

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6721581号
(P6721581)

(45) 発行日 令和2年7月15日(2020.7.15)

(24) 登録日 令和2年6月22日(2020.6.22)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 Q 1/6804	(2018.01)	C 12 Q 1/6804	Z N A Z
C 12 Q 1/6869	(2018.01)	C 12 Q 1/6869	Z
C 12 N 15/10	(2006.01)	C 12 N 15/10	1 1 4 Z
G 01 N 27/00	(2006.01)	G 01 N 27/00	J
C 40 B 40/06	(2006.01)	G 01 N 27/00	Z

請求項の数 18 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-520357 (P2017-520357)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月6日 (2015.10.6)
 (65) 公表番号 特表2017-536103 (P2017-536103A)
 (43) 公表日 平成29年12月7日 (2017.12.7)
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2015/052919
 (87) 國際公開番号 WO2016/059375
 (87) 國際公開日 平成28年4月21日 (2016.4.21)
 審査請求日 平成30年10月5日 (2018.10.5)
 (31) 優先権主張番号 1418469.1
 (32) 優先日 平成26年10月17日 (2014.10.17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国(GB)

(73) 特許権者 511252899
 オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド
 イギリス国 オックスフォード オーエックス4 4ディーキュー オックスフォード サイエンス パーク エドモンド ハレー ロード ゴズリング ビルディング
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】分析物を膜貫通ポアに送達する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリヌクレオチド分析物を膜中の膜貫通ポアに送達する方法であって、
 (a) 官能化微粒子に付着している前記ポリヌクレオチド分析物を用意するステップと、
 (b) 前記官能化微粒子を前記膜へ送達し、それによって前記ポリヌクレオチド分析物を前記膜貫通ポアに送達し、前記微粒子は、(i) 前記膜を含むチャンバーの表面に沿って膜へ進み、および/または膜と平行して進み、または(ii) 膜に沿って進むステップと
 (c) 前記ポリヌクレオチド分析物が前記官能化微粒子から剥離し、ポリヌクレオチド結合タンパク質が前記膜貫通ポアを通る前記ポリヌクレオチド分析物の移動を制御するよう
 に、前記ポリヌクレオチド分析物を前記膜貫通ポアおよびポリヌクレオチド結合タンパク質と相互作用させるステップと
 を含む、前記方法。

【請求項2】

前記膜にカップリングされなかったポリヌクレオチド分析物の濃度と比べて、増加した濃度のポリヌクレオチド分析物を膜中の膜貫通ポアに送達するためのものである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記膜貫通ポアに送達される前記ポリヌクレオチド分析物の濃度が、少なくとも約10倍増加される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

(a) 前記官能化微粒子を電気化学的勾配、拡散勾配、親水性勾配または疎水性勾配に沿って移動させるステップと、(b) 前記官能化微粒子を磁場内で移動させるステップと、(c) 前記官能化微粒子を電場内で移動させるステップと、(d) 前記官能化微粒子を圧力下で移動させるステップと、または(e) 前記官能化微粒子を重力によって移動させるステップとを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、50以上、100以上、500以上、1,000以上、5,000以上、10,000以上、100,000以上、1,000,000以上、10,000,000以上、または50,000,000以上のポリヌクレオチド分析物が前記官能化微粒子に付着される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記ポリヌクレオチド分析物が、前記膜とカップリングすることができる1つまたは複数のアンカーを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記アンカーが、ポリペプチドアンカーおよび/または疎水性アンカーを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記ポリヌクレオチド分析物が前記官能化微粒子に一時的に付着される、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記ポリヌクレオチド分析物がハイブリダイゼーションによって前記官能化微粒子に付着され、および/または請求項6に依存したときに、前記1つまたは複数のアンカーが、ハイブリダイゼーションによって前記ポリヌクレオチド分析物に連結される、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記官能化微粒子が、微粒子が直径500μm以下であり、セラミック、ガラス、シリカ、重合体または金属から形成される、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

30

前記膜貫通ポアが膜貫通タンパク質ポアである、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記膜貫通タンパク質ポアが、スメグマ菌(*Mycobacterium smegmatis*)ポリン(Msp)、-ヘモリシン(-HL)またはライセニンに由来する、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

ポリヌクレオチドを特性評価する方法であって、(a)請求項1～12のいずれか一項に記載の方法を行うステップと、(b)前記ポリヌクレオチドが前記膜貫通ポアを通りよう前に前記ポリヌクレオチドを前記膜貫通ポアと相互作用させるステップと、(c)前記ポリヌクレオチドが前記ポアに対して移動するときに、前記ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を取り、それによって前記ポリヌクレオチドを特性評価するステップとを含む方法。

40

【請求項 14】

前記官能化微粒子を前記膜から除去するステップをさらに含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

磁場またはフローベースの方法を使用する、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

(a) 第一の官能化微粒子に付着している第一の試料中の第一のポリヌクレオチド分析

50

物を用意するステップと、

(b) 前記第一の官能化微粒子を前記膜へ送達し、それによって前記第一のポリヌクレオチド分析物を前記膜貫通ポアに送達するステップと、

(c) 前記第一の官能化微粒子を前記膜から除去する、場合により前記第一のポリヌクレオチド分析物を除去するステップと、

(d) 第二の官能化微粒子に付着している第二の試料中の第二のポリヌクレオチド分析物を用意するステップと、

(e) 前記第二の官能化微粒子を膜へ送達し、それによって前記第二のポリヌクレオチド分析物を前記膜貫通ポアに送達するステップと

を含む、請求項 1_3 に記載の方法。

10

【請求項 1_7】

請求項 1_6 に記載の方法であって、

(A) (i) ステップ (b) と (c) の間に、前記第一のポリヌクレオチド分析物を前記膜貫通ポアと相互作用させ、前記第一のポリヌクレオチド分析物の有無または 1 つもしくは複数の特性を示す 1 つまたは複数の測定値を相互作用中に取るステップ、および / または (i i) ステップ (e) 後に、前記第二のポリヌクレオチド分析物を前記膜貫通ポアと相互作用させ、前記第二のポリヌクレオチド分析物の有無または 1 つもしくは複数の特性を示す 1 つまたは複数の測定値を相互作用中に取るステップをさらに含む、あるいは、

(B) (i) ステップ (b) と (c) の間に、前記第一のポリヌクレオチドが前記ポアを通って移動するように、前記第一のポリヌクレオチドを前記膜貫通ポアと相互作用させ、前記第一のポリヌクレオチドが前記ポアに対して移動するときに、前記第一のポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特性を示す 1 つまたは複数の測定値を取り、それによって前記第一のポリヌクレオチドを特性評価するステップ、および / または (i i) ステップ (e) 後に、前記第二のポリヌクレオチドが前記ポアを通って移動するように、前記第二のポリヌクレオチドを前記膜貫通ポアと相互作用させ、前記第二のポリヌクレオチドが前記ポアを通って移動するときに、前記第二のポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特性を示す 1 つまたは複数の測定値を取り、それによって前記第二のポリヌクレオチドを特性評価するステップをさらに含む、

20

前記方法。

【請求項 1_8】

30

膜貫通ポアを使用してポリヌクレオチド分析物の有無または 1 つもしくは複数の特性を判定する方法であって、(a) 請求項 1 ~ 1_2 のいずれか一項に記載の方法を行うステップと、(b) 前記ポリヌクレオチド分析物を前記膜貫通ポアと相互作用させるステップと、(c) 前記ポリヌクレオチド分析物の有無または 1 つもしくは複数の特性を示す 1 つまたは複数の測定値を相互作用中に取るステップとを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分析物を膜中の膜貫通ポアに送達する新規方法に関する。方法は、微粒子の使用を含む。

40

【背景技術】

【0002】

迅速で安価なポリヌクレオチド（例えばDNAまたはRNA）シークエンシングおよび同定技術が、現今、広範な用途にわたって必要とされている。既存の技術は、主に、大量のポリヌクレオチドを生産するための增幅技法に頼り、シグナル検出に多量の専門蛍光化学物質を必要とするため、時間がかかり、費用が嵩む。

【0003】

膜貫通ポア（ナノポア）には、高分子および様々な小分子用の直接的、電気的バイオセンサーとして大きな将来性がある。特に、ナノポアは、最近、将来性のあるDNAシークエンシング技術として注目されている。

50

【0004】

電位がナノポア全体に印加されると、ヌクレオチドなどの分析物がバレル内に特定の期間、一時的に存在する場合、電流の流れが変化する。ヌクレオチドのナノポア検出は、電流の既知痕跡および継続時間の変化を知らせる。鎖シークエンシング法では、単一ポリヌクレオチド鎖をポアに通して、ヌクレオチドの正体を得る。鎖シークエンシングは、ポアを通るポリヌクレオチドの移動を制御するためにポリヌクレオチド結合タンパク質の使用を含むことがある。

【0005】

超低濃度分析物送達は、関連する検出器が存在している膜に分析物をカップリングして果たすことができる事が以前に立証されている。これは、検出するのに必要な分析物の量を桁違いに低下させる（国際公開第2012/164270号パンフレット）。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者らは、膜中の膜貫通ポアへの分析物の送達効率を、微粒子を使用して増すことが可能であることを驚くべきことに立証した。微粒子は、膜貫通ポアを使用して検出するのに必要な分析物の量を桁違いに低下させる。

【課題を解決するための手段】

【0007】

したがって、本発明は、分析物を膜中の膜貫通ポアに送達する方法であって、（a）微粒子に付着している分析物を用意するステップと、（b）微粒子を膜へ送達し、それによつて分析物を膜貫通ポアに送達するステップとを含む方法を提供する。

20

【0008】

本発明は、

ポリヌクレオチド分析物を特性評価する方法であって、（a）ポリヌクレオチド分析物で本発明の方法を行うステップと、（b）ポリヌクレオチドがポアを通るようにポリヌクレオチドを膜貫通ポアと接触させるステップと、（c）ポリヌクレオチドがポアに対して移動するときに、ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を取り、それによってポリヌクレオチドを特性評価するステップとを含む方法；

膜貫通ポアを使用して分析物の有無または1つもしくは複数の特性を判定する方法であつて、（a）本発明の方法を行うステップと、（b）分析物を膜貫通ポアと相互作用させるステップと、（c）相互作用中に、分析物の有無または1つもしくは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を取るステップとを含む方法；および

30

分析物を膜中の膜貫通ポアに送達するためのキットであつて、（a）微粒子と、（b）分析物を膜とカップリングすることができる1つまたは複数のアンカーとを含むキットも提供する。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】DNAを実施例1でDyna bead（登録商標）にどのように付着させたかを示す略画表現（ノンスケール）である。二本鎖DNA（dsDNA）試料は、ラムダDNAの断片化によって得（点線で示し、Aと称する）、Yアダプター（Bと称する）およびヘアピンアダプター（Cと称する）をラムダDNAのいずれかの末端に付着させている。2つの異なるヘリカーゼがdsDNA試料に結合されている。Yアダプターに結合するヘリカーゼ（Dと称する）は、そのアミノ酸配列中に存在するhisタグ（6個の連続したヒスチジン）を有さなかった一方、ヘアピンに結合するヘリカーゼ（Eと称する）は、そのアミノ酸配列中に存在するhisタグ（6個の連続したヒスチジン；図ではグレーの四角として示し、Fと称する）を有した。His-Tag Isolation and Pull down Dynabead（登録商標）（Gと称する）がdsDNA試料とプレインキュベートされる場合、次いで、ビーズ表面のコバルト（黒い円で示し、Hと称する）が酵素上のヒスチジンに結合される。dsDNA試料は、試料にハイブリダイズされ

40

50

た（Iと称する）DNA鎖に付着された2つのアンカー（Jと称する）も有し、これらはDNAを膜に結合させるために使用される。この図は、単一dsDNA試料の付着を示しているが、ビーズはコバルトで覆われているため、単一ビーズ上の複数のdsDNA試料を結合する可能性がある。

