孔を脂質二重層内に挿入するプロセスは、50mVの電気穿孔パルスの適用及び5回の検出パルスの適用、51mVの電気穿孔パルスの適用及びの5回の検出パルスの適用等であろう。プロセスは、ナノ気孔が挿入されるまで(その場合、電極は止められる)、または電極/ウェルが拒絶される、もしくは欠陥であると決定されるまで繰り返される。

【0171】

いくつかの場合では、酵素、例えば、ポリメラーゼ(例えば、DNAポリメラーゼ)または他の酵素(例えば、逆転写酵素)は、ナノ気孔に結合される、及び/またはナノ気孔に近接して位置付けられる。ポリメラーゼ/酵素は、ナノ気孔が膜内に組み込まれる前または後にナノ気孔に結合され得る。いくつかの事例では、ナノ気孔及びポリメラーゼ/酵素は、融合タンパク質(すなわち、単一のポリペプチド鎖)である。全体を通してポリメラーゼが例示されるが、任意の好適な酵素が使用され得ることが理解される。

【0172】

ポリメラーゼは、任意の好適な方法でナノ気孔に結合され得る。いくつかの場合では、ポリメラーゼは、溶血素タンパク質単量体に結合され、次いで、大量のナノ気孔7量体が構築される(例えば、結合されたポリメラーゼを有しない6つの溶血素単量体に対して結合されたポリメラーゼを有する1つの単量体の割合)。次いで、ナノ気孔7量体は、膜内に挿入され得る。

【0173】

ポリメラーゼをナノ気孔に結合するための別の方法は、リンカー分子を溶血素単量体に

10

20

30

40

50

結合すること、または溶血素単量体を結合部位を有するように変異させることと、次いで、大量のナノ気孔7量体を構築することと、を含む（例えば、リンカー及び/または結合部位を有しない6つの溶血素単量体に対してリンカー及び/または結合部位を有する1つの単量体の割合）。リンカー及び/または結合部位（ H^+ ）を有する単量体とリンカー及び/または結合部位（ H^- ）を有しない溶血素単量体との組み合わせは、サブユニット、例えば、 $(H^+)_2(H^-)_5$ 、 $(H^+)_3(H^-)_4$ 、 $(H^+)_4(H^-)_3$ 等の任意の割合を有する7量体溶血素ナノ気孔を達成するために行われ得ることが理解される。次いで、ポリメラーゼは、結合部位または結合リンカーに結合され得る（例えば、大量に、膜内に挿入する前に）。ポリメラーゼはまた、（例えば、7量体）ナノ気孔が膜内に形成された後、結合部位または結合リンカーに結合され得る。いくつかの場合では、複数のナノ気孔 - ポリメラーゼ対は、バイオチップの複数の膜（例えば、ウェル及び/または電極にわたって配置される）内に挿入される。いくつかの事例では、ポリメラーゼのナノ気孔複合体への結合は、上述の各電極のバイオチップ上で生じる。

10

【0174】

ポリメラーゼは、任意の好適な化学（例えば、共有結合及び/またはリンカー）でナノ気孔に結合され得る。いくつかの場合では、ポリメラーゼは、分子ステーブルでナノ気孔に結合される。いくつかの事例では、分子ステーブルは、3つのアミノ酸配列（示されるリンカーA、B、及びC）を含む。リンカーAは、溶血素単量体から延在してもよく、リンカーBは、ポリメラーゼから延在してもよく、次いで、リンカーCは、リンカーA及びBを、ゆえにポリメラーゼをナノ気孔に結合することができる（例えば、リンカーA及びBの両方の周りを包むことによって）。リンカーCはまた、リンカーAまたはリンカーBの一部として構成されてもよく、このようにして、リンカー分子の数を低減する。リンカーは、ピオチン及びストレプトアビジンであってもよい。

20

【0175】

いくつかの事例では、ポリメラーゼは、Solulink（商標）化学を使用してナノ気孔に結合される。Solulink（商標）は、HyNic（6-ヒドラジノ-ニコチン酸、芳香族ヒドラジン）と4FB（4-ホルミルベンゾエート、芳香族アルデヒド）との間の反応であり得る。いくつかの事例では、ポリメラーゼは、クリック化学（例えば、Life Technologiesから入手可能である）を使用してナノ気孔に結合される。いくつかの場合では、亜鉛フィンガー突然変異が溶血素分子内に導入され、次いで、分子を使用して（例えば、DNA中間分子）、ポリメラーゼを溶血素上の亜鉛フィンガー部位に結合する。

30

【0176】

二重層形成を検出するための方法

上述のセンサ上に二重層を創出する試みの後、二重層が確立されているかどうか、または電極が二重層ではない層で単に被覆されているかどうかを決定するために電気刺激が適用され得る。これを行う1つの方法は、非破壊的AC刺激を層で被覆された電極に適用して、電極が薄い容量性脂質二重層（または他の薄層）で被覆されていることを示す容量性電流応答を探すことである。

【0177】

塩、電圧、及び電極直径条件に対して適切な容量性読取値が検出される場合、二重層が電極にわたって創出されており、操作者は気孔挿入ステップを開始する準備が整っていることが推察され得る。

40

【0178】

代替として、破壊用途の順次増大する電圧パルスが、アレイの各電極に適用されてもよく、電極上の層が破壊される電圧が記録される。許容可能な数の電極を横断して見られる電圧が、塩、電圧、及び電極直径条件に対して予期される二重層破壊電圧に対応する場合、単一の気泡が、チップを横断して流れ、二重層を再度作製し、操作者は気孔挿入ステップを開始する準備が整う。

【0179】

50

ウェル及びナノ気孔装置を形成するためのシステム

本開示の別の態様は、ウェルを含むナノ気孔装置を形成するためのシステムを提供する。そのようなシステムを使用して、膜（例えば、脂質二重層）をウェルまたは電極に隣接して形成し、ナノ気孔を膜内に挿入することができる。

【0180】

システムは、堆積システム、堆積システムと流体連通しているポンプシステム、及びウェルを形成するための方法を実装する機械可読コードを実行するためのコンピュータプロセッサ（または本明細書では「プロセッサ」）を有するコンピュータシステム（またはコントローラ）を含み得る。コードは、本明細書に提供される方法のうちのいずれかを実装することができる。ポンプシステムは、堆積システムをパージするまたは撤去させるように構成され得る。いくつかの場合では、堆積システムは、除外される。

10

【0181】

堆積システムは、ウェルの材料層を形成するための1つ以上の反応空間を含み得る。いくつかの状況では、堆積システムは、（例えば、チャンバの中間の場所でパージまたはポンプを用いて）流体的に互いに隔てられ得る1つ以上の相互接続された反応チャンバを有するロールツーロール堆積システムである。

