

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3935509号
(P3935509)

(45) 発行日 平成19年6月27日(2007.6.27)

(24) 登録日 平成19年3月30日(2007.3.30)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53

M

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68

A

請求項の数 70 (全 102 頁)

(21) 出願番号 特願平10-535104
 (86) (22) 出願日 平成10年2月11日(1998.2.11)
 (65) 公表番号 特表2001-514739(P2001-514739A)
 (43) 公表日 平成13年9月11日(2001.9.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/003024
 (87) 国際公開番号 W01998/035012
 (87) 国際公開日 平成10年8月13日(1998.8.13)
 審査請求日 平成17年2月10日(2005.2.10)
 (31) 優先権主張番号 60/037,921
 (32) 優先日 平成9年2月12日(1997.2.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/064,687
 (32) 優先日 平成9年11月5日(1997.11.5)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

チャン, ユージーン ワイ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 4 6, ブルックリン, ブルック ストリ
 ート 6 5

(74) 代理人

弁理士 山本 秀策

(72) 発明者

チャン, ユージーン ワイ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 4 6, ブルックリン, ブルック ストリ
 ート 6 5

審査官 山村 祥子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリマー分析のための方法および製品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

連結したユニットのポリマーを分析するための方法であって、

(1) ユニット特異的マーカーで標識された連結したユニットのポリマーを提供する工程であって、該ユニット特異的マーカーがそれらのユニットを識別するためにポリマーの1つ以上のユニットと特異的に相互作用し、該ユニット特異的マーカーと該ポリマーとの間の相互作用が、該ポリマーの分析全体を通して維持される、工程；

(2) ユニット特異的マーカーが識別可能であるという、全てより少ない該連結されたユニットの信号を、ユニット特異的マーカーから検出する工程、および

(3) 検出された該信号のシグネチャーを保存し、該ポリマーを分析するために該信号を分析する工程、

を包含する、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、複数の前記ユニット特異的マーカーをステーションに曝露して、該ユニット特異的マーカーのユニットの該ステーションへの該曝露から生じる、非イオン伝導性信号を生じ、そして、該ステーションはチャネルを規定する表面を有する壁材料に付着される、方法。

【請求項 3】

請求項 1 の記載の方法であって、前記連結したユニットのポリマーの複数の個々のユニットをステーションに対して移動して、該個々のユニットが該ステーションを通過する際に

10

20

、該ポリマーまたはステーションにおける検出可能な物理的变化から生じる信号を生成して、該ポリマーを分析する、方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法であって、複数の前記ユニット特異的マーカーを、電磁放射線、クエンチング源、および蛍光励起源からなる群から選択される因子に曝露して検出可能な信号を生じる、方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ポリマーのユニットを識別するユニット特異的マーカーを、電磁放射線、クエンチング源および蛍光励起源からなる群より選択される因子に一過的に曝露して、同一性が未知である該個々のユニットに特徴的な検出可能な電磁放射線信号との相互作用を発生し、該信号を、該個々のユニットの同一性を示す、隣接した該ポリマーの信号発生ユニットから発生した信号と識別する、方法。

10

【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法であって、前記連結したユニットのポリマーを、ステーションに対して一過的に移動して、ユニット特異的マーカーまたは該ステーションの、検出可能な物理的变化から生じる信号を生成し、ここで、該ユニット特異的マーカーで標識されたポリマーのユニットの同一性が未知であり、かつ該信号は、隣接する前記ポリマーの信号発生ユニットの、該ステーションへの曝露から生じる信号から、該個々のユニットの同一性の指標として、識別される、方法。

【請求項 7】

20

請求項 1 に記載の方法であって、前記ポリマーがステーションに対して移動され、少なくとも 2 つのユニットを識別するユニット特異的マーカーを該ステーションに暴露して、該ユニット特異的マーカーまたは該ステーションでの検出可能な物理的变化から生じる特徴的な信号を生じ、特徴的な信号間の経過時間量が測定され、経過時間量が該 2 つのユニットの近似を示す、方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ポリマーがステーションに対して直線的に移動され、第 1 のユニットおよび第 2 のユニットを識別するユニット特異的マーカーを該ステーションに暴露して、該ユニット特異的マーカーまたは該ステーションでの検出可能な物理的变化から生じる第 1 および第 2 の信号を生じ、該第 2 の信号は該第 1 の信号と異なり、該信号の順序は、該 2 つのユニットの順序の指標として決定される、方法。

30

【請求項 9】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ポリマーがステーションに対して直線的に通過され、該 2 つのユニットの各々が該ステーション付近を通過する際に発生する特徴的な信号を生成し、該信号間の経過時間が測定され、該工程は、データセットを生成する複数の同様のポリマーについて繰り返され、そして該 2 つの個々のユニット間の距離が、該データセットを分析することによって該複数の同様のポリマーから得られた情報に基づいて測定される、方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ポリマーがステーションに対して直線的に移動され、第 1 のユニットおよび第 2 のユニットを識別する 2 つのユニット特異的マーカーの各々が該ステーション付近を通過される際に発生したポリマー依存性インパルスが測定され、該第 1 ユニットおよび第 2 ユニットの各々は、特徴的な信号を発生し、この工程は、複数の同様のポリマーについて繰り返され、該少なくとも 2 つのユニットの順序は、該複数の同様のポリマーから得られる情報に基づき決定される、方法。

40

【請求項 11】

前記信号が直線的に検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記信号のシグネチャーが少なくとも 10 信号である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

50

前記信号のシグネチャーがユニット特異的マーカーの順序を定義する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記信号のシグネチャーがユニット特異的マーカー間の距離を定義する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記信号のシグネチャーがユニット特異的マーカーの数を定義する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ユニット特異的マーカーの全てが検出される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 7】

前記ユニット特異的マーカーの一部のみが検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記ポリマーが、ユニット特異的マーカーで、部分的およびランダムに標識される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ポリマーの前記ユニットの全てがユニット特異的マーカーで標識される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 に記載の方法であって、前記連結したユニットの標識されたポリマーが、電磁放射線、クエンチング源、および蛍光励起源からなる群から選択される因子に曝露され、前記信号が該ポリマーのユニット特異的マーカーと該因子との間の相互作用により生成される、方法。

20

【請求項 2 1】

請求項 1 に記載の方法であって、前記連結したユニットの標識されたポリマーがステーションに対して移動され、前記信号が、該ポリマーのユニット特異的マーカーの該ステーションへの曝露時に生成される、方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ポリマーのユニット特異的マーカーを識別するための方法であり、該ユニット特異的マーカーの同一性が、該ポリマーの少なくとも 1 ユニットの同一性を指し示すものであり、該ユニット特異的マーカーが一過性にステーションに曝露されて、該ユニット特異的マーカーの信号特性を生成し、そして該信号と、該ユニット特異的マーカーの同一性を指し示すものとして該ポリマーのユニット特異的マーカーを生成する隣接信号から生成した信号と、を区別する工程をさらに包含する、方法。

30

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の方法であって、前記ステーションが、電磁放射線、クエンチング源、および蛍光励起源からなる群から選択される因子であり、前記信号が検出可能な電磁放射線信号である、方法。

【請求項 2 4】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ポリマーの 2 つのユニット特異的マーカーの近似を決定するための方法であり、該 2 つのユニット特異的マーカーの近似が前記信号のシグネチャーであり、それぞれのユニット特異的マーカーの同一性が、該ポリマーの少なくとも 1 ユニットの同一性を指し示すものであり、前記標識されたポリマーがステーションに対して移動されて、2 つのユニット特異的マーカーが該ステーションに曝露されて、該ユニット特異的マーカーまたは該ステーションにおける検出可能な物理的变化により生じる特徴的な信号を生成し、そして該方法は、各々の特徴的な信号を検出する間の経過時間量を測定する工程をさらに包含し、該経過時間量は該 2 つのユニット特異的マーカーの近似である、方法。

40

【請求項 2 5】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ポリマーの 2 つの配列ユニットマーカーの順序を決

50

定するための方法であり、それぞれのユニット特異的マーカーの同一性が該ポリマーの少なくとも1ユニットの同一性を指し示すものであり、該2つのユニット特異的マーカーの順序が前記信号のシグネチャーであり、前記標識されたポリマーがステーションに対して直線的に移動されて、該ユニット特異的マーカーの1つを該ステーションに曝露して、信号のシグネチャーである信号を生成し、そして該ユニット特異的マーカーの他方を該ステーションに曝露して、第1信号とは異なった、該信号のシグネチャーである第2検出可能信号を生成し、そして、該2つのユニット特異的マーカーの順序を指し示すものとしての、該信号の順序を決定する工程をさらに包含する、方法。

【請求項26】

請求項1に記載の方法であって、前記ポリマーの2つのユニット特異的マーカー間の距離を決定するための方法であり、それぞれのユニット特異的マーカーの同一性が該ポリマーの少なくとも1ユニットの同一性を指し示すものであり、該2つのユニット特異的マーカー間の距離が前記信号のシグネチャーであり、前記標識されたポリマーがステーションに対して直線的に移動されて、それぞれの該2つのユニット特異的マーカーが該ステーション付近を通過するに従って生成される、特徴的な信号を生成し、そして該2つのユニット特異的マーカー間の距離を指し示すものとしての、該信号間の距離を決定する工程をさらに包含する、方法。

10

【請求項27】

前記信号が電磁放射線である、請求項1に記載の方法。

【請求項28】

20

前記因子が電磁放射線である、請求項4に記載の方法。

【請求項29】

前記複数のユニット特異的マーカーの一部が発蛍光団で標識された、請求項4に記載の方法。

【請求項30】

前記複数のユニット特異的マーカーを発光化合物の近くに導き、そして該発光化合物を電磁放射線に曝露することによって、該複数のユニット特異的マーカーが、連続的に電磁放射線に曝露され、そしてここで、該複数のユニット特異的マーカーは、該発光化合物からの電磁放射線の放出に、検出可能に影響を与える、請求項4に記載の方法。

【請求項31】

30

前記複数のユニット特異的マーカーが、連続的に電磁放射線に曝露され、そしてここで、該電磁放射線は、該複数のユニット特異的マーカーからの電磁放射線の放出に、検出可能に影響を与え、前記検出可能な信号を生じる、請求項4に記載の方法。

【請求項32】

前記発光化合物からの電磁放射線の放出に検出可能に影響を与える前記ユニット特異的マーカーが、発蛍光団で標識される、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

発光化合物が固体材料に付着される、請求項30に記載の方法。

【請求項34】

前記ポリマーを壁材料中のナノチャネルを通して移動し、そして該複数のユニット特異的マーカーが該ナノチャネルにおいて相互作用ステーションで前記因子に曝露されることによって、該複数のユニット特異的マーカーが、連続的に該因子に曝露される、請求項28に記載の方法。

40

【請求項35】

前記ポリマーが、ナノチャネルに隣接する、壁材料中に包埋された発光化合物を有する該壁材料中の該ナノチャネルを通して移動され、これにより、該ポリマーが該ナノチャネルを通して移動する際に前記複数のユニット特異的マーカーが該発光化合物と相互作用する、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記壁材料が、複数のナノチャネルを含み、該ナノチャネルには相互作用ステーションが

50

存在し、そして、前記方法は、該ナノチャネルを通して複数のユニット特異的マーカーを移動する工程であって、任意の所定の時間において、ナノチャネル当たりポリマーが1つのみである工程、および、該相互作用ステーションでの該ポリマーの個々のユニットと前記因子との相互作用から得られる信号を同時に検出する工程、をさらに含む、請求項34に記載の方法。

【請求項37】

前記検出された信号を、他のポリマーからの信号のパターンと比較して、2つのポリマーの関連性を決定する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項38】

前記検出された信号を、既知のポリマーに特徴的な既知のパターンの信号と比較して、分析されるポリマーの該既知のポリマーとの関連性を決定する工程をさらに含む、請求項27に記載の方法。

10

【請求項39】

前記複数のユニット特異的マーカーが、前記ポリマーの第1末端での第1ユニットと、該ポリマーの反対の第2末端での第2ユニットとの2つのユニットである、請求項4に記載の方法。

【請求項40】

前記第1ユニットからの第1の信号の検出と前記第2ユニットからの第2の信号の検出との間の経過時間の長さを測定する工程をさらに含む、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記信号の連続的な検出の間の経過時間を検出する工程をさらに含む、請求項27に記載の方法。

20

【請求項42】

前記第1のユニット特異的マーカーは、前記因子と相互作用して第1の検出可能な信号を生じ、そして前記第2のユニット特異的マーカーは、該因子と相互作用して該第1の検出可能な信号とは異なる第2の検出可能な信号を生じる、請求項27に記載の方法。

【請求項43】

前記ポリマーが核酸である、請求項1～42に記載の方法。

【請求項44】

前記ポリマーの少なくとも2つのユニットが異なって標識され、2つの異なった検出可能な信号を生じる、請求項1～42に記載の方法。

30

【請求項45】

前記複数のユニット特異的マーカーが少なくとも2つの因子に曝露され、ここで、該ユニット特異的マーカーと該少なくとも2つの因子との間の相互作用が、少なくとも2つの信号を生じる、請求項4に記載の方法。

【請求項46】

前記少なくとも2つの因子が、前記ポリマーが通過するチャネルの異なる領域に配置される、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記少なくとも2つの信号が、異なる信号である、請求項45に記載の方法。

40

【請求項48】

前記少なくとも2つの信号が、同じ信号である、請求項45に記載の方法。

【請求項49】

前記ナノチャネルが、前記壁に固定される、請求項34に記載の方法。

【請求項50】

前記ユニット特異的マーカーがステーションで前記因子に曝露され、そしてここで該ステーションは非リガンド材料である、請求項4に記載の方法。

【請求項51】

前記ステーションが相互作用ステーションであり、ユニット特異的マーカーは該相互作用ステーションで該ユニット特異的マーカーと相互作用する因子に曝露されて、該相互作用

50

に特徴的な検出可能な電磁放射線信号を生じる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記ステーションが信号発生ステーションであり、そして、生じた特徴的な信号がポリマー依存性インパルスである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記因子が 1 つ以上の発蛍光団であり、そして前記ユニット特異的マーカーが、該ユニット特異的マーカーを該因子のエネルギー移動近接内に配置することによって一過的に曝露され、そしてここで、該因子と該ユニット特異的マーカーとの間の蛍光エネルギー移動を検出することによって、前記信号が検出される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記因子が少なくとも 3 つの発蛍光団である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記ポリマーのユニット特異的マーカーが、該ユニット特異的マーカーを、壁材料中のナノチャンネルを含む相互作用ステーションに配置することによって、前記因子に曝露される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記壁材料が 2 つの層を含み、該層の 1 つが伝導性であり、そして他方は非伝導性であり、そしてここで、前記ナノチャンネルが両方の層を横断する、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記ステーションが信号発生ステーションであり、そして発生される該信号がポリマー依存性インパルスである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記複数の同様のポリマーが均一集団である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記複数の同様のポリマーが不均一集団である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記複数の同様のポリマーがランダムに標識される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記ポリマーが核酸である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記工程の全てが連続的に同時に行われる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記ステーションが相互作用ステーションであり、そして該相互作用ステーションがナノチャンネルである請求項 9 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記ステーションが信号発生ステーションである、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記ステーションが相互作用ステーションである、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記ポリマー依存性インパルスの生成が、生成した電磁放射線信号を測定することを包含する、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記複数の同様のポリマーが同種集合である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記複数の同様のポリマーが異種集合である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記ポリマーが核酸である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記検出する工程が、前記連結されたユニットの全てより少ない単位特異的マーカーからの信号を連続的に検出することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

背景

分子生物学や細胞生物学の研究は、細胞の肉眼的構造に焦点を当てている。細胞がその機能性を決定する複雑なミクロ構造を有することが、現在知られている。細胞構造および機能に関する多様性の多くは、様々な素材 (building block) を多様な化合物に組み立てる細胞の能力に起因する。細胞は、限られた一組のモノマーと呼ばれる素材からポリマーを組み立てることにより、この作業を達成する。ポリマーの多様な機能性への手がかりは、ポリマー中のモノマーの一次配列に基づいており、例えば、なぜ細胞が特定の様態で分化するのか、または特定の薬物による処理に細胞がどう応答するのか、といった細胞機能の基礎を理解するのに不可欠である。

10

モノマー配列を同定することにより、ポリマーの構造を同定する能力は、各有効成分の理解、および細胞内でのその有効成分の役割の理解に不可欠である。ポリマーの配列を決定することにより、発現地図を作成し、どのタンパク質が発現されるのかを決定し、疾患状態ではどこで変異が起こるかを理解し、そして特定のモノマーが不在であったり変異している場合、多糖がより良好に機能するのか、またはその機能を失うのかを決定することが可能である。

発現地図は、mRNA発現パターンの決定に関する。異なって発現されたmRNAを同定する必要性は、時間的および空間的の両面において、遺伝子プログラミングの理解にとって重要である。胎児段階、成長段階、および老化段階を含む、生物の一生の発達の時間経過の間に、異なる遺伝子がオンおよびオフされる。発達変化に加えて、傷害、薬物、異物、およびストレスなど様々な刺激に対する一時的な変化もある。刺激に対する、または成長に伴う特定の組の細胞について経時的な発現変化を図表化する能力により、時間的発現地図と呼ばれるものの作成が可能になる。その一方で身体的発現地図 (body expression map) もまたあり、これには異なる組織および細胞型について異なって発現する遺伝子に関する知識が含まれている。発現地図は、種間および固体間において異なるのみならず、疾患に罹患した状態と疾患に罹患していない状態との間でも異なる。分別遺伝子発現 (differential gene expression) の調査によって、様々な学問分野で遺伝子の重要な発見がもたらされており、それらには、信号変換 (Smithら、1990)、サーカディアンリズム (Lorosら、1989)、果実熟成 (Wilkinsonら、1995)、空腹 (Quら、1996)、細胞周期制御 (el-Deiryら、1993)、アポトーシス (Woroniczら、1994)、および虚血傷害 (Wangら、1995) など多数がある。発現地図の作成には、cDNAまたはmRNAの配列決定および同定が含まれているので、配列決定がより迅速であるほど、必然的に複数の発現地図がより迅速に作成できることになる。

20

30

現在、ヒトゲノムのわずか1%のみしか配列決定されておらず、その他のゲノムではさらに少ない量しか配列決定されていない。また、発現した配列タグを用いた、わずか一つの非常に不完全なヒト身体発現地図しか達成されていない (Adamsら、1995)。ゲノム配列決定の現在のプロトコルは、時間がかかり、クローン化、ゲノムライブラリ作製、コロニー選択 (picking)、および配列決定のような面倒な工程を含む。部分的なゲノムライブラリを一つ作成するだけでも、数ヶ月のオーダーの時間を要する。ライブラリの確立後でさえ、配列決定のためのDNAの準備、および実際の配列決定工程の稼働までには時間的ずれがある。これらの好ましくない事実の乗数効果により、わずか一つのゲノムの配列決定にさえ、莫大な費用、時間、および努力を要することは明らかである。

40

一般的にDNA配列決定は、2つのうち1つの方法を用いて、現在行われている。第1の、より普及している方法は、Sangerら (1977) によって記載されたジデオキシチェーンターミネーション法である。この方法は、ジデオキシヌクレオチドで終結するDNA分子の酵素合成を含む。4つのddNTPを用いることにより、標的DNAの各位置で終結する分子集団を合成できる。これに続く分析により、DNA分子の長さ、および各分子が終結する塩基 (A、C、G、またはTのいずれか) に関する情報がもたらされる。この情報を用いて、DNA配列が決定され得る。第2の方法は、MaxamおよびGil

50

bert 配列決定 (Maxam および Gilbert, 1977) であり、これは、標的 DNA の所定の位置で分解された分子集団を生成するために化学分解を用いる。化学反応切断特異性およびフラグメント長の知識を用いて、DNA 配列を生成する。いずれの方法も、ポリアクリルアミドゲル電気泳動および放射性 DNA フラグメントの写真による可視化 (photographic visualization) に依存する。各プロセスには、約 1 日から 3 日を要する。サンガー配列決定反応は、1 回のランでわずか 300 から 800 塩基しか生成できない。

サンガー法を用いた配列情報の出力を向上させる方法も提案されている。サンガー法に基づいたこれらの方法は、多重配列決定 (multiplex sequencing)、キャピラリーゲル電気泳動、および自動ゲル電気泳動を含む。また最近、同様にサンガー法に依らない方法を開発することに、益々関心が集まっている。サンガー法に依らない方法は、全く異なる方法論を用いて塩基情報を得る。この範疇は、走査電子顕微鏡法 (STM)、質量分析、酵素ルミノメトリック無機ピロリン酸検出アッセイ (enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate) (ELIDA) 配列決定、エキソヌクレアーゼ配列決定、およびハイブリダイゼーションによる配列決定を含む、最新の技術を含む。これらの方法の概要を以下に説明する。

現在、自動ゲル電気泳動は、最も汎用されている大規模配列決定法である。自動法では、蛍光標識されたサンガーフラグメントを、電荷結合素子 (CCD) 検出器により、実時間で読み取る必要がある。異なる 4 つのジデオキシチエンターミネーション反応を、それぞれ異なって標識されたプライマーを用いて実行する。反応混合物を合わせて、ポリアクリルアミドスラブで同時電気泳動させる。ゲルの末端にレーザー励起を用いることで、分離された DNA フラグメントが分析され、配列がコンピュータにより決定される。多くの自動機器が市販されているが、それぞれ異なる検出法及び標識スキームを用いている。これらのうち最も効率のよいのは、Applied Biosystems Model 377XL であり、1 日あたり 115,200 塩基の最大実速度を生じる。

キャピラリーゲル電気泳動法では、ゲルを充填した小さな直径のキャピラリーにより、反応サンプルが分析される。キャピラリーの小さな直径 (50 μm) が、電気泳動中に発生する熱の効率的な消散を可能にしている。従って、過度のジュール加熱 (400 V/m) することなく、高い電界強度を用いることができ、分離時間を一反応あたり約 20 分に低減できる。塩基をより迅速に分離するのみならず、従来のゲル電気泳動に比して、向上した分解度が得られる。さらに、多くのキャピラリーを並行して分析するので (Wooley および Mathies, 1995)、作成される塩基情報の増大が可能である (実際の速度は 200,000 塩基/日である)。主たる欠点は、反応ごとに新しくゲルを充填したキャピラリーチューブを準備しなければならないので、キャピラリーの連続装填が行えないことである。キャピラリーゲル電気泳動機器は、最近商品化されている。

多重配列決定は、電気泳動ゲルをより効率よく用いる方法である (Church および Kieffer-Higgins, 1988)。まずサンガー反応サンプルを、特有のオリゴマーでタグ化し、その後、最大 20 の異なるサンプルを電気泳動ゲルの 1 レーンで電気泳動する。その後、サンプルをメンブレン上にプロットする。次に、メンブレンをサンガー反応サンプル上のタグに対応するオリゴマーで順次プローブする。メンブレンを洗浄し、20 のサンプル全ての配列が決定するまで連続して再プローブする。ゲル電気泳動の回数を、実質的に低減できるが、洗浄工程とハイブリダイゼーション工程は、電気泳動ゲルを電気泳動するのと同様に面倒である。

質量分析による配列決定は、80 年代後半に初めて導入された。この分野での最近の進歩は、より優れた配列決定を可能にしている (Crain, 1990、Littleら, 1994、Keoughら, 1993、Smirnovら, 1996)。質量分析配列決定では、まず、塩基一個分長さが異なる入れ子 (nested) DNA 分子の集団の生成を引き起こす。続いてフラグメントの分析を、質量分析によって行う。一例では、33 マーを部分的に消化するために、エキソヌクレアーゼが用いられる (Smirnov, 1996)。類似の 5' 末端および異なる 3' 終末点を有する分子集団が生成される。その後、反応混

10

20

30

40

50

合物が分析される。質量分析は、連続フラグメント間の質量差を区別できるほど感度が高く、配列情報の作成を可能にする。

質量分析配列決定は、従来方法に比べて、高度に正確、廉価、かつ迅速である。しかしながら、主たる限界は、読み取り長が10塩基のオーダーであることである。最良の方法であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析(Smirnovら, 1996)でさえも、80~90塩基対の最大読み取り長しか達成できない。分析工程の間のグアニジンでのより長いDNAのフラグメント化のため、大幅に長い読み取り長は物理的に不可能である。従って、質量分析配列決定は、短いプライマー配列の確認に限定され、大規模な配列決定に実用できない。

走査トンネル顕微鏡(STM)配列決定(Ferrell, 1997)法は、STMが商品化されたときに考案された。塩基対情報を電子顕微鏡写真から直接読み取ることができるという当初の見込みは、もはや正しいとは言えない。DNA分子を伝導面に配さなければならず、伝導面は大抵、高度配向パイロライトグラファイト(HOPG)または金である。これらは、トンネルチップ(tunneling tip)により働く物理的および電子的力による剥離に抵抗するのに十分な強さでDNAを保持するための結合部位が欠如している。DNA分子は、困難を伴いながらも、表面に静電的に接着され得る。DNAをうまく固定しても、極度に高い分解能が必要なので、塩基情報を区別することは困難である。現在の技術では、プリンをピリミジンから区別し得るが、個々のプリンおよびピリミジンを同定することはできない。この難業を達成する能力は、プリン上のアルデヒド基とアミン基との間の区別が可能であり、ピリミジン上のメチル基の有無を区別可能な電子顕微鏡検査法を要する。

酵素ルミノメトリック無機ピロリン酸検出アッセイ(ELIDA)配列決定は、連続塩基の付加を判定するため、DNA重合からのピロリン酸放出の検出を用いる。DNA重合反応で放出されたピロリン酸は、ATPスルフィラーゼによってATPに変換され、ATP産生がホタルルシフェラーゼによって連続的にモニターされる。塩基特異性を判定するため、この方法では、ATP、CTP、GTP、およびTTPの連続洗浄を用いる。ATPの洗浄でピロリン酸が生成されれば、一個以上のアデニンが組み込まれる。組み込まれた塩基の数は、生成されるピロリン酸の量に正比例する。作成された配列情報の向上は、多くのELIDA反応の同時平行分析によって達成できる。

主たる欠点は、短い読み取り長である。多重洗浄が必要なため、Ronaghiら(1996)は、15塩基の最大読み取り長でしか達成していない。1塩基の読み取りにつき洗浄が4回あるので、このことは、100塩基の読み取り長には、合計400回の洗浄を行わなければならないことを意味する。各洗浄ごとに発物質の1%の損失があるとして、400回の洗浄後には、発物質の1.8%しか残っておらず、これでは検出に不十分である。

エキソヌクレアーゼ配列決定は、蛍光標識された一本鎖DNA分子を用いる。このDNA分子は流体中に吊り下げられ、エキソヌクレアーゼによって連続切断される。そのとき、個々の蛍光塩基が放出されて、単一分子検出システムに通される。標識されたヌクレオチド検出の時間的な並びが、DNAの配列に対応する(Ambroseら, 1993、Davisら, 1992、Jettら, 1989)。前進型エキソヌクレアーゼを用いることで、理論的には、10,000bp以上のフラグメントを10塩基/秒の速度で配列決定できる。

実際には、エキソヌクレアーゼ配列決定は、各工程において多くの困難に直面する。標識工程は、DNA中の4種の塩基全てを、それぞれ異なる蛍光体でタグ化することを必要とする。立体配置上、これは極めて好ましくない。Ambroseら1993は、M13 DNAの7kb鎖上で2個の塩基の完全な標識を達成している。さらに、流体中にDNA分子を懸乗させるには、困難な光学的捕獲(optical trapping)が必要である。この工程は時間がかかり相当な専門技術を要する。最後に、蛍光体の単一分子は、高い効率で検出される必要がある。1%の誤差でも重大となる。65%から95%に検出効率の改善が達成されてきた。検出効率は限界にまで押し上げられており、さらなる改善の達成は困難で

10

20

30

40

50

ある。

ハイブリダイゼーション法による配列決定では、標的DNAを、可能なオリゴマー配列すべてからなるオリゴマーのセットで引き続いてプローブする。標的DNAの配列は、オリゴマーと標的との間のハイブリダイゼーションパターンの知識を用いて生成される (Bains, 1991, Cantorら, 1992, Drmanacら, 1994)。標的DNAをプローブする2つの可能な方法がある。「プローブアップ (Probe Up)」法は、標的DNAを基質上に固定化し、オリゴマーのセットで連続的にプローブすることを含む。一方、「プローブダウン」は、オリゴマーのセットを基質上に固定化し、標的DNAとハイブリダイズさせることを要する。マイクロチップ合成技術をDNAプローブに応用した「DNAチップ」の出現により、 1 cm^2 の面積に何千もの異なるDNAプローブのアレイを生成することが可能になり、プローブダウン法をより実用的にしている。プローブアップ法は、8マーの場合、65, 536の連続プローブと洗浄を要し、膨大な時間がかかる。一方、プローブダウンハイブリダイゼーションは、数秒でデータを生成する。完全なハイブリダイゼーションの場合、65, 536のオクタマープローブで、最大170塩基が決定される。65, 536の「混合」11マーで、700塩基が生成できる。

実際には、プローブアップ法が、約100塩基対の配列を生成するのに用いられてきた。不完全なハイブリダイゼーションは、適切な配列の生成において困難を引き起こす。ハイブリダイゼーションにおける誤差は何倍にも増幅される。1%の誤差率で、配列決定できる最大長が少なくとも10%低減される。従って、もし65, 536のオリゴヌクレオチドの1%が、200マーDNA標的にハイブリダイズする場合に、偽陽性のハイブリダイゼーション信号を生じると、得られた「ハイブリダイゼーション」の75%が誤りとなる (Bains, 1997)。このような場合、配列決定は不可能となる。結論として、適切なデータを作成するためには、ハイブリダイゼーションが極めて有効でなければならない。さらに、ハイブリダイゼーションによる配列決定は、プローブの長さより1塩基短い配列を繰り返すときにも、問題に直面する。そのような配列が存在するとき、多くの可能な配列がハイブリダイゼーションデータに適合してしまう。

これらの技術のほとんどにおいて、最も一般的な限界は、読み取り長の長さである。実際には、短い読み取り長は、標的DNAの線形序列 (linear order) が解読される前に、追加の遺伝子配列情報が配列決定される必要があることを意味する。短いフラグメントは、さらなるオーバーラップフラグメントで橋渡しされなければならない。理論的に、500塩基の読み取り長では、ヒトゲノムの 3×10^9 塩基全ての線形配列を正しく並べる前に、最低 9×10^9 塩基を配列決定する必要がある。実際、想定し得る (believable) ゲノムを作成するのに必要とされる塩基数は、約 2×10^{10} 塩基である。これら異なる技術の比較は、非実用的なエキソヌクレアーゼ配列決定のみが、長い読み取り長の理論的能力を有することを示している。他の方法は、短い理論的読み取り長を有しており、実用ではさらに短い読み取り長となる。配列決定される必要のある塩基の数を低減するには、読み取り長を改善しなければならないのは明らかである。

タンパク質配列決定は、一般的に、例えばエドマン分解による、末端アミノ酸残基の化学的に誘導された連続的除去および同定を含む。Stryer, L., Biochemistry, W. H. Freeman and Co., San Francisco (1981) pp. 24 - 27を参照されたい。エドマン分解は、ポリペプチドがイソチオシアネートと反応する遊離アミノ基を有することを要する。イソチオシアネートは、典型的にはフェニルイソチオシアネートである。この付加物は、ポリマーの最も近接する骨格アミド基と分子内で反応し、それにより、五員環を形成する。この付加物は再配置され、末端アミノ酸残基はその後、強酸を用いて切断される。アミノ酸の遊離されたフェニルチオヒダントイン (PTH) が同定され、短くなったポリマーは分解および分析サイクルを繰り返し受け得る。

さらに、ポリペプチドのカルボキシ末端配列決定のための、いくつかの新しい方法が記載されてきた。Inglish, A. S., Anal. Biochem. 195: 183 - 96 (1991)を参照されたい。カルボキシ末端配列決定法は、エドマン分解によく似て

10

20

30

40

50

いるが、ポリマーの反対側の末端からの連続的な分解も包含する。Ing l i s , A . S . , A n a l . B i o c h e m . 1 9 5 : 1 8 3 - 9 6 (1 9 9 1) を参照されたい。エドマン分解同様、カルボキシ末端配列決定法は、末端アミノ酸残基の化学的に誘導された連続的除去および同定を含む。

より最近では、ポリマーフラグメントの入れ子状セット（配列規定セット）を調製し、続いて質量分析を行うことによるポリペプチド配列決定が記載されている。C h a i t , B . T . ら , S c i e n c e 2 5 7 : 1 8 8 5 - 9 4 (1 9 9 2) を参照されたい。アミノ酸残基の公知の質量とフラグメントとの相対的質量差を比較することにより、配列が決定される。ポリマーフラグメントの入れ子状（配列規定）セットの形成は、DNA配列決定に必須であるが、この方法は、各残基の連続的除去と同定から成る従来のタンパク質配列決定法とは実質的に異なる。この方法は実用可能性を有するが、いくつかの問題に直面しており、効果的な方法であると証明されてはいない。

ポリマー配列を決定するための公知の方法はそれぞれ、欠点を有する。例えば、ほとんどの方法は時間と労力がかかる。ゲルに基づくDNA配列決定法は、300から800ユニットのポリマーの配列を同定するのに、約1日から3日を要する。質量分析法およびELIDA配列決定のような方法は、非常に短いポリマーについてしか実施できない。

新しいポリマー配列決定法の必要性は極めて大である。配列決定の速度が、複雑な遺伝子機能の迅速な決定に疑いなく役立つ、複数の身体的および時間的発現地図を作製する能力を限定している。疾病診断や新薬調製の高速化を図るために、改良されたポリマー分析方法の必要性も存在する。

発明の要旨

本発明は、ポリマーを分析するための新たな方法および生成物に関し、詳細には、ポリマーの配列を決定するのに有用な新たな方法および生成物に関する。本発明は、ポリマーを配列決定するのに使用される従来技術の方法を上まわる驚くべき利点を有する。本発明以前に、本発明が達成し得る配列決定速度を達成できそうな方法および方法の組合せはなかった。本発明の方法を用いて、従来技術を用いて達成できるよりも、ヒトゲノム全体を数オーダーの桁速に配列決定し得る。ゲノム全体の配列決定に加えて、本発明の方法および生成物は、発生過程および疾患過程に対して、包括的かつ多重的な発現マップを作成するのに用いられ得る。個体のゲノムを配列決定し、そして多重発現マップを作成する能力は、任意の表現形質または疾患過程の遺伝的基礎を決定する能力を大いに向上させる。

本発明によるポリマーを分析する方法は、ポリマーの各ユニットを個々に試験する能力に基づく。各ユニットを個々に試験することにより、ユニットのタイプおよびポリマーのバックボーン上におけるユニットの位置が同定され得る。このことは、ユニットをステーションに配置し、そしてユニットがステーションに最も近接する場合に起こる変化を試験することによって達成し得る。変化は、ユニットとステーションまたはパートナーとの間で起こる相互作用の結果として起こり、そして特定のユニットに対して特異的なものである。例えば、ポリマーが核酸分子であり、かつTがステーションの近位に配置される場合、Tに特異的な変化が起こる。一方、Gがステーションの近位に配置される場合、Gに特異的な変化が発生する。起こる特異的な変化が使用されるステーションおよび研究されるポリマーのタイプに依存する。例えば、変化は、相互作用の結果として発生する電磁信号であり得る。

本発明の方法は、ポリマー内のユニット（または、ある場合には、1群のユニット）を確認することによってポリマーを分析する2タイプの方法を広く含む。第1のタイプの方法は、少なくとも単一のポリマーの分析を含む。ある局面における単一のポリマーの1つのユニットは、因子（agent）と相互作用し、その結果、変化、例えば、エネルギーの移動または消失が起こり信号を生成する。信号はユニットの同一性の指標である。別の局面において、個々のユニットはステーションに曝露され、その結果、ユニットまたはステーションへの検出可能な物理的变化が起こる。ユニットまたはステーションにおける変化は検出可能であり、かつ、その特定のユニットの特徴である信号を生成する。第2のタイプの方法は、複数のポリマーの分析を含む。複数のポリマーの各々の1つのユニットは、相互

作用が起こり得るステーションに配置される。この相互作用は、ユニットを特異的に同定するポリマー依存性インパルス (impulse) を生成するものである。ポリマー依存性インパルスは、例えば、エネルギーの移動、消失、コンダクタンスの変化、機械的变化、抵抗の変化、または任意の他の物理的变化によって発生し得る。

ポリマーを分析する方法として提案する方法は、DNA分子内のユニットの配列を決定するのにとりわけ有用であり、そしてそれら全てが現在のゲノム規模の配列決定プロトコルにおける主要な制限となっている長い配列決定前の工程を構成するゲノムライブラリの作成、クローニング、およびコロニー選択を行う必要を排除し得る。本明細書中で開示される方法は、従来技術で達成されるものよりかなり長い読み出し長、および100万倍の速度の配列読み出しを提供する。提案する読み出し長は、数十万個のヌクレオチドのオーダー（桁）である。これは、重複し、かつ冗長な配列に対する必要性を顕著に低減させることになり、ゲノムの再構成を達成するために配列決定する必要のあるDNAの実質量を低減する。

10

分析のためにポリマーを調製する方法も、本明細書において請求される。長い読み出し長および新規な調製方法の組合せにより、はるかに合理化され、かつ効率的なプロセスをもたらす。最後に、ポリマーの所定の数のユニットを読み出すのにかかる実際の時間は、本願でこれもまた請求する、ナノチャンネルプレートまたはマイクロチャンネルプレートと呼ばれる新規な装置によって供給される莫大な並行増幅のおかげで、現在の方法の100万倍の速度である。これら全ての要因の組合せが、分子生物学および細胞生物学の分野で大幅な前進を提供する配列決定を含むポリマー分析の方法となる。

20

本発明に記載の方法によってゲノムDNAをなどのポリマーを配列決定する能力は、生物学において素晴らしい意味を有する。このような速いペースでの遺伝情報の回収は、ヒトゲノム計画 (Human Genome Project) を前進させる。本発明の方法および生成物は、各個体について多重発現マップを調製する能力を与え、ヒトの遺伝プログラムの完全な解読を可能にする。個々の遺伝情報のプールを一度に比較する能力により、初めて、1つの遺伝子疾患を簡単に発見するだけでなく、複合多重遺伝子障害をDNA自体が配列決定されるのと同じ速度で発見する能力を可能にする。

ある局面において、本発明は、連結されたユニットのポリマーを分析する方法である。本発明の方法は、ポリマーの複数の個々のユニットを、電磁放射線、消失源および蛍光励起源からなる群より選択された因子に曝露する工程を含み、個々のユニットは因子と相互作用して、検出可能な信号を生成する工程、およびこの相互作用から得られた信号を連続して検出して、ポリマーを分析する工程を包含する。ある実施形態において、信号は電磁放射線である。別の実施形態において、この因子は電磁放射線である。本発明のある実施形態によると、ポリマーの個々のユニットは発蛍光団で標識される。

30

ポリマーの複数の個々のユニットは、複数の個々のユニットを発光性化合物の近位に配置し、そしてその発光性化合物を電磁放射線に曝露することによって電磁放射線に連続的に曝露され得る。ここで、ポリマーの複数の個々のユニットは、発光性化合物からの電磁放射線に検出可能に作用する。別の実施形態において、ポリマーの複数の個々のユニットは電磁放射線に連続的に曝露され得、ここで、電磁放射線はポリマーの複数の個々のユニットからの電磁放射線の発光に検出可能に作用して、検出可能な信号を生成する。

40

本発明の別の実施形態によると、本発明の方法は、検出可能な信号を位置付けするために、壁材料内のナノチャンネルを通じてポリマーを移動する工程を含む。壁材料内のナノチャンネルを通じてポリマーを移動し、そしてポリマーの複数の個々のユニットをナノチャンネルの相互作用ステーションにおいて因子に曝露することによって、ポリマーの複数の個々のユニットをこの因子に連続して曝す。この因子は壁材料に取り付けられ得る（壁材料に埋め込まれ得るか、壁材料の表面に共有結合され得るか、または壁材料の表面上にコーティングされ得る）。ある実施形態において、壁材料は、複数のナノチャンネルを含み、各ナノチャンネルにおいて相互作用ステーションを含み、そして複数のポリマーはナノチャンネルを通じて移動し、1つのポリマーのみが相互作用ステーションを任意の所定の時間を通して（1つを超えるポリマーが、それらが重複しない限り、所定の時間に単一のナノチャネ

50

ル内に存在し得る)、そしてポリマーの個々のユニットの相互作用から得られる信号および相互作用ステーションにおける因子が同時に検出される。好適には、ナノチャネルは壁材料内に固定される。

検出される信号は、さらなる分析のためにデータベース内に格納され得る。ある分析方法において、これらの信号は別のポリマーからの信号のパターンと比較して、2つのポリマーの関連性を判定し得る。あるいは、検出された信号は、公知のポリマーに特徴的な公知の信号パターンと比較して、公知のポリマーに対する分析しつつあるポリマーの関連性を判定し得る。分析はまた、第1のユニットからの第1の信号の検出と第2のユニットからの第2の信号の検出との間で経過した時間の長さを測定する工程を含む。ある実施形態において、複数の個々のユニットは2つのユニット、つまり、ポリマーの第1の端部における第1のユニットおよびポリマーの反対の第2の端部の第2のユニットである。信号の連続的な検出の間の経過時間は、ポリマーの2つのユニット間の距離またはポリマーの長さを表示し得る。

10

ポリマーは、当業者に公知の任意のタイプのポリマーであり得る。好適な実施形態において、ポリマーは、核酸およびタンパク質からなる群より選択される。より好適な実施形態において、ポリマーは核酸である。

因子と相互作用して信号を生成するポリマーのユニットは、標識される。ユニットは内因的に標識され得るか、または外因的に標識され得る。ある実施形態において、ポリマーの一部のユニットのみが標識される。別の実施形態において、全てのユニットが標識される。さらに別の実施形態において、ポリマーの少なくとも2つのユニットが、2つの異なる検出可能な信号を生成するように別々に標識される。ポリマーのユニットは、各ユニットまたはユニットの特定の部分が標識されるか、または不規則に標識され得る。

20

別の実施形態において、ポリマーの複数の個々のユニットは、チャネルの別個の領域に配置された少なくとも2つのステーションに曝露される。このとき、ポリマーのユニットと少なくとも2つのステーションとの間の相互作用が少なくとも2つの信号を生成する。

ある実施形態において、ポリマーの個々のユニットは、放射線で標識され、そしてこの信号は蛍光形態の電磁放射線である。

別の実施形態において、ユニットはステーションにおいて因子に曝露される。好適には、ステーションは非液体材料である。

さらに別の実施形態において、ポリマーの複数の個々のユニットは少なくとも2つの因子に曝露され、そしてポリマーのユニットと少なくとも2つの因子との間の相互作用が少なくとも2つの信号を生成する。少なくとも2つの因子は、ポリマーが通過するチャネルの別個の領域に配置され得る。ある実施形態において、少なくとも2つの信号は異なる信号である。別の実施形態において、少なくとも2つの信号は同じ信号である。

30

本発明の別の局面によると、連結されたユニットのポリマーの分析のための方法が提供される。本発明の方法は、連結されたポリマーの複数の個々のユニットをステーションに対して移動する工程、ならびに、個々のユニットがステーションを通過するに従って、ポリマーまたはステーション内の検出可能な物理的变化から得られる信号を連続的に検出してポリマーを分析する工程を含む。本発明のこの局面はまた、上で説明した各実施形態を含む。

40

ある実施形態において、ステーションは相互作用ステーションであり、そして個々のユニットは相互作用ステーションにおいて、個々のユニットと相互作用する因子に曝露されて、この相互作用に特徴的な検出可能な電磁放射線信号を生成する。別の実施形態において、ステーションは信号生成ステーションであり、そして生成された特徴的な信号はポリマー依存性インパルスである。好適には、ステーションは非液体材料である。

本発明の別の局面において、本発明は、ポリマーの複数の個々のユニットをステーションに曝露し、ポリマーのユニットのステーションに対する曝露から得られる非イオンコンダクタンス信号を生成することによって連結されたユニットのポリマーを分析する方法である。ここで、ステーションはチャネルを規定する表面を有する壁材料に取りつけられる。本発明のこの局面は、上で説明した各実施形態を含む。

50

本発明の別の局面によると、ポリマーの個々のユニットを確認する方法が提供される。本発明の方法は、ポリマーの個々のユニットを、電磁放射線、消失源および蛍光励起源からなる群より選択された因子に過渡的に曝露してこの個々のユニットの同一性は未知である、上記個々のユニットに特徴的である検出可能な電磁放射線信号との相互作用を生成する工程、上記信号を検出する工程、ならびに、上記信号を、ポリマーの隣接する信号生成ユニットより生成した信号から個々のユニットの同一性の指標として識別する工程を包含する。

因子は、1つ以上の発蛍光団であり得、好適には少なくとも3つの発蛍光団である。個々のユニットを因子のエネルギー移動近傍に配置することによって、個々のユニットが1つ以上の発蛍光団（因子）に過渡的に曝露される場合、因子と個々のユニットとの間で蛍光エネルギー移動が起こる。蛍光エネルギー移動を検出することによって信号を検出する。ある実施形態において、壁材料内にナノチャンネルを含む相互作用ステーションに個々のユニットを配置することによって、ポリマーの個々のユニットを因子に曝露する。好適には、壁材料は少なくとも2つの層を含み、一方の層は信号の生成を可能にし、そして他方の層は信号の生成を防止し、ナノチャンネルは両方の層を横切る。

別の局面によると、本発明は、ポリマーの個々のユニットを同定する方法である。本発明の方法は、ステーションに対してポリマーの個々のユニットを過渡的に移動する工程であって、ここで、個々のユニットの同一性は未知であり、ユニットまたはステーションにおける検出可能な物理的变化から得られる信号を検出する工程、および上記信号をポリマーの隣接する信号生成ユニットのステーションに対する曝露により生じる信号から個々のユニットの同一性の指標として識別する工程を包含する。本発明のこの局面はまた、上で説明した各実施形態を含む。

ある実施形態において、ステーションは相互作用ステーションであり、個々のユニットは相互作用ステーションにおいて、個々のユニットと相互作用する因子に曝露されて、この相互作用に特徴的な検出可能な電磁放射線信号を生成する。別の実施形態において、ステーションは信号生成ステーションであり、そして生成された特徴的な信号はポリマー依存性インパルスである。

さらに別の局面において、本発明は、連結されたユニットのポリマーの2つの個々のユニットの近接度（proximity）を決定するための方法である。本発明の方法は、ポリマーをステーションに対して移動する工程と、個々のユニットをステーションに曝露して、ユニットまたはステーション内の検出可能な物理的变化から得られる特徴的な信号を生成する工程と、生成された特徴的な信号を検出する工程と、および特徴的な信号を検出する間に経過した時間の量を測定する工程であって、経過した時間の量が2つの個々のユニットの近接度の指標である工程を包含する。

ある実施形態において、ステーションは相互作用ステーションである。別の実施形態において、相互作用ステーションは因子を含み、因子は電磁放射線、消失源および蛍光励起源からなる群より選択され、特徴的な信号は検出可能な電磁放射線信号である。別の実施形態において、相互作用ステーションは壁材料内のナノチャンネルである。

所定の他の実施形態において、言及されるステーションは、信号生成ステーションである。別の実施形態において、信号生成ステーションは、ポリマーと相互作用して物理的インパルスである特徴的な信号を生成する物理的インパルスソースを含む。ある実施形態における物理的インパルスは、物理的インパルスソースのポリマーのユニットへの曝露の結果として、抵抗またはコンダクタンスのような物理量の変化から生じる。ある実施形態において、物理的インパルスは、ポリマーユニットに隣接して配置されたマイクロ電極またはナノ電極の間のユニットの移動によって引き起こされるキャパシタンスまたは抵抗の変化から得られる。例えば、信号生成ステーションは、ポリマーユニットの反対側に配置されたマイクロ電極またはナノ電極を含み得る。電極を通過するユニットの移動の結果として起こるキャパシタンスまたは抵抗の変化は、特定のユニットについて特異的である。別の実施形態において、物理的インパルスはユニットからの放射性信号の放出から生じる。他の実施形態において、物理的インパルスは、圧電性チップ、直接的な物理的接触、および