【図2】DNAライプラリー試料をDynabead（登録商標）とプレインキュベートした場合（レーン4～7）、またはDynabead（登録商標）なしでプレインキュベートした場合（レーン1～3）に観察された最大スループットに正規化されたスループット（1時間あたりにシークエンシングされるDNAのメガ塩基対）を示す棒グラフである。y軸表示=最大に正規化されたスループット、およびx軸表示=泳動数。

【図3】DNA／ビーズ試料の添加直後のナノポアチップ系の明視野画像を示す図である。わずかなDynabead（登録商標）（小さな黒点として見られる）が、膜が形成されたチップの領域で観察された（この領域はウェルの1つで黒い円によって強調されている）。

【図4】DNA／ビーズ試料添加の20分後のナノポアチップ系の明視野画像を示す図である。Dynabead（登録商標）の大きなクラスター（図では白い破線の円によって強調されている）が、膜が形成されたチップの領域で観察された（この領域はウェルの1つで黒い円によって強調されている）。

【図5】様々なDynabead（登録商標）を添加する前（X点）および後（Y点）の飽和チャネルの数（Y軸）のプロットを示す図である。調査した種々のDynabead（登録商標）官能化は、1-シラン、2-ストレプトアビジンおよび3-短いビオチン化DNA鎖と結合したストレプトアビジンであった。

【図6】もはや活性でなかった单一チャネルMspAナノポア（Xと称する棒）のパーセンテージ（y軸）、および種々のビーズ（1-シラン、2-ストレプトアビジン、3-短いビオチン化DNA鎖と結合したストレプトアビジン、4-コバルトベースのHistag Isolation and pull down）をナノポア系に添加したときに飽和したチャネル（Yと称する棒）のパーセンテージを示す図である。

【図7】ストレプトアビジン被覆ビーズの存在下（2と称する）またはストレプトアビジン被覆ビーズの不在下（0と称する）の、ポア数（y軸）対オープンポア電流（x軸、pA）を示すグラフである。

【図8】図8Aは、アレイチップ上の単一ウェルの側面を示す略画表現である。TOPオトレジストでできた柱はAと称し、ウェルの側面はBと称し、ウェルの内側および上の緩衝液はDと称し、ダークグレーとして示し、膜（両親媒性層）はEと称し、黒い線として示し、FはDNA中の被覆された微粒子を表す。この図は、微粒子が油層の縁に堆積し、次いで、微粒子が油層の縁に沿って転がり、膜の最上部に集まることを示している。

図8Bは、アレイチップ（倍率10×）における同じ単一ウェルの視野画像の上面および側面を示す図である。緩衝液に添加したフルオロフォアおよび前処理（油）に添加した異なる色のフルオロフォアがあり、これらの溶液が系のどこに存在したかを例証した。これらの画像は、共焦点顕微鏡を使用して撮影された画像であることから、図8Aの略画形態で示された系がアレイチップにおいて生成されることを例証するものである。

【図9】第二のDNA試料（B）を磁性微粒子に送達し、検出し、その後、ナノポア系から除去する前に、DNA試料（A）をどのように磁性微粒子に送達し、検出し、その後、ナノポア系から除去したかを示す略画図である。（A）は、磁性微粒子が添加されない系を示す。（B）は、磁性微粒子を使用した試料Aの送達を示す。（C）は、試料Aからの情報の十分なデータコレクションを示す。（D）は、（試料Aの被覆された）微粒子の系からの除去を示す。これは、磁性ビーズを磁石に曝露することによって行い、磁性微粒子を膜から除去することによって試料Aを膜からアンカッピングした。（E）は、系に今や試料Aがないことを示す。（F）は、磁性微粒子を使用した第二の試料Bの送達を示す。（G）は、試料Bからの情報の十分なデータコレクションを示す。（H）は、（試料Bの被覆された）微粒子の系からの除去を示す。これは、磁性ビーズを磁石に曝露することによって行い、磁性微粒子を膜から除去することによって試料Bを膜からアンカッピング

10

20

30

40

50

グした。上のプロセスは、多数の試料を送達し、検出し、次いで除去するために繰り返すことができる。

【図10】DNAを実施例5でDyna bead（登録商標）にどのように付着させたかを示す略画表現（ノンスケール）である。二本鎖DNA（dsDNA）試料は、ラムダDNAの断片化によって得（点線で示し、Aと称する）、Yアダプター（Bと称する）およびヘアピンアダプター（Cと称する）をラムダDNAのいずれかの末端に付着させている。Yアダプターに結合するヘリカーゼはDと称する。ヘアピンアダプターにハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドが示され（Eと称する）、ビオチン部分（Fと称する）を含有した。MyOne C1 Dyna bead（登録商標）（Gと称する）をdsDNA試料とプレインキュベートすると、ビーズ表面（黒い円で示し、Hと称する）のストレプトアビシンはビオチンに結合した。dsDNA試料は追加のアンカー（Jと称する）も有し、アンカーはDNA鎖（Iと称する）に付着させ、DNA鎖はYアダプターにハイブリダイズした：これをDNAを膜と結合させるために使用した。この図は、単一dsDNA試料の付着を示しているが、ビーズはストレプトアビシンで覆われているため、単一ビーズ上の複数のdsDNA試料を結合する可能性がある。

【図11】実施例6に記載されている実験の間の試料AおよびBのカバレッジ深度を示す2つのプロット（y軸=カバレッジ深度およびx軸=試料1（1と称する領域を参照されたい）および2（2と称する領域を参照されたい）のポリヌクレオチド配列中のDNA塩基数）を示す図である。カバレッジ深度は、DNA配列におけるその位置がマッピングされ、ヘリカーゼによって制御されるDNAの移動において同定された場合の数に関する。セクション（A）は、試料1のみをナノポア系に添加した場合のカバレッジ深度を示し、セクション（B）は、試料Aが系から洗浄され、試料Bが系に添加されていた場合のカバレッジ深度を示す。試料1のDNA配列は、試料2のDNA配列よりはるかに長かった。ビーズ（試料1が付着している）が系から洗い流され、試料2を有するビーズが添加された後では、試料1のカバレッジ深度は極めて低かった。

【図12】ナノポアチップ系の同じ領域の2つの顕微鏡画像を示す図である。（A）は、ビーズに付着されている試料Aの添加後のナノポアチップ系の顕微鏡画像を示す。Dyna bead（登録商標）の大きなクラスター（図では白い破線の円によって強調されている）が、膜が形成されたチップの領域で観察された（この領域はウェルの1つで黒い円によって強調されている）。（B）は、3×1m³体積の緩衝液を使用してナノポア系が洗い流された後のナノポアチップ系の顕微鏡画像を示す。膜が形成されたチップの領域にビーズは見られなかった。

【図13A】実施例7において記載されているローインプットプロトコールを示す略図である。

【図13B】PCRベースのローインプットプロトコール（実施例7において言及されている）を示す略図である。

【図14】実施例8において記載されている配列捕捉ワークフローを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

配列表の説明

配列番号1は、MS-B1突然変異体MspA单量体をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。この突然変異体は、シグナル配列を欠き、次の突然変異を含む：D90N、D91N、D93N、D118R、D134RおよびE139K。

【0011】

配列番号2は、MspA单量体のMS-B1突然変異体の成熟形態のアミノ酸配列を示す。この突然変異体は、シグナル配列を欠き、次の突然変異を含む：D90N、D91N、D93N、D118R、D134RおよびE139K。

【0012】

配列番号3は、-ヘモリシン-E111N/K147N（-HL-NN；Stoddart et al., PNAS, 2009; 106(19): 7702-7707）の1つの单量体をコードするポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列を示す。

【0013】

配列番号4は、- H L - N N の1つの単量体のアミノ酸配列を示す。

【0014】

配列番号5～7は、M s p B、CおよびDのアミノ酸配列を示す。

【0015】

配列番号8は、Phi 29 DNAポリメラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を示す。

【0016】

配列番号9は、Phi 29 DNAポリメラーゼのアミノ酸配列を示す。 10

【0017】

配列番号10は、大腸菌(E. coli)からのs b c B遺伝子に由来するコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。この配列は、大腸菌(E. coli)からのエキソヌクレアーゼI酵素(EcoExoI)をコードする。

【0018】

配列番号11は、大腸菌(E. coli)からのエキソヌクレアーゼI酵素(EcoExoI)のアミノ酸配列を示す。

【0019】

配列番号12は、大腸菌(E. coli)からのx th A遺伝子に由来するコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。この配列は、大腸菌(E. coli)からのエキソヌクレアーゼI II酵素をコードする。 20

【0020】

配列番号13は、大腸菌(E. coli)からのエキソヌクレアーゼI II酵素のアミノ酸配列を示す。この酵素は、二本鎖DNA(dsDNA)の一方の鎖からの5'一リン酸ヌクレオシドの分配性消化(distributive digestion)を3' - 5'方向で行う。鎖上の酵素開始は、およそ4ヌクレオチドの5'オーバーハングを必要とする。

【0021】

配列番号14は、サーマス・サーモフィラス(T. thermophilus)からのrecJ遺伝子に由来するコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。この配列は、サーマス・サーモフィラス(T. thermophilus)からのRecJ酵素(TthRecJ-cd)をコードする。 30

【0022】

配列番号15は、サーマス・サーモフィラス(T. thermophilus)からのRecJ酵素(TthRecJ-cd)のアミノ酸配列を示す。この酵素は、ssDNAからの5'一リン酸ヌクレオシドの前進性消化(processive digestion)を5' - 3'方向で行う。鎖上の酵素開始は、少なくとも4ヌクレオチドを必要とする。

【0023】

配列番号16は、バクテリオファージexo(redX)遺伝子に由来するコドン最適化ポリヌクレオチド配列を示す。この配列は、バクテリオファージエキソヌクレアーゼをコードする。 40

【0024】

配列番号17は、バクテリオファージエキソヌクレアーゼのアミノ酸配列を示す。この配列は、集合して三量体になる3つの同一のサブユニットの1つである。この酵素は、dsDNAの一方の鎖からのヌクレオチドの5' - 3'方向の高前進性消化を行う(<http://www.neb.com/nebcomm/products/productM0262.asp>)。鎖上の酵素開始は、5'リン酸エステルを有するおよそ4ヌクレオチドの5'オーバーハングを優先的に必要とする。

【0025】

配列番号18は、Hel308 Mbuのアミノ酸配列を示す。

【0026】

配列番号 19 は、 H e l 3 0 8 C s y のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 2 7 】

配列番号 20 は、 H e l 3 0 8 T g a のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 2 8 】

配列番号 21 は、 H e l 3 0 8 M h u のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 2 9 】

配列番号 22 は、 T r a I E c o のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 0 】

配列番号 23 は、 X P D M b u のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 1 】

配列番号 24 は、 D d a 1 9 9 3 のアミノ酸配列を示す。

10

【 0 0 3 2 】

配列番号 25 は、 T r w c C b a のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 3 】

発明の詳細な説明

開示する生成物および方法の様々な用途を当技術分野における具体的な必要に合わせて調整できることは理解されるはずである。本明細書において用いる用語法が本発明の特定の実施形態の説明を目的にしたものに過ぎず、限定を意図したものでないことも理解されるはずである。

【 0 0 3 4 】

20

加えて、本明細書および添付の特許請求の範囲において用いる場合、単数形「 a 」、「 a n 」および「 t h e 」は、文脈による別段の明白な指図がない限り、複数の言及対象を含む。したがって、例えば、「分析物 (an analyte) 」への言及は、2つ以上の分析物を含み、「微粒子 (a microparticle) 」への言及は、2つ以上の微粒子を含み、「ポリヌクレオチド (a polynucleotide) 」への言及は、2つ以上のポリヌクレオチドを含み、「アンカー (an anchor) 」への言及は、2つ以上のアンカーを指し、「ヘリカーゼ (a helicase) 」への言及は、2つ以上のヘリカーゼを含み、「膜貫通ポア (a transmembrane pore) 」への言及は、2つ以上のポアを含むなど。

【 0 0 3 5 】

上文であろうと、下文であろうと、本明細書の中で引用するすべての出版物、特許および特許出願は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

