

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6542676号
(P6542676)

(45) 発行日 令和1年7月10日(2019.7.10)

(24) 登録日 令和1年6月21日(2019.6.21)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 Q	1/6827	(2018.01)
C 12 M	1/00	(2006.01)
G 01 N	37/00	(2006.01)
C 12 N	15/11	(2006.01)

C 12 Q	1/6827	Z
C 12 M	1/00	A
G 01 N	37/00	1 O 1
C 12 N	15/11	Z

請求項の数 14 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2015-558929 (P2015-558929)
(86) (22) 出願日	平成26年2月19日 (2014.2.19)
(65) 公表番号	特表2016-510590 (P2016-510590A)
(43) 公表日	平成28年4月11日 (2016.4.11)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/017226
(87) 國際公開番号	W02014/130589
(87) 國際公開日	平成26年8月28日 (2014.8.28)
審査請求日	平成29年2月9日 (2017.2.9)
(31) 優先権主張番号	61/767,219
(32) 優先日	平成25年2月20日 (2013.2.20)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	515214774 バイオナノ ジェノミクス、 インコーポ レイテッド アメリカ合衆国 19104 ペンシルベ ニア州 フィラデルフィア マーケット ストリート 3701 4階
(74) 代理人	100079049 弁理士 中島 淳
(74) 代理人	100084995 弁理士 加藤 和詳
(72) 発明者	カオ、 ハン アメリカ合衆国 92130 カリフォル ニア州 サン デイエゴ カーメル カン トリー ロード 12668

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ナノフルイディクスにおける分子の特性解析

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

500 ヌクレオチド未満の長さを有する複数のサンプル核酸分子を少なくとも第1の標識で標識することであって、前記サンプル核酸分子はゲノムまたは1つもしくは複数のゲノム断片のポリヌクレオチド配列を含み、前記サンプル核酸分子はサンプルからのものである、前記標識すること、

500 ヌクレオチド未満の長さを有する複数の標識された参照核酸分子を提供することであって、前記参照核酸分子は1つもしくは複数の参照ゲノム断片のポリヌクレオチド配列を含む、前記提供すること、

前記複数の標識されたサンプル核酸分子を1つまたは複数の流体チャネルを通して移動させること、 10

前記複数の標識された参照核酸分子を1つまたは複数の流体チャネルに通して移動させること、

前記標識されたサンプル核酸分子からのシグナルの物理的計数を検出することであって、前記シグナルは前記ゲノムまたは1つもしくは複数のゲノム断片に特徴的なパターンを含む、前記検出すること、

前記標識された参照核酸分子からのシグナルの物理的計数を検出することであって、前記シグナルは前記1つもしくは複数の参照ゲノム断片に特徴的なパターンを含む、前記検出すること、

前記ゲノムまたは1つもしくは複数のゲノム断片に特徴的なパターンの位置および前記

10

20

1つまたは複数の参照ゲノム断片に特徴的なパターンの位置を、参照ゲノム内のパターンの位置にアライメントして、前記参照ゲノムにわたる前記サンプル核酸分子についてのカバー倍数 (coverage depth) および前記参照ゲノムにわたる前記参照核酸分子についてのカバー倍数 (coverage depth) を確認すること、ならびに、

前記サンプル中における注目する前記ゲノムまたは1つもしくは複数のゲノム断片のコピー数を決定すること、

を含み、前記標識されたサンプル核酸分子および前記標識された参照核酸分子は同じ生体を出所とするか、または異なる生体を出所とする、

ゲノムまたは1つもしくは複数のゲノム断片のポリヌクレオチド配列を含むサンプルを特性解析する方法。 10

【請求項2】

前記サンプルは母体血液を出所とし、前記標識された参照核酸分子は血液以外の母体サンプルを出所とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記サンプルは循環胎児細胞を含む、請求項1又は請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記サンプルについてのカバー倍数 (coverage depth) を反映するためにヒストグラム分布を生成することをさらに含む、請求項1～請求項3のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項5】

前記標識された参照核酸分子を生成できるように参照核酸分子を標識することをさらに含み、前記標識された参照核酸分子は1つまたは複数の第2のパターンを含む、請求項1～請求項4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記標識された参照核酸分子からのシグナルは、電気的または光学的に記憶された数値または数値群を含む、請求項1～請求項5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

注目する前記1つまたは複数のゲノム断片は性染色体またはその少なくとも1つの断片を含み、前記1つまたは複数の参照ゲノム断片は常染色体またはその少なくとも1つの断片を含む、請求項1～請求項6のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項8】

前記第1の標識は、蛍光標識、放射性標識、磁気標識および非光学的標識の内の少なくとも1つを含む、請求項1～請求項7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

標識付与は、

第1の配列モチーフのところで、サンプル核酸分子の二本鎖DNAの一本の鎖をニッキングエンドヌクレアーゼでニッキングすること、および

前記DNAを標識すること、

を含む、請求項1～請求項8のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項10】

前記DNA上のニックの少なくとも一部を修復することをさらに含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

ポリヌクレオチド配列を含むサンプル分子のポリヌクレオチド配列上の複数の配列特異的な位置を標識すること、

流体チャネル内で前記サンプル分子の少なくとも一部分を線状化すること、

前記配列特異的な位置の標識のパターンの物理的計数を検出すること、

参照またはde novoでのin silicoゲノムアセンブリにマッチするパターンの物理的計数をヒストグラム分布にまとめてカバー倍数 (coverage dep 50

t h) を反映すること、および

前記サンプル分子の部分についてのカバー倍数 (coverage depth) が分子の他の部分についてのカバー倍数 (coverage depth) と異なる場合に、前記サンプル分子内の遺伝的異常の存在または非存在を決定することを含む、

ポリヌクレオチド配列を含むサンプルを特性解析する方法。

【請求項 1 2】

前記サンプルは循環胎児細胞を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記サンプル分子および前記参照分子は同じ生体の異なる組織を出所とする、請求項 1 1 または請求項 1 2 記載の方法。 10

【請求項 1 4】

前記参照分子からのシグナルの量は、電気的または光学的に記憶された数値または数値群を含む、請求項 1 1 または請求項 1 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

関連出願の相互参照

本出願は 2013 年 2 月 20 日に出願された米国仮出願第 61 / 767219 号の利益を主張するものであり、該米国仮出願はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

【発明の概要】 20

【 0 0 0 2 】

本明細書中のいくつかの実施形態によれば、サンプルを特性解析する方法が提供される。該方法は、複数のサンプル分子を少なくとも第 1 の標識で標識することを含み、ここで前記サンプル分子は注目する 1 つまたは複数の第 1 のゲノム断片のポリヌクレオチド配列を含み、注目する前記 1 つまたは複数の第 1 のゲノム断片はサンプル中の異常の可能性のあるゲノム領域に対応する。前記方法は、複数の標識参照分子を提供することを含んでもよく、前記参照分子は 1 つまたは複数の参照ゲノム断片のポリヌクレオチド配列を含み、該 1 つまたは複数の参照ゲノム断片は、異常の可能性があるゲノム領域には対応しないことが既知であるゲノム断片である。本明細書で使用する用語「異常の可能性があるゲノム領域に対応する」およびこの用語からの変形には、異常な染色体領域と重複する、または該領域に含まれる、ゲノム断片が含まれ、該異常な染色体領域は、重複 (duplication) 、欠失、逆位、転座、および / または異数染色体もしくはそれらの断片を含むがそれらに限定されない。ここで、ゲノム断片は、存在 (例えば、重複) または非存在 (例えば、欠失、例えばゲノム断片が欠失領域に含まれるまたは欠失領域と重複する場合) のどちらであってもよい異常なゲノム領域に対応しうる。前記方法は、複数の標識サンプル分子および複数の標識参照分子を流体チャネルを通して移動させることを含むことができる。前記方法は、前記標識サンプル分子からのシグナルを検出して、少なくとも、注目する前記 1 つまたは複数の第 1 のゲノム断片に特徴的な 1 つまたは複数の第 1 のパターン、および前記 1 つまたは複数の参照ゲノム断片に特徴的な 1 つまたは複数の第 2 のパターンを確認することを含むことができる。前記方法は、前記 1 つまたは複数の第 1 のパターンを確認するシグナルを、前記 1 つまたは複数の第 2 のパターンを確認するシグナルと相關させることを含むことができる。いくつかの実施形態では、標識付与は、サンプル分子を第 1 の標識で標識することを含み、ここで、参照分子は第 2 の標識を含み、前記第 1 の標識は前記 1 つまたは複数の第 1 のパターンを生成するように構成されており、前記第 2 の標識は前記 1 つまたは複数の第 2 のパターンを生成するように構成されており、前記第 1 の標識および前記第 2 の標識は互いに異種のものである。いくつかの実施形態では、標識付与は、第 1 の標識で標識することを含み、ここで、前記 1 つまたは複数の第 1 のパターンおよび前記 1 つまたは複数の第 2 のパターンは、それぞれ、前記第 1 の標識を含み、前記 1 つまたは複数の第 1 のパターンおよび前記 1 つまたは複数の第 2 のパターンは互いに異なる。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記参照分子を標識して標識参照分子 30

20

30

40

50

を生成することをさらに含み、ここで該標識参照分子は前記1つまたは複数の第2のパターンを含む。いくつかの実施形態では、前記標識参照分子および前記標識サンプル分子は同じサンプルを出所とする。いくつかの実施形態では、前記標識参照分子は、前記サンプルと同じ生体における異なる組織を出所とする。いくつかの実施形態では、前記標識参照分子および前記標識サンプル分子は異なる生体を出所とする。いくつかの実施形態では、前記標識参照分子からのシグナルは、電気的または光学的に記憶された数値または数値群を含む。いくつかの実施形態では、前記方法はさらに、第2のサンプルを出所とする複数の第2のサンプル分子を少なくとも前記第1の標識で標識すること、前記複数の第2のサンプル分子を流体チャネルを通して移動させること、ならびに前記標識サンプル分子からのシグナルを検出して、注目する前記1つまたは複数の第1のゲノム断片に特徴的な前記1つまたは複数の第1のパターン、および前記1つまたは複数の参考ゲノム断片に特徴的な前記1つまたは複数の第2のパターンを少なくとも確認すること、を含み、ここで、前記複数の第2のサンプル分子は、注目する前記1つまたは複数の第1のゲノム断片のポリヌクレオチド配列を含み、前記複数の第2のサンプル分子は前記染色体異常に対応しないことが既知である分子である。いくつかの実施形態では、前記方法はさらに、前記パターンの位置を参考ゲノム内のパターンの位置へアラインメントすることを含む。いくつかの実施形態では、前記サンプル分子は、前記ゲノム異常の可能性を有するサンプルを出所とし、前記1つまたは複数の参考ゲノム断片は、第1の染色体またはその断片を含み、また、前記参考ゲノム断片は、前記ゲノム異常を含まないことが既知である第2のサンプルを出所とする。いくつかの実施形態では、注目する前記1つまたは複数の第1のゲノム断片は、性染色体、または性染色体の少なくとも1つの断片を含み、前記1つまたは複数の参考ゲノム断片は、常染色体、または常染色体の少なくとも1つの断片を含む。いくつかの実施形態では、注目する前記1つまたは複数の第1のゲノム断片は、ヒト21番染色体、ヒト13番染色体、ヒト14番染色体、ヒト15番染色体、ヒト16番染色体、ヒト18番染色体、ヒト22番染色体およびそれらの断片からなる群から選択される第1の常染色体、または該第1の常染色体の少なくとも1つの断片を含み、前記1つまたは複数の参考ゲノム断片は第2の常染色体または少なくとも1つのその断片を含むが、前記第2の常染色体あるいはその断片は、前記第1の常染色体あるいはその断片とは異なる。いくつかの実施形態では、シグナルを相關させることは、複数の標識サンプル分子またはそれらの部分から発生するシグナル(S1、S2...Sn)と参考から発生するシグナル(C)との間の比(K)(K1=S1/C、K2=S2/C...Kn=Sn/C)を使用することを含む。いくつかの実施形態では、前記第1の標識は、蛍光標識、放射性標識、磁気標識または非光学的標識の内の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、前記第2の標識は、蛍光標識、放射性標識、磁気標識または非光学的標識の内の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、標識付与は、第1の配列モチーフで二本鎖DNAの一本の鎖をニッキングエンドヌクレアーゼでニッキングし、そのDNAを標識することを含む。いくつかの実施形態では、前記方法はさらに、DNA上のニックの少なくとも一部を修復することを含む。いくつかの実施形態では、ニックは修復されない。いくつかの実施形態では、標識は転写ターミネーターを含む。いくつかの実施形態では、前記第1の標識による標識付与は、前記サンプル分子の少なくとも1つの配列モチーフに対し、非切断制限酵素、ジンクフィンガータンパク質、抗体、転写因子、転写活性化因子様ドメイン、DNA結合タンパク質、ポリアミド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸およびメチルトランスフェラーゼからなる群から選択されるDNA結合物でタグ付けすることを含む。いくつかの実施形態では、前記第1の標識による標識付与は、前記サンプル分子の少なくとも1つの配列モチーフをメチルトランスフェラーゼでタグ付けすることを含む。いくつかの実施形態では、前記方法はさらに、前記サンプル分子を非配列特異的標識で標識することを含む。前記非配列特異的標識は、前記第1の標識および前記第2の標識とは異なっていてよい。いくつかの実施形態では、前記存在しうる異常ゲノム領域は、転座、付加、増幅、トランスバージョン、逆位、異数性、倍数性、モノソミー、トリソミー、トリソミー21、トリソミー13、トリソミー14、トリソミー15、トリソミー16、10
20
30
40
50

トリソミー18、トリソミー22、三倍性、四倍性または性染色体異数性の内の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、前記遺伝的異常は、トリソミーまたはモノソミーの内の少なくとも1つを含む。