10

20

30

40

50

NMR核スピン信号から得られる。

ポリマーは、当業者に公知の任意のタイプのポリマーであり得る。好適な実施形態において、ポリマーは、核酸およびタンパク質からなる群より選択される。より好適な実施形態において、ポリマーは核酸である。ポリマーは、不規則にまたは規則的に標識され得る。異なる連結されたユニットを標識するのに異なる標識を用いて、異なる信号を生成し得る。ある実施形態において、ポリマーの個々のユニットは発蛍光団で標識される。

本発明の別の局面において、連結されたユニットのポリマーの2つの個々のユニットの順序を決定する方法が提供される。本方法は、ポリマーをステーションに対して直線的に移動する工程、一方の個々のユニットをステーションに曝露して、ユニットまたはステーションでの検出可能な物理的变化から得られる信号を生成する工程、他方の個々のユニットをステーションに曝露して、ユニットまたはステーション内の検出可能な物理的变化から得られる、第1の信号とは異なる第2の検出可能な信号を生成する工程、他方の信号を2つの個々のユニットの順序の表示として判定する工程を包含する。

ある実施形態において、ステーションは相互作用ステーションである。別の実施形態において、相互作用ステーションは因子を含み、因子は、電磁放射線、消失源および蛍光励起源からなる群より選択され、生成された特徴的な信号は検出可能な電磁放射線信号である。別の実施形態において、相互作用ステーションは壁材料内のナノチャンネルである。

所定の他の実施形態において、言及されるステーションは信号生成ステーションである。別の実施形態において、信号生成ステーションは、ポリマーと相互作用して物理的インパルスである特徴的な信号を生成する物理的インパルスソースを含む。ある実施形態における物理的インパルスは、物理的インパルスソースのポリマーのユニットへの曝露の結果として、抵抗またはコンダクタンスのような物理量の変化から生じ得る。ある実施形態において、物理的インパルスは、ポリマーユニットに隣接して配置されたマイクロ電極またはナノ電極の間のユニットの移動によって引き起こされるキャパシタンスまたは抵抗の変化から得られる。例えば、信号生成ステーションは、ポリマーユニットの反対側に配置されたマイクロ電極またはナノ電極を含み得る。電極を通過するユニットの移動の結果として起こるキャパシタンスまたは抵抗の変化は、特定のユニットについて特異的である。別の実施形態において、物理的インパルスはユニットからの放射性信号の放出から得られる。他の実施形態において、物理的インパルスは、圧電性 (piezoelectric) チップ、直接的な物理的接触、およびNMR核スピン信号から生じる。

ポリマーは、当業者に公知の任意のタイプのポリマーである。好適な実施形態において、ポリマーは、核酸およびタンパク質からなる群より選択される。より好適な実施形態において、ポリマーは核酸である。ポリマーは、不規則にまたは規則的に標識される。異なる連結されたユニットを標識するのに異なる標識を用いて、異なる信号を生成し得る。ある実施形態において、ポリマーの個々のユニットは発蛍光団で標識される。別の実施形態において、ポリマーの個々のユニットは放射能によって標識される。

本発明のさらに別の実施形態によると、連結されたユニットのポリマーの2つの個々のユニットの間の距離を判定する方法が提供される。本発明の方法は、ポリマーをステーションに対して直線的に通過させる工程と、2つの個々のユニットの各々がステーションを通過する間に生成された特徴的な信号を検出する工程と、測定された信号の間の経過時間を測定する工程と、工程1、工程2および工程3を複数の同様のポリマーについて繰り返してデータセットを生成する工程と、データセットを分析することによって上記複数の同様のポリマーから得られた情報に基づく2つの個々のユニットの間の距離を決定する工程とを包含する。

ある実施形態において、ステーションは相互作用ステーションである。別の実施形態において、相互作用ステーションは因子を含み、因子は、電磁放射線、消失源および蛍光励起源からなる群より選択される。別の実施形態において、生成された特徴的な信号は検出可能な電磁放射線信号である。別の実施形態において、相互作用ステーションは壁材料内のナノチャンネルである。

所定の他の実施形態において、言及されるステーションは信号生成ステーションである。

別の実施形態において、信号生成ステーションは、ポリマーと相互作用して物理的インパルスである特徴的な信号を生成する物理的インパルスソースを含む。ある実施形態における物理的インパルスは、物理的インパルスソースのポリマーのユニットへの曝露の結果として、抵抗またはコンダクタンス等の物理量の変化から生じる。ある実施形態において、物理的インパルスは、ポリマーユニットに隣接して配置されたマイクロ電極またはナノ電極の間のユニットの移動によって引き起こされる抵抗またはコンダクタンスの変化から生じる。例えば、信号生成ステーションは、ポリマーユニットの反対側に配置されたマイクロ電極またはナノ電極を含み得る。電極を通過するユニットの移動の結果として起こるキャパシタンスまたは抵抗の変化は、特定のユニットについて特異的である。別の実施形態において、ステーションにおける発光を測定することにより、2つの連結されたユニットが信号生成ステーションにおいて検出される。別の実施形態において、物理的インパルスはユニットからの放射性信号の放出から生じる。他の実施形態において、物理的インパルスは、圧電性チップ、直接的な物理的接触、およびNMR核スピン信号から得られる。

ポリマーは、当業者に公知の任意のタイプのポリマーであり得る。好適な実施形態において、ポリマーは、核酸およびタンパク質からなる群より選択される。より好適な実施形態において、ポリマーは核酸である。ポリマーは、不規則にまたは規則的に標識される。異なる連結されたユニットを標識するのに異なる標識を用いて、異なる信号が生成され得る。ある実施形態において、ポリマーの個々のユニットは蛍光団で標識される。

別の実施形態によると、複数の同様のポリマーは均質な集団である。別の実施形態において、複数の同様のポリマーは不均質な集団である。

別の実施形態において、工程(1)から工程(4)は実質的に同時に実行される。

本発明のさらに別の局面によれば、このような転移および消失が可能である2つの相互作用するパートナーの間での共鳴エネルギーの転移または消失を検出する方法が開示される。本発明の方法は、このような転移や消失が可能となるような十分に近い近位に2つのパートナーを配置する工程、電磁放射線、消失源および蛍光励起源からなる群より選択された因子をパートナーの一方に添加する工程、パートナー間での電磁放射線放射および相互作用に起因する蛍光共鳴エネルギーの移動および消失を材料シールドでシールドする工程、および放射された電磁放射線を検出する工程を包含する。好適な実施形態において、材料シールドは伝導性材料シールドである。

別の局面において、本発明は、連結されたユニットのポリマーを分析する方法である。本発明の方法は、連結されたユニットの標識されたポリマーを提供する工程、全ての連結されたユニットよりも少ないユニット特異的なマーカーからの信号を検出する工程、および検出された信号のシグネチャー(signature)を格納してポリマーを分析する工程を包含する。ある実施形態において、全てのユニット特異的なマーカーが検出される。別の実施形態において、ポリマーはユニット特異的なマーカーによって部分的かつ不規則に標識される。さらに別の実施形態において、ユニット特異的なマーカーの一部分のみが検出される。別の実施形態において、ポリマーの全てのユニットは、ユニット特異的なマーカーによって標識される。

ある実施形態における連結されたユニットの標識されたポリマーは、電磁放射線、消失源および蛍光励起源からなる群より選択された因子に曝露され、そして信号がポリマーのユニット特異的なマーカーと因子との間の相互作用によって生成される。

ある実施形態において、信号は直線的に検出される。別の実施形態において、信号のシグネチャーは少なくとも10個の信号を、好適には20個の信号を含む。信号のシグネチャーはポリマーに関する任意の情報を含む。好適には、信号のシグネチャーはユニット特異的なマーカーの順序、距離、および数に関する情報を含む。

別の実施形態において、連結されたユニットの標識されたポリマーはステーションに対して移動され、ここで、ポリマーのユニット特異的なマーカーをステーションに曝露すると信号が生成される。ステーションは相互作用ステーションであり得る。

ある実施形態における方法は、ポリマーのユニット特異的なマーカーを同定する方法であり、ユニット特異的なマーカーの同一性は、ポリマーの少なくとも1つのユニットの同一

10

20

30

40

50

性の指標である。ユニット特異的なマーカーは、ステーションに過渡的に曝露されて、ユニット特異的なマーカーに特徴的な信号を生成し、そして信号は、ユニット特異的なマーカーの同一性の指標として、ポリマーの隣接する信号生成性のユニット特異的なマーカーから生成された信号から識別される。ステーションは、電磁放射線、消失源および蛍光励起源からなる群より選択された因子を含む相互作用ステーションであり得、ここで、信号は検出可能な電磁放射線信号である。

他の実施形態における方法は、ポリマーの2つのユニット特異的なマーカーの近接度を判定する方法であり、ここで、2つのユニット特異的なマーカーの近接度は、上記信号のシグネチャーである。各ユニット特異的なマーカーの同一性は、ポリマーの少なくとも1つのユニットの同一性の指標である。標識されたポリマーはステーションと相対的に移動され、2つのユニット特異的なマーカーをステーションに曝露し、ユニット特異的なマーカーまたはステーション内での検出可能な物理的变化から得られる特徴信号を生成し、そして、各特徴信号の検出の間に経過した時間の量を測定する。経過した時間の量が2つのユニット特異的なマーカーの近接度の指標である。

本発明の方法はまた、ポリマーの2つのユニット特異的なマーカーの順序を決定する方法であり、各ユニット特異的なマーカーの同一性は、ポリマーの少なくとも1つのユニットの同一性の指標であり、ここで、2つのユニット特異的なマーカーの順序は上記信号のシグネチャーである。標識されたポリマーは、ステーションに対して直線的に移動されて、一方のユニット特異的なマーカーをステーションに曝露して、ユニット特異的なマーカーである信号を生成し、そして他方のユニット特異的なマーカーをステーションに曝露して、ユニット特異的なマーカーである、第1の信号とは異なる第2の検出可能な信号を生成する。決定された信号の順序は、2つのユニット特異的なマーカーの順序の指標である。ある実施形態における本発明の方法は、ポリマーの2つのユニット特異的なマーカーの間の距離を決定する方法であり、各ユニット特異的なマーカーの同一性は、ポリマーの少なくとも1つのユニットの同一性の指標であり、ここで、2つのユニット特異的なマーカーの間の距離は上記信号のシグネチャーである。標識されたポリマーは、ステーションに対して直線的に移動され、ステーションを通過した2つのユニット特異的なマーカーの各々として発生した特徴信号を生成し、そして2つのユニット特異的なマーカーの間の距離の指標として信号の間の距離が決定される。

別の実施形態において、本発明の方法は、試験標識されたポリマーを特徴づける方法であって、ここで、複数の標識されたポリマーはステーションに曝露されて、複数の標識されたポリマーの各々についての信号のシグネチャーが得られる。本発明の方法は、複数のポリマーの信号のシグネチャーを比較する工程と、ポリマーの信号のシグネチャーの間の類似性に基づいてポリマーの関連性を判定する工程と、関連するポリマーの信号のシグネチャーに基づいて試験ポリマーを特徴づける工程とを包含する。

さらに別の実施形態によれば、本発明の方法は、連結されたユニットのポリマーを配列決定する方法である。信号のシグネチャーは複数の重複するポリマーの各々から得られ、各ポリマーの少なくとも一部分が、他方のポリマーと同一の連結されたユニットの配列を有し、そして、信号のシグネチャーが比較されて、複数のポリマーにおいて同一である連結されたユニットの配列が得られる。

別の実施形態における方法は、1組のポリマーを分析するための方法であり、この組の各ポリマーが連結されたユニットの個体ポリマーであり、ここで、ポリマーの組は互いに平行に配向され、そして、このポリマーのポリマー特異的な特徴が検出される。

上記方法の各々は、いくつかの実施形態において、信号の生成をもたらすユニットと因子との間でのエネルギーの転移または消失を含むポリマーとステーションとの間の相互作用に基づき、ならびに、他の実施形態において、信号の生成をもたらすユニットまたはステーション内での物理的变化に基づく。各方法は多くのポリマー上で同時に、または、ただ1つのポリマー上で一度に行われ得る。

ユニットとステーションとの間におけるポリマー依存性インパルスを含む相互作用に基づいて複数のポリマーを一度に分析する方法もまた実行され得る。後に説明するこれらの方

10

20

30

40

50

法は、検出され得る任意のタイプのポリマー依存性インパルスを生成するユニットと信号生成ステーションとの間の相互作用に基づく。ポリマー依存性インパルスは、ポリマーのユニットを信号生成ステーションに曝露することにより生成されるが、ポリマーユニットまたはステーション内での物理的変化が発生することを必要としない。例えば、ポリマー依存性インパルスは、エネルギーの転移、消失、コンダクタンスの変化、機械的変化、抵抗の変化または任意の他の物理的変化から得られ得る。

試験ポリマーを特徴付ける方法は、本発明の別の局面である。試験ポリマーを特徴付ける方法は、複数のポリマーの各々についてポリマー依存性インパルスを得る工程、複数のポリマーのポリマー依存性インパルスを比較する工程、ポリマーのポリマー依存性インパルスの間の類似性に基づいてポリマーの関連性を判定する工程、および関連するポリマーのポリマー依存性インパルスに基づいて試験ポリマーを特徴付ける工程によって実行される。

10

複数のポリマーは任意のタイプのポリマーであり得るが、好適には核酸である。ある実施形態において、複数のポリマーは均質な集団である。別の実施形態において、複数のポリマーは不均質な集団である。ポリマーは不規則にまたは規則的に標識され得る。異なる連結されたユニットを標識するのに異なる標識が使用され、異なるポリマー依存性インパルスが生成され得る。

ポリマー依存性インパルスは、ポリマーについての多くの異なるタイプの構造情報を提供する。例えば、得られたポリマー依存性インパルスは、ポリマー依存性インパルスの順序を含み得るか、もしくは、得られたポリマー依存性インパルスは、特異的な信号の間の時間的分離または特異的なポリマー依存性インパルスの数を含み得る。

20

ある重要な実施形態において、ポリマー依存性インパルスは、複数のポリマーを直線的に信号生成ステーションを通過して移動させることにより得られる。

別の局面において、本発明は、連結されたユニットのポリマーの2つの個々のユニットの間の距離を決定する方法である。本発明の方法は、(1)ポリマーをステーションと相対的に直線的に通過させる工程、(2)信号生成ステーションを通過した2つの個々のユニットの各々として生成されたポリマー依存性インパルスを検出する工程、(3)測定されたポリマー依存性インパルスの間の経過時間を測定する工程、(4)複数の同様のポリマーについて工程1、2、および3を繰り返してデータセットを生成する工程、および(5)データセットを分析することによって上記複数の同様のポリマーから得られた情報に基づいて2つの個々のユニットの間の距離を判定する工程を包含する。ある実施形態において、工程(1)~(4)は、実質的に同時に実行される。

30

複数のポリマーは任意のタイプのポリマーであり得るが、好適には核酸である。ある実施形態において、複数のポリマーは均質な集団である。別の実施形態において、複数のポリマーは不均質な集団である。ポリマーは不規則または規則的に標識され得る。異なる連結されたユニットを標識するのに異なる標識を使用して、異なるポリマー依存性インパルスが生成され得る。

ある実施形態において、測定されたポリマー依存性インパルスは生成された電磁放射線信号である。別の実施形態において、2つの連結されたユニットは、ステーションにおける発光を測定することによって信号生成ステーションにおいて検出される。信号生成ステーションはナノチャネルであり得る。

40

別の局面によると、本発明は、連結されたユニットのポリマーの2つの個々のユニットの順序を決定する方法である。この方法は、(1)信号生成ステーションに対して直線的にポリマーを移動する工程、(2)一方の個々のユニットをステーションに曝露して第1のポリマー依存性インパルスを生成する工程、(3)他方の個々のユニットをステーションに曝露してポリマー依存性インパルスを生成する工程、(4)複数の同様のポリマーについて工程1、2、および3を繰り返してデータセットを生成する工程、および(5)データセットを分析することによって上記複数の同様のポリマーから得られた情報に基づいて2つの個々のユニットの順序を判定する工程、を包含する。ある実施形態において、工程(1)~(4)は、実質的に同時に実行される。ある実施形態において、測定された信号

50

は電磁放射信号である。

複数のポリマーは任意のタイプのポリマーであり得るが、好適には核酸である。ある実施形態において、複数のポリマーは均質な集団である。別の実施形態において、複数のポリマーは不均質な集団である。ポリマーは不規則または規則的に標識され得る。異なる連結されたユニットを標識するのに異なる標識が使用され、異なるポリマー依存性インパルスが生成され得る。

ある実施形態において、測定されたポリマー依存性インパルスは生成された電磁放射線信号である。別の実施形態において、2つの連結されたユニットは、ステーションにおける発光を測定することによって信号生成ステーションにおいて検出される。信号生成ステーションはナノチャンネルであり得る。

10

本発明の別の局面において、連結されたユニットのポリマーを配列決定する方法が提供される。この方法は、複数の重複するポリマーからポリマー依存性インパルスを得る工程であって、ポリマーの少なくとも一部分が他方のポリマーと同一の連結されたユニットの配列を有する工程、およびポリマー依存性インパルスと比較して、複数のポリマーにおいて同一である連結されたユニットの配列を得る工程を包含する。

ある実施形態において、ポリマー依存性インパルスは光学的に検出可能である。別の実施形態において、核酸は、電磁放射線、消失源、蛍光励起源および放射線源からなる群より選択された因子で標識される。

複数のポリマーは任意のタイプのポリマーであるが、好適には核酸である。ある実施形態において、複数のポリマーは均質な集団である。別の実施形態において、複数のポリマーは不均質な集団である。ポリマーは不規則または規則的に標識され得る。異なる連結されたユニットを標識するのに異なる標識を使用して、異なるポリマー依存性インパルスが生成され得る。

20

核酸を標識する方法もまた提供される。方法は、分裂細胞をヌクレオチドアナログに接触させる工程、ヌクレオチドアナログに取り込まれた核酸を細胞から単離する工程、および取り込まれたヌクレオチドアナログを標識することにより、取り込まれたヌクレオチドアナログで核酸を改変する工程を包含する。ある実施形態において、ヌクレオチドアナログは臭素処理されたアナログである。

分裂細胞は、必要に応じて、細胞分裂周期において細胞の増殖を阻害し、接触工程を実行し、そして細胞を細胞分裂周期に再入させることによって、ヌクレオチドアナログと接触され得る。次に、核酸は、細胞が細胞分裂周期に再入して、そして細胞分裂周期を完了した後で、かつ、第2の細胞分裂周期が完了する前に単離され得る。

30

別の実施形態において、取り込まれたヌクレオチドアナログは電磁放射線源、消失源および蛍光励起源からなる群より選択された因子で標識される。

本発明の別の局面によると、1組のポリマーを分析する方法が提供される。このセットの各ポリマーは連結されたユニットの個体ポリマーである。方法は、1組のポリマーを互いに平行になるように配向する工程と、このポリマーのポリマー特異的な特徴を検出する工程とを包含する。ある実施形態において、配向工程はゲルを含まない溶液中である。ポリマーは任意の方法を用いて配向され得る。ポリマーを配向する好適な方法は、電界をポリマーに適用する方法である。

40

複数のポリマーは任意のタイプのポリマーであり得るが、好適には核酸である。ある実施形態において、複数のポリマーは均質な集団である。別の実施形態において、複数のポリマーは不均質な集団である。ポリマーは不規則または規則的に標識され得る。異なる連結されたユニットを標識するのに異なる標識を使用して、異なるポリマー依存性インパルスが生成され得る。

ポリマー特異的な特徴は、ポリマーの構造的特徴に関する情報である。ポリマー特異的な特徴は、ポリマー内の連結されたユニットの順序であり得る。

ある実施形態において、検出工程は上記ポリマーについて同時に実行される。別の実施形態において、検出工程は、電磁放射線信号を測定する工程を含む。好適な実施形態によると、検出工程は、ポリマーを複数の信号生成ステーションに対して相対的に直線的に通過

50

させること、およびこのポリマーがこの信号生成ステーションを通過する時に生成するポリマー依存性インパルスを検出し、かつ、区別することを含む。

本発明の別の局面において、１組のポリマーを分析する方法であって、この組の各ポリマーが連結されたユニットの個体ポリマーである方法が提供される。この方法は、電界の１組のポリマーを配向する工程、１組のポリマーを規定された各チャンネルを介して同時に移動する工程、およびポリマーがチャンネルを介して移動する時にポリマー特異的な特徴を検出する工程を包含する。ある実施形態において、配向する工程はゲルを含まない溶液の中で行われる。好適にはチャンネルはナノチャンネルである。

複数のポリマーは任意のタイプのポリマーであり得るが、好適には核酸である。ある実施形態において、複数のポリマーは均質な集団である。別の実施形態において、複数のポリマーは不均質な集団である。ポリマーは不規則または規則的に標識され得る。異なる連結されたユニットを標識するのに異なる標識を使用して、異なるポリマー依存性インパルスが生成され得る。

10

ポリマー特異的な特徴は、ポリマーの構造的特徴に関する情報である。ポリマー特異的な特徴は、ポリマー内の連結されたユニット (unity) の順序であり得る。

ある実施形態において、検出工程は上記ポリマーについて同時に実行される。別の実施形態において、検出工程は、電磁放射線信号を測定する工程を含む。好適な実施形態によると、検出工程は、ポリマーを複数の信号生成ステーションに対して相対的に直線的に通過させる工程、およびこのポリマーがこの信号生成ステーションを通過する時に生成するポリマー依存性インパルスを検出し、かつ、区別する工程を包含する。

20

本発明のまた別の局面により、製品が提供される。この製品は壁材料を含み、この壁材料はチャンネルを定義する表面、因子を有し、ここで因子は、電磁放射線源、クエンチング源、発光フィルム層および蛍光励起源からなる群より選択され、チャンネルに近接した壁材料に付着され、この因子は十分にチャンネルに近接し、そしてパートナー化合物と検出可能に相互作用するのに十分な量で存在する。このパートナー化合物は、チャンネルを通過する発光化合物、光受容化合物、放射活性化合物、およびクエンチャーからなる群より選択される。好ましくは、チャンネルはポリマーの支持体である。

１つの実施態様における因子は電磁放射線源であり、この電磁放射線源は発光化合物である。別の実施態様では、チャンネルはマイクロチャンネルおよびナノチャンネルからなる群より選択される。

30

別の実施態様によると、チャンネルを定義する壁材料の表面に発光化合物は含まれない。別の実施態様では、発光化合物は壁材料の外面に付着している。また別の実施態様では、発光化合物はリンカーに付着し、このリンカーは壁材料の外面に付着している。さらに別の実施態様では、発光化合物は壁材料内、または壁材料の層内または壁材料上に埋め込まれる。発光化合物は壁材料の外面の領域に集中され得、別の実施態様では、この領域はチャンネルの一部分を包囲する。発光化合物は同心円状のリングをチャンネルの一部分の周りの壁材料中で形成し得る。発光化合物の局在化されたエリアのみの曝露を可能にする開口部を有するマスキング層もまた製品の一部となり得る。

第１の発光化合物と異なる第２の発光化合物は、チャンネルに近接した壁材料に付着され得る。ここで発光化合物は十分にチャンネルに近接して、そしてチャンネルを通過するパートナー発光化合物と検出可能に相互作用するのに十分な量で存在する。

40

壁材料は別々の層から形成され得る。１つの実施態様では、発光化合物に近接した壁材料の外表面は伝導層である。別の実施態様では、壁材料は伝導層および非伝導層の二つの層を含む。壁材料はまた、信号発生を妨げる第１層および信号発生を許容する第２層の少なくとも二つの層から構成され得る。あるいは、発光化合物に近接した壁材料は光不透過性層である。別の実施態様では、壁材料は光不透過性層および支持光不透過性層の二つの層を含む。壁材料は発光化合物の第２側面上の第２の光不透過性層であり得、第１層および第２層は発光化合物を挟む。好ましい実施態様では、発光化合物は蛍光化合物である。

チャンネルは任意の形状または寸法を有し得る。好ましくは、チャンネルは１オングストロームと１mmとの間であるナノチャンネルである。好ましい実施態様では、チャンネルの幅は１オ

50

ングストロームと500オングストロームとの間である。好ましくは、壁は複数のチャネルを含む。好ましくは、壁材料は少なくとも2つの、そしてより好ましくは少なくとも50のチャネルを含む。

1つの実施態様では、壁材料は互いに付着された第1光不透過性層および発光フィルム層の二つの層から形成され、ここでチャネルは両層を通して延び、両層の表面によって定義される。好ましくは、チャネルはナノチャネルである。好ましい実施態様では、チャネルの長さは1オングストロームと1mmとの間である。いくつかの実施態様における物品は第2光不透過性層を含み、発光フィルム層は第1と第2光不透過性層との間に配置される。好ましい実施態様では、チャネルを定義する表面は光不透過性層の表面を含み、この表面に発光フィルム層材料は含まれない。

10

別の実施態様では、因子は蛍光励起源であり、ここで蛍光励起源はシンチレーション層である。シンチレーション層は、NaI(Tl)、ZnS(Ag)、アントラセン、スチルベン、および可塑性蛍光体(plastic phosphor)からなる群から選択され得る。好ましくは、シンチレーション層は二つの照射不透過性層(例えば鉛またはLucite)の間の壁材料中に埋め込まれる。

別の局面では、本発明は複数のチャネルを定義する表面、および少なくとも一つのチャネルに近接した壁材料の別々の領域に付着したステーションを有する壁材料である製品であり、ここでこのステーションは十分にチャネルに近接して、そしてチャネルを通過して、連結したユニットのポリマーでの、またはポリマーがステーションに曝露される際のステーションでの、検出可能な物理的变化から信号を生じさせるのに十分な量で存在する。

20

本発明の別の局面により、製品が提供される。この物品はチャネルを定義する表面、およびそれぞれがチャネルに近接した壁材料の別々の領域に付着した複数のステーションを有する壁材料である。ここでステーションは十分にチャネルに近接し、そしてチャネルを通過する連結したユニットのポリマーでの、またはポリマーがステーションに曝露される際のステーションでの、検出可能な物理的变化から信号を生じさせるのに十分な量で存在する。

壁材料を調整するための方法は、本発明の別の局面である。この方法は、発光化合物またはクエンチング化合物を壁材料の複数の別々の位置に共有結合する工程を包含し、各上記別々の位置は、上記壁材料上のそれぞれの相互作用ステーションに十分近く、これによりポリマーの個々のユニット(これは上記発光化合物またはクエンチング化合物と相互作用

30

的であり、信号を生成する)が上記相互作用ステーションに配置された場合、発光化合物またはクエンチング化合物は個々のユニットと相互作用し、信号を生成する。1つの実施態様では、この方法は、上記壁材料に伝導性材料層を適用する工程を包含する。別の実施態様では、発光化合物またはクエンチング化合物は上記壁材料中のチャネルに近接した別々の位置において共有結合され、上記チャネルは相互作用ステーションを定義する。チャネルは好ましくはマイクロチャネルである。より好ましい実施態様では、チャネルはナノチャネルである。発光化合物またはクエンチング化合物は、1つの様式で壁材料に共有結合され得、これにより、チャネルを定義する壁材料の表面は発光化合物およびクエンチング化合物を含まない。

本発明はまた、選択的に化学物質を付着するための方法を包含し、これは不透明である壁材料を介してチャネルの縁において付着される。この方法は、壁材料を介してチャネルの縁で付着した光防護性化学基を備えた壁材料を提供する工程、光防護性化学基に光を適用してこの化学基を脱光防護する工程、およびこの脱保護された化学基に化学物質を付着する工程を包含する。

40

1つの実施態様では、光はチャネルの縁を定義する壁材料の表面の選択された領域にのみ適用される。別の実施態様では、チャネルは第1末端および第2末端を有し、縁は第1末端にあり、ここで光は第2末端に適用され、この光はチャネルを通過し、上記第1末端の縁において光防護性化学基に接触する。チャネルは好ましくはマイクロチャネルである。より好ましい実施態様では、チャネルはナノチャネルである。

本発明の別の局面により、壁材料の表面上の局在化された発光エリアを有する壁材料を調

50

製するための方法を提供する。この方法は表面を有する壁材料を提供する工程、および少なくとも表面上の局在化された発光エリアを生成するように発光化合物をこの表面に適用する工程を包含し、ここで局在化されたエリアは発光検出用の標的領域を定義し、そしてこの標的領域は壁材料を介したチャンネルの縁である。1つの実施態様では、この方法はさらに光防護性化学基を壁材料の表面に付着する工程、発光化合物を付着する前に光防護性化学基に光を与えて、化学基を脱光防護する工程、およびこの脱光防護された化学基に発光化合物を付着する工程を包含する。

1つの実施態様では、光はチャンネルの縁を定義する壁材料の表面の選択された領域のみに適用される。好ましい実施態様では、光防護性化学基はチャンネルの縁を定義する壁材料の表面の選択された領域のみに付着される。別の実施態様では、チャンネルは第1末端および第2末端を有し、縁は第1末端にあり、ここで光は第2末端に適用され、この光はチャンネルを通過して、上記第1末端の縁において光防護化学基に接触する。チャンネルは好ましくはマイクロチャンネルである。より好ましい実施態様では、チャンネルはナノチャンネルである。

10

この方法は、壁材料の表面上に開口部を有するマスクを配置し、局在化された発光エリアのみがマスクの開口部を通して曝露されるさらなる工程を包含し得る。1つの実施態様では、発光化合物は壁材料の表面の一部に付着される。

本発明の別の局面により、信号を検出するための装置が提供される。この装置はバッファーチャンバを備えるハウジングであり、壁がバッファーチャンバの一部を定義し、そしてポリマーを配列するための複数の開口部、ハウジングに関して固定されたセンサ（このセンサはそれぞれの開口部において発せられる信号と開口部依存型センサ信号を発生する他の開口部において発せられる信号とを識別する）、および上記センサ信号の収集および保存用メモリを有する。好ましい実施態様では、センサは光学センサである。

20

1つの実施態様では、光学センサは複数の開口部において発せられる電磁放射線信号を認識する。別の実施態様では、装置はマイクロプロセッサを含む。

1つの実施態様では、開口部は壁内のチャンネルにより定義される。好ましくは開口部は壁内のマイクロチャンネルにより定義される。より好ましくは開口部は壁内のナノチャンネルにより定義される。1つの実施態様では、複数の開口部は少なくとも2つである。好ましい実施態様では、その数は少なくとも50である。

1つの実施態様では、装置は上記壁により、上記第1バッファーチャンバから分離した第2バッファーチャンバを備え、ここでバッファーチャンバは開口部を介して互いに流体連絡し合う。別の実施態様では、装置はハウジングに固定された一組の電極を備え、上記一組の内一つは第1バッファーチャンバに配置され、もう一方の電極は第2バッファーチャンバに配置される。

30

本発明の別の局面により、信号を検出するための装置が提供される。装置は第1バッファーチャンバおよび第2バッファーチャンバを定義するハウジング、ハウジングにより支持され第1および第2バッファーチャンバを分離する壁、この壁により定義され第1と第2バッファーチャンバとの間の流体連絡を提供する複数のチャンネル、ならびにチャンネル依存型信号の識別および収集用センサを備える。好ましくは、チャンネルはマイクロチャンネルである。より好ましくは、チャンネルはナノチャンネルである。1つの実施態様では、複数のチャンネルは少なくとも2つである。好ましい実施態様では、その数は少なくとも50である。好ましくは信号は光学信号である。

40

1つの実施態様では、チャンネルを包囲する壁は因子を含み、この因子は電磁放射線、クエンチング源および蛍光励起源からなる群より選択され、壁に付着している。好ましくは因子は電磁放射線であり、そしてこの電磁放射線は発光化合物である。1つの実施態様では、発光化合物は壁内のチャンネルに集中されている。

別の実施態様によると、装置はチャンネルを介して生物学的実体を移動するための手段を備える。

本発明の別の局面により、バッファーチャンバを備えたハウジング、バッファーチャンバの一部を定義する壁材料、ポリマー相互作用ステーションを含む壁、およびハウジングに

50

固定された光学センサを備える装置を提供し、この光学センサは相互作用ステーションにおいて発せられる電磁放射線信号を検出するように構築および配置される。

別の局面において本発明は、要求に応じて複数のポリマーの特性情報を利用可能にするためのコンピュータシステムである。このシステムは、複数のポリマーのための記憶用メモリ、およびプロセッサを有する。メモリはポリマー用の特有の識別子を使用してアクセス可能な様式で、連続的に検出される信号を表示する情報を含む記録を記憶し、この信号は複数のポリマーの個々のユニット、またはポリマーが曝露されるステーションにおいて検出可能な物理的変化から生じる。プロセッサは、複数のポリマーの内選択された一つについて、メモリ内に記憶された記録にアクセスするためのものであり、この選択されたポリマーに関連した特有の識別子によってアクセスする。

10

1つの実施態様では、信号は因子に曝露された複数のポリマーの個々のユニットの相互作用から生じ、この因子は電磁放射線、クエンチング源および蛍光励起源からなる群より選択される。別の実施態様ではコンピュータシステムはまた、選択されたポリマーの連続して検出される信号と、既知のポリマーに特徴的な信号の既知のパターンとを比較し、選択されたポリマーと既知のポリマーとの関連性を決定するための手段を含む。

本発明のそれぞれの制限は、本発明の多様な実施態様を包含し得る。従って、任意の1つの要素または要素の組合せを含む本発明のそれぞれの制限が、各装置および各方法に含まれ得ることが予期される。

【図面の簡単な説明】

図1は、ランダムな標識方法の概略図を示す。

20

図2は、瞬間率法 (instantaneous rate method) を介して距離情報を決定するための、エネルギー放出パターンにおける変化を示す生データのグラフである。連続した検出可能な信号 (プロットした場合に左から右への曲線を生む信号) から生じるエネルギーパターンの変化が、二つのエネルギー強度減少、続いて二つのエネルギー強度増加を示す。比率は 6.8A/s であり、 t_1 は第1および第2標識の流入間の時間である。

図3は、配列 $5'\text{ACGTACGTACGTACGT}'3$ を有する16マーのためのランダムなA-標識化フラグメントの代表的な集合を示し、またどのようにアクセプター標識化ヌクレオチド間の塩基の分離を決定するのに距離情報が使用されるかを示す。

図4は、ナノチャンネルプレートの多様な潜在的構成を示す概略図である。

図5は、放射活性ポリマーを分析するためのナノチャンネルプレートを示す概略図である。

30

図6は、ドナー発蛍光団の同心円状のリングを備えたナノチャンネルの断面の概略図、ならびに対応しているナノチャンネル上のドナー発光およびエネルギー移動を示すグラフである。

図7は、ナノチャンネルプレートのモデルを示し、このプレートはプレート内にドナー発蛍光団層を備えた多数のナノチャンネルを有する。図7Bは、伝導層に近接して配置された単一のアクセプターを備えた単一のナノチャンネルの拡大図を示す。

図8AおよびBは、ナノチャンネルを介したアクセプター標識の通過時の信号発生を示す概略図である。図8Aは、一つのナノチャンネルの拡大図を示す。図8Bは、アクセプター標識が位置Aから位置Cへと移動する際のドナー強度の鋭い変化を図式的に示す。

図9は、伝導材料間に挟まれたドナー発蛍光団の適切な厚みおよび半径を備えたナノチャンネルを介する、2塩基標識化DNA鎖の通過を概略的かつ図式的に示す。

40

図10は、一つおよび二つのアクセプター存在下でのドナー発光における変化を視覚的に示す体積 (volume) グラフである。図10Aは、体積としての変化量を示す。図10Bは、一つのアクセプターについての変化を示す。

図11は、DNAが、組立てられたナノチャンネルを通過し得ることを示す実験結果を示す。

図12は、電界の生成し得るナノチャンネル (またはマイクロチャンネル) プレートを保持するように構築された装置を示す。

図13は、ナノチャンネル装置を示し、この装置はナノチャンネルプレートを保持する二つの融解Pyrexセル、上部および下部バッファー領域、電極、液浸目標物および電源からなる

50

。

図14は、インピトロの塩基の特異的(I B S A)標識の概略図である。

図15は、I B S A標識からDNA配列を解読するための一般図を示す。

発明の詳細な説明

本発明は、ポリマーの少なくとも一つのユニットとステーションまたは因子(agent)との間の相互作用から生じる信号またはポリマー依存インパルスを検出することによって、あるいは、ユニットがステーションに曝されるときこのユニットあるいはステーションの変化によって、ポリマーあるいはポリマーのユニットを分析あるいは同定する方法を包含する。ポリマーを「分析する」ことは、ポリマーの大きさ、ポリマーのユニットの秩序、他のポリマーとの関連性、ユニットの同一性(identity)あるいは有無などの、ポリマー構造についてのいくつかの情報を得ることを意味する。生物学的分子の構造および作用は相互依存しているので、構造の情報はポリマーの作用についての重要な情報を明らかにし得る。

10

本発明による一つの方法は、各個々のユニットが因子と相互作用して検出可能な信号を生成するように、電磁放射線、クエンチ源(quenching source)および蛍光励起源から成るグループから選択された因子にポリマーの複数のユニットを曝することによって、結合ユニットのポリマーを分析するための方法である。相互作用から得られる信号は逐次的に検出される。

本明細書において用いられるように、ポリマーのユニットは、エネルギー移動、クエンチ、あるいはユニット、因子またはステーションの物理的变化がこれらの間で生じ得、それにより検出可能な信号が生じるように、ユニットおよび因子またはステーションを互いに相互作用近位(interactive proximity)に配置あるいは呈することによって、ポリマーのユニットは因子またはステーションに「曝される」。相互作用近位とは、検出可能な信号を生じさせる相互作用または変化を可能にするために、十分に近接していることを意味する。

20

一つの実施態様において、ポリマーのユニットは因子に逐次的に曝される。「逐次的に曝される」とは、概して、時間的に互いに分離されることを意味する。好ましい実施態様において、相互作用ステーションにある因子への相互作用近位内にポリマーの各ユニットが移動するように、ポリマーおよび因子は互いに関して「線形に」移動させられる。ポリマーの各ユニットが因子あるいはステーションと相互作用すると、検出可能な信号が生成される。この検出可能な信号は捕捉(逐次的に検出)され、検出装置によって記録され得る。各ユニットについて生成されるこの検出可能な信号は、ユニットのタイプを示すものであり得る。本明細書で用いられるように、一つのポリマーの異なるユニットからの信号が時間的に間隔をあけて検出されるときに、信号は「逐次的に」検出される。信号を「逐次的に」検出するために、全てのユニットが検出されるまたは信号を生成することが必要になるわけではない。

30

ユニットが因子またはステーションに逐次的に曝されると、ユニットと因子またはステーションとは互いに関連して移動する。本明細書において用いられるように、「ユニットと因子またはステーションとは互いに関連して移動する」という語句は、少なくともユニットと因子またはステーションとの間の相互作用の期間の間に、ユニットおよび因子またはステーションの両方が移動しているか、あるいはこれらの二つのうちの一つのみが移動し、他方は静止したままであるかのいずれかを意味する。ユニットおよび因子またはステーションは、任意の機構によって互いに関して移動し得る。例えば、因子またはステーションは静止したままであり得、ポリマーは電流によって引っ張られ、因子またはステーションを通過し得る。ポリマーを移動させるための他の方法は、磁界、機械力、流動液体媒体、加圧システム、重力、およびポリマーがDNAであるときは、例えばDNAポリメラーゼあるいはヘリカーゼ、あるいは例えばポリマーがアクチンなどのペプチドであるときはミオシンなどの分子モーター(motor)から得られる移動を含むが、これらに限定されない。ポリマーの移動は、ポリマーを導くためのチャネル、溝、または輪の使用によって補助され得る。あるいは、因子またはステーションが移動させられ、かつポリマーが静止していて

40

50

もよい。例えば、因子またはステーションは、ポリマーの長さに沿って導かれる走査チップ内に保持され得る。

別の実施態様において、信号は同時に検出される。本明細書で用いられるように、信号は、ポリマーの複数の標識されたユニットを因子またはステーションに同時に曝させることによって「同時に検出」される。複数のユニットは、複数の相互作用部位を用いることによって因子またはステーションに同時に曝され得る。信号は、これらの各部位で同時に検出され得る。例えば、複数の因子またはステーションが、ポリマーのユニットに対応する、空間内の特定の位置に配置され得る。ポリマーが複数の因子またはステーションの相互作用近位内に運ばれると、信号が同時に生成される。これは、例えば、ユニット間の距離に等しい実質的に同じ距離において配置された因子またはステーションの線形アレイに具

10

現化され得る。ポリマーは、各ユニットが因子またはステーションへの相互作用近位にあり、それにより同時信号を生成するように、因子またはステーションに対して配置され得る。信号が逐次的に検出されると、複数のポリマーも同時に分析され得る。複数のポリマーは、一つを超えるポリマーを各々の因子またはステーションに関して同時に移動させることによって同時に分析される。ポリマーは類似していても、あるいは異なってもよい。ポリマーが類似している場合は、同一のまたは異なるユニットが同時に検出され得る。少なくとも二つのポリマーが同時に分析されることが好ましい。より好ましい実施態様においては、少なくとも50個のポリマーが同時に分析され、別の好ましい実施態様においては、少なくとも100個のポリマーが同時に分析される。

20

本明細書で用いられる「ポリマー」は、結合によって互いに結合された個々のユニットの線形骨格を有する化合物である。ポリマーの骨格が枝分かれし得る場合もある。好ましくは、骨格は枝分かれていない。用語「骨格」は、高分子化学分野における通常の意味で与えられている。ポリマーは骨格組成が不均質 (heterogeneous) であり得、それによってペプチド - 核酸 (核酸に結合したアミノ酸を有し、安定性が強化されている) などの互いに連結したポリマーユニットの任意の可能な組み合わせを含む。好ましい実施態様において、ポリマーは骨格組成が均質 (homogeneous) であり、例えば、核酸、ポリペプチド、多糖、炭水化物、ポリウレタン、ポリカーボネート、ポリ尿素、ポリエチレンイミン、ポリアリーレンスルフィド、ポリシロキサン、ポリイミド、ポリアセテート、ポリアミド、ポリエステル、またはポリチオエステルである。最も好ましい実施態様において、ポリ

30

マーは核酸またはポリペプチドである。本明細書において用いられる「核酸」は、デオキシリボース核酸 (DNA) またはリボース核酸 (RNA) などのヌクレオチドからなる生体高分子である。本明細書において用いられるポリペプチドは、連結したアミノ酸からなる生体高分子である。ポリマーの連結されたユニットに対して本明細書において用いられるように、「結合された」または「結合」は、任意の物理化学的手段によって二つの実体が互いに結合されることを意味する。共有結合または非共有結合である、当業者に公知の任意の結合が含まれる。このような結合は当業者に周知である。特定のポリマーの個々のユニットを連結する、天然に (in nature) 通常見出される結合である天然結合は、最も一般的である。天然結合には、例えば、アミド、エステルおよびチオエステル結合が挙げられる。しかし、本発

40

明の方法によって分析されるポリマーの個々のユニットは、合成または修飾された結合によって結合され得る。ユニットが共有結合によって結合されているポリマーは最も一般的であるが、水素結合したポリマーなども含む。ポリマーは複数の個々のユニットから成る。本明細書で用いられる「個々のユニット」は、他の構成単位 (building block) またはモノマーに直接または間接的に結合し得、それによってポリマーを形成する構成単位またはモノマーである。ポリマーは好ましくは、少なくとも二つの異なる結合ユニットのポリマーである。これらの少なくとも二つの異なる結合ユニットは、以下でより詳細に論じるように、異なる信号を生成し得るか、または異なる信号を生成するために標識され得る。特定のタイプのユニットは、ポリマーのタイプに依存する。例えば、DNAは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、5-メチルシトシ

50

ン、2-アミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチンおよび他の天然および非天然核塩基 (nucleobase)、置換されたおよび置換されない芳香族部分 (moiety) などのプリンおよびピリミジンのユニットから構成されるデオキシリボースホスフェート骨格から成る生体高分子である。RNAは、DNAに関して記載したプリンおよびピリミジンなどのユニットから構成されるリボースホスフェート骨格から成る生体高分子であるが、ここで、チミジンウラシルはチミジンで置換されている。DNAユニットは、それらの5'または3'ヒドロキシル基によってポリマーの他のユニットに結合され得、それによってエステル結合を形成する。RNAユニットは、それらの5'、3'、または2'ヒドロキシル基によって、ポリマーの他のユニットに結合し得、それによってエステル結合を形成する。あるいは、末端5'、3'または2'アミノ基を有するDNAまたはRNAユニットは、アミノ基によってポリマーの他のユニットに結合し得、それによってアミド結合を形成する。ポリペプチドの個々のユニットは、20個の天然アミノ酸および修飾アミノ酸を含むアミノ酸である。アミノ酸はアミドまたは遊離酸として存在し得、このアミノ酸の -アミノ基を介してポリマーの骨格中で他のユニットに結合し、それによってポリマーへのアミド結合を形成する。

10

「複数の個々のユニット」は、互いに結合した少なくとも二つのユニットである。

核酸が文字配列によって表されるときは、ヌクレオチドは左から右に向かって5' 3'の順であり、特に注意がない限り、「A」はアデノシン、「C」はシチジン、「G」はグアノシン、「T」はチミジン、および「U」はウラシルを示すことが理解される。

ポリマーは、天然で生じたネイティブ (native) すなわち天然ポリマー、または天然に存在しない非天然ポリマーであり得る。ポリマーは代表的には、天然ポリマーの少なくとも一部を含む。ポリマーは、改めて (de novo) 単離あるいは合成され得る。例えば、ポリマーは、天然源から単離され得 (例えば、分割 (cleavage) およびゲル分離によって精製され得る) か、あるいは、合成され得る (例えば、(i) 例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によってインビトロで増幅、(ii) 例えば、化学合成によって合成、(iii) クローニングなどによって組換えられ生成され得る)。

20

ポリマーまたはポリマーの少なくとも一つのユニットは、因子またはステーションと相互作用して、この相互作用の信号特性を生成し得る形をとっている。このような相互作用に供され得るポリマーのユニットは、標識されていると称される。ポリマーのユニットがこの相互作用を受けて特有の信号を生成し得る場合、ポリマーは内在的に標識されていると称される。外在的な標識がポリマーに付加される必要はない。しかし、特有の信号を生成する相互作用を生じさせるために非天然 (non-native) 分子がポリマーの個々のユニットに付着されなければならない場合、ポリマーは外在的に標識されていると称される。「標識」は、例えば、発光、エネルギー受容 (energy accepting)、蛍光、放射性またはクエンチであり得る。

30

ポリマーの多くの天然ユニットは、発光化合物またはクエンチャー (quencher) である。例えば、ネイティブな (native) 核酸分子のヌクレオチドは、別個の吸収スペクトルを有し、例えば、A、G、T、CおよびUはそれぞれ259nm、252nm、267nm、271nmおよび258nmで吸収極大を有する。内在性標識を含む修飾ユニットもまた、ポリマー中に取り込まれ得る。核酸分子は、例えば、発光化合物またはクエンチ化合物の特性エネルギー放出パターンを有する任意の以下の修飾ヌクレオチドユニットを含み得る：2,4-ジチオウラシル、2,4-ジセレノウラシル (Diselenouracil)、ヒポキサンチン、メルカプトプリン、2-アミノプリン、およびセレノプリン。

40

外在性標識を付加することなく、発光、クエンチ、または放射性特性以外のユニットの特性がユニットの同一性についての情報を提供するときも、ユニットは内在的に標識されていると考えられ得る。例えば、ユニットの形状および電荷は、ユニットによるコンダクタンス経路の遮断から生じるコンダクタンスの変化などの、特定の特性信号をもたらし得るユニットについての情報を提供する。