【0182】

1つ以上の堆積システムを使用して、ウェルを形成することができる。堆積システムは、例えば、化学蒸着（CVD）、原子層堆積（ALD）、プラズマ増強CVD（PECVD）、プラズマ増強ALD（PEALD）、金属有機CVD（MOCVD）、熱線CVD（HWCVD）、開始CVD（iCVD）、修飾CVD（MCVD）、軸蒸着（VAD）、外側蒸着（OVD）、及び物理蒸着（例えば、スパッタ堆積、蒸発堆積）等の様々な種類の堆積技法とともに使用するために構成され得る。堆積システムは、写真平版術等の様々な半導体製造技法を使用して層毎の形成を可能にするように構成され得る。

20

【0183】

ポンプシステムには、ターボ分子（「turbo」）ポンプ、拡散ポンプ、イオンポンプ、低温（「cryo」）ポンプ、及び機械式ポンプのうちの1つ以上等の1つ以上の真空ポンプが挙げられる。ポンプには、1つ以上のバックアップポンプが挙げられる。例えば、ターボポンプは、機械式ポンプによって逆行し得る。

【0184】

いくつかの状況では、1つ以上のウェルを含むアレイは、堆積システムを用いて基板内に形成される。堆積は、コントローラを用いて調節され得る。いくつかの実施形態では、コントローラは、基板温度、前身の流速、成長速度、キャリアガス流速、及び堆積チャンバ圧力等の1つ以上の処理パラメータを調節するように構成される。コントローラは、本明細書に提供される方法を実装するように構成される機械実行可能コードの実行を補助するように構成されるプロセッサを含む。機械実行可能コードは、フラッシュメモリ、ハードディスク、またはコンピュータ実行可能コードを記憶するように構成される他の物理的記憶媒体等の物理的記憶媒体上に記憶される。

30

【0185】

コントローラは、システムの様々な成分に連結され得る。例えば、コントローラは、1つ以上の堆積システム及び/または流体流動システム（例えば、ポンプシステム）と連通していてもよい。コントローラは、ポンプシステムと連通していてもよく、それは、コントローラに筐体の圧力を調節させることができる。

40

【0186】

コントローラは、基板温度、前身の流速、成長速度、キャリアガス流速、前身の流速、及び堆積チャンバ圧力等の1つ以上の処理パラメータを調節するようにプログラムされるか、さもなければそのように構成され得る。いくつかの場合では、コントローラは、堆積チャンバ内の前身の流れの終結（または調節）を補助する堆積チャンバのバルブまたは複数のバルブと連通している。コントローラは、本明細書に提供される方法を実装するように構成される機械実行可能コードの実行を補助するように構成されるプロセッサを含む。

50

機械実行可能コードは、フラッシュメモリ、ハードディスク、またはコンピュータ実行可能コードを記憶するように構成される他の物理的記憶媒体等の物理的記憶媒体上に記憶される。コントローラを使用して、脂質溶液の流体流路中への流れ、流体流路内の1つ以上の気泡の流れ、及び1つ以上の刺激（例えば、電気刺激）の適用等の膜及び/または気孔形成を調節することもできる。

【0187】

本明細書に提供されるシステム及び方法の態様は、プログラミングにおいて具体化され得る。技術の様々な態様は、典型的には、ある種類の機械可読媒体上で行われるまたはある種類の機械可読媒体内で具体化される機械（またはプロセッサ）実行可能コード及び/または関連データの形態の「製品」または「製造品」であると考えられ得る。機械実行可能コードは、メモリ（例えば、可読専用メモリ、ランダムアクセスメモリ、フラッシュメモリ）またはハードディスク等の電子記憶ユニット上に記憶され得る。「記憶」型媒体は、ソフトウェアプログラミングの任意に時点で非一時的記憶装置を提供し得る、コンピュータ、プロセッサ等の有形メモリまたは様々な半導体メモリ、テープ装置、ディスクドライブ等のそれらの関連モジュールのいずれかまたは全てを含み得る。ソフトウェアの全てまたは一部は、インターネットまたは様々な他の電気通信ネットワークを通して通信されることもある。そのような通信は、例えば、一方のコンピュータまたはプロセッサから他方へ、例えば、管理サーバまたはホストコンピュータからアプリケーションサーバのコンピュータプラットフォームにソフトウェアをロードすることができる。このため、ソフトウェア要素を保有し得る別の種類の媒体は、有線及び光地上線ネットワークを通して、様々なエアリンク上でローカル装置間の物理界面を横断して使用されるような光波、電波、及び電磁波を含む。有線または無線リンク、光リンク等のそのような波を搬送する物理的要素も、ソフトウェアを保有する媒体として考えられ得る。本明細書に使用する場合、非一時的な有形の「記憶」媒体に限定されない限り、コンピュータまたは機械「可読媒体」等の用語は、実行用のプロセッサへの命令の提供に關与する任意の媒体を指す。

【0188】

よって、コンピュータ実行可能コード等の機械可読媒体は、有形記憶媒体、搬送波媒体、または物理的伝送媒体を含むが、これらに限定されない多くの形態をとる可能性がある。不揮発性記憶媒体には、例えば、任意のコンピュータ（複数可）における記憶装置のうちのいずれか等、図面に示されるデータベースを実装するために使用されるもの等の光学または磁気ディスクが挙げられる。揮発性記憶媒体は、そのようなコンピュータプラットフォームのメインメモリ等のダイナミックメモリを含む。有形伝送媒体は、同軸ケーブル、すなわち、コンピュータシステム内にバスを含むワイヤを含む銅線及び繊維光学部品を含む。搬送波伝送媒体は、電気信号もしくは電磁信号、または無線周波（RF）赤外線（IR）データ通信中に生成されるもの等の音波もしくは光波の形態であってもよい。したがって、コンピュータ可読媒体の一般的な形態には、例えば、フロッピーディスク、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ、任意の他の磁気媒体、CD-ROM、DVD、もしくはDVD-ROM、任意の他の光学媒体、パンチカード紙テープ、穴のパターンを有する任意の他の物理的記憶媒体、RAM、ROM、PROM、及びEPROM、FLASH-EPROM、任意の他のメモリチップもしくはカートリッジ、データもしくは命令を輸送する搬送波、そのような搬送波を輸送するケーブルもしくはリンク、またはコンピュータがプログラミングコード及び/もしくはデータを読み取ることができる任意の他の媒体形態が挙げられる。コンピュータ可読媒体のこれらの形態の多くは、1つ以上の命令の1つ以上のシーケンスを実行のためにプロセッサに搬送することに関与し得る。