30

【 0 0 3 6 】

発明の方法

本発明は、分析物を膜中の膜貫通ポアに送達する方法を提供する。方法は、微粒子に付着している分析物を用意するステップを含む。方法は、分析物を微粒子に付着させるステップを含んでもよい。微粒子は次いで膜へ送達され、これにより分析物が膜貫通ポアへ送達される。

【 0 0 3 7 】

本発明者らは、ポアへの超低濃度の分析物送達は分析物を微粒子に付着させて果たすことができるることを、驚くべきことに立証した。これは、検出するのに必要な分析物の量を数桁下げる。必要とされる分析物の量がどの程度低減するかは、予測することができなかった。特に、本発明者らは驚くべきことに、一本鎖ポリヌクレオチドの捕捉が以前に報告されたものと比べて少なくとも 10 衍増加することを報告する。これは、次世代シーケンシングシステムなどの診断装置に関する主要な関心事である試料調製要件に、著しい意味合いを持つ。

40

【 0 0 3 8 】

本発明の方法は、好ましくは、増加した濃度の分析物を膜中の膜貫通ポアに送達するためのものである。本発明の方法は、好ましくは、増加した濃度の分析物を膜貫通ポアに送達することによる、膜中の膜貫通ポアを使用する分析物の特性評価の改善された方法である。膜貫通ポアに送達された分析物の濃度は、膜にカップリングされなかった分析物と比

50

【 0 0 3 9 】

微粒子を使用する送達効率は、分析物が膜ともカップリングされる場合、特に増加される。膜との分析物のカップリングは、様々なナノポア・酵素シーケンシング用途に利点を加えた。鎖シーケンシングにおいて、ポリヌクレオチド分析物が導入される場合、ポアは永続的または一時的に遮断されるようになり、ポリヌクレオチドのシーケンシングを妨げることがある。ポリヌクレオチド分析物の一方の末端が、例えば膜とのカップリングまたは繫留によりポアから離れて局在する場合、この一時的または永続的遮断はもはや観察されないことが驚くべきことに見いだされた。ポリヌクレオチドの一方の末端は、膜とカップリングしてこれを塞ぐことにより、ポア上の分析物濃度を有効に増加させ、したがってシーケンシング系デューティサイクルを増加させるようにも作用する。膜貫通ポアに送達される分析物の濃度は、好ましくは、膜とカップリングされている分析物と比べて少なくとも約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19倍、少なくとも約20倍、少なくとも約25倍、少なくとも約30倍、少なくとも約35倍、少なくとも約40倍、少なくとも約45倍、少なくとも約50倍、または少なくとも約100倍増加される。

10

【 0 0 4 0 】

本発明の方法は、好ましくは、特性評価またはシークエンシング用に増加した濃度のポリヌクレオチドを膜中の膜貫通ポアに送達するためのものである。本発明の方法は、好ましくは、増加した濃度の分析物を膜貫通ポアに送達することによる、膜中の膜貫通ポアを使用してポリヌクレオチドを特性評価またはシークエンシングする改善された方法である。膜貫通ポアに送達されるポリヌクレオチドの濃度は、好ましくは、上で論じたいずれかの量ほど増加される。方法は、低濃度で存在する分析物を検出するのにももちろん有利である。分析物が約0.001pMから約1nM、例えば約0.01pM未満、約0.1pM未満、約1pM未満、約10pM未満、または約100pM未満の濃度で存在する場合、方法は好ましくは、分析物を膜貫通ポアに送達（および場合により、分析物の存在または1つもしくは複数の特性を判定）できるようにする。方法は、低濃度で存在する分析物を検出するのにももちろん有利である。分析物が約0.001pMから約1nM、例えば約0.01pM未満、約0.1pM未満、約1pM未満、約10pM未満、または約100pM未満の濃度で存在する場合、方法は好ましくは、分析物の存在または1つもしくは複数の特性を判定できるようにする。

20

【 0 0 4 1 】

約 1.0 ng 以下、例えば約 5 ng 以下、約 2.5 ng 以下、約 1.0 ng 以下、約 0.5 ng 以下、約 0.1 ng 以下、約 0.01 ng 以下または約 0.001 ng 以下の分析物が存在する場合、方法は好ましくは、分析物を膜貫通ポアに送達（および場合により、分析物の存在または 1 つもしくは複数の特性を判定）できるようとする。約 5.0 fmol 以下、例えば約 4.0 fmol 以下、約 3.0 fmol 以下、約 2.0 fmol 以下、約 1.0 fmol 以下、約 0.5 fmol 以下、約 0.1 fmol 以下、約 0.01 fmol 以下、または約 0.001 fmol 以下の分析物が存在する場合、方法は、好ましくは、分析物を膜貫通ポアに送達（および場合により、分析物の存在または 1 つもしくは複数の特性を判定）できるようとする。

[0 0 4 2]

本発明の方法は、ほんの少量の精製ポリヌクレオチドがヒト血液から得られてもよいいため、ポリヌクレオチドシークエンシングに特に有利である。方法は好ましくは、約0.001pMから約1nM、例えば0.01pM未満、0.1pM未満、1pM未満、10pM未満、または100pM未満の濃度で存在するポリヌクレオチドの、膜貫通ポアへの送達を可能にする（および場合により、ポリヌクレオチドの配列の推定、またはポリヌクレオチドのシークエンシングを可能にする）。

50

【0043】

10 ng 以下、例えば約 5 ng 以下、約 2.5 ng 以下、約 1.0 ng 以下、約 0.5 ng 以下、約 0.1 ng 以下、約 0.01 ng 以下、または約 0.001 ng 以下のポリヌクレオチドが存在する場合、方法は好ましくは、分析物を膜貫通ポアに送達できるようにする（および場合により、ポリヌクレオチドの配列の推定、またはポリヌクレオチドのシーケンシングを可能にする）。約 5.0 fmol (fmol) 以下、例えば約 4.0 fmol 以下、約 3.0 fmol 以下、約 2.0 fmol 以下、約 1.0 fmol 以下、約 0.5 fmol 以下、約 0.1 fmol 以下、約 0.01 fmol 以下、または約 0.001 fmol 以下のポリヌクレオチドが存在する場合、方法は好ましくは、分析物を膜貫通ポアに送達できるようにする（および場合により、ポリヌクレオチドの配列の推定、またはポリヌクレオチドのシーケンシングを可能にする）。

【0044】

本発明の方法は好ましくは、分析物またはポリヌクレオチドの単一分子の、膜貫通ポアへの送達（および場合により特性評価）を可能にする。

【0045】

下でより詳細に論じるように、同じまたは類似の分析物の 2 つ以上のバージョンが、本発明を用いて特性評価されてもよい。これは、ポリヌクレオチドの配列を 2 回以上調査できるようにするため、ポリヌクレオチドシーケンシングに有利である。これは、シーケンシング効率および精度の向上をもたらす。

【0046】

ポリヌクレオチドの一方の末端を膜とカップリングする（一時的にでも）ことは、該末端がナノポアベースのシーケンシングプロセスを妨害できないようにされることも意味する。

【0047】

本発明の方法は、他の利点も有する。本発明で使用される微粒子は、他の分析物を含有する試料から標的分析物を選択または捕捉し、該分析物を膜貫通ポアに送達するように設計することができる。このことは、下でより詳細に論じる。

【0048】

ナノポア特性評価またはシーケンシングのための試料調製は、微粒子を使用してポリヌクレオチドなどの分析物を精製するステップを概して含む。微粒子は、次いで特性評価またはシーケンシングの前に除去される。微粒子が分析物またはポリヌクレオチドを膜貫通ポアに送達するために使用される場合、試料調製方法は 1 つ少ないステップを含み、それ故、行うのがより迅速であり、容易である。

【0049】**分析物**

本発明の方法は、分析物を膜中の膜貫通ポアに送達することに関わる。いずれの数の分析物が送達されてもよい。例えば、本発明の方法は、2 つ以上の分析物、例えば 3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、20 以上、30 以上、50 以上、100 以上、500 以上、1,000 以上、5,000 以上、10,000 以上、100,000 以上、1,000,000 以上、10,000,000 以上、または 50,000,000 以上の分析物を送達することに関わることがある。2 つ以上の分析物は、同じまたは異なる微粒子を使用して送達されてもよい。

【0050】

2 つ以上の分析物が送達される場合、それらは互いに異なっていてもよい。例えば、第一の分析物はタンパク質であってもよく、第二の分析物はポリヌクレオチドであってもよい。あるいは、2 つ以上の分析物は異なるポリヌクレオチドであってもよい。2 つ以上の分析物は、より長いポリヌクレオチド配列の複数のコピー（ゲノムの複数のコピーなど）のランダム断片化の生成物であってもよく、それ故に、異なっているが重複するポリヌクレオチド断片であってもよい。2 つ以上の分析物は、同じ分析物の 2 つ以上の例であってもよい。2 つ以上の分析物は、同一であってもよい。これにより、特に分析物がポリヌク

10

20

30

40

50

レオチドの場合校正が可能になる。方法が3つ以上の分析物の調査に関わる場合、それらはすべて、同じ分析物の3つ以上の例であってもよく、またはそれらのいくつかが同じ分析物の別の例であってもよい。

【0051】

本発明の方法は、分析物の1つまたは複数の特性を判定または測定するステップに関わることがある。方法は、分析物の2、3、4または5以上の特性を判定または測定するステップを含むことがある。1つまたは複数の特性は、好ましくは、(i)分析物のサイズ、(ii)分析物の同一性、(iii)分析物の二次構造、および(iv)分析物が修飾されているか否かから選択される。 $\{i\}$ 、 $\{ii\}$ 、 $\{iii\}$ 、 $\{iv\}$ 、 $\{i, ii\}$ 、 $\{i, iii\}$ 、 $\{i, iv\}$ 、 $\{ii, iii\}$ 、 $\{ii, iv\}$ 、 $\{iii, iv\}$ 、 $\{i, ii, iii\}$ 、 $\{i, ii, iv\}$ 、 $\{i, iii, iv\}$ 、 $\{ii, iii, iv\}$ または $\{i, ii, iii, iv\}$ などの、(i)から(iv)のいずれの組み合わせを本発明に従って測定してもよい。本発明の方法は、好ましくは、ポリヌクレオチドの配列の推定またはポリヌクレオチドのシークエンシングを含む。このことは、下でより詳細に論じる。

【0052】

分析物は、いずれの物質であってもよい。好適な分析物としては、金属イオン、無機塩類、ポリマー酸または塩基などの重合体、色素、漂白剤、医薬品、診断剤、レクリエーショナルドラッグ、爆薬および環境汚染物質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0053】

分析物は、細胞から分泌される分析物であってもよい。あるいは、分析物は、本発明が行われる前に分析物が細胞から抽出されなければならないような、細胞内部に存在する分析物であってもよい。

【0054】

分析物は、好ましくは、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはポリヌクレオチドである。アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質は、天然に存在してもよくまたは天然に存在しなくてもよい。ポリペプチドまたはタンパク質は、その中に合成アミノ酸または修飾アミノ酸を含んでもよい。アミノ酸に対するいくつかの異なるタイプの修飾は、当技術分野において公知である。本発明の目的のために、当技術分野で利用可能ないずれかの方法によって分析物を修飾できることは理解されるはずである。

【0055】

タンパク質は、酵素、抗体、ホルモン、成長因子、またはサイトカインなどの成長調節タンパク質であってもよい。サイトカインは、インターロイキン、好ましくはIFN-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12またはIL-13、インターフェロン、好ましくはIL-、またはTNF-などの他のサイトカインから選択することができる。タンパク質は、細菌性タンパク質、真菌性タンパク質、ウイルス性タンパク質、または寄生虫由来タンパク質であってもよい。タンパク質はポアと接触される前に、ポリペプチド鎖を形成するためにアンフォールディングされてもよい。