【0003】

本明細書中のいくつかの実施形態によると、サンプルを特性解析する方法が提供される。前記方法は、サンプル分子のポリヌクレオチド配列上の複数の配列特異的な位置を標識することを含むことができる。前記方法は、流体チャネル内で前記サンプル分子の少なくとも一部分を線状化することを含むことができる。前記方法は、前記サンプル分子上の標識からのシグナルを定量することを含むことができる。前記方法は、前記サンプル分子からのシグナルの量を参照分子からのシグナルの量と比較することを含むことができる。前記方法は、前記サンプル分子からのシグナルの量が前記参照分子から発生するシグナルの量と異なる場合に、前記サンプルDNA内の遺伝的異常の存在または非存在を決定することを含むことができる。いくつかの実施形態では、前記サンプル分子および前記参照分子は、同じ生体を出所とする。いくつかの実施形態では、前記サンプル分子および前記参照分子は、同じ生体の異なる組織を出所とする。いくつかの実施形態では、前記サンプル分子および前記参照分子は、異なる生体を出所とする。いくつかの実施形態では、前記参照分子からのシグナルの量からのシグナルは、電気的または光学的に記憶された数値または数値群を含む。いくつかの実施形態では、前記サンプル分子は、DNAを含む。いくつかの実施形態では、遺伝的異常は、転座、付加、增幅、トランスバージョン、逆位、異数性、倍数性、モノソミー、トリソミー、トリソミー21、トリソミー13、トリソミー14、トリソミー15、トリソミー16、トリソミー18、トリソミー22、三倍性、四倍性または性染色体異数性の内の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、前記遺伝的異常は、トリソミーまたはモノソミーの内の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、標識付与は、前記ポリヌクレオチドを蛍光標識、放射性標識、磁気標識または非光学的標識の内の少なくとも1つで標識することを含む。いくつかの実施形態では、標識付与は、第1の配列モチーフで二本鎖DNAのうちの一本の鎖をニッキングエンドヌクレアーゼでニッキングすること、およびそのDNAを標識することを含む。いくつかの実施形態では、標識付与は、第1のDNA上のニックの少なくとも一部を修復することをさらに含む。いくつかの実施形態では、ニックは修復されない。いくつかの実施形態では、標識は転写ターミネーターを含む。いくつかの実施形態では、標識付与は、前記サンプル分子の少なくとも1つの配列モチーフに、非切断制限酵素、ジンクフィンガータンパク質、抗体、転写因子、転写活性化因子様ドメイン、DNA結合タンパク質、ポリアミド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸およびメチルトランスフェラーゼからなる群から選択されるDNA結合物でタグ付けすることを含む。いくつかの実施形態では、前記第1の標識による標識付与は、前記サンプル分子の少なくとも1つの配列モチーフをメチルトランスフェラーゼでタグ付けすることを含む。

【0004】

本明細書中のいくつかの実施形態によると、サンプルを特性解析する方法が提供される。前記方法は、サンプル核酸分子を標識することを含むことができる。前記方法は、前記標識サンプル核酸分子を流体ナノチャネルを通して移動させることを含むことができ、ここで、前記流体ナノチャネルはサンプル核酸分子の少なくとも一部分を伸張させるように構成されており、前記流体ナノチャネルは10nm以上の長さおよび1,000nm未満の断面直径を有する。前記方法は、流体チャネル内で前記サンプル核酸分子から発生するシグナルを検出することを含むことができる。前記方法は、前記サンプル核酸分子上の前記標識の位置を決定することを含むことができる。前記方法は、前記サンプル核酸分子上の前記標識の位置を参照ゲノム内の標識の位置にアラインメントすることを含むことができ、ここで、前記参照ゲノムは、前記サンプル分子と同じ生体を出所とする第2のサンプルから得られる。

【0005】

いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうち任意のものにおける前記流体ナノチ

10

20

30

40

50

ヤネルは、10 nm以上 の長さおよび5,000 nm未満の断面直径を有するチャネルを含む。いくつかの実施形態では、前記流体チャネルはナノチャネルを含む。いくつかの実施形態では、前記流体チャネルは基板の表面に平行に配置される。いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、移動させることは、前記標識サンプルに流体の流れ、放射線場、電気浸透力、電気泳動力、動電力、温度勾配、表面特性勾配、毛細管流れ、圧力勾配、磁場、電場、後退メニスカス（receding meniscus）、表面張力、熱勾配、引張力、押力およびそれらの組み合わせからなる群から選択される原動力をかけることを含む。

【0006】

いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうちの任意のものにおける前記サンプルは、細菌、ビリオン、DNA分子、RNA分子、核酸ポリマー、タンパク質、ペプチドおよび多糖からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうち任意のものにおける前記サンプルは母体血液を出所とし、前記参照分子は、血液以外の母体サンプルを出所とする。いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうち任意のものにおける前記サンプルはヌクレオチドを含み、少なくとも2つの標識は、ヌクレオチド内の注目する領域のそれぞれの末端に配置される。いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうち任意のものにおける前記サンプルは循環胎児細胞、循環腫瘍細胞または体液もしくは組織を含む。

【0007】

いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうち任意のものは、標識の物理的計数、強度、波長またはサイズを決定することを含む光学検査を含む。いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうち任意のものは、前記サンプル中の少なくとも1つの標識領域の長さを決定することを含む光学検査を含む。いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうち任意のものは、前記サンプルまたは前記サンプルの部分を含むプールから発生するシグナルを決定することをさらに含む。

【0008】

いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうち任意のものは、複数のサンプルまたはサンプル部分から発生するシグナル（S₁、S₂...S_n）と参照から発生するシグナル（C）との間の比（K）（K₁=S₁/C、K₂=S₂/C...K_n=S_n/C）を使用することを含む。いくつかの実施形態では、K₁とK_nとの差は、胎児サンプルの存在を同定するために使用される。いくつかの実施形態では、K₁とK_nとの差は、腫瘍その他の癌を出所とするDNAの存在を同定するために使用される。いくつかの実施形態では、K₁とK_nとの差は、前記サンプル中の遺伝的異常の存在を決定するために使用される。いくつかの実施形態では、前記遺伝的異常は異数性である。いくつかの実施形態では、前記遺伝的異常は、転座、付加、増幅、トランスバージョンまたは逆位である。

【0009】

いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうち任意のものは、既知の二倍性の染色体または一倍性の染色体を出所とする参照を含む。いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうち任意のものは、前記サンプルからのシグナルをメタゲノムまたはマイクロバイオーム研究で得た集団分布と相關させることを含む。いくつかの実施形態では、本明細書中の方法のうち任意のものは、前記サンプルについてのカバー倍数（coverage depth）を反映するためにヒストグラム分布を生成することを含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するシステムが提供される。前記システムは、サンプル分子を少なくとも2つの標識で標識するための1つまたは複数の領域を含むことができる。前記システムは、標識サンプル分子を移動させるための流体チャネルを含むことができ、ここで、前記流体チャネルは前記サンプル分子の少なくとも一部分を伸張させるように構成されており、前記流体チャネルは10 nm以上の長さおよび5,000 nm未満の断面直径を有する。前記システムは、前記流体チャネル内で前記標識サンプルから発生するシグナルを検出するための装置を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0011】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するシステムが提供される。前記システムは、サンプル核酸分子を標識するための1つまたは複数の領域を含むことができる。前記システムは、前記標識サンプル核酸分子を移動させるための流体ナノチャネルを含むことができ、ここで、前記流体ナノチャネルはサンプル核酸分子の少なくとも一部分を伸張させるように構成されており、前記流体ナノチャネルは10nm以上の長さおよび1,000nm未満の断面直径を有する。前記システムは、前記流体チャネル内で前記サンプル核酸分子から発生するシグナルを検出するための装置を含むことができる。

【0012】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。前記システムは、サンプルDNA上の複数の配列特異的位置を標識するための領域を含むことができる。前記システムは、前記サンプルDNAの少なくとも一部分を線状化するための領域を含むことができる。前記システムは、前記サンプルDNA上の標識から発生するシグナルを定量するための装置を含むことができる。

10

【0013】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。前記システムは、サンプル分子を少なくとも2つの標識で標識する手段を含むことができる。前記システムは、前記標識サンプル分子を線状化する手段を含むことができる。前記システムは、流体チャネル内で前記標識サンプルから発生するシグナルを検出する手段を含むことができる。

20

【0014】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。前記システムは、サンプル核酸分子を標識する手段を含むことができる。前記システムは、前記標識サンプル核酸分子を線状化する手段を含むことができる。前記システムは、流体チャネル内で前記サンプル核酸分子から発生するシグナルを検出する手段を含むことができる。

【0015】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。前記システムは、サンプルDNA上の複数の配列特異的位置を標識する手段を含むことができる。前記システムは、前記サンプルDNAの少なくとも一部分を線状化する手段を含むことができる。前記システムは、前記サンプルDNA上の標識から発生するシグナルを定量する手段を含むことができる。

30

【0016】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものは、細菌、ビリオン、DNA分子、RNA分子、核酸ポリマー、タンパク質、ペプチドおよび多糖からなる群から選択されるサンプルを特性解析することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものは、母体血液を出所とするサンプルを特性解析することができ、ここで、前記参照分子は、血液以外の母体サンプルを出所とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものは、ヌクレオチドを含むサンプルを特性解析することができ、ここで、少なくとも2つの標識は、そのヌクレオチド内の注目するゾーンのそれぞれの末端に配置される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものは、循環胎児細胞、循環腫瘍細胞または体液もしくは組織を含むサンプルを特性解析することができる。

40

【0017】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものは、蛍光標識、放射性標識、磁気標識またはそれらの組み合わせからなる群から選択される標識を含むことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものは光学検査のために構成することができ、ここで、光学検査は、標識の物理的計数、強度、波長またはサイズを決定することを含む。いくつかの実施形態では、光学検査は、サンプル中の少なくとも1つの標識領域の長さを決定することを含む。いくつかの実施形態では、

50

本明細書に記載のシステムのうち任意のものは、シグナルを相関させるように構成することができ、ここで、シグナルを相関させることは、サンプルのプールまたはサンプルの部分のプールから発生するシグナルを決定することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものは、シグナルを相関させるように構成することができ、ここで、シグナルを相関させることは、複数のサンプルまたはサンプルの部分から発生するシグナル（S1、S2...Sn）と参照から発生するシグナル（C）との間の比（K）（K1 = S1 / C、K2 = S2 / C...Kn = Sn / C）を使用することを含む。いくつかの実施形態では、K1とKnとの差は、胎児サンプルの存在を同定するために使用される。いくつかの実施形態では、K1とKnとの差は、腫瘍その他の癌を出所とするDNAの存在を同定するために使用される。いくつかの実施形態では、K1とKnとの差は、前記サンプル中の遺伝的異常の存在を決定するために使用される。いくつかの実施形態では、前記遺伝的異常は異数性である。いくつかの実施形態では、前記遺伝的異常は、転座、付加、増幅、トランスバージョンまたは逆位である。

【0018】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものは、既知の二倍性の染色体または一倍性の染色体を出所とする参照を含むことができる。

【0019】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものは、前記サンプルからのシグナルを、メタゲノムまたはマイクロバイオーム研究で得た集団分布と相関させることができる。

【0020】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものの流体チャネルは、ナノチャネルを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものの流体チャネルは、基板の表面に平行に配置される。いくつかの実施形態では、移動させることは、前記標識サンプルに流体の流れ、放射線場、電気浸透力、電気泳動力、動電力、温度勾配、表面特性勾配、毛細管流動、圧力勾配、磁場、電場、後退メニスカス（receding meniscus）、表面張力、熱勾配、引張力、押力およびそれらの組み合わせからなる群から選択される原動力をかけることを含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものは、サンプルについてのカバー倍数（coverage depth）を反映してヒストグラム分布を生成するように構成される。

【0022】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のうち任意のものを実施するためのキットが提供される。

【0023】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のシステムのうち任意のものを使用するためのキットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、本明細書中のいくつかの実施形態に係る、ナノ流体チャネルを通って流動するサンプル分子または粒子（長円体）および参照または比較の分子または粒子（球体）を示す概略図である。

【0025】

【図2】図2は、標識分子または粒子から放出されたシグナルを検出して、サンプルおよび参照の分子または粒子の量、強度および構成をまとめる、イメージングセットアップの実施形態を示す概略図である。

【0026】

【図3a】図3aは、個々のナノ流体チャネル内でPCRにより生成し、蛍光染色し、流動し、イメージングした既知サイズ（233bp、498bpおよび834bp）を有す

10

20

30

40

50

る小さな二本鎖DNA断片を示す一連の画像を示す図である。

【図3b】図3bは、同じナノ流体チャネル内で混合し、流動し、イメージングした同じ二本鎖DNA断片を示す図である。蛍光シグナルは、ヒストグラム内にプロットした。

【0027】

【図4】図4は、既知のサイズ(233bp、498bpおよび834bp)を有する個々の標識されたDNA分子から放出された光子を描出するガウス曲線を示す一連のグラフを示す図である。全計数および強度は、質量および/または分子サイズに線形比例していた。未知の分子サイズおよび量は、前記方法により、線形ダイナミックレンジ内で外挿することができる。

【0028】

【図5】図5は、図4からの情報を使用した、線形ダイナミックレンジ範囲内の未知の分子サイズおよび量の外挿を例示している一連の散布図を示す図である。

【0029】

【図6】図6は、参照ゲノム(ヒトゲノムバージョン19)に対してプロットされたゲノムDNA断片を示すヒストグラムである。y軸は、特定の染色体領域についてのカバー倍数(coverage depth)を示す。配列情報を含まない領域(例えば、セントロメアおよびテロメア)を除いて、ゲノム全体を通して一様な分布が観察された。

【0030】

【図7a】図7aは、1番染色体に対しアラインメントしたヒト男性サンプルを出所とする二倍性のゲノム断片を示すグラフを示す図である。y軸は、カバーの量を提供する。x軸は、ヌクレオチド位置を提供する。平均カバー倍数(coverage depth)は5×である。

【図7b】図7bは、本明細書中のいくつかの実施形態に係る方法およびプラットフォームを使用した定量的測定を示している、2×～2.5×の平均カバー倍数(coverage depth)(大まかには二倍性の常染色体の倍数の半分)とともに示した、同じ男性サンプルを出所とする一倍性の性染色体Xを示すグラフを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