【0189】

脂質二重層を形成する、ナノ気孔を脂質二重層内に挿入する、及び核酸分子を配列決定するための方法は、PCT特許公開第WO2011/097028号において見られ、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの場合では、膜は、気泡を用いて形成され、ナノ気孔は、電気刺激を用いて膜内に挿入される。

【0190】

バイオチップ及び／または本明細書に記載される方法で製造されるバイオチップの使用が本明細書に記載される。バイオチップを使用して、核酸塩基の配列中のメチル化された核酸塩基の存在を決定することができる。

【0191】

本明細書に記載されるバイオチップは、トランス膜タンパク質または膜結合型タンパク質の安定性または性能に対する薬物または任意の人工もしくは天然に生じる分子の効果を決定するために使用され得る。検出器は、その上に本明細書に記載されるように人工もしくは天然のセル膜または任意の絶縁層が作製される個別にアドレス可能な電極のアレイ（例えば、2を超える）を創出することによって、設定され得る。これらの膜、層、または絶縁層内に、任意の数の事前に選択されたまたは既知のトランス膜タンパク質は、本明細書に記載される方法を使用して挿入され得る。任意のトランス膜タンパク質を、脂質二重層（または任意の絶縁層）内に挿入することができ、これらのトランス膜タンパク質の安定性または性能に対する化学物質、薬物、及び任意の生体もしくは人工分子の効果は、例えば、特定の薬物の適用後、膜の分断を検出することによって、電気的に検知または検出され得る。その存在がイオンまたは電気的に検出され得る任意のトランス膜タンパク質は、電気刺激に対する分子応答の変化は、二重層／気孔に与えられる環境における特定の薬物の適用または変化の適用と相関性があり得るため、上述のアッセイにおいて更に多くの情報を提供する。

10

【0192】

本明細書に記載されるバイオチップは、アレイセンサの異なる部分にわたって位置する異なる膜の安定性または性能に対する薬物または任意の人工もしくは天然分子の効果を決定するために使用され得る。本出願の図面において画定されるチャンネルの使用によって、異なる脂質二重層材料または絶縁層は、アレイチップの異なる区域に方向付けられてもよく、複数の異なる脂質膜または絶縁層は、試験溶液に提示されてもよく、各膜／層型は、既知の場所に存在している。膜／層型または異なる膜に有効な任意の人工もしくは天然に生じる分子に影響する薬物の能力が、検出され得る。

20

【0193】

本明細書に記載されるバイオチップは、既知の溶液中の特定のタンパク質または特定の生体分子の存在を検出する、捕捉する、選別する、及び捨てるために使用され得る。

30

【0194】

本明細書に記載されるバイオチップを作製及び使用するバイオチップ及び方法は、電解質溶液を使用してもよい。いくつかの場合では、電解質溶液中のイオンはナノ気孔を通して流れ、電極によって検出される。電極が犠牲電極（すなわち、検出中に枯渇されるもの、例えば、銀）である場合、電極は、電解質が他のものではなく多少の塩を含むとき、比較的長く持続する。いくつかの実施形態では、電解質は、カリウムイオンを含まない。（例えば、カリウムイオンは、比較的短い電極寿命をもたらすため）。いくつかの実施形態では、電解質は、塩化リチウム、塩化テトラメチルアンモニウム、トリエチル塩化アンモニウム、塩化アンモニウム、塩化ナトリウム、グルタミン酸カリウム、グルタミン酸ナトリウム、またはそれらの任意の組み合わせを含む（例えば、列記される塩は、比較的短い電極寿命をもたらすため）。

40

【0195】

本開示のバイオチップは、抵抗性、誘導性、または容量性検知を用いて測定値の検知を実施することができる。いくつかの場合では、バイオチップは、膜または膜内のナノ気孔と膜もしくはナノ気孔に隣接または近接する種との相互作用に応じて電極に隣接する膜のキャパシタンスを検知することができる電極を含む。そのような測定は、適用される交流電流（AC）波形または直流電流（DC）波形を用いて行うことができる。

【実施例】

【0196】

以下の実施例は、本開示の様々な実施形態の例示であり、制限ではない。

50

【0197】

実施例1．二重層の形成及び気孔の挿入

手動シリンジ設定及び自動シリンジポンプ設定を使用するフローセル上の二重層の形成及び気孔の挿入は、高い二重層及び単一の溶血素気孔率をもたらす。二重層は、脂質で被覆されたチップ表面を横断して1 Mまたは0.3 M KCl溶液及び空気気泡を流入し、かつ電気刺激を適用することによって、両方の設定において形成される。2つの溶血素の適用方法は、高い単一の気孔率をもたらす。1つの方法は、以下の操作を含む：(1) 溶血素をデカン中で脂質と予備混合する、(2) 溶血素-脂質混合物をチップ表面上に流入し、数分間にわたって培養する、(3) 二重層を形成する、並びに(4) 電気刺激を適用して、気孔を二重層内に電気穿孔する。第2の方法は、以下の操作を含む：(1) KClをチップの表面上に流入する、(2) デカン中の脂質をチップ表面上に流入する、(3) 二重層を形成する、(4) 溶血素をチップ表面を横断して流入する、または溶血素及び反応混合物をチップ表面を横断して流入する(5) 電気刺激を適用して、気孔を二重層内に電気穿孔する、並びに(6) KClをチップ表面を横断して流入して、遊離溶血素を除去する。本方法は、続いて、読み取りを開始する前に試薬を混合してもよく、またはチップ上で混合するために溶血素及び試薬を単に残してもよい。両方の適用方法における電気穿孔操作中、チップは、より容易な溶血素挿入のため、二重層をより流動性にするように加熱されてもよい。温度は、電気穿孔操作中または電気穿孔操作後のいずれかで室温以下まで低下させ、気孔の長い寿命を増加させる。

10

【0198】

実施例2．フローセル構造

図25及び図26を参照して、フローセルは、半導体チップの上部の上にガスケットを直接位置付けることによって、チップパッケージ上に構築される。ガスケット厚さは、50 μm ~ 500 μm で異なる。ガスケットは、片側もしくは両側に感圧接着剤を用いてプラスチックで、シリコン膜で、またはEPDM等の可撓性エラストマーで構成され得る。ガスケットは、任意の形状に作製され得る。硬質プラスチック上部(例えば、PMMAで作製される)は、ガスケットの上部(例えば、PSA積層化PMMAで作製される)に位置付けられ、感圧接着剤によって、またはガスケットに圧縮力を適用するロック機構によってガスケットに封止される。上部は、試薬及び空気を、フローセルを通して流入するために使用される単一または複数の入口及び出口を有する。