【0056】

分析物は、最も好ましくは核酸などのポリヌクレオチドである。ポリヌクレオチドは、下でより詳細に論じる。ポリヌクレオチドは、5'末端もしくは3'末端、または鎖に沿った1つもしくは複数の中間点で膜とカップリングしてもよい。ポリヌクレオチドは、下で論じるように一本鎖または二本鎖であってもよい。ポリヌクレオチドは、環状であってもよい。ポリヌクレオチドは、マイクロRNAにハイブリダイズするプローブまたはマイクロRNAそれ自体であるアプタマーであってもよい(Wang, Y. et al, *Nature Nanotechnology*, 2011, 6, 668-674)。分析物は、タンパク質と結合するポリヌクレオチドであってもよく、タンパク質を特性評価するために、例えばタンパク質の濃度を判定するために使用することができる。

【0057】

10

20

30

40

50

分析物がマイクロRNAにハイブリダイズするプローブである場合、プローブは永続的または一時的に膜とカップリングされてもよい。このことは、下でより詳細に論じる。プローブそれ自体が、膜と直接カップリングするように適合されてもよく、または膜とカップリングするように適合された相補的ポリヌクレオチドにハイブリダイズしてもよい。分析物は、特有の配列または明確に識別できるようにするバーコードを有するプローブにハイブリダイズされたマイクロRNAの複合体であってもよい。

【0058】

分析物がアプタマーである場合、アプタマーは永続的または一時的に膜とカップリングされてもよい。アプタマーそれ自体が、膜と直接カップリングするように適合されてもよく、または膜とカップリングするように適合された相補的ポリヌクレオチドにハイブリダイズしてもよい。アプタマーは、タンパク質分析物と結合されてもまたは結合されなくてもよく、アプタマーを検出する最終的な目的は、アプタマーが結合するタンパク質分析物の有無または1つもしくは複数の特性を検出することであってもよい。

【0059】

ポリヌクレオチド

分析物は、好ましくはポリヌクレオチドである。核酸などのポリヌクレオチドは、2つ以上のヌクレオチドを含む高分子である。ポリヌクレオチドまたは核酸は、いずれのヌクレオチドのいずれの組み合わせを含んでもよい。ヌクレオチドは、天然に存在するものであることもあり、または人工的なものであることもある。ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、酸化またはメチル化されていることがある。ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、損傷されていることがある。例えば、ポリヌクレオチドは、ピリミジン二量体を含むことがある。そのような二量体は概して、紫外線による損傷に関連し、皮膚黒色腫の主原因である。ポリヌクレオチド中の1つまたは複数のヌクレオチドは、例えば標識またはタグで、修飾されていることがある。好適な標識は、下で説明する。ポリヌクレオチドは、1つまたは複数のスペーサーを含むことがある。

【0060】

ヌクレオチドは、概して核酸塩基、糖および少なくとも1つのリン酸エステル基を概して含有する。核酸塩基および糖は、ヌクレオシドを形成する。

【0061】

核酸塩基は、概して複素環式である。核酸塩基としては、プリンおよびピリミジン、より具体的にはアデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、ウラシル(U)およびシトシン(C)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0062】

糖は、概してペントース糖である。ヌクレオチド糖としては、リボースおよびデオキシリボースが挙げられるが、これらに限定されない。糖は、好ましくはデオキシリボースである。

【0063】

ポリヌクレオチドは、好ましくは次のヌクレオシドを含む：デオキシアデノシン(dA)、デオキシリウリジン(dU)および/またはチミジン(dT)、デオキシグアノシン(dG)ならびにデオキシチジン(dC)。

【0064】

ヌクレオチドは、概してリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである。ヌクレオチドは、概して、一リン酸エステル、二リン酸エステルまたは三リン酸エステルを含有する。ヌクレオチドは、3つより多くのリン酸エステル、例えば4つまたは5つのリン酸エステルを含むことがある。リン酸エステルは、ヌクレオチドの5'側または3'側に付着されていることもある。ヌクレオチドとしては、アデノシンーリン酸(AMP)、グアノシンーリン酸(GMP)、チミジンーリン酸(TMP)、ウリジンーリン酸(UMP)、5-メチルシチジンーリン酸、5-ヒドロキシメチルシチジンーリン酸、シチジンーリン酸(CMP)、環状アデノシンーリン酸(cAMP)、環状グアノシンーリン酸(cGMP)、デオキシアデノシンーリン酸(dAMP)、デオキシグアノシンーリン酸(dGMP)。

10

20

30

40

50

d G M P)、デオキシチミジンーリン酸 (d T M P)、デオキシリジンーリン酸 (d U M P)、デオキシシチジンーリン酸 (d C M P) およびデオキシメチルシチジンーリン酸が挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、好ましくは、A M P、T M P、G M P、C M P、U M P、d A M P、d T M P、d G M P、d C M P およびd U M P から選択される。

【 0 0 6 5 】

ヌクレオチドは、脱塩基性であってもよい（すなわち、核酸塩基を欠く）。ヌクレオチドは、核酸塩基および糖を欠くこともある（すなわち、C 3スペーサーである）。

【 0 0 6 6 】

ポリヌクレオチド中のヌクレオチドは、いずれの様式で互いに付着されていてよい。ヌクレオチドは、概して、それらの糖およびリン酸基によって核酸の場合のように付着されている。ヌクレオチドは、それらの核酸塩基によってピリミジン二量体の場合のように接続されていることがある。

【 0 0 6 7 】

ポリヌクレオチドは、一本鎖状であることもあり、または二本鎖状であることもある。ポリヌクレオチドの少なくとも一部分は、好ましくは二本鎖状である。

【 0 0 6 8 】

ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸 (D N A) またはリボ核酸 (R N A) などの核酸であってもよい。ポリヌクレオチドは、D N A の一方の鎖にハイブリダイズされたR N A の一方の鎖を含んでもよい。ポリヌクレオチドは、ペプチド核酸 (P N A)、グリセロール核酸 (G N A)、トレオース核酸 (T N A)、ロックド核酸 (L N A)、またはヌクレオチド側鎖を有する他の合成重合体などの、当技術分野において公知のいずれの合成核酸であってもよい。P N A主鎖は、ペプチド結合によって連結された反復N - (2 - アミノエチル) - グリシンユニットからなる。G N A主鎖は、ホスホジエステル結合によって連結された反復グリコールユニットからなる。T N A主鎖は、ホスホジエステル結合によって一緒に連結された反復トレオース糖からなる。L N Aは、リボース部分の2'酸素と4'炭素を接続する余分な架橋を有する、上で論じたようなリボヌクレオチドから形成される。

【 0 0 6 9 】

ポリヌクレオチドは、最も好ましくはリボ核酸 (R N A) またはデオキシリボ核酸 (D N A) である。

【 0 0 7 0 】

ポリヌクレオチドは、いずれの長さであってもよい。例えば、ポリヌクレオチドは、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも400もしくは少なくとも500ヌクレオチドの長さ、またはヌクレオチド対の長さでありうる。ポリヌクレオチドは、1000以上のヌクレオチドの長さもしくはヌクレオチド対の長さ、5000以上のヌクレオチドの長さもしくはヌクレオチド対の長さ、または10000以上のヌクレオチドの長さもしくはヌクレオチド対の長さでありうる。

【 0 0 7 1 】

試料

分析物は、任意の好適な試料中に存在してもよい。試料は、生体試料であってもよい。任意の生物または微生物から得られたまたは抽出された少なくとも1つの試料を使用してインピトロで本発明を行ってもよい。生物または微生物は、概して、古細菌性、原核性または真核性であり、五界、すなわち植物界、動物界、菌界、原核生物界および原生生物界の1つに概して属する。任意のウイルスから得られたまたは抽出された少なくとも1つの試料に対して本発明をインピトロで行ってもよい。試料は、好ましくは流体試料である。試料は、患者の体液を概して含む。試料は、尿、リンパ液、唾液、粘液または羊水であってもよいが、好ましくは血液、血漿または血清である。概して、試料は起源がヒトであるが、代替的に、別の哺乳類動物からのもの、例えば、商業飼育動物、例えばウマ、ウシ、

10

20

30

40

50

ヒツジ、魚、ニワトリもしくはブタからのものであってもよく、または代替的にペット、例えばネコもしくはイヌであってもよい。あるいは、試料は、植物起源のもの、例えば、商品作物、例えば、穀類、マメ科植物、果実または野菜、例えば、コムギ、オオムギ、オートムギ、キャノーラ、トウモロコシ、ダイズ、イネ、ダイオウ、バナナ、リンゴ、トマト、ジャガイモ、ブドウ、タバコ、マメ、レンズマメ、サトウキビ、カカオノキ、ワタから得られた試料であってもよい。

【0072】

試料は、非生体試料であってもよい。非生体試料は、好ましくは流体試料である。非生体試料の例としては、外科用流体、水、例えば飲用水、海水または河川水、および検査室検査用の試薬が挙げられる。

10

【0073】

試料は、本発明で使用される前に、例えば、遠心分離によって、または望ましくない分子もしくは細胞、例えば赤血球を濾過して取り除く膜を通過させることによって、概して処理される。試料は、採取され次第、測定されることがある。試料は、アッセイ前に、好ましくは-70℃未満で概して保存されることもある。

【0074】

膜

いずれの膜を本発明に従って使用してもよい。好適な膜は、当技術分野において周知である。膜は、好ましくは両親媒性層である。両親媒性層は、親水性と親油性の両方を有する両親媒性分子、例えばリン脂質から形成される層である。両親媒性分子は、合成のものであってもよく、または天然に存在するものであってもよい。天然に存在しない両親媒性物質、および単層を形成する両親媒性物質は、当技術分野において公知であり、例えば、ブロック共重合体を含む (Gonzalez-Perez et al., Langmuir, 2009, 25, 10447-10450)。ブロック共重合体は、2つ以上の単量体サブユニットが一緒に重合されて单一高分子鎖を作っている高分子材料である。ブロック共重合体は、各単量体サブユニットが一因となる特性を概して有する。しかし、ブロック共重合体は、個々のサブユニットから形成された重合体が有さない固有の特性を有することがある。ブロック共重合体は、単量体サブユニットの1つが疎水性（すなわち親油性）であるが他のサブユニットは水性媒体中にあるとき親水性であるように、工学的に操作することができる。この場合、ブロック共重合体は、両親媒性を有することがあり、生体膜を模倣する構造を形成することがある。ブロック共重合体は、（2つの単量体サブユニットからなる）ジブロックであることがあるが、2つより多くの単量体サブユニットから、両親媒性物質として挙動するより複雑な配置を形成するように、構築されることもある。共重合体は、トリブロック、テトラブロックまたはペンタブロック共重合体であることがある。膜は、好ましくは、トリブロック共重合体膜である。

20

【0075】

古細菌双極性テトラエーテル脂質は、脂質が単層膜を形成するように構築されている天然に存在する脂質である。これらの脂質は、厳しい生物環境で生き残る好極限性細菌、好熱菌、好塩菌および好酸菌において一般に見いだされる。それらの安定性は、最終二重層の融合された性質に由来すると考えられている。親水性-疎水性-親水性の一般モチーフを有するトリブロック重合体を生成することによってこれらの生物学的エンティティーを模倣するブロック共重合体材料を構築することは容易である。この材料は、脂質二重層と同様に挙動し、かつ小胞から層状の膜までの範囲の相挙動を包含する、単量体膜を形成しうる。これらのトリブロック共重合体から形成される膜は、生体脂質膜に勝るいくつかの利点を保持する。トリブロック共重合体を合成するので、まさにその構築を注意深く制御して、膜を形成するためにならびにポアおよび他のタンパク質と相互作用するために必要な的確な鎖長および特性を得ることができる。

30

【0076】

ブロック共重合体は、脂質副素材として分類されないサブユニットから構築されることもある。例えば、疎水性重合体は、シロキサンまたは他の非炭化水素系単量体から作製さ

40

50

れることがある。ブロック共重合体の親水性サブセクションは、低いタンパク質結合特性を有することもでき、この低いタンパク質結合特性によって、未加工の生体試料に曝露されたときに高度に耐性である膜の生成が可能になる。このヘッド基ユニットは、非古典的脂質ヘッド基から誘導されることもある。

【0077】

トリプロック共重合体膜は、生体脂質膜と比較して増加した機械的および環境安定性、例えば、より高い動作温度またはpH範囲も有する。ブロック共重合体の合成性は、重合体に基づく膜を広範な用途に合わせてカスタマイズするためのプラットフォームをもたらす。