外在性標識が本発明の方法による使用のために選択される場合、選択される外在性標識のタイプは、行われる分析の性質、因子のタイプおよびポリマーのタイプを含む様々な因子

50

に依存する。外在性標識化合物は、発光化合物、クエンチ化合物、放射性化合物、スピラベル、および重金属化合物を含むが、これらに限定されない。標識は、分析されるポリマーのユニットとステアリン相溶性 (stearically compatible) かつ化学的に相溶性であるべきである。

本明細書で用いられる「発光化合物」は、特定の波長の光の照射に応答して光を放射する化合物である。これらの化合物は、燐光、化学ルミネセンス、ルミネセンス、分極蛍光 (polarized fluorescence)、シンチレータ、またはより好ましくは、蛍光によって光を吸収および放射し得る。選択される特定の発光化合物は、以下でさらに詳細に述べられる様々な因子に依存する。発光化合物は文献に詳細にわたって記載されている。例えば、Haugland, R.P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 第六版, Molecular Probes, Inc., 1996は本明細書において参考として援用され、発光化合物の記載を提供する。

10

放射性化合物は、アルファ、ベータ、またはガンマ核放射線を放射する因子である。アルファ線は、質量数 4 の正に荷電した粒子で、電界および磁界によってわずかに偏向されている。ベータ線は負に荷電した電子で、電界および磁界によって大幅に偏向されている。ガンマ線は電磁放射線の光子であり、電界および磁界によって偏向されず、 10^{-8} から 10^{-9} cm オーダーの波長を有する。

概して、蛍光染料は、いくつかの共役二重結合の鎖を有する炭化水素分子である。染料の吸収波長および発光波長は、共役鎖中の炭素原子数にほぼ比例する。好ましい蛍光化合物は「Cy-3」(Biological Detection Systems, Pittsburgh, PA) である。本発明による有用な他の好ましい蛍光化合物は、イソチオシアン酸フルオレセイン (「FITC」)、テキサスレッド (Texas red)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (「TRITC」)、4,4ジフルオロ-4-ボラ-3a、および4a-ジアザ-s-インダセン (diaza-s-indacene) (「BODIPY」) を含むが、これらに限定されない。

20

化学ルミネセンス化合物は、化学反応によってルミネセンスを示す化合物である。燐光化合物は、放射の吸収の結果、遅延されたルミネセンスを示す化合物である。ルミネセンスは、励起の際の材料による電磁放射線の非熱放射である。これらの化合物は当該分野において周知であり、そして様々なドナー源から入手可能である。

本発明の一つの実施態様において、発光化合物は、ドナーまたはアクセプター発蛍光団 (fluorophore) である。本明細書で用いられる発蛍光団は、ある波長で光を吸収し、別の波長で光を放射し得る分子である。ドナー発蛍光団は、近接するアクセプター分子に蛍光エネルギーを送達し得る発蛍光団である。アクセプター発蛍光団は、近接するドナーからエネルギーを受容し得る発蛍光団である (ドナー発蛍光団のアクセプターは発蛍光団である必要はない。このアクセプターは非蛍光性であり得る)。発蛍光団は、光照射されることによって、励起状態またはより高エネルギーレベルに光化学的に促進され得る。励起波長は、概して、スペクトルの紫外、青色、または緑色領域にある。発蛍光団は、エネルギーを放出して基底状態に戻る前に、非常に短期間の間、励起状態に留まる。放射光としてエネルギーを散逸させるこれらの発蛍光団は、ドナー発蛍光団である。外部へ向かう光子の波長分布は発光スペクトルを形成し、これは励起スペクトルよりも長い波長 (より低いエネルギー) でピークを有するが、特定の発蛍光団については同様に特徴的である。

30

40

本発明の別の実施態様において、ユニットは放射性化合物で標識される。放射性化合物は、因子またはステーションを通過するときに核放射線を放射する。因子がシンチレーション層であるとき、核放射線はシンチレーション層と相互作用し、そして蛍光励起を引き起こす。次いで、放射性標識されたユニットを示す蛍光信号が検出され得る。

当該分野において公知の任意の手段によって、外在性標識がポリマーに付加され得る。例えば、標識はポリマーに直接付着されても、ポリマーに付着されたリンカーに付着されてもよい。例えば、発蛍光団は化学的手段によって核酸中に直接取り込まれるが、活性アミノまたはチオ基を介して核酸中に導入されてもいる。ProudnikovおよびMirabekov, Nucleic Acids Research, 24:4535-4532 (1996)。化学的に容易に誘導 (derivatize) され得るか、またはリンカーを含む修飾ユニットは、ポリマーに組み込まれ、この過程を促進さ

50

せ得る。生物共役 (bioconjugate) を行う (prepare) ためのポリマー、リンカー、および/または外在性標識に行われ得る修飾手順の詳細にわたる記載は、Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc., San Diego, 1996に見出され得、この文献は本明細書において参考として援用される。

DNAの直接化学標識にはいくつかの公知の方法がある (Hermanson, 1996; Rogetら, 1989; ProudnikovおよびMirzzbekov, 1996)。それらの方法の一つは、DNAの部分的デブリネーションによってアルデヒド基を導入することに基づく。付着されたヒドラジン基を有する蛍光標識はアルデヒド基と効率的に結合し、ナトリウム標識効率がおよそ60%に低減することによってヒドラゾン結合が安定化される。過剰のアミン発蛍光団の存在下でシトシンが亜硫酸水素塩と反応すると、N₄位でアミノ交換反応が生じる (Hermanson, 1996)。pH、アミン発蛍光団濃度、ならびにインキュベーション時間および温度などの反応条件は、形成される生成物の収率に影響を与える。アミン発蛍光団 (3M) が高濃度のときは、アミノ交換反応は収率100%に近づき得る (DraperおよびGold, 1980)。

発光化合物は、当該分野で公知の任意の機構によってポリマーまたは他の材料に付着され得る。例えば、様々な発光基と反応性である官能基には、(官能基: 発光化合物の反応性基) 活性化されたエステル: アミンまたはアニリン; アシルアジド: アミンまたはアニリン; ハロゲン化アシル: アミン、アニリン、アルコール、またはフェノール; アシルニトリル: アルコールまたはフェノール; アルデヒド: アミンまたはアニリン; ハロゲン化アルキル: アミン、アニリン、アルコール、フェノール、またはチオール; アルキルスルホネート: チオール、アルコール、またはフェノール; 無水物: アルコール、フェノール、アミン、またはアニリン; ハロゲン化アリール: チオール; アジリジン: チオールまたはチオエーテル; カルボン酸: アミン、アニリン、アルコール、またはハロゲン化アルキル; ジアゾアルカン: カルボン酸; エポキシド; チオール; ハロアセトアミド: チオール; ハロトリアジン: アミン、アニリン、またはフェノール; ヒドラジン: アルデヒドまたはケトン; ヒドロキシアミン: アルデヒドまたはケトン; イミドエステル: アミンまたはアニリン; イソシアナート: アミンまたはアニリン; およびイソチオシアナート: アミンまたはアニリンを含むが、これらに限定されない。

ポリマーのユニットと相互作用する因子は、電磁放射線、クエンチ源および蛍光励起源から成る群から選択される。本明細書で用いられる「電磁放射線」は、電磁波により生成されるエネルギーである。電磁放射線は、直接光源の形であっても、あるいはドナー発蛍光団などの発光化合物によって放射されてもよい。本明細書で用いられる「光」は、可視波長、赤外波長および紫外波長を含む任意の波長の電磁エネルギーを含む。

本明細書において用いられるように、クエンチ源は、発光源の特性を変えるまたは変え得る任意の実体である。変えられる特性には、強度蛍光寿命 (intensity fluorescence lifetime)、スペクトル、蛍光、または燐光が挙げられ得る。

本明細書で用いられる蛍光励起源は、蛍光を発し得るか、または光子放出を生じさせ得る任意の実体 (すなわち、電磁放射線、有向電界 (directed electric field)、温度、蛍光、放射、シンチレーション、物理的接触、または機械的破壊) である。例えば、ユニットが放射性化合物で標識されると、放射性放射は、シンチレーション層である因子の分子励起を生じさせ、その結果、蛍光を発する。

ポリマーのユニットが因子に曝されると、これら二つの間の相互作用が信号を発生させる。この信号は、ポリマーについての情報を提供する。例えば、タンパク質ポリマーの特定のタイプの全てのユニット (例えば、全てのアラニン) が、特定の発光化合物で標識 (内在的または外在的に) され、次いで、因子との相互作用の際にこの発光化合物の信号特性が検出されると、信号は、アラニン残基がポリマー上のその特定の位置に存在することを示す。各タイプのユニット (例えば、各タイプのアミノ酸) が、別個の発光パターンを有する異なる発光化合物で標識される場合、各アミノ酸は因子と相互作用して別個の信号を生成する。どの各信号がポリマーの各ユニットに対応しているかを決定することによって、ユニットの配列が決定され得る。

ユニットと因子との間の相互作用は様々な形をとり得るが、ユニットと因子が互いに物理

10

20

30

40

50

的に接触することを必要とはしない。相互作用の例は以下の通りである。第1のタイプの相互作用は、因子が電磁放射線であり、ポリマーのユニットが発光化合物（発光化合物を用いて内在的または外在的のいずれかで標識される）であることを伴う。発光ユニットが電磁放射線（適切な波長のレーザビームまたはドナー発光団から放射される電磁放射線によるなど）と接触させられると、電磁放射線は、発光化合物に、特定の波長の電磁放射線を放射させる。次いで、信号が測定される。信号は発光の特性パターンを示し、従って、ポリマーの特定の標識されたユニットが存在することを示す。この場合、ポリマーのユニットは「発光化合物からの電磁放射線の放射に検出可能に影響を与える」と称される。第2のタイプの相互作用は、因子が発光励起源であり、ポリマーのユニットが発光化合物または放射性化合物であることを伴う。発光ユニットが発光励起源と接触させられると、
10 発光励起源は発光化合物に特定の波長の電磁放射線を放射させる。放射性ユニットが発光励起源と接触させられると、ユニットから放射される核放射線は発光励起源に特定の波長の電磁放射線を放射させる。次いで、信号が測定される。

これらのタイプの相互作用の変形例は、相互作用の第3の要素である、信号の発生に関連する近似化合物（proximate compound）の存在を伴う。例えば、ユニットは、ドナー発光団である発光化合物で標識され得、近似化合物はアクセプター発光団であり得る。発光化合物が励起状態におかれ、アクセプター発光団に近接させられた場合、エネルギー移動がドナーとアクセプターとの間に生じ、発光性であるユニットの有無の測定として検出され得る信号を生成する。発光化合物は、光（レーザビームなど）に曝されることによって、または発光励起源に曝されることによって「励起」状態におかれ得る。
20

別の相互作用は、クエンチ源である近似化合物を伴う。この例においては、発光ユニットは、露光されることによって電磁放射線を放射させられる。発光化合物がクエンチ源に近接して配置される場合、発光ユニットからの信号は変化される。

上記の相互作用に平行した相互作用の組が考案され得るが、ここでは、発光化合物は近似化合物であり、ユニットはクエンチ源かあるいはアクセプター源のいずれかである。これらの場合において、因子は近似化合物によって放射される電磁放射線であり、ユニットを近似化合物との相互作用近位に移動させることによって、ユニットとこのような放射線との間の相互作用の特性を示す信号が生成される。

これらの各相互作用が検出可能な信号を生成する機構は、当該技術において公知である。例示の目的のために、本発明によってドナーとアクセプター発光団が相互作用し検出可能な信号を生成する機構（このタイプの相互作用から生じることが公知である実施上の制限を含む）およびこのような制限を減少または無くする方法を、以下に記載する。
30

好ましい実施態様において、ユニットと因子との間の相互作用によって生じる信号は、発光団間の蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）から生じる。ユニットまたは近似化合物/因子のいずれかが、ドナー発光団またはアクセプター発光団のいずれかで標識され得る。FRETは発光団間の光子エネルギー移動である。FRETは、10 ~ 100 だけ離れた二つの点の間の距離を測定する能力のために、分子の詳細な特徴付けにおけるツールとしての将来性がある。FRETのオングストローム分解（resolution）は、分子動力学および生物物理学的現象の多くの研究において用いられている（概説のために、Clegg、1995；Clegg、1992；Selvin、1995；およびWuおよびBrand、1994を参照のこと）。ドナー発光団とアクセプター発光団との間のエネルギー移動がプローブ間の距離のマイナス六乗（inverse sixth power）に依存するために、FRETの分解能は上昇する。実施上は、この分解能はほぼ、最も高い解像度の電子顕微鏡の分解能の大きさよりも良好な大きさである。
40

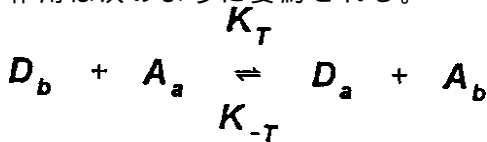
FRETを受けるためには、ドナーの放射スペクトルはアクセプターの励起スペクトルと重畳する。ポリマーのユニットは、アクセプター発光団で特異的に標識される。因子はドナー発光団である。レーザはドナー発光団の励起波長に合わせられる。ポリマーがチャネルを通して移動すると、ドナー発光団はその特性波長を放射する。アクセプター発光団がドナー発光団との相互作用近位に移動すると、アクセプター発光団はドナー発光団からのエネルギーによって励起される。この相互作用の結果、ドナー発光団の放射はクエンチされ、アクセプター発光団の放射は強化される。
50

検出のために最適な有効 (efficient) FRET信号を生成させるためには、二つの条件が満たされるべきである。第1の条件は、アクセプターの非存在下での有効なドナー放射である。第2の条件は、FRETの間にドナー放射またはアクセプター放射のいずれかに変化を有効に生じさせることである。

モデルシステムにおいて、ドナー発蛍光団およびアクセプター発蛍光団の両方が、光子放出を無期限に (indefinitely) 生じさせ得る。このような状況において、エネルギー移動の間には、ドナー放射の減少はアクセプター放射の増加に等しい。言い換えれば、放射変化はドナーおよびアクセプターの両方について同一である。これは、ドナー放射クエンチ事象の度に、それと等しくかつ逆のアクセプター放射事象が存在するためである。Cantor および Schimmel, 1980は、このモデルシステムの直感的な概要を呈示している。ドナーおよびアクセプターの、二つの発蛍光団のシステムを考える。

Förster

距離内の範囲で、非常に弱いカップリングが生じる。ドナーとアクセプターとの間の相互作用は次のように要約される。



ここで、 D_0 および A_0 は基底一重項状態であり、 D_b および A_b は第1の励起一重項状態である。 k_T および k_{-T} は、エネルギー移動の前進速度および後進速度である。上記の反応は、第1の励起状態にある所与のドナーについての反応を示し、基底状態 D_0 に達するまでに内部変換によって急速にエネルギーを失う。アクセプター吸収エネルギーはドナー発光エネルギーと重なるので、非常に弱いカップリングが生じ、共鳴エネルギーの移動を起こさせ得る。

共鳴エネルギー移動の結果、ドナー (D_b) およびアクセプター (A_b) の両方が励起振動状態になる。振動緩和は、ドナーおよびアクセプターを迅速にそれぞれの基底振動レベルにする。振動緩和は非常に効率的であり、励起振動状態の平均寿命は約 10^{-15} 秒しかない (Skoogら, 1992)。一方、蛍光分子についての内部変換は、約 10^{-9} 秒である。これらの速度の違いは、 k_T が非常に効率的であっても、逆反応 (k_{-T}) は起こりにくいことを示している。従って、この理想システムにおいて、励起されたドナーおよびアクセプターの相対的な母集団のずれがある。

上記の分析は、単一のドナーおよび単一のアクセプターを用いるシステムを記載する。同じタイプの相互作用が、多数のドナーと一つのアクセプターとを用いるシステムで行われ得る。アクセプターが基底一重項状態 (A_0) にあるときは常に、エネルギー移動が生じ得る。これは、1ナノ秒の寿命を有するアクセプターについては、 1×10^9 回毎秒 (これは、標準照射下のドナーの励起率 (約25000回励起/秒) と比較すると、非常に高い速度である) で励起され得ることを意味する。アクセプターが受け得る励起の最大数は、一つのドナー発蛍光団が受け得る励起最大数よりも大幅に大きいので、複数のドナーが一つのアクセプターにエネルギーを移動し得る。

アクセプターのより高いエネルギーレベル (A_x) への励起およびそれと同時のドナー下方遷移 (de-excitation) 事象は、複数のドナーおよび一つのアクセプターを用いるシステム中で生じる信号の妨害をもたらす可能性のある問題であると考えられ得るが、この場合には当てはまらないことを以下の分析は示している。より高いエネルギーレベルへの励起およびそれと同時のドナー下方遷移事象の信号発生への妨害が生じるとは思わない。

より高いレベルへのアクセプター励起は、アクセプターの第1の一重項状態 (A_0) からアクセプターのより高い一重項状態 (A_x) へのさらなる励起が理論的にはあり得ることを意味する。これが実際に可能である場合、有効寿命が短くなるために、所与の時間内の励起事象の最大数は増加する。アクセプターはエネルギー移動を受けるために下方遷移を行う必要はもはやなくなるので、より短い有効寿命が生じる。アクセプターにおけるこのような遷移は、遷移のためのアクセプター吸収エネルギーがドナー放出エネルギーに一致する

10

20

30

40

50

場合のみ起こり得るが、これは大多数の分子には概して当てはまらない。その結果、ドナーとアクセプターとの間のエネルギー移動は、アクセプターが基底一重項状態にあるときにのみ起こり得る。

同時にドナー下方遷移が生じる場合には、ドナーのうちの一つのみがアクセプターにエネルギーを移動し得る。これは、他方のドナーがクエンチされず、放射的に発光することを意味する。同時の事象が頻繁に生じる場合は、ドナーの一部が光子を放出し得るために、複数のドナーのクエンチについての上記のシナリオ (scenario) はそれほど正確なものではなくなる。以下の確率計算は、このような事象が統計的にめったに起こらないものであることを示し、複数のドナーのクエンチの使用を支持する。

1 ナノ秒中に k 回の同時ドナー放射が生じる確率であり、ここで $n = P_{n,k} = (P_k) ({}_nC_k)$ (10)
) は発蛍光団の数である。

エネルギー移動を受け得ない

ドナー放射の回数

$$= (2-1)P_{n,2}t = (3-1)P_{n,3}t + \dots + (n-1)P_{n,n}t = \sum_{k=2}^{n-1} (k-1)P_{n,k}t$$

これらの計算の目的は、所与の量の時間についての同時ドナー下方遷移事象の回数を算出することである。重畳する事象の数が増加するに従って、ドナーエネルギー移動のパーセンテージが低くなるので、この回数は重要である。例えば、四つの発蛍光団について ($n = 4$; すなわち、 $P_{n,k} = P_{4,2}$) 1 ナノ秒中に同時に生じる二つのドナー放射 ($k = 2$) の確率を見出すことが可能である。本例において、各発光は 1 ナノ秒間続き、格子 (grid) 中に青色円として表される。さらに、各発蛍光団は平均で 25000 フォトン / 秒をランダム (20)
に放射する。変数は、 n = 発蛍光団の数、 k = 同時ドナー放射の回数、 P = 確率、 C = 組み合わせ、および t = 時間として定義される。 n 個の発蛍光団について 1 ナノ秒中に生じる k 個の同時事象 ($P_{n,k}$) についての確率は、 n 個の発蛍光団について k 個の同時事象が生じ得る可能な組み合わせの数 (${}_nC_k$) によって乗算された k 個の同時事象についての確率 (P_k) と等しい。同時事象の総数は、同時事象の全ての可能な値についての確率の合計として与えられる。これは、(事象数) / ナノ秒のユニットで確率を与える。従って、同時発光を経る発蛍光団の総数は、所与の時間 (t) によって乗算された、1 ナノ秒についての確率である。所与の時間 (t) 内の二回を超えるドナー放射 ($P_{4,3}$ および $P_{4,4}$) の確率を考慮することもまた必要である。この情報から、同時に生じる下方遷移のためにエネルギー移動を受け得ないドナー発蛍光団の数が導き出され得る。 (30)

四つの発蛍光団についての 1 ナノ秒間の二回の同時ドナー放射の確率は、

$$P_{n,k} = P_{4,2} = (P_k)({}_nC_k) = P_k \frac{n!}{k!(n-k)!} = \left(\frac{25000}{10^9}\right)^2 \left(\frac{4!}{2!2!}\right) = 3.75 \times 10^{-9}$$

として与えられる。

1 ナノ秒が一回の放射を含む確率は $25000 / 10^9$ である。同一のナノ秒内に二回の放射が生じる確率は二乗 ($25000 / 10^9$)² である。四つの異なる発蛍光団があるので、同時放射を生じさせる六つの異なる可能な組み合わせがある ($4! / 2! 2!$)。乗算されたこれらの値は、 3.75×10^{-9} 事象 / ナノ秒を与える。 10^9 ナノ秒で乗算されたこの値は、3.75 事象 / 秒を生じさせる。この場合、1 事象毎に二回の放射があり ($k = 2$)、これらのうちの (30)
一つ ($k - 1$) はエネルギー移動を受け得ないので、FRET を受けないドナー放射の総数は 3.75 事象 / 秒となる。

上記の単純な計算は、より多くの発蛍光団を用いるシステムにも適用され得る。この場合、1000 個の発蛍光団を考える ($n = 1000$)。同様な方法で、 $P_{1000,2}$ が計算され、 3.122×10^{-4} 事象 / ナノ秒となる。エネルギー移動を受け得ないドナー放射の回数は 3.122×10^5 である。三回の同時ドナー放射が生じ得る場合もある。これらの事象 ($P_{1000,3}$) についての確率が次のように計算される。

$$= \left(\frac{25000}{10^9}\right)^3 \left(\frac{1000!}{3!997!}\right) = 2.596 \times 10^{-6}$$

生じ得ないドナー放射の回数は $(3-1)(10^9)(2.596 \times 10^{-6})$ 、すなわち、 5.192×10^3 である。同様な方法で、四回あるいはそれを超える回数の同時放射についての計算が、エネルギー移動を受け得ないドナー発蛍光団の正味数に含まれる必要がある。この数は、以下の方程式によって表される。

$$= (2-1)P_{n,2}t = (3-1)P_{n,3}t + \dots + (n-1)P_{n,n}t = \sum_{k=2}^{k=n} (k-1)P_{n,k}t$$

上記の加法を解くと、エネルギー移動を受けない 3.174×10^5 回のドナー発蛍光団が得られる。ドナー放射は、以下の値から算出される：発蛍光団 1 つにつき 25000 光子 / 秒、1000 個の発蛍光団、および 1 秒の時間間隔。これは、 2.5×10^7 個の光子が一秒毎に放出されることを意味する。結論は、ドナー事象の 98.7% がエネルギー移動を受け得る。

複数のドナー / 単一のアクセプターの系の上記の論考から出される結論は、一つのアクセプターが、複数のドナーとのエネルギー移動を受け得るということである。考慮される制限は、より高いエネルギーレベルにアクセプターを励起する能力、そしてまた同時ドナー下方遷移の制限である。同時に生じるドナー放射において、一つの下方向遷移のみがアクセプターとのエネルギー移動を受け得る。これが頻繁に生じる場合は、アクセプターは全てのドナー放射事象とのエネルギー移動を受け得ない。確率計算は、標準エビ照射 (epiillumination) 条件下では 1000 個のドナー / 1 つのアクセプターの系について、98.7% のドナー放射事象がアクセプターとのエネルギー移動を受け得ることを示す。これらの詳細な分析から得られる包括的な結論は、複数ドナー系 / 単一アクセプター系が実際に存在し、一つのアクセプターが多数のドナー分子とのエネルギー移動を受け得ることである。

以下の記載は、複数ドナー / 単一アクセプター系のドナーおよびアクセプター発蛍光団について、条件がどのように最適化され得るかを示す。系を最適化するためには、この系が実際に行われたときに生じ得る二つの潜在的な問題が考慮されるべきである。フォトブリーチング (photobleaching) および溶媒クエンチの問題がある (Rost, 1990; Menterら、1978; Giloh および Sedat, 1982; Vaughan および Weber, 1970; Guilbault, 1973; Udenfriend, 1962; Pringsheim, 1963)。これらの影響により、発蛍光団が経験し得る励起サイクルの数が制限され得る。理想的なシステムにおいては発蛍光団は無数の励起サイクルを経験し得るのに対して、実施上はサイクルの実際数は、溶媒条件および励起光の強度の両方に依存して有限数に制限される。しかし、複数ドナー / 単一アクセプター系において生じる信号は、特定の実験条件下で最適化され得る。

有効な信号を最適化しそして生成するための理論は以下の通りである。原理は、モデル条件ができる限り近くシミュレートされる限り信号は生成される、というものである。理想的な発蛍光団は、無限の励起サイクルを経験し得ることを想起されたい。現実の発蛍光団が同様の様式で挙動する場合、光子放射の一時的な統合 (integration) が十分である限り、任意の数の発蛍光団が検出され得る。理想条件に近く達成するための一つの方法は、固体媒体中に発蛍光団を固定することによる。固体媒体中に発蛍光団を埋め込むことによって、フォトブリーチングおよびクエンチングの両方が無くなり得 (Haughland, 1996; Garland および Moore, 1979; Rost, 1991)、そして特定のタイプの発蛍光団 (植物細胞壁中のフェルラ酸、ウラニルガラス、およびアクリフラビンなど) が特に安定である (Rost, 1991)。これによって、可能な励起サイクル数が飛躍的に増加する。固体媒体中に埋め込まれているにもかかわらず、ドナー発蛍光団は数時間の間、蛍光信号を生成し得 (Rost, 1991)、アクセプターでの FRET もまだ受け得 (Stryer, 1978; Cantor および Schimmel, 1980)、およびその逆もあり得る。さらに、アクセプターは、溶媒条件において数時間ドナーとの共鳴エネルギー移動を受け得ることが公知である (Wittwer, 1997; Lee ら、1994; Uchiyama ら、1996; Livak ら、1997)。安定な信号を有するドナーをクエンチするアクセプターの能力は、非常に有効な信号を生成する能力となる。

溶媒条件において延長された時間の間、アクセプターがドナーとのエネルギー移動を受け得ることが示されている (Wittwer, 1997; Lee ら、1994; Uchiyama ら、1996; Livak ら、1997)。証拠は、ペプチドで行われた実験および核酸切断アッセイから得られる。これら

10

20

30

40

50

のアッセイにおいて、特定の基質がいずれかの端部で、ドナー発蛍光団およびアクセプター発蛍光団で標識される。基質の長さは、ドナー - アクセプター対の Förster

距離の範囲内であるので、ドナーの蛍光はクエンチされる。ドナー蛍光を監視することによって、切断の光ベースのアッセイが可能になる。このように、ドナー蛍光の増加は、特定の酵素の切断活性に正比例する。通常、蛍光定量切断アッセイと称されるこのタイプのアッセイは、HIVプロテアーゼ (Matayoshiら、1990; TothおよびMarshall、1990)、中性プロテアーゼ (Ngら、1989)、EcoRV制限エンドヌクレアーゼ (ErskineおよびHalford、1994)、PaeR7エンドヌクレアーゼ (Ghoshら、1994)、DNAポリメラーゼI 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性 (Wittwerら、1997; Livak、1997)、サーモリシン (thermolysin) (Yan 10 gおよびVan Wart、1994)、およびパパイン (Garcia-EcheverriaおよびRich、1992) を含む、多くの系の研究に用いられている。これらの実験の関連は、アクセプターが、延長された時間の間、ドナーをクエンチし得るという証拠を含んでいるので重要である。蛍光定量切断アッセイにおける制御は、実験の継続時間の間、切断されていない基質を (切断酵素の非存在下で) 監視することを含む。特に長い実験については、これらの制御は延長された時間にわたって監視される必要がある。これらの制御においてドナー蛍光が増加しないことは、アクセプターがドナーを長時間クエンチし得ることを直接示す。

アクセプターのエネルギー状態は変わらないままであるので、アクセプターは延長された時間の間にエネルギーを移動する能力を維持する。アクセプター吸収エネルギーがドナー放射エネルギーと一致するときに、エネルギー移動が生じる。エネルギー移動の結果、基底一重項状態 (A_0) から励起一重項状態 (A_1) への変換が起こる。アクセプターは、蛍光または非放射のいずれかである内部変換によりエネルギーを失う。上記の研究は、非理想的な実験条件にもかかわらず、アクセプターは相対的なエネルギーレベル、すなわち、エネルギー移動を受ける能力を維持することを示している。 20

溶液中で発蛍光団が概して受ける励起サイクル数は、およそ35,000サイクルである (Rost、1991)。しかし、溶液中の発蛍光団励起サイクル数は、酸素クエンチ、衝突クエンチ、および励起状態反応などの上記の溶媒効果 (solvent effect) によって制限される。溶媒条件は、励起サイクル数が最適化されるように調整され得る (Haughland、1996)。様々な化学的方法が、アクセプター蛍光の検出のための条件を最適化するために用いられる。アジ化ナトリウム (NaN_3)、ヨウ化ナトリウム (NaI)、ジチオスレイトール (DTT)、ジチオエリスリトール (DTE)、ジチオン酸塩ナトリウム、n - プロピル没食子酸塩、アスコルビン酸、およびポリビニルアルコール (PVA) は、全てが様々な発蛍光団と有効であることが見出されている 30

(Böckら、1985; Johnsonら、1982; PiccioloおよびKaplan、1984; Gill、1979; GilohおよびSedat、1982; ValnesおよびBrandtzaeg、1985)。

-メルカプトエタノール、ニトロプルシドナトリウム、および電子ドナーおよびSH基を有する分子の取り込みも有効であることが見出されている (FranklinおよびFilion、1985; SpatzおよびGrabig、1983; HamadaおよびFujita、1983)。さらに、溶液発蛍光団退色を減少させるための市販の試薬も利用可能である。SlowFade (Molecular Probes、OR) 調合物によって、フルオレセインの退色率はほぼゼロに減少する。フルオレセインからのほぼ一定の放射強度を提供するので、SlowFade試薬は、励起強度が極大になり長くなり得る、定量測定および共焦点レーザ走査顕微鏡を用いる用途に特に有用である。提案された最適化条件下のシステムについては、アクセプターがある状態での初期ドナー放射およびドナー放射の変化は、理想的条件の効率と近い効率を有する。 40

本明細書で用いられる「検出可能な信号」は、従来の技術によって検知され得る任意のタイプの信号である。生成される信号は、因子またはステーションのタイプ、ならびにユニットおよび存在する場合は近似化合物に依存する。一つの実施態様において、信号は、ポリマーの標識された (内在的または外在的) ユニットによる、または近似化合物による発光から生じる電磁放射線である。別の実施態様において、信号は、放射性放射のシンチレ 50

ーション層との相互作用から生じる蛍光である。検出された信号は、分析のためにデータベースに保存され得る。保存された信号を分析するための一つの方法は、保存された信号を別のポリマーからの信号のパターンと比較して、二つのポリマーの関連性を決定することによる。検出された信号の分析のための別の方法は、検出される信号を公知のポリマーの特徴を示す信号の公知のパターンと比較し、分析されるポリマーの公知のポリマーに対する関連性を決定することによる。信号の比較は、以下でより詳細に論じられる。

一つを超える検出可能な信号が検出され得る。例えば、第1の個々のユニットは因子またはステーションと相互作用し、第1の検出可能な信号を生成し得、第2の個々のユニットは因子またはステーションと相互作用し、第1の検出可能な信号とは異なる第2の検出可能な信号を生成し得る。これによって、一つを超えるタイプのユニットが、一つのポリマー上で検出されることが可能になる。

10

検出可能な信号はステーションで生成される。本明細書で用いられる「ステーション」は、信号またはポリマー依存性インパルスを生成するために、検出されるべきポリマーの一部（例えばユニット）が曝される領域である。ステーションは、気体を含む任意の材料から構成され得る。好ましくは、ステーションは非液体材料である。「非液体」は、当該分野における通常の意味を有する。液体は、構成分子間での自由運動を行うが、分離する傾向がないことによって特徴付けられる非固体、非気体材料である。別の好ましい実施態様において、ステーションは固体材料である。一つの実施態様において、ユニットが因子と相互作用するとき、ステーションは相互作用ステーションである。ステーションは信号発生ステーションでもあり得、これは以下でより詳細に記載する。本明細書において用いられるように、「相互作用ステーションまたは部位」は、ポリマーのユニットおよび因子が互いに対して十分に近接して配置され得、それによってそれらが相互作用し得る領域である。例えば、発蛍光団のための相互作用ステーションは、エネルギー的に相互作用して、信号を生成するように、発蛍光団が十分に近接している領域である。

20

好ましい実施態様において相互作用ステーションは、チャンネルを形成する壁に付着したアクセプター発蛍光団などの局在化された因子が、チャンネルを通過するポリマーと相互作用し得るナノチャンネルの領域である。ポリマーが因子の局在化された領域を通過する位置は、相互作用ステーションである。ポリマーの各標識されたユニットが因子を通過すると、検出可能な信号が生成される。因子は、チャンネルの領域内に様々な方法で局在化され得る。例えば、因子は、チャンネルの壁を形成する材料中に埋め込まれても、あるいは壁材料の表面に付着されてもよい。あるいは、因子は、チャンネルから距離をおいて配置されるが、導波路を介してチャンネルの領域に直接光を運び得る光源であり得る。複数のポリマーが複数のチャンネルを介して運ばれる装置も用いられ得る。本発明のこれらの実施態様および他の関連する実施態様が、以下でより詳細に論じられる。ポリマーの移動は、ポリマーを導くための溝またはリングの使用によって補助され得る。

30

相互作用ステーションを形成するための他の配置が、本発明によって包含される。例えば、ポリマーは、壁の表面につながるか、または壁に埋め込まれた分子モータを介して通過させられ得、それによって特定の位置に、好ましくは、近似因子への相互作用近位に、ポリマーのユニットを逐次的に移動させ、それによって相互作用ステーションを規定する。分子モータは、ポリメラーゼ、ヘリカーゼ(helicase)、またはアクチンなどの化合物であり、これらはポリマーと相互作用して各ユニットを通過してポリマーの長さに沿って運ばれる。同様に、ポリマーは移動しないように保持され得、リーダー(reader)はポリマーに沿って移動され得、リーダーはそれに取り付けられた因子を有する。例えば、因子は、ポリマーの長さに沿って導かれる走査チップ内に保持され得る。次いで、因子がポリマーの各ユニットへの相互作用近位に移動されると、相互作用ステーションが形成される。

40

一旦信号が生成されると、次いで、この信号は検出され得る。特定のタイプの検出手段は、ユニットと因子との間に生じる相互作用のタイプに依存することが明らかである生成された信号のタイプに依存する。本発明の方法に關与する多くの相互作用が、電磁放射線信号を生じる。二次元、および三次元イメージングシステムを含む電磁放射線信号を検出す

50

るための多くの方法が、当該分野において公知である。

近年、生物学的システムにおいて蛍光を画像化するための三次元画像化システムが記載されている。Dicksonらは、ゲル中の細孔中の単一分子 (single molecule) の三次元画像化を記載した。Dicksonら、Science、274:966-969 (1996)。Dicksonらは、単一蛍光分子のブラウン運動での制限された環境の影響を検討している。自由蛍光染料およびタンパク質に結合した蛍光染料の単一分子は、ポリアクリルアミド (PAA) ゲル中に捕捉される。ナイルレッドが、2 nmオーダーの細孔を有するポリアクリルアミドゲル中に取り込まれる。蛍光体ゲルは、内部全反射 (TIR) によって生成される消失性 (evanescent) 波で励起されて、ゲルの細孔内の単一分子の移動または静止を検出する。TIR方法は、励起強度中の指数的低下 (exponential fall-off) を用いることによって細孔中の分子についての三次元情報を生成し、界面からの蛍光体の距離を決定する。観察された運動と理論上のブラウン運動との間の不一致は、両方の場合によって調査される。自由蛍光体についてのブラウン運動は、 10^4 の因数で減少される。標識されたタンパク質は、空間で完全に静止したままであった。直接的な類似によって、ナノチャネルの空間制限は、ナノチャネルFRET配列における標識されたDNAのブラウン運動を制限するか、あるいは無くするべきである。これによって、ナノチャネルを通るDNAの安定した予測可能な通過が可能になる。

本発明の方法による有用な顕微鏡システムの一例は、Ishijimaら、Cell、92:161-171 (1998) に与えられる。

二次元画像化システムは、他のパラメータの中でも低ノイズ、高量子効率、適切な画素対画像相関、および有効な処理時間を有するために重要である。信号を検出するために有用な装置の一例は、蛍光波長範囲内の電磁放射線を検出する二次元蛍光画像化システムである。

測定される蛍光信号のタイプ、強度、寿命またはスペクトルのいずれかに基づく蛍光画像化装置の三つのカテゴリーが存在する。強度信号は、電荷結合素子 (CCD) カメラ、ストリークカメラ、およびシリコンダイオードアレイを含む様々な方法で捕獲され得る。これらの方法のうち、最も一般的であるのはCCDカメラであり、これは商業上の用途が広いためである。ストリークカメラは、フェムト秒までの優れた時間解像度を提供する。シリコンダイオードアレイは、優れたダイナミックレンジ、信号対ノイズ比、および時間解像度 (1000 / 秒の共通フレーム速度) を有するが、画素が大きい (CCDは $20 \mu\text{M} \times 20 \mu\text{M}$ であるのに対して、 $25 \mu\text{M} \times 500 \mu\text{M}$)。各装置が本発明の方法と共に用いられ得るが、CCDカメラが好ましい。

寿命およびスペクトル画像化は、ゲート画像増強装置、パルス化レーザ、およびCCDカメラを含む機器の組み合わせを用いて行われる。寿命関連技術である時間ゲート法は、背景および自己蛍光から蛍光信号を一時的に区別する工程を伴う。本明細書で参考として援用されるPeriasamyらは、臨床画像化のための時間ゲート蛍光顕微鏡の概説を提供する。Periasamyら、Microscopy and Analysis、33-35 (1995)。寿命画像化は、蛍光寿命を決定するために時間ゲートまたは位相変調技術を用いる。スペクトル画像化は、各画素での発光スペクトルを決定する。時間ゲートおよび寿命画像化技術は、より良好な信号対ノイズ比およびより大きい染料特異性などの多くの利点を単純なCCD画像化に提供し、従って、本発明の検出方法にとって好ましい装置でもある。

画像化技術の第1のタイプである強度画像化は、強度信号を独立して捕捉するためのCCDカメラまたはICCDカメラの使用を概して伴う。これは単純であるために、本発明の方法による信号検出のための所望の方法である。CCDカメラおよびICCDカメラは、多くの供給者 (すなわち、Photometrics、Hamamatsu、Princeton Instruments) から容易に購入され得る。

CCDは、フォトン相互作用によって生成される電子電荷を保持し得る、画素と称される多数の光感知素子を有する二次元シリコンマトリクスである。CCDをフォトン蛍光発光に曝すと、個々の画素中に電荷が増加する。露光が完了すると、蓄積された電荷の全ての列が、シリアルCCDレジスタに向かって運ばれる。シリアルレジスタ中では、個々の画素電荷パケットは、電荷量に比例する信号を生成する読出し増幅器に運ばれる。二次元の一連の

10

20

30

40

50

信号への画像が首尾よく変換されるまで、CCDの各列は同様に読み出される。CCDとシリアルCCDレジスタとの間の電荷伝送は非常に有効である（99.9999%有効）。出力増幅器は測定されたアナログ信号に対して線形応答を生成し、画像は8ビットと16ビットとの間でデジタル化される。

画像の読出しの際には、CCDカメラが画像を改変するために通常用いる二つのオプションがある。サブアレイ読出しとピンニング（binning）、または電荷グループ化である。プログラムされたCCDカメラは、目的となる規定された領域内で画素を選択的に処理し得る。目的となる領域を規定することの利点は、これによって画像読出しがより高速に生じ得ることである。各画素を処理するためおよびデジタル化するための時間は固定され、その結果、所望の領域が小さくなると、より高速なフレーム速度が可能になる。サブアレイ読出しからより小さい領域が可能になる。例えば、1024×1024画素CCD内の100×100画素が、1 MHzの画素読出し周波数で、100フレーム/秒のフレーム速度で読み出され得る。一方、より高速な読出し時間のために小さい方の画素を一つの有効なより大きい画素に組み合わせるピンニングによって、いくつかの画素からの電荷の組み合わせが可能になる。ピンニングの間、CCDは、ダイナミックレンジを増大させ、フレーム速度を高くするために低い解像度で動作する。ダイナミックレンジは、CCDが線形に検出し得る最も大きい信号の基礎読出しノイズに対する比である。例えば、4×4にピンニングされた1024×1024画素CCDは、ピンニングされていない画素よりも実質的に16倍の大きさの大きい画素を有する256×256画像を生成する。画像は、この速度の16倍でも読み出される。CCDの特定の動作モードは、カメラの構成要素およびホストコンピュータによって指示される。

CCDの制御を理解するために、論じられる必要がある代表的なCCDの三つの構成要素があり、それにはカメラコントローラー、電子ユニット、およびカメラヘッドを含む。コントローラーは、ホストコンピュータとカメラとの間の入力および出力の媒介プロセッサとして働く。コントローラーは、あるホスト命令が出されるとカメラを働かせるロジックを含む。さらに、コントローラーは、デジタル化された画素データをコンピュータに中継する。内部では、コントローラーは、CCD位相の調整およびアナログ処理ユニットのタイミングのために必要なシーケンスを有する。電子ユニットは、デジタル命令を活性なクロック信号およびシーケンスに変換する。さらに、ユニットはA/D変換器を含む。8ビットから16ビットへのディジタイザが、一般的には用いられる。カメラヘッドはCCDを含み、冷却装置を含むことも多い。液体窒素またはペルチェ冷却が一般的である。

CCDカメラの動作を基本的に理解すると、性能がカメラについて最も重要な検討事項となる。詳細には、これらのパラメータは、ノイズ、線形性、量子効率、および時間解像度である。重要なノイズの四つの成分がある。それらは暗電流、読出しノイズ、ショットノイズおよびランプノイズである。暗電流は、CCD内の漏れ電流である。電荷は暗状態でさえも蓄積し、それゆえそのように呼ぶ。CCD温度が低くなると、暗電流も低くなる。熱電流冷却材または液体窒素はCCD温度を低下させ、それによって暗電流を低減させ得る。-120

の温度は、数オーダーの大きさを暗電流を低減させ得る。マルチピンフェージング（MP P）は、100以上の率で暗電流を低減させ得る新規なCCD技術である。読出しノイズは、出力プリアンプから生じるより高速のフレーム速度で生成される確率的電子電荷である。収集速度が上昇すると、読出しノイズも増加する。読出しノイズは、温度が-60 よりも下がると、大幅に低減され得る。一般的にはフォトンノイズとも称されるショットノイズは、光の量子性質によって生じる。ショットノイズは、フォトン信号の平方根である。低い光レベルでは、相対的なショットノイズは高くなり、所望の信号をマスクすることが多い。ランプノイズは、照射源中の強度変動によって生じ、安定した電源を用いることによって制御され得る。ランプノイズは、CCDカメラの量的な適用においては大きく見られることが非常に多い。

光度線形性は、定量蛍光顕微鏡法の間には特に重要になる。本発明の方法の使用について、線形演算子は概してCCDデータには適用されないの、線形性の関連は非常に重要なものではない。CCDの電荷生成機構は本質的に線形であるので、出力信号は電荷に正確に比例する。CCDとディジタイザとの間の電子は、偏位のための余地を提供する。高科学グレ

10

20

30

40

50

ードCCDは、通常、0.1%未満の偏位を有する線形性を示す。ほとんどの場合において、線形性は、線形性を試験するために用いられる技術よりもより線形であるので、測定が困難である。

量子効率、は、CCDに到達して相互作用を行い、CCD中で電子-ホール対を生成させるフォトンの一部である。量子効率は、低グレードCCD上の10%から後方照射科学グレードCCD上の80%までの範囲を有する。量子効率のスペクトル分散もあり、ピークは通常可視波長内で生じる。後方照射CCDは、全てのスペクトル位置でより大幅に大きい量子効率を有する。CCDカメラの時間解像度は、カメラの可能なフレーム速度を論じるときに重要になる。露出時間は与えられた用途により異なり、露出時間は用いられる発蛍光団の数および励起光の強度によって調節され得る。与えられたCCDカメラ中の時間解像度への制限は、アナログ-デジタル変換器動作周波数およびまた画像サイズの関数である。例えば、1 MHzで動作するA/D変換器は、一秒間に100×100画像の100フレームを読み出し得る。さらに、所望のダイナミックレンジが高くなると、読み出し周波数は低くなる。例えば、画素につき14ビットでデジタル化を行う現在のCCDカメラが1 MHzを超えて動作することは困難である。複数のシリアルレジスタ装置を用いることによって、一つのA/D変換器によって与えられる時間的制限は克服される。このような装置の速度の上昇は、利用可能な出力チャンネルの数に比例する。1 MHzで動作する4つの出力レジスタを有するCCDカメラによって獲得される14ビットの100×100画素画像は、1秒間に400フレームを獲得し得る。克服され得ない最高速度制限は、20 μ秒から500ナノ秒まで変化する画素読み出し時間によって指示される。100×100画素画像について、最も遅い画素読み出し時間でさえも500フレーム/秒を可能にし得る。従って、読み出し時間がフレーム速度への制限になることはまれであるが、制限となるのはむしろA/Dコントローラーである。この証拠として、2000/秒のフレーム速度が128×128アレイで可能であった(Ichikawaら、1992)。

本発明の方法において特に有用なCCDカメラは、大きい画素、低ノイズ、および短い走査時間のカメラである。大きい画素サイズは、より大きいウェル容量を有し、より多くのフォトンの収集を可能にし、従ってより大きい最大信号-ノイズ比(SNR)を可能にする。強度変化区別の基礎は、以下で簡潔に述べられるように、大きいSNRによる。従って、低ノイズはSNRを改善する補助となる。より小さいウェル容量およびより低いダイナミックレンジを有するMPPタイプCCDは、十分に適さない。短い走査時間から時間解像度が高くなり、コンピュータRAM中またはハードドライブ上でリアルタイムで格納可能であるべきである高容積データストリームを可能にする。量子効率は相応なものであるべきである。CCDの線形性は重大ではないが、科学的グレード(0.1%)であると仮定される。画像であるドナー蛍光体はおおよそ同じ強度であるので、ダイナミックレンジは重大ではない。

増強CCD(ICCD)カメラは、CCDカメラに加えて、光電陰極、マイクロチャンネルプレート(MCP)、および蛍光スクリーンからなる。蛍光が光電陰極上に衝突し、光電子をMCP内に放出する。MCPは、薄い円盤の形に熔融された数百万のガラス毛细管(チャンネル)のアレイからなる二次電子増倍管である。光電子がチャンネル上に入射すると、二次電子が生成される。電子がチャンネルを通過すると、機器のゲインとして直接制御される増幅が生じる。MCPの各チャンネルは画素に対応する。MCPの出力は、電子がMCPから外部に出て当たる蛍光面に集束される。光画像が蛍光面上に再生され、CCDカメラによって捕捉される。

いくつかの場合において、ICCDを用いることが好ましい。画像増強器を付加することによって、高速ゲーティングおよび高いゲインが提供される。ゲーティングは、恐らくICCDの最も重要な局面である。それは画像増強器への入力電圧を制御することによって生じる電子シャッター動作である。現在のところ、時間解像画像化法は、ナノ秒およびナノ秒以下のゲーティング時間で可能である(Thomasら、1992)。ゲーティングによって、背景信号が時間的に区別されるために、より多くの信号検出が可能になる。時間的区別および信号対ノイズ比の増大の例は、時間ゲート蛍光顕微鏡法および蛍光寿命画像化顕微鏡法のパルス法において見られる。画像増強器のゲインは、カメラの感度を高くするために用いられ、蛍光寿命画像化顕微鏡法の位相変調法におけるツールともなる。電子ゲインは、10000:1まで高くなり得る。これによって、読み出しノイズにわたって非常に弱い光信号が増幅さ