20

30

【0199】

いくつかの事例では、全体のガスケットの大きさは、4 mm \times 4 mmの正方形である。いくつかの場合では、フローセル体積は、500 μm 厚のガスケット構造に対して約1.5 μl である。いくつかの実施形態では、約15 ~ 20個の電極が、ガスケットの下で被覆される。

【0200】

実施例3．二重層形成プロトコル

1. チップ上にノチャネルを通して300 mM KClを流入することによって、チップ表面を湿らせる。

2. 20 μL のデカン中7.5 mg/ml DPHPCに続いて、120 μL の300 mM KCl、20 mM HEPES、pH 7.5(「KCl」)を通して流入する。

40

3. 30 pAの不活性化を伴い、 $\pm 250\text{ mV}$ ~ $\pm 1\text{ V}$ の範囲の一連の負の電気パルスを適用する。

4. チップを2回(20 μL のKCl、20 μL の気泡)、次いで120 μL のKClで洗浄する。

5. ステップ3を繰り返す。

6. セルの少なくとも30%が300 mV ~ 700 mVの規模のパルスで不活性化するまで操作4及び5を繰り返す(例えば、約4 ~ 8回)。

7. 2回(20 μL のKCl、20 μL の気泡)及び120 μL のKClでセルを埋め合わせる。

50

【0201】

ステップ6は、多重薄層、多重堆積、または非二重層構造に対して単一の脂質二重層を試験するための破壊試験である。単一の二重層構造を用いて最適な性能が達成される。

【0202】

上述のステップ4及び6において使用される気泡は、約2 μ L ~ 約300 μ Lの範囲であった。(液体及び気泡の)流速は、約1 μ L / 秒 ~ 約250 μ L / 秒の範囲であり、好ましい流速は、約10 μ L / 秒であった。

【0203】

これは、手動で実施された。自動化方法が、以下の実施例6に記載される。

【0204】

10

実施例4．気孔挿入プロトコル

方法1：実験の最初に溶血素を脂質と混合する

1．二重層の形成後、フローセルの上部の上に携帯用カイロを設置する。

2．10 pAの不活性化を伴い、-50 mV ~ -600 Vの範囲の一連の負の電気パルスを用いて気孔を二重層内に電気穿孔する。

次いで、300 mMのKClでプレートを洗浄して、過剰な溶血素を除去する。

【0205】

方法2：二重層上への溶血素の流入、続いて洗浄及び第1の電気穿孔：

1．二重層の形成後、20 mM HEPES中0.3 M KCl中20 μ Lの100 μ g / mL溶血素、pH 7.5 (「KCl」)、及び5 %グリセロールを、フローセルを通して流入する。

20

2．20 μ Lの気泡及び80 μ Lの0.3 M KCl、pH 7.5で洗浄する。300 mM KCl、pH 7.5で、過剰な溶血素を洗い流す

3．室温より温かい温度設定で、気孔を二重層内に電気穿孔する。

【0206】

方法3：溶血素電気穿孔を用いた二重層形成

1．洗浄ステップ(ステップ2)がないことを除いて、方法2と同様。

【0207】

実施例5．ポンプで自動化された二重層形成及び破裂

図27は、繰り返される二重層生成及び洗浄条件下における二重層が破裂する電圧をセル位置に対して示す。自動化気泡及びKCl洗浄プロトコルは、一定の二重層形成を可能にする。表1は、様々な条件下(例えば、溶血素及び脂質を用いるまたは溶血素を用いない)における二重層形成及び破裂率を示す。

30

【表 1】

表 1. 二重層形成及び破裂

チップ ID	被覆%	破裂%
120830__CC 01-1	99%	76%
120824__CC 06-1	94%	59%
120801__CC 01-1	92%	81%
120803__MT 01-1	73%	51%
120802__CC - 01-1	87%	93%
120731__MT 01-1	100%	89%
120803__MT 01-1	73%	51%

被覆%＝最初に脂質で被覆されるセルの数；二重層である必要はない。

破裂%＝セルを破裂した最後にショートされた電極の数。

【0208】

実施例 6：完全自動化二重層形成。

この例は、チップに関する自動化二重層創出プロトコルの概要を提供する。このプロトコルは、2つの部分に分けられる：チップを二重層形成に対して点検及び調製して、更に菲薄化する、開始、チップ上への実際の二重層形成。

【0209】

開始

開始プロトコルは、3つの主要ステップを有する：乾燥チェック、ショートチェック、及び任意に、調整。乾燥チェックは、いずれも異常なデータ読取値を送らないことを点検するために各電極に電圧を印加することからなる。これは、典型的には、電圧パルスを適用して、電流を読み取るセルを数えることによって行われる。いずれかが実際に電流信号を送る場合、その電極は、粗悪であると見なされる。あまりに多くのセルが粗悪である場合、手順は終了する。次のステップは、ショートチェックである。所望の塩／緩衝液が、チップ上に流入され、全てが短絡電流読取値を送ることを点検するために、電圧が各電極に適用される。これは、典型的には、電圧パルスを適用して、軌道読取値 (r a i l e d r e a d i n g) を送るセルを数えることによって行われる。十分なセルが良好 (すなわち、軌道読取値を送る) でない場合、手順は終了する。開始プロトコルの最後のステップは、任意の調整である。このステップは、ファラデー電極のために使用され、それらを電気化学に理想的な状態にするために電極を働かせる。これは、典型的には、セルに一連の電圧パルス及び／または傾斜を適用することによって行われる。

【0210】

菲薄化

菲薄化プロトコルは、4つの主要ステップを有する：脂質追加、漏出試験、二重層破裂、及び二重層の埋め合わせ。開始プロトコルの終了後、チップは所望の塩溶液で被覆され、電極は残りの実験に対して良好な状態にある。第1のステップは、脂質をシステムに追加することである。少量の脂質／有機溶媒混合物、続いてより多くの塩溶液を、チップ上に流入する。次いで、事象のループに入り、菲薄化プロトコルにより、チップが十分な被覆率及び二重層破裂を有すると見なされた場合にこのループは終了する。ループの第1の部分は、漏出試験である。この試験は、上昇電圧の階段を印加し、それが脂質材料で被覆されるかどうか、また被覆される場合、その被覆率の封止抵抗がいくつであるかという2