胎児からは、小さなDNA断片が母体血流中に流出する。腫瘍もまた、DNAを血流中に放出することが見いだされている。本明細書中のいくつかの実施形態によると、血液中のDNA断片などのポリヌクレオチド断片を分析して、胎児または腫瘍を出所とする循環ポリヌクレオチドまたは循環細胞の存在を検出する方法がある。さらに本明細書中のいくつかの実施形態によると、母体血液中の胎児DNAを分析して遺伝的異常を検出する方法がある。いくつかの好ましい実施形態では、本明細書に記載の方法は、遺伝的異常を同定するための、ナノ流体をベースとする単一分子検出プラットフォームの使用を伴う。本明細書中のいくつかの実施形態に係る方法および装置は、例えば小さいまたは大きいDNA分子などの小さいまたは大きい分子を分析するという利点を有する。いくつかの実施形態では、注目する分子または領域は少なくとも1つのパターンで標識され、注目する参照分子または領域は少なくとも1つのパターンで標識される。分子は、マイクロ流体チャネル内で線状化することができ、ここで、注目する分子または領域についてのカバー倍数(coverage depth)を、参照分子についてのカバー倍数(coverage depth)と比較して、注目する分子のコピー数を決定することができる。

【0032】

母体血液中の短鎖DNAの約3～15%は胎児を出所すると推定されている。本明細書では、フルイディクスを組み込んだ方法を使用して、小分子(短鎖DNA断片を含む)を容易に検出および定量する方法が記載される。一部の好ましい実施形態では、前記方法は、シーケンシングまたはアセンブリを行わずに短鎖DNA断片を定量することを含む。

【0033】

羊水を抜き取るための針穿刺を含む現行の出生前診断は、流産その他の合併症を引き起こす可能性がある。さらに、多数の現行の癌検出法は、さらに例えば生検などの侵襲性手

10

20

30

40

50

技を含んでいる。本明細書中のいくつかの実施形態によると、出生前診断の非侵襲的方法が提供される。いくつかの実施形態では、前記方法は血液を検査するためである。いくつかの実施形態では、前記方法は血液サンプルだけを検査し、他の組織を出所とするサンプルは検査しない。

【0034】

さらに本明細書では、フルイディクスを組み込んでいる方法を使用して、より大きい分子（より長鎖のDNA断片を含む）を、容易に検出およびその発生源について追跡する方法が記載される。例えば、いくつかの実施形態では、DNA断片を腫瘍その他の癌である発生源まで遡って追跡する。一部の好ましい実施形態では、前記方法を使用して、遺伝的異常を同定または特性解析するためにDNA断片をそれらの発生源まで追跡する。

10

【0035】

好ましい実施形態では、母体血液サンプルを出所とする循環DNAは、母体ゲノムに対して胎児DNAを同定および定量するために分析される。いくつかの実施形態では、この情報は、侵襲性試験を行わずに出生前のゲノム健康状態（例えばトリソミー21など）を判定するために使用される。異数性を検出するためのアッセイで使用するために適切なオリゴの例は、参照により全体が本明細書に取り込まれるYahya-Graison et al., Classification of Human Chromosome 21 Gene-Expression Variations in Down Syndrome: Impact on Disease Phenotypes, Am J Hum Genet 2007, 81(3):475-491に記載されたHSA21オリゴアレイに提供されている。

20

【0036】

いくつかの実施形態では、注目するサンプルは、参照サンプルと比較される。いくつかの実施形態では、前記注目するサンプルは、母体血液サンプルを出所とする。これらの実施形態のいくつかでは、前記参照サンプルは、血液以外の出所からの母体サンプルである。いくつかの実施形態では、前記母体参照サンプルには、血液以外の倍数性組織から単離された、DNAなどのポリヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態では、前記母体参照サンプルは、口腔内サンプル、唾液サンプル、尿サンプル、喀痰サンプルまたは涙液サンプルを含む。例えば、いくつかの実施形態では、トリソミー21は、母体口腔サンプルとの比較により母体血液サンプル中で検出される。

30

【0037】

いくつかの実施形態では、前記注目するサンプルは、本明細書に記載の方法を実施する前に、胎児核酸の濃縮が行われている。例えば、いくつかの実施形態では、胎児細胞は、抗体に捕捉され得る胎児細胞特異的マーカーを使用して濃縮される。いくつかの実施形態では、注目するサンプルは、サイズ分画される。しかし、当業者に知られた任意の濃縮法を使用できる。

【0038】

いくつかの実施形態では、前記注目するサンプルは、腫瘍細胞または腫瘍細胞と疑われる細胞、または腫瘍細胞と流体連絡している組織（例えば、血液）を出所とする。いくつかの実施形態では、前記参照サンプルは、健常細胞を出所とするサンプルである。いくつかの実施形態では、前記参照サンプルは、腫瘍細胞または腫瘍細胞と疑われる細胞とは同じ生体の健常細胞を出所とする。いくつかの実施形態では、前記参照サンプルは、腫瘍細胞または腫瘍細胞を出所とする核酸を含む可能性がほとんど、または全くない組織から選択される。

40

【0039】

当業者であれば認識するように、注目するサンプルは、様々な出所からの核酸を含む可能性がある。いくつかの実施形態では、注目するサンプルは、環境サンプル、動物組織もしくは植物組織、血液その他の体液を出所とする細菌またはビリオンを含む。いくつかの実施形態では、DNA断片が、染色体異常または癌ゲノムを検出するために使用される。

【0040】

50

当業者であれば認識するように、本明細書に記載の方法は、循環胎児細胞または循環腫瘍細胞を出所とするDNAを調製および分析するために使用できる。例えば、いくつかの実施形態では、細胞は分析前に注目するDNAを放出させるために溶解させられる。

【0041】

いくつかの実施形態では、ゲノム全体がアッセイまたは分析される。いくつかの実施形態では、ゲノムの一部分だけがアッセイまたは分析される。いくつかの実施形態では、染色体全体がアッセイまたは分析される。いくつかの実施形態では、染色体の一部分だけがアッセイまたは分析される。いくつかの実施形態では、遺伝子全体が分析される。いくつかの実施形態では、遺伝子の一部分だけがアッセイまたは分析される。

【0042】

本明細書中に記載されたシグナルは、光学シグナル、蛍光シグナル、非光学シグナル、放射性シグナル、電気シグナル、磁気シグナル、化学シグナルまたはそれらの任意の組み合わせなどの任意の適切なシグナルを含むことができる。いくつかの実施形態では、シグナルは、電子スピニ共鳴分子、蛍光分子、化学発光分子、放射性同位体、酵素基質、ビオチン分子、アビジン分子、電荷移動分子、半導体ナノ結晶、半導体ナノ粒子、コロイド金ナノ結晶、リガンド、マイクロビーズ、磁気ビーズ、常磁性粒子、量子ドット、発色性基質、親和性分子、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、抗原、ナノワイヤー、ハブテン、抗体、抗体断片、脂質またはそれらの組み合わせによって生成される。

【0043】

いくつかの実施形態では、シグナルは、蛍光、化学発光、熒光、生物発光またはそれらの任意の組み合わせを誘導するために1つまたは複数の励起光源を使用することによって生成される。適切な励起光源には、レーザー、可視光源、赤外線光源、紫外線光源またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0044】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチドまたは関連シグナル（例えば、蛍光発色団（fluorophore））の検出は、定量的である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドの長さが定量される。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドのサイズが定量される。いくつかの実施形態では、シグナルの強度は、分子の長さと相関する。例えば、図3aに示したように、より長いDNA分子は、短いDNA分子より強力なシグナルを生成することができる。いくつかの実施形態では、シグナルの強度は、サンプルまたは流体チャネル中のDNAの量と相関する。

【0045】

いくつかの実施形態では、サンプルは、例えば、参照により全体が本明細書に取り込まれる米国特許出願公開第20130034546号明細書に記載されたように、コピー数のバリエーションについて分析される。

【0046】

特定分子、例えば異なる染色体を出所とするDNA断片などの特定分子、の量は、本明細書に提供した方法において定量的に測定できる。いくつかの実施形態では、二倍性の常染色体を出所とするゲノムDNAの量は、一倍性の性染色体を出所とするゲノムDNAの量の2倍であると観察される。いくつかの実施形態では、そのような断片の量は、当該断片の出所となった染色体のコピー数を反映する。いくつかの実施形態では、2つまたは3つの色標識が使用される。

【0047】

いくつかの実施形態では、染色体由来断片を検出し、相対比を使用して異数性を同定する。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドのコピー数は、 $K_1 = S_1 / C$ および $K_2 = S_2 / C$ (式中、 K_1 は、第1のサンプルのシグナルのコントロールに対する比であり、 K_2 は、第2のサンプルのシグナルのコントロールサンプルに対する比である) を使用して計算される。前記参照サンプルを出所とするコピー数は整数であり、 K_1 と K_2 との差は注目するサンプルの1つにおける異常を表すことができると想定される。いくつかの実施形態では、異常は、特定サンプルについての前記比を複数のサンプルからの平均比と

10

20

30

40

50

比較することによって検出される。前記方法はさらに、コントロールゲノム配列が、ゲノム当たりのその全長が既知である別々の部分を含み、注目する配列は、正常遺伝子当たりのその長さが既知である別々の部分を含み、K1とK2との間に有意な差があればゲノム内の遺伝的異常が示されることを想定している。いくつかの実施形態では、注目するヌクレオチド配列はトリソミー結合染色体に関するものでもよく、ここで、コントロールゲノム配列はトリソミー結合染色体以外の染色体を出所とし、K1 / K2 の比がおよそ 2 : 3 または 3 : 2 の場合、トリソミー遺伝子型が示される。いくつかの実施形態では、注目するヌクレオチド配列は、ゲノムの一部分の欠失を含む。いくつかの実施形態では、注目するヌクレオチド配列は、繰り返し配列を含む。その場合、本明細書中のいくつかの実施形態によれば、繰り返し配列のコピー数を決定できる。いくつかの実施形態では、前記第1のサンプルは母体血液（いかなる理論によっても限定されるものではないが、胎児核酸を含む可能性がある）を含み、前記第2のサンプルは血液以外の母体組織（好ましくは、胎児核酸を含む可能性がほとんど無い、または全く無い組織）を含む。

【0048】

いくつかの実施形態では、デジタル計数検出が行われる。いくつかの実施形態では、デジタル計数検出は、粒子（例えば、ビーズ）、細菌またはビリオン粒子に対し行われる。当業者であれば認識するように、本明細書に記載の方法は、固有の標識付与を行うことができる様々な標的に適用することができる。いくつかの実施形態では、デジタル核型分析が行われる。例えば、いくつかの実施形態では、デジタル核型分析は、注目する異数性を有する可能性がある染色体について行われる。本明細書に記載した方法は、転座、付加、増幅、トランスバージョン、逆位、異数性、倍数性、モノソミー、トリソミー、トリソミー-21、トリソミー-13、トリソミー-14、トリソミー-15、トリソミー-16、トリソミー-18、トリソミー-22、三倍性、四倍性、ならびにXO、XXY、XYyおよびXXXを含むがそれらに限定されない性染色体異常を含む、注目する何らかの染色体変異を検出するために使用できる。

【0049】

いくつかの実施形態では、本明細書では、長さがおよそ数十～数百ヌクレオチドである「短鎖」断片を検出するのに十分な感度を有する方法が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載したサンプル分子は、ポリヌクレオチド「短鎖」断片を含む。例えば、いくつかの実施形態では、前記ポリヌクレオチド断片は、長さが約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、前記ポリヌクレオチド断片は、長さが約100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975または1,000ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、注目する分子は、長さが約1,000、950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300、250、200、150、100または50ヌクレオチド未満の断片である。いくつかの実施形態では、前記断片は二本鎖である。いくつかの実施形態では、前記断片はDNAを含む。いくつかの実施形態では、前記断片はRNAを含む。いくつかの実施形態では、前記断片はRNAにハイブリダイズしたDNAを含む。いくつかの実施形態では、前記感度は、おおよそ、標的断片と関連した单一蛍光発色団（fluorophore）を検出する程度に高い。

【0050】

いくつかの実施形態では、注目するヌクレオチドは、長さが約500ヌクレオチド以上、例えば約500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900または2,000ヌクレオチドの長さの断片であり、また、上記に列挙した数値のいずれか2つの間の範囲、例えば約500～約2,000、約500～約1,500、

10

20

30

40

50

約 500 ~ 約 1,000、約 500 ~ 約 900、約 500 ~ 約 700、約 700 ~ 約 2,000、約 700 ~ 約 1,500、約 700 ~ 約 1,000、約 700 ~ 約 900、約 1,000 ~ 約 2,000、約 1,000 ~ 約 1,500 または約 1,500 ~ 約 2,000 の範囲、の長さをも含む。

【0051】

本明細書に記載の方法およびシステムにおいて使用するために適切な分子には、ポリマー、二本鎖DNA、一本鎖DNA、RNA、DNA - RNAハイブリッド、ポリペプチド、生体分子、タンパク質などが含まれる。適切なポリマーには、ホモポリマー、コポリマー、ブロックコポリマー、ランダムコポリマー、分岐鎖状コポリマー、デンドリマーまたはそれらの任意の組み合わせが含まれる。

10

【0052】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、母体血液サンプル中の分子の総数の約 0.025%、0.5%、0.75%、1%、1.25%、1.5%、1.75%、2%、2.25%、2.5%、2.75%、3%、3.25%、3.5%、3.75%、4%、4.25%、4.5%、4.75%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20% または 25% 未満を構成する胎児分子を検出するのに十分な感度を有する。

【0053】

いくつかの実施形態では、標識付与は、配列モチーフまたは化学成分に対して行われる。標識付与は、化学的結合または生化学的結合を含む、当業者に知られた任意の技術を使用して実施できる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載した標識は、固有の配列モチーフに結合させられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載した標識は、化学成分に結合される。これらの実施形態のうちいくつかでは、前記化学成分は、特定の染色体に関係するものである。