10

20

30

40

50

れ得る。

一つのフォトンの事象は、ICCDを用いて検出され得る。例えば、一つの発蛍光団の画像化は、CCDカメラ、画像増強器、およびエピ蛍光顕微鏡を用いてSaseら、1995によって達成されている。「Real Time Imaging of Single Fluorophores on Moving Actin with an Epifluorescence Microscope」において、Saseらは一つの発蛍光団が高検出効率でリアルタイムに画像化され得ることを示している。液体単一分子感度 (solution single molecule sensitivity) を達成した他の方法は、蛍光相関分光 (EigenおよびRigler、1994; KinjoおよびRigler、1995)、遠視野共焦顕微鏡 (Nieら、1994)、極低温蛍光分光 (Karthara、1995)、単一分子フォトンバースト計数 (HaabおよびMathies、1995; CastroおよびShera、1995; Goodwinら、1995; Peckら、1989; NguyenおよびKeller、1987; Leeら、1994; ChenおよびDovich、1996; Sheraら、1990; Soperら、1992)、二フォトン励起蛍光 (Mertz、1995)、および電気化学検出 (FanおよびBard、1995) を含む。

数値的SNR値は、CCDカメラの所望の局面に基づいて算出され得る。例えば、上記の基準を満たすCCDは、表1に示される規格を有するEEV 05-20 CCD (Princeton Instruments, Princeton, NJ) である。

表 1			
CCDフォーマット	1152×770	ダイナミックレンジ、ビット	14~17
画素サイズ、 μm	22.5×22.5	非線形、%	<1 (16ビット)
全ウェル容量、ke	500	-120℃で暗色電荷、電子/画素-時間	<1
読出しノイズ、e	4-6, 50 kHz 22, 500 kHz	量子効率、%ピーク	40

SNRを算出するためには、様々なノイズ値を考慮する方程式が必要とされる。任意の検出システムにおいて、弱く断続的な信号の検出を妨げ得るノイズの基礎レベルが常に存在する。直感的には、所望の信号が大きくなるに従って、ノイズの基礎レベルの重要性は低くなる。より大きい信号、そしてそれゆえ、より大きいSNRが、発蛍光団の数または励起強度のいずれかを増大させることによって達成され得る。SNRを算出するための方程式は

$$SNR = \frac{PE}{\sqrt{(N_{shot}^2 + N_{dark}^2 + N_{read}^2 + N_{lamp}^2)}}$$

$$PE = \frac{I \xi_{pt} E N G}{h \nu}$$

である。PEは、検出器から放出された光電子の数を表し、検出器システムの効率 (E) に関連する。効率 (E) が高くなるに従って、与えられた数のフォトンについて放出される光電子の数が増える。PEは、蛍光体の数 (N)、プリアンプゲイン (G)、積分時間 (t)、光強度 (I)、蛍光体のモル消失係数 ()、および選択された蛍光体について特定の蛍光定数 () にも関連する。N_{shot} は、蛍光発光のランダムな変動によるノイズを表し、生成される信号の大きさに関連する。信号が大きくなるに従って、ショットノイズも大きくなる。N_{dark} および N_{read} は、暗ノイズおよび読出しノイズである。N_{lamp} は、

照射源から生成されるノイズである。 N_{lamp} が、SNRにおいて大きな影響を有し得ることに留意することは重要である。1%の強度変動を有する照射源は、100:1ほどの大きさしかないSNRを有し得る。この場合、ランプノイズは、安定な電源を用いることによって最小化される。例えば、改変された電源を有する市販の(Uniphase)ヘリウム-ネオンレーザは、総強度の0.002%未満の強度変動を有する。さらに、タングステンフィラメントランプは、電球の出力が0.001%未満変動するように、安定した電源を備え得る。表2は、変数の値を列挙し、特定の値が選択された理由を提供している。

表2		
変数	値	理由
I	30 W/cm ²	2 Wレーザの強度は P/A によって与えられる。 A はビーム面積である。レーザ強度は64 W/cm ² である。
ϵ	91,000 l/M cm	フルオレセインについての分子消失係数
ρ	3.8×10^{-21} Mcm ³	フルオレセインの蛍光発光についての定数
t	0.010秒	100フレーム/秒で動作するCCDについての積分時間
E	0.025	CCDのフィルタ、対物レンズ、および量子効率を含む、システムの収集効率
N	1000	ドナー発蛍光団/画素の適切な数
G	60	代表的なプリアンプゲイン: ICCDについてのゲインは10000:1ほどになり得る
h	6.6261×10^{-34} Js	プランク定数
ν	$6.1224 \times 10^{14} \times s^{-1}$	$c = \nu \lambda$; $\lambda = 490\text{nm}$ (フルオレセインの励起)
N_{shot}	$632e^{-1}$	$N_{shot} = PE$
N_{lamp}	$8e^{-1}$	0.002%強度変動
N_{read}	$40e^{-1}$	高読出し速度でのEEV 05-20 CCDについての推定
N_{dark}	~ 0	-120°CでのEEV 05-20 CCDについての値
SNR	631:1	上記の方程式より

631:1のSNRは高い値である。高いSNRは、強度および強度変化の両方、あるいは言い換えれば、アクセプターが有る状態および無い状態でのドナー発光の効率的な検出を確実にする。例えば、631:1のSNRは、信号の0.158% ($1/632 \times 100$) 変化の検出に66%の信頼度があることを意味する。0.316%の変化の検出には95%の信頼度があり、0.475%の変化には99.9%の信頼度がある。強度変化が大きいほど、検出の可能性が大きくなる。どの強度変化もない状態では、より高いベースラインSNRによって、与えられたパーセンテージ

の強度変化についてより大きい信頼度間隔が可能になる。信号変化の検出の信頼度を最大化するためには、アクセプターが存在する状態で大きい割合の変化を生成することが重要である。

大きいパーセンテージの変化を生成させるための一つの方法は、相互作用ステーションの周りに、例えば、ポリマーが通過し得る同心円中に、複数のドナー発蛍光団をクラスタさせ、全てのドナー発蛍光団がアクセプターとのエネルギー伝達を確実に受けるようにする。ドナー発蛍光団のこのような同心円の適切な幅は、ドナーの発光速度、およびドナー -

Förster

距離によって決定され得る。アクセプターが通過する際の強度の代表的な変化は30% ~ 50 %の範囲にわたり、この範囲は明白な100%の信頼度に対応する。 10

CCDカメラが信号を処理し得る前に、生成された各信号は検出器システムの画素によって捕獲されなければならない。各画素は、単一の相互作用ステーションからの信号を捕獲し得るべきであり、信号中の過渡的变化の検出能を有するべきである。一つの画素によって検出される相互作用ステーションの領域、例えば、ナノチャンネル上の物質の局所化された領域は、検出器上の画素サイズ、画像の倍率および測定される波長の回折制限によって決定される。測定された領域と検出器画素サイズと倍率との間の関係は、以下の方程式によって与えられる。

$$a = 2d / M$$

測定される領域のサイズは a^2 によって与えられ、ここで a はエッジ長さである。検出器画素のエッジ長さは d によって与えられる。倍率は M によって与えられる。 $d = 15 \mu m$ および $M = 60\times$ であるこれらの変数の従来の値を用いて、測定された領域のエッジ長さは500nmと判明し、500nm波長信号の分解能の範囲内に十分あることがわかる。エピ照明 (epi illumination) 下の顕微鏡サンプルのための分解能は以下の方程式で呈示される (Matsumoto, 1993)。 20

$$R_f = 0.61 \lambda / NA$$

R_f は、解像され得る二つの明るい点の間の最小距離である。 λ は、ドナー蛍光体発光の波長である。NAは、顕微鏡対物レンズの口径数である。NAと分解能との間には反比例の関係があるので、最も高い口径数が所望される。NAは、レンズの選択についての以下の典型的な判定基準によって与えられる (TaylorおよびSalmon, 1989)。 30

$$NA = n \sin \theta$$

n は、液浸媒体 (immersion medium) の屈折率である。油などのより高い屈折率の媒体を用いることが望ましいことが多い。 θ は、光学軸とレンズに入る最大周縁光線との間の角度である。高電力での高品質顕微鏡対物レンズのために、口径数は1.4ほどに高くなり得る。上記の二つの方程式から、500nm発光信号および1.4NAレンズについての分解能は218nmになる。

上記の計算からの結論は、検出ユニット上の二つの隣接する画素は、信号の起源を混同せずに、各々がそれぞれの相互作用ステーションからの信号を検出し得ることである。慎重に倍率および画素サイズを算出することによって、画素間の交差干渉が回避され得る。例えば、最も小さい画素サイズ ($d = 6 \mu m$) および最大倍率 ($M = 100\times$) が用いられる場合、検出された領域上の120nmエッジ長さが達成される。システムの分解能は218nmで一定のままであるので、信号の干渉は存在する。これは、実験セットアップを規定する前に計算を行うことによって回避され得る。従って、検出システム上の倍率および画素サイズを調節することによって、測定された領域が回折制限と一致するところに最適な数が到達し得る。これは、検出システムの分解能に等しく、またはそれよりも大きくエッジ長さを設定することによって、上記の二つの式の組み合わせから決定され得る。 40

$$2d / M = 0.61 \lambda / NA$$

相互作用ステーションの濃度は、一つのための相互作用ステーションが検出器システムの一つの画素に対応するように変化され得る。例えば、 4×10^6 ナノチャンネル / cm^2 プレートが用いられる場合、60 \times 倍率および15 μm 画素サイズを用いて、0.01ナノチャンネル (相互作用 50

用ステーション)が画素毎に見出される。相互作用ステーション濃度はさらに低く調節され得、例えば、 $48\text{ }\mu\text{M}$ の平均最小細孔間距離も適切な範囲にある。

強度画像化に加えて、時間ゲート蛍光顕微鏡法および蛍光寿命画像化の両方が、本発明の方法による信号の検出に用いられ得る。時間ゲート蛍光顕微鏡法および蛍光寿命画像化は、蛍光信号の時間的判別および強度画像化よりも良好な信号対ノイズ比などの利点を有する、より関連のある方法である。

顕著な背景散乱および自己蛍光がある場合、時間ゲートが望ましい。背景光散乱は、散乱された波長が所望の発蛍光団の発光波長と等しい場合、問題である。散乱効果は、散乱された波長が検出された波長よりも短くなるように、大きいストークスシフトを有する発蛍光団を用いることによって回避され得る。この場合、散乱光は、光学フィルタを用いることによって除去され得る。一方、自己蛍光は、蛍光顕微鏡法を用いる実質的に全ての研究に影響を与える共通の問題である。自己蛍光は、溶媒、溶質、および顕微鏡システムの光学構成要素から生じ得る。自己蛍光は、検出の信号対ノイズ比を低下させる。これは、検出器システムの様々な構成要素に多くの改善があっても当てはまる(PeriasamyおよびHerman、1994)。

10

時間ゲート蛍光顕微鏡(TGFM)は、自己蛍光と蛍光との間の判別を行うために異なる蛍光寿命を用いる。蛍光染料の寿命は、自己蛍光の寿命よりも長くなるように選択され得る。短い寿命の自己蛍光は $1\text{ }\mu\text{秒}$ 未満の間にゼロに減衰するが、長い寿命の蛍光は $1\text{ }\mu\text{秒}$ から10ミリ秒までの寿命を示し得る(例えば、ユーロピウムキレート、ランタニドキレート)。サンプルの励起は、自己蛍光または蛍光のいずれかの寿命よりも短い、短い強度パルスを用いて行われる。指数的減衰が続く。測定が蛍光信号の減衰の後にのみ行われる場合、より長い寿命の信号がより大きい感度で測定される。

20

TGFMのための画像化装置の例は、Periasamy、1995において提供される。エビ蛍光能力および連続波(CW)レーザ(コヒーレントまたはスペクトル-物理)を有する蛍光顕微鏡(Nikon)が引例に示され、所望の励起波長で放射を行う。励起レーザ光は、規定されたパルス幅を有するレーザパルスを生成するためにチョッパ制御を有するチョッパでチョップされる。光の強度は、可変中性濃度フィルタ(Omega Optics)を使用して制御される。測定の時間を遅延させるために、遅延パルス生成器が、高周波数ゲート画像増強器(Hamamatsu)、または放射光路中のチョッパを制御するための信号を生成するために用いられる。CCDカメラ(Princeton InstrumentsまたはPhotometrics)が信号を収集するために用いられる。

30

蛍光寿命は、分子が基底状態に戻る前に励起状態のままでいる平均時間を表す。蛍光寿命の測定のために二つの方法がある。パルス法と、位相変調法である(Lakowicz、1986; McGown、1989; GrattonおよびLimkema、1983)。パルス法において、サンプルは光の短いパルスを用いて励起され、時間依存蛍光減衰が測定される。位相変調法においては、サンプルは正弦的に変調された光を用いて励起される。位相シフトおよび復調が寿命を算出するために用いられる。近年まで、寿命測定はキュベットサンプルを用いてのみ用いられていた。過去五年間に、顕微鏡二次元解像度と高解像度寿命測定とを組み合わせた方法が開発されている(RodgersおよびFirey、1985; Wangら、1990; Morganら、1990; Cleggら、1991; LakowiczおよびBerndt、1991; Buurmanら、1992; van de VenおよびGratton、1992; Oidaら、1993)。蛍光寿命画像化顕微鏡法(FIM)の開発によって、細胞および他の顕微鏡サンプル中の蛍光標識の位置および環境の詳細な研究が可能になった。以下では、FIMの利点、理論、および適用を論じる。

40

蛍光寿命測定は、特異性、感度、定量(quantitation)および高時間解像度を含む様々な理由のために用いられている(Wangら、1996)。寿命の測定は、蛍光分子は別個の寿命を有するので、高い特異性を提供する。吸収および発光と比較すると、寿命は分子のより大きい判別を提供する。寿命は少量の分子にも行われ得、これによって強度測定と同様の感度が得られる。寿命による分子の定量は、蛍光寿命は発蛍光団の蛍光量子収率に直接関連するので、真の測定を提供する。最後に、寿命は、通常、ピコ秒とマイクロ秒との間である、生物分子過程の時間スケール上で生じる時間事象を検出するために用いられ得る。

50

寿命を決定する二つの方法がある。まず、パルス法が記載される (Lakowicz、1986)。発蛍光団の集団を励起させる光の短いパルスを考える。励起された分子の蛍光信号は、一次的に時間と共に低下し、以下の指数関数として与えられる。

$$I(t) = A e^{(-t/\tau)}$$

A は任意の定数、 t は時間、 τ は蛍光寿命である。直感的には、蛍光寿命は、強度が元の値の $1/e$ に減衰、すなわち 63% に減衰するために必要な時間である。寿命を実験的に測定するための方法の一つは、パルスサンプリング法を用いるものである (Hermanら、1996)。 D_1 および D_2 は連続するフレーム上で収集される。フレームは寿命方程式および図 2 を用いて分析され、二次元寿命アレイが生成される。各励起事象に追従して、CCD カメラに取り付けられたマルチチャネルプレートゲート画像増強器 (MCP-GII) が、励起パルスの後にある時間間隔 (t_1) をおける非常に短い間隔の間 (すなわち、4 ナノ秒) オンにされる。連続してオンである CCD 上で発光が獲得される。CCD の一つのフレーム上で十分な信号を捕獲するために、同一の処理が多数回繰り返される。 t_1 で十分な信号が生成されると、CCD は読み出され、励起パルス (t_2) に関するゲートウィンドウが移動し、処理全体が繰り返される。画素毎分析を用いて二つのフレームの解釈を行うと、各点での画像の寿命が与えられる。

Wangら、1996 は、パルス FLIM のための装置を五つの主要な構成要素から成るものとして記載する。すなわち、1) パルス化光源、2) 画像検出装置 (ゲート画像増強器および CCD カメラ)、3) タイミング制御ユニット、4) および蛍光顕微鏡である。システムは、パルス化光源が、モードロック YAG レーザ、第三次高調波発生器を有する染料レーザ、およびキャビティダンパから成るピコ秒パルス化光源 (コヒーレント) であることを除いて、上記の時間ゲート蛍光顕微鏡 (TGFM) について記載した装置と同一である。ピコ秒パルスは、UV から IR までの同調可能波長を有する。シングルショット (single shot) から 76 MHz までの速度が生成される。

蛍光寿命決定の第 2 の方法は、位相変調法によるものである。励起のパルス化された光源を用いる代わりに、この方法は、正弦的に変調された強度の光を用いる。従って、サンプルの発光は同一の正弦変化に追従する。蛍光分子の励起された寿命のために、変調された発光は位相が遅延している。位相シフト (ϕ) の大きさは、発蛍光団の寿命に直接関連する。さらに、発光の復調がある。言い換えれば、最終発光の振幅が、励起光の振幅よりも小さい。位相角 (ϕ) および復調係数 ($m = BA/ba$) の両方が測定され、位相 (ϕ) および変調寿命 (τ_m) を算出するために用いられる (Lakowicz、1986)。

$$\tau_p = \frac{\tan \phi}{\omega} \quad \tau_m = \frac{\sqrt{[(1/m^2) - 1]}}{\omega}$$

一回の指数減衰において、 $\phi = \phi_m = \phi$ 、実際の蛍光寿命。

位相変調寿命決定を支持する基礎理論は、二次元画像化システムに適用され得る。以下の記載は、Gadellaら (1993)、および Lakowicz および Szmanski (1996) に基づき、これらの各々が本明細書において参考として援用される。この方法は、発光信号の位相シフトに関連する強度を有する画像を生成する、ゲイン変調画像増強器を用いる。様々な電子遅延または位相シフトを用いて収集されるいくつかの位相感受性画像を用いれば、物体の寿命画像を算出することが可能である。これをさらに理解するために、ある位置 r から時間平均された位相感受性強度を記載する方程式を示すことが必要である。

$$I(r, \theta - D) = I_0(r) [1 + \frac{1}{2} m_D m(r) \cos(\theta(r) - \theta_D)]$$

ここで、 r は画素位置を示し、 θ_D はゲイン変調信号の位相角であり、 $\theta(r)$ は発光の位相であり、 m_D は検出器のゲイン変調であり、 $m(r)$ は発光の変調振幅であり、 $I_0(r)$ は画素の元の強度である (濃度に依存する)。方程式は、与えられた画素の強度を、二つの制御されたパラメータ (θ_D および m_D) および三つの未知数 ($I_0(r)$ 、 $\theta(r)$ 、 $m(r)$) の関数として与えられた画素の強度を記載する。 $\theta(r)$ または $m(r)$ のいずれかが既知の場合、寿命 (τ) が決定され得ることを想起されたい。三つの未知数

があるために、少なくとも三つの異なる画像が標本の寿命を決定するために必要とされる。ゲイン変調信号の位相角 (ϕ) を制御することによって、一連の位相感受性画像が生成され、従って、寿命が決定され得る。

位相変調FLIMのための装置は、LakowiczおよびSzmajnski (1996) に記載されている。励起は、モードロックNd:YAGレーザーによって同調ポンプされるキャビティードンブレーザーの出力によって提供される。励起光はレーザービームエキスパンダによって拡張される。ゲート画像増強器は、ターゲットとCCDカメラとの間に配置される。画像増強器のゲインは、周波数合成器の出力を用いて変調される。CCDカメラは位相に敏感な画像を捕捉する。FLIMソフトウェアを有するコンピュータは出力を処理し、寿命画像を生成する。

この方法に伴う他の相互作用は、核放射線信号を生成する。ポリマー上の放射標識が、ステーションなどの検出の規定された領域を通過すると、核放射線が放射され、これらの一部は放射検出の規定された領域を通過する。核放射線の検出器は放射線検出の規定された領域に近接して配置され、放出された放射信号を捕捉する。核放射線を測定するための多くの方法が当該分野において公知であり、これらの方法はクラウドおよびバブルチャンバ装置、一定電流イオンチャンバ、パルスカウンタ、気体カウンタ

(すなわち、Geiger-Müllerカウンタ)、

固体検出器 (表面バリア検出器、リチウムドリフト形検出器、固有ゲルマニウム検出器)、シンチレーションカウンタ、チェレンコフ検出器などを含む。

他のタイプの生成された信号が当該分野において周知であり、当業者に公知の多くの検出手段を有する。これらの中には、対向電極、磁気共鳴、および圧電走査チップが含まれる。対向ナノ電極は、容量変化の測定によって機能し得る。二つの対向電極は、効率的に二つの電極の間に有るエネルギー蓄積の領域を生成する。二つの対向電極の容量は、異なる材料が電極の間に配置されると変化することが公知である。この値は、誘電率として公知である。誘電率の変化は、二つの電極の間の電圧の変化として測定され得る。本実施例においては、ポリマーの異なるヌクレオチド塩基またはユニットが、異なる誘電率を生じさせ得る。容量は、方程式 $C = K C_0$ についてのポリマーのユニットの誘電率として変化し、ここで K は誘電率、 C_0 はいかなる塩基もない状態での容量である。次いで、ナノ電極の電圧偏向は測定装置に出力され、信号の経時変化を記録する。

ナノサイズのNMR検出装置は、特定のスピン標識されたポリマーユニットの通過を検出するように構成され得る。ナノサイズのNMR検出装置は、掃引され得る磁石と、一定の周波数の電磁エネルギーでポリマーを照射する手段 (これは、電磁周波数が掃引される間に、磁界定数を保持することと同一である) とから成る。磁界が適切な強度に達すると、核がエネルギーを吸収し、共鳴が生じる。この吸収によって、サンプルを取り巻くアンテナコイルに小さな電流が流れ込む。信号は増幅され、記録装置に出力される。公知の標識された化合物については、検出時間は、問題となっている化合物の全スペクトルが必要となるNMR検出の現在の手段よりも大幅に速い。ポリマーの公知の標識されたユニットは、特定の領域において公知の化学シフトを有し、それによって全スペクトル掃引を行う必要がなくなり、塩基毎の検出時間をマイクロまたはミリ秒までに低下させる。

ナノスケールの圧電走査チップは、異なるポリマーユニットのチップとの物理的接触に基づいて、ポリマーの異なるユニットを読み出すために用いられ得る。ポリマーユニットのサイズおよび形状に依存して、異なる圧電信号が生成され、一連のユニット依存変化を生成する。ユニット上のラベルは、天然 (native) ユニットとは物理的に異なり、圧電走査チップを介する検出のための容易な手段を生成し得る。ポリマーユニットがチップと接触すると、圧電結晶が変化し、検出装置に出力される電流を生じさせる。ポリマーユニットとチップとの相互作用によって生成される電流の振幅および持続時間は、ポリマーユニットの特性である。

光検出可能な信号が生成され、検出され、データベースに格納され、信号は分析されてポリマーに関する構造上の情報を決定し得る。コンピュータは、ポリマーについてのデータを収集するために用いられるコンピュータと同じであっても、あるいはデータ分析専用の別のコンピュータであってもよい。本発明を実行するための適したコンピュータシステム

10

20

30

40

50

は、代表的には、ユーザへの情報を表示する出力装置と、出力装置に接続されたメインユニットと、ユーザから入力を受け取る入力装置とを含む。メインユニットは、概して、相互接続機構を介してメモリシステムに接続されるプロセッサを含む。入力装置および出力装置もまた、相互接続機構を介してプロセッサおよびメモリシステムに接続される。

ナノチャネルは、ポリカーボネートテンプレート膜の全幅にわたる金属フィブリルを生成する無電解メッキ手順によって作成され得る。膜の両面が金属フィルムで被覆されて、ナノディスク電極アセンブリを生成するようにも膜は生成され得、金属フィルムの一方は膜の表面を露出するために除去され得る。金属フィルムは、膜の表面を露出するために除去され得る。これらの電極は、底面で共通電流コレクタに接続され得る。このアセンブリは、コンダクタンスの変化を介するポリマーの流れが測定されるので、電流の変化を検討するために有用である。このようなプレートの作成は、Martin, C.P.R., Science, 266: 1961-1965 (1994) において記載されている。

検出された信号のデータ分析のためのコンピュータプログラムは、CCD製造者から容易に入手可能である。このようなプログラムは、以下に記載するような汎用コンピュータを用いて実行され得る。本発明の方法には、一つの画素への動作のみが行われる必要がある（ポイント動作）。ポイント動作の複雑さは、用いられる画像化の方法に依存する。強度ベースの画像化は、データの最も高速な操作を提供し、これは個々の画素上で演算のみが行われるからである。画像化技術（強度、TGFM、またはFLIM）とは無関係に、各方法において各画素に行われるアルゴリズムは、あるより複雑な画像化状況で行われる必要があるグローバルな全フレーム動作と比較すると、低レベルであると考えられる。

一つ以上の出力装置がコンピュータシステムに接続され得ることが理解されるべきである。例となる出力装置は、陰極線管（CRT）ディスプレイ、液晶ディスプレイ（LCD）、プリンタ、モデムなどの通信装置、および音声出力を含む。一つ以上の入力装置がコンピュータシステムに接続され得ることが理解されるべきである。例となる入力装置は、キーボード、キーパッド、トラックボール、マウス、ペンおよびタブレット、通信装置、およびセンサなどのデータ入力装置を含む。本発明は、コンピュータシステムとの組み合わせで用いられる特定の入力または出力装置、あるいは本明細書に記載された入出力装置に限られないことが理解されるべきである。

コンピュータシステムは、AC@などの高レベルコンピュータプログラミング言語を用いてプログラム可能な汎用コンピュータシステムであり得る。コンピュータシステムは、特殊にプログラムされた特殊目的ハードウェアでもあり得る。汎用コンピュータシステムにおいて、プロセッサは、代表的には市販のプロセッサであり、その例は、Intelから入手可能なシリーズx86プロセッサ、AMDおよびCyrixから入手可能な同様の装置、Motorolaから入手可能な680X0シリーズマイクロプロセッサ、IBMから入手可能なPowerPCマイクロプロセッサ、およびDigital Equipment Corporationから入手可能なAlphaシリーズプロセッサである。多くの他のプロセッサが利用可能である。このようなマイクロプロセッサは、オペレーティングシステムと称されるプログラムを実行し、この例は、WindowsNT、UNIX、DOS、VMSおよびOS8であり、他のコンピュータプログラムの実行を制御し、スケジューリング、デバギング、入力/出力制御、アカウントティング、コンパイル、格納割当て、データ管理およびメモリ管理、ならびに通信制御および関連するサービスを提供する。プロセッサおよびオペレーティングシステムは、高レベルプログラミング言語のアプリケーションプログラムが書かれているコンピュータプラットフォームを規定する。

メモリシステムは、代表的には、コンピュータ読出し可能で書きこみ可能な非揮発性記録媒体を含み、それらの例は磁気ディスク、フラッシュメモリ、およびテープである。ディスクは、フロッピーディスクとして公知の着脱可能なものであっても、ハードディスクとして公知な永久的なものでもよい。ディスクは、代表的には二値の形態で、すなわち、1および0の列として解釈される形態で信号が格納される多数のトラックを有する。このような信号は、マイクロプロセッサによって実行されるアプリケーションプログラム、またはアプリケーションプログラムによって処理されるディスク上の格納された情報を規定し得る。代表的には、動作において、プロセッサは、非揮発性記録媒体から、ダイナミック

10

20

30

40

50

ランダムアクセスメモリ (DRAM) またはスタティックメモリ (SRAM) などの、代表的には揮発性ランダムアクセスメモリである集積回路メモリ素子にデータを読みこむ。集積回路メモリ素子はプロセッサにより、ディスクが行うよりも高速の情報へのアクセスを可能にする。プロセッサは、概して、集積回路メモリ内でデータを操作し、次いで、処理が完了すると、データをディスクにコピーする。様々な機構が、ディスクと集積回路メモリ素子との間のデータ移動を管理するものとして公知であり、本発明はそれらの機構に限定されない。本発明は特定のメモリシステムに限定されないことも理解されるべきである。

本発明は特定のコンピュータプラットフォーム、特定のプロセッサ、または特定の高レベルプログラミング言語に限定されないことが理解されるべきである。さらに、コンピュータシステムはマルチプロセッサコンピュータシステムであっても、コンピュータネットワークを介して接続される複数のコンピュータを含んでもよい。

10

ポリマーについての格納されたデータは、コンピュータのメモリシステム中のデータベースまたはデータファイルに格納され得る。各ポリマーについてのデータは、例えば、固有の識別子を各ポリマーに割り当てることによって、他のポリマーについてのデータとは無関係にプロセッサによってアクセス可能であるように、メモリシステムに格納され得る。データに含まれる情報およびその情報がどのように分析されるかは、物質と相互作用させられて信号を生成する標識されたユニットの数およびタイプに依存する。例えば、一つのポリマーの全てのユニット、すなわち、特定のタイプのラベルを有する各タイプのユニット (例えば、核酸の全ての A) が標識される場合、一つのポリマーの分析からポリマー内の全てのユニットの順序を決定することが可能である。しかし、核酸などのポリマーの四つのタイプのユニットの一つのみが標識される場合、核酸の全配列を決定するためにより多くのデータが必要になる。いくつかの標識機構およびこれらの機構によって生成されるコンピュータシステムデータを用いて分析を行うための方法が、以下でより詳細に記載される。論考を容易にするために、核酸に関して標識戦略が記載される。しかし、これらの各戦略は、全てのポリマーの標識に有用である。

20

標識のいくつかの異なる戦略が可能であり、それには異なるタイプの標識されたヌクレオチドの置換、標識されたヌクレオチドの異なる割合、一本鎖または二本鎖標識、および特定の配列を有するポリマーに結合する化合物などの多様性標識 (多様性標識は、特定の実施態様に関して以下でより詳細に論じる) を含む。最も単純な標識機構は、四つ全てのヌクレオチドを異なる標識で標識することを伴う。三つ、二つ、または一つの標識しか用いない標識機構も可能である。

30

標的DNAのA、C、GおよびTが異なる標識で標識される、四つのヌクレオチドの標識機構が形成され得る。このような分子は、相互作用ステーションを通過すると、標的DNA上のヌクレオチドの線形配列に対応する信号の線形順序を生成する。四ヌクレオチド戦略を用いる利点は、データ解釈が容易になること、およびユニットの全配列が一つの標識されたポリマーから決定され得るという事実である。しかし、四つ全ての塩基に外因性標識を付加することによって、立体障害問題が生じ得る。この問題を低減させるために、ヌクレオチドの一部または全ての内因性特性がヌクレオチドを標識するために用いられ得る。上記で論じたように、ヌクレオチドは、各プリンおよびピリミジンが別個の吸収スペクトル特性を有するために、内因的に標識されている。本明細書に記載されている各標識機構において、ヌクレオチドは外因的または内因的のいずれかで標識され得るが、四ヌクレオチド標識法が用いられるときは、少なくともヌクレオチドの一部が内因的に標識されることが好ましい。また、外因性標識が四ヌクレオチド標識機構と共に用いられるとき、立体障害を減少させるために、標識は小さく、電荷が中性であることも好ましい。

40

四つのヌクレオチドのうちの三つが標識化される三ヌクレオチド標識化機構も行われ得る。四つのヌクレオチドのうちの三つのみが標識化されるとき、本発明の方法によって生成されるデータの分析は、四つ全てのヌクレオチドが標識化されるときよりも複雑である。第四の標識化されないタイプのヌクレオチドの数および位置が別々に決定されなければならないために、データがより複雑になる。第四のヌクレオチドの数および位置を決定するための一つの方法は、二つの異なるセットの標識化核酸分子の分析を用いる。例えば、一

50

つの核酸分子は、A、CおよびGで標識化され得、別の核酸分子はC、GおよびTで標識化され得る。二つのセットからの標識化ヌクレオチドの線形順序の分析によって、配列データが生成される。各セットについて選択される三つのヌクレオチドは、これらの二つのセットが四つ全ての標識化ヌクレオチドを含む限り、多くの異なる可能性を有し得る。たとえば、A C Gの組は、標識化C G T、A C TまたはA G Tの組と対にされ得る。

第四のヌクレオチドを含む配列は、ポリマー上の第四のヌクレオチドの位置を識別することによって、少なくとも二つの異なって標識化されるポリマーのセットではなく、一つの標識化ポリマーのみを用いることによって決定され得る。これは、核酸分子上の標識化ヌクレオチドの間の距離を決定することによって達成され得る。例えば、A、CおよびGは標識化され、生成された検出可能な信号は、核酸分子がA G G C A A A C Gの配列を有することを示した。GとGとの間の距離が通常のヌクレオチド間距離の二倍であることを除いて、核酸分子中の各ヌクレオチドの間の距離がヌクレオチドの特定の組み合わせについての公知のヌクレオチド間の距離と等しい場合、Tは二つのGの間に位置し、分子全体はA G T G C A A A C Gの配列を有する。ヌクレオチド間の距離は、いくつかの方法で決定され得る。第一に、核酸分子の一つのユニットが一つの時間間隔で因子を通過するように、ポリマーおよび因子は互いに関して直線的に一定の速度で移動し得る。二つの時間間隔が検出可能な信号の間で経過する場合、検出可能な信号を生成し得ない標識化されないヌクレオチドがその位置内に存在する。塩基間の距離を決定する方法は、ランダムな一塩基標識化を参照して以下でより詳細に論じられる。あるいは、ポリマーおよび因子は、各標識化ユニットが因子と同時に相互作用し、同時の検出可能な信号を生成するように、互いに相互作用させられ得る。生成された各検出可能な信号は、ユニットが配置されるポリマーに沿った位置で生じる。検出可能な信号の間の距離は直接算出され、標識化されないユニットが核酸分子に沿ったいずれかの位置にあるかどうかを決定し得る。

核酸分子は、二ヌクレオチド標識化機構によっても標識化され得る。六組の二ヌクレオチド標識化核酸分子がデータを解析(resolve)し、ヌクレオチド配列を解釈するために用いられ得る。Ambroseら、1993およびHardingおよびKeller、1992は、完全に外在性標識化ヌクレオチドのうちの二つを用いる大きい蛍光DNA分子の合成を示している。分子の平均サイズは7 kbであった。二ヌクレオチド標識化の六つの異なる組み合わせは、以下の公式を用いて可能である。

$$({}_nC_k) = \frac{n!}{k!(n-k)!} = \frac{4}{2!2!} = 6$$

ここで、同時にn個のヌクレオチドからk個が取られた(n nucleotides are taken k)。可能な組み合わせはAC、AG、AT、CG、CTおよびGTである。各組における標識化の線形順序を知ることによって、核酸配列の再構築が成功し得る。モデル配列として4-mer (5'ACGT'3')を用いて、理論が証明され得る。第1の組、ACは、Aの後にCがなければならないという情報を与える。これはAとCとの間に介在するヌクレオチドの数についての情報も、Aの前にあるいずれものGまたはTについての情報も与えない。第2の組、AGは、Aの後にGもあるということを示している。組ATは、Aの後にTがあることを示している。これらの三つの組から、標的DNAは4-merであり、一つのC、一つのGおよび一つのTがAの後にあることが分かる。次の組は、Aの後に有るこれらの三つのヌクレオチドの順序に関する情報を与える。組CGは、Cの後にGがあることを示している。組CTは、Cの後にTがあることを示している。組GTで、5'ACGT'3'の最終解読配列を与えるための配置が完了する。六つの標識化組の核酸分子を用いる方法に加えて、上記のように検出可能な信号を生成する標識化ヌクレオチド間の距離についての情報と六未満の数の組の二つのヌクレオチド標識化核酸分子から得られる情報とを組み合わせることによって、配列が確立され得る。第四の標識化機構である、ランダムな一ヌクレオチド標識化機構も用いられ得る。この方法において、集団分析および/またはDNA移動の瞬間速度のいずれかによって得られる距離情報が、二つの標識化ヌクレオチドを分離するヌクレオチドの数を決定するために用いられる。四つの異なって標識化標的分子の分析によって、全配列が生成される。

これらの標識法を用いる分析の一つの方法は、相補塩基情報の使用を含む。図1は、二つの異なって標識化DNAサンプルが必要とされる標識化戦略を示している。第1のサンプルは、同一の発蛍光団でランダムに標識化非相補塩基のうちの二つを有する。塩基の非相補対は、AC、AG、TCおよびTGである。第2のサンプルは、ランダムに標識化塩基の一つを有する。第2のサンプルについて選択された塩基は、四つの塩基のうちのいずれかであり得る。与えられた例において、二つの非相補塩基はAおよびCに選択される。その結果、二つのサンプルが作成され、一つのサンプルは標識化AおよびCを有し、他方は標識化Aを有する。DNAは、ゲノムによって消化され、末端標識化され、精製され、ナノチャンネルFRET配列決定によって分析される。各フラグメントから生じる配列特異的FRET情報は、二つの相補鎖グループのうちの一つに分類される。分類によって、全ての所望の塩基の位置を決定するための集団分析が可能になる。図は、分類データからの配列情報の生成を図示する。分析された情報の第1のグループは、一本の鎖上の全てのAおよびCの位置を生じる。分析された第2のグループは、一本の鎖上の全てのAおよびCの知識を生じる。同一の手順が相補鎖に適用される。相補鎖のAおよびCの知識は、他方の鎖上のTおよびGの知識と同一である。結果は、配列再構築となる。配列を交差確認するために、TG、TCおよびAGなどの非相補塩基の別の対について工程が繰り返され得る。

塩基間の距離を決定する二つの方法がある。一つの方法は、特定の標識化のためのエネルギー伝達の持続時間またはクエンチングから容易に算出される、DNA移動の瞬間速度を決定することを必要とする。別の方法は、標的DNA分子の集団およびその対応するガウス距離分布の分析を伴う。

瞬間速度法は、信号間の分離時間 (t) によって乗算されるDNA移動の公知の瞬間速度 (v) に基づく距離分離の決定を伴う。瞬間速度は、標識化ヌクレオチドが相互作用ステーションを通過するためにかかる時間を測定することによって見出される。因子の濃縮領域の長さ (d) が公知であるので (因子の局所化された領域の較正および物理的測定、例えば、濃縮ドナー発蛍光団領域の厚さにより)、速度は単に $v = d/t$ となる。図2に示されるように、プロットされたときに逐次的な検出可能な信号から生じるエネルギー放出パターンにおける変化を示す生データの分析によって、左から右へ二つのエネルギー強度が低下し、それに続いて二つのエネルギー強度が増大することを示す曲線が生成される。第1のエネルギー強度低下 (t_1 と称される) からの平坦部は、第2の平坦部 (t_2) の二倍である。相互作用ステーションの長さは、51 として与えられる。この与えられた情報から、標識化ヌクレオチドの数が公知である。さらに、二つの間の分離距離が、DNA移動速度をドナー強度平坦部の時間に関連付けることによって決定される。

標識化されるヌクレオチドの数は、単に強度低下の数によって示される。図2において、二つの強度低下がある。従って、DNA上には二つの検出可能な標識がなければならない。塩基分離の距離を決定するためにDNA移動の瞬間速度を知ることが必要であり、この瞬間速度は、一つの標識化ヌクレオチドが因子の局所化された領域を横断する時間および因子の局所化された領域の長さを知ることによって見出される。因子の局所化された領域の長さは、51 として与えられる。一つの標識化ヌクレオチドが因子の局所化された領域を横断するための時間は、第1の強度低下および第1の強度増大によって境界が定められる (灰色に陰をつけられた領域、7.5秒として示される)。DNA移動の速度は、6.8 / 秒である。塩基分離は、10個の塩基対に等しい、速度によって乗算された標識化ヌクレオチドを分離する時間 ($t_1 = 5$ 秒) から導き出される ($6.8 \times t_1$)。交差確認の手段として、 $51 - t_2 v$ も、塩基分離を生じさせる。

集団法において、標識化ヌクレオチドの集団全体が考慮される。速度法に必要となるように、因子の局所化された領域の長さおよび瞬間速度を知ることには必要ではない。集団分析を用いることによって、個々の核酸分子へ正確な測定を行う必要が統計的になくなる。各々がナノチャンネルを横断する5つの核酸分子を用いる集団法の例が以下に記載される。同一のDNAフラグメントの集団を表す5つの分子が用意される。一定の電界内で、第1の標識ヌクレオチドと第2の標識ヌクレオチドとの間の検出時間は、全てのDNA分子について同一であるべきである。実験条件下では、これらの時間はわずかに異なり、それによっ

て時間のガウス分布が生じる。ガウス分布のピークは、二つの標識ヌクレオチドの間の分離距離 (d) の特性である。

一つのヌクレオチドでランダムに標識化核酸分子の集団 (六個の分子が集団を表す) を用いるさらなる例は、集団分析の概念および距離情報の決定をさらに示す。核酸は末端標識化されて参照点を提供する。十分な核酸分子を用いて、いずれもの二つの A の間の距離が決定され得る。二つの分子は、副集団と考えられるときには、末端標識と第 2 の A との間およびまた第 2 の A と第 3 の A との間で塩基分離を運ぶ。分離時間は、塩基距離を表す分布を生じさせるために用いられる。同じ二つの分子中で、四つおよび六つの塩基分離の分布が生じさせられる。同じ論理を集団の残りに適用すると、DNA 上の全ての A の位置が決定され得る。他の三つの塩基 (C、G および T) について工程を繰り返すことによって、全配列が生成される。

10

一つのタイプのユニット全て標識化することに加えて、一つのタイプのヌクレオチドが全ては標識化されない一ヌクレオチド標識化機構を用いることが可能である。この方法の概要は図 3 に示され、この図は、5'ACGTACGTACGTACGT'3 の配列を有する 16-mer についてのランダム A 標識フラグメントの代表的な集団を示している。個々に標識化各 DNA 分子は、5' および 3' 末端標識に加えて、標識化 A の半分を有する。ランダムに標識化フラグメントの大きい集団を用いて、標的 DNA 上の各連続する A の間の距離が見出され得る。末端標識は、DNA 末端と第 1 の A との間の距離を識別するために役立つ。同一の分析をその他のヌクレオチドに繰り返すことによって、16-mer の配列が生成される。このような方法を用いる利点は、立体効果がなく、標識化が容易であることを含む。このタイプの標識化は、ランダム標識化と称される。「ランダムに標識化」ポリマーは、特定のタイプのユニット全てよりも少ないユニットが標識化ポリマーである。特定のタイプのランダムに標識化ポリマーのどのユニットが標識化されているかは未知である。

20

手短に上述したように、標識化機構の様々な組み合わせが共に用いられ得る。上記で列挙した方法の全てにおいて、信号からの順序付けされた線形情報またはヌクレオチド間の距離情報のいずれかが考慮される。順序付けされた線形および距離情報の両方に依存する方法を与えるために、これらの二つの局面が組み合わせられ得る。例えば、ランダム一ヌクレオチド標識化戦略は、ランダム四ヌクレオチド標識化戦略に発展した。ランダム四ヌクレオチド標識化は、四つのすべてのヌクレオチドのフラクションが標識化されている。分子の集団は、標識化された四つのヌクレオチドの一部を有する。各四つのヌクレオチドは独自の標識を有する。ランダム標識化集団の分析の結果、配列データが生成される。

30

二本鎖 DNA を用いることによって、変形が可能になる。DNA の一つの鎖上のヌクレオチドの二つが標識化ヌクレオチドに完全に置換されるときに、一本鎖二ヌクレオチド標識化機構が行われ得る。二ヌクレオチド標識化を支持する理論を保ちながら、二つの外在的に標識化ヌクレオチドによって課される立体障害制限を減少させるためには、各相捕鎖の上の一つのヌクレオチドを完全に標識化し、それによって同一の目的を達成することが可能である。この方法は、各鎖が異なる標識で標識化される二本鎖 DNA を用いることを伴う。六つの異なって標識化された二本鎖 (duplex) DNA の組が、配列情報を提供するために適切であるデータセットを生成する。DNA の各相補鎖は、標識化ヌクレオチドの一つを有するべきである。各二本鎖 DNA セットにおいて、二つの異なるヌクレオチドの等価物 (可能な組み合わせは、AC、AG、AT、CG、CT、GT) が標識化される。両方の相捕鎖が標識化アデニンを有するとき、これは組み合わせ AT と等価である。二本鎖二ヌクレオチド標識化において、利点は、各鎖上の一つのヌクレオチドのみが標識化され、それによって一本鎖 DNA 上の二ヌクレオチド標識化と比較するとより長い標識化鎖を合成することが可能になることである。実施上では、完全に標識化された一つのヌクレオチドを用いる DNA フラグメントの合成は、10kb よりも大幅に大きい長さで達成され得ることが示されている (Ambrose ら、1993; Harding および Keller、1992)。

40

本発明の方法の一つの用途は、ポリマー内のユニットの配列を決定することである。核酸などのポリマー内のユニットの配列を識別することは、ポリマーの作用を理解すること、および細胞または組織などの生理学的環境におけるポリマーの役割を決定することにおけ

50

る重要な工程である。現在用いられている配列決定法は遅く、煩雑である。本発明の方法はより迅速であり、かつ、非常に短い時間により大幅に多くの配列データを生成する。

ポリマーの配列決定は、ポリマー全体またはポリマーの一部の配列決定、またあるいはポリマー上の個々のユニットの識別までを含み得る。ポリマーの個々のユニットを識別するための一つの方法は、同一性が未知であるポリマーの個々のユニットを、電磁放射線、クエンチング源、および蛍光励起源からなる群から選択される因子に過渡的に曝して、個々のユニットの特性である検出可能な信号との相互作用を生成させる工程と、信号を検出し、この信号を個々のユニットの同一性を示すものとして、ポリマーの隣接する信号生成ユニットから生成される信号から判断する工程とを含む。

個々のユニットは、個々のユニットの特性を示す検出可能な信号を生成させるために、因子に「過渡的に曝され」る。本明細書で用いられる「過渡的に曝される」は、信号を生成するために十分な時間の間ユニットが因子の相互作用近位内に配置され、次いで、この相互作用近位の外部に移動されることを意味する。信号を生成するために必要な時間の正確な長さは、個々のユニットおよび含まれる因子に依存するが、概して、時間量は1ナノ秒と1秒との間である。

個々のユニットの特性を示す信号は、ポリマーの隣接する信号生成ユニットから生成される信号から判別される。「隣接する信号生成ユニット」は、個々のユニットに最も近いユニットであり、因子に曝されると、検出可能な信号を生成する。直接連結したユニットが標識され（内在性または外在性）、および検出可能な信号を生成しない限り、それは必ずしも個々のユニットに直接連結したユニットではない。

因子が一つ以上の発蛍光団である場合、因子とユニットとの間の相互作用近位はエネルギー移動近位であり、生成される信号は蛍光共鳴エネルギー移動である。本明細書で用いられる「エネルギー移動近位」は、一つの相補源が他方の相補源の吸収スペクトルと重畳する場合、二つの相補源の間の相互作用を可能にする、ユニットと発蛍光団との間の距離である。本明細書で用いられる「蛍光共鳴エネルギー移動」は、重畳する放射および吸収スペクトルを有する発蛍光団の間の光子エネルギーの移動である。

ポリマーの個々のユニットを識別するための他の方法は、ステーションに関してポリマーの個々のユニットを過渡的に移動させる工程であって、個々のユニットの同一性は未知である工程と、ユニットまたはステーションの検出可能な物理的变化から生じる信号を検出する工程と、ポリマーの隣接する信号生成ユニットをステーションに曝すことによって生じる信号から前記信号を個々のユニットの同一性を示すものとして判別する工程とを包含する。

従って、一つの局面において、本発明の方法は、ポリマーの一つ、一部または全てのユニットを識別するために用いられ得る。これは、骨格上のその特定の位置で検出される信号が特定の標識化ユニットの存在の特性を示すかを決定することによって、個々のユニットのタイプおよびポリマーの骨格上でのそのユニットの位置を識別することによって達成される。

本発明の方法は、ポリマーの他の構造上の特性を識別するためにも有用である。本発明の方法によりポリマーを分析することによって得られる構造上の情報は、ポリマーの特性的特徴の識別を含み得、これらの特徴は（ひいては）、例えば、サンプル中のポリマーの存在の識別またはポリマーの関連性の決定、ポリマーのサイズの識別、ポリマーの二つ以上の個々のユニットの間の近さまたは距離の識別、ポリマー中の二つ以上の個々のユニットの順序の識別、および/またはポリマーのユニットの一般的組成の識別を可能にする。このような特性は、サンプル中の特定のポリマーの有無の決定などの様々な目的に有用である。例えば、ポリマーが核酸であるとき、本発明の方法は、特定の遺伝子配列が細胞または組織中で発現されるかどうかを決定するために用いられ得る。特定の配列の有無は、サンプル中のいずれかのポリマーが、目的のポリマー中のみで見出される個々のユニットの特性パターンを発現するかどうかを決定することによって、すなわち、検出された信号を公知のポリマーの特徴を示す信号の公知のパターンと比較し、分析されているポリマーの公知のポリマーへの関連性を決定することによって、確立され得る。目的となるポリマー