つの事項に関してセルを試験する。十分なセルが被覆されず、かつ高い封止抵抗を有する場合、より大きい体積の空気気泡がチップ上に流入された。これは、チップを横断するその被覆率を増加させるように示された。別の漏出試験が、この空気気泡に続いた。このサイクルは、適度な被覆率及び封止抵抗が測定されるか、またはあまりに多くの試験が連続して失敗するまで繰り返され、手順が終了されるだろう。典型的には、それは、初回の後に通過し、手順は二重層破裂コードに移動するだろう。二重層破裂コードは、 $\pm 1\text{ V}$ までずっと上昇電圧の方形波を適用する。これは、二重層を破裂するが、二重層を有しない被覆されたセルが破裂しない破裂試験である。典型的には、第1のラウンドにおいて不十分な破裂が観察され、したがって、チップ上に気泡が流入された。理論に束縛されず、この気泡は、脂質材料を再分散して、破裂したセル上に二重層を再形成し、また、破裂しなかつたセル上に脂質材料を菲薄化すると考えられている。漏出試験、二重層破裂、及び気泡のラウンド後、二重層がセルの大半にわたって形成されたことを示す破裂されたセルの閾値が見出されるだろう。チップが完成していると見なされた後、チップは、ナノ気孔の挿入の準備が整っている。

10

【0211】

コンピュータ実装

上述のプロトコル（複数可）は、コンピュータシステムで自動化及び／または実装されてもよい。バイオチップ上に脂質二重層を生み出すためのコンピュータ実装方法は、

複数の流体タンクから流体を選択し、各流体を複数のウェルを含むバイオチップ上に分注するためのものであって、各流体が事前に選択された順序で分注される、流体分注装置と、

20

各タンクが、緩衝剤、脂質液体、洗浄液体から選択される流体を含有する、複数の流体タンクと、

気泡が所定の回数で提供される、気泡生成システムと、
流体をバイオチップの複数のウェルから除去するための吸気器または重力供給除去システムと、

複数の電極を含み、該電極がポリマー配列を検出及び／または決定するために構成される、バイオチップと、

バイオチップ上に脂質二重層を形成するために流体及び気泡循環の処理を制御するための制御システムと、を備える。

30

【0212】

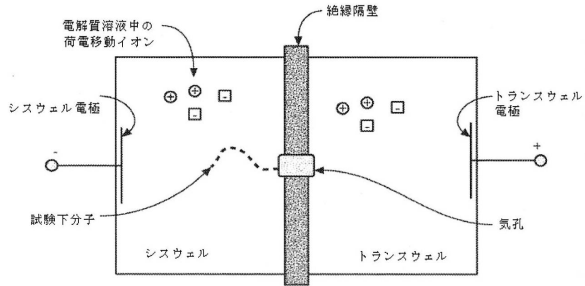
気泡生成システムは、空気に曝露されるバルブポートから空気を引き込むことによって、または気体の供給口に結合されるバルブポートから気体を引き込み、システムを通してそれを押出すことによって、気泡が創出されるような、空気への開口部であってもよい。

【0213】

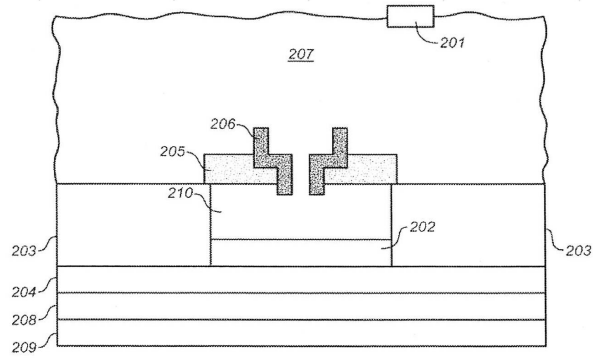
本発明の好ましい実施形態が本明細書に図示されかつ記載されたが、そのような実施形態は、例として提供されるにすぎないことが当業者には明らかである。当業者には、本発明から逸脱することなく多数の変形例、変更例、及び置換例が今では想到されるであろう。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する種々の代替手段が、本発明の実施において採用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲に含まれる方法及び構造、並びにそれらの均等物が、それによって包含されることが意図される。