20

【0054】

本明細書中のいくつかの実施形態では、各標識は、蛍光発色団 (fluorophore)、量子ドット、デンドリマー、ナノワイヤー、ビーズ、ハプテン、ストレプトアビジン、アビジン、ニュートラビジン (neutravidin)、ビオチンおよび反応性基からなる群から独立して選択される。本明細書中のいくつかの実施形態では、第1の標識および第2の標識は、蛍光発色団 (fluorophore) または量子ドットからなる群から独立して選択される。本明細書中のいくつかの実施形態では、前記標識の少なくとも1つは非光学的標識を含む。本明細書中のいくつかの実施形態では、前記標識付与はポリメラーゼを用いて行われる。本明細書中のいくつかの実施形態では、前記標識付与は、標識を含むdNTPの存在下でポリメラーゼを用いて行われる。本明細書中のいくつかの実施形態では、前記ポリメラーゼは、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する。本明細書中のいくつかの実施形態では、前記ポリメラーゼはフラップ領域を離れ、リガーゼによる修復前にライゲーション可能なニックを修復するために前記フラップ領域は除去される。本明細書中のいくつかの実施形態では、前記フラップ領域は、少なくとも1つのヌクレオチドが制限された濃度で存在する条件下でポリメラーゼの 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を使用して除去される。本明細書中のいくつかの実施形態では、前記フラップ領域は、少なくとも1つのヌクレオチドが反応から除かれた条件下でポリメラーゼの 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を使用して除去される。本明細書中のいくつかの実施形態では、前記フラップ領域は、フラップエンドヌクレアーゼを用いて除去される。本明細書中のいくつかの実施形態では、前記標識付与は、少なくとも1種のdNTPの存在下でポリメラーゼを用いて行われる。本明細書中のいくつかの実施形態では、前記少なくとも1種のdNTPは、dNTPの単一種である。本明細書中のいくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法はさらに、標識付与の最中に、温度、dNTP濃度、補因子濃度、バッファー濃度またはそれらの任意の組み合わせを調整することによってポリメラーゼの活性を調節することを含む。本明細書中のいくつかの実施形態では、第1のモチーフまたは第2のモチーフをニッキングすることは、NT-BspQIを用いてニッキングすることを含

30

40

50

む。本明細書中のいくつかの実施形態では、非配列特異的標識、例えばポリヌクレオチド骨格標識、が、本明細書に記載の1つまたは複数の配列特異的標識に加えて適用される。

【0055】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の少なくとも1つの標識は、非光学的標識を含む。様々な非光学的標識を、本明細書中の実施形態と組み合わせて使用できる。いくつかの実施形態では、非光学的標識は、電子標識を含む。例示的な電子標識には、強電荷を備える分子、例えば金属イオンなどのイオン、荷電アミノ酸側鎖、あるいは他のカチオンまたはアニオン、が含まれるがそれらに限定されない。電子標識は、例えば、該標識が検出器内に配置されたときの導電率（または抵抗率）によって検出できる。いくつかの実施形態では、ナノチャネルは、チャネル内に配置された物質の導電率または抵抗率を決定することによって電子標識の存在または非存在を決定するように構成された電極を含む。いくつかの実施形態では、非光学的標識は、金属、金属酸化物（例えば、金属酸化物）または酸化ケイ素成分を含む。いくつかの実施形態では、前記非光学的標識は、金属、金属酸化物またはその他の酸化物を含む成分（例えばナノ粒子）を含む。特定の金属または酸化物成分の存在は、例えば、核磁気共鳴法によって検出できる。いくつかの実施形態では、標識は、所定の条件下（例えば、pHの変化）で、部分、例えば陽子あるいはアニオンなどの部分、を放出するように構成され、放出された部分の存在または非存在が検出される。

10

【0056】

いくつかの実施形態では、2つ以上の標識は互いに異種のものである。例えば、第1のモチーフは第1の固有パターンを生成できるように第1の標識で標識することができ、第1のモチーフとは異なる第2のモチーフは、第2の固有パターンを生成できるように第1の標識とは異種の第2の標識で標識できる。いくつかの実施形態では、2つ以上の標識は同種である。例えば、第1のモチーフは1つの標識で標識することができ、さらに第1のモチーフとは異なる第2のモチーフも固有パターンを生成するように同種の標識で標識できる。いくつかの実施形態では、注目する第1の染色体または領域に対応する複数のプローブを第1の標識で標識し、注目する第2の染色体または領域（例えば、参照染色体または領域）に対応する複数の第2のプローブを、第1の標識とは異種の第2の標識で標識する。この場合、注目する第1の染色体または領域を出所とする配列を含む標識サンプル分子は、それらが第1の標識で標識されているか第2の標識で標識されているかによって、注目する第2の染色体または領域を出所とする配列を含むサンプル分子とは区別することができる。

20

【0057】

可逆性ターミネーターを有するヌクレオチドは、第1のホスホジエステル結合を形成できるが、ターミネーションを除去（reversal）する前には、第2のホスホジエステル結合を形成することはできない（あるいは、第2のホスホジエステル結合を形成する能力が制限される）。そこで、可逆性ターミネーターを有するヌクレオチドは、ポリヌクレオチド内に（例えばニック部位において）組み込むことができるが、該ヌクレオチドはターミネーターが除去されるまでは、下流ホスホジエステル結合を形成できない。前記除去は、当業者に知られた技術を用いて行うことができる。例えば、ターミネーターは、例えば電磁放射線によって開裂できる開裂性リンカーによって、ヌクレオチドに結合させることができる。ニック修復を3'可逆性ターミネーターを有する標識ヌクレオチドを使用して行うと、単一標識ヌクレオチドを該ニックに組み込むことができるが、ターミネーターはさらなる標識ヌクレオチドが該ニック内に組み込まれるのを防止することができる。したがって、ニックに対する標識付与は、ニック1つ当たり1つの標識ヌクレオチドに限定できる。ニックに対する標識付与をニック1つ当たり1つの標識部分に限定することで、複数の標識が同じニック内に組み込まれる潜在的バイアスを最小限に抑えることができる。例えば、ニック1つ当たり1つの標識部分に標識付与を限定する手法が採られると、互いにごく近くにある2つのニックは標識からの比較的強いシグナルに基づいて分解検出できる（すなわち、2つの標識が同じニック内に単純に組み込まれてしまう可能性を排除

30

40

50

できる）。例えば、ニックの数の定量的推定が望まれる場合は、1ニック当たり1標識の手法により、標識シグナルの強度とニック数とを直接相關させることができになる。可逆性ターミネーターを有する前記ヌクレオチド上の前記標識は、本明細書に記載された通りのものであってよい。いくつかの実施形態では、可逆性ターミネーターを含む前記ヌクレオチドは量子ドットを含む。いくつかの実施形態では、可逆性ターミネーターを含む前記ヌクレオチドは蛍光発色団(fluorophore)を含む。いくつかの実施形態では、可逆性ターミネーターを含む前記ヌクレオチドは非光学的標識を含む。

【0058】

いくつかの実施形態では、複数の標識が单一のサンプル分子を標識する。いくつかの実施形態では、前記標識の少なくとも1つは配列特異的標識を含む。いくつかの実施形態では、前記標識の少なくとも1つは非配列特異的標識を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの標識が配列特異的標識を含み、少なくとも1つの標識が非配列特異的標識を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの標識が、DNAの片方または双方の鎖を切断しない。例えば、いくつかの実施形態では、少なくとも1つの標識は、非切断制限酵素、メチルトランスフェラーゼ、ジンクフィンガータンパク質、抗体、転写因子、DNA結合タンパク質、ヘアピンポリアミド、三重らせん形成オリゴデオキシヌクレオチド、ペプチド核酸またはそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、配列特異的標識と非配列特異的標識のどちらもDNAを切断しない。

【0059】

いくつかの実施形態では、例えば、蛍光標識が施されると、標識は高感度カメラを使用して検出される。いくつかの実施形態では、例えば、非光学的標識が施されると、標識は電子的に検出される。ただし、対応する標識に適した任意の検出方法を使用できる。本明細書に記載の方法は、本明細書に記載の分子の1つまたは複数の領域内における蛍光標識、放射性標識、磁気標識またはそれらの任意の組み合わせへの結合を含むことができる。標識が、注目する分子に、または注目する分子の少なくとも一部分またはその他の領域に、特異的に相補的であることで、結合がなされてもよい。

【0060】

いくつかの実施形態では、ニッキング酵素は、後で標識される、例えば標識ヌクレオチドまたは標識ヌクレオチドアナログを使用して後で標識される、配列特異的ニックを生成する。いくつかの実施形態では、前記ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、蛍光標識される。いくつかの実施形態では、DNAはナノチャネル内への閉じ込めによって線状化され、その結果、一様な線状化が起こり、シグネチャーパターンを含むDNA分子上のニック標識間の間隔の精密および正確な測定が可能になる。いくつかの実施形態では、第2のニッキング酵素が使用される。いくつかの実施形態では、前記第2のニッキング酵素は、第2の標識色とともに使用される。本明細書中の実施形態において使用できる例示的なニッカーゼには、Nb.BbvcI、Nb.BsmI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、Nt.AlwI、Nt.BbvcI、Nt.BspQI、Nt.BstNBII、Nt.CviPIIおよびそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。ニッキング剤およびプロトコルの例もまた、米国特許出願公開第2011/0171634号明細書および米国特許出願公開第2012/0237936号明細書に提供されており、これらは参照により全体が本明細書に取り込まれる。

【0061】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド、例えばRNAまたはDNAは、プローブをポリヌクレオチドの一本鎖にハイブリダイズさせることによって標識される。前記プローブは、前記RNAまたはDNAの鎖またはそれらの一部分に相補的であってよい。いくつかの実施形態では、プローブは、特定の配列モチーフに相補的である。いくつかの実施形態では、複数のプローブが、複数の特定配列モチーフに相補的になるように提供され、例えば少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、5,000または10,000(列挙した数値のうち任意

10

20

30

40

50

の 2 つの間の範囲を含む) のプローブが提供される。いくつかの実施形態では、プローブはランダムな配列を有する。いくつかの実施形態では、複数のランダム配列を備えるプローブが提供される。いくつかの実施形態では、プローブは、有機蛍光発色団 (fluorophore)、量子ドット、デンドリマー、ナノワイヤー、ビーズ、金ビーズ、常磁性ビーズ、磁気ビーズ、放射性標識、ポリスチレンビーズ、ポリエチレンビーズ、ペプチド、タンパク質、ハプテン、抗体、抗原、ストレプトアビシン、アビシン、ニュートラビシン、ビオチン、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、改変 (engineered) 制限酵素などの配列特異的結合因子、メチルトランスフェラーゼ、ジンクフィンガータンパク質などの内の 1 つまたは複数を含んでいる。いくつかの実施形態では、前記プローブは、蛍光発色団 (fluorophore) - クエンチャー対を含んでいる。前記プローブの 1 つの構成は、プローブの第 1 の端に付着した蛍光発色団 (fluorophore) およびプローブの第 2 の端に連結された適切なクエンチャーを含むことができる。この場合、前記プローブがハイブリダイズしていなければ、クエンチャーは蛍光発色団 (fluorophore) が蛍光発光するのを防止できるが、前記プローブが標的配列にハイブリダイズするとプローブは線状化し、クエンチャーを蛍光発色団 (fluorophore) から遠ざけ、適切な波長の電磁放射線によって励起された際に蛍光発色団 (fluorophore) が蛍光を発することを可能にする。いくつかの実施形態では、第 1 のプローブは FRET 対の第 1 の蛍光発色団 (fluorophore) を含み、第 2 のプローブは FRET 対の第 2 の蛍光発色団 (fluorophore) を含む。この場合、前記第 1 のプローブおよび前記第 2 のプローブが単一のラップまたは互いに FRET 半径内にある 1 対のラップにハイブリダイズすることにより、FRET によるエネルギー移動が可能となる。いくつかの実施形態では、第 1 のプローブは FRET 対の第 1 の蛍光発色団 (fluorophore) を含み、対応するギャップを埋めるために組み込まれたヌクレオチド上の標識は FRET 対の第 2 の蛍光発色団 (fluorophore) を含むことができる。この場合、前記第 1 のプローブがラップにハイブリダイズし、前記標識ヌクレオチドが対応するギャップにハイブリダイズすると、FRET によるエネルギー移動が可能になる。

【0062】

いくつかの実施形態では、二本鎖 DNA は、まず、温度の上昇または有機溶媒を用いた操作によって所定のゲノム領域の二本鎖間の水素結合を溶融させることによっていわゆる D ループを開かせ、次に、比較的安定な形態へとアニーリングにより戻る前に、一本鎖領域に対して同等あるいはそれ以上の親和性を備える少なくとも 1 つの特異的プローブにハイブリダイズされることによって標識できる。したがって、いくつかの実施形態では、二本鎖 DNA は、いずれかの鎖をニッキングまたは切断することなく本明細書に記載したようにプローブによって標識できる。いくつかの実施形態では、複数の D ループを一本鎖上で開かせることができる。この場合、複数のプローブを、特定の二本鎖 DNA にアニーリングさせることができる。

【0063】

いくつかの実施形態では、標識付与は、メチルトランスフェラーゼを介して標識をポリヌクレオチドへ移動させることを含む。いくつかの実施形態では、前記メチルトランスフェラーゼは、配列モチーフを特異的にメチル化する。したがって、標識付与は、メチルトランスフェラーゼにより標識を配列モチーフに移動させることを含むことができる。例示的な適切な DNA メチルトランスフェラーゼ (M T a s e) には、M . B s e C I (5' - A T C G A T - 3' 配列内の N 6 でアデニンをメチル化する)、M . T a q I (5' - T C G A - 3' 配列内の N 6 でアデニンをメチル化する) および M . H h a l (5' - G C G C - 3' 配列内の C 5 で第 1 のシトシンをメチル化する) が含まれるがそれらに限定されない。いくつかの実施形態では、2 つ以上のメチルトランスフェラーゼが 2 つ以上の標識を提供し、これらは同種でも異なっていてもよい。