【0078】

膜は、最も好ましくは、国際出願番号PCT/GB2013/052766またはPCT/GB2013/052767において開示されている膜の1つである。

【0079】

両親媒性分子は、分析物のカップリングを助長するように化学的に修飾されるまたは官能化されることがある。

【0080】

両親媒性層は、単層であってもよく、または二重層であってもよい。両親媒性層は、概して平面状である。両親媒性層は、湾曲されることがある。両親媒性層は、支持されることがある。両親媒性層は、凹面であってもよい。両親媒性層は、両親媒性層の周辺領域(Aと称する柱に付着している)が、図8にEと称して示されている両親媒性層領域より高くなるように、図8に示すように隆起した柱(Aと称する)から吊るすことができる。これによって、上で記載したように微粒子が膜に沿って進み、移動し、スライドしたまたは転がることが可能になりうる。

【0081】

両親媒性膜は、概して自然移動性であり、本質的に二次元流体としておおよそ 10^{-8} cm·s⁻¹の脂質拡散速度で動作する。これは、ポアおよびカップリングされた分析物が両親媒性膜内で概して移動することができる意味する。

【0082】

膜は、脂質二重層であってもよい。脂質二重層は、細胞膜のモデルであり、ある範囲の実験研究用の優れたプラットフォームとして役立つ。例えば、脂質二重層をシングルチャンネル記録による膜タンパク質のインピトロ調査に使用することができる。あるいは、脂質二重層をバイオセンサーとして使用して、ある範囲の物質の存在を検出することができる。脂質二重層は、いずれの脂質二重層であってもよい。好適な脂質二重層としては、平面状脂質二重層、支持二重層またはリポソームが挙げられるが、これらに限定されない。脂質二重層は、好ましくは平面状脂質二重層である。好適な脂質二重層は、国際出願番号PCT/GB08/000563(国際公開第2008/102121号パンフレットとして公開された)、国際出願番号PCT/GB08/004127(国際公開第2009/077734号パンフレットとして公開された)および国際出願番号PCT/GB2006/001057(国際公開第2006/100484号パンフレットとして公開された)に開示されている。

【0083】

脂質二重層を形成する方法は、当技術分野において公知である。好適な方法は、実施例で開示する。脂質二重層は、脂質单層が水溶液/空気界面に、その界面に対して垂直である開口部のいずれかの側を超えて担持される、モンタル(Montal)およびミューラー(Mueller)の方法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 1972; 69: 3561-3566)によって、一般に形成される。通常、先ず脂質を有機溶媒に溶解し、次いで溶媒の液滴を開口部のいずれかの側の水性溶液の表面で蒸発させることによって、脂質を水性電解質溶液の表面に付加する。有機溶媒を蒸発させたら、開口部のいずれかの側の溶液/空気界面を、二重層が形成されるまで、開口部を超えて物理的に上下に移動させる。平面状脂質二重層は、膜の開口部を横断して形成されることもあり、または開口を横断して凹所内に形成されることもある

10

20

30

40

50

。

【0084】

モンタルおよびミューラーの方法は、タンパク質ポア挿入に好適である良質脂質二重層を形成する、対費用効果の高い、比較的容易な方法であるため、評判がよい。他の一般的な二重層形成方法としては、先端部浸漬 (tip-dipping)、二重層の塗装、およびリポソーム二重層のパッチクランプが挙げられる。

【0085】

先端部浸漬二重層形成は、脂質の単層を担持している試験溶液の表面に開口部表面（例えばピペット先端部）を触れさせることを必要とする。この場合もやはり、有機溶媒に溶解された脂質の液滴を溶液表面で蒸発させることによって先ず脂質単層が溶液／空気界面に作られる。次いで、二重層はラングミュア (Langumur)・シェーファー (Schaefer) 法によって形成され、溶液表面に対して開口部を移動させる機械的自動化を必要とする。

10

【0086】

塗装される二重層については、有機溶媒に溶解された脂質の液滴が開口部に直接塗布され、その開口部が水性試験溶液に沈められる。脂質溶液は、塗装用刷毛または同等物を使用して開口部全面に薄く塗られる。溶媒が薄くなることで、脂質二重層が形成される結果となる。しかし、二重層からの溶媒の完全除去は困難であり、それ故、この方法によって形成される二重層は、安定性がより低く、電気化学的測定中にノイズをより生じやすい。

【0087】

パッチクランプは、生体細胞膜の研究に一般に使用される。細胞膜が吸引によってピペットの末端部にクランプされ、膜のパッチがその開口部を覆って付着される。この方法は、リポソームをクランプする（その結果、リポソームが破裂してピペットの開口部全面を封止する脂質二重層を残す）ことによる脂質二重層の生成に適応されている。方法は、安定した巨大な単層状のリポソームと、ガラス表面を有する材料における小開口部の作製とを必要とする。

20

【0088】

リポソームは、超音波処理、押出しましたはモザファリ (Mozafari) 法 (Colas et al. (2007) *Micron* 38:841-847) によって形成することができる。

【0089】

好ましい実施形態において、脂質二重層は、国際出願番号 PCT/GB08/004127 (国際公開第2009/077734号パンフレットとして公開された) に記載されているように形成される。有利なこととして、この方法では脂質二重層が乾燥脂質から形成される。最も好ましい実施形態において、脂質二重層は、国際公開第2009/077734号パンフレット (PCT/GB08/004127) に記載されているように開口を横断して形成される。

30

【0090】

脂質二重層は、2つの対向する脂質層から形成される。2つの脂質層は、それらの疎水性テール基が互いに向き合って疎水性の内部を形成するように配置される。脂質の親水性ヘッド基は、その二重層の両面の水性環境に向かって外側に向いている。二重層は、いくつかの脂質相で存在することがあり、そのような脂質相としては、脂質無秩序相（流体層状）、液体秩序相、固体秩序相（層状ゲル相、インターデジティッドゲル相）および平面状二重層結晶（層状サブゲル相、層状結晶相）が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0091】

脂質二重層を形成するいずれの脂質組成物を使用してもよい。脂質組成物は、表面電荷、膜タンパク質を支持する能力、充填密度または機械的特性などの、必要な特性を有する脂質二重層が形成されるように選択される。脂質組成物は、1種または複数種の異なる脂質を含むことができる。例えば、脂質組成物は、100種以下の脂質を含有することができる。脂質組成物は、好ましくは、1～10種の脂質を含有する。脂質組成物は、天然に存在する脂質および/または人工脂質を含むことがある。

50

【0092】

脂質は、ヘッド基と、界面部分と、同じであってもまたは異なってもよい2つの疎水性テール基とを概して含む。好適なヘッド基としては、中性ヘッド基、例えばジアシルグリセリド(DG)およびセラミド(CM)、双性イオン性ヘッド基、例えばホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)およびスフィンゴミエリン(SM)、負の電荷を有するヘッド基、例えばホスファチジルグリセロール(PG)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)、リン酸(PA)およびカルジオリピン(CA)、ならびに正の電荷を有するヘッド基、例えばトリメチルアンモニウム-プロパン(TAP)が挙げられるが、これらに限定されない。好適な界面部分としては、天然に存在する界面部分、例えば、グリセロール系またはセラミド系部分が挙げられるが、これらに限定されない。好適な疎水性テール基としては、飽和炭化水素鎖、例えばラウリン酸(n-ドデカン酸)、ミリスチン酸(n-テトラデカン酸)、パルミチン酸(n-ヘキサデカン酸)、ステアリン酸(n-オクタデカン酸)およびアラキドン酸(n-エイコサン酸)、不飽和炭化水素鎖、例えばオレイン酸(シス-9-オクタデカン酸)、ならびに分岐炭化水素鎖、例えばフィタノイルが挙げられるが、これらに限定されない。不飽和炭化水素鎖の鎖長ならびに不飽和炭化水素鎖中の二重結合の位置および数は、様々でありうる。分岐炭化水素鎖の鎖長ならびに分岐炭化水素鎖中のメチル基などの分枝の位置および数は、様々でありうる。疎水性テール基を界面部分にエーテルまたはエステルとして連結することができる。脂質は、ミコール酸であってもよい。

【0093】

脂質を化学的に修飾することもできる。脂質のヘッド基またはテール基は、化学的に修飾されることがある。ヘッド基が化学的に修飾されている好適な脂質としては、PEG修飾脂質、例えば1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000]、官能化PEG脂質、例えば1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3ホスホエタノールアミン-N-[ビオチニル(ポリエチレングリコール)2000]、ならびにコンジュゲーション用に修飾された脂質、例えば1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-(スクシニル)および1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-(ビオチニル)が挙げられるが、これらに限定されない。テール基が化学的に修飾されている好適な脂質としては、重合性脂質、例えば1,2-ビス(10,12-トリコサジイノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、フッ素化脂質、例えば1-パルミトイール-2-(16-フルオロパルミトイール)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、重水素化脂質、例えば1,2-ジパルミトイール-D62-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、およびエーテル連結脂質、例えば1,2-ジ-O-フィタニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンが挙げられるが、これらに限定されない。脂質は、分析物のカップリングを助長するように化学的に修飾されるまたは官能化されることがある。

【0094】

両親媒性層、例えば脂質組成物は、層の特性に影響を及ぼす1つまたは複数の添加剤を概して含む。好適な添加剤としては、脂肪酸、例えばパルミチン酸、ミリスチン酸およびオレイン酸、脂肪アルコール、例えばパルミチン酸アミコール、ミリスチン酸アルコールおよびオレイン酸アルコール、ステロール、例えばコレステロール、エルゴステロール、ラノステロール、シトステロールおよびスチグマステロール、リゾリン脂質、例えば1-アシル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、ならびにセラミドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0095】

別の好ましい実施形態において、膜は固体層である。固体層は、有機材料と無機材料両方から形成することができ、そのような材料としては、マイクロエレクトロニクス材料、絶縁材料、例えばSi₃N₄、Al₂O₃およびSiO、有機および無機重合体、例えば、ポリアミド、プラスチック、例えばTeflon(登録商標)またはエラストマー、例えば二成分付加硬化シリコーンゴム、およびガラスが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

い。固体層は、グラフェンから形成されることがある。好適なグラフェン層は、国際出願番号 P C T / U S 2 0 0 8 / 0 1 0 6 3 7 (国際公開第 2 0 0 9 / 0 3 5 6 4 7 号パンフレットとして公開された) に開示されている。Yusko et al., *Nature Nanotechnology*, 2011; 6: 253-260 および米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 0 4 8 4 9 9 号明細書は、微粒子を使用しない固体層における膜貫通ポアへのタンパク質の送達を記載している。本発明の方法は、これらの文献に開示された方法における送達を改善するために使用することができる。

【 0 0 9 6 】

方法は、(i) ポアを含む人工両親媒性層、(ii) ポアを含む単離された天然に存在する脂質二重層、または(iii) ポアが挿入された細胞を使用して、概して行われる。方法は、人工トリブロック共重合体層などの人工両親媒性層を使用して、概して行われる。層は、他の膜貫通および/または膜内タンパク質ならびに他の分子をポアに加えて含むことがある。好適な装置および条件は、下で論じる。本発明の方法は、概してインピトロで行われる。

【 0 0 9 7 】

膜貫通ポア

膜貫通ポアは、ある程度膜を交差する構造である。膜貫通ポアは、印加された電位によって駆動される水和イオンが膜を横断して流れるまたは膜内を流れることを可能にする。膜貫通ポアは、概して膜全体を交差しており、したがって、水和イオンは、膜の一方の面から膜の他方の面に流れることがある。しかし、膜貫通ポアが膜を交差している必要はない。膜貫通ポアは、一方の末端が閉じられていることがある。例えば、ポアは、膜内のウェル、ギャップ、チャネル、溝またはスリットであることがあり、水和イオンは、それに沿って流れることもあり、またはその中に流入することもある。

【 0 0 9 8 】

いずれの膜貫通ポアを本発明において使用してもよい。ポアは、生物学的なものであってもよく、または人工的なものであってもよい。好適なポアとしては、タンパク質ポア、ポリヌクレオチドポアおよび固体ポアが挙げられるが、これらに限定されない。ポアは、DNA 折り紙ポア (Langecker et al., *Science*, 2012; 338: 932-936) であってもよい。