10

20

30

40

50

の全配列は、サンプル中のポリマーの有無を確立するために決定される必要はない。同様に、本発明の方法は、一つのポリマーから検出された信号を、別のポリマーからの信号のパターンと比較し、これらの二つのポリマーの関連性を決定するために有用であり得る。ポリマーの二つの個々のユニットの近さ、またはこれらの間の距離が、本発明の方法によって決定され得る。いくつかの理由で、二つのユニットの近さ、またはこれらの間の距離を決定し得ることが重要である。ポリマーの各ユニットは、骨格に沿って特定の位置を有する。ユニットの配列は、公知のポリマーについては青写真となる。未知のポリマー上の二つ以上のユニットの間の距離は、公知のポリマーの青写真と比較され、これらが関連しているかを決定し得る。さらに、二つのユニットの間の距離を決定するための能力は、目的の二つのユニットの間にユニットが存在する場合に、いくつかのユニットがあるかを決定するために重要である。

10

連結したユニットのポリマーの二つの個々のユニットの近さを決定するために、ポリマーがステーションに関して移動され、ここで各個々のユニットがステーションに曝され、ユニットまたはステーションの検出可能な物理的变化から生じる特性信号が生成される。次いで、生成された各特性信号が検出され、各特性信号の検出の間の経過時間量が上記のように測定される。経過時間量は、これら二つの個々のユニットの近さを示す。ステーションは相互作用ステーションであり得、ユニットは因子に曝され、電磁信号を生成し得る。本明細書で用いられる「相互作用の特徴を示す信号」は、ステーションと特定の標識化ユニットとの間の相互作用から生じることが予測される信号である。生成された特定の信号は、ステーションのタイプおよび標識化ユニットのタイプに依存する。例えば、ステーションが電磁放射線である因子であり、標識化ユニットが発蛍光団である場合、これら二つの間の相互作用の結果、発蛍光団が放射することが公知である波長での発蛍光団による電磁放射線放射を生じる。ステーションがシンチレーション層である因子であり、ユニットが放射活性である場合、これら二つの間の相互作用の結果、蛍光の形で電磁放射線放射を生じる。

20

本発明の方法を用いてポリマーのユニットの順序を決定することが可能である。本発明の一つの局面において、ポリマーの二つの個々のユニットの順序は、ステーションに対してポリマーを直線的に移動させ、個々のユニットのうちの二つをステーションに曝し、ステーションまたはユニットの物理的变化から生じる第1および第2の検出可能な信号を生成することによって決定され得る。信号の順序は、二つの個別ユニットの順序を示す。

30

ポリマーのユニットの一般的な組成も、本発明の方法によって決定され得る。例えば、ポリマーが核酸である場合、本発明の方法は、核酸中のプリン対ピリミジンのパーセンテージ、またはA、C、TおよびGのパーセンテージについての情報を提供し得る。

サンプルのサイズについての定量的情報も、本発明の方法によって決定され得る。例えば、ポリマーのサイズは、ポリマーを構成する個々のユニットの数を決定することによって決定され得る。ポリマーを構成するユニットの数は、相互作用部位でポリマー全体が因子を通過して直線的様式で横切るために必要な時間量を測定し、特定のタイプのポリマーの個々のユニットがその部位を通過して完全に横切るための平均時間長さでその時間量を除算することによって決定される。

特定のユニットに関する情報に加えて、本発明の方法は、ポリマーについての情報を提供するために、一つを超えるユニットを同時に識別するために用いられ得る。一つの局面において、連結したユニットの標識化ポリマーを提供し、全ての連結したユニットより少ない数の連結したユニットの標識化ユニット特異的マーカーからの信号を検出し、および検出された信号のシグネチャーを保存してポリマーを分析することによって、本方法は実行される。本発明のこの局面において、標識化ポリマーの各ユニットがユニット特異的マーカーで標識化されても、あるいは全てのユニットよりも少ない数のユニットがユニット特異的マーカーで標識化されてもよい。

40

この方法は、ポリマーの複数のユニットを同時に分析するために特に有用である。これは、標識化され、一つを超えるユニットと配列特異的様式で相互作用するユニット特異的マーカーを用いることによって達成される。本明細書で用いられるように、「ユニット特異

50

的マーカー」は、ポリマーの一つ以上のユニットと特異的に相互作用し、これらのユニットを識別し得る化合物である。例えば、核酸分子のためのユニット特異的マーカーは、TG、AG、ATCなどの塩基の特定の配列に結合する標識化二量体、三量体などであり得る。標識化マーカーの存在または位置を識別することによって、ポリマーについての構造上の情報が導き出され得る。例えば、ポリマー上にマーカーが存在することにより、ポリマーの同一性を明らかにし得る。これによって、溶液中またはポリマー混合物中のポリマーの有無が決定され得る。ポリマー上のマーカーの順序、距離、数などは、ポリマーの配列または組成についての情報を提供し得る。他のユニット特異的マーカーは、配列特異的主溝および副溝結合剤およびインターカレーター、配列特異的DNAおよびペプチド結合タンパク質、配列特異的ペプチド - 核酸などを含むが、これらに限定されない。多くのこのようなユニット特異的マーカーが存在し、当業者には周知である。

このタイプの分析が、ポリマーの個々のフラグメントへの複数のプローブのハイブリダイゼーションパターンを分析することによって、DNAフラグメントを識別するために一つの実施態様において用いられ得る。DNAのハイブリダイゼーション分析のための現在の最新の方法は、DNA小片 (chip) に依存する。本発明の方法は、多くの理由で有利である。DNAの未知のフラグメントに結合する複数のプローブ間の数、タイプ、順序および距離が決定され得る。この情報は、異なって発現される遺伝子の数を明確に識別するために用いられ得る。現在のハイブリダイゼーション研究方法は、所定のフラグメントに結合するプローブのタイプのみを決定し得る。さらに、本発明の方法は、特定の発現された遺伝子の実際の数を正確に計り得る。現在の方法は蛍光強度の定量化に依存し、これは検出システム中の非線形性のために誤差を生じさせることが多い。多量の情報が生成されたと仮定すると、本発明の方法は、発現された遺伝子の選択または未知の核酸がアッセイされることを必要としない。これは、異なる遺伝子についての異なるDNA小片、発現された遺伝子の組が分析されること、また異なる有機体が必要となることは異なっている。本発明の方法は、生成されたハイブリダイゼーションパターンのコンピュータ分析によって未知の発現された遺伝子を識別し得る。次いで、DNAプローブの線形分析から得られたデータは、データベース中の情報と一致させられ、標的DNAの同一性が決定される。従って、本方法は、ハイブリダイゼーション反応からの情報を分析し得、次いで、この情報は遺伝子発現パターンの診断および決定に適用され得る。

本明細書において用いられる「シグネチャー」は、標識化ポリマーから生じる配列特異的信号である。シグネチャーは、ポリマーの構造に関する情報を含む。例えば、ポリマーのシグネチャーは、一連の連続するユニットによって、または互いに特定の距離をおいた特定のユニットによって規定され得る。ポリマーのシグネチャーはポリマーを識別する。DNAの鎖の長さに沿ったある位置で塩基を識別することによってフラグメントの識別のみを行うために、シグネチャーは有用である。いずれか一つの位置が分かる確立は $1/4$ である。フラグメントの明確な識別は、およそ20個の位置が識別される結果となる ($1/4^{20} = 9.1 \times 10^{-13}$)。20個の検出された標識および10%の検出 / 標識化を有するフラグメントについては、フラグメントの大きさは200塩基対のみであることが必要とされる。提案された読み出し長さはキロベースのオーダーであり、これはいずれものフラグメントを明確に識別する長さとなっている。フラグメントの識別によって、同様の配列によるグループ化が可能になり、集団分析による配列再構成が可能になる。

本発明の分析の好ましい方法は、放射性標識化ポリマーの使用を伴う。放射活性放射のタイプは、用いられる検出装置のタイプに影響を与える。概して、アルファ、ベータ、およびガンマ放射線を含む、三つの異なるタイプの核放射線がある。アルファ放射線は、物質 (matter) 中の広範囲なイオン化を生じさせ、イオン化チャンバおよび比例計数器による個々の計数を可能にするが、さらに興味深いことには、物質 (matter) と相互作用するアルファ放射線は分子励起も生じさせ得、この結果として蛍光が生じ得る。蛍光は、シンチレーションと称される。アルファ崩壊よりも弱いベータ崩壊は増幅され、適切な信号を生成し得る。ガンマ放射線は、励起エネルギーの内部変換から生じる。ガンマ光線のシンチレーション計数は有効であり、強力な信号を生成する。ヨウ化ナトリウム結晶は、入射ガ

10

20

30

40

50

ンマ放射線で蛍光を発する。

本明細書で用いられる「シンチレーション」層または材料は、核放射による励起にตอบสนองして蛍光を発する、または発光するいずれものタイプの材料である。シンチレーション材料は、当該分野において周知である。共鳴構造を有する芳香族炭化水素は、優れたシンチレータである。アントラセンおよびスチルベンが、このような化合物のカテゴリーに入る。無機結晶もまた、蛍光を発することが知られている。これらの化合物がルミネセンスを示すためには、無機結晶は、価電子帯と伝導帯との間にエネルギーレベルを形成する少量の不純物を有さなければならない。従って、励起および脱励起が生じ得る。多くの場合、脱励起はリン光性光子放出を介して生じ得、それにより検出の継続時間が長くなる。いくつかの一般的なシンチレータは、NaI (TI)、ZnS (Ag)、アントラセン、スチルベンおよび可塑性蛍光体を含む。

10

核放射線を測定するための多くの方法が当該分野において公知であり、クラウドおよびバブルチャンバ装置、一定電流イオンチャンバ、パルスカウンタ、気体カウンタ

(すなわち、Geiger-Müller計数管)、

固体検出器 (表面バリア検出器、リチウムドリフト型検出器、固有ゲルマニウム検出器)、シンチレーションカウンタ、チェレンコフ検出器などの装置を含む。

放射標識化ポリマーの分析は、ポリマー依存インパルスを生成する他の手段と同一である。例えば、放射標識化 A を有するサンプルは、システムによって分析され、サンプル DNA 上の A の相対的な間隔を決定し得る。放射信号の検出の間の時間は、分析されるポリマーに特徴的である。標識化 DNA の四つの集団 (A、C、G、T) の分析は、分析されるポリマーの配列を生成し得る。DNA の配列は、二重標識化 DNA および単一標識化 DNA の組み合わせの分析を含む、より複雑な機構を用いても分析され得る。A および C で標識化フラグメントの分析に続き、同一のフラグメントの A で標識されたものの分析を行うことによって、A および C の位置がわかる。手順が相補的な鎖について繰り返される場合は、配列が公知である。システムは、ポリマー (ポリペプチド、RNA、炭水化物など)、サイズ、濃度、タイプ、同一性、存在、配列および数の分析のためにさらに用いられ得る。

20

上記の方法は、ポリマーについての構造上の情報を決定するために、一つのポリマーまたは一つを超えるポリマーに行われ得る。本発明は、複数のポリマーへ上記の方法を実施することを含む。これらの方法および本発明の方法を複数のポリマーに同時に行うための装置は、以下で詳細に記載される。

30

上記の方法の一部は、検出可能な信号を生成するためのエネルギー移動またはクエンチングを伴う相互作用に基づく。エネルギー移動またはクエンチングを伴うことは、本発明のこれらの実施態様における二つの制限のいずれか一つに記載されている。一つの制限は、相互作用に関わる因子が、電磁放射線、クエンチング源または蛍光励起源からなる群から選択されることである。もう一つの制限は、検出可能な信号が電磁放射線信号であることである。各方法が、記載された一つの制限の代わりに別の制限を含み得、また、エネルギー移動またはクエンチングを伴う相互作用の概念も含むことが、当業者に明らかであるべきである。例えば、電磁放射線、クエンチング源および蛍光励起源からなる群から選択される因子にポリマーのユニットを曝し、検出可能な信号を生成させることによってポリマーを分析するための方法を含むことに加えて、これらの実施態様における本発明は、ポリマーのユニットを因子に曝して、検出可能な電磁信号を生成させることによってポリマーを分析するための方法も含む。

40

エネルギー移動、クエンチングまたは電磁放射線信号を伴う方法に加えて、上記の本発明の方法は、ポリマーのユニットまたはステーションの検出可能な物理的变化から生じる信号を検出することによって行われ得る。本明細書において用いられるように、ポリマーのユニットまたはステーションの「検出可能な物理的变化」とは、ユニットをステーションに曝す結果としてポリマーのユニットまたはステーションに生じるいずれものタイプの変化である。一旦ユニットがステーションに曝されると、検出可能な信号が生成される。ステーションは、例えば、相互作用ステーションまたは信号生成ステーションであり得、これらの各々が本明細書中で詳細に論じられる。検出可能な信号を生成するためのステーシ

50

ョンまたはユニットに生じる変化のタイプは、ステーションのタイプおよびユニットのタイプに依存する。変化を受けて検出可能な信号を生成するステーション - ユニットの組み合わせのいくつかの例は、例示の目的のために本明細書において論じられる。当業者は、本発明の範囲内に入る他のステーション - ユニットの組み合わせを導き出し得る。

ステーションとポリマーのユニットとの間の相互作用がエネルギー移動に基づくとき、ユニットまたはステーションのいずれか、あるいはこれらの両方が物理的に変化して信号を生成し得る。一つの実施態様において、ステーションはユニットにエネルギーを移動させ得、ユニットにエネルギー - ユニットの特異的信号を発生させる。ユニット中に生じる物理的变化は、エネルギー状態の変化から生じる。別の実施態様において、ユニットはエネルギーをステーションに移動し得、ステーションに特定のエネルギー移動から生じるユニット特異的信号を発生させる。さらに別の実施態様において、パートナー (partner) 化合物が、信号を生成させる物理的变化を生じさせ得る。放射活性ユニットとステーションとの間に相互作用が生じるとき、ユニットはエネルギーを放出することによって物理的に変化

10

する。
本発明の他の局面は、複数のポリマーを分析するための方法を含む。各ポリマーは、信号生成ステーションでの複数のポリマーのユニットの相互作用を逐次的に検出することによって分析される。これらの方法は、試験ポリマーを特徴付けるための方法、ポリマーの配列決定のための方法、ポリマーのユニットの順序を決定するための方法、ポリマーのユニットの間の距離を決定するための方法、およびポリマーの組を分析するための方法を含むが、これらに限定されない。これらの方法は、エネルギー移動またはクエンチングから生

20

じる相互作用を含むが、これらに限定されない。
試験ポリマーを特徴付けるための方法は、複数の各ポリマーについてポリマー依存インパルスを得、複数のポリマーのポリマー依存インパルスを比較し、ポリマーのポリマー依存インパルスの間の類似性に基づいてポリマーの関連性を決定し、関連するポリマーのポリマー依存インパルスに基づいて試験ポリマーを特徴付けることによって行われる。

本明細書で用いられる「ポリマー依存インパルス」は、ポリマーの一つのユニットのみの構造上の特性に関する情報を伝送するまたは運ぶ、検出可能な物理量である。物理量は、検出され得るいずれもの形であり得る。例えば、物理量は、電磁放射線、化学伝導率、電気伝導率などであり得る。ポリマー依存インパルスは、エネルギー移動、クエンチング、伝導度の変化、機械的变化、抵抗変化、または他のいずれもの物理変化から生じ得る。ポリマー依存インパルスは特定のユニットに特異的であるが、一つを超える特定の標識ユニットを有するポリマーは、一つを超える同一のポリマー依存インパルスを有する。さらに、特定のタイプの各ユニットは、異なる標識を有する場合、異なるポリマー依存インパルスを生じ得る。

30

ポリマー依存インパルスを検出するために用いられる方法は、生成される物理量のタイプに依存する。例えば、物理量が電磁放射線である場合、ポリマー依存インパルスは光学的に検出される。本明細書で用いられる「光学的に検出可能な」ポリマー依存インパルスは、光検出画像化システムによって検出され得る電磁放射線の形態である光ベースの信号である。物理量が化学伝導率である場合、ポリマー依存インパルスは化学的に検出される。

「化学的に検出される」ポリマー依存インパルスは、化学伝導率を測定するための通常の手段によって検出され得る、イオン伝導率などの化学濃度または電荷の変化の形をとる信号である。物理量が電気信号である場合、ポリマー依存インパルスは抵抗または容量の変化の形をとる。

40

本明細書で用いられるように、「ポリマーの関連性」は、そのポリマーに独自のものであるポリマーの特性パターンを識別することによって決定され得る。例えば、ポリマーが核酸である場合、ポリマー内の10個の連続するヌクレオチドの実質的にいずれもの配列が、この核酸分子の独自の特性となる。10個のヌクレオチドの配列と同一の配列を示す他のいずれもの核酸分子が、関連するポリマーである。

「複数のポリマー」は、少なくとも二つのポリマーである。好ましくは、複数のポリマーは、少なくとも50個のポリマーであり、より好ましくは、少なくとも100個のポリマーで

50

ある。

ポリマー依存インパルスは、ポリマーについてのいずれものタイプの構造上の情報を提供し得る。例えば、これらの信号は、ポリマーの全配列の全体または一部、ポリマー依存インパルスの順序、またはポリマー依存インパルスの間の分離時間をユニット間の距離を示すものとして提供し得る。

ポリマー依存インパルスは、信号生成ステーションでポリマーのユニットと環境との間で生じる相互作用によって得られる。本明細書で用いられる「信号生成ステーション」は、ユニットが環境と相互作用し、ポリマー依存インパルスを生成する領域であるステーションである。本発明のいくつかの局面において、ポリマー依存インパルスは、ユニットと相互作用して検出可能な信号を生成し得る、電磁放射線、クエンチング源、および蛍光励起源からなる群から選択された因子との規定された領域内での接触から生じる。別の局面において、ポリマー依存インパルスは、分子との相互作用にตอบสนองして、伝導率の特定の変化を受け得る化学環境との規定された領域における接触から生じる。特定の構造を有する分子が化学環境と相互作用すると、伝導率に変化が生じる。特定の構造に特異的である変化は、一時的な変化であり得、例えば、伝導率が変化するために必要となる時間の長さは、相互作用が特定の構造または物理変化を伴うことを示し得る。例えば、相互作用の強度の変化は、特定の構造との相互作用を示し得る。別の局面において、ポリマー依存インパルスは、ポリマーユニットに隣接して配置された微小電極 (microelectrode) またはナノ電極 (nanoelectrode) の間のユニットの移動によって生じる容量または抵抗の変化から生じる。例えば、信号生成ステーションは、ポリマーユニットの対向する側に配置された微小電極またはナノ電極を含み得る。電極を通過するユニットの移動の結果として生じる、抵抗または伝導率の変化は、特定のユニットに特異的である。

二つの個々のユニットの間の距離を決定するための方法も、本発明に含まれる。連結したユニットのポリマーの二つの個々のユニットの間の距離を決定するために、ポリマーは信号生成ステーションに関して直線的に通過させられ、二つの各個々のユニットが信号生成ステーションを通過すると生成されるポリマー依存インパルスが測定される。次いで、各工程が複数の類似するポリマーに対して繰り返される。ポリマーの各ユニットが信号生成ステーションを逐次的に通過するとき、ポリマーは信号生成ステーションに関して直線的に通過すると称される。

データセットを生成するために、各工程が複数の類似するポリマーに対して繰り返される。次いで、二つの個々のユニットの間の距離は、データセットを分析することによって複数の類似するポリマーから得られる情報に基づいて決定され得る。

本方法は、標識を含むポリマーの量を識別するための方法も含む。例えば、サンプル中の特定のユニットまたはユニットの組み合わせを有するポリマーの数を決定することが可能である。例えば、mRNAのサンプル中では、サンプル中に存在する特定のmRNAの数が決定され得る。これは、所望のmRNA分子のパターンまたはシグネチャー特性を識別することによって達成される。次いで、RNAのサンプルは本発明の方法によって分析され得、特定のパターンまたはシグネチャーを有するmRNA分子の数が決定され得る。

本明細書で用いられるように、「類似するポリマー」は、少なくとも一つの重畳領域を有するポリマーである。類似するポリマーは、ポリマーの同種 (homogeneous) の集団であっても、ポリマーの異種 (heterogenous) の集団であってもよい。本明細書で用いられる「同種の集団」は同一のポリマーのグループである。類似するポリマーの「異種の集団」は、同一ではないが、同一のユニットの少なくとも一つの重畳領域を含む類似するポリマーのグループである。重畳領域は、代表的には、少なくとも10個の連続するヌクレオチドからなる。重畳領域が、少なくとも11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または22個の連続的なヌクレオチドから成る場合もある。

「複数の類似するポリマー」は、二つ以上の類似するポリマーである。好ましくは、複数の類似するポリマーは、50個以上の類似するポリマーである。より好ましくは、複数の類似するポリマーは、100個以上の類似するポリマーである。

本明細書で用いられる「データセット」は、類似するポリマーによって生成されるポリマ

10

20

30

40

50

ー依存インパルスを規定する情報のセットである。データセットは上述のように分析され、用いられる分析法は、標識化ポリマーを生成するために用いられる標識化機構のタイプに依存する。核酸配列決定は、本発明の方法の特に好ましい実施態様である。

現在は、5%未満のヒトゲノムの配列が決定されている。これはヒト配列知識における基準の小さなフラクションに変換され、全ての個体の配列である。例えば、ヒト集団には、 1.4×10^{19} (50億人 $\times 3 \times 10^9$ 塩基/人)がある。現在まで、全てのヒト遺伝子情報の 2×10^{-10} パーセントのみが公知である。全ての世界中の労力によるヒトゲノムの配列決定の速度は、 $> \$ 1$ / 塩基の費用でおおよそ 3×10^9 / 15年、すなわち550000塩基/日である。本明細書に記載される本発明の方法による配列決定は、配列決定の速度における顕著な進展となる。一つの機械で一人のヒトゲノムを完了するための予測時間は、約15時間である。並行していくつかのダイナミックアレイが、一時間の何分の一かの時間で一人のヒトゲノムの配列を完了し得る。

10

連結したユニットのポリマーの配列決定のための方法も、本発明によって含まれる。本方法は、複数の各重畳するポリマー、他のポリマーと同一である連結したユニットの配列を有する各ポリマーの少なくとも一部からポリマー依存インパルスを得、ポリマー依存インパルスを比較して、複数のポリマー中で同一である連結したユニットの配列を得ることによって行われる。

複数の重畳ポリマーは、各ポリマーが他のポリマーと同一である連結したユニットの配列の少なくとも一部を有する、ポリマーの組である。同一である配列の一部は重畳領域と称され、これは少なくとも10個の連続するユニットを含む。

20

本発明の別の局面において、連結されたユニットのポリマーのユニットの順序は、信号生成ステーションに関して直線的にポリマーを移動させ、各々が特性ポリマー依存インパルスを生じる二つの個々のユニットの各々が信号生成ステーションを通過するときに生成されるポリマー依存インパルスを測定することによって決定され得る。これらの工程は、複数の類似するポリマーに対して繰り返され、少なくとも二つの個々のユニットの順序が、複数の類似するポリマーから得られる情報に基づいて決定される。

セットの各ポリマーが連結されたユニットの個々のポリマーの組を分析するための方法は、本発明によって含まれる。本方法は、ポリマーの組を互いに平行に配向させる工程、およびポリマーのポリマーに特定の特性を検出する工程を伴う。

上記1組のポリマーは、互いに平行に配向される。これらのポリマーは、ポリマーを互いに平行に配置させることが可能なあらゆる手段によって配向され得る。例えば、ポリマーに電界を印加することによって平行形態に配向させることが可能である。好ましくは、この配向工程はゲルの無い溶液中で行われる。

30

本明細書で用いられる「ポリマー特異的特徴」とは、その配列に関するポリマーのあらゆる構造的特徴である。例えば、ポリマー特異的特徴は、ポリマーの長さ、ポリマー中の連結したユニットの順序、ポリマーユニット間の距離、ポリマー中でのユニットの近接度、ポリマーユニットの1つ、いくつかまたは全ての配列、およびポリマーの存在等のポリマーに関する情報を含むが、これらに限定はされない。

ポリマー特異的特徴を検出する工程は、全てのポリマーについて同時に行われ得る。この工程は、全てのポリマーの各ユニットを順次検出することを包含する。これは、複数の信号発生ステーションに対して各ポリマーを直線的に通過し、上記ポリマーが上記信号発生ステーションを通る際に発生するポリマー依存性インパルスを検出および区別することによって行われ得る。

40

本発明は、1組のポリマーであって、その組のポリマーのそれぞれが連結したユニットの個々のポリマーである、1組のポリマーを分析する方法をも含む。この方法は、電界中で上記1組のポリマーを配向し、定義された各チャンネルを通してこの1組のポリマーを同時に動かし、そして、ポリマーをチャンネルを通して動かす際にポリマー特異的特徴を検出することによって行われる。各チャンネルを通して1組のポリマーを同時に動かす工程は、各ユニットが個別に上記ステーションを通るようにチャンネル毎に1つのポリマーを動かすことによって行われる。ポリマーが縦一列に配置され且つ一度に1つのユニットだけが1つ

50

のステーションと相互作用するのであれば、一度に複数のポリマーがチャンネル内にあって
もよい。

本明細書で用いられる「定義された各チャンネル」とは、ポリマーを入れる前にその構造が
決められたチャンネルであり、ポリマーがそのチャンネルを通過するように定義された経路に
沿って通るようにしたチャンネルである。ゲルマトリクスに見られるようなチャンネルは、定
義された各チャンネルではない。

本発明の方法は、エネルギー移動またはクエンチングが可能な2つの相互作用するパート
ナー間での共鳴エネルギー移動またはクエンチングを検出するためにも使用できる。本明
細書で用いられる共鳴エネルギー移動(R E T)とは、オーバーラップする発光および吸
収スペクトルを有する2つの化合物間における光子エネルギーの移動である。蛍光共鳴エ
ネルギー移動(F R E T)は、発光団間における光子エネルギーの移動である。上記2
つの相互作用するパートナーは、エネルギー移動またはクエンチし得る任意の化合物、即
ち、発光化合物またはクエンチャーである。

10

本方法は、2つのパートナーを上記のような移動またはクエンチングを可能にするのに十
分に近接させ、これらのパートナーの一方に、電磁放射線、クエンチング源および蛍光励
起源からなる群より選択される因子を付与し、材料シールドを用いて、電磁放射線の放射
およびパートナー間の相互作用によって生じる蛍光共鳴エネルギーの移動およびクエンチ
ングをシールドし、そして、放射された電磁放射線を検出することによって行われる。

本明細書で用いられる「材料シールド」とは、エネルギー移動またはクエンチングを防止
または制限する任意の材料である。このような材料には、伝導性材料、高インデックス(
h i g h i n d e x)材料および光不透過性材料が含まれるが、これらに限定はされない。
好適な実施形態においては、材料シールドは伝導性材料シールドである。本明細書で
用いられる「伝導性材料シールド」とは、少なくともドナー源およびアクセプター源間
におけるエネルギー移動を防ぐのに十分に伝導性である材料である。

20

上記した本発明の各方法は、少なくとも配列決定ポリマーの様々な局面において有用であ
る。また、これらの方法は全て、ポリマー分析方法に関連して記載される様々な標識化ス
キームとともに使用できる。

本発明の方法は、ポリマーの個々のユニットについて特定の検出可能な信号を生成する任
意のデバイスを用いて達成できる。この種の分析を可能にするデバイスの種類の1つは、
相互作用ステーションまたは信号発生ステーションを通るポリマーの直線的な移動を促進
するものである。本発明の局面の1つによれば、本発明の方法を実施するのに有用な製品
が提供される。本製品は、チャンネルを規定する表面を有し、電磁放射線源、クエンチング
源、発光フィルム層および蛍光励起源からなる群より選択される因子をチャンネルに近接し
て壁材料に付着させた壁材料であって、上記因子は、チャンネルを通過する発光化合物お
よびクエンチャーからなる群より選択されるパートナー化合物と検出可能に相互作用する
のに十分にチャンネルに近接して十分な量で存在する壁材料を含む。

30

本明細書で用いられる「壁材料」とは、少なくとも1つのチャンネルを支持できる任意の寸
法の固体または半固体のバリアである。半固体材料は、自立(self supporting)材料で
あり、例えば、ポリアクリルアミドゲルのようなゲル材料であり得る。例えば、壁材料は
、伝導性または非伝導性、光透過性または光不透過性、透明または不透明であり得る単
一の支持材料で構成され得る。いくつかの例においては、この因子が壁材料内に埋め込ま
れる。そのような例においては、壁材料中に形成されたチャンネルに因子を曝露して、信号を
発生させるように、壁材料を全体的または部分的に非伝導性層、光透過性層または透明層
で形成し得る。壁材料を部分的にのみこれらの材料で形成する場合、残りの壁材料は、信
号発生を防止する、伝導性で光不透過性または不透明の層で形成され得る。いくつかの例
においては、壁材料は、異なる材料の層で形成される。例えば、壁材料は、単一の伝導性
層および単一の非伝導性層で形成され得る。あるいは、壁材料は、2つの伝導性層で囲ま
れた単一の非伝導性層で形成され得る。本発明の壁材料には、複数層および様々な材料の
組み合わせが包含される。

40

本明細書で用いられる「発光フィルム層」とは、元来発光性であるフィルム、または、何

50

らかの励起または照明手段によって発光性になるフィルム（例えば、内面反射によって照明される電気光学薄フィルムおよび高インデックスフィルム）である。

本明細書で用いられる「伝導性材料」とは、少なくともドナーおよびアクセプター間におけるエネルギー移動を防止するのに十分に伝導性である材料である。

本明細書で用いられる「非伝導性材料」とは、ドナーおよびアクセプター間におけるエネルギー移動を可能にする量未満の量を伝導する材料である。

本明細書で用いられる「光透過性材料」とは、使用される特定の電磁放射線、クエンチング源、または蛍光励起源によって生じる波長の光に対して透過性である材料である。

本明細書で用いられる「光不透過性材料」とは、使用される特定の電磁放射線、クエンチング源、または蛍光励起源によって生じる波長の光に対して不透過性である材料である。

本明細書で用いられる「チャンネル」とは、ポリマーが通過し得る媒体を通る経路である。

ポリマーがチャンネルを通過し得る限り、チャンネルは任意の寸法を有し得る。例えば、チャンネルは分岐の無い真っ直ぐな円筒状チャンネルであってもよいし、あるいは、相互接続された曲がりくねった（winding）チャンネルの分岐したネットワークであってもよい。好ましくは、チャンネルは真っ直ぐなナノチャンネルまたはマイクロチャンネルである。本明細書で用いられる「ナノチャンネル」とは、ナノメートルのオーダーの寸法を有するチャンネルである。ナノチャンネルの平均直径は1 nm ~ 999 nmの間である。本明細書で用いられる「マイクロチャンネル」とは、マイクロメートルのオーダーの寸法を有するチャンネルである。マイクロチャンネルの平均直径は1 μm ~ 1 mmの間である。本発明において有用なチャンネルの好適な仕様および寸法を以下に具体的に記載する。好適な実施形態において、チャンネルは壁に固定される。

因子は、壁材料のチャンネルを通過するパートナー発光化合物によってエネルギーの移動またはクエンチングを生じることによってパートナー化合物と検出可能に相互作用するように壁材料に付着される。パートナー化合物と相互作用するように、因子は、チャンネルに近接して配置され得る。例えば、因子は、チャンネルの内側に付着させてもよいし、壁材料の外側表面に付着させてもよいし、チャンネルの縁を包囲する壁材料の外側表面の集中（concentrated）領域に付着させてもよいし、壁材料内に埋め込んでもよいし、あるいは、チャンネルを包囲する壁材料中に同心リング状に埋め込んでもよい。任意に、因子は、壁材料の表面全体を覆ってもよいし、あるいは、壁材料全体にわたって埋め込まれてもよい。因子が局在化していないときに信号の発生を向上させるために、因子の局在化した領域のみが露出するように、マスクを用いて壁材料の一部の領域を覆ってもよい。本明細書で用いられる「マスク」とは、任意の大きさおよび形状の開口部を有する物体である。因子がパートナー因子に曝露されたときに異なる信号を生成するように、壁材料に複数の因子を付着させてもよい。

因子は、当該分野において公知のあらゆる実行される付着手段によって、壁材料の表面に付着させ得る。生体適合材料（biomaterial）を結合させる方法の例は、本明細書中で参考として援用されるHermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc., San Diego, 1996に示されている。

因子を壁材料の表面に付着させるとき、因子は壁材料に直接付着させてもよいし、リンカーを介して付着させてもよい。本明細書で用いられる、因子の付着に関する「リンカー」とは、発光化合物またはクエンチング化合物を壁材料に結合する（tethers）分子である。リンカーは当該分野において周知である。一般的に使用されるリンカーには、様々な長さのアルカンが含まれる。

因子は、パートナー発光化合物と検出可能に相互作用するのに十分な量で壁材料に付着される。本明細書で用いられる「パートナー発光化合物」とは、先に定義されたような発光化合物であるが、因子と特異的に相互作用し、因子に近接して配置されたときにエネルギー移動またはクエンチする発光化合物である。必要となるパートナー発光化合物の量および因子の量は、使用される因子および発光化合物の種類に依存する。

本発明の製品の別の実施例は、複数のチャンネルを規定する表面と、チャンネルの少なくとも1つに隣接する壁材料の別個の（discrete）領域に付着されるステーションとを有する壁

10

20

30

40

50

材料であって、上記ステーションが、チャンネルを通過する連結したユニットのポリマーにおける検出可能な物理的变化、または、ポリマーがステーションに曝露される際のステーションにおける検出可能な物理的变化によって信号を生じさせるのに十分にチャンネルに近接して十分な量で存在する、壁材料である。チャンネルの少なくとも1つに隣接する壁材料の「別個の領域」は、ステーションを有していない壁材料によって包囲された局所的なエリアである。この別個の領域を包囲するエリアは、ユニットと相互作用してユニットのステーションとの相互作用によって生じるものと同じ特性信号を生じることではない。別個の領域は、チャンネル内またはチャンネル近傍に配置され、これにより、別個の領域におけるステーションがチャンネルを横断するユニットに曝露される。

本発明によるまた別の製品は、チャンネルを規定する表面と、チャンネル近傍の壁材料の別個の領域にそれぞれ付着させた複数のステーションとを有する壁材料であって、上記ステーションが、チャンネルを通過する連結したユニットのポリマーにおける検出可能な物理的变化、または、ポリマーがステーションに曝露される際のステーションにおける検出可能な物理的变化によって信号を生じさせるのにチャンネルに十分近接して十分な量で存在する、壁材料である。

本明細書で用いられる「複数のステーション」とは、少なくとも2つのステーションである。好ましくは、複数のステーションは、少なくとも3つのステーションである。別の好適な実施形態では、複数のステーションは、少なくとも5つのステーションである。

好適な実施形態において、本製品はナノチャンネルプレートである。プレート内に埋め込まれた発蛍光団を有するナノチャンネルプレートの最適な設計についての下記の説明は、例示する目的で記載されるに過ぎない。本実施例では、本製品のいくつかの局面を最適化するための方法を記載する。この説明は、いかなる意味においても、本明細書中で請求される製品を限定するものではない。

ナノチャンネルプレートのいくつかの実施例を図4に示す。図4Aには、伝導性材料層(62)および非伝導性材料層(64)を有するナノチャンネルプレート(60)を示す。チャンネル(70)は、2本鎖標識DNAの通路を直線様式で包含するのに十分な直径を有する。本実施例においては、ドナー発蛍光団(68)は、透明な非伝導性材料の中で、各チャンネルの周りに同心リング状に埋め込まれている。ナノチャンネルプレートの残りの部分は、光不透過材料(66)で形成されている。

図4B、図4C、図4D、図4Eおよび図4Kは、チャンネル(70)によって形成される開口部を包囲するように、壁材料の表面に付着させた発蛍光団(68)を有するナノチャンネルプレートを示す。図4Bおよび図4Dに示すように、発蛍光団は、壁材料の表面全体を覆ってもよい。また、発蛍光団は、表面全体を覆う代わりに、図4C、図4Eおよび図4Kに示すようにチャンネル開口部の周囲に集中させてもよい。さらに、発蛍光団を支持する壁材料は、図4Dおよび図4Eに示すような伝導性層(62)であってもよいし、壁材料は図4Kに示すように光不透過層(78)であってもよいし、また、壁材料は図4Bおよび図4Cに示すように支持層(72)であってもよい。支持層は、伝導性、非伝導性、透明、光透過性および光不透過性を含むが、これに限定はされない任意の種類の壁材料であり得る。

図4F、図4G、図4H、図4Iおよび図4Lは、チャンネル(70)を包囲する壁材料の中に埋め込まれた発蛍光団(68)を有するナノチャンネルプレートを示す。この場合も、発蛍光団は、壁材料全体にわたって延在(図4Fに図示)してもよいし、図4G、図4Hおよび図4Iに示すようにチャンネルの周囲に集中していてもよい。図4F、図4G、図4H、図4Iおよび図4Lに示す実施形態においては、発蛍光団は、非伝導性材料層(62)または透明材料層(74)または光透過性材料層(79)の中に埋め込まれる。発蛍光団が埋め込まれた層によって、図4Fおよび図4Gに示すように壁材料の表面を形成してもよいし、または、この層を他の層の間に挟持してもよい。例えば、図4Hおよび図4Iの非伝導性層(64)は、2つの伝導性層(62)の間に挟持されている。図4Lの光透過性層(79)は2つの光不透過性層(78)の間に挟持されている。いくつかの場合においては、図示した層が壁材料全体を形成する。他の場合においては、これらの層は、支持

10

20

30

40

50

層に隣接してもよいし、または、図 4 I に示すように支持層の間に挟持されてもよい。

図 4 J は、チャンネル (70) によって形成される開口部を包囲するように、壁材料の表面に付着させた発蛍光団 (68) を有するナノチャンネルプレートを示す。チャンネル内の表面を含む壁材料の露出表面の全てを包囲する材料は、伝導性材料である。

図 4 M および図 4 N は、チャンネル (70) の少なくとも一部を包囲するように、壁材料内に配置された発光薄フィルム (76) を有するナノチャンネルプレートを示す。発光薄フィルムは、図 4 M に示すように壁材料の表面を形成し且つ光不透過性層 (78) に隣接するか、または、図 4 N に示すように 2 つの光不透過性層 (78) の間に挟持されてもよい。図 4 O および図 4 P は、壁材料内に埋め込まれた、または壁材料の表面に付着させた 2 つの発蛍光団層 (68) を有するナノチャンネルプレートを示す。図 4 O の場合、発蛍光団層 (68) は、壁材料のいずれかの側で伝導性材料 (62) の表面に付着し、チャンネルによって形成される開口部を包囲する。図 4 P の場合、発蛍光団層 (68) は、光不透過性層 (78) を挟持する 2 つの光透過性層 (79) 内に埋め込まれている。

本発明の好適な方法は、上述したように、放射標識されたポリマーの分析を含む。(例えば、 ^{32}P または ^3H を用いて) 放射標識された DNA 等のポリマーの調製は当該分野において公知である。以下の説明では、本発明の方法による放射標識されたポリマーの分析の数多くの可能な実施形態のうちの 1 つを示す(図 4 Q および図 4 R)。放射標識された核酸分子 (160) を、単一の製造された多層ナノチャンネルプレート (162) を用いて分析する。ナノチャンネルは、標識された核酸分子の直径であり、定義された検出領域を得るように構成されている。図 4 Q および図 4 R に示す例示的なナノチャンネルプレートは、鉛またはルーサイト (Lucite) フィルム (164、166) 等の 2 つの放射線不透過性層、および、低密度材料のフィルム (または、シンチレーション層) (168) (即ち、従来のポリマー、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン (polystyrene)、テフロン等) からなる不均質多層構造である。図 4 Q の鉛フィルムは、低密度材料層を挟持し、放射線の通過を防ぐような厚さである。低密度材料は、放射線の通過を可能にし、これにより、定義された放射線検出領域を形成する。DNA 上の放射標識が定義された検出領域を通過すると、核放射線が放射され、その一部は定義された放射線検出領域を通過する、図 4 R は、チャンネルによって形成される開口部を包囲する低密度材料 (168) を有するナノチャンネルプレートを示す。チャンネル内の表面を含む壁材料の露出表面の全てを包囲する材料は、放射線不透過性層 (165) である。

放射標識されたヌクレオチドの分析についての関連実施形態(図 5)では、シンチレーション計数および複数のナノチャンネルプレートを用いた検出システムを示す。図 5 に示すように、ナノチャンネルアレイ (170) が製造される。出力データの平行増幅のために、複数の多層チャンネル (172) が存在する。個々のチャンネルはそれぞれ、核放射線をシールドする 2 つの放射線シールド層 (174) と、核放射線への曝露によって蛍光励起されるシンチレーション層 (176) とからなる。個々のチャンネルは、核放射線シールド材料によって互いに分離されている。光学品質ルーサイト (または、核放射線の通過を防ぐ他のあらゆる透明材料) を重ねることによって、核放射線が蛍光検出システムに到達するのを防ぐ。これにより、蛍光信号のみを検出システムに到達させることができる。

上記ナノチャンネルはのそれぞれは、一例に過ぎない。従って、いずれかの要素 1 つまたは要素の組み合わせを含むこれらの実施形態に関して記載される限定事項のそれぞれが、各ナノチャンネルに含まれ得ることが想起されている。異なる材料による複数の層を有するフィルムの調製は、当該分野において、例えば米国特許第 5,462,467 号の Ferreira ら, Thin Solid Films 244:806-809 (1994) に既に記載されている、。

提供される実施例においては、ドナー強度を最適化するために、ドナー発蛍光団を、各チャンネルの周囲で同心リング状に集中させる。エネルギー移動の範囲は、部分的には半径方向のフォルスター距離によって限定されるので、同心リングが好適であることが直感的にわかる。1 つのチャンネルを詳細に調べてみると、同心リング構成のおかげで生じることができるドナー強度の顕著な変化が示される。図 6 は、同心リング構成を有する単一チャンネル (82) を示す。最外周同心リング (86) が、チャンネルの周囲に配置されたドナー発

蛍光団のエッジを示す。中間同心エリア (8 4) は、ドナーからアクセプターへのエネルギー移動率がドナー発蛍光団の放射率よりも高い領域を示す。

ドナー発蛍光団を固体媒体中に埋め込む理由は、フォトブリーチングおよびクエンチングのメカニズムを調べることによって最も良く理解される。蛍光信号を減衰させ得るファクターには、フォトブリーチング、温度クエンチング、エネルギー移動クエンチング、衝突クエンチング、励起状態反応、および溶媒効果が含まれる。これらのメカニズムは、それらが全て衝突または二分子の事象によって生じるという点で類似している。固体媒体は、これらの望ましくない分子プロセスに対する物理的バリアであり、ドナー発蛍光団を分離する手段である。例えば、フォトブリーチングのメカニズムは、非蛍光生成物を形成する励起された発蛍光団と酸素との間の反応によるものである (Menterら, 1978; Menterら, 1979; Giloh and Sedat, 1982)。固体媒体、特に無酸素環境下で製造されたものは、酸素が埋め込まれた発蛍光団に到達するのを防いで、可能性のある酸化反応を排除する (GarlandおよびMoore, 1979; Rost, 1990)。固体媒体の効果をさらに理解するために、他のクエンチング効果の簡単なまとめを示す。温度クエンチングは、温度の上昇に伴う蛍光の減少である。温度依存性の度合いは化合物に依存するが、通常、摂氏 1 度あたりクエンチング量は約 1 % である (Guilbault, 1973)。この効果は、分子運動および衝突頻度が増大して、これにより、蛍光を生じ得る前に基底状態に遷移する確率が高くなるためであると考えられる。衝突クエンチングは、発蛍光団と別の分子との直接的な接触を含む数多くの可能なメカニズムで構成される広いカテゴリである (Lakowicz, 1983)。励起状態反応は、近傍の溶媒分子との反応における発蛍光団の反応性励起状態を含み、衝突クエンチングの部分集合を構成する (Porter, 1967; Zweig, 1973)。溶媒効果は、水素結合効果、酸塩基化学、および電荷移動相互作用を含む溶媒 - 発蛍光団の衝突および相互作用からなる (Lakowicz, 1983)。エネルギー移動クエンチングは、望ましくない FRET を介した発蛍光団の不純物の影響に起因する。フォトブリーチングおよびクエンチングメカニズムの一部を列挙したが、ここから、発蛍光団発光の減衰の主な原因は発蛍光団との分子相互作用であることが明らかである。このように、固体媒体は、発蛍光団を分離して、望ましくないクエンチング分子の侵入を防ぐ物理的バリアを形成することによって、これらの望ましくない分子相互作用、衝突および反応を排除する。

エネルギー移動に対する固体媒体の影響を決定するには、エネルギー移動を規定する方程式を調べるべきである。考えなければならない方程式はフォルスター距離を記述する (Salvin, 1995; CantorおよびSchimmel, 1980; WuおよびBrand, 1994; Cleggら, 1995; FaircloughおよびCantor, 1978)。

$$R_0 = \frac{\sqrt[6]{8.79 \times 10^{-5} J \phi_D \kappa^2}}{n^4}$$

J は、ドナーの発光とアクセプターの吸収との間の正規化されたスペクトルオーバーラップであり、 ϕ_D は、アクセプターが無い状態でのドナーの発光の量子効率 (または量子収率) (ϕ_D は、放出される光子の数を吸収される光子の数で割ったもの) であり、n は、屈折率であり、 κ^2 は、2 つの遷移双極子の相対角度に関する幾何学的ファクターである。固体媒体中にドナー発蛍光団を埋め込むことによって、屈折率 n が大きくなる。溶媒系の場合、n は、水の場合の値 (1 . 3 3) よりも僅かに高い約 1 . 3 5 にする (Selvin, 1995)。固体媒体の典型的な値は、融解石英の場合 1 . 4 6、クラウンガラスの場合 1 . 5 2、重フリントガラスの場合 1 . 6 6 である。固体媒体および溶媒系の R_0 の比を利用して、屈折率を変化させる効果の大きさを決定することができる。

$$\frac{R_0}{R_0'} = \left(\frac{n}{n'} \right)^{2/3}$$

ここで、ダッシュの付いた値は固体媒体についての値であり、ダッシュの付いていない値は溶媒系についての値である。n' = 1 . 5 と仮定すると、上記比は 0 . 9 3 になる。従って、フォルスター距離は 7 % しか変化しない。これは、より高い元々の R_0 値を有する

10

20

30

40

50

ドナー - アクセプター対を用いて容易に補正できる値である。

再び図 6 を参照して、概念的に、方程式を示すまでもなく、チャンネルの中心からのエネルギー移動率 ($k_{transfer}$) は、その中心から離れるに従って小さくなる (図 6)。アクセプターが無い場合に、ドナーの発光率 (k_{emit}) が、ドナー発蛍光団のエリア全体にわたって均一であることも公知である (図 6)。チャンネルおよびアクセプターに最も近いエリアは、完全にクエンチされる。 R_{equal} 未満である全てのエリアにおいて、ドナー発蛍光団は完全にクエンチされる。なぜなら、 $k_{transfer}$ が k_{emit} よりも大きいからである。 R_{equal} よりも大きいエリアにおいては、ドナーの発光率がエネルギー移動率よりも大きく、従って、クエンチングは不完全である。

ドナー発蛍光団の同心円リングが R_{equal} に等しい半径を有している場合、ドナー発蛍光団に 100% の強度変化が起こり得る。このことは、アクセプタ標識されたヌクレオチドがチャンネルを通して出ると、アクセプタが完全な効率で検出されることを意味する。信頼区間 (confidence interval) がシステムの SNR に関連することを考えると、そのような変化のための 99.9% の信頼区間を生成するために必要な最小の信号対ノイズ比は 6:1 であると計算される。提案されている検出システム用の SNR は 600:1 よりも大きい。