【0064】

いくつかの実施形態では、標識付与は、メチルトランスフェラーゼを介して標識をポリ

スクレオチドへ移動させることを含む。いくつかの実施形態では、前記メチルトランスフェラーゼは、配列モチーフを特異的にメチル化する。したがって、標識付与は、メチルトランスフェラーゼにより標識を配列モチーフに移動させることを含むことができる。例示的な適切なDNAメチルトランスフェラーゼ(MTase)には、M.BseCI(5'-ATCGAT-3'配列内のN6でアデニンをメチル化する)、M.TaqI(5'-TCGA-3'配列内のN6でアデニンをメチル化する)およびM.Hhal(5'-GCGC-3'配列内のC5で第1のシトシンをメチル化する)が含まれるがそれらに限定されない。いくつかの実施形態では、2つ以上のメチルトランスフェラーゼが2つ以上の標識を提供し、これらは同種でも異なっていてもよい。

【0065】

10

いくつかの実施形態では、前記チャネルは、マイクロチャネルを含む。いくつかの実施形態では、前記チャネルは、ナノチャネルを含む。適切な流体ナノチャネルセグメントは、約1,000nm未満、約500nm未満、約200nm、約100nm未満、さらには約50nm未満、約10nm未満、約5nm未満、約2nm未満、またはさらには約0.5nm未満といった特徴的な断面寸法を有する。流体ナノチャネルセグメントは、適切には、分子の旋回半径の約2倍未満という特徴的な断面寸法を有する。いくつかの実施形態では、前記ナノチャネルは、おおよそ分子の持続長以上という特徴的な断面寸法を有する。本発明に適切な流体ナノチャネルセグメントは、約100nm以上、約500nm以上、約1,000nm以上、約2μ(ミクロン)以上、約5μ以上、約10μ以上、約1mm以上、またはいっそう約10mm以上の長さを有する。流体ナノチャネルセグメントは、いくつかの実施形態では、1cm³(立方センチメートル)当たり1流体ナノチャネルセグメント以上の密度で存在する。

【0066】

20

流体チャネルの例は、米国特許出願公開第2008/0242556号明細書の中に見いだすことができ、該米国特許出願公開はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。いくつかの実施形態では、ビリオン粒子または細菌細胞がアッセイされる。例えば、いくつかの実施形態では、細菌細胞はマイクロチャネルを使用してアッセイされる。いくつかの実施形態では、前記チャネルは、数μ~数十μの範囲内の直径を備える細胞がその中を流れることを可能にする。

【0067】

30

図1は、本明細書中のいくつかの実施形態に係る流体チャネルの配置を示す概略図である。該配置はサンプル入口チャンバー10を含むことができる。前記配置は、流体チャネル、例えば流体ナノチャネル、のアレイ12を含むことができる。前記配置は、サンプル出口チャンバー14を含むことができる。出口チャンバーは、バッファー液16を含むことができる。ナノ流体チャネルのアレイ12は、入口チャンバー10と流体連絡することができる。ナノ流体チャネルのアレイ12は、出口チャンバー14と流体連絡することができる。注目するサンプル分子または粒子18は、ナノ流体チャネルのアレイ10内に配置できる。注目するコントロールまたは比較の分子または粒子18は、ナノ流体チャネルのアレイ10内に配置できる。いくつかの実施形態では、ナノ流体チャネルのアレイ12は、入口チャンバー10を出口チャンバー14に連結する。いくつかの実施形態では、注目するサンプル分子または粒子18および注目するコントロールまたは比較の分子または粒子20は、サンプル入口チャンバー内に装填され、ナノ流体チャネルのアレイを通ってバッファー溶液16内を移動する。いくつかの実施形態では、注目するサンプル分子または粒子18および注目するコントロールまたは比較分子または粒子20は、ナノ流体チャネルのアレイ12からサンプル出口チャンバー14内に沈殿させられる。

40

【0068】

図2は、本明細書中のいくつかの実施形態に係る注目するサンプル分子または粒子を検出するための配置を示す概略図である。いくつかの実施形態では、該配置は、第1のサンプル入口または出口11、第2のサンプル入口または出口11、ならびに、それらの間に配置され、第1および第2の入口または出口11のそれぞれと流体連絡している少なくと

50

も 1 つの流体チャネル 13、を含む。ここで、サンプルが第 1 の入口または出口 11 内に装填されると、第 1 の入口または出口 11 が入口として機能し、第 2 の入口または出口 11 が出口として機能できることが想定されている。ここで、サンプルが第 2 の入口または出口 11 内に装填されると、第 2 の入口または出口 11 は入口として機能し、第 1 の入口または出口 11 は出口として機能できることが想定されている。いくつかの実施形態では、前記サンプルは、注目する分子または粒子 18、注目するコントロールまたは比較粒子 20、またはそれら 2 つの組み合わせ、を含む。いくつかの実施形態では、注目する分子または粒子 18、注目するコントロールまたは比較粒子 20 は、流体チャネル 13 を通って移動する。いくつかの実施形態では、流体チャネル 13 は、ナノチャネルを含む。いくつかの実施形態では、流体チャネル 13 は、マイクロチャネルを含む。いくつかの実施形態では、流体チャネル 13 は、検出領域 22 を含む。いくつかの実施形態では、前記システムは、検出領域 24 の上方に配置されたカバー 24 を含む。いくつかの実施形態では、カバー 24 は、透明キャップを含む。いくつかの実施形態では、検出器 26 が、検出領域 22 および（存在する場合は）カバー 24 の上方に配置される。いくつかの実施形態では、例えは、光学的検出が使用される場合、検出器 26 は光子検出 / 撮像装置を含む。いくつかの実施形態では、レンズ 28 が、検出領域 22 および検出器 26 と光学的に連絡して配置される。いくつかの実施形態では、レンズ 28 は、検出領域 22 と検出器 26 との間に配置される。いくつかの実施形態では、ダイクロイックミラー 30 が、（存在する場合は）蛍光標識を励起できるように、および（存在する場合は）蛍光標識からの蛍光を検出できるように、検出領域 22、レンズ 28、検出器 26 および励起光源 32 と光学的に連絡して配置される。10

【0069】

いくつかの実施形態では、サンプルと参照サンプルとの比較は、ヒストグラムの形態で提供される。いくつかの実施形態では、参照または de novo での in silico o ゲノムアセンブリにマッチする特定標識化パターンを備える分子の物理的計数を、ヒストグラム分布に表示し、カバー倍数（coverage depth）を反映する。特定領域または染色体全体の平均カバー倍数（coverage depth）よりカバー倍数が高いまたは低いことは、正常倍数性からの逸脱、例えは遺伝的障害における異数性の症例などにおける正常倍数性からの逸脱、または癌における構造上の変動（structural variations）を反映する。30

【0070】

さらなる代替的実施形態

本明細書に記載したいくつかの実施形態は、以下を含むことができる：

サンプル分子の 1 つの領域を少なくとも 2 つの標識で標識すること、

前記標識サンプル分子を流体チャネルを通して移動させることであって、ここで前記流体チャネルは前記サンプル分子の少なくとも一部分を伸張させるように構成されており、前記流体チャネルは 10 nm 以上の長さおよび 5,000 nm の断面直径を有する、前記移動させること、

前記流体チャネル内で前記標識サンプルから発生するシグナルを検出すること、

前記標識サンプルから発生するシグナルを参照分子の対応する領域から発生するシグナルと相關させること、40

を含む、サンプルを特性解析する方法。

前記方法はさらに、

前記サンプル分子の前記領域に対応する前記参照分子の領域を標識すること、

前記標識参照サンプル分子を流体チャネルを通して移動させることであって、前記流体チャネルは前記サンプル分子の少なくとも一部分を伸張させるように構成されており、前記流体チャネルは 10 nm 以上の長さおよび 5,000 nm の断面直径を有する、前記移動させること、

前記流体チャネル内で前記標識参照サンプルから発生するシグナルを検出することであって、参照分子の既知の対応する領域から発生するシグナルは、前記標識参照サンプルか50

ら発生する前記シグナルであること、
を含むことができる。

【0071】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析する方法が提供される。前記方法は、
サンプル核酸分子を標識すること；

標識サンプル核酸分子を流体ナノチャネルを通して移動させること、ここで、前記流体
ナノチャネルは、前記サンプル核酸分子の少なくとも一部分を伸張させるように構成され
ており、前記流体ナノチャネルは10nm以上の長さおよび1,000nm未満の断面直
径を有する；

前記流体チャネル内でサンプル核酸分子から発生するシグナルを検出すること； 10

前記サンプル核酸分子上の前記標識の位置を決定すること；および

前記サンプル核酸分子上の前記標識の位置を参照ゲノム内の標識の位置へアラインメン
トすること、

を含むことができる。

【0072】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析する方法が提供される。前記方法は、

二本鎖DNAサンプルを処理して、前記二本鎖DNAサンプルから解離した、前記二本
鎖DNAサンプルの第1の鎖のフラップを生じさせること（ここで、前記フラップは約1
～約1,000塩基の範囲内にある長さを有し、前記フラップは前記フラップに対応する
二本鎖DNAサンプルの第1の鎖内にギャップを生じさせる）； 20

1つまたは複数の塩基を前記二本鎖DNA内に組み込んで、前記ギャップの少なくとも
一部分を消すこと；

前記処理された二本鎖DNAの少なくとも一部分を1つまたは複数のタグで標識するこ
と；

前記二本鎖DNA上の前記標識から発生するシグナルを定量すること；

前記二本鎖DNAから発生する前記シグナルの量を参考DNAから発生するシグナルの
量と比較すること；および

前記二本鎖DNAから発生する前記シグナルの量が前記参考DNAから発生する前記シ
グナルの量と異なる場合に、二本鎖DNA内に遺伝的異常が存在すると決定すること、
を含むことができる。 30

【0073】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析する方法が提供される。前記方法は、
サンプルDNA上の複数の配列特異的位置を標識すること；

前記サンプルDNAの少なくとも一部分を線状化すること；

前記サンプルDNA上の前記標識から発生するシグナルを定量すること；

前記サンプルDNAから発生する前記シグナルの量を参考DNAから発生するシグナル
の量と比較すること；および

前記サンプルDNAから発生する前記シグナルの量が前記参考DNAから発生する前記
シグナルの量とは異なる場合に、前記サンプルDNA内に遺伝的異常が存在すると決定す
ること、

を含むことができる。 40

【0074】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。該シ
ステムは、

サンプル分子を少なくとも2つの標識で標識するための1つまたは複数の領域；

前記標識サンプル分子を移動させるための流体チャネル（ここで、前記流体チャネルは
前記サンプル分子の少なくとも一部分を伸張させるように構成されており、10nm以上
の長さおよび5,000nm未満の断面直径を有する）；および

前記流体チャネル内で前記標識サンプルから発生するシグナルを検出するための装置、

を含むことができる。

【0075】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。該システムは、

サンプル核酸分子を標識するための1つまたは複数の領域；

前記標識サンプル核酸分子を移動させるための流体ナノチャネル（ここで、前記流体ナノチャネルは、前記サンプル核酸分子の少なくとも一部分を伸張させるように構成されており、10nm以上の長さおよび1,000nm未満の断面直径を有する）；および

前記流体チャネル内で前記サンプル核酸分子から発生するシグナルを検出するための装置、

10

を含むことができる。

【0076】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。該システムは、

二本鎖DNAサンプルから解離した、前記二本鎖DNAサンプルの第1の鎖のフラップを発生するように、前記二本鎖DNAサンプルを処理するための1つまたは複数の領域（ここで、前記フラップは約1～約1,000塩基の範囲内の長さを有し、前記フラップはフラップに対応する前記二本鎖DNAサンプルの第1の鎖内にギャップを発生させる）；

前記ギャップの少なくとも一部分を消すように、前記二本鎖DNA内に1つまたは複数の塩基を組み込むための1つまたは複数の領域；

20

前記処理された二本鎖DNAの少なくとも一部分を1つまたは複数のタグで標識するための1つまたは複数の領域；および

前記二本鎖DNA上の前記標識から発生するシグナルを定量するための装置、

を含むことができる。

【0077】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。該システムは、

サンプルDNA上の複数の配列特異的位置を標識するための領域；

前記サンプルDNAの少なくとも一部分を線状化するための領域；および

前記サンプルDNA上の前記標識から発生するシグナルを定量するための装置、

30

を含むことができる。

【0078】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。該システムは、

サンプル分子を少なくとも2つの標識で標識する手段；

前記標識サンプル分子を線状化する手段；および

流体チャネル内で前記標識サンプルから発生するシグナルを検出する手段、

を含むことができる。

【0079】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。該システムは、

40

サンプル核酸分子を標識する手段；

前記標識サンプル核酸分子を線状化する手段；および

流体チャネル内で前記サンプル核酸分子から発生するシグナルを検出する手段、

を含むことができる。

【0080】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。該システムは、

二本鎖DNAサンプルを処理して、前記二本鎖DNAサンプルから解離した、前記二本鎖DNAサンプルの第1の鎖のフラップを発生させる手段（ここで、前記フラップは約1

50

～約1,000塩基の範囲内の長さを有し、前記フラップは、前記フラップに対応する前記二本鎖DNAサンプルの第1の鎖内にギャップを発生させる)；

前記ギャップの少なくとも一部分を消すように前記二本鎖DNA内に1つまたは複数の塩基を組み込む手段；

前記処理された二本鎖DNAの少なくとも一部分を1つまたは複数のタグで標識する手段；および

前記二本鎖DNA上の前記標識から発生するシグナルを定量する手段、
を含むことができる。

【0081】

いくつかの実施形態では、サンプルを特性解析するためのシステムが提供される。該システムは、サンプルを特性解析するためのシステムを含むことができ、ここで該システムは、

サンプルDNA上の複数の配列特異的位置を標識する手段；

前記サンプルDNAの少なくとも一部分を線状化する手段；および

前記サンプルDNA上の前記標識から発生するシグナルを定量する手段、
を含む。

【0082】

いくつかの実施形態では、前記サンプルが、細菌、ビリオン、DNA分子、RNA分子、核酸ポリマー、タンパク質、ペプチドおよび多糖からなる群から選択される、本明細書に記載した方法またはシステムが提供される。

【0083】

いくつかの実施形態によると、前記サンプルが母体血液を出所とし、前記参照分子が血液以外の母体サンプルを出所とする、本明細書に記載した方法またはシステムが提供される。

【0084】

いくつかの実施形態によると、前記サンプルがヌクレオチドを含み、前記少なくとも2つの標識がヌクレオチド内の注目するゾーンのそれぞれの末端に配置される、本明細書に記載した方法またはシステムが提供される。