【 0 0 9 9 】

膜貫通ポアは、好ましくは膜貫通タンパク質ポアである。膜貫通タンパク質ポアは、分析物などの水和イオンが膜の一方の面から膜の他方の面に流れることを可能にする、ポリペプチドまたはポリペプチドのコレクションである。本発明において、膜貫通タンパク質ポアは、印加された電位によって駆動される水和イオンが膜の一方の面から他方に流れることを可能にするポアを形成することができる。膜貫通タンパク質ポアは、好ましくは、ヌクレオチドなどの分析物がトリブロック共重合体膜などの膜の一方の面から他方に流れることを可能にする。膜貫通タンパク質ポアは、DNA または RNA などのポリヌクレオチドをポアを通って、移動させる。

【 0 1 0 0 】

膜貫通タンパク質ポアは、単量体であってもよく、またはオリゴマーであってもよい。ポアは、好ましくは、いくつかの反復サブユニット、例えば、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15 または少なくとも 16 個サブユニットで構成される。ポアは、好ましくは、六量体、七量体、八量体または九量体ポアである。ポアは、ホモオリゴマーであってもよく、またはヘテロオリゴマーであってもよい。

【 0 1 0 1 】

膜貫通タンパク質ポアは、概してバレルまたはチャネルを含み、それを通ってイオンが流れことがある。ポアのサブユニットは、概して中心軸を包囲し、鎖を膜貫通 バレルもしくはチャネルまたは膜貫通 ヘリックスバンドルもしくはチャネルにもたらす。

【 0 1 0 2 】

10

20

30

40

50

膜貫通タンパク質ポアのバレルまたはチャネルは、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたは核酸などの分析物との相互作用を助長するアミノ酸を概して含む。これらのアミノ酸は、好ましくは、バレルまたはチャネルの狭窄部付近に位置する。膜貫通タンパク質ポアは、正電荷を有する1つまたは複数のアミノ酸、例えば、アルギニン、リシン、もしくはヒスチジンまたは芳香族アミノ酸、例えばチロシンもしくはトリプトファンを概して含む。これらのアミノ酸は、ポアとヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたは核酸との相互作用を概して助長する。

【0103】

本発明に従って使用するための膜貫通タンパク質ポアは、バレルポアまたはヘリックスバンドルポアに由来しうる。バレルポアは、鎖から形成されるバレルまたはチャネルを含む。好適なバレルポアとしては、-毒素、例えば-ヘモリシン、炭疽毒素およびロイコシジン、ならびに外膜タンパク質/細菌のポリン、例えば、スメグマ菌(*Mycobacterium smegmatis*)ポリン(Msp)、例えばMspA、MspB、MspCまたはMspD、CsgG、外膜ポリンF(OmpF)、外膜ポリンG(OmpG)、外膜ホスホリパーゼAおよびナイセリア(*Neisseria*)オートトランスポーターリポタンパク質(NalP)ならびに他のポア、例えばライセニンが挙げられるが、これらに限定されない。ヘリックスバンドルポアは、ヘリックスから形成されるバレルまたはチャネルを含む。好適なヘリックスバンドルポアとしては、内膜タンパク質および外膜タンパク質、例えば、WZAおよびC1yA毒素が挙げられるが、これらに限定されない。膜貫通ポアは、ライセニンに由来しうる。CsgGに由来する好適なポアは、国際出願第PCT/EP2015/069965号明細書に開示されている。ライセニンに由来する好適なポアは、国際出願番号PCT/GB2013/050667(国際公開第2013/153359号パンフレットとして公開された)に開示されている。膜貫通ポアは、Mspに由来することもあり、または-ヘモリシン(-HL)に由来することもある。野生型-ヘモリシンポアは、7つの同一の単量体またはサブユニットで形成されている(すなわち、このポアは七量体である)。-ヘモリシン-NNの1つの単量体またはサブユニットの配列は、配列番号4で示される。

【0104】

膜貫通タンパク質ポアは、好ましくはMspに、好ましくはMspAに由来する。そのようなポアは、オリゴマー性となり、Mspに由来する7、8、9または10個の単量体を概して含む。ポアは、同一の単量体を含むMspに由来するホモオリゴマー性ポアであることがある。あるいは、ポアは、他と異なる少なくとも1つの単量体を含むMspに由来するヘテロオリゴマー性ポアであることがある。好ましくは、ポアは、MspAまたはそのホモログもしくはパラログに由来する。

【0105】

Mspに由来する単量体は、配列番号2で示される配列またはその変異体を概して含む。配列番号2は、MspA単量体のMS-(B1)8突然変異体である。これは、次の突然変異:D90N、D91N、D93N、D118R、D134RおよびE139Kを含む。配列番号2の変異体は、配列番号2のものとは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、ポアを形成するその能力を保持するポリペプチドである。ポアを形成する変異体の能力は、当技術分野において公知の任意の方法を用いてアッセイすることができる。例えば、変異体を両親媒性層に他の適切なサブユニットとともに挿入してもよく、オリゴマー化してポアを形成するその能力を判定してもよい。両親媒性層などの膜にサブユニットを挿入する方法は、当技術分野において公知である。例えば、サブユニットを精製形態でトリブロック共重合体膜を含有する溶液に懸濁させてもよく、その結果、サブユニットは膜に分散し、膜と結合することによって挿入され、集合して機能性状態になる。あるいは、M.A. Holden, H. Bayley. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 6502-6503および国際出願番号PCT/GB2006/001057(国際公開第2006/100484号パンフレットとして公開された)に記載されている「ピックアンドプレース」法を用いて、サブユニットを膜に直接挿入してもよい。

10

20

30

40

50

【0106】

配列番号2のアミノ酸配列の全長にわたって、変異体は、好ましくは、アミノ酸同一性に基づきその配列と少なくとも50%相同であることになる。より好ましくは、変異体は、アミノ酸同一性に基づき、配列全体にわたって配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%およびより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同であることがある。100以上、例えば125、150、175または200以上の連続するアミノ酸のストレッチにわたって、少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%または95%アミノ酸同一性（「確かな相同性」）があることがある。

10

【0107】

当技術分野における標準的な方法を用いて相同性を決定してもよい。例えば、UWGC G Packageは、相同性を計算するために使用することができ、例えばそのデフォルト設定で使用される、BESTFITプログラムを提供している(Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395)。例えば、Altschul S. F. (1993) J Mol E vol 36:290-300; Altschul, S.F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10に記載されているように、PILEUPおよびBLASTアルゴリズムを用いて、相同性を計算し、または配列を並べる（例えば、等価の残基または対応する配列を（通常はそれらのデフォルト設定で）同定する）ことができる。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、米国国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から公的に入手できる。

20

【0108】

配列番号2は、MspA单量体のMS- (B1) 8 突然変異体である。変異体は、MspAと比較してMspB、CまたはD单量体における突然変異のいずれかを含むことがある。MspB、CおよびDの成熟形態は、配列番号5~7で示される。詳細には、変異体は、MspB中に存在する次の置換を含むことがある：A138P。変異体は、MspC中に存在する次の置換の1つまたは複数を含むことがある：A96G、N102EおよびA138P。変異体は、MspD中に存在する次の突然変異の1つまたは複数を含むことがある：G1の欠失、L2V、E5Q、L8V、D13G、W21A、D22E、K47T、I49H、I68V、D91G、A96Q、N102D、S103T、V104I、S136KおよびG141A。変異体は、MspB、CおよびDからの突然変異および置換の1つまたは複数の組み合わせを含むことがある。変異体は、好ましくは、突然変異L88Nを含む。配列番号2の変異体は、MS-B1のすべての突然変異に加えて突然変異L88Nを有し、MS- (B2) 8と呼ばれる。本発明において使用されるポアは、好ましくはMS- (B2) 8である。配列番号2の変異体は、好ましくは、1つまたは複数のD56N、D56F、E59R、G75S、G77S、A96DおよびQ126Rを含む。配列番号2の変異体は、MS-B1のすべての突然変異に加えて突然変異G75S/G77S/L88N/Q126Rを有し、MS-B2Cと呼ばれる。本発明において使用されるポアは、好ましくはMS- (B2) 8またはMS- (B2C) 8である。配列番号2の変異体は、好ましくはN93Dを含む。変異体は、より好ましくは突然変異G75S/G77S/L88N/N93D/Q126Rを含む。

30

【0109】

上で論じたものに加えて、アミノ酸置換、例えば1、2、3、4、5、10、20または30以下の置換を、配列番号2のアミノ酸配列に加えてもよい。保存的置換は、アミノ酸を、類似の化学構造、類似の化学的特性または類似の側鎖体積の他のアミノ酸で置き換える。導入されるアミノ酸は、それらが置き換えるアミノ酸と類似の極性、親水性、疎水性、塩基性、酸性、中性または電荷を有しうる。あるいは、保存的置換は、既存の芳香族または脂肪族アミノ酸の代わりに、芳香族または脂肪族である別のアミノ酸を導入することがある。

【0110】

40

50

膜貫通タンパク質ポアなどの、本明細書に記載するタンパク質のいずれも、それらの同定または精製を支援するように、例えば、ヒスチジン残基(h i s タグ)、アスパラギン酸残基(a s p タグ)、ストレプトアビジンタグ、 f l a g タグ、 S U M O タグ、 G S T タグもしくは M B P タグの付加によって、または細胞からのそれらの分泌を促進するためのシグナル配列の付加(ポリペプチドがそのような配列を天然に含有しない場合)によって、修飾されることがある。遺伝子タグを導入することの代替法は、タグをポアまたは構築物上のネイティブ位置または工学的に操作された位置に化学反応させることである。この方法の例は、ポアの外側に工学的に操作されたシステインにゲルシフト試薬を反応させることであろう。この方法は、ヘモリシンヘテロオリゴマーを分離する方法として立証されている(Chem Biol. 1997 Jul; 4(7):497-505)。

10

【 0 1 1 1 】

ポアは、顕現標識で標識されることがある。顕現標識は、ポアを検出できるようにするいずれの好適な標識であってもよい。好適な標識としては、蛍光分子、放射性同位元素、例えば、¹ ² ⁵ I、³ ⁵ S、酵素、抗体、抗原、ポリヌクレオチドおよびリガンド、例えばビオチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 1 2 】

膜貫通タンパク質ポアなどの、本明細書に記載するタンパク質のいずれも、合成的に作製してもよく、または組み換え手段によって作製してもよい。例えば、ポアをインピトロ翻訳および転写(I V T T)によって合成してもよい。ポアのアミノ酸配列は、天然に存在しないアミノ酸を含むように修飾されることもあり、またはタンパク質の安定性を増すように修飾されることもある。タンパク質が合成手段によって生産される場合、そのようなアミノ酸を生産中に導入してもよい。合成または組み換え生産のいずれかの後にポアを改変してもよい。

20

【 0 1 1 3 】

膜貫通タンパク質ポアなどの、本明細書に記載するタンパク質のいずれも、当技術分野において公知の標準的な方法を用いて生成することができる。ポアまたは構築物をコードするポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準的方法を用いて誘導され、複製されることがある。ポアまたは構築物をコードするポリヌクレオチド配列は、当技術分野における標準技法を用いて細菌宿主細胞において発現されることがある。ポアは、組み換え発現ベクターからのポリペプチドのインサイチュー発現によって細胞において生産されることがある。発現ベクターは、ポリペプチドの発現を制御するための誘導性プロモーターを場合により有する。これらの方法は、Sambrook, J. and Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYに記載されている。

30

【 0 1 1 4 】

ポアは、タンパク質生産生物からの任意のタンパク質液体クロマトグラフィーシステムによる精製後、または組み換え発現後、大規模に生産されることがある。典型的なタンパク質液体クロマトグラフィーシステムとしては、F P L C、A K T Aシステム、B i o - C a d システム、B i o - R a d B i o L o g i c システムおよびG i l s o n H P L C システムが挙げられる。