R_{equal} を計算するための定量的説明を以下に述べる。ドナー発光およびエネルギー移動の速度のための式を示す。ドナー発光速度 (k_{emit}) は以下の通りである。

$$k_{emit} = \frac{I \xi \rho N}{h \nu}$$

ここにおいて、 I はドナー発蛍光団に入射する光の強度であり、 ξ はドナー発蛍光団のモル消光係数であり、 ρ は蛍光発光用定数 ($3.8 \times 10^{-21} \text{ mol cm}^3 / \text{L}$) であり、 N はドナー発蛍光団の数であり、 h はプランク定数 ($6.6261 \times 10^{-34} \text{ J s}$) であり、 ν は励起光の周波数である。

多くのドナーから 1 つのアクセプタへのエネルギー移動速度 ($k_{transfer}$) は、1 つのドナーおよび 1 つのアクセプタに関するオリジナルのフェルスター速度式 (Förster, 1965)

から導出される。オリジナルの式は、以下の通りである。

$$k = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_o}{r} \right)^6$$

ここにおいて、 k は 1 つのドナーから 1 つのアクセプタへのエネルギー移動速度であり、 R_o はフェルスター距離であり、 τ_D はドナーの蛍光寿命であり、 r はドナーからアクセプタまでの距離である。マルチドナーシステムの導出は直接的であり、上述したマルチドナーシステムの議論に従う。

マルチドナーシステムのために転換されるエネルギーの量には 2 つの限定がある。第 1 には、アクセプタの寿命によって課せられる飽和限度がある。アクセプタは基底一重項状態にあるときであればいつでも励起することができるというだけである。1 ns の寿命を有するアクセプタの場合、上限は 1×10^9 励起イベント / 秒である。単一の発蛍光団に対して低い励起速度を与えられた場合 (25,000 励起イベント / 秒)、このように大きな飽和レベルはほとんど問題ではない。第 2 の限定は、ドナー発蛍光団の同時脱励起 (de-excitation) の可能性である。上記で計算したように、同時に起こり得る脱励起イベントの数は非常に少ない。アクセプタは、エネルギー移動の結果起こる励起イベントでは飽和されず、かつ、同時ドナー脱励起の可能性は低いため、マルチドナーシステムについてのエネルギー移動速度はドナー発蛍光団の数 (N) に正比例する。

$$k_{transfer} = \frac{N}{\tau_D} \left(\frac{R_o}{r} \right)^6$$

上記式によると、 $k_{transfer}$ が $k_{emit} (R_{equal})$ に等しい場合の半径は、2 つの速度式

10

20

30

40

50

を等式化して r を求めることにより得られる。

$$k_{emit} = K_{transfer} \Rightarrow \frac{I\xi\rho N}{h\nu} = \frac{N}{\tau_D} \left(\frac{R_o}{r} \right)^6$$

r を求める。

$$r = R_{equal} = \frac{R_o}{\sqrt[6]{\tau_n I \xi \rho / h \nu}}$$

R_{equal} の数値が計算され得る。表 3 は、変数の値と特定の値が選択される理由とをリストアップしている。

表 3		
変数	値	理由
R_o	60Å	フェルスター転換の範囲が20Å~100Åである。
τ_D	1×10^{-9} s/光子	蛍光寿命が1 ns~20nsの範囲である。
h	6.6261×10^{-34} J s	プランク定数
ν	$6.1224 \times 10^{14} \times s^{-1}$	$c=\nu\lambda$; $\lambda=490$ nm (フルオロセインの励起)
I	30 W/cm ²	2Wレーザの強度は P/A で表される。 A =ビーム領域 ($r=2$ mm). レーザの強度は64 W/cm ² である。
ϵ	91,000l/M cm	フルオロセイン用モル消光係数
ρ	3.8×10^{-21} M cm ³	フルオロセインの蛍光発光用定数
R_{equal}	350Å	上記の式より

R_{equal} は、350 、すなわち、フェルスター距離の大きさのオーダー内であると計算される。このことは、350 に等しい半径を有するチャネルの回りの発蛍光団の同心円リングは、アクセプタ標識が通過するとすぐ、信号強度の100%変化を引き起こすことを意味する。実際には、このように大きなドナー強度の低下を有することは、信号検出の面および隣接する塩基 (base) を分解する必要性の面の両方から不要である。例えば、S/NRが600:1である場合、僅か0.50%の強度変化が99.9%の信頼区間を引き起こす。隣接する塩基間の分解は、ドナー層内に1つのアクセプタではなく2つのアクセプタが存在する際のドナー発光の更なる低下を見ることにより可能である。1つのアクセプタが既にドナー発光をゼロまで低下している場合、更なるアクセプタは検出されない。なぜなら、ドナー発光はこれ以上低下し得ないからである。この局面を以下に詳細に述べる。光不安定な保護基および光回折を用いて各チャネル回りのドナー発蛍光団の同心円リングを構築する方法の例もまた以下に提供する。

少なくとも1 nmのチャネル直径サイズを有するナノチャネルは、Poretics, Inc.よりポリカーボネートフィルタという形態で市販されており、Corning Separations, Inc.により注文製造され得る。所望の直径を有するナノチャネルを作成するために、いくつかの方

10

20

30

40

50

法が用いられ得る。

ナノチャネルプレートを調製する1つの方法は、膜材料中で均一な直径を有する円筒状孔を生成するトラック・エッチ手順である。10 nmのオーダーの孔直径とほぼ 10^9 孔/ cm^2 の孔密度とを有するマイクロ孔性およびナノ孔性ポリマー膜が、トラック・エッチ法により調製され得る(R. L. Fleischer, P.B. Price, R.M. Walker, Nuclear Tracks in Solids (Univ. of California Press, Berkeley, CA (1975))。トラック・エッチ法による孔の製造は、2工程プロセスである。第1の工程では、薄いポリカーボネート(または他のポリマー材料)フィルムを、原子炉内で、コリメート(collimate)され荷電された粒子に曝す。これらの粒子は、ポリカーボネート材料を通過する際に、感光性を与えられたトラックを残す。トラックの密度は、フィルムを原子炉内に置く時間を変えることにより制御される。第2の工程では、粒子が残したトラックを優先的にエッチングまたは溶解することにより、均一な円筒状チャネルを得る。穿孔の直径は、フィルム上でのエッチャントの滞留時間により制御され得る。トラックエッチされた膜を形成する方法の多くの例が、当該分野で記載されている。例えば、Varian Associates Inc.の欧州特許出願第83305268.1号(公開番号第0109147号)、米国特許第3,303,085号、第3,662,178号、第3,713,921号、第3,802,972号、第3,852,134号、第4,956,219号、第5,462,467号、第5,564,959号、および第5,449,917号である。これらは各々、参考として本明細書中で援用される。

市販の膜は概してポリカーボネートまたはポリエステルから調製されるが、他の多くの材料がトラック・エッチプロセス(Id.)の影響を受けやすい。例えば、他のポリマー材料は、ポリスチレン;芳香族ポリエステル;ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレンを含むポリオレフィン;ポリビニルジフルオライド(PVDF)などのビニルプラスチック;および硝酸セルロース、酪酸セルロース、および酢酸セルロースなどのセルロースエステルを含むがこれらに限定されない。本発明のナノチャネルプレートは、トラック・エッチ技術で調製される場合、トラックエッチされることができトラックエッチされた膜を形成するために用いられ得るいずれの材料からも形成され得る。

高エネルギー粒子を有する材料のボンバード(bombardment)を行うデバイスは、研究および工業において周知である。トラックを形成するために用いられる粒子は、静電加速器(例えば、Van de Graaff加速器またはTandem加速器)などの荷電粒子加速器、線形加速器またはサイクロトロンなどのサイクリック加速器、または当該分野で公知の他の手段により生成され得る。

一旦ダメージを受けたトラックがフィルム内に形成されると、気体または液体中でフィルムを選択的にエッチングすることによりチャネルまたは孔が形成される。エッチャントの滞留時間がチャネルのサイズを決定する。トラックエッチされたフィルムは、所望の適用に合致するサイズを有するチャネルを形成するために十分な時間、エッチャントに曝される。所望の適用に合致するサイズは、分析されるポリマーのタイプおよび分析のタイプにより異なる。チャネルの直径は、M. Mulder、Basic Principles of Membrane Technology, Klumer Academic, 1991に開示された方法に従って走査電子顕微鏡(SEM)を用いて測定され得る。

規定された直径を有するナノチャネルを作成する第2の方法は、トラックエッチングと表面コーティングとの組み合わせを用いることである。所望のナノチャネルデバイスより大きい直径を有するポリカーボネート膜に、規定された厚みを有する材料の薄フィルムでコーティングする。得られる構造は、所望の直径を有するまでコーティングされたポリカーボネート膜表面である。ナノチャネルプレートに付加された薄フィルムの第1の層は、伝導層である。伝導層は、隣接する塩基を分解することを補助する(以下に、より詳細に述べる)。

伝導性ポリマーの薄い層は、溶媒の蒸着によりポリカーボネート膜に付加される。伝導性ポリマーの溶媒蒸着は記載されている(Cheungら、1994; Ferreiraら、1994; FerreiraおよびRubner、1995; FouおよびRubner、1995)。以下はFouおよびRubner、1995からの抜粋で

ある。

「我々は、ポリピロールおよびポリアニリンなどの伝導性ポリマーを、フィルム厚みとフィルム構成との両方に対してオングストロームレベルの制御を有する多層薄フィルムにする操作をするために、記載されている層毎の処理技術を利用するために必要な溶液化学および方法について述べる。300 S/cmを越える伝導性を有する超薄フィルムが作製され得る。プロセスは、希釈溶液からの基板上に、電気的伝導性ポリマーの単層を自発的に吸着することを含む。後の多層薄フィルムは、溶融可能なポリアニオンを交互に蒸着することにより生成される。薄フィルムの厚みは、オングストロームレベルに厳密に制御され得、5 と 1000 を越える値との間の範囲であり得る。用いられる伝導性ポリマーは、ポリピロールおよびポリアニリンである。なぜなら、これらは、超薄層（約50）に 10
対して高度に伝導性（300 S/cm）になり得るからである。」

所望のナノチャネルを形成するために溶媒蒸着法を用いることの利点は、2つある。まず第1に、任意の特定の直径を有するナノチャネルが精密かつ正確に形成され得る。第2に、ナノチャネルプレートの第1の層は伝導層であるため、伝導層を付加するのは非常に容易である。さらなる利点は、重要ではないが、伝導性材料の厚フィルムを付加することによりポリカーボネート表面の最高点と最下点との間の距離が減少し得、それにより、より均一な表面が形成されることである。

本発明のナノチャネルデバイスを調製する別の方法は、炭素ナノチューブ（nanotube）のアレイの形成による。Iijimaは、六角形状に結合した炭素原子の複数の同心円状円筒形シェルの形成を示し、上記シェルは、1次元空間内に種を閉じ込める触媒的表面として作用し得る。Iijima、Nature、354:56（1991）。米国特許第4,424,054号をも参照のこと。 20

Li, W. Z.らもまた、大面積の、高度に秩序立った（ordered）隔離された長い炭素ナノチューブの形成方法を報告している。方法は、遷移性金属ナノ粒子で覆われたカーボンブラックおよびグラファイトまたはシリカではなく、孔内に埋め込まれた鉄ナノ粒子を含有する中間孔性（mesoporous）シリカを利用する、化学蒸着法に基づく。以下の方法はLi, W. Z.らに記載されている。

「ナノ粒子を含有する中間孔性シリカを、硝酸鉄水溶液中におけるテトラエトキシシラン（TEOS）加水分解からのソルゲルプロセスにより調製した。分析的に純粋なTEOS（10 ml）を10.4 mlの分析的に純粋なエチルアルコールおよび0.1 M硝酸鉄水溶液（11.4 ml）と、約30分間磁気攪拌により混合した。その後、濃縮フッ化水素（0.2 ml）を数滴加え、混合物を15分間攪拌した。混合物をゲル化した後、ゲルを60 で1週間乾燥させることにより、過剰の水および他の溶媒を除去した。その後ゲルを450、 10^{-2} torrで10時間 か 焼した。孔内に埋め込まれた酸化鉄ナノ粒子を含有する比較的均一な孔を有するシリカネットワークを得た。その後酸化鉄ナノ粒子を550、流動する9% H_2/N_2 （110 cm³/分）の180 torrで5時間還元することにより、鉄ナノ粒子を得た。得られた鉄ナノ粒子は高い触媒活性を有する。その後、9%アセチレンの窒素混合物を110 cm³/分の流速でチャンバに導入し、700 30

でアセチレンを分解することにより得られた炭素原子を蒸着することにより炭素ナノチューブを基板上に形成した。サンプルを、炭素の蒸着の前後に走査電子顕微鏡（SEM）（S-4200、Hitachi）で検査した。SEMに取り付けられたSiLi検出器によりエネルギー拡散X線スペクトル（EDX）を記録した。透過電子顕微鏡（TEM）標本を調製するために、サンプルをモルタル中で粉碎し、エタノール中に懸濁した。その後1滴を孔を有する（holey）炭素銅グリッド上に垂らしてJEM200-cx顕微鏡で調べる 40
ことにより、炭素ナノチューブを特徴づけた。」

さらに、ナノチャネルは、アノード多孔性アルミナからも調製され得る。アノード多孔性アルミナは、中央に、円筒状の、典型的には直径4~200 nmの範囲の均一サイズの孔を有する、柱状六角形セルがバックされたアレイである。このタイプの膜は、アルミニウム金属から電気化学的に調製される（A. DespicおよびV. P. Parkhutik、Modern Aspects of Electrochemistry、J.O. Bockris、R.E. White、B. E. Conway編（Plenum、New York 50

、1989)、第20巻、第6章)。 10^{11} 孔/cm²ほども高い孔密度が達成されている(D. AlMawawi、N. Coombs、M. Moskovits、J. Appl. Phys. 70、4421(1991))。5nmほども小さい孔直径を有する膜が、この方法を用いて調製されている(そして、さらに小さい孔が調製され得る)。Martin、C. R.、Science、266:1961(1994)。

MatsudaおよびFukudaは、多孔性アルミナ膜の改変を述べている。高度に秩序立った金属(プラチナおよび金)ナノ孔アレイである膜は、アノード多孔性アルミナのハニカム構造の2段階複製を用いて調製される。多孔性アルミナのネガティブな孔構造を調製し、それに続いて、金属でポジティブな構造を形成する結果、アノード多孔性アルミナの形状的構造と同一の形状的構造が得られる。従って、この方法は、アルミナ以外の所望の材料で、アノード多孔性アルミナの孔アレイを調製することを可能にする。MatsudaおよびFukuda、Science、268:1466(1995)。MatsudaおよびFukudaの手順を以下にまとめる。

最小限の数の欠陥および転位を引き起こす、基板上での40Vでのアルミナの長時間アノード化に続いて、飽和H₂Cl₂でアルミニウム基板および多孔層の底部を除去することにより、アノードアルミナを生成した。材料をその後、5%(重量)燐酸溶液に30でディップすることにより、孔の直径を調整した。後の金属メッキプロセスのための触媒または電極を形成するために、アノード多孔性アルミナの底部に真空蒸着で薄い金属層を蒸着した。概して、エバポレーションには、基盤(scaffold)を形成する金属と同一の金属が用いられる。5%(重量)過酸化ベンゾイルなどの重合開始剤を含む金属メタクリレートモノマーを、真空条件下で孔に注入し、紫外線照射により重合した。その後、アルミナ層をNaOHで除去することにより、ポリ(メチルメタクリレート)(PMMA)のネガティブな多孔性アルミナタイプ構造を形成した。以下のようにプラチナの無電解蒸着を行うことにより、PMMA成形物でポジティブ構造を形成した。PMMAのネガティブタイプを、無電解メッキ溶液にディップし、金属蒸着を円筒状構造の底部で開始させ、次第にPMMAのキャビティを金属で満たし、PMMAのネガティブタイプの上部まで満たした。あるいは、対照的な条件下で、AuをPMMAのマイクロキャビティ内に電気化学的に蒸着させることにより金(Au)孔アレイを調製した。アセトンでPMMAを分解することにより、多孔性金属を得た。

当該分野で記載されている他のナノ多孔性材料は、 3×10^{10} 孔/cm²ほどの高い孔密度を有するナノチャネルアレイガラス(R. J. Tonucci、B. L. Justus、A. J. Campillo、C. E. Ford、Science 258、783(1992)、ならびに、PearsonおよびTonucci、Science、270:68(1995))を含む。Douglasらは、バクテリア由来のタンパク質内のナノ視的な(nanoscopic)孔が、これらの孔の像を下の基板に移動するために用いられ得ることを示した(Douglasら、Science 257:642(1992))。最後に、Ozinは、テンプレート材料として用いられ得る広範囲の種々のナノ孔性固体について述べている(Ozin、G. Adv. Mater. 4:612(1992))。Nishizawaらは、0.8nmほども小さい半径を有する金属ナノ細管膜の生成を記載しており(Nishizawaら、Science 268:700(1995)、金を市販のポリカーボネート濾過膜(Poretics)中の孔の壁にメッキすることにより形成されるナノ細管について記載している。上記膜は、均一な半径(25nm、 6×10^8 孔/cm²)を有し膜の完全な厚み(6μm)を貫通する円筒状ナノ孔を含む。「孔壁上に蒸着されたAu層の厚みは、メッキ時間を変化させることにより制御され得る。その結果、Auナノ細管の内径は思いのままに変化され得る[細管含有膜を横切る気体(He)フラックスの測定から決定されるように]。」Berggrenらは、自己アセンブル単層および中性不活性ガスのピームを用いてナノリトグラフィー用技術を示した。Berggrenら、Science 269:1255-1257(1995)。

La Silvaらは、走査トンネリング顕微鏡(STM)を用いる、10から100ナノメートル代の寸法を有し、周囲の環境から部分的に電氣的絶縁されている簡単な金属構造を製造するための技術について記載している。この方法は、非常に薄い金属膜を絶縁基板上に堆積し、そのチップを用いて、横方向の電氣的絶縁が所望される膜によってギャップを形成することによって実施される。(Journal of Vacuum Science & Technology B、(1993) 11: 1992-1999)

10

20

30

40

50

壁材料 (wall material) は、ポリマーの隣接するユニットを分離するのに最適なように構築され得る。壁材料の目的は、信号の発生を助ける環境を提供することであるので、壁材料を調製するために用いられる材料は、このプロセスを助けるように選択され得る。例えば、因子が壁材料に埋め込まれている場合、この因子を取り囲む壁材料は、非伝導性または光透過性材料であるのが好ましい。チャンネルを取り囲む壁に発蛍光団が埋め込まれた装置において壁材料を最適にするには、少なくとも他に 2 つの機構があり、それは、隣接する標識された塩基を分離するために、薄い伝導層を用いることと、各チャンネルの周りにあるドナー発蛍光団の半径を制御することとである。

伝導層は、電氣的シールドディングを通したフォースター (Förster)

10

エネルギーの移動を防止する。図 6 は、ドナー発蛍光団を含む、非伝導層に対する伝導層の構成を示す。伝導「サンドウィッチ」は、エネルギーの移動が起こり得る限定された領域を形成し、これによって、塩基の分離の最適化が助けられる。フォースターエネルギー移動は、ドナーとアクセプターとの間の電氣的双極子 - 双極子相互作用のために発生する。生成信号が FRET に依存する場合に伝導層を使用する理由は、FRET が電界依存性であるので、ドナーとアクセプターとの間に電氣的遮蔽を形成することでエネルギー移動が防止されることである。エネルギー移動の原理を十分に理解する必要がある。入射励起光はドナー中に電界を形成する。これは、光がドナー内の遷移を誘導するか、またはドナー内の電子を振動させるためである (Selvin, 1995 年)。これによって、ドナー中に誘導された電気双極子モーメントが形成され、次いで、それ自体の電界が形成される。エネルギー移動は、アクセプターがドナーの電界内に配置されるときに起こる。この結果、誘導された双極子モーメント p_A を形成する遷移がアクセプター内に誘導される。双極子モーメントのサイズは、ドナー電界のサイズに関連する： $p_A = \epsilon_A E_D$ 、ここで、 ϵ_A は、アクセプターの分極率である。アクセプターによって吸収されるエネルギーの量は、 $p_A E_D = \epsilon_A E_D^2$ 、これを書き換えると、エネルギー移動率の $1/R^6$ 依存ということになる。

20

電気シールドディングの理論は、最も初歩的な物理学の本において見いだされる。Purcell (1985 年) は、明確な説明を提供する。ボックス内のポテンシャル関数 (x, y, z) は、ラプラス方程式 $\nabla^2 = 0$ を満足させなければならない。伝導体に関する情報が与えられると、伝導体の境界は等電位となり、これは、伝導体の表面のいずれにおいても $\phi = \phi_0$ 定数関数であることを意味する。ラプラス方程式の明白な解答は、容量全体にわたって $\phi = \phi_0$ であることである。一意性の定理によると、解答は 1 つのみであり得る。これは、答えが $\phi = \phi_0$ 定数であることを意味する。 $E = -\text{grad } \phi$ であるため、定数ポテンシャル関数の電界はゼロである。従って、電界は、ボックス内のいずれにおいてもゼロである。

30

開口穴を有するボックスのモデルは、ナノチャンネルプレートに適用され得る。これは、ナノチャンネルプレートが、実質的に、多くの「穴」を有する伝導ボックスであるからである。図 7 A および図 7 B を参照のこと。図 7 A は、ナノチャンネル (90) を有する完全なナノチャンネルプレートを示す。ドナー発蛍光団 (88) の層は、伝導「ボックス」によって取り囲まれている。このように、電氣的シールドディング (92) のために、ボックスの外側からのドナー発蛍光団へのエネルギー移動はあり得ない。エネルギー移動の原理が電氣的であることを喚起されたい。ナノチャンネルプレートの外面であるナノチャンネルの境界条件では、 $\phi = \phi_0$ 、等電位表面である。ラプラス方程式の論理的な解答は、境界条件内のいずれにおいても $\phi = \phi_0$ 定数であることである。一意性の定理から、これは、唯一可能な解答であるので、伝導ナノチャンネル「ボックス」内のいずれにおいても、 $E = -\text{grad } \phi$ のため $E = 0$ である。結論は、アクセプター発蛍光団が、ボックス外側からのエネルギーの移動を受けることがあり得ないことである。図 7 B に示すように、ナノチャンネル内であっても、エネルギー移動は幾何学的に限定される。アクセプター分子が、ドナー発蛍光団の面内にはない任意の位置では、エネルギー移動量は限定される。図 7 B において、エネルギー移動を受けることがあり得ないドナー発蛍光団の量は、アクセプター発蛍光団がドナー発

40

50

蛍光団の面内に直接ない（これは所望の構成である）限り大抵の場合非常に大きい の角度で取り囲まれる。

伝導層のために、標識ヌクレオチドがナノチャネルを通過することで、鋭い信号が形成される。図 8 A および図 8 B は、アクセプター標識がナノチャネルを通過するときの信号の生成を示す。図 8 A は、1 つのナノチャネル（98）の拡大図を示す。伝導層（94）の一部のみを示す。光不透過性ポリカーボネート層は図示されていない。DNA 鎖上のアクセプター標識（100）は、ナノチャネルを通して下部から上部へと、位置 A から開始して位置 C まで移動する。FRET は、位置 B においてのみ発生し得る。なぜなら、伝導層が、位置 A および位置 C において、ドナー発蛍光団（96）とアクセプターとの相互作用を遮蔽するためである。図 8 B は、アクセプター標識が位置 A から位置 C に移動するときの、ドナー強度の鋭い変化をグラフによって示す。グラフの中間領域は、ドナー発蛍光団のレベルを示す。グラフの外側領域は、伝導層のレベルを示す。伝導層とドナー発蛍光団層との界面には、電氣的シールドイングのために、ドナー強度が著しく変化する。

隣接する塩基間の分離は、伝導層によって分離され得ることは明白である。ドナー発蛍光団の厚さが $B - DNA$ （3.4）のらせん増加未満である箇所に伝導「サンドウィッチ」を形成することによって、所望の分離が成し遂げられ得る。この厚さの薄膜は、プラズマ、溶液、化学蒸気、またはイオンビーム堆積法（Spohr, 1990; Valiev, 1992; Konuma, 1992; Pauleau, 1995; Brunoら、1995; Dash, 1975; Stuart, 1983; Morosanu, 1990）を用いて容易に構築され得る。しかし、次の表題下で説明するように、3.4 未満のドナー発蛍光団膜を用いることは所望されない。要するに、より厚い層に埋め込まれたドナー発蛍光団によって、DNA 移動の瞬間的な速度が測定できる。厚い層内で標識ヌクレオチドが費やす時間を測定し、層の寸法を知ることによって、DNA 移動速度が分かり、これは、標識されたヌクレオチド間の距離を決定するのに重要である。

隣接する標識された塩基を正確に分離するための方法の他の例としては、各ナノチャネルの周りのドナー発蛍光団の半径を制御することが挙げられる。ドナー発蛍光団の同心リングの存在下で 2 つのアクセプター標識に対して移動されるエネルギーの量は、1 つのアクセプター標識に対して移動されるエネルギーよりも大きい。1 つのアクセプターおよび 2 つのアクセプターに対して移動されるエネルギーの差を検出することによって、隣接する塩基の分離が可能になる。ドナー発蛍光団が 1 つより多くのアクセプターと相互作用することを可能にするためには、ドナー発蛍光団の厚さは、DNA のらせんピッチよりも大きくなければならない。さらに、ドナー発蛍光団の半径は、1 つのアクセプターに対する R_{equal} よりも大きくなければならない（図 6 を参照）。1 つのアクセプターに対する R_{equal} よりも大きい半径は、1 つよりも多くのアクセプターの存在下で、ドナー強度のさらなる減少を可能にする。 R_{equal} における半径は、1 つのアクセプターが通過するときドナー強度減少が 100% に等しくなることを意味する。この場合、2 つの隣接するアクセプターが通過することによって、1 つのアクセプターと同じ検出信号が得られる。

図 9 は、適切な厚さを有するナノチャネル（104）を通した DNA の 2 塩基標識された鎖の通過（102）、および伝導材料（106）間に挟まれたドナー発蛍光団（108）の半径を模式的に示す。「A」から「D」と付された位置は、図の右側に示すグラフ上の記号に対応する。最初、DNA 上のアクセプター標識は位置 A にある。この位置ではエネルギー移動は可能ではないので、ドナー強度は、最大のままである。DNA がさらに移動すると、1 つのアクセプターは、ドナー発蛍光団（B）によりエネルギー移動を受けることができ、ドナー強度は著しく減少する。位置 C では、2 つの発蛍光団は、エネルギー移動を受け、ドナー強度はさらに減少し得る。最後に、2 つのアクセプター標識はドナー発蛍光団の領域から出て、これ以上のエネルギー移動は可能でなくなり、ドナー強度は最大（D）に戻る。

1 つのアクセプターおよび 2 つのアクセプターの存在下でのドナー放出の変化は、数学的な定量を用いずに、明視的に示され得る。図 10 A は、容量としての変化量を示す。図は、固体容量（110）としてのエネルギー移動量を示す。元々のドナー強度は、ディスク（112）の形状で容量として示される。図 10 B は、1 つのアクセプターに対する変化

10

20

30

40

50

を示す。図の右側は2つのアクセプターに関する。減衰曲線は、フォースター方程式によって与えられる半径距離に対するエネルギー移動速度を示す。2つのアクセプターに対する減衰曲線は、1つのアクセプターに対する減衰曲線のおよそ2倍である。ドナー放出速度およびエネルギー移動速度は、 $1/s \text{ nm}^2$ の単位で表される。エネルギー移動の表面エリアにわたるドナー放出減少速度の積分は、ドナー放出の正味の減少となる。これは、2で積分した各減衰曲線下の斜線エリアとして示される。元のドナー放出(2で積分した斜線長方形エリア)が分かれば、ドナー放出の減少%が見いだされ得る。

数学的に、変化は容易に計算され得る。両ケースにおいて、変化は、2で積分したストライプエリア(図10)と等しい。計算する際、ドナー放出およびエネルギー移動速度は、適切な $1/s \text{ nm}^2$ の単位で表されなければならない。そうするために、 N/A で与えられるドナー発蛍光団の密度は、速度方程式において用いられる。ここで、 N_D は、発蛍光団の数であり、 A は、ドナー発蛍光団によって占有されるエリアである。従って、放出速度は、以下の式で示される：

$$k_{emit} = \frac{I\xi\rho N_D}{h\nu A}$$

エネルギー移動速度は以下のようになる：

$$k_{transfer} = \frac{N_D N_A}{\tau_D A} \left(\frac{R_o}{r} \right)^6$$

ここで、 N_A は、ドナーによってエネルギー移動を受けることが可能なアクセプターの数である。2で積分したストライプエリアについての一般式は、以下の通りである：

$$\pi(R_{equal}^2 - R_{channel}^2)K_{emit} + \int_0^{2\pi R_{donor}} \int_{R_{equal}} k_{transfer} r dr d\theta$$

この計算では、 $R_{donor} = 55 \text{ nm}$ であり、 $N_D = 1000$ である。ドナー発蛍光団密度(N_D/A)は、 1 nm^2 当たり0.11発蛍光団となる。この値は、妥当である。なぜなら、最大の可能性の発蛍光団の面積のサイズが 1 nm^2 であるためである。これは、密度が、最も高い可能性の発蛍光団密度よりも少なくとも1桁低いことを意味する。

一般式を解くために、 R_{equal} が、 $k_{emit} = k_{transfer}$ と設定することによって得られ得ることを喚起されたい。この結果以下の通りになる：

$$R_{equal} = \frac{R_o}{\sqrt[6]{\tau_D I \xi \rho / N_A h \nu}}$$

以下のように示される元のドナー放出(E_o)を知ることにもまた重要である。

$$E_o = k_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2)$$

表3および上記から得られる値を用いると、エネルギー移動を受ける位置にある異なる数のアクセプターについて、ドナー放出値を表に示すことができる(表4)。 $N_A = 1 - 5$ 、 $11 - 12$ についての値を例として計算する。第1のドナー放出減少値が最大となると予想される。次の減少は次第に小さくなる。 R_{equal} が R_{donor} に近づく、実際(%でない)の変化はゼロに近づく、と予測される。これは、ドナー分子が実質的にほとんど完全に消滅する(quench)ためである。

検出能力を決定するのは、%変化および信号対ノイズ比であって、ドナー放出の絶対的な数値変化ではない。予想されるように、SNRは、アクセプターの数が増加するにつれて減少する。これは、ドナー消滅がより大きくなるためである。他に記載のない限り、ドナー放出は小さくなる。このSNRの減少は、 N_A を5%から12%に%増加させることによって補償される。信頼度は、SNRおよび%変化を用いることによって計算される。例えば、1つのアクセプターから2つのアクセプターへの変化を検出するための信頼度は、1つのアクセプターに対するSNRおよび1つのアクセプターから2つのアクセプターへ

10

20

30

40

50

の%変化を用いて得られる。この場合、0.483%の変化を検出する際の信頼度は95%である。%変化は高い(29.1%)であるため、1つのアクセプターから2つのアクセプターへの信号の変化は、100%の信頼度で検出される。上記からの計算は、複数の隣接するアクセプターが高効率で検出され得ることを示す。

表 4				
N_A	ドナー放出 (光子/S)	前回からの %変化	SNR (E_0, N_A) = 0 における 80 %の全能力	信頼度
0	2.5572×10^7	—	632:1	約 100%
1	1.0943×10^7	57.2%	413:1	“
2	7.7510×10^6	29.1%	348:1	“
3	5.7650×10^6	25.6%	300:1	“
4	4.3560×10^6	24.4%	261:1	“
5	3.2440×10^6	25.5%	225:1	“
“	“	“	“	“
11	3.8200×10^5	—	77:1	“
12	2.1200×10^5	44.5%	58:1	“

上記の計算から、1つの発蛍光団がドナー発蛍光団層を通過する間にドナー放出が一定となると想定される。ドナー発蛍光団層が、透明な非伝導性媒体に埋め込まれた発蛍光団の単層からなり得ることを喚起されたい。ナノチャネルの出口に近接したアクセプターについてのエネルギー移動の範囲は、チャネルに最初に入ったときの範囲よりも小さい。この変化は、以下に数学的に示すように、事実、有意である。この変化を考慮すると、信号対ノイズ比をより高くし、そしてさらなるアクセプターに対してドナー強度がより大きく変化することになる。これは、非常に効率的な信号生成/検出を示す表4の値がすでに、実質的にわずかに高いことを意味する。

アクセプターがドナー発蛍光団層を通過する際のドナー放出の変化は、次の式の計算によって決定される。有効なエネルギー移動範囲がより小さいため、アクセプターがドナー層を通過するにつれてエネルギー移動量は減少することが予想される。この減少の結果、ドナー放出は、前の計算よりも大きくなる。ドナー放出が高くなることは、SNRが高くなることを意味する。アクセプターがドナー層に少しの距離だけ入ると仮定する。その後すぐに、他のアクセプターがドナー層に入る。さらなるアクセプターの存在によって、ドナー放出は減少する。%変化は大きい。事実、%変化は前の計算よりも大きい。より高いSNRとより大きい%変化とが組合わさると、検出効率が前に見積もったよりも大きくなることを意味する。すべてのいくつかのヌクレオチドを標識するなど、複雑な標識パターンは、このシステムを用いて識別され得る。

アクセプターがドナー発蛍光団と同じ面にある場合のドナー放出の式は、以下のように表される：

$$k_{mit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [k_{emit} \pi(R_{equal}^2 - R_{channel}^2) + \int_0^{2\pi R_{donor}} \int_{R_{equal}} k_{transfer} r dr d\theta]$$

k_{emit} および $k_{transfer}$ についての式を喚起されたい。

$$k_{emit} = \frac{I \xi \rho N_D}{h \nu A} \quad k_{transfer} = \frac{N_D}{\tau_D A} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

半径距離 (x) およびドナー層 (d) からのアクセプターの距離に関して、元のドナー放出関数を以下を代入して表す。

$$dr = \frac{x}{\sqrt{x^2 + d^2}} dx \quad r = \sqrt{x^2 + d^2}$$

$k_{transfer}$ の式を代入すると次の式が得られる。

$$k_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [k_{emit} \pi(x_{equal}^2 - R_{channel}^2) + 2\pi \frac{N_D R_o^6}{\tau_D A} \int_{x_{equal}}^{R_{donor}} \frac{x}{(x^2 + d^2)} dx]$$

$u = x^2 + d^2$ とすると、 $dx = du / 2x$ となる。

$$k_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [k_{emit} \pi(x_{equal}^2 - R_{channel}^2) + 2\pi \frac{N_D R_o^6}{\tau_D A} \int_{U=x_{equal}^2+d^2}^{U=R_{donor}^2+d^2} \frac{1}{2u^3} du]$$

$$k_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [k_{emit} \pi(x_{equal}^2 - R_{channel}^2) + (2\pi \frac{N_{DR_o^6}}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4(x_{equal}^2 + d^2)^2} - \frac{1}{4(R_{donor}^2 + d^2)^2})]$$

x に $R_{equal}^2 - d^2$ を代入すると、以下の放出関数を得られる：

$$E(d) = k_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [k_{emit} \pi(R_{equal}^2 - d^2 - R_{channel}^2) + (2\pi \frac{N_{DR_o^6}}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4R_{equal}^4} - \frac{1}{4(R_{donor}^2 + d^2)^2})]$$

以下のドナー放出関数は、距離に対してプロットされ得る。

距離	ドナー放出 (光子 / S)	元からの % 変化
0	1.09425×10^7	-
20Å	1.09740×10^7	0.023 %
40Å	1.0692×10^7	1.158 %
60Å	1.12278×10^7	2.607 %
80Å	1.14501×10^7	4.638 %
100Å	1.17365×10^7	7.256 %

$$E_2(d) = k_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [k_{emit} \pi(x_{equal}^2 - R_{channel}^2) + (2\pi \frac{N_{DR_o^6}}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4(R_{equal}^2 + d^2)^2} - \frac{1}{4(R_{donor}^2 + d^2)^2}) + (2\pi \frac{N_D R_o^6}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4R_{equal}^4} - \frac{1}{4R_{donor}^4})]$$

上記の式の解答を得るためには、 k_{emit} を2つのアクセプターのエネルギー移動の合計と等しくすることによって、 R_{equal} を見いだす必要がある。以下の等式における R_{equal} についての解はコンピュータによって得られる。

$$k_{emit} = k_{transfer(1)} + k_{transfer(2)} \Rightarrow \frac{I \xi \rho N_D}{h\nu} = \frac{N_D}{\tau_D} \left(\frac{R_o}{R_{equal}} \right)^6 + \frac{N_D}{\tau_D} \frac{R_o^6}{(R_{equal}^2 + d^2)^3}$$

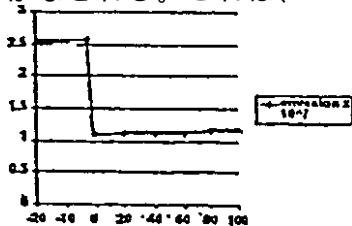
1つのアクセプターから2つのアクセプターへのドナー放出の%変化を表に表す。

距離 (d)	R_{equal} 2アクセプター	$E_2(d)$	$E_1(d)$	% 変化	SNR
0Å	39.28	7.7510×10^8	1.0943×10^7	29.10%	348.0:1
20Å	39.21	7.7661×10^8	1.0974×10^7	29.24%	348.3:1
40Å	39.11	7.8102×10^8	1.1069×10^7	29.44%	349.3:1
60Å	39.01	7.8815×10^8	1.1228×10^7	29.80%	350.9:1
80Å	38.82	7.9790×10^8	1.1450×10^7	30.31%	353.1:1
100Å	38.610	8.0962×10^8	1.1737×10^7	31.01%	355.7:1

10

$$\% \text{ 変化} = \frac{E_1(d) - E_2(d)}{E_1(d)} \times 100$$

従って、個々の塩基に至るまでの塩基の分離が成し遂げられ得る。塩基分離の議論に対して、個々のアクセプターによってドナー層内で費やされる時間が決定され得るという推論がなされる。これは、DNA移動の瞬間的な速度に関する情報と言い換えられる。



20

チャンネルに対するポリマーの最適な線形交差を成し遂げるためには、チャンネルの直径およびポリマーの線形交差を方向づけるために用いられる方法、例えば、電界を考慮することが重要である。チャンネルの直径は標識されたポリマーの直径とうまく対応すべきである。線形交差の理論は、チャンネルの直径がポリマーの直径とうまく対応することである。例えば、DNAポリメラーゼのリング状の摺動クランプは、二本鎖DNAの直径とうまく対応し、DNA分子との線形交差を首尾よく成し遂げる内径を有する。数キロベースのDNAは、摺動クランプを縫うように通り抜けることが可能である。チャンネルの直径がDNAの直径とうまく対応する場合に、チャンネルに対するDNAの線形交差が発生することを示している文献もまたいくつかある。(Bustamante, 1991; Gurrieriら、1990; Matsumotoら、1981)。

30

実験で使用される一本鎖DNAは、約1.6 nmの直径を有する。約1.7から3 nmの内径を有するチャンネルは、一本鎖DNA分子の線形交差を可能にするのに十分である。チャンネルの直径およびDNAの直径は、正確に一致する必要はないが、類似していることが好ましい。3.4 nmの直径を有する二本鎖DNAについては、線形交差を可能にするには、3.5 nmと4.5 nmとの間のチャンネルサイズで十分である。

40

上述したように、ポリマーをチャンネルにわたって直線的に移動させ、相互作用ステーションまたは信号生成ステーションを通過させるために多くの方法が用いられ得る。本発明による好ましい方法は電界を用いる。ポリマーをチャンネルを通して引っ張るために電界が用いられ得る。これは、いくつかの研究ですでに示されているように、ポリマーが伸張され、印加電界の方向に整列するからである(Bustamante, 1991; Gurrieriら、1990; Matsumotoら、1981)。チャンネルを通したポリマーの線形交差に関する実験に関連するものの大半は、Kasianowiczら(1996年)およびBerzukovら(1994年)に記載されている、電界を用いてポリマー分子がタンパク質チャンネルを通して引っ張られる実験から生じている。これらの文献のそれぞれは参考のために本明細書中で援用される。ポリマーの線形交差を可能にするための1つの方法を例示するために、これらの実験

50

の簡単な説明を以下に示す。

「Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel」という名称の研究において、K a s i a n o w i c z ら (1 9 9 6 年) は、電界を用いた脂質二層内におけるタンパク質チャンネルを通したDNA分子の線形交差について示している (これは、P C T 公開特許出願第W O 9 6 / 2 9 5 9 3 号にも記載されている)。この要約の抜粋は以下の通りである。

我々は、電界は、一本鎖RNAおよびDNA分子を脂質二層膜内の2.6nm直径のイオンチャンネルを通して駆動することが可能であることを示す。チャンネルの直径は、一本鎖のRNAまたはDNAのみを収容することが可能であるため、各ポリマーは、チャンネルを部分的に阻止する伸張した鎖として膜を横切る。

このアッセイは、膜チャンネルとしてStaphylococcus aureus - 溶血素を用いて実施される。この膜チャンネルは2.6nmの直径を有し、長期間にわたって開口したままでいることが可能であるため、イオン流は脂質二層にわたって連続して流れることができる。DNA分子がチャンネルを横切っている間にイオン流は阻止されるべきであるとの仮説がある。単一チャンネルの読みとりを用いて、阻止時間は記録される。線形交差が発生している場合には、阻止時間の長さは、チャンネルを通過する一本鎖DNA分子の長さに対応する。最初、-120mVの電位を膜に印加すると、電流が流れた。一本鎖DNAを加えると、300μsおよび1300μsの2つの連続した伝導阻止がそれぞれ発生した。

上記のデータは次の2つの仮説を支持している。1) 阻止時間 (「寿命」と呼ぶ) の長さはDNAの長さに比例する、および2) 印加する電圧が大きければ大きいほど、所定の長さのDNAに対する阻止時間は短くなり、このことは、線形交差が実際に発生していたことを示している。コントロールとして、二本鎖DNAがタンパク質チャンネルを交差しないことが示された。

B e z r u k o v ら (1 9 9 4 年) は、「Counting polymers moving through a single ion channel」という名称の論文において、アラメシシン (alamethicin) 孔に関して同様の研究を行った。アラメシシン孔は、内径2nmである。伝導阻止の持続時間は、孔を通して引っ張られたポリマーの長さに比例し、このことは、線形交差に関する仮説を支持している。K a s i a n o w i c z ら (1 9 9 6 年) およびB e z r u k o v ら (1 9 9 4 年) の結果は、電界が、線形様式で、タンパク質孔チャンネルにわたってDNAを駆動し得ることを示している。

DNAが製造されたナノチャンネルを通過し得ることを本発明に従って示すために実験を行った。実験の結果を図11に示す。様々な形式のDNAをナノチャンネルに曝し、ナノチャンネルを通過し得るかどうかを決定した。50kbの二本鎖線形DNAのみが4nmのナノチャンネルのアレイを通過することができた。同じサイズの円形プラスミドによってモデル化された折り畳みDNAは、アレイを通過することができない。レーン1および2はコントロールである。円形DNAは、予想通り、線形DNAよりも移動が遅い。レーン3および4は、線形DNAのみがナノチャンネルアレイを通過し得ることを示している。約5nmの溶媒和物直径を有する折り畳みDNAは、アレイを通過することができないため、線形DNAがプレートを通過する唯一の手段は、線形様式によるものである。

上記のK a s i a n o w i c z らによるシステムを用いると、DNAなどのランダムに標識されたポリマーは、チャンネルを通してポリマーを通過させ、ユニット特定の測定を行うことによって分析され得る。チャンネルは、K a s i a n o w i c z ら、およびまたP C T 公開特許出願第W O / 9 6 / 2 9 5 9 3 号において記載されるような脂質膜内のタンパク質孔として調製され得る。簡単に言うと、S. aureusタンパク質 - 溶血素は、脂質二層のシス側に添加される。脂質二層は、例えば、緩衝溶液を含む2つのコンパートメントを仕切るテフロン膜内の0.2mmの穴に溶液を入れることによって、ジフィタノイルホスファチジルコリンから形成され得る。溶血素を添加した後、二層に対して電圧が印加され、0mVから140mVまで変化し得る。ランダムに標識されたDNAは、タンパク質のシス側でバッファーに添加される。標識されたDNAをこのシス側からチャンネルのトランス側に横切らせる電圧が印加される。この電圧は正の電荷を帯びている。各ユニットがチ

10

20

30

40

50

チャンネルを通過するとき、チャンネルの阻止によってコンダクタンスの変化が生じる。コンダクタンスの変化は、チャンネルを通過するユニットのサイズ、形状および電荷に依存する。ユニットが標識されている場合、コンダクタンス変化は、標識の特性を反映する。このように、標識されたユニットは識別され得る。この方法は、特定のユニットを識別するため、または特定オーダーのユニットもしくはユニット間の距離もしくは単に標識されているユニットの数を識別するために用いられ得る。

DNAが逆行移動することはあまりない。これは、ナノチャンネル内およびナノチャンネル外について、摩擦係数の差があるためである。標識された溶媒和DNAとナノチャンネルの内部との間の予想されるファンデルワールス相互作用は、遊離溶液よりもナノチャンネルの内側に位置するDNAの部分に対してより高い摩擦抵抗を形成する。このことは、ナノチャンネルプレートが存在下では、DNAの移動がより遅いことから証明されている（図6のレーン1および3を比較せよ）。摩擦抵抗の差は、所望のDNA移動の方向のラチェット機構を形成する傾向にある。

ポリマーを相互作用ステーションまたは信号生成ステーションを通して線形に移動させる他の方法は、分子モータの使用を伴う。分子モータは、ポリマーと物理的に相互作用し、ポリマーをステーションを通して引っ張る装置である。分子モータは、限定はされないが、DNAポリメラーゼおよびヘリカーゼを含む。DNAポリメラーゼは、効率的な分子モータとして機能することが示されている。好ましくは、DNAにクランプするポリメラーゼの領域の内径は、二本鎖DNAの内径と同様である。さらに、大量のDNAは、線形様式で、クランプ内を縫うように通り抜けることが可能である。

DNAポリメラーゼIIIホロ酵素のサブユニットの全体構造は、直径が80 Åで、内径が約35 Åである。比較として、二重B形態DNAのフルターン（full turn）は約3.4 Åである。サブユニットは、摺動クランプ機構において、DNAの周りに係合し、DNA複製中のホロ酵素の前進型モーションを干渉する。サブユニットが複製中のDNAを取り囲み、前進性をホロ酵素に与えることは周知である（Bloomら、1996；Fuら、1996；Griep, 1995；HerendeenおよびKelly, 1996；Naktinisら、1996；Paz-Elizurら、1996；Skaliterら、1996）。摺動クランプはポリメラーゼについての前進性の機構であるため、これは、必然的に、大量のDNAが線形様式でクランプを縫うように通り抜けることを意味する。いくらかのキロベースは、一時、クランプを縫うように通り抜ける（KornbergおよびBaker, 1991）。

本発明の壁材料を調製する方法もまた本発明に含まれる。本発明による壁材料を調製する1つの方法は、因子を壁材料の複数の分離された位置に共有結合させる工程を含む。因子は、相互作用ステーションに十分に近接した壁材料上の分離した位置に結合され、因子と相互作用して信号を生成するポリマーの個別のユニットが相互作用ステーションに配置されると、因子は、個々のユニットと相互作用して信号を生成する。分離した位置は、壁材料の表面上にあるか、または因子が壁材料内に埋め込まれるように壁材料内にあり得る。他の方法は、不透明な壁材料を通してチャンネルの縁に選択的に化学物質を付着させることである。本明細書で用いる「不透明な」材料とは、選択された波長の光を透過させない材料のことである。

壁材料には、壁材料を通してチャンネルの縁に付着した光保護化学基が設けられている。次に、光は、光保護化学基に与えられ、化学基を脱光保護（dephotoprotect）し、化学物質は、脱光保護された化学基に付着される。