【0085】

いくつかの実施形態によると、前記標識が蛍光標識、放射性標識、磁気標識またはそれらの組み合わせからなる群から選択される、本明細書に記載した方法またはシステムが提供される。

【0086】

いくつかの実施形態によると、前記光学検査が、前記標識の物理的計数、強度、波長またはサイズを決定することを含む、本明細書に記載した方法またはシステムが提供される。

【0087】

いくつかの実施形態によると、前記光学検査がサンプル中の少なくとも1つの標識領域の長さを決定することを含む、本明細書に記載した方法またはシステムが提供される。

【0088】

いくつかの実施形態によると、シグナルを相関させることが、サンプルのプールまたはサンプルの部分のプールから発生するシグナルを決定することを含む、本明細書に記載した方法またはシステムが提供される。

【0089】

いくつかの実施形態によると、前記シグナルを相関させることが、複数のサンプルまたはサンプル部分から発生するシグナル(S1、S2...Sn)と参照から発生するシグナル(C)：との間の比(K)(K1=S1/C、K2=S2/C...Kn=Sn/C)を使用することを含む、本明細書に記載した方法またはシステムが提供される。いくつかの実施形態では、K1とKnとの差が、胎児サンプルの存在を同定するために使用される。いくつかの実施形態では、K1とKnとの差が、腫瘍その他の癌を出所とするDNA

10

20

30

40

50

の存在を同定するために使用される。いくつかの実施形態では、K₁とK_nとの差が、前記サンプル中の遺伝的異常の存在を決定するために使用される。いくつかの実施形態では、前記遺伝的異常は異数性である。いくつかの実施形態では、前記遺伝的異常は、転座、付加、増幅、トランスバージョンまたは逆位である。いくつかの実施形態では、前記参照は、既知の二倍性の染色体または一倍性の染色体を出所とする。いくつかの実施形態では、前記サンプルからのシグナルを、メタゲノムまたはマイクロバイオーム研究で得た集団分布と相關させる。

【0090】

いくつかの実施形態によると、前記流体チャネルがナノチャネルである、本明細書に記載した方法またはシステムが提供される。いくつかの実施形態では、前記流体チャネルは基板の表面に平行に配置される。いくつかの実施形態では、

10

【0091】

いくつかの実施形態によると、前記サンプルについてのカバー倍数(coverage depth)を反映するためにヒストグラム分布を生成することをさらに含む、本明細書に記載の方法またはシステムが提供される。

【0092】

いくつかの実施形態によると、前記サンプルが、循環胎児細胞、循環腫瘍細胞または体液もしくは組織を含む、本明細書に記載した方法またはシステムが提供される。

【0093】

いくつかの実施形態では、移動させることは、前記標識サンプルに流体の流れ、放射線場、電気浸透力、電気泳動力、動電力、温度勾配、表面特性勾配、毛細管流動、圧力勾配、磁場、電場、後退メニスカス(receding meniscus)、表面張力、熱勾配、引張力、押力およびそれらの組み合わせからなる群から選択される原動力をかけることを含む、本明細書に記載した方法またはシステムが提供される。

20

【0094】

いくつかの実施形態によると、本明細書に記載した方法を実施するためのキットが提供される。

【0095】

いくつかの実施形態によると、先行請求項のいずれか一項に記載のシステムを使用するためのキットが提供される。

30

【0096】

本明細書に与えられた説明においては、添付の図面が参照されるが、これも説明の一部を形成する。詳細な説明、図面および特許請求の範囲に記載した例示的実施形態は、限定的であることを意図したものではない。本明細書に提示した主題の精神または範囲から逸脱することなく、他の実施形態を利用してもよいし、他の変更を加えててもよい。本明細書に概括的に記載され、図面に例示された本開示の態様は、極めて様々な異なる構成にアレンジ、置換、結合および設計できることは容易に理解されるところであり、それらの全てが明示的に想定され、本開示の一部をなすものである。

【0097】

他に定義されない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者が一般に理解している意味と同じ意味を有する。

40

【0098】

本明細書で使用する用語「チャネル」は、境界により規定された領域を意味する。そのような境界は、物理的、電気的、化学的、磁気的なものなどであってもよい。用語「ナノチャネル」は、特定のチャネルが特定の寸法においてナノスケールであると考えられることを明確にするために使用される。

【0099】

本明細書で使用する用語「DNA」は、任意の長さ(例えば、0.1 K b ~ 1 メガベース)のDNAを意味する。DNAは、高純度調製物、未精製物または半精製物であってよい。DNAは、任意の生物学的出所からのものであってもよく、または合成のものであつ

50

てもよい。

【0100】

本明細書で使用する用語「ヌクレオチド」は、デオキシリボ核酸（例えば、D N A、m t D N A、g D N Aまたはc D N A）、リボ核酸（例えば、R N Aまたはm R N A）または当分野で知られた他の核酸種のうちの任意のもの、を含有する分子を意味する。用語「標識ヌクレオチド」は、検出可能な何らかの修飾を含むヌクレオチドを意味する。これには、塩基に付着したレポーター基を備えるヌクレオチドが含まれるがそれらに限定されない。レポーター基には、蛍光染料、ハプテン、ビオチン分子または金ナノ粒子が含まれるがそれらに限定されない。用語「天然ヌクレオチド」は、修飾されていない、またはD N A内への組み込みを妨害しないわずかな修飾を有する、ヌクレオチドを意味する。用語「t」、「c」、「a」、「g」および「u」は、D N A内のヌクレオチドを意味する。
10

【0101】

用語「ニック」は、1本のD N A鎖上または他方のD N A鎖上で発生するホスホジエステル結合の切断部を意味し、3'ヒドロキシル末端を有する。

【0102】

本明細書で使用する用語「ニッキングエンドヌクレアーゼ」は、単一D N A鎖上のホスホジエステル結合を切断して既定の配列に3' - ヒドロキシルを残すことのできる、天然型または組み換え型の任意の酵素を意味する。ニッキングエンドヌクレアーゼは、天然のものであってもよく、1本のD N A鎖切断活性を排除するように制限酵素を改変したものでもよく、またはニッキングサブユニットをD N A結合ドメイン、例えばジンクフィンガーおよび転写アクチベーター様エフェクターD N A認識ドメイン、に融合させることにより得られたものでもよい。
20

【0103】

本明細書で使用する用語「標識部位」は、ポリメラーゼが鋳型依存的にヌクレオチドを付加できる露出3'ヒドロキシル基を有する任意のD N A部位を意味する。標識部位は、ニッキングエンドヌクレアーゼ、ハイブリダイズしたプローブ、または任意の一D N A鎖上のホスホジエステル結合を切断できる任意の化学的または物理的手段によって生成することができる。ホスホジエステル結合を切断する手段は、その生物学的出所の外にあるD N A、またはD N A抽出の前のD N Aに対し、例えば生物学的サンプルが化学薬品に曝されることにより、および放射線などの外力に曝されることにより、生じさせることができる。3'末端が伸張可能でなければ、例えば、New England BiolabsのP re C Rキットを使用して、修復を実施することにより、ヒドロキシル基を復元することができる。
30

【0104】

本明細書で使用する用語「サンプル」は、例えば、血液、血清、血漿、血痰、洗浄液、脳脊髄液、尿、精液、汗、涙液、唾液などを含むことができる。本明細書で使用する用語「血液」、「血漿」および「血清」は、画分またはそれらの処理された部分を明示的に含む。同様に、サンプルが生検、スワブ、スマアなどから取り出された場合は、「サンプル」は、生検、スワブ、スマアなどに由来する処理された画分または部分を明示的に含む。
40

【0105】

本明細書で使用する用語「染色体」は、クロマチンに由来し、D N Aおよびタンパク質成分（特にヒストン）を含む、生細胞の遺伝担持遺伝子キャリアを意味する。

【0106】

当業者が認識するように、「移動させること」は、ナノチャネルにD N A分子を通す文脈において使用される場合は、線状化すること、と互換的に使用できる。

【0107】

本明細書に記載した方法、装置、システムおよびキットは、下記の参考文献のいずれかに記載された方法、装置、システムおよびキットを取り込むことができる：米国特許出願公開第2009/0305273号；国際公開第2008/079169号；米国特許出願公開第2008/0242556号；国際公開第2008/121828号；米国特許
50

出願公開第 2011 / 0171634 号；国際公開第 2010 / 002883 号；米国特許出願公開第 2011 / 0296903 号；国際公開第 2009 / 149362 号；米国特許出願公開第 2011 / 0306504 号；国際公開第 2010 / 059731 号；米国特許出願公開第 2012 / 0097835 号；国際公開第 2010 / 135323 号；国際出願 PCT / US11 / 57115 号；米国特許出願第 13 / 606819 号；国際出願 PCT / US2012 / 054299 号；米国特許出願公開第 2012 / 0244635 号；国際公開第 2011 / 038327 号；米国特許出願公開第 2012 / 0237936 号；米国出願第 13 / 503307 号；国際公開第 2011 / 050147 号；米国出願第 61 / 734327 号；同第 61 / 761189 号；および同第 61 / 713862 号。これらの文献は、それぞれ、参照によりその全体が本明細書に取り込まれる。

10

【実施例 1】

【0108】

ヒト男性サンプルを出所とするゲノム断片を PCR によって生成し、標識し、ナノチャネルに通してランさせた。次に検出した断片を各染色体についての単一遺伝子参照光学マップに対しアラインメントした。分子は、アラインメント開始部位に基づいて並び替えた。

【0109】

図 7A に示したように、二倍性の常染色体（1番染色体）について観察された平均カバー倍数（coverage depth）は 5X であり、染色体全体にわたり均一に分布していた。分子のサンプリングが均一であったならば、アラインメント開始部位は染色体全体にランダムに分布し、線形プロットを生じさせたであろう。

20

【0110】

図 7B に示したように、同じ男性サンプルを出所とする一倍性の性染色体（X 染色体）について観察された平均カバー倍数（coverage depth）は 2X ~ 2.5X（二倍性の染色体の倍数の約半分）であり、同様に染色体全体に均一に分布していた。この実施例は、本明細書に記載した方法およびプラットフォームを使用して達成できる定量的測定を実証している。

本開示に係る態様は以下のものも含む。

< 1 >

複数のサンプル分子を少なくとも第 1 の標識で標識することであって、前記サンプル分子は注目する 1 つまたは複数の第 1 のゲノム断片のポリヌクレオチド配列を含み、前記注目する 1 つまたは複数の第 1 のゲノム断片はサンプル中の異常の可能性があるゲノム領域に対応する、前記標識すること、

30

複数の標識参照分子を提供することであって、前記参照分子は 1 つまたは複数の参照ゲノム断片のポリヌクレオチド配列を含み、前記 1 つまたは複数の参照ゲノム断片は、前記異常の可能性があるゲノム領域には対応しないことが既知である、前記提供すること、

前記複数の標識サンプル分子および前記複数の標識参照分子を流体チャネルに通して移動させること、

前記標識サンプル分子および前記標識参照分子からのシグナルを検出して、少なくとも、前記注目する 1 つまたは複数の第 1 のゲノム断片に特徴的な 1 つまたは複数の第 1 のパターン、および前記 1 つまたは複数の参照ゲノム断片に特徴的な 1 つまたは複数の第 2 のパターンを確認すること、ならびに

40

前記 1 つまたは複数の第 1 のパターンを確認するシグナルを、前記 1 つまたは複数の第 2 のパターンを確認するシグナルに相關させること、

を含む、サンプルを特性解析する方法。

< 2 >

標識付とは、前記サンプル分子を第 1 の標識で標識することを含み、前記参照分子は第 2 の標識を含み、

前記第 1 の標識は、前記 1 つまたは複数の第 1 のパターンを生成するように構成されており、

50

前記第2の標識は、前記1つまたは複数の第2のパターンを生成するように構成されており、

前記第1の標識および前記第2の標識は互いに異種のものである、<1>に記載の方法

。

<3>

標識付与は、第1の標識で標識することを含み、

前記1つまたは複数の第1のパターンおよび前記1つまたは複数の第2のパターンは各々が前記第1の標識を含み、

前記1つまたは複数の第1のパターンおよび前記1つまたは複数の第2のパターンは互いに異なる、<1>に記載の方法。

10

<4>

前記標識参照分子を生成できるように参照分子を標識することをさらに含み、前記標識参照分子は前記1つまたは複数の第2のパターンを含む、<1>～<3>のいずれか1つに記載の方法。

<5>

前記標識参照分子および前記サンプル分子は、前記サンプルを出所とする、<1>～<4>のいずれか1つに記載の方法。

<6>

前記標識参照分子は前記サンプルと同じ生体中の異なる組織を出所とする、<1>～<5>のいずれか1つに記載の方法。

20

<7>

前記標識参照分子からのシグナルは、電気的または光学的に記憶された数値または数値群を含む、<1>～<6>のいずれか1つに記載の方法。

<8>

第2のサンプルを出所とする複数の第2のサンプル分子を少なくとも前記第1の標識で標識することであって、前記複数の第2のサンプル分子は前記注目する1つまたは複数の第1のゲノム断片のポリヌクレオチド配列を含み、前記複数の第2のサンプル分子は前記染色体異常に対応しないことが既知である、前記標識すること、および

前記複数の第2のサンプル分子を前記流体チャネルを通して移動させること、

をさらに含む、<1>～<7>のいずれか1つに記載の方法。

30

<9>

前記注目する1つまたは複数の第1のゲノム断片は性染色体またはその少なくとも1つの断片を含み、前記1つまたは複数の参照ゲノム断片は常染色体またはその少なくとも1つの断片を含む、<1>～<8>のいずれか1つに記載の方法。

<10>

前記注目する1つまたは複数の第1のゲノム断片は、ヒト21番染色体、ヒト13番染色体、ヒト14番染色体、ヒト15番染色体、ヒト16番染色体、ヒト18番染色体およびヒト22番染色体ならびにそれらの断片からなる群から選択される第1の常染色体またはその少なくとも1つの断片を含み、

前記1つまたは複数の参照ゲノム断片は第2の常染色体またはその少なくとも1つの断片を含み、前記第2の常染色体またはその断片は前記第1の常染色体またはその断片とは異なる、