40

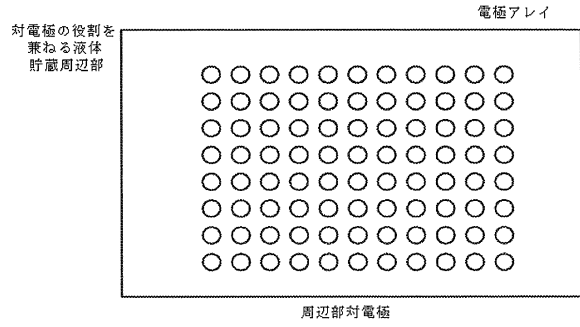
【図 1】



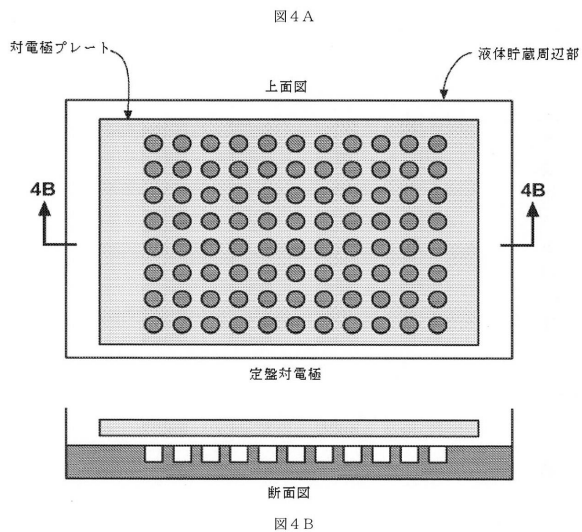
【図 2】



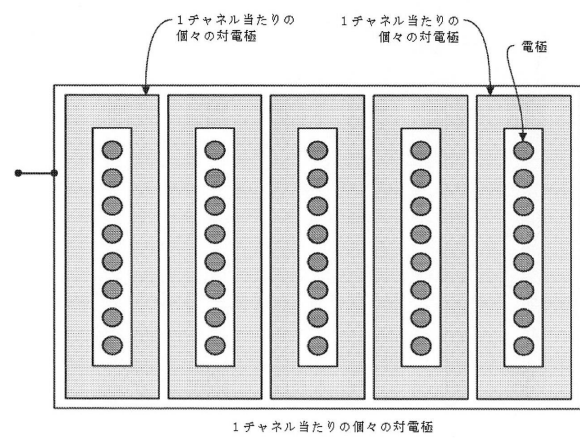
【図 3】



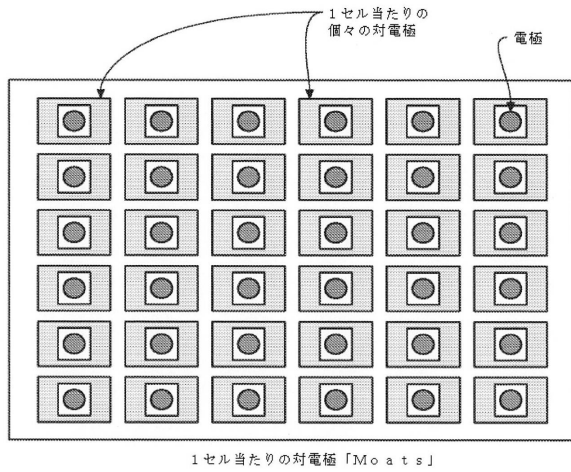
【図 4】



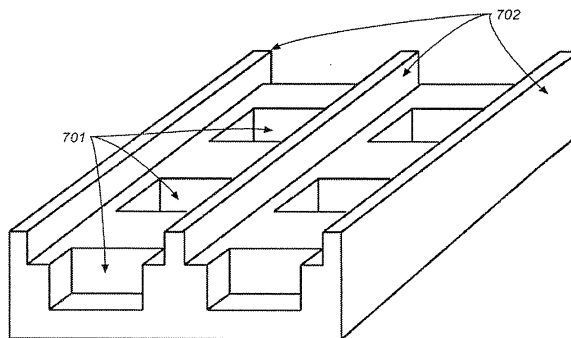
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8】