40

【 0 1 1 5 】

微粒子

微粒子は、分析物を送達するために使用される。いずれの数の微粒子も、本発明の方法において使用することができる。例えば、本発明の方法は、単一の微粒子または2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、50、100、1,000、5,000、10,000、100,000、500,000もしくは1,000,000もしくはこれ以上の微粒子を使用してもよい。2つ以上の微粒子が使用される場合、微粒子は同じであってもよい。あるいは、異なる微粒子の混合物が使用されてもよい。

【 0 1 1 6 】

各微粒子は、1つの分析物が付着されてもよい。あるいは、各微粒子は、2つ以上の分

50

析物、例えば3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、50以上、100以上、500以上、1,000以上、5,000以上、10,000以上、100,000以上、1,000,000以上、10,000,000以上、または50,000,000以上の分析物が付着されてもよい。微粒子は、分析物で実質的にまたは完全に被覆または覆われてもよい。微粒子は、その表面上の実質的に全てまたは全てに分析物が付着されてもよい。微粒子は、アダプターによってポリヌクレオチドなどの分析物に付着することができる。アダプターは、Yアダプターまたはヘアピンアダプターであってもよい(以下を参照されたい)。

【0117】

分析物、すなわち、分析物の1つの例は、2つ以上の微粒子に付着されてもよい。分析物、すなわち、分析物の1つの例は、上で論じたいずれの数の微粒子にも付着されうる。

10

【0118】

微粒子は、サイズが概してミクロン(μm)で測定される微視的粒子である。微粒子は、ミクロスフェアまたはマイクロビーズとしても公知である。微粒子は、ナノ粒子であってもよい。ナノ粒子は、サイズが概してナノメートル(nm)で測定される微視的粒子である。

【0119】

微粒子は、約0.001μmから約500μmの粒径を概して有する。例えば、ナノ粒子は、約0.01μmから約200μmまたは約0.1μmから約100μmの粒径を有してもよい。より多くの場合、微粒子は、約0.5μmから約100μmまたは例えは約1μmから約50μmの粒径を有する。微粒子は、約1nmから約1000nm、例えは約10nmから約500nm、約20nmから約200nmまたは約30nmから約100nmの粒径を有してもよい。

20

【0120】

微粒子は、球形または非球形であってもよい。球形微粒子は、ミクロスフェアと呼ばれることがある。非球形粒子は、例えば板状、針状、不整形または管状であってもよい。用語「粒径」は本明細書で使用されるとき、粒子が球形であれば粒子の直径を意味し、または粒子が非球形であれば体積ベースの粒径を意味する。体積ベースの粒径は、問題の非球形粒子と同じ体積を有する球体の直径である。

【0121】

30

2つ以上の微粒子が方法で使用される場合、微粒子の平均粒径は、約0.5μmから約500μmなどの上で論じたサイズのいずれであってもよい。2つ以上の微粒子の集団は、好ましくは、10%以下、例えは5%以下または2%以下の変動係数(標準偏差対平均の比)を有する。

【0122】

任意の方法が、微粒子のサイズを判定するために使用されうる。好適な方法としては、フローサイトメトリー(例えは、Chandler et al., J Thromb Haemost. 2011 Jun;9(6):1216-24を参照されたい)が挙げられるが、これに限定されない。

【0123】

微粒子は、任意の材料から形成することができる。微粒子は、好ましくは、セラミック、ガラス、シリカ、重合体または金属から形成される。重合体は、ポリヒドロキシアルカノエート、デキストラン、ポリラクチド、アガロース、セルロース、デンプンもしくはキトサンなどの天然重合体、またはポリウレタン、ポリスチレン、ポリ(塩化ビニル)、シランもしくはメタクリレートなどの合成重合体であってもよい。好適な微粒子は当技術分野において公知であり、市販されている。セラミックおよびガラスのミクロスフェアは、3M(登録商標)から市販されている。シリカおよび重合体の微粒子は、EPRUI Nanoparticles & Microspheres Co. Ltdから市販されている。微粒子は、Polysciences Inc.、Bangs Laboratories Inc.およびLife Technologiesからも市販されている。

40

【0124】

50

微粒子は、固体であってもよい。微粒子は、中空であってもよい。微粒子は、重合体纖維から形成されてもよい。

【0125】

分析物がポリヌクレオチドである場合、微粒子は、ポリヌクレオチドを抽出および単離するために使用されるキットに由来してもよい。

【0126】

微粒子の表面は、分析物と相互作用および付着することができる。表面は、官能化することなく分析物と天然に相互作用することができる。微粒子の表面は、分析物の付着を容易にするために概して官能化される。好適な官能化は、当技術分野において公知である。例えば、微粒子の表面は、ポリヒスチジンタグ(ヘキサヒスチジンタグ、 $6 \times \text{His}$ タグ、 His_6 タグまたは His タグ(登録商標))、NTA、ストレプトアビシン、ビオチン、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド(DNA、RNA、PNA、GNA、TNAまたはLNAなど)、カルボキシ基、第四級アミン基、チオール基、アジド基、アルキン基、DIBO、脂質、FLAGタグ(FLAGオクタペプチド、ポリヌクレオチド結合タンパク質(下で論じられたもののいずれかを含む)、ペプチド、タンパク質、抗体または抗体断片によって官能化することができる。抗体断片は、下でより詳細に論じる。微粒子は、付着に関して、下で論じるリンカーまたは基のいずれかによって官能化することもできる。

【0127】

微粒子は、分析物と特異的に結合する分子または基によって官能化することができる。この場合、微粒子に付着され、膜貫通ポアに送達されることになる分析物は、標的分析物と呼ばれることがある。これにより、他の分析物を含有する試料から微粒子が標的分析物を選択または捕捉することが可能になる。分子または基が、優先的なまたは高い親和性では標的分析物と結合するならば、分子または基は標的分析物と特異的に結合するが、低い親和性のみでは他のまたは異なる分析物と結合しない。分子または基は、 1×10^{-6} M以下、より好ましくは 1×10^{-7} M以下、 5×10^{-8} M以下、より好ましくは 1×10^{-8} M以下、またはより好ましくは 5×10^{-9} M以下のKdで結合するならば、優先的なまたは高い親和性で結合する。分子または基は、 1×10^{-6} M以上、より好ましくは 1×10^{-5} M以上、より好ましくは 1×10^{-4} M以上、より好ましくは 1×10^{-3} M以上、さらにより好ましくは 1×10^{-2} M以上のKdで結合するならば、低い親和性で結合する。

【0128】

好ましくは、分子または基は、他の分析物に対する親和性より大きい、少なくとも10倍、例えば少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、少なくとも1000または少なくとも10,000倍の親和性で標的分析物と結合する。親和性は、蛍光および放射性同位元素を利用するものなど、公知の結合アッセイを用いて測定することができる。競合的結合アッセイも当技術分野において公知である。ペプチドまたはタンパク質とポリヌクレオチドとの結合強度は、Hornblower et al., Nature Methods. 4: 315-317. (2007) に記載されているナノポア力分光法を用いて測定することができる。

【0129】

標的分析物がポリヌクレオチドである場合、微粒子は、標的ポリヌクレオチド分析物に特異的にハイブリダイズする、または標的ポリヌクレオチド分析物の部分もしくは領域に相補的である部分もしくは領域を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド(上で論じたもののいずれかなど)によって官能化されてもよい。これにより、他のポリヌクレオチドなどの他の分析物を含有する試料から、微粒子が標的ポリヌクレオチド分析物を選択または捕捉することが可能になる。オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、優先的なまたは高い親和性で標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズするならば、標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするが、低い親和性のみでは他のポリヌクレオチドに実質的にハイブリダイズしない、ハイブリダイズしない。オリゴヌクレオチドまたは

ポリヌクレオチドは、他の配列に対する T_m より大きい、少なくとも 2 、例えば少なくとも 3 、少なくとも 4 、少なくとも 5 、少なくとも 6 、少なくとも 7 、少なくとも 8 、少なくとも 9 または少なくとも 10 である融解温度 (T_m) で標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズするならば、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは特異的にハイブリダイズする。より好ましくは、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、他の核酸に対する T_m より大きい、少なくとも 2 、例えば少なくとも 3 、少なくとも 4 、少なくとも 5 、少なくとも 6 、少なくとも 7 、少なくとも 8 、少なくとも 9 、少なくとも 10 、少なくとも 20 、少なくとも 30 または少なくとも 40 である T_m で標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする。好ましくは、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドとは 1 ヌクレオチド以上 10 、例えば 1 、 2 、 3 、 4 または 5 ヌクレオチド以上異なる配列に対する T_m より大きい、少なくとも 2 、例えば少なくとも 3 、少なくとも 4 、少なくとも 5 、少なくとも 6 、少なくとも 7 、少なくとも 8 、少なくとも 9 、少なくとも 10 、少なくとも 20 、少なくとも 30 または少なくとも 40 である T_m で標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする。オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、少なくとも 90 、例えば少なくとも 92 または少なくとも 95 の T_m で標的ポリヌクレオチドに概してハイブリダイズする。 T_m は、DNAマイクロアレイの使用を含む公知の技法を用いて実験的に測定することができ、またはインターネット上で利用できるものなど、公的に入手できる T_m 計算機を用いて計算することができる。

【0130】

20

ハイブリダイゼーションを可能にする条件は、当技術分野において周知である（例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press；およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Ausubel et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)）。ハイブリダイゼーションは、低ストリンジエンシー条件下、例えば、30 から 35 % ホルムアミド、1 M NaCl および 1 % SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) の緩衝液の存在下、37 、その後の $1 \times (0.1650 \text{ M Na}^+)$ から $2 \times (0.33 \text{ M Na}^+)$ SSC (標準的なクエン酸ナトリウム) 、50 、20 回洗浄で行われてもよい。ハイブリダイゼーションは、中程度のストリンジエンシー条件下、例えば、40 から 45 % ホルムアミド、1 M NaCl 、および 1 % SDS の緩衝液の存在下、37 、その後の $0.5 \times (0.0825 \text{ M Na}^+)$ から $1 \times (0.1650 \text{ M Na}^+)$ SSC 、55 、洗浄で行われてもよい。ハイブリダイゼーションは、高ストリンジエンシー条件下、例えば 50 % ホルムアミド、1 M NaCl 、1 % SDS の緩衝液の存在下、37 、その後の $0.1 \times (0.0165 \text{ M Na}^+)$ SSC 、60 、洗浄で行われてもよい。

30

【0131】

オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの部分または領域に実質的に相補的である部分または領域を含んでもよい。したがって、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの領域または部分は、標的ポリヌクレオチド中の部分または領域と比較して、5、10、15、20、21、22、30、40 または 50 ヌクレオチドの領域にわたって 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 以上の不一致を有することがある。

40

【0132】

領域の部分は、概して、50 ヌクレオチド以下、例えば 40 ヌクレオチド以下、30 ヌクレオチド以下、20 ヌクレオチド以下、10 ヌクレオチド以下または 5 ヌクレオチド以下である。

【0133】

微粒子は、好ましくは常磁性または磁性である。微粒子は、好ましくは、常磁性もしくは超常磁性材料、または鉄などの常磁性もしくは超常磁性金属を含む。任意の好適な磁性微粒子が使用されうる。例えば Clontech、Promega、Invit

50

rogen Thermo Fisher Scientific および N E B から市販されている磁性ビーズが使用されうる。いくつかの実施形態において、微粒子は、ニトリロ三酢酸 (NTA) などの金属キレート基などの有機基が付着している磁性粒子を含む。有機成分は、例えば、-C(=O)O-、-C-O-C-、-C(=O)-、-NH-、-C(=O)-NH、-C(=O)-CH₂-I、-S(=O)₂- および -S- から選択される基を含んでもよい。有機成分は、NTA (ニトリロ三酢酸) などの金属キレート基を含んでもよい。通常、金、鉄、ニッケルまたはコバルトなどの金属も、金属キレート基に付着される。この種類の磁性ビーズは、His タグタンパク質を捕捉するために一般に使用されるが、本発明に使用するためにも好適である。