40

<1>～<9>のいずれか1つに記載の方法。

<11>

前記サンプル分子は前記ゲノム異常の可能性を有するサンプルを出所とし、

前記1つまたは複数の参照ゲノム断片は前記第1の染色体またはその断片を含み、前記参照ゲノム断片は前記ゲノム異常を含まないことが既知の第2サンプルを出所とする、

<1>～<9>のいずれか1つに記載の方法。

<12>

シグナルを相關させることは、複数の標識サンプル分子またはそれらの部分から発生す

50

る前記シグナル(S₁、S₂ . . . S_n)と前記参照から発生する前記シグナル(C)との間の比(K)(K₁ = S₁ / C 、 K₂ = S₂ / C . . . K_n = S_n / C)を使用することを含む、 < 1 > ~ < 1 1 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 1 3 >

前記第 1 の標識は、蛍光標識、放射性標識、磁気標識または非光学的標識の内の少なくとも 1 つを含む、 < 1 > ~ < 1 2 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 1 4 >

前記第 2 の標識は、蛍光標識、放射性標識、磁気標識または非光学的標識の内の少なくとも 1 つを含む、 < 2 > または < 4 > ~ < 1 3 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 1 5 >

10

標識付与は、

第 1 の配列モチーフのところで、二本鎖 D N A の一本の鎖をニッキングエンドスクレアーゼでニッキングすること、および

前記 D N A を標識すること、

を含む、 < 1 > ~ < 1 4 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 1 6 >

前記 D N A 上のニックの少なくとも一部を修復することをさらに含む、 < 1 5 > に記載の方法。

< 1 7 >

20

ニックは修復されない、 < 1 5 > に記載の方法。

< 1 8 >

前記標識は転写ターミネーターを含む、 < 1 5 > ~ < 1 7 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 1 9 >

前記第 1 の標識による標識は、前記サンプル分子の少なくとも 1 つの配列モチーフに、非切断制限酵素、ジンクフィンガータンパク質、抗体、転写因子、転写活性化因子様ドメイン、D N A 結合タンパク質、ポリアミド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸およびメチルトランスフェラーゼからなる群から選択される D N A 結合物でタグ付けすることを含む、 < 1 > ~ < 1 4 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 2 0 >

30

前記第 1 の標識による標識付与は、前記サンプル分子の少なくとも 1 つの配列モチーフにメチルトランスフェラーゼでタグ付けすることを含む、 < 1 > ~ < 1 4 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 2 1 >

前記サンプル分子を非配列特異的標識で標識することをさらに含む、 < 1 > ~ < 2 0 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 2 2 >

サンプル分子のポリヌクレオチド配列上の複数の配列特異的な位置を標識すること、流体チャネル内で前記サンプル分子の少なくとも一部分を線状化すること、

前記サンプル分子上の前記標識からのシグナルを定量すること、

前記サンプル分子からのシグナルの量を参考分子からのシグナルの量と比較すること、および

40

前記サンプル分子からの前記シグナルの量が前記参考分子から発生する前記シグナルの量と異なる場合に、前記サンプル D N A 内の遺伝的異常の存在または非存在を決定することを含むサンプルを特性解析する方法。

< 2 3 >

前記サンプル分子および前記参考分子は同じ生体を出所とする、 < 2 2 記載の方法。

< 2 4 >

前記サンプル分子および前記参考分子は同じ生体の異なる組織を出所とする、 < 2 2 記載の方法。

50

< 2 5 >

前記サンプル分子および前記参照分子は異なる生体を出所とする、< 2 2 >記載の方法。

< 2 6 >

前記参照分子からの前記シグナルの量は、電気的または光学的に記憶された数値または数値群を含む、< 2 2 >に記載の方法。

< 2 7 >

前記サンプル分子はD N Aを含む、< 2 2 >～< 2 6 >のいずれか1つに記載の方法。

< 2 8 >

前記遺伝的異常は、転座、付加、増幅、トランスバージョン、逆位、異数性、倍数性、モノソミー、トリソミー、トリソミー21、トリソミー13、トリソミー14、トリソミー15、トリソミー16、トリソミー18、トリソミー22、三倍性、四倍性または性染色体異数性の内の少なくとも1つを含む、< 2 2 >～< 2 7 >のいずれか1つに記載の方法。

10

< 2 9 >

前記遺伝的異常はトリソミーまたはモノソミーの内の少なくとも1つを含む、< 2 2 >～< 2 7 >のいずれか1つに記載の方法。

< 3 0 >

標識付与は、前記ポリヌクレオチドを蛍光標識、放射性標識、磁気標識または非光学的標識の内の少なくとも1つで標識することを含む、< 2 2 >～< 2 9 >のいずれか1つに記載の方法。

20

< 3 1 >

標識付与は、

第1の配列モチーフのところで二本鎖D N Aの一本の鎖をニッキングエンドヌクレアーゼでニッキングすること、および

前記D N Aを標識すること、

を含む、< 2 2 >～< 3 0 >のいずれか1つに記載の方法。

< 3 2 >

前記第1のD N A上のニックの少なくとも一部を修復することをさらに含む、< 2 2 >～< 2 9 >のいずれか1つに記載の方法。

< 3 3 >

30

ニックは修復されない、< 3 2 >に記載の方法。

< 3 4 >

前記標識は転写ターミネーターを含む、< 2 2 >～< 3 3 >のいずれか1つに記載の方法。

< 3 5 >

前記標識付与は、前記サンプル分子の少なくとも1つの配列モチーフに、非切断制限酵素、ジンクフィンガータンパク質、抗体、転写因子、転写活性化因子様ドメイン、D N A結合タンパク質、ポリアミド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸およびメチルトランスフェラーゼからなる群から選択されるD N A結合物でタグ付けすることを含む、< 2 2 >～< 3 0 >のいずれか1つに記載の方法。

40

< 3 6 >

前記第1の標識による標識付与は、前記サンプル分子の少なくとも1つの配列モチーフにメチルトランスフェラーゼでタグ付けすることを含む、< 2 2 >～< 3 0 >のいずれか1つに記載の方法。

< 3 7 >

サンプル核酸分子を標識すること、

前記標識サンプル核酸分子を流体ナノチャネルに通して移動させることであって、前記流体ナノチャネルは、前記サンプル核酸分子の少なくとも一部分を伸張させるように構成されており、前記流体ナノチャネルは10nm以上の長さおよび1,000nm未満の断面直径を有する、前記移動させること、

50

前記流体チャネル内で前記サンプル核酸分子から発生するシグナルを検出すること、
前記サンプル核酸分子上の前記標識の位置を決定すること、
前記サンプル核酸分子上の前記標識の位置を参照ゲノム内の標識の位置へアラインメントすることであって、前記参照ゲノムは前記サンプル分子と同じ生体を出所とする第2のサンプルから得られる、前記アラインメントすること、
を含むサンプルを特性解析する方法。

< 3 8 >

前記流体ナノチャネルは、10nm以上の中さおよび5,000nm未満の断面直径を有するチャネルを含む、<1>～<37>のいずれか1つに記載の方法。

< 3 9 >

10

前記サンプルは、細菌、ビリオン、DNA分子、RNA分子、核酸ポリマー、タンパク質、ペプチドおよび多糖からなる群から選択される、<1>～<38>のいずれか1つに記載の方法。

< 4 0 >

前記サンプルは母体血液を出所とし、前記参照分子は血液以外の母体サンプルを出所とする、<1>～<39>のいずれか1つに記載の方法。

< 4 1 >

前記サンプルはヌクレオチドを含み、前記少なくとも2つの標識は前記ヌクレオチド内の注目するゾーンのそれぞれの末端に配置される、<1>～<40>のいずれか1つに記載の方法。

20

< 4 2 >

前記光学検査は、前記標識の物理的計数、強度、波長またはサイズを決定することを含む、<1>～<41>のいずれか1つに記載の方法。

< 4 3 >

前記光学検査は、前記サンプル中の少なくとも1つの標識領域の長さを決定することを含む、<1>～<42>のいずれか1つに記載の方法。

< 4 4 >

前記サンプルまたは前記サンプルの部分を含むプールから発生するシグナルを決定することを含む、<1>～<43>のいずれか1つに記載の方法。

< 4 5 >

30

比較することは、複数のサンプルまたはそれらの部分から発生する前記シグナル(S1、S2...Sn)と前記参照から発生する前記シグナル(C)との間の比(K)(K1=S1/C、K2=S2/C...Kn=Sn/C)を使用することを含む、<22>～<36>のいずれか1つに記載の方法。

< 4 6 >

K1とKnとの差が胎児サンプルの存在を同定するために使用される、<45>に記載の方法。

< 4 7 >

K1とKnとの差が腫瘍その他の癌を出所とするDNAの存在を同定するために使用される、<45>に記載の方法。

40

< 4 8 >

K1とKnとの差が前記サンプル中の遺伝的異常の存在を決定するために使用される、<45>に記載の方法。

< 4 9 >

前記遺伝的異常は異数性である、<45>に記載の方法。

< 5 0 >

前記遺伝的異常は転座、付加、増幅、トランスバージョンまたは逆位である、<36>に記載の方法。

< 5 1 >

前記参照は、既知の二倍性のまたは一倍性の染色体を出所とする、<1>～<50>の

50

いずれか 1 つに記載の方法。

< 5 2 >

前記サンプルからのシグナルをメタゲノムまたはマイクロバイオーム研究で得た集団分布と相関させる、< 1 > ~ < 5 1 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 5 3 >

前記流体チャネルはナノチャネルである、< 1 > ~ < 5 2 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 5 4 >

前記流体チャネルは基板の表面に平行に配置される、< 1 > ~ < 5 3 > のいずれか 1 つに記載の方法。

10

< 5 5 >

前記サンプルについてのカバー倍数 (c o v e r a g e d e p t h) を反映するためにはヒストグラム分布を生成することをさらに含む、< 1 > ~ < 5 4 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 5 6 >

前記サンプルは循環胎児細胞、循環腫瘍細胞または体液もしくは組織を含む、< 1 > ~ < 5 5 > のいずれか 1 つに記載の方法。

< 5 7 >

前記移動させることは、前記標識サンプルに流体の流れ、放射線場、電気浸透力、電気泳動力、動電力、温度勾配、表面特性勾配、毛細管流動、圧力勾配、磁場、電場、後退メニスカス (r e c e d i n g m e n i s c u s) 、表面張力、熱勾配、引張力、押力およびそれらの組み合わせからなる群から選択される原動力をかけることを含む、< 1 > ~ < 5 6 > のいずれか 1 つに記載の方法。

20

< 5 8 >

サンプル分子を少なくとも 2 つの標識で標識するための 1 つまたは複数の領域、前記標識サンプル分子を移動させるための流体チャネルであって、前記サンプル分子の少なくとも一部分を伸張せしめるように構成されており、1 0 n m 以上の長さおよび 5 , 0 0 0 n m 未満の断面直径を有する、前記流体チャネル、および

前記流体チャネル内で前記標識サンプルから発生するシグナルを検出するための装置、を含む、サンプルを特性解析するためのシステム。

30

< 5 9 >

サンプル核酸分子を標識するための 1 つまたは複数の領域、前記標識サンプル核酸分子を移動させるための流体ナノチャネルであって、前記サンプル核酸分子の少なくとも一部分を伸張せしめるように構成されており、1 0 n m 以上の長さおよび 1 , 0 0 0 n m 未満の断面直径を有する、前記流体ナノチャネル、および

前記流体チャネル内で前記サンプル核酸分子から発生するシグナルを検出するための装置、を含む、サンプルを特性解析するためのシステム。

< 6 0 >

サンプル D N A 上の複数の配列特異的位置を標識するための領域、前記サンプル D N A の少なくとも一部分を線状化するための領域、および前記サンプル D N A 上の前記標識から発生するシグナルを定量するための装置、を含む、サンプルを特性解析するためのシステム。

40

サンプル分子を少なくとも 2 つの標識で標識する手段、前記標識サンプル分子を線状化する手段、および流体チャネル内で前記標識サンプルから発生するシグナルを検出するための手段、を含む、サンプルを特性解析するためのシステム。

< 6 1 >

サンプル核酸分子を標識する手段、前記標識サンプル核酸分子を線状化する手段、および

50

流体チャネル内で前記サンプル核酸分子から発生するシグナルを検出する手段、
を含む、サンプルを特性解析するためのシステム。

< 6 2 >

サンプルDNA上の複数の配列特異的位置を標識する手段、
前記サンプルDNAの少なくとも一部分を線状化する手段、および
前記サンプルDNA上の前記標識から発生するシグナルを定量する手段、
を含む、サンプルを特性解析するためのシステム。

< 6 3 >

前記サンプルは、細菌、ビリオン、DNA分子、RNA分子、核酸ポリマー、タンパク質、ペプチドおよび多糖からなる群から選択される、< 5 8 > ~ < 6 2 > のいずれか1つに記載のシステム。

10

< 6 4 >

前記サンプルは母体血液を出所とし、前記参照分子は、血液以外の母体サンプルを出所とする、< 5 8 > ~ < 6 3 > のいずれか1つに記載のシステム。

< 6 5 >

前記サンプルはヌクレオチドを含み、前記少なくとも2つの標識は前記ヌクレオチド内の注目するゾーンのそれぞれの末端に配置される、< 5 8 > ~ < 6 4 > のいずれか1つに記載のシステム。

< 6 6 >

前記標識は、蛍光標識、放射性標識、磁気標識またはそれらの組み合わせからなる群から選択される、< 5 8 > ~ < 6 5 > のいずれか1つに記載のシステム。

20

< 6 7 >

前記光学検査は、前記標識の物理的計数、強度、波長またはサイズを決定することを含む、< 5 8 > ~ < 6 6 > のいずれか1つに記載のシステム。

< 6 8 >

前記光学検査は、前記サンプル中の少なくとも1つの標識領域の長さを決定することを含む、< 5 8 > ~ < 6 7 > のいずれか1つに記載のシステム。

30

< 6 9 >

シグナルを相關させることは、サンプルのプールまたはサンプルの部分のプールから発生するシグナルを決定することを含む、< 5 8 > ~ < 6 8 > のいずれか1つに記載のシステム。