窒化チタン
アルミニウム
半導体

【図 9】

二酸化ケイ素
窒化チタン
アルミニウム
半導体

【図 10】

フォトレジスト
二酸化ケイ素
窒化チタン
アルミニウム
半導体

【図 12】

フォトレジスト
二酸化ケイ素
窒化チタン
アルミニウム
半導体

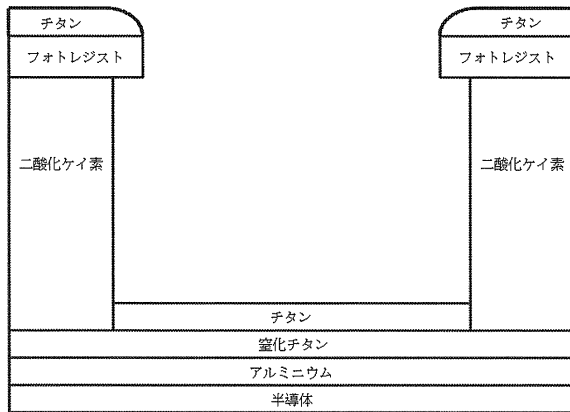
【図 11】

フォトレジスト
曝露されるフォトレジスト
フォトレジスト
二酸化ケイ素
窒化チタン
アルミニウム
半導体

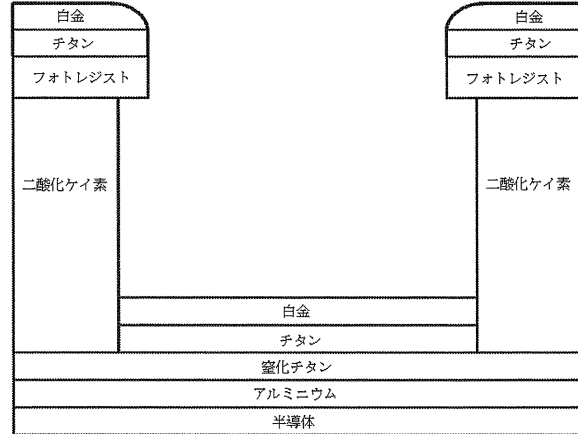
【図 13】

フォトレジスト
二酸化ケイ素
窒化チタン
アルミニウム
半導体

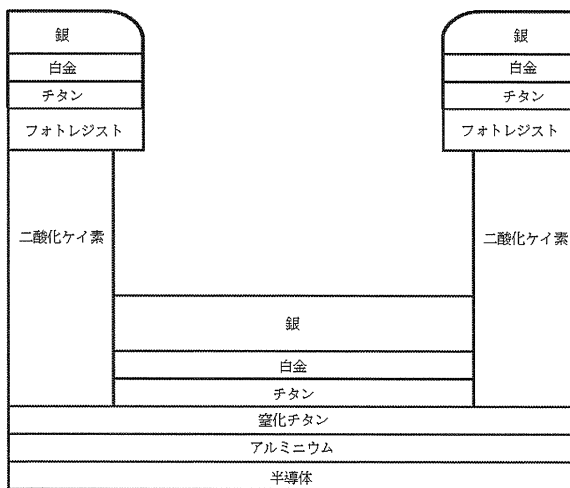
【図 14】



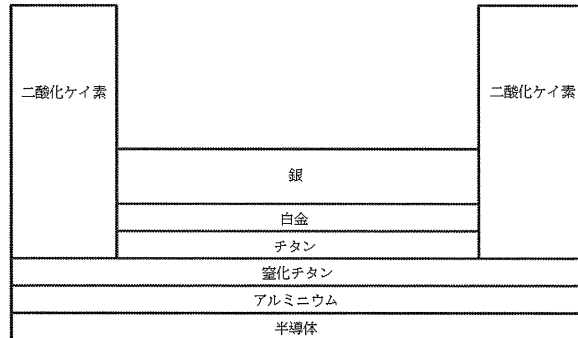
【図 15】



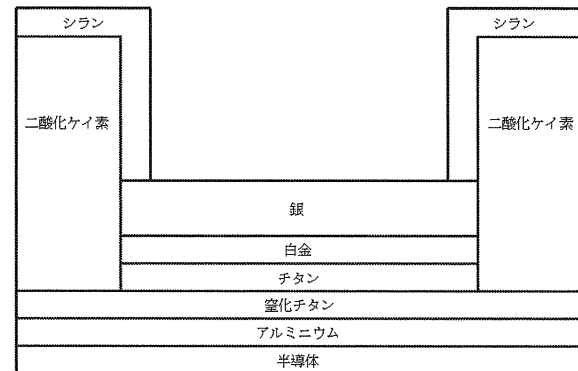
【図 16】



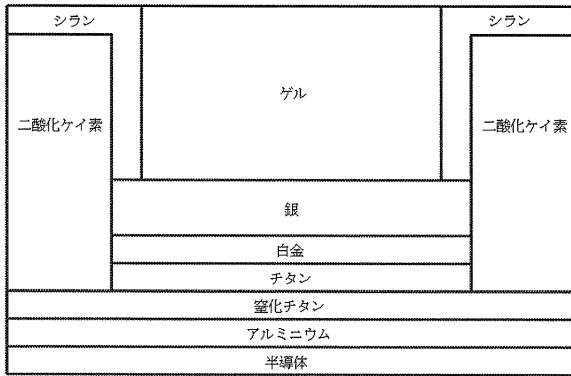
【図 17】



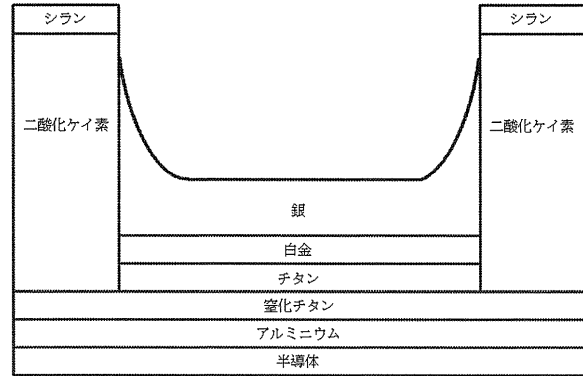
【図 18】



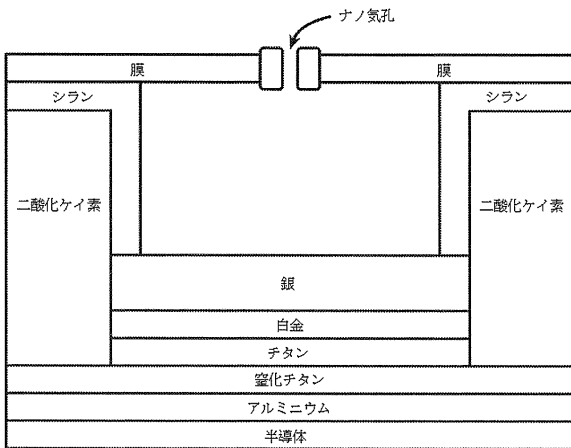
【図 19】



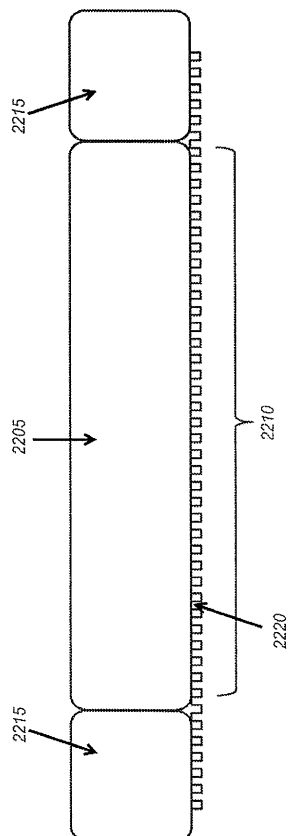
【図 21】



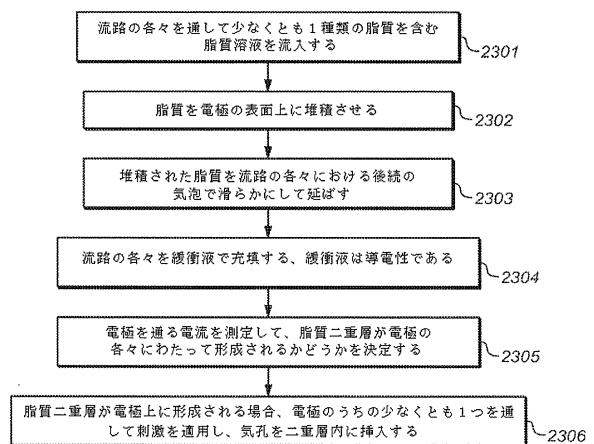
【図 20】



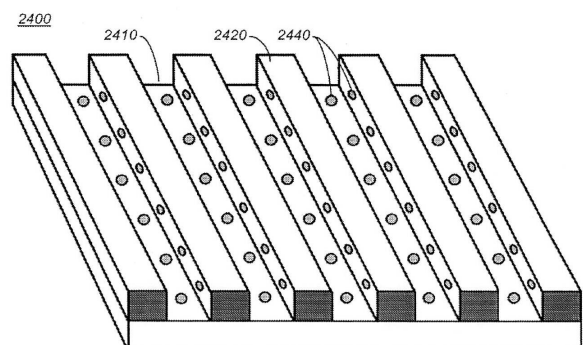
【図 22】



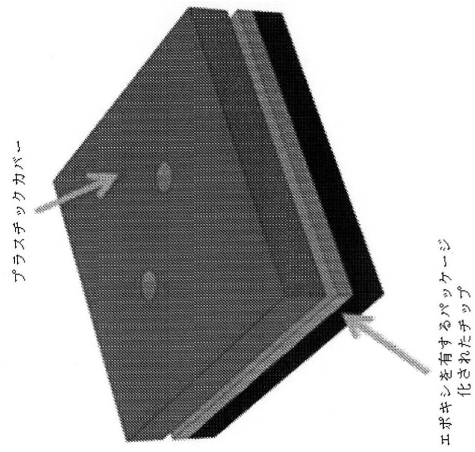
【図 23】



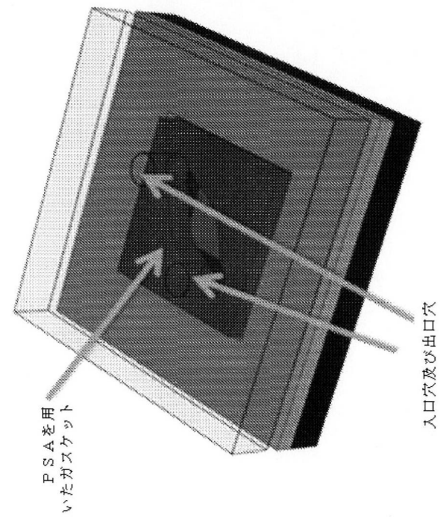
【図 24】



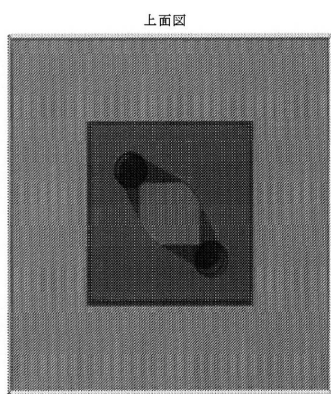
【図 25 A】



【図 25 B】

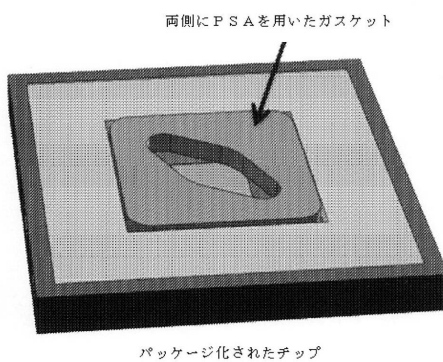


【図 25 C】

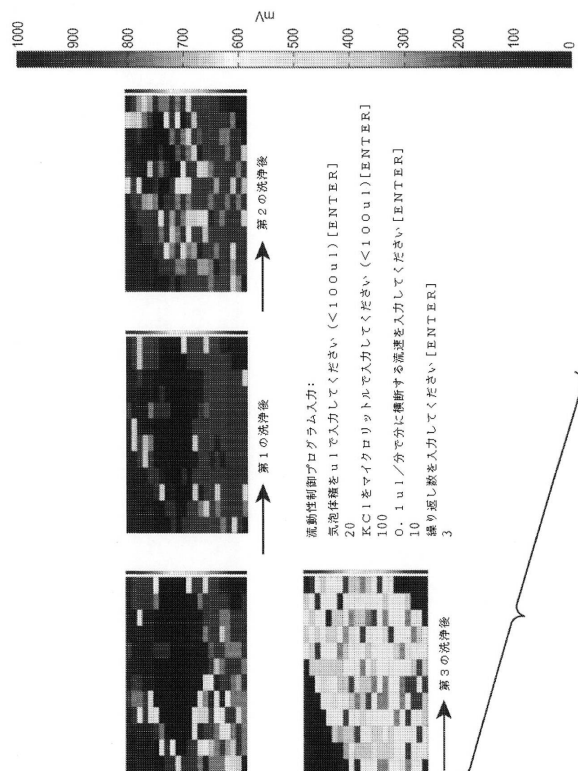


有効な電極区域の一部はカバーである（無効）

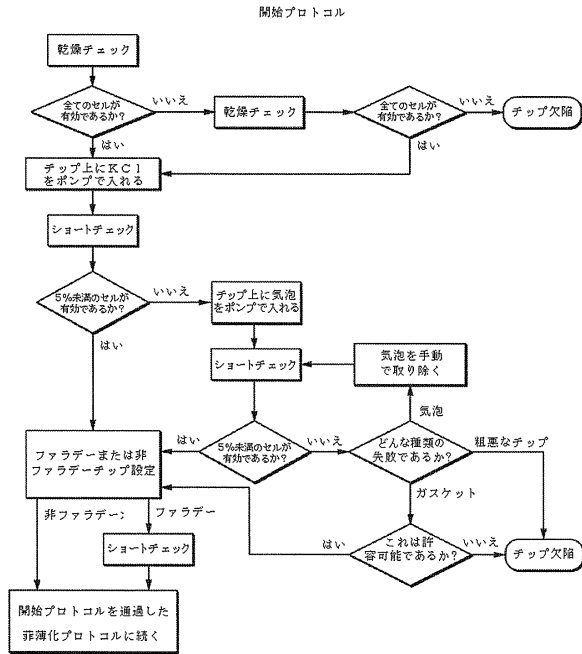
【図 26】



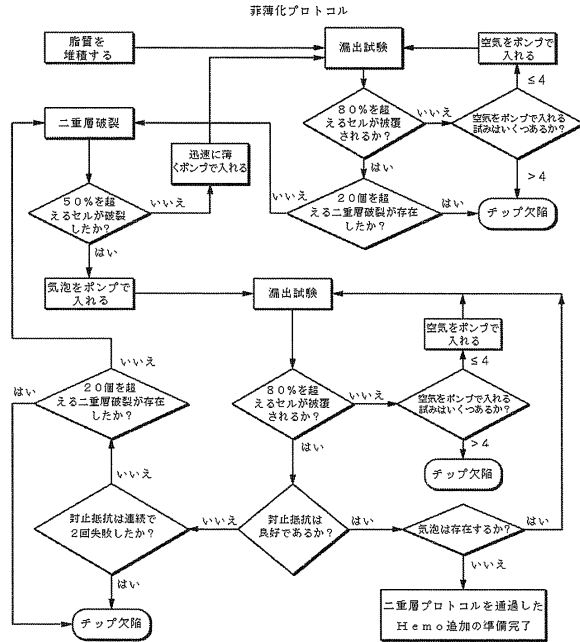
【図 27】