本明細書で用いる「光保護化学化合物」とは、露光されると化学的に反応することが可能な感光性化合物のことである。光が光保護化学基に与えられると、基は脱光保護され、発光化合物およびクエンチング化合物などの化学物質と相互作用しやすい。

因子の局在領域は、光保護化学基が壁の全面を覆っていても調製可能であり得る。光は、因子を局在化させることが所望される壁の領域に選択的に与えられ得る。例えば、光は、チャンネル開口部を取り囲む壁の領域のみに与えられ得るので、これらの領域のみが脱光保護される。因子が添加されると、この因子は、チャンネル開口部を取り囲む領域の周りの壁のみに付着する。

10

20

30

40

50

さらに、壁材料の表面上に局在化された発光エリアを有する壁材料を調製する方法が提供される。発光化合物は、表面に与えられ、少なくともその表面に局在化された発光エリアが形成される。発光化合物は、壁材料の表面に直接添加され得るか、または表面に付着し

光によって脱光保護された光保護化学基を介して表面に間接的に付着され得る。本明細書で用いる「局在化された発光エリア」とは、発光を検出するための壁材料を通してチャンネルの縁の周りに標的領域を規定する、壁材料の表面の集中的な発光化合物の領域のことである。局在化されたエリアは、いくつかの方法で形成され得る。第1に、発光化合物は、チャンネルの縁の周囲のみで壁表面に直接付着され得る。第2に、発光化合物は、チャンネルの縁の周囲の局在化エリアに選択的に付着された光保護化学基に付着され得る。あるいは、光保護化学基は、壁材料の全面または壁材料の表面のランダム領域に添加され得るが、選択領域のみが、光によって脱光保護され、局在化領域を形成し、そこに発光化合物が付着され得る。光保護化学基および発光化合物は共に、局在化された発光領域を形成するためにマスクが用いられるとき、壁材料の全面または壁材料の表面のランダム領域に添加され得る。開口部を有するマスクは、壁表面にわたって配置され得、マスクの開口部は、壁表面の局在化領域を特にチャンネルの開口部の周りで曝す。

壁材料の表面に局在化された発光エリアを有する壁材料はまた、まず、発光化合物を表面に与え、その表面に少なくとも局在化された発光エリアを形成し、次に、壁材料内にチャンネルを形成し、チャンネルの縁が局在化された発光エリア内に標的領域を形成することによっても調製され得る。

本発明の好ましい方法を示すために、各チャンネルの周りにドナー発光団の同心リングを有する製品物品を構築する方法の限定されない実施例が提供される。この方法は、光不安定保護基および光回折を使用することによって成し遂げられる。光不透過性ポリカーボネート多孔性媒体は、一方の側面が、共有結合リンカーの緻密な層でコーティングされている。リンカーは、光不安定保護基によって保護されている。光は光不透過性ポリカーボネートの裏側から透過される。保護光源の波長(400~500nm)は、各チャンネルが点光源として作用するチャンネルのサイズ(5nm)よりもはるかに大きい。透過光の強度は、チャンネルに最も近接した箇所での最大となる。従って、チャンネルに近接した基のみが脱保護される。脱保護基は、次の化学反応において、ドナー発光団と自由に反応し、同心リングを生成する。

脱保護の同心リングの半径は、光の回折特性を理解することによって制御される。光の波長が長く、チャンネルのサイズが小さい場合、回折角が90°よりも大きくなる非常に強い回折の状態が設定される。光は、光不透過性ポリカーボネート表面を通過せず、むしろチャンネルを通して強制的に回折される。Huygenの原理によると、各チャンネルは、球状に放射する二次的な点光源として作用する。Huygenの原理は、波面のすべてのポイントが、球状の二次的な小波を生成するための点源と見なされ得る。時間tの後、波面の新しい位置は、これらの二次的な小波に対する接線表面となる。Huygenの原理の直接的な結果は、チャンネルの出口端で二次的な点源が発生することである。さらなる結果は、各チャンネルの中心からの距離が増加するにつれて、励起光の強度が減少することである。

チャンネルを出る光の量および結果として得られる光強度の球状分布が計算され得る。チャンネルを出る光のパワーは、チャンネルの断面積に入射光(I_0)の強度を掛けて与えられる

$$P = I_0 \pi R_{channel}^2$$

チャンネルを出ると、光は球状に放射する点源となる。この特定の場合、光源は、球の半分($4\pi r^2 / 2$ の表面積)を放射するように限定される。チャンネルの中心からの半径距離の関数としての新しい強度($I(r)$)は、チャンネルを出る光のパワーを所定の距離(r)における放射表面積で割って与えられる。

$$I = \frac{P}{A} = \frac{I_0 R_{channel}^2}{2r}$$

10

20

30

40

50

光不透過性ポリカーボネートの裏側から1 cm離れた60 Wの光源については、強度はチャンネルの中心から35 nmの距離(R_{equal})で4.77 W/cm²から0.43 W/cm²まで減少し、これは、91%の強度変化に相当する。上記の式より、各チャンネルの周囲の光の半径は、光源の強度によって正確に制御され得る。

感光性保護基については詳細に記載されている(Pillai, 1980)。共有結合リンカー(アミン、ヒドロキシル、カルボン酸、ケトン、スルフヒドリル、等)のタイプに応じて、対応する感光性保護基が利用可能である。例えば、アミノ基は、ニトロベラトリルオキシカルボニル(nitroveratryloxycarbonyl)(NVOC)、2-ニトロベンジルオキシカルボニル、および置換された2-ニトロベンジルオキシカルボニル基で保護され得る。最後の2つはまた、カルボン酸およびヒドロキシル基を保護するためにも用いられ得る。2-ニトロベンジルオキシカルボニル誘導体の光分解脱阻は簡単で、350 nmのランプおよびエタノールのみを必要とする。脱保護の時間は1から24時間制御される。

本発明はまた、信号を検出するための装置を含む。装置は、製造物品の支持体、およびポリマーが相互作用ステーションを横切るときに発生する相互作用によって生成される信号を検出するセンサを提供する。装置は、バッファーチャンバ、バッファーチャンバの一部を規定し、ポリマーを整列させるための複数の開口部を有する壁、およびハウジングに対して固定されるセンサを含み、センサは、各開口部から出力される信号と、他の開口部から出力される信号とを区別し、開口部依存性センサ信号を生成する。

「開口部依存性センサ信号」は、ポリマーとステーションとの間の相互作用の結果、壁材料における開口部で発生する信号である。

ハウジング内の壁は、少なくとも1つおよび好ましくは2つのバッファーチャンバを規定する。本明細書で用いる「バッファーチャンバ」は、液体媒体を支持することが可能なエリアのことである。2つのバッファーチャンバは、互いに流体が流通し得る。

壁は、壁内におけるチャンネルによって形成された複数の開口部を有する。壁内における「複数の開口部」は、少なくとも2つのチャンネルによって形成された少なくとも2つの開口部を意味する。好ましくは、複数の開口部とは少なくとも50個の開口部である。

本明細書中において使用されるような「センサ」は、物理的な刺激に応答し、そして得られたインパルスを経験した形態で送信する装置である。センサは、光学センサ、温度センサ、圧力センサ、音センサ、磁気センサ、電気センサ、機械センサ、放射能センサ、および動きセンサを含むが、これらに限定されない。好ましくは、センサは、光学センサである。本明細書中において使用されるような「光学センサ」は、入力電磁気放射信号を検出し、そしてインパルスに変換する装置である。インパルスは、計測され、そしてデータとして格納される。光学センサは、当該分野において周知であり、そして顕微鏡を含む。センサは、センサが相互作用ステーション(station)において生成された信号を検出し得るように、筐体に対して固定される。センサを筐体に直接固定または取付けする必要はない。

本明細書中において使用されるようなマイクロプロセッサは、センサ信号を収集し、そして格納するためのデバイスである。一般に、マイクロプロセッサは、ROM、RAM、レジスタ、およびI/O制御などの数個の電気的構成要素を含むチップである。従来のマイクロプロセッサは、当該電子工学分野において周知である。

電界を生成し得るナノチャンネル(または、マイクロチャンネル)プレート(120)を保持するために構成された装置の一例が、図12において与えられる。電極(128、130)によって生成された電界は、ナノチャンネルを通してDNAを牽引するために使用される。1例のナノプレートは、塩基当たりのより長い信号収集時間を可能にするために、ナノチャンネルを通るポリマーの移動を遅らせるのに役立つわずかに粘性のあるバッファー溶液中に浸される。さらに、プレートの方の面上には、バッファー溶液に浸された電極(128、130)がある。ナノチャンネルプレート、バッファーコンパートメント(122)、および電極の集合体は、イメージ分析に適切な光学品質ガラスチャンバ中に収納され、そして60x1.4NAオイル対物レンズ(126)に隣接して配置される。

上述のように、ポリマーをチャンネルを通して直線的に移動させるために電界を使用するこ

とは、好ましい。電界中のポリマーの伸長された直線的な配向がナノチャネルの直線的通過に好ましいので、電界の使用は適切である。さらに、ポリマー移動速度は、電圧によって制御され得る。最後に、電界は、FRETに悪影響を与えない。

光学顕微鏡法 (Bustamante, 1991; Gurrieriら, 1990; Matsumotoら, 1981, RampinoおよびChrambach, 1990; SchwartzおよびKoval, 1989; Smithら, 1989)、直線二色性 (LD) (Kermanら, 1990; Kermanら, 1985, Mooreら, 1986)、蛍光検出型LD (Holzwarthら, 1987)、および線形複屈折 (SturmおよびWeill, 1989; Chuら, 1990) は、ゲル電気泳動にかけられたDNA分子の形状における瞬間的变化を研究するために使用され得る。これらの研究において、DNAが強度に配向および伸長されることが示される。

Guirrieriら, 1990は、電界中のDNA分子の直線的かつ伸長されたコンフォーメーションを実証した。各場合において、DNA分子は、印加された電界の方向へきれいに配向される。DNA分子を視覚化するために使用される方法は、蛍光DNA標識およびイメージ増倍管 - ビデオカメラシステムの使用を組み合わせる (Bustamante, 1991; Housealら, 1989; MorikawaおよびYanagida, 1981; Matsumotoら, 1989; Yanagidaら, 1983)。示されたDNA分子は、164kbp長であるT2分子である。

電界中のDNAの配向は、直線二色性および電気二色性を用いて十分に研究されてきた (Dingら, 1972; YamaokaおよびCharney, 1973; Colsonら, 1974; Hoganら, 1978; PrioreおよびAllen, 1979; YamaokaおよびMatsuda, 1981; Wuら, 1981)。実際に、DNA配向についてなされた最初の研究は、これらの2つの技術を用いて行われた。DNAは、最初に溶液中で研究され、そしてその後電気泳動ゲルで研究された。溶液中およびゲル中の双方の研究は、DNA分子が実際に電界の方向に配向されるという同様の結果を出す。

天然DNAは、電界にほぼ垂直なヌクレオチド塩基の好ましい配向の結果として負UV直線二色性 (LD) を示す。DNAの配向は、永久のまたは誘発された双極子モーメントのいずれかの存在に起因した。例えば、Dingら, 1972は、80% v/vエタノールを与えるようにエタノール中に希釈されたトリス - カコジル酸塩バッファー中でのDNAの観察を記載する。

9 V/cmの単一電気パルスからのLDデータ。パルスの持続は、水平バーによって示される。安定状態において、LD^rの平坦域は、-1.5に近いことが読み取れ、このことは、DNAが電界の方向へ配向されることを意味する (Akermanら, 1990)。

Akermanら, 1990は、パルス化電界ゲル電気泳動上でLD研究を行った。そして溶液中と同様の結果が得られる。Akermanは、LD^r対時間のプロットを提供する。LD^rは、電界中の配向を表す。-1.5の値は、DNA分子が電界中で配向されることを意味する。x軸上の水平バーは、電気パルスの持続を示す。DNAは、1% アガロース中に存在する。パルス開始後短時間で、曲線は、-1.5に近いLD^rで平坦となり、パルス開始後短時間でDNAが配向されることを意味する。パルスがオフにされると、DNAは、もはや電界中でそれ自身を配向させず、そしてLD^r曲線は、もはや-1.5に留まらない。

電界中のDNA配向についての理論的根拠は、DNA中の永久のまたは誘発された双極子モーメントのいずれかに基づく。双極子は、トルクを最小にするために電界の方向へそれ自身を配向させることを思い出して欲しい。Hoganら, 1978は、DNA中の異方性イオンフローに関連する双極子モーメントの誘発についての理論的根拠を提案した：

二色性の、電界、培地のイオン強度、および巨大分子の長さに対する依存性を説明するために、本発明者らは、異方性イオンフローがポリ電解質の周辺に非対称なイオン雰囲気を生成し、配向トルクが生じるという新しいモデルを提案する。電界中のDNA配向についての議論からの結論は、DNA分子および他のポリマーが、電気泳動ゲル中または溶液中にかかわらず、電界の方向へそれ自身を配向させることである。溶液での研究は、電気泳動での研究に先立って行われた。電界中のDNA配向の示唆するところは、DNA分子および他のポリマーが直線的にナノチャネルを通るように駆動され得るという事実をさらに支持する。DNAの折り畳みをほどかれた配向はまた、DNA分子の直線的な移動において重要である。上述のように、DNAおよび他のポリマー分子は、電界を用いてタンパク質チャネルを直線的に通るように駆動され得る。本明細書中に記載されるデータは、このことをさらに理論的根拠付けし、そしてなぜDNA分子がそのようなやり方で挙動し得るかに対する理論的基礎

10

20

30

40

50

を与える。DNAがタンパク質孔を直線的に通過することが示され、そしてDNA分子が電界の方向にそれ自身を配向する場合に、DNAのナノチャネルを通る直線的な移動が達成され得る。

エネルギー移動の持続が重要なので、ポリマーが移動する速度はまた、重要である。アクセプターがドナー発蛍光団層に長く留まるほど、より大きな信号が生成される。ミリ秒の積分時間は、明確な信号検出を可能にする。ドナー発蛍光団の層がおよそ40 nmであるので、必要なポリマー移動速度は、40 nm/10msまたは4000 nm/sとして近似され得る。ナノチャネルFRET配列決定において、所定の速度は、印加電界の電圧またはポリマー分子の摩擦係数のいずれかを制御することによって達成される。

DNAの移動速度は、電界中のDNA鎖の移動を定義する式が与えられると決定され得る (Tinocoら、1995)。

$$u = \frac{ZeE}{f}$$

ここでZは、電荷の数(単位なし)であり、 $e = 1.6022 \times 10^{-19}$ クーロン、Eは、m当たりのボルトの電界であり、そしてfは、kg/sでの摩擦係数である。移動速度は、電界Eの大きさ、分子の正味の電荷、摩擦係数fによって特徴づけられるような分子の大きさおよび形状に依存する。分子の正味の電荷は、Zeによって示される。摩擦係数は、以下の式から決定され得る (Tinocoら、1995)：

$$f = kf_0 = k(6\pi\eta r)$$

ここで η は粘性係数、 r はDNAと同じ体積を有する球体についての半径、kは形状因子(1本鎖DNAについて約1.7)、および f_0 はDNAと同じ体積を有する球体についての摩擦係数である。

合理的に、ポリマー移動速度を制御するために、摩擦係数または電界の大きさのいずれかが使用され得ることが分かる。所定のシステムにおける異なる電圧に対して、異なるポリマー移動速度が存在する。同様に、より大きな分子またはより粘性のある培地中の分子は、より低い分子移動性を有する。ゲル電気泳動における例から、電界強度、ポリマーサイズ、および摩擦係数の効果の算出が可能である。粘性のある培地が、摩擦係数に対しゲルと同じ所望の影響を達成し得ることを理解することは重要である。摩擦係数は、電気泳動速度に反比例するので、粘性を2倍にすると、電気泳動速度は2倍低減する。

粘性溶媒中の電気泳動は、多くのグループによって行われてきた (ChangおよびYeung、1995; Belloら、1994; JumppanenおよびRiekkola、1995; SahotaおよびKhaledi、1994; Klenchinら、1991; HarrisおよびKell、1985; Korchemnayaら、1978)。ShaotaおよびKhaledi、1994は、ホルムアミド中の電気泳動が、水(0.89cP、25°C)の3倍にあたる、25°Cで3.3cPの粘性を有することを実証する。ホルムアミドは、水よりも高い誘電率を有し、そして多くの支持電解質を可溶化し得るので、電気泳動は、水中よりもホルムアミドの方が好ましい。一般に、ホルムアミドは、電気泳動バッファー液中で水と混合して使用される。混合された、グリセロール溶液、N-メチル-2-ピロリドン、酢酸、およびN-メチルホルムアミドがまた使用されてきた (Korchemnayaら、1978)。1 cPから25cP程度までの範囲にわたる広範な粘性が可能である (Bellowら、1994)。必要とされる実際の溶液の粘性は、ナノチャネル中のポリマー分子の摩擦係数に依存する。したがって、正味の摩擦係数は、粘性およびまたポリマーに対するナノチャネルの摩擦効果に依存する。ナノチャネル孔が小さいので、ナノチャネルの壁と標識されたポリマーとの間の溶媒トラップからの摩擦効果が存在する。この溶媒トラップ効果の大きさは、ゲル電気泳動から生じるものと同様である。結果として、わずかに粘性のある溶液のみが、所望のポリマー移動速度を増大し得る。

所定の電界に対して、異なる大きさの分子についての電気泳動移動性が分子量と移動距離との関係を知ることによって、以下のように、決定され得る：

$$\log M = a - bx$$

10

20

30

40

50

ここで、 M は核酸の分子量であり、そして x は移動距離（移動性に比例）である。 a および b は、所定の電界についての定数である。

要約すると、電界中のポリマー移動速度は、電界、摩擦係数、および分子サイズによって制御され得る。ポリマー移動速度についての所望値は、容易に達成され得る。

FRETに対する電界の悪影響は全くない。エネルギー移動は、短距離間の電気双極子相互作用に関連するので、外部電界の存在は、FRETを行うドナー - アクセプター対の能力に負に影響し得る。外部電界の存在は、FRETプライマーおよびゲルに基づく自動化DNA配列決定を用いて行われた最近の研究から分かるように（GlazerおよびMathies、1997；Hungら、1996；Juら、1996a；Juら、1996b；Marraら、1996；Wangら、1996；Wangら、1995）、FRETに対して全く悪影響を有さない。FRETプライマーは、大きなストロークシフト（Stoke's shift）およびしたがって発蛍光団弁別のために、配列決定反応生成物の標識化において使用される。これらの実験において、FRET標識化DNAフラグメントがゲル上を走らされ、そして同時に、電界の存在下で、フラグメントがCCDカメラおよびレーザを用いて検出される。4色毛细管電気泳動システムまたはApplied Biosystems 373Aシーケンサのいずれかが使用される。これらの実験は、強力な電界の存在下でエネルギー移動が生じることを実証する。

ナノチャンネル装置の1設計例は、図13において示され、この例は、ナノチャンネルプレート（140）を保持する2つの融合されたパイレックスセル（132、134）から構成される。上部（136）および下部（138）バッファ領域が、小さい方の（134）および大きい方の（132）パイレックスセルに、それぞれ含まれる。バッファ領域は、インジウムすず酸化物（ITO）を用いて改変されたガラスカバースリップ（146）を用いて密封される。インジウムすず酸化物は、このシステムにおいて電極（142）として機能する透明な導体である。電極は、負荷抵抗 R_L （1から数個までのG、定常電流システムにアプローチするため）および電圧源からの制御された電圧可変抵抗器から構成される可変電圧源（152）につながる。電圧計は並列に接続される。オイル（144）被覆された浸漬対物レンズ（150）が、蛍光信号（148）を検出するために、ガラスカバースリップの下に配置される。

ポリマーが上部バッファ領域中へ装填され、そしてポリマーを下部チャンバへ駆動するために電界が使用される。バッファは、所望の粘性および電解質性質を有する。エピイルミネーション（Epiillumination）および信号収集は、同じ60x1.4NAオイル浸漬対物レンズを通して可能である。装置の寸法は、取付けを簡単にするために従来の顕微鏡スライド（75mm x 25mm）の寸法と同様である。ナノチャンネルプレートとガラスカバースリップとの間の間隙は、0.4mmである。厚さ0.1mmの薄いカバースリップが示される。長い動作距離の対物レンズが利用可能なので、これらの寸法が好ましい。例えば、NikonからのCFI₆₀システムは、0.6mmを超える厚さの標本を検査し得る60x、1.4NA対物レンズを有する。

温度制御ブロックが、ジュール加熱および熱変動を防ぐために使用される。ブロックは、ナノチャンネル装置を囲み得、そして冷却材流動のための入口/出口ポートを有する。ブロックは、ナノチャンネル装置の一定の温度制御を可能にするために中空である。装置のいずれかの面には、中空チャンバを通る冷却材を再利用することを可能にする入口/出口ポートが存在する。

いくつかのグループが、電気泳動の蛍光顕微鏡観察のために特殊化された装置を使用してきた（RampinoおよびChrambach、1991；Matsumotoら、1981；Smithら、1989；Bustamante、1991；Gurrieriら、1990；SchwartzおよびKoval、1989；Smithら、1990）。パルスフィールドゲル電気泳動法にかけられたDNA分子の観察のためのSmithら、1990によって使用された装置が記載される：

20- μ lの溶融アガロース1滴が2つの顕微鏡カバースリップ（24mm x 24mm）の間に置かれ、そして10分間冷却される。このサンドイッチ構成は、通常の顕微鏡スライド上に置かれ、そして爪光沢剤を用いて4隅で密閉される。スライドは、エポキシ接着剤を用いてスライド上に固定された4つの銅電極を有するように予め作成された。次に、この装置は、約5で30分間冷蔵された。溶融アガロースは、電氣的接続を完全にするように電極上へ滴下され、そしてTBEバッファ（0.5x）が、アガロースの湿ったままにするためにときど

10

20

30

40

50

き添加された。

RampinoおよびChrmbach、1991は、より大きなバッファ領域、プラチナ条板電極、および冷却材フローのための領域を有するより複雑な装置を記載する。装置全体は、顕微鏡のステージ上に取付け可能である。実際のゲル自体は、2つのガラスカバースリップの間にサンドイッチされ、そして装置の中心に配置され、いずれか一方の面上でバッファ領域と接触する。本設計は、均一な電界および温度の制御を可能にする。上述の装置とは対称的に、RampinoおよびChrmbach装置は、標準的電気泳動用に設計されており、そしてパルスフィールドゲル電気泳動用ではない。

簡単に、本発明の装置（図13に示される）がポリマーに対してどのように機能するかが以下に記載される。DNAなどのポリマーは、本発明の方法または当該分野で公知の任意の他の方法によって（内因的にまたは外因的に）標識される。標識されたDNAは、好ましくはわずかに粘性を有するバッファ溶液中に置かれる。バッファは、上部バッファチャンバ136に添加される。電界は、電極を使用して生成され、そしてDNAは、ナノチャンネルプレート（140）のナノチャンネルに直線的に入るようにされる。標識されたDNAがナノチャンネルプレートの反対側へ現れるにつれ、標識は1剤またはチャンネルを取り囲む環境と相互作用され、検出器によって検出される信号またはポリマー依存インパルスを生成する。検出された信号またはポリマー依存インパルスは、格納され、そしてポリマーについての構造情報を明らかにするために処理される。

本発明の最後の局面は、本発明の方法にしたがう使用、およびランダムに標識された核酸を利用することが望ましい他の任意の使用のために核酸を調製する方法を含む。本方法は、分裂する細胞をヌクレオチドアナログに接触させる工程、細胞からヌクレオチドアナログを組み込んだ核酸を単離する工程、組み込まれたヌクレオチドアナログを標識することによって、組み込まれたヌクレオチドアナログを有する核酸を改変する工程を含む。本明細書中で使用されるような「ヌクレオチドアナログ」は、A、T、G、またはCと置換可能だが、改変された構造を有する分子である。ヌクレオチドアナログは、例えば、臭化アナログ、2,4-ジチオウラシル、2,4-ジセレノウラシル、ヒポキサンチン、メルカプトプリン、2-アミノプリン、およびセレノプリンを含むが、これらに限定されない。組み込まれたヌクレオチドアナログは、発光化合物、クエンチ供給源、および蛍光励起供給源からなる群から選択される1剤を用いて標識され得る。

分裂細胞は、ヌクレオチドを生きた細胞中へ組み込ませるための当該分野において公知の任意の手段によってヌクレオチドアナログと「接触」される。例えばヌクレオチドアナログは、細胞培養培地に添加され得、そして細胞によって自然に取り込まれ得る。ヌクレオチドアナログの取り込みを最適化するために、分裂細胞は、培地にヌクレオチドアナログを添加する前に従来手段を使用して増殖を停止され得、そして次に、一旦ヌクレオチドアナログが培地に添加されると、細胞が細胞分裂サイクルに再び入ることを可能にするためにこの停止が取り除かれる。次いで、組み込まれたヌクレオチドアナログを有する核酸は、細胞が細胞分裂サイクルに再入しそして少なくとも1細胞分裂サイクルを完了した後で、単離され得る。

ヌクレオチドアナログをDNAに組み込むための方法の1例は、BickおよびDavidson、Proc. Nat. Acad. Sci.、71:2082-2086（1974）中に提供される。BickおよびDavidsonは、BrdU依存性細胞株B4を、0.1mM BrdUを含む10%ウシ胎仔血清（E培地）を補充したDulbecco改変Eagleの培地からなる基本増殖培地中で増殖させた。100-mm Falconプラスチック組織培養皿が0.1mMヒポキサンチン、0.4μMアミノプテリン、および10μM BrdUを含むE培地（E-HAB培地）中の 10^6 個のB4細胞を用いて接種され、そして細胞は、6週間にわたりE-HAB培地中で高密度（100-mm皿当たり 5×10^5 細胞）で3回継代された。次に、細胞は、E-HAB培地中に低密度（6-mm皿当たり1000細胞）でプレートされ、そして3週間後に、約10個の大きなコロニーが各皿中に観察された。1皿から細胞を収穫し、そしてHABと称する新しい細胞株として維持された。BrdU含有細胞の予期される光感受性のために、HAB細胞は常時、環境光から守られた。E-HAB培地中での100細胞世代後、1アリコートのHAB細胞がE培地に再び移された。HAB-Eと称される新しい細胞の副株は、単離され、E培地中で維持され

10

20

30

40

50

た。

BickおよびDavidsonは、 $2 \mu\text{Ci/ml}$ の活性で $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (New England Nuclear Corp.) を添加された培地 (上述) 中で細胞を増殖した。最初のフェノール抽出の後、DNA調製物が37

で60分間 $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度でRNase Aを用いて常法で処理されたことを以外はDavidsonおよびBick (Proc. Nat. Acad. Sci., 70:138-142 (1973)) において記載されるように、2 - 3回の集団倍増の後、細胞が収穫され、そしてDNAが単離された。2回目のフェノール抽出の後、DNAは10mM Tris-HCl、10mM pH7.6、1mM EDTAに対して広範に透析され、そして次に最後に10mM Tris-HCl pH7.6、1mM EDTAに対して透析された。DNAを単離するための他の方法が当該分野において周知である。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989)。

10

核酸を調製するための本発明の方法は、以下インピトロ塩基特異的標識化 (IBSA) と称される。IBSAは、ヌクレオチドアナログの存在下で被験体から得られた細胞の培養を含む。ヌクレオチドアナログは、後の化学的改変をし得るか、ドナー放射波長における高い分子吸光係数を有するか、またはアクセプター標識に付着するためのリンカーを有するかのいずれかである。最も重要なアナログは、DNA複製の間に塩基対形成を妨害しない官能基を含むアナログである。8置換プリン類、5置換ピリミジン、および6置換ピリミジンがこの判定基準を満足する。

IBSAスキームの非制限的な1例を以下に詳細に述べる。方法は、図14において概説され、そして最初のDNA単離からゲノム標識および最後の配列分析までの工程を網羅する。細胞は、被験体から単離され、そして次に増殖される。十分な遺伝子材料を提供するのに十分な細胞が存在する時に、細胞は、細胞周期において停止される。停止は、それがS期を中断しない限り、周期のいずれの時点において起こり得る。8 - プロモ - 2' - デオキシプリン類および5 - プロモ - 2' - デオキシピリミジン類などの容易に化学的に誘導体化され得るヌクレオチドアナログが、増殖培地に添加される。次いで、細胞は、1サイクル増殖され、そして細胞からのゲノムDNAが単離される。その結果得られるDNAは、半保存的複製の生成物である標識化および非標識化DNAのキメラである。1本鎖のみ標識されたDNAを有する利点は、得られた2重鎖DNAが本発明の配列決定方法において使用され得ることである。

20

ゲノムDNAは、約100kbの大きさに分解される。この時点で、ゲノムDNAは、化学的に標識され、そして末端標識される。臭化アナログ中で細胞を培養することの利点は、このような改変が、塩基にアクセプター標識を付加するというさらなる改変のために塩基を活性化することである。ヒトゲノムについては、約3万フラグメントある。フラグメントは、本発明の配列決定法により同時に分析される。同様の大きさのフラグメントおよびポテンシャル配列は、合わせてグループ化され、そしてDNA配列情報を生成するために集団分析が行われる。ゲノムの配列決定は、約6時間で完了され得る。被験体細胞の単離から配列決定の終了までの時間は、約1週間である。以下の段落は、各個々の工程を詳細に説明する。

30

概説されるスキームの第1の工程は、細胞培養および細胞サイクル停止である。細胞サイクル停止の目的は、すべての得られるDNAが標識化および非標識化DNAのキメラであることを確実にするために、同時にDNA複製を行い得る細胞の同期集団を生成することである。細胞を同期させる多くの方法があり、MまたはS期のいずれかで細胞を停止する方法を含む。M期ブロックのみが所望のゲノムキメラを生成する。中期インヒビターの例は、圧力下の亜酸化窒素、ビンブラスチン (MarcusおよびRobbines、1963)、およびコルセミドを含む。コルセミドは、中期における細胞をブロックするが、洗浄によって逆転され得る (Mitchison、1971; KatoおよびYoshida、1970; Stubblefield、1968)。細胞は、コルセミド中で数時間増殖され、その結果同期培養を生じる (WunderlichおよびPeyk、1969)。圧力下の亜酸化窒素 (Rao、1968) は、それが容易に除去され得る点において有利である。ブロックの除去および所望の臭化塩基アナログの追加は、S期に同期して入ることを可能にする。

40

使用され得るヌクレオチドアナログは、8 - プロモ - 2' - デオキシアデノシン、8 - プ

50

ロモ - 2' - デオキシグアノシン、5 - ブロモ - 2' - デオキシシチジン、および5 - ブロモ - 2' - デオキシウリジンを含むが、これらに限定されない。これらの臭化ヌクレオチドアナログは、求核試薬に結合するために活性化される (Traincardら、1983; Sakamotoら、1987; Kellerら、1988; Hermanson、1996)。アミン含有アクセプター標識および発蛍光団の塩基アナログへの結合は、周囲温度 (35) でなされる。アクセプター標識の最終の位置は、標識されたフラグメントの塩基対形成が影響されないような位置である。

臭化ヌクレオチドアナログは、市販されており (Sigma Corp.、Fluka Inc.、Fisher Scientific、Inc.)、または臭化する試薬を用いた反応によって調製され得る、Hermanson、1996は、N - ブロモスクシンイミド (NBS) を使用して、チミン、シチジン、およびグアノシンでDNAの臭化するためのプロトコルを概説する。アデニン残基は、NBSを必要としない他の方法から調製される。例えば、8 - ブロモ - 2' - デオキシアデノシンおよび8 - ブロモ - 2' - デオキシグアノシンは、臭素水と天然塩基の反応によって合成され得る (Ikeharaら、1969a; Uedaら、1974; FaerberおよびScheit、1971; Kochetkovら、1968)。プリン類の8位での臭化はまた、ヌクレオチドモルフォリデイトによって達成され得る (Langら、1968; Ikeharaら、1969b)。臭化の溶媒条件は、特に重要である。2' - デオキシアデノシンの臭化は、0 でジメチルホルムアミド中では起こらないが、反応が氷酢酸中で50~60で行われるならば、8 - ブロモ - 2' - デオキシアデノシンは、比較的容易に形成される (Gueronら、1967; Rahnら、1965)。

臭化および他の塩基アナログは、細胞培養の間にゲノムDNA中へ効率的に組込まれると実証された (Balzariniら、1984)。特別な例は、フローサイトメトリーのために使用される細胞への5 - ブロモ - 2' - デオキシウリジンの組込みである。5 - ブロモ - 2' - デオキシウリジンは、新しく合成されたDNA中へチミジンの代わりに組込まれる (Crissmanら、1990; Pootおよび

Hoehn、1990; Böhmer、1990; Gainesら、1996; Nicolasら、1990)。

上で議論され、そして題名が「Total Substitution of Bromodeoxyuridine for Thymidine in the DNA of a Bromodeoxyuridine-Dependent Cell Line」である論文のBickおよびDavidson、1974にしたがうように、塩基アナログの置換パーセンテージは、非常に高くあり得る。以下は、この論文からの段落である：

完全な置換を得るために、BrdU依存細胞は、添加チミジンの非存在下で、アミノプテリン、チミジン生合成の強力なインヒビター、およびBrdUを含む培養培地にさらされた。我々は、核DNA中の少なくとも99.8%のチミジンがBrdUと置換される細胞株の単離をここで報告する。

現在提案されたランダム1塩基標識化スキームにおいて、99.8%もの高いパーセンテージの置換は、必要でないが、このようなデータは、塩基アナログの細胞性組込みの可能性に洞察を与える。他の臭化された塩基アナログは同様に、容易に哺乳類細胞に組込まれ得る (Stewartら、1968)。このようなやり方で組込まれた臭素のない塩基アナログの数例は、2 - アミノプリン (Glickman、1985)、5 - プロピニルオキシ - 2' - デオキシウリジン、および5 - エチニル - 2' - デオキシウリジン (Balzariniら、1984) を含む。

適切に臭化されたDNAキメラを細胞培養によって生成した後、分析のためのキメラゲノムDNAは、染色体ソーティングの任意選択の工程を含む数工程を行うことによって調製される。100kbのDNAフラグメントは、フローソートされた染色体の部分消化から生成され得る。任意選択のフローソーティング工程は、多くのマニュアルおよび教科書 (de Jongら、1989; Fawcettら、1994) によって詳細に網羅されているので、ここで詳細には議論しない。

簡単に述べると、細胞は、コルセミドを添加することによって中期において停止される。数百万の培養された細胞は、ゆっくりと溶解され、1つ以上の蛍光染料で細胞が染色される懸濁液バッファー中に中期染色体を放出する。次に、標的染色体は、1つのレーザシステム中の1つの発蛍光団、または2つのレーザ検出システム中の2つの発蛍光団のいずれかを使用して、蛍光発光パターンによって同定される。次に、DNA Cloning 3中のGloverおよびHames、1995によって記載されたプロトコルにしたがうように、ソートされた染色

体が調製され、そして部分的に消化される。100kbのオーダーの大きさが得られる。臭化DNAの発蛍光団標識化は、部分消化の前または後のいずれかになされ得る。塩基臭化は、求核性置換のための塩基を活性化する。一般的な染料のフルオレセイン、クマリン、エオシン、ローダミン、およびテキサスレッド (Molecular Probes、OR) を含むアミン / ヒドラジン基を有する多くの異なる発蛍光団が使用され得る。これらは、可視領域において吸光性および発光性を有する。これらの発蛍光団上のアミノ基は、プリン類の8位およびピリミジン類の5位を攻撃し、求核性置換反応を行う。置換反応のための実験プロトコルは、Hermanson、1996によって記載される。記載された標識化スキームの改変された概説は、以下に与えられる。

臭化DNAを標識するためのプロトコル

10

1. ヒドラジンまたはアミン結合発蛍光団を水中に80~100mMの濃度で溶解する。
2. 25 μ lの発蛍光団溶液を臭素活性化DNA溶液に添加する。
3. 50 で1時間反応させる。
4. エタノール沈殿によって精製する。20 μ lの4M LiClおよび500 μ lの(-20 に冷却された)エタノールを添加する。十分に攪拌する。
5. -20 で30分間保存し、次に12,000gでの遠心分離によって沈殿されたDNAを分離する。
6. 上清を除去し、そして70%および100%エタノールを用いてペレットを洗浄する、なお各洗浄後に遠心分離する。

標識されたDNAペレットを水中に再溶解し、そして-20 で保存する。

20

ゲノム部分消化から、約3万の100kbフラグメントが調製される。フラグメントは、末端転移酵素を用いて、または短い標識化ポリヌクレオチドへの連結によってのいずれかで末端標識される。末端標識化によって組込まれた蛍光標識は、異なるスペクトル吸収または(連結スキームにおけるような)標識の特異的配列によってのいずれかで唯一に同定される。末端標識化後、調製されたDNAは、上述のようにナノチャネルFRET配列決定にかけられる。データは、フラグメントサイズおよびポテンシャル配列によってソートされる。集団分析によって、DNA配列が生成される。

図15は、IBSA標識化からDNA配列を解読するための一般的なスキームを与える。ゲノムDNAの1サンプルは、その塩基中に標識された2つの塩基を有する(この場合、AおよびC)。末端標識および内部標識されたDNAフラグメントは、FRET配列決定によって分析される。その結果得られるデータは、フラグメントサイズおよびポテンシャル配列によってソートされる。ポテンシャル配列は、DNAの特定のフラグメントについて生成された配列特異的FRET信号のパターンとして規定される。ポテンシャル配列は、配列情報を与えないが、むしろDNA分子が唯一に同定されることを可能にする。集団分析は、各フラグメント上のAおよびCのすべての位置を決定するために行われる。相補鎖は、対形成される。塩基位置を決定する工程は、塩基のうちのただ1つ(A)について繰り返される。1つの標識化塩基および2つの標識化塩基について得られたデータの比較は、DNA配列を生成する。

30

100kbフラグメントは、配列決定について常に望ましいわけではない。発現マッピングおよび単一遺伝子配列決定は、もっとより短い標識化フラグメントを必要とする。より短い標識化フラグメントの生成は、ニックトランスレーション、プライマー伸長、およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって達成され得る。さらに、より小さいフラグメントはまた、改変したサンガー反応、および末端転移酵素の使用によって分析され得る。酵素方法を用いて、大きなヌクレオチドアナログは、しばしば組込まれ得る(Hermanson、1996)。

40

プライマー伸長において、改変されたヌクレオチド三リン酸は、規定量の所望のプライマーを使用してDNAテンプレートに付加される。使用されるポリメラーゼの形態は、インタクトなE.coliのDNAポリメラーゼIの5'-3'エクソヌクレアーゼ活性を欠失するKlenowフラグメントである(Kesslerら、1990;FeinbergおよびVogelstein、1983、1984)。等価な酵素は、Sequenase 2.0ポリメラーゼおよびT7ポリメラーゼである。この方法は、内部標識化標的DNAを調製する簡単な方法である。この方法を使用して、10kbより大きな長さを有

50

する大きな内部標識化DNAフラグメントの合成は、改変された塩基によって置換されたヌクレオチドの1つを用いて合成されてきた。プロトコルは、簡単に要約すれば、Sequenase 2.0 (Amersham) を使用することを含む。アニーリング反応は、1 μ lのプライマー (0.5 pmol/ μ l)、2 μ lのSequenaseバッファー (5X)、5 μ gのプラスミドDNA、および10 μ lの滅菌蒸留水からなる。65 $^{\circ}$ C水浴中で2分間インキュベーション後、アニーリングは、30 $^{\circ}$ Cで30分間起こるように放置される。実際の反応混合物は、10 μ lのアニーリング反応 (プライマーテンプレート)、1 μ lのジチオスレイトール (0.1M) 1 μ Mの各dNTP、0.1 μ Mの発蛍光団dNTP、および0.025U/ μ lのSequenaseからなる。混合後、反応は、室温で15分間進行するように放置される。

プライマー伸長を用いて、Ambroseら (1993) ならびにHardingおよびKeller (1992) は、大きな蛍光DMA分子の合成を示している。彼らの実験において、一つのピリミジンの発蛍光団アナログでの完全な置換が、7 kbよりも長いDNAにおいて達成された。5 kb長と7 kb長との間の蛍光DNA (このDNA内で二つのピリミジンは完全に標識される) はまた、同じ著者により報告されている。他の異常な塩基アナログ (例えば7-(2-オキソエチル) グアニン、2'-アミノ-2'-デオキシシチジン、8-オキソプリン、およびN-4-アミノデオキシシチジン) を用いて、大きなフラグメントも合成されている (Barbinら、1985; Purmalら、1994; Aurupら、1994; Negishiら、1988)。

ニックトランスレーションは、Escherichia coli DNAポリメラーゼIの能力を利用して、ヌクレオチド残基のニック [臍臓のデオキシリボヌクレアーゼ (Dnase) I により生成される] の3'-ヒドロキシル末端への連続した追加と、隣接5'-ホスホリル末端からのヌクレオチド除去とを組み合わせる

(Meinkoth & Wahl、1987; Rigbyら、1977; Langerら、1981; Hölftkeら、1990)。

多くの修飾された塩基がニックトランスレーションにより取り込まれてきた (MeffertおよびDose、1988; Gebeyehuら、1987; GillamおよびTener、1986)。DNAポリメラーゼIはそれらが形成されると同じくらい速く補充されるように切断を生じさせ、所望のヌクレオチドをオリジナル鎖へと組み込む。多量の標識化ヌクレオシド三リン酸が反応の間存在するので、標識は取り込まれて、そして親鎖は修飾される。ニックトランスレーションは以下の混合物を含む:二本鎖DNA標的、2 ng/mlの濃度のDNAse I (1 μ l)、三つのタイプの未修飾デオキシヌクレオシド三リン酸 (100 μ Mの濃度のdNTP) (各1 μ l)、標識化dNTP (300 μ Mで) (1 μ l)、水 (32 μ l)、および5 ~ 10ユニットの活性を含むDNAポリメラーゼ (1 μ l)。反応は15 $^{\circ}$ Cで1時間進める。反応は、0.25M EDTA (4 μ l)、10mg/ml tRNA (2 μ l)、および10mM Tris (150 μ l)、pH7.5によりクエンチされる。標識化DNAはエタノール沈殿法 (Bethesda Research Laboratories, New England Nuclear, and Amersham) により精製される。

直接PCR標識法は所望の標識を標的DNAに組み込むだけでなく、標識化DNAの量を増幅させる (Saikiら、1985, 1988)。PCRはDNAポリメラーゼ (最も一般的には、Thermus aquaticus由来のTaqポリメラーゼ) の熱安定性形態を用いる。TaqポリメラーゼはPCRの各サイクルで、増幅DNA複製物へと標識を組み込む性能を有する。この様式において、3 kbまでのDNAフラグメントは標識され得る。Wiemannら、1995はフルオレセイン-15-dATPで内部的にPCR産物を標識する方法を記載し、プロトコルは他の発蛍光団に適用され得る。発蛍光団のPCR組み込みのための反応混合物は、各プライマー (1 μ l)、各dNTP (200 μ M)、発蛍光団-dNTP (10 μ M)、およびTaqポリメラーゼ (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) (0.025U/ μ l) からなる。反応バッファーは、10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、および0.01% (wt/vol) ゼラチンからなる。PCRは30サイクルを用いて実行される。

サンガー法により生成される配列決定反応はまた、酵素的な標識化を用いて分析され得る。それぞれの鎖末端フラグメントは5'および3'発蛍光団で標識される。5'発蛍光団はプライマー部として組み込まれ、3'末端標識は末端トランスフェラーゼにより付加される。末端トランスフェラーゼ標識法は本来、放射標識化ヌクレオシド三リン酸を用いて開発され

10

20

30

40

50

た (Roychoudhuryら、1979; TuおよびCohen、1980)。この技術は後に非放射活性ヌクレオチドアナログに適用された (Kumarら、1988)。この技術は、(a) 0.5M カコジル酸カリウム (20 μ l)、5 mM CoCl_2 、1 mM DTT、pH 7、(b) 修飾されたデオキシヌクレオシド三リン酸 (100 μ M)、5 mM dCTP (4 μ l)、および水 (100 μ l) への標的DNAの添加を含む。末端トランスフェラーゼは反応混合物中の最終濃度50ユニットに添加され、そして45分間37℃で反応される (Hermanson、1996)。

標識後手順もまた使用され得る。この方法において、発蛍光団を結合するためのリンカーアームを有する塩基アナログは、上記の方法を用いて初めにDNAに組み込まれる。発蛍光団のリンカーアームへの引き続く結合は、共有結合性の連結技術 (例えばWaggoner (1995) により記載されている技術) を用いて可能である。Jettら (1995) は、以下の内一つの完全な組み込みを用いたM13 DNA (7250bp) の完全長合成を示している: 5-(3-アミノプロピニル)-dCTP、5-(3-アミノアリル)-dCTP、または5-(3-アミノアリル)-dUTP。リンカーへの共有結合性発蛍光団結合もまた示されている。この技術の利点は、標識が個々の蛍光分子からなる必要がないことであるが、この標識はより多数の色素を有するより大きな分子であり得る。このような例は、フィコビリタンパク質、色素充填ビーズ、タグ化タンパク質、または蛍光タグの鎖を含む。

上述の特許、特許出願および参考文献のそれぞれは本明細書中においてその全体が参考として援用される。本発明による、現在好ましい実施態様を記載してきたが、本明細書中に記載の教示を考慮して、他の修正、改変および変更が当業者に提案されることが考えられる。従って、このような改変、修正および変更が、添付の請求の範囲により定義された本発明の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。

10

20

1. Akerman, B., Jonsson, M., Moore, D., and Schellman, J. 1990. Conformational dynamics of DNA during gel electrophoresis studied by linear dichroism spectroscopy. In *Electrophoresis of Large DNA Molecules* (Lai, E. and Birn, B. W., Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
2. Akerman, B., Jonsson, M., and Nordén. 1985. Electrophoretic orientation of DNA detected by linear dichroism spectroscopy. *J. Chem. Soc. D. Chem. Commun.* 422.
3. Aikens, R. 1992. Properties of low-light level slow-scan detectors In *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. Mason, W. T. (Ed.) Harcourt Brace & Company, Cambridge, England.
4. Allen, M. J., Balooch, M., Subbrah, S., Tench, R. J., Sickhaus, W., and Balhorn, R. 1991. *Scanning Microsc.* 5:625. 10
5. Ambrose, W. P., Goodwin, P. M., Jett, J. H., Johnson, M. E., Martin, J. C., Marrone, B. L., Schecker, J. A., Wilkerson, C. W., and Keller, R. A. 1993. Application of single molecule detection to DNA sequencing and sizing. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 97:1535-1542.
6. Andersson-Engels, S., Johansson, J., and Svanberg, S. 1990. Multicolor fluorescence imaging systems for tissue diagnostics. *Proc. SPIE-Bioimag. Two-Dimens. Spectrosc.* 1205:179-89.
7. Aurup, H., Tuschl, T., Benseler, F., Ludwig, J., and Eckstein, F. 1994. Oligonucleotide duplexes containing 2'-amino-2'-deoxycytidines: thermal stability and chemical reactivity. *Nucleic Acids Res.* 22:20-4. 20
8. Arts, E., Kuiken, J., Jager, S., and Hoekstra, D. 1993. Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur. J. Biochem.* 217:1001-9.
9. Bains, W. 1991. Hybridization methods for DNA sequencing. *Genomics*, 11:294-301.
10. Bains, W. 1997. Hybridization for sequencing of DNA. In *Molecular Biology and Biotechnology*, R. A. Meyers, Ed. VCH Publishers, New York.
11. Balzarini, J., De Clercq, E., Ayusawa, D., and Seno, T. 1984. Thymidylate synthetase-deficient mouse FM3A mammary carcinoma cell line as a tool for studying the thymidine salvage pathway and the incorporation of thymidine analogues into host cell DNA. *Biochem. J.* 217:245-52. 30
12. Barbin, A., Laib, R. J., and Bartsch, H. 1985. Lack of miscoding properties of 7-(2-oxoethyl)guanine, the major vinyl chloride-DNA adduct. *Cancer Res.* 45:2440-4.
13. Bello, M. S., de Besi, R., Rezzonico, R., Righetti, P. G., and Casiraghi, E. 1994. Electroosmosis of polymer solutions in fused silica capillaries. *Electrophoresis* 15:623-6.
14. Bezrukov, S. M., Vodyanoy, I., and Parsegian, V. A. 1994. Counting polymers moving through a single ion channel. *Nature*. 370:279.
15. Bick, M. D. and Davidson, R. L. 1974. Total substitution of bromodeoxyuridine for thymidine in the DNA of a bromodeoxyuridine-dependent cell line. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71:2082-2086.
16. Bignold, L. P. 1987. A novel polycarbonate (Nuclepore) membrane demonstrates chemotaxis, unaffected by chemokinesis, of polymorphonuclear leukocytes in the Boyden chamber. *J. of Immunological Methods.* 105:275-280. 40
17. Bloom, L. B., Turner, J., Kelman, Z., Beechem, J. M., O'Donnell, M., and Goodman, M. F. 1996. Dynamics of loading the beta sliding clamp of DNA polymerase III onto DNA. *J. Biol. Chem.* 271:30699-708.