< 7 0 >

前記システムは、複数のサンプルまたはサンプル部分から発生する前記シグナル(S1、S2...Sn)と前記参照から発生する前記シグナル(C)との間の比(K)(K1=S1/C、K2=S2/C...Kn=Sn/C)を用いて、前記シグナルを相關させるように構成されている、< 5 8 > ~ < 6 9 > のいずれか1つに記載のシステム。

< 7 1 >

K1とKnとの差が胎児サンプルの存在を同定するために使用される、< 7 0 >に記載のシステム。

40

< 7 2 >

K1とKnとの差が、腫瘍その他の癌を出所とするDNAの存在を同定するために使用される、< 7 0 >に記載のシステム。

< 7 3 >

K1とKnとの差が、前記サンプル中の遺伝的異常の存在を決定するために使用される、< 7 0 >に記載のシステム。

< 7 4 >

前記遺伝的異常は異数性である、< 7 3 >に記載のシステム。

< 7 5 >

前記遺伝的異常は、転座、付加、増幅、トランスバージョンまたは逆位である、< 7 3 >に記載のシステム。

50

< 7 6 >

前記参照は既知の二倍性の染色体または一倍性の染色体を出所とする、< 5 8 > ~ < 7 5 > のいずれか 1 つに記載のシステム。

< 7 7 >

前記サンプルからのシグナルをメタゲノムまたはマイクロバイオーム研究で得た集団分布と相關させる、< 5 8 > ~ < 7 6 > のいずれか 1 つに記載のシステム。

< 7 8 >

前記流体チャネルはナノチャネルである、< 5 8 > ~ < 7 7 > のいずれか 1 つに記載のシステム。

< 7 9 >

10

前記流体チャネルは基板の表面に平行に配置される、< 5 8 > ~ < 7 8 > のいずれか 1 つに記載のシステム。

< 8 0 >

前記サンプルについてのカバー倍数 (c o v e r a g e d e p t h) を反映するため
にヒストグラム分布を生成することをさらに含む、< 5 8 > ~ < 7 9 > のいずれか 1 つに
記載のシステム。

< 8 1 >

前記サンプルは、循環胎児細胞、循環腫瘍細胞または体液もしくは組織を含む、< 5 8 > ~ < 8 0 > のいずれか 1 つに記載のシステム。

< 8 2 >

20

前記移動させることは、前記標識サンプルに、流体の流れ、放射線場、電気浸透力、電
気泳動力、動電力、温度勾配、表面特性勾配、毛細管流動、圧力勾配、磁場、電場、後退
メニスカス (r e c e d i n g m e n i s c u s) 、表面張力、熱勾配、引張力、押す
力およびそれらの組み合わせからなる群から選択される原動力をかけることを含む、< 5
8 > ~ < 8 1 > のいずれか 1 つに記載のシステム。

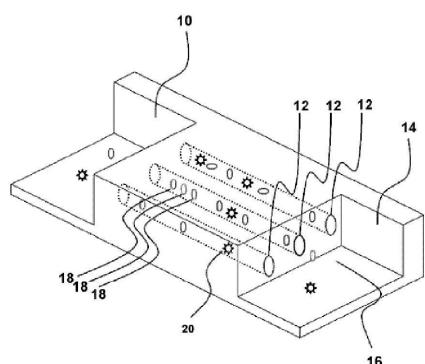
< 8 3 >

< 1 > ~ < 5 7 > のいずれか 1 つに記載の方法を実施するためのキット。

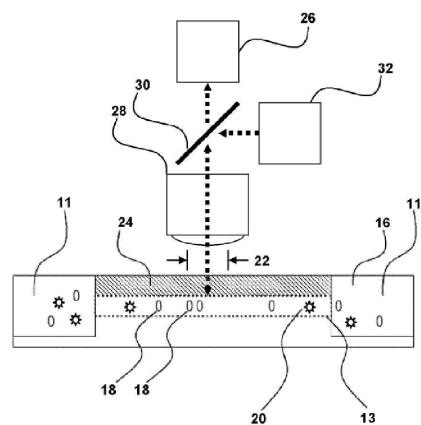
< 8 4 >

< 5 8 > ~ < 8 2 > のいずれか 1 つに記載のシステムを使用するためのキット。

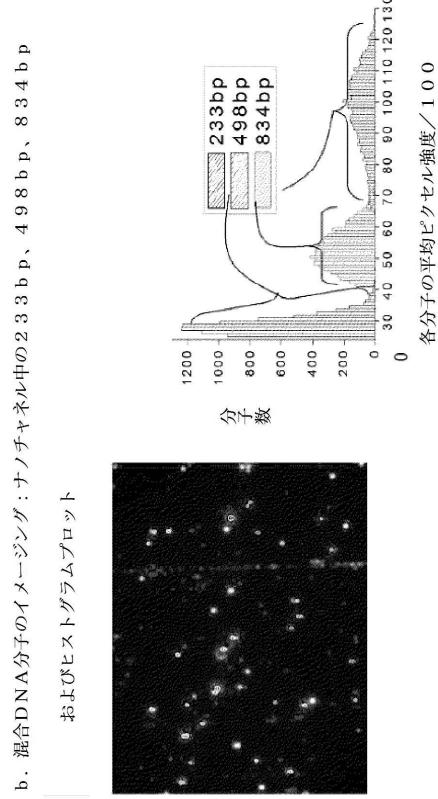
【図1】



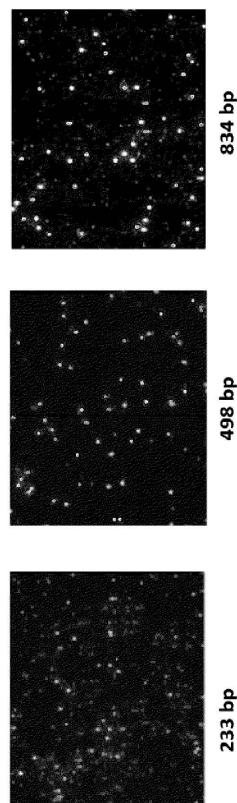
【図2】



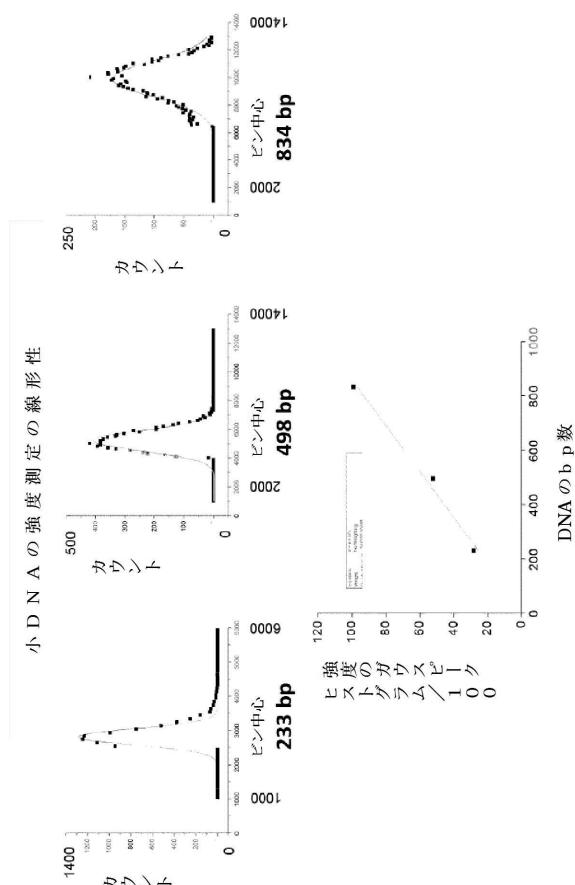
【図3 b】



【図3 a】

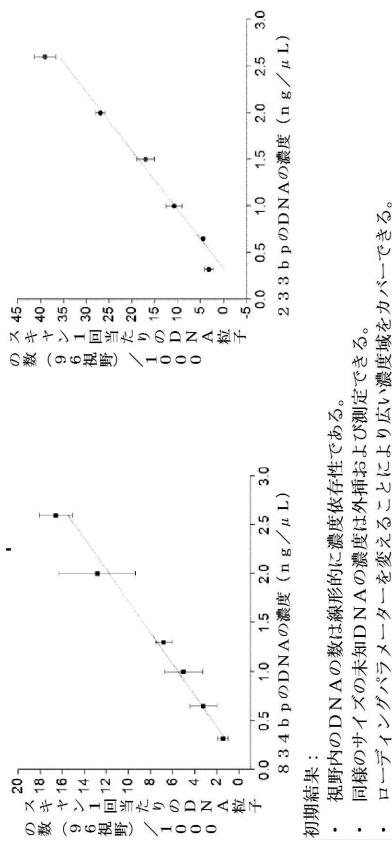


【図4】



【図5】

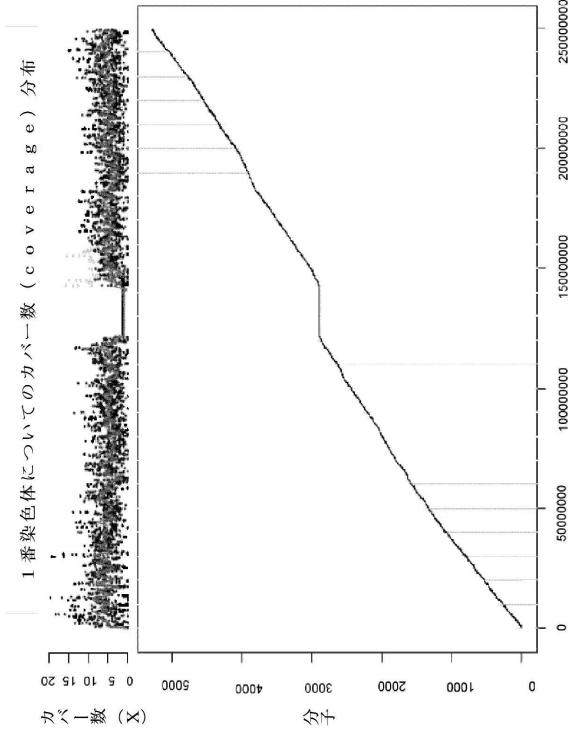
- 小断片分子または粒子の定量的測定
- ・ 各DNAについて6つの異なる既知濃度のサンプルを調製した。
 - ・ 各DNAの全サンプルについて同じローディングペラメーターを使用した。
 - ・ 各サンプルについて3回のスキャンを実施した。
 - ・ 各スキャンにおいて粒子数を計数した。



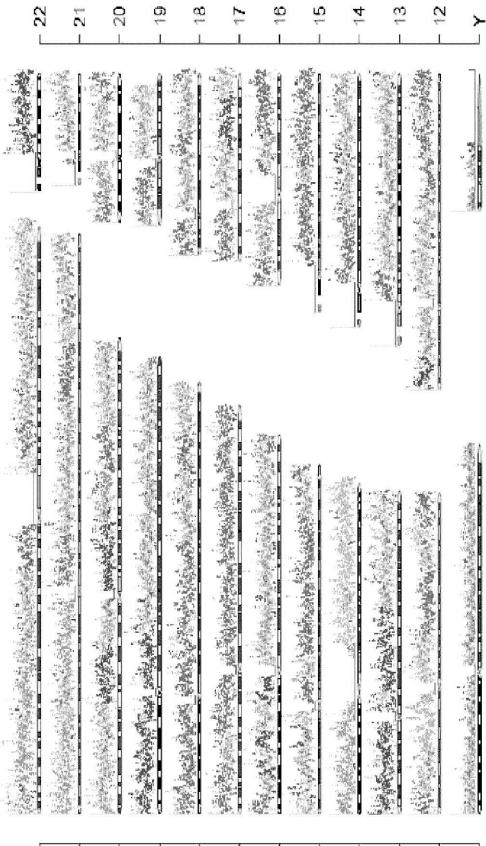
初期結果：

- ・ 視野内のDNAの数は線形的に濃度依存性である。
- ・ 同様のサイズの未知DNAの濃度は外挿および測定できる。
- ・ ローディングペラメーターを変えることにより広い濃度域をカバーできる。

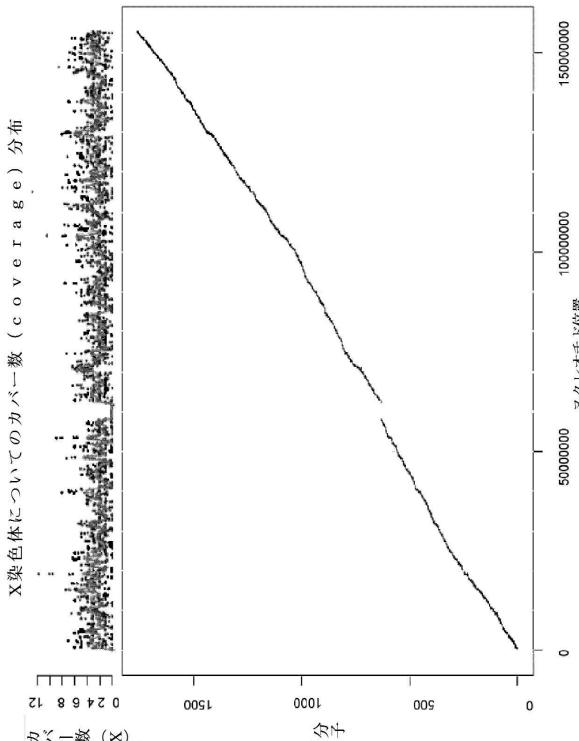
【図7 a】



【図6】



【図7 b】



フロントページの続き

(72)発明者 ハスティー、アレックス、アール.
アメリカ合衆国 92126 カリフォルニア州 サンディエゴ クレーター ドライブ 11
125

(72)発明者 ラム、アーネスト、チツン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サンディエゴ ナンバージェイ32 マハリ
ア アベニュー 3950

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 特表2011-526787(JP,A)
国際公開第2013/000100(WO,A1)
特表2010-522569(JP,A)
米国特許出願公開第2010/0216153(US,A1)
特表2010-534069(JP,A)
特表2010-510476(JP,A)
特表2009-529887(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)