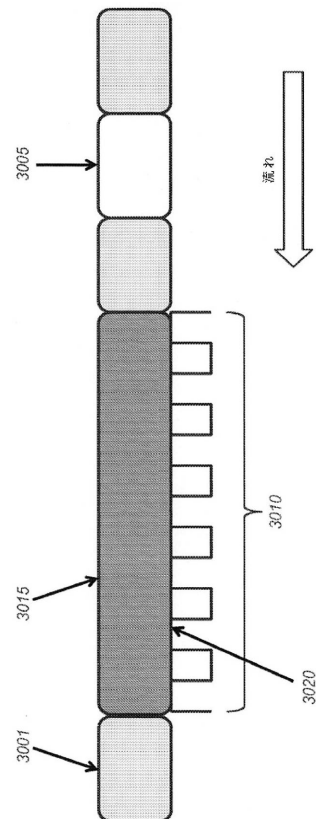
【 図 2 8 】



【 図 2 9 】



【 図 3 0 】



フロントページの続き

- (72)発明者 デイビス, ランドール・ダブリュー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3 , マウンテン・ビュー, イースト・ミドルフィールド
・ロード 3 2 5
- (72)発明者 リウ, エドワード・シアン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3 , マウンテン・ビュー, イースト・ミドルフィールド
・ロード 3 2 5
- (72)発明者 ハラダ, エリック・タケシ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3 , マウンテン・ビュー, イースト・ミドルフィールド
・ロード 3 2 5
- (72)発明者 アギレ, アン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3 , マウンテン・ビュー, イースト・ミドルフィールド
・ロード 3 2 5
- (72)発明者 トランス, アンドリュー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3 , マウンテン・ビュー, イースト・ミドルフィールド
・ロード 3 2 5
- (72)発明者 ポラード, ジェームズ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3 , マウンテン・ビュー, イースト・ミドルフィールド
・ロード 3 2 5
- (72)発明者 チェック, シンシア
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3 , マウンテン・ビュー, イースト・ミドルフィールド
・ロード 3 2 5

審査官 山本 匡子

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 2 3 4 5 0 (W O , A 1)
特開 2 0 1 3 - 1 1 8 8 5 2 (J P , A)
特開 2 0 1 1 - 1 6 0 7 1 8 (J P , A)
特開 2 0 0 9 - 1 5 6 5 7 2 (J P , A)
特開 2 0 0 5 - 1 6 4 3 8 8 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
(S T N)