18. Böck, G., Hilchenbach, M., Schauenstein, K. and Wick, G. 1985. Photometric analysis of antifading reagents for immunofluorescence with laser and conventional illumination sources. *J. of Histochemistry and Cytochemistry* 33:699-705.
19. Böhmer, R. 1990. Cell division analysis using bromodeoxyuridine-induced suppression of Hoechst 33258 fluorescence. *Methods in Cell Biology* 18:173-84.
20. Bruno, G., Capezzuto, P., and Madan, A. 1995. *Plasma deposition of amorphous silicon-based materials*. Academic Press, Boston.
21. Bustamante, C. 1991. Direct observation and manipulation of single DNA molecules using fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20:415-46.
22. Buurman, E. P., Sanders, R., Draaijer, A. Van Veen, J. J. F., Houpt, P. M., and Levine, Y. K. 1992. Fluorescence lifetime imaging using a confocal laser scanning microscope. *Scanning* 14:155-59. 10
23. Cantor, C. R., Mirzabekov, A., and Southern, E. 1992. Report on the sequencing by hybridization workshop. *Genomics*, 13:1378-1383.
24. Castro, A. and Shera, E. B. 1995. Single-molecule electrophoresis. *Anal. Chem.* 67:3181-3186.
25. Chang, H. T. and Yeung, E. S. 1995. Dynamic control to improve the separation performance in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 16:2069-73.
26. Chen, D. and Dovichi, N. J. 1996. Single-molecule detection in capillary electrophoresis: molecular shot noise as a fundamental limit to chemical analysis. *Anal. Chem.* 68:690-696. 20
27. Chu, G. Vollrath, D., and Davis, R. W. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234:1582.
28. Church, G. M. and Kieffer-Higgins, S. 1988. Multiplex DNA sequencing. *Science* 240:185-88.
29. Clark, I., MacManus, J. P., Banville, D., and Szabo, A. G. 1993. A study of sensitized lanthanide luminescence in an engineered calcium-binding protein. *Anal. Biochem.* 210:1-6.
30. Clegg, R. M., Feddersen, B., Gratton, E., and Jovin, T. M. 1991. Time-resolved imaging microscopy. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* 1640:448-460. 30
31. Clegg, R. M. 1992. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods in Enzymology*. 211:353-379.
32. Clegg, R. M., Murchie, A. I. H., Zechel, A., and Lilley, D. M. J. 1993. Observing the helical geometry of double-stranded DNA in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2994-98.
33. Clegg, R. M. 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Opin. Biotech.* 6:103-110.
34. Colson, P., Houssier, C. and Fredericq, E. 1974. *Biochim. Biophys. Acta* 340:244-61.
35. Crain, P. F. 1990. *Mass Spectrom. Rev.* 9:505-54. 40
36. Crissman, H. A. and Steinkamp, J. A. 1990. Detection of bromodeoxyuridine-labeled cells by differential fluorescence analysis of DNA fluorochromes. *Methods in Cell Biology* 33:199-206.
37. Cundall, R. B. and Dale, R. E. (1983). *Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology*. Plenum, New York.

38. Dash, J. G. 1975. *Films on solid surfaces: the physics and chemistry of physical adsorption*. Academic Press, New York.
39. Davis, L., Fairfield, F., Hammond, M., Harger, C., Jett, J., and Keller, R. 1992. Rapid DNA sequencing based on single-molecule detection. *Los Alamos Science*. 20:280-6.
40. Davis, L. M., Fairfield, F. R., Harger, C. A., Jett, J. H., Keller, R. A., Hahn, J. H., Krakowski, L. A., Marrone, B. L., Martin, J. C., Nutter, H. L., Ratliff, R. L., Shera, E. B., Simpson, D. J. and Soper, S. A. 1991. *Genet. Anal. Tech. Appl.* 8:1-7.
41. de Jong, P. J., Yokobata, K., Chen, C., Lohman, F., Pederson, L., McNinch, J. et al. 1989. *Cytogenet. Cell Genet.* 51:985.
42. Ding, D. W., Rill, R. and Van Holde, K. E. 1972. *Biopolymers* 11:2109-2124. 10
43. Dozier, J. 1988 HIRIS — The high resolution Imaging spectrometer. *Proc. SPIE — Recent Adv. Sensors, Radiometry Data Process. Remote Sens.* 924:10-22.
44. Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I., and Crkvenjakov, R. 1989. Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method. *Genomics* 4:114-128.
45. Drmanac, R., Drmanac, S., Jarvis, J., and Labat, I. 1994. Sequencing by hybridization. In *Automated DNA Sequencing and Analysis Techniques*, J. Craig Ventor, Ed. Academic Press, London.
46. Eigen, M. and Rigler, R. 1994. Sorting single molecules: applications to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:5740-7. 20
47. el-Deiry, W. S., et al., 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.
48. Faerber, P. and Scheit, K. H. 1971. *Chem. Ber.* 104:456-460.
49. Fairclough, R. H., and Cantor, C. R. 1978. The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies. *Methods in Enzym.* 347-79.
50. Fan, F. F. and Bard, A. J. 1995. Electrochemical detection of single molecules. *Science* 267:871-4.
51. Fawcett, J. J., Longmire, J. L., Martin, J. C., Deaven, L. L., and Cram, L. S. 1994. Large-scale chromosome sorting. *Methods in Cell Biology* 42:319-331. 30
52. Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
53. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. (Addendum). *Anal. Biochem.* 137:266-7.
54. Ferreira, M. and Rubner, M. F. 1995. Molecular-level processing of conjugated polymers. 1. layer-by-layer manipulation of conjugated polymers. *ACS* 28:7107-7114.
55. Ferrell, T., Allison, D., Thundat, T., and Warmack, R. 1997. Scanning tunneling microscopy in sequencing of DNA. In *Molecular Biology and Biotechnology*, R. A. Meyers, Ed. VCH Publishers, New York.
56. Förster, T. 1965. In *Modern Quantum Chemistry*, Vol. III (Sinanoglu, O., Ed.), pp. 93-137, Academic Press, New York. 40
57. Fou, A. C. and Rubner, M. F. 1995. Molecular-level processing of conjugated polymers. 2. layer-by-layer manipulation of in-situ polymerized p-type doped conducting polymers. *ACS* 28:7115-7120.

58. Franklin, A. L. and Filion, W. G. 1985. A new technique for retarding fading of fluorescence: DPX-BME. *Stain Technology* 60:125-35.
59. Frey, M. W., Sowers, L. C., Millar, D. P., and Benkovic, S. J. 1995. The nucleotide analog 2-aminopurine as a spectroscopic probe of nucleotide incorporation by the Klenow fragment of *Escherichia coli* polymerase I and bacteriophage T4 DNA polymerase.
60. Fu, T. J., Sanders, G.M., O'Donnell, M., and Geiduschek, E. P. 1996. Dynamics of DNA-tracking by two sliding-clamp proteins. *EMBO J.* 15:4414-22.
61. Gadella, T. W. J., Jovin, T. M., and Clegg, R. M. 1993. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale. *Biophysical Chemistry*. 48:221-239.
62. Gains, H., Andersson, L., and Biberfeld, G. 1996. A new method for measuring lymphocyte proliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J. of Immunological Meth.* 195:63-72.
63. Garini, Y., Katzir, N., Cabib, D., and Buckwald, R. A. 1996. Spectral bio-imaging. In *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy* (Wang, X.-F. and Herman, B., Eds.), John Wiley & Sons, New York.
64. Garland, P. B. and Moore, C. H. 1979. Phosphorescence of protein-bound eosin and erythrosin: a possible probe for measurements of slow rotational motion. *Biochem. J.* 183, 561-572.
65. Gawrisch, K., Han, K. H., Yang, J. S., Bergelson, L. D., and Ferretti, J. A. 1993. Interaction of peptide fragment 828-848 of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type I with lipid bilayers. *Biochemistry* 32:3112-18.
66. Gebeyehu, G. Rao, P. Y., SooChan, P., Simms, D. A., and Klevan, L. 1987. Novel biotinylated nucleotide-analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. *Nucleic Acids Res.* 15:4513-34.
67. Gibson, T. J., Coulson, A. R., Sulston, J. E., and Little, R. F. R. 1987a. *Gene*. 53:275.
68. Gibson, T. J., Rosenthal, A., and Waterson, R. H. 1987b. *Gene* 53:283.
69. Gill, D. 1979. Inhibition of fading in fluorescence in microscopy of fixed cells. *Experientia* 35:400-1.
70. Gillam, I. C. and Tener, G. M. 1986. N4-(6-aminohexyl) cytidine and -deoxycytidine nucleotides can be used to label DNA. *Anal Biochem.* 157:199-207.
71. Giloh, H. and Sedat, J. W. 1982. Fluorescence microscopy; reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by *n*-propyl gallate. *Science* 217:1252-1255.
72. Glazer, A. N. and Mathies, R. A. 1997. Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses. *Current Opinion in Biotechnology* 8:94-102.
73. Glickman, B. W. 1985. *Basic Life Sciences*. 31:353-79.
74. Glover, D. M. and Hames, B. D. 1995. *DNA Cloning 3*. IRL Press, New York.
75. Goodwin, P. M., Ambrose, W. P., Martin, J. C., and Keller, R. A. 1995. Spatial dependence of the optical collection efficiency in flow cytometry. *Cytometry*. 21:133-144.
76. Gratton, E. and Limkema, M. 1983. A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer with picosecond resolution. *Biophys. J.* 44:315-325.
77. Griep, M. A. 1995. Fluorescence recovery assay: a continuous assay for processive DNA polymerases applied specifically to DNA polymerase III holoenzyme. *Anal. Biochem.* 232:180-9.

10

20

30

40

78. Guéron, M., Eisinger, J., and Shulman, R. G. 1967. *J. Chem. Phys.* 47:4077.
79. Guilbault, G. G. 1973. (ed.) *Practical fluorescence: theory, methods and techniques*. Marcel Dekker, New York.
80. Gurrieri, S., Rizzarelli, E., Beach, D. and Bustamante, C. 1990. Imaging of kinked configurations of DNA molecules undergoing orthogonal field alternating gel electrophoresis by fluorescence microscopy. *Biochemistry* 29:3396-3401.
81. Haab, B. and Mathies, R. 1995. Single molecule fluorescence burst detection of DNA fragments separated by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 67:3253-60.
82. Hamada, S. and Fujita, S. 1983. DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry* 79:219-26.
83. Harding, J. D. and Keller, R. A. 1992. Single molecule detection as an approach to rapid DNA sequencing. *Trends Biotechnol.* 10:55-57.
84. Harris, C. M. and Kell, D. B. 1985. On the dielectrically observable consequences of the diffusional motions of lipids and proteins in membranes. .2. Experiments with microbial cells, protoplasts and membrane vesicles. *Eur. Biophysics. J.* 13:11-24.
85. Haugland, R. P. 1996. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Molecular Probes, Eugene.
86. Herendeen, D. R and Kelly, T. J. 1996. DNA polymerase III: running rings around the fork. *Cell.* 84:5-8.
87. Herman, B., Wang, X.F., Periasamy, A., Kwon, S., Gordon, G., and Wodnicki, P. Fluorescence lifetime imaging in cell biology. *Proceedings of Optical Diagnostics of Living Cells and Biofluids* 2678:88-97.
88. Hogan, M., Dattagupta, N. and Crothers, D. M. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:195-199.
89. Hötke, H.-J., Seibl, R., Burg, J., Mühlegger, K., and Kessler, C. 1990. Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids: II. Optimization of the digoxigenin system. *Mol. Gen. Hoppe-Seyler* 371:929-938.
90. Holzwarth, A. R. 1995. Time-resolved fluorescence spectroscopy. *Methods in Enzymology.* 246:335-361.
91. Holzwarth, G., Whitcomb, R. W., Platt, K. J., Crater, G. D., and McKee, C. B. 1990. Velocity of linear DNA during pulsed-field gel electrophoresis. In *Electrophoresis of Large DNA Molecules* (Lai, E. and Birren, B. W., Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
92. Holzwarth, G., McKee, C. B., Steiger, S., and Crater, G. 1987. Transient orientation of linear DNA molecules during pulsed-field gel electrophoresis. *Biopolymers* 28:1043.
93. Houseal, T. W., Bustamante, C., Stump, R. F., and Maestre, M. F. 1989. *Biophys. J.* 56:507.
94. Huff, J. C., Weston, W. L. and Wanda, K. D. 1982. Enhancement of specific immunofluorescent findings with use of para-phenylenediamine mounting buffer. *J. of Investigative Dermatology* 78:449-50.
95. Hung, S. C., Ju, J., Mathies, R. A., and Glazer, A. N. 1996. Cyanine dyes with high absorption cross section as donor chromophores in energy transfer primers. *Anal. Biochem.* 243:15-27.
96. Ickhikawa, M., Iijima, T., and Matsumoto, G. 1993. Simultaneous 16, 384-site optical recording of neural activities in the brain. In *Brain Mechanisms of Perception and*

10

20

30

40

- Memory: From Neuron to Behavior*. T. Ono, L. R. Squire, M. E. Raichle, D. I. Perrett & M. Fukuda (eds). Oxford University Press, NY.
97. Ikehara, M., Tazawa, I., and Fukui, T. 1969a. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo). 17:1019-1024.
 98. Ikehara, M., Tazawa, I., and Fukui, T. 1969b. *Biochemistry* 8:736-43.
 99. Iijima, T., Ichikawa, M., & Matsumoto, G. 1989 *Abstr. Soc. Neurosci.* 15:398.
 100. Janesick, J. (1980-91) Informal Notes, Jet Propulsion Laboratory, California Institute of Technology, Pasadena, California.
 101. Jett, J., Keller, R., Martin, J., Marrone, B., Moyzis, R., Ratliff, R., Seitzinger, N., Shera, E., and Stewart, C. 1989. High-speed DNA sequencing: an approach based upon fluorescence detection of single molecules. *J. of Bio. Structure & Dynamics* 7:301-9. 10
 102. Jett et al. 1995. US Patent No. 5405747.
 103. Johnson, G. D., Davidson, R. S., McNamee, K. C., Russell, G., Goodwin, D. & Holborow, E. J. 1982. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *J. of Immunological Methods* 55:231-242.
 104. Johnson, G. D. and Nogueira Araujo, G. M. de C. 1981. A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. of Immunological Methods* 43:349-50.
 105. Ju, J., Glazer, A. N., and Mathies, R. A. 1996a. Cassette labeling for facile construction of energy transfer fluorescent primers. *Nucleic Acids Res.* 24:1144-8. 20
 106. Ju, J., Glazer, A. N., and Mathies, R. A. 1996b. Energy transfer primers: a new fluorescence labeling paradigm for DNA sequencing and analysis. *Nature Medicine*. 2:246-9.
 107. Junttanen, J. H. and Riekkola, M. L. 1995. Influence of electrolyte composition on the effective electric field strength in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 16:1441-4.
 108. Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., and Deamer, D. W. 1996. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:13770-3.
 109. Kato, H. and Yoshida, T. H. 1970. Nondisjunction of chromosomes in a synchronized cell population initiated by reversal of colcemid inhibition. *Expl. Cell Res.* 60:459-64. 30
 110. Keough, T., Baker, T. R., Dobson, R. L. M., Lacey, M. P., Riley, T., Hasselfield, J., and Hesselberth, P. E. 1993. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7:195-200.
 111. Kinjo, M. and Rigler, R. Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Research*. 23:1795-1799.
 112. Kirk, W. R., Wessels, W. S., and Prendergast, F. G. 1993. Lanthanide-dependent perturbations of luminescence in indolythylenediaminetetraacetic acid-lanthanide chelate. *J. Phys. Chem.* 97:10326-10340.
 113. Klenchin, V. A., Sukharev, S. I., Serov, S. M., Chernomordik, L. V., and Chizmadzhev, YuA. 1991. Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophysical J.* 60:804-11. 40
 114. Kochetkov, N. K., Budowsky, and Shibaev, V. N. *Proc. Nucl. Acid Chem.*, 1:500-2.
 115. Konuma, M. 1992. *Film Deposition by plasma techniques*. Springer-Verlag, New York.

116. Korchemnaya, E. K., Ermakov, A. N., Bochkova, L. P. 1978. *J. Anal Chem USSR (Eng. Transl.)* 33:625.
117. Kornberg, A., and Baker, T. A. 1991. *DNA Replication* W. H. Freeman, New York.
118. Lakowicz, J. R. and Szymanski, H. 1996. Imaging applications of time-resolved fluorescence spectroscopy. In *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy* (Wang, X. F. and Herman, B. Eds). John Wiley & Sons, New York.
119. Lakowicz, J. R. and Berndt, K. W. 1991. Lifetime-selective fluorescence imaging using an RF phase-sensitive camera. *Rev. Sci. Instru.* 62:3653.
120. Lang, R. A., Robins, R. K., and Townsend, L. B. 1968. *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*. 1:228. Ed, Zorbach, W. W. and Tipson, R. S. John Wiley & Sons, New York. 10
121. Langer, P. R., Waldrop, A. A., and Ward, D. C. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:6633-6637.
122. Lee, K. B., Matsuda, K., Nishimura, S., and Lee, Y. C. 1995. A new approach to assay endo-type carbohydrases: bifluorescent-labeled substrates for glycoamidases and ceramide glycanases. *Anal. Biochem.* 230:31-6.
123. Lee, L. G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. W., Halloran, N. D., and Wilson, R. K. *Nucleic Acids Res.* 20:2471-2483.
124. Lee, S. P., Porter, D., Chirikjian, J. G., Knutson, J. R., and Han, M. K. 1994. A fluorometric assay for DNA cleavage reactions characterized with *Bam*HI restriction endonuclease. *Anal. Biochem.* 220:377-383. 20
125. Lee, S. P., Censullo, M. L., Kim, H. G., Knutson, J. R., and Han, M. K. 1995. Characterization of endonucleolytic activity of HIV-1 integrase using a fluorogenic substrate. *Anal. Biochem.* 227:295-301.
126. Lee, Y.-H., Maus, R. G., Smith, B. W. and Winefordner, J. D. 1994. Laser-induced fluorescence detection of a single molecule in a capillary. *Anal. Chem.* 66:4142-9.
127. Lewotsky, K. 1994. Hyperspectral Imaging: evolution of imaging spectrometry. *SPIE OE/Rep.*, November:1-3.
128. Little, D. P., Chorush, R. A., Speir, J. P., Senko, M. W., Kelleher, N. L., and McLafferty, F. W. 1994. *J. Am. Chem. Soc.* 116:4893-4897. 30
129. Livak, K. J. 1997. Quantitation of DNA/RNA using real-time PCR detection. *PE Applied Biosystems*, Foster City, CA.
130. Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T. et al., 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol.* 14:1675-1680.
131. Loros, J. J., Denome, S. A., and Dunlap, J. C. 1989. Molecular cloning of genes under control of the circadian clock in *Neurospora*. *Science* 243:385-388.
132. Marcus, P. I. and Robbins, E. 1963. Viral inhibition in the metaphase-arrest cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50:1156-64. 40
133. Marra, M., Weinstock, L. A., and Mardis, E. R. 1996. End sequence determination from large insert clones using energy transfer fluorescent primers. *Genome Research* 6:1118-22
134. Martin, I., Dubois, M.-C., Defrise-Quertain, F., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R., and Ruyschaert, J.-M. 1994. Correlation between fusogenicity of synthetic modified

- peptides corresponding to the NH₂-terminal extremity of simian immunodeficiency virus gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer: an infrared spectroscopy study. *J. Virol.* 68:1139-48.
135. Mason, W. T. 1992. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. Harcourt Brace & Company, Cambridge, UK.
 136. Matayoshi, E. D., Wang, G. T., Krafft, G. A., and Erickson, J. 1990. Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science*. 247:954.
 137. Matsumoto, B. 1993. Cell biological applications of confocal microscopy. *Methods in Cell Biology*. 38:86.
 138. Matsumoto, S., Morikawa, K., and Yangida, M. 1981. Light microscopic structure of DNA in solution studied by the 4',6-diamidino-2-phenylindole staining method. *J. Mol. Biol.* 152:501-516.
 139. Maurizi, M. R., Kasprzyk, P. G., and Ginsberg, A. 1986. Distances between active site probes in glutamine synthetase from *Escherichia coli*: fluorescence energy transfer in free and in stacked dodecamers. *Biochem.* 25:141-151.
 140. Mautner, H. G. 1956. *J. Am. Chem. Soc.* 78:5293.
 141. Maxam, A. M. and Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:560-4.
 142. Maymon, W., and Neeck, S. P. 1988. Optical system design alternatives for the Moderate-Resolution Imaging Spectrometer Tilt (MODIS-T) for the Earth Observing System (EoS). *Proc. SPIE — Recent Adv. Sensors, Radiometry Data Process Remote Sens.* 924:10-22.
 143. McGown, L. B. 1989. Fluorescence lifetime filtering. *Anal. Chem.* 61:839A-847A.
 144. Meffert, R. and Dose, K. 1988. Uv-induced cross-linking of proteins to plasmid pBR322 containing 8-azidoadenine 2'-deoxyribonucleotides. *FEBS Lett.* 239:190-4.
 145. Meertz, J., Xu, C. and Webb, W. W. 1995. Single-molecule detection by two-photon-excited fluorescence. *Optics Letters* 20:2532-34.
 146. Meinkoth, J. and Wahl, G. M. 1987. Nick translation. *Methods in Enzymology* 152:91-94.
 147. Menter, J. M., Hurst, R. E. and West, S. S. 1979. Photochemistry of heparin-acridine orange complexes in solution. *Photochemistry and Photobiology.* 27:629-33.
 148. Menter, J. M., Golden, J. F. & West, S. S. 1978. Kinetics of fluorescence fading of acridine orange-heparin complexes in solution. *Photochemistry and Photobiology* 27:629-633.
 149. Miki, M., O'Donoghue, S. I., and Dos Remedios, C. G. 1992. Structure of actin observed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13:132.
 150. Miki, M. and Iio, T. 1993. Kinetics of structural changes of reconstituted skeletal muscle thin filaments observed by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 268:7101-7106.
 151. Mitchinson, J. M. 1971. *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge University Press, London.
 152. Moore, D. P., Schellman, J. A., and Baase, W. A. 1986. The orientation, relaxation and reptation of DNA in orthogonal field, alternately-pulsed field gel electrophoresis: a linear dichroism study. *Biophys. J.* 49:130a.

10

20

30

40

153. Morikawa, K., and Yangida, M. 1981. *J. Biochem.* 89:693.
154. Morosanu, C. E. 1990. *Thin films by chemical vapour deposition*. Elsevier, New York.
155. Morgan, C. G., Mitchell, A. C., and Murray, J. G. 1990. Nanosecond time-resolved fluorescence microscopy: principle and practice. *Trans. R. Microsc. Soc. (Micro '90)* 463-466.
156. Nakashima, M., Yamada, S., Shiono, S., and Maeda, M. 1992. *IEEE Trans. Biomed. Engng.* 39:26-36.
157. Naktinis, V., Turner, J., O'Donnell, M. 1996. A molecular switch in a replication machine defined by an internal competition for protein rings. *Cell.* 84:127-45.
158. Negishi, K., Matsumoto, K., Bessho, T., Tada, F., and Hayatsu, H. 1988. In vitro mutagenesis by incorporation of N4-aminodeoxycytidine 5'-triphosphate. *Nucleic Acids Symposium Series.* 19:33-6.
159. Newman, J., Swiney, J. L., Day, L. A. 1977. *J. Mol. Biol.* 110:119-46.
160. Nicolas, V., Nefussi, J. R., Collin, P., and Forest, N. 1990. Effects of acidic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on subconfluent fetal rat calvaria cell cultures: DNA synthesis and alkaline phosphatase activity. *Bone and Mineral.* 8:145-56.
161. Nguyen, D. C. and Keller, R. A. Detection of single molecules of phycoerythrin in hydrodynamically focused flows by laser-induced fluorescence. *Anal. Chem.* 59:2158-2161.
162. Nie, S., Chiu, D. T., and Zare, R. N. 1994. Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy. *Science.* 266:1018-21.
163. Oida, T., Sato, Y., and Kusumi, A. 1993. Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy): methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells. *Biophys. J.* 64:676-685.
164. Orrust, R., and O'Donnell, M. 1993. *J. Biol. Chem.* 268:11766-72.
165. Pap, E. H. W., Bastiaens, P., Borst, J. W., van den Berg, P., van Hoek, A., Snoek, G., Wirtz, K., and Visser, A. 1993. Quantitation of the interaction of protein kinase C with diacylglycerol and phosphoinositides by time-resolved detection of resonance energy transfer. *Biochemistry* 32:13310-17.
166. Paul, W. Professor of Physics, Harvard University.
167. Pauleau, Y. 1995. *Materials and processes for surface and interface engineering*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
168. Paz-Elizur, T., Skalter, R., Blumenstein, S., and Livneh, Z. 1996. Beta*, a UV-inducible smaller form of the beta subunit sliding clamp of DNA polymerases III of *Escherichia coli*. I. Gene expression and regulation. *J. Biol. Chem.* 271:2482-90.
169. Peck, K., Stryer, L., Glazer, A. N. and Mathies, R. A. 1989. Single-molecule fluorescence detection: autocorrelation criterion and experimental realization with phycoerythrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4087-4091.
170. Periasamy, A., Siadat-Pajouh, M., Wodnick, P., Wang, X-F., and Herman, B. Time-gated fluorescence microscopy for clinical imaging. *Microscopy and analysis.* 3:33-4.
171. Periasamy, A. & Herman, B. 1994. Computerized fluorescence microscopic vision in the biomedical science, *J. of Computer-Assisted Microscopy* 6:1-26.

10

20

30

40

172. Picciolo, G. L. and Kaplan, D. S. 1984. Reduction of fading of fluorescent reaction product for microphotometric quantitation. *Advances in Applied Microbiology* 30:197-234.
173. Pillai, V. N. 1980. Photoremovable protecting groups in organic synthesis. *Synthesis*. 1980:1.
174. Platt, J. L. and Michael, A. F. 1983. Retardation of fading and enhancement of intensity of immunofluorescence by *p*-phenylenediamine. *J. of Histochemistry and Cytochemistry* 31:840-42.
175. Poot, M. and Hoehn, H. 1990. Cell cycle analysis using continuous bromodeoxyuridine labeling and Hoechst 33258-ethidium bromide bivariate flow cytometry. *Methods in Cell Biology* 33:185-98.
176. Porter, G. (Ed.) 1967. *Reactivity of the photoexcited organic molecule*. Interscience, New York.
177. Pringsheim, P. 1963. *Fluorescence and phosphorescence*. John Wiley, New York.
178. Priore, D.-R. C. and Allen, F. S. 1979. *Biopolymers* 18:1809-1820.
179. Purmal, A. A., Kow, Y. W.; and Wallace, S. S. 1994. 5-Hydroxyprimidine deoxynucleoside triphosphates are more efficiently incorporated into DNA by exonuclease-free Klenow fragment than 8-oxopurine deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res.* 22:3930-5.
180. Purcell, E. M. 1985. *Electricity and Magnetism, Vol. 2* McGraw-Hill, New York.
181. Qu, D., et al., 1999. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380:243-247.
182. Rahn, R. O., Schulman, R. G., and Longworth, J. W. 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:893.
183. Rampino, N. J. and Chrambach, A. 1990. Apparatus for gel electrophoresis with continuous monitoring of individual DNA molecules by video epifluorescence microscopy. *Anal. Biochem.* 194:278-283.
184. Rao, P. N. 1968. Mitotic synchrony in mammalian cells treated with nitrous oxide at high pressures. *Science* 160:774-6.
185. Rigby, P. W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237-51.
186. Reddick, R. C., Warmack, R. J., and Ferrell, T. L. 1989. *Phys. Rev. B* 39:767-770.
187. Rodgers, M. A. J. and Firey, P. A. 1985. *Photochem. Photobiol.* 42:613.
188. Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., and Nyrén, P. 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242:84-89.
189. Ross, P. D. and Scruggs, L. 1964. *Biopolymers*. 2:231-6.
190. Rost, F. W. D. 1991. *Quantitative Fluorescence Microscopy*. Cambridge University Press, Cambridge.
191. Roychoudhury, R., Tu, C.-P.-D., and Wu, R. 1979. Influence of nucleotide sequence adjacent to duplex DNA termini on 3'-terminal labeling by terminal transferase. *Nucleic Acids Res.* 6:1323-1333.

10

20

30

40

- 192.Saha, A. K., Kross, K., Kloszewski, E. D., Upson, D. A., Toner, J. L., Snow, R. A., Black, C. D. V., and Desai, V. C. 1993. Time-resolved fluorescence of a new europium chelate complex: demonstration of highly sensitive detection of protein and DNA samples. *J. Am. Chem. Soc.* 115:11032-33.
- 193.Sahota, R. S. and Khaledi, M. G. 1994. Nonaqueous capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 66:1141-6.
- 194.Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- 195.Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91. 10
- 196.Sanger, F., Nicklen, A., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-7.
- 197.Sase, I., Miyata, H., Corrie, J., Cralk, J., and Kinoshita, Jr., K. K. 1995. Real time imaging of single fluorophores on moving actin with an epifluorescence microscope. *Biophys. J.* 69:323-8.
- 198.Scheit, K. H. 1980. *Nucleotide Analogs: Synthesis and Biological Function*. John Wiley & Sons, New York.
- 199.Schellman, J. A., and Jensen, H. P. 1987. Optical spectroscopy of oriented molecules. *Chem. Rev.* 87:1359. 20
- 200.Schott, J. R. 1989. Remote sensing of the Earth: A synoptic view. *Phys Today* September:72-79.
- 201.Schwartz, D. C. and Koval, M. 1989. Conformational dynamics of individual DNA molecules during gel electrophoresis. *Nature* 338:520-522.
- 202.Selvin, P. R., Rana, T. M., and Hearst, J. E. 1994. Luminescence resonance energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 116:6029-30.
- 203.Selvin, P. R. 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Methods in Enzymology.* 246:300-334.
- 204.Shera, E. B., Seitzinger, N. K., Davis, L. M., Keller, R. A., and Soper, S. A. 1990. Detection of single fluorescent molecules. *Chem. Phys. Letts.* 174:553-57. 30
- 205.Shikmus, M. L., Guaglianone, P., and Herman, T. M. 1986. Synthesis and characterization of biotin-labeled nucleotide analogs. *DNA* 5:247-55.
- 206.Skaliter, R., Bergstein, M., and Livneh, Z. 1996. Beta*, a UV-inducible shorter form of the beta subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. II. Overproduction, purification, and activity as a polymerase processivity clamp. *J. Biol. Chem.* 271:2491-6.
- 207.Skoog, D. A., West, D. M., and Holler, F. J. 1992. *Analytical Chemistry*. Saunders College Publishing, New York.
- 208.Smimov, I. P., Roskey, M. T., Juhasz, P., Takach, E. J., Martin, S. A., and Haff, L. A. 1996. Sequencing oligonucleotides by exonuclease digestion and delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 238:19-25. 40
- 209.Smith, D. P., Shieh, B. H., and Zuker, C. S. 1990. Isolation and structure of an arrestin gene from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1003-1007.
- 210.Smith, S. B., Burrieri, S., and Bustamante, C. 1990. Fluorescence microscopy and computer simulations of DNA molecules in conventional and pulsed-field gel

- electrophoresis. In *Electrophoresis of Large DNA Molecules* (Lai, E. and Birren, B. W., Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
211. Smith, S. B., Aldridge, P. K., and Callis, J. B. 1989. Observation of Individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis. *Science* 243:203-206.
212. Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B., and Hood, L. E. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 321:674-9.
213. Sober, H. A. Ed. 1970. *Handbook of Biochemistry*, 2nd ed. The Chemical Rubber Co., Cleveland.
214. Soper, S. A., Davis, L. M., and Shera, E. B. 1992. Single molecule spectroscopy in solution. *Los Alamos Science* 20:286-96. 10
215. Spatz, W. B. and Grabig, S. 1983. Reduced fading of fast blue fluorescence in the brain of the guinea-pig by treatment with sodium-nitroprusside. *Neuroscience Letters* 38:1-4.
216. Spohr, R. 1990. *Ion tracks and microtechnology: principles and applications* Vieweg, Braunschweig.
217. Steinberg, I. Z. 1971. *Annu. Rev. Biochem.* 40:83.
218. Steiner, R. F. and Weinryb, I. 1971. *Excited States of Proteins and Nucleic Acids*. Plenum Press, New York.
219. Stewart, J. E., Hahn, G. M., Parker, V., and Bagshaw, M. A. 1968. Chinese hamster cell monolayer cell cultures. *Exp. Cell Res.* 49:293-299. 20
220. Stuart, R. V. 1983. *Vacuum technology, thin films, and sputtering: an introduction*. Academic Press, New York.
221. Stryer, L. 1978. *Annual Review of Biochem.* 47:819.
222. Stubblefield, E. 1968. Synchronization methods for mammalian cell cultures. In *Methods in Cell Physiology*. Ed. by D. M. Prescott. 3:25-43. Academic Press, New York.
223. Sturm, J. and Weill, G. 1989. Direct observation of DNA chain orientation and relaxation by electric birefringence: implications for the mechanism of separation during pulsed-field gel electrophoresis. *Phys. Rev. Lett.* 62:1484. 30
224. Taliani, M., Bianchi, E., Narjes, F., Fossatelli, M., Urbani, A., Steinküler, C., De Francesco, R., and Pessi, A. 1996. A continuous assay of hepatitis C virus protease based on resonance energy transfer dipeptide substrates. *Anal. Biochem.* 240:60-7.
225. Taylor, D. L. and Salmon, E. D. 1989. *Methods in Cell Biol.* 29:207-37
226. Taylor, D. L., Reidler, J., Spudich, J. A., and Stryer, L. 1981. Detection of actin assembly by fluorescence energy transfer. *J. Cell Biol.* 89:363.
227. ter Beest, M. and Hoekstra, D. 1993. Interaction of myelin basic protein with artificial membranes. Parameters governing binding, aggregation and dissociation. *Eur. J. Biochem.* 211:689-96.
228. Theil, E. 1997. Automation in genome research. In *Molecular Biology and Biotechnology*, R. A. Meyers, Ed. VCH Publishers, New York. 40
229. Thomas, R. S., Shimkunas, A. R., and Manger, P. E. 1992. Sub-nanosecond intensifier gating using heavy and mesh cathode underlays. *Proc. Int. Congr. High Speed Photo. Photon* 19th. 1984.

230. Tian, R. and Rodgers, M. A. J. (1991). Time-resolved fluorescence microscopy. In *New Techniques in Optical Microscopy and Spectrophotometry* (R. J. Cherry, Ed.), pp. 312-351. CRC Press, Boca Raton, FL.
231. Tinoco, I., Sauer, K., and Wang, J. C. 1995. *Physical Chemistry* Prentice Hall, Englewood Cliffs.
232. Tu, C.-P.-D., and Cohen, S. 1980 3'-End labeling of DNA with [α - 32 P] cordycepin-5'-triphosphate. *Gene* 10:177-83.
233. Uchiyama, H., Hirano, K., Kashiwasake-Jibu, M., and Taira, K. 1996. Detection of undegraded oligonucleotides *in vivo* by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 271:380-84.
234. Udenfriend, S. 1962. *Fluorescence assay in biology and medicine*. Academic Press, New York and London.
235. Ueda, T., Miura, K., Imazawa, K., and Odajima, K. 1974. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo). 22:2377-2382.
236. Valiev, K. A. 1992. *The physics of submicron lithography*. Plenum Press, New York.
237. Valnes, K. and Brandtzaeg, P. 1985. Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. *J. of Histochemistry and Cytochemistry* 33:755-761.
238. van Hulst, N. F., Moers, M. H. P., Noordman, O. F. J., Tack, R. G., Segerink, F. B., and Böiger, B. 1993. *Appl. Phys. Lett.* 62:461
239. van de Ven, M., and Gratton, E. 1992. Time-resolved fluorescence lifetime imaging. In *Optical Microscopy: Emerging Methods and Applications* (B. Herman, and J. J. Lemaster, Eds.), 373-402. Academic Press, San Diego.
240. Vaughan, W. M. and Weber, G. 1970. Oxygen quenching of pyrenebutyric acid fluorescence in water. A dynamic probe of the microenvironment. *Biochemistry* 9:464-473.
241. Waggoner, A. 1995. Covalent labeling of proteins and nucleic acids with fluorophores. *Methods in Enzymology* 246:362-373.
242. Wang et al., 1995. Discovery of adrenomedullin in rat ischemic cortex and evidence for its role in exacerbating focal brain ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1003-1007.
243. Wang, S. Y. 1976. *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*. Academic Press, New York.
244. Wang, X. F., Periasamy, A., Wodnicki, P., Gordon, G. W., and Herman, B. 1996. Time-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy: instrumentation and biomedical applications. In *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy* (Wang, X. F. and Herman, B. Ed). John Wiley & Sons, Inc., New York.
245. Wang, X. F., Periasamy, A., Wodnicki, P., Gordon, G. W., and Herman, B. 1996. Time-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy: instrumentation and biomedical applications. *Chemical Analysis* 137:313-350.
246. Wang, X. F., Kitajima, S., Uchida, T., Coleman, D. M., and Minami, S. 1990. Time-resolved fluorescence microscopy using multichannel photon counting. *Appl. Spectrosc.* 44:25.
247. Wang, Y., Wallin, J. M., Ju, J., Sensabaugh, G. F., and Mathies, R. A. 1996. High-resolution capillary array electrophoretic sizing of multiplexed short tandem repeat loci using energy-transfer fluorescent primers. *Electrophoresis*. 17:1485-90.

10

20

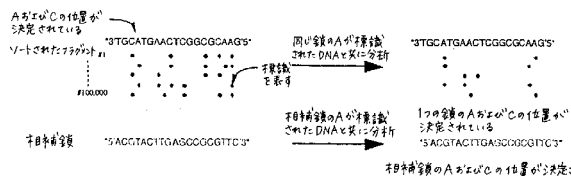
30

40

248. Wang, Y., Ju, J., Carpenter, B. A., Atherton, J. M., Sensabaugh, G. F., and Mathies, R. A. 1995. Rapid sizing of short tandem repeat alleles using capillary array electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers. *Anal. Chem.* 67:1197-203.
249. Ward, D. C. and Reich, E. 1969. Fluorescence studies of nucleotides and polynucleotides. 244:1228-1237.
250. Weimann, S., Rupp, T., Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., and Ansorge, W. 1995. Primer design for automated DNA sequencing utilizing T7 DNA polymerase and internal labeling with fluorescein-15-dATP. *BioTechniques* 18:688-97.
251. Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Conner, T. W., and Klee, H. J. 1995. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Mol. Biol.* 27:1097-1108. 10
252. Wittwer, C. T., Herman, M. G., Moss, A. A., and Rasmussen, R. P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 22:130-1, 134-8.
253. Wooley, A. T. and Mathies, R. A. 1995. Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips. *Anal. Chem.* 67:3676-3680.
254. Woronicz, J. D., Calnan, B., Ngo, V., and Winoto, A. 1994. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 367:277-281.
255. Wu, H. M., Dattagupta, N. and Crothers, D. M. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6808-6811. 20
256. Wu, P. G. and Brand, L. 1994. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* 218:1-13.
257. Wunderlich, F. and Peyk, D. 1969. Antimitotic agents and macronuclear division of ciliates. II. Endogeneous recovery from colchicine and colcemid—a new method of synchronization in *Tetrahymena pyriformis* GL. *Expl. Cell Res.* 57:142-4.
258. Yanagida, M., Hiraoka, Y., and Katsura, I. 1983. *Cold Spring Harbor Symp. Biol.* 47:177-87.
259. Yamaoka, K. and Matsuda, K. 1981. *Macromolecules* 14:595-601.
260. Yamaoka, K. and Charney, E. 1973. *Macromolecules* 6:66-76. 30
261. Vane, G., Chrien, T. G., Reimer, J. H., Green, R. O., and Conel, J. E. 1988. Comparison of laboratory calibrations of the Airborne Visible/Infrared Imaging Spectrometer (AVIRIS) at the beginning and end of the first flight season. *Proc. SPIE—Recent Adv. Sensors, Radiometry Data Process. Remote Sens.* 924:168-178.
262. Zweig, A. 1973. Photochemical generation of stable fluorescent compounds (photofluorescence). *Pure and Applied Chemistry* 33:389-410.

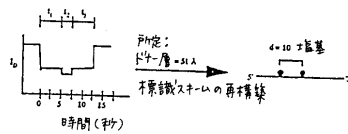
【図 1】

Figure 1



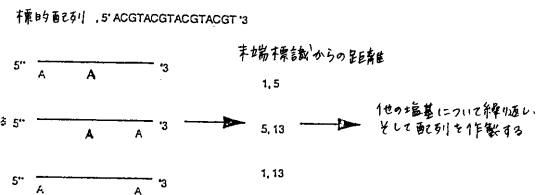
【図 2】

Figure 2



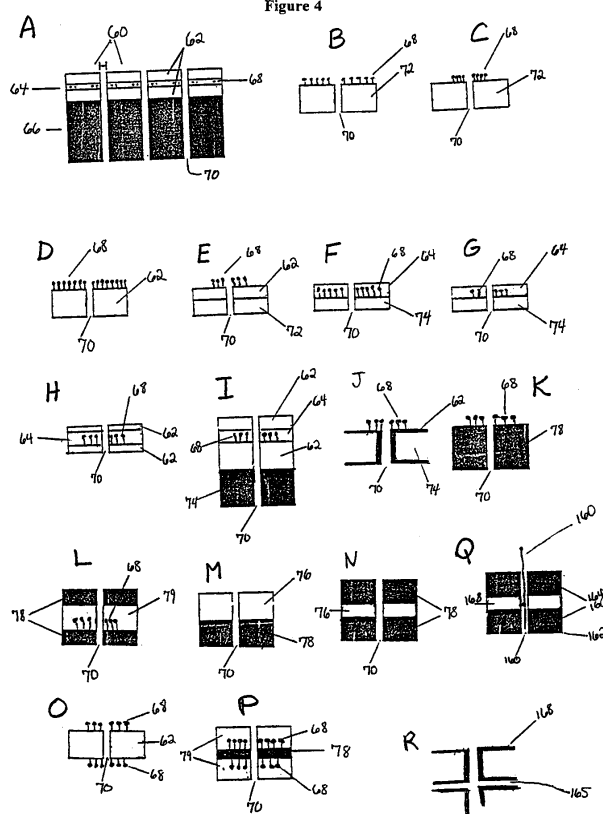
【図 3】

Figure 3



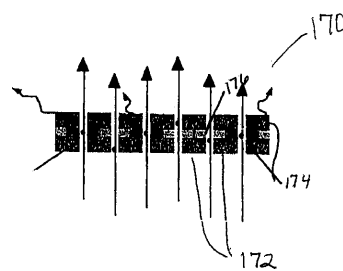
【図 4】

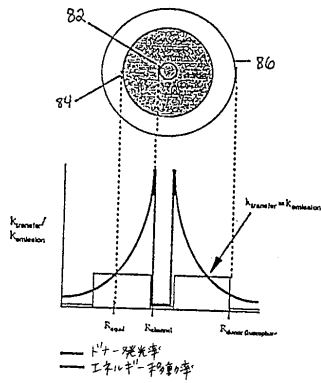
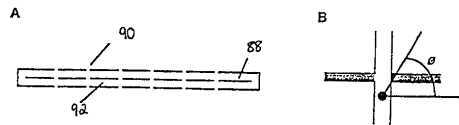
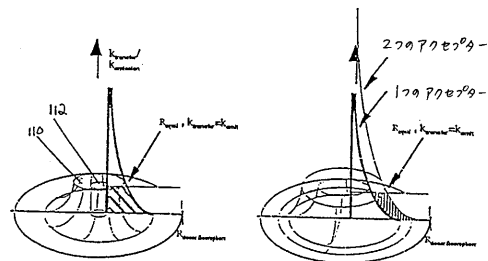
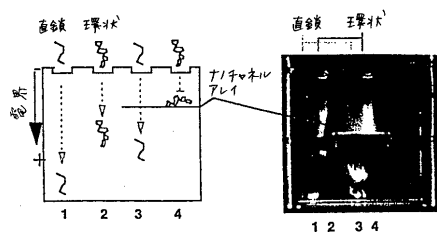
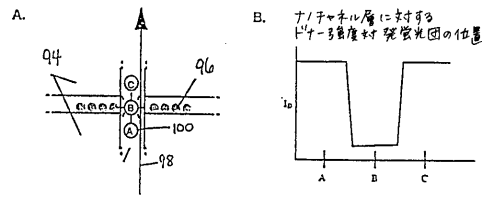
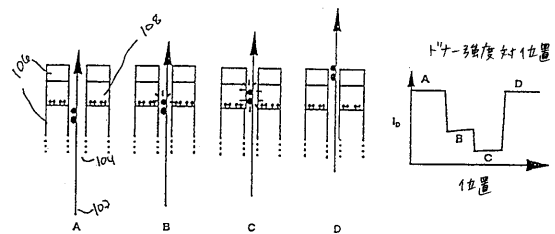
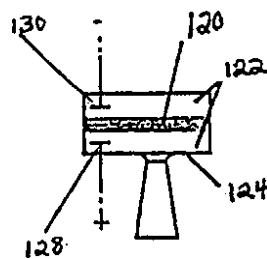
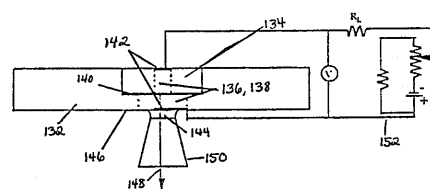
Figure 4



【図 5】

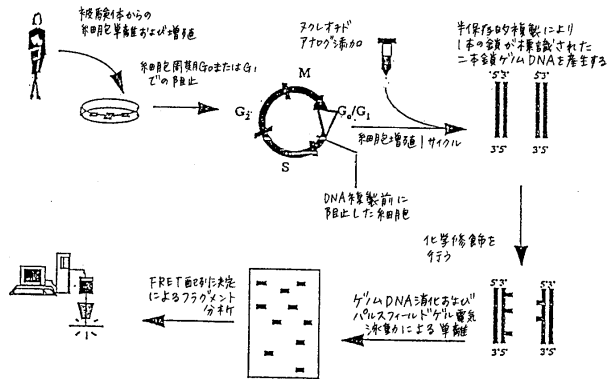
Figure 5



【図 6】
Figure 6【図 7】
Figure 7【図 10】
Figure 10【図 11】
Figure 11【図 8】
Figure 8【図 9】
Figure 9【図 12】
Figure 12【図 13】
Figure 13

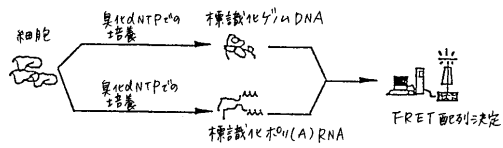
【図 14】

Figure 14



【図 15】

Figure 15



フロントページの続き

(56)参考文献 米国特許第05538898(US,A)
国際公開第96/030508(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
G01N 33/48 - 98