【0134】

10

微粒子は、最も好ましくは、Life Technologies から市販されている His タグ Dynabead (登録商標)、IBA 製 Mag Strep ビーズ、N E B 製ストレプトアビジン磁性ビーズ、Beckman Coulter 製 Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI) ビーズもしくは Agencourt AMPure XP ビーズ、または Dynabeads (登録商標) My One (商標) ストレプトアビジン C1 (Thermo Fisher Scientific) である。

【0135】

他の方法

本発明は、分析物を膜中の膜貫通ポアに送達する方法であって、

20

(a) 固体担体に付着している分析物を用意するステップと、

(b) 固体担体を膜へ送達し、それによって分析物を膜貫通ポアに送達するステップとを含む方法も提供する。

【0136】

方法は、好ましくは、固体担体を膜に近接または隣接して置き、固体担体を膜へ移動できるようにするステップを含む。方法は、好ましくは、固体担体を膜に近接または隣接して置き、固体担体を膜へ移動させるステップを含む。固体担体は、膜と接触させることができる。固体担体は、膜と接触させなくてもよい。

【0137】

固体担体は、任意の固体担体であってもよい。好適な例としては、プローブ、プレート、カラム、ピンおよびディップスティックが挙げられるが、これらに限定されない。プローブは、M.A. Holden, H. Bayley. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 6502-6503、および国際出願第 PCT / GB 2006 / 001057 号明細書 (国際公開第 2006 / 100484 号パンフレットとして公開された) において論じられているもののいずれであってもよい。

30

【0138】

分析物、試料、ポア、膜、装置、官能化、付着、送達、カップリング、アンカップリング、除去、洗浄および特性評価など、上および下で論じた実施形態のいずれも、この方法に同等に当てはまる。

【0139】

40

本発明は、分析物を膜中の膜貫通ポアに送達するためのキットであって、(a) 固体担体と、(b) 分析物を膜とカップリングすることができる 1 つまたは複数のアンカーとを含むキットも提供する。下で論じるキット実施形態のいずれも、このキットに同等に当てはまる。

【0140】

付着

分析物および微粒子は、いずれの様式で付着されてもよい。例えば、分析物は、下で論じるカップリング方法のいずれかを用いて微粒子に付着されてもよい。分析物は、下で論じる任意の方法を用いて微粒子に特異的に付着されてもよい。

【0141】

50

分析物は、微粒子に非特異的に付着されてもよい。分析物は、微粒子に吸着されてもよい。分析物が微粒子の外面および/または微粒子内の内面に薄膜として付着される場合、分析物は微粒子に吸着される。

【0142】

分析物は、1力所で微粒子に付着されてもよい。例えば2つ以上のリンカーが使用される場合、分析物は、2力所以上、例えば3、4、5、6、7、8、9、10力所以上で微粒子に付着されてもよい。

【0143】

タンパク質分析物は、システイン、トレオニン、セリン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸およびグルタミンなどの天然に存在するそのアミノ酸を介して付着されてもよい。天然に存在するアミノ酸は、付着を容易にするために修飾されてもよい。例えば、天然に存在するアミノ酸は、アシル化、リン酸化、グリコシル化またはファルネシル化によって修飾することができる。他の好適な修飾は、当技術分野において公知である。天然に存在するアミノ酸に対する修飾は、翻訳後修飾であってもよい。タンパク質分析物は、その配列に導入されたアミノ酸を介して付着されてもよい。そのようなアミノ酸は、好ましくは置換によって導入される。導入されるアミノ酸は、システインまたは付着を容易にする非天然アミノ酸であってもよい。好適な非天然アミノ酸としては、4-アジド-L-フェニルアラニン(Faz)、およびLiu C. C. and Schultz P. G., Annu. Rev. Biochem., 2010, 79, 413-444の図1に含まれる1-71のアミノ酸のいずれか1つが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0144】

分析物は、リンカー分子を介して微粒子に付着されてもよい。分析物は、1つまたは複数、例えば2つまたは3つのリンカーを使用して微粒子に付着することができる。リンカーは、必要な距離にわたって続く任意の分子を含むことができる。リンカーは、炭素1個(ホスゲン型リンカー)から多数のオングストロームまで長さが変化できる。リンカーとしての使用に好適である直鎖状分子の例としては、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリペプチド、多糖、デオキシリボ核酸(DNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレオース核酸(TNA)、グリセロール核酸(GNA)、飽和および不飽和炭化水素、ポリアミドが挙げられるが、これらに限定されない。これらのリンカーは不活性であってもよく、または反応性であってもよく、特にこれらのリンカーは規定の位置で化学的に切断可能であってもよく、またはそれ自体がフルオロフォアもしくはリガンドで修飾されてもよい。リンカーは、好ましくはジチオスレイトール(DTT)に抵抗性である。好ましい柔軟なペプチドリンカーは、2から20個、例えば4、6、8、10または16個のセリンおよび/またはグリシンアミノ酸のストレッチである。より好ましい柔軟なリンカーとしては、(SG)₁、(SG)₂、(SG)₃、(SG)₄、(SG)₅、(SG)₈、(SG)₁₀、(SG)₁₅または(SG)₂₀が挙げられ、ここでSはセリンであり、Gはグリシンである。好ましい剛性リンカーは、2から30個、例えば4、6、8、16または24個のプロリンアミノ酸のストレッチである。より好ましい剛性リンカーとしては、(P)₁₋₂が挙げられ、ここでPはプロリンである。

30

40

【0145】

分析物は、1つもしくは複数の化学的クロスリンカーまたは1つもしくは複数のペプチドリンカーを使用して微粒子に付着されてもよい。好適な化学的クロスリンカーは、当技術分野において周知である。好適な化学的クロスリンカーとしては、次の官能基：マレイミド、活性エステル、スクシンイミド、アジド、アルキン(ジベンゾシクロオクチノール(DIBOまたはDBCO)、ジフルオロシクロアルキンおよび直鎖アルキンなど)、ホスフィン(無痕跡および無痕跡でないシュタウディンガーライゲーションにおいて使用されるものなど)、ハロアセチル(ヨードアセトアミドなど)、ホスゲン型試薬、スルホニルクロリド試薬、イソチオシアネート、ハロゲン化アシル、ヒドラジン、ジスルフィド、ビニルスルホン、アジリジンおよび光反応性試薬(アリールアジド、ジアジリジンなど)を含むものが挙げられるが、これらに限定されない。

50

【0146】

アミノ酸と官能基との反応は、システイン／マレイミドなど、自発的であってもよく、またはアジドおよび直鎖アルキンを接続するためのCu(I)など、外部試薬を必要としてもよい。

【0147】

好ましいクロスリンカーとしては、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル3-(ピリジン-2-イルジスルファニル)プロパノエート、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル4-(ピリジン-2-イルジスルファニル)ブタノエート、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル8-(ピリジン-2-イルジスルファニル)オクタノエート、ジ-マレイミドPEG 1k、ジ-マレイミドPEG 3.4k、ジ-マレイミドPEG 5k、ジ-マレイミドPEG 10k、ビス(マレイミド)エタン(BMOE)、ビス-マレイミドヘキサン(BMH)、1,4-ビス-マレイミドブタン(BMB)、1,4ビス-マレイミジル-2,3-ジヒドロキシブタン(BMDB)、BM[PEO]2(1,8-ビス-マレイミドジエチレングリコール)、BM[PEO]3(1,11-ビス-マレイミドトリエチレングリコール)、トリス[2-マレイミドエチル]アミン(TMEA)、DTM Eジチオビスマレイミドエタン、ビス-マレイミドPEG3、ビス-マレイミドPEG11、DBCO-マレイミド、DBCO-PEG4-マレイミド、DBCO-PEG4-NH2、DBCO-PEG4-NHS、DBCO-NHS、DBCO-PEG-DBCO 2.8kDa、DBCO-PEG-DBCO 4.0kDa、DBCO-15原子-DBCO、DBCO-26原子-DBCO、DBCO-35原子-DBCO、DBCO-PEG4-S-S-PEG3-ビオチン、DBCO-S-S-PEG3-ビオチンおよびDBCO-S-S-PEG11-ビオチンが挙げられる。最も好ましいクロスリンカーは、スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD)およびマレイミド-PEG(2kDa)-マレイミド(アルファ、オメガ-ビス-マレイミドポリ(エチレングリコール))である。

【0148】

リンカーは標識されることがある。好適な標識としては、蛍光分子(Cy3、FAM/FITCまたはAlexaFluor(登録商標)555など)、放射性同位元素、例えば¹²⁵I、³⁵S、酵素、抗体、抗原、ポリヌクレオチドおよびビオチンなどのリガンドが挙げられるが、これらに限定されない。そのような標識は、リンカーの量を定量できるようにする。標識は、ビオチンなどの切断可能な精製タグ、またはタンパク質それ自体には存在しないがトリプシン消化によって放出されるペプチドなどの、同定方法において現れる特定の配列でもあってもよい。

【0149】

分析物または微粒子のそれ自体への架橋は、非常に過剰な分析物および/または微粒子の中でリンカーの濃度を保つことにより防ぐことができる。あるいは、2つのリンカーが使用される「鍵と鍵穴」配置が使用されてもよい。各リンカーの一方の末端のみが一緒に反応してより長いリンカーを形成し、リンカーの他方の末端はそれぞれ構築物(すなわち、分析物または微粒子)の異なる部分と反応することができる。

【0150】

微粒子への分析物の付着は、永続的または安定性であることがある(すなわち、分析物は、本発明の方法において微粒子から剥離するようにならない)。好ましい永続的または安定な付着は、共有結合性付着である。

【0151】

付着は、好ましくは一時的であり、すなわち、分析物は、例えばポアに送達されるとまたはポアと相互作用するときに、本発明の方法中に微粒子から剥離しうる。好ましい一時的付着はハイブリダイゼーションによる。2つの相補的ポリヌクレオチドは、分析物を微粒子に付着させるために使用されることがある。あるいは、他方のポリヌクレオチドの部分もしくは領域に特異的にハイブリダイズする、または他方のポリヌクレオチドの部分もしくは領域に相補的である部分または領域をそれぞれ含む2つのポリヌクレオチドが使用

されることがある。一方のポリヌクレオチドは、分析物に付着されることがあり、他方は微粒子に付着されることがある。分析物および微粒子は、次いで2つのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって付着されることがある。ポリヌクレオチドは、上で論じたもののいずれであってもよい。あるいは、分析物がポリヌクレオチドである場合、ポリヌクレオチド分析物の部分または領域に特異的にハイブリダイズする、またはポリヌクレオチド分析物の部分もしくは領域に相補的である部分または領域を含むポリヌクレオチドが、微粒子に付着されることがある。

【0152】

このことは、カップリングに関して下でより詳細に論じる。他の好ましい一時的付着としては、ポリヒスチジンタグ(ヘキサヒスチジンタグ、6×Hisタグ、His6タグまたはHisタグ(登録商標))、Ni-NTAまたはストレプトアビジン-ビオチンを使用する付着が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0153】

下で論じるように、ヘリカーゼなどのポリヌクレオチド結合タンパク質は、ポアを通るポリヌクレオチド分析物の移動を制御するために使用されることがある。好ましい実施形態において、ポリヌクレオチド分析物は、これと結合しているポリヌクレオチド結合タンパク質が備えられ(すなわち、ポリヌクレオチド分析物は、ポリヌクレオチド結合タンパク質を含む)、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド結合タンパク質を介して微粒子に付着される。ポリヌクレオチド結合タンパク質は、上で論じた方法のいずれかを用いて微粒子に付着されることがある。ポリヌクレオチド結合タンパク質は、下で論じるタンパク質のいずれであってもよい。ポリヌクレオチド結合タンパク質は、好ましくはヘリカーゼに由来する。

20

【0154】

送達

方法は、微粒子を膜へ送達するステップを含む。微粒子は、分析物を膜中の膜貫通ポアに送達する。微粒子は、いずれの様式で膜へ送達されてもよい。方法は、好ましくは、微粒子を膜に近接または隣接して置き、微粒子を膜へ移動させるステップを含む。微粒子は、膜から任意の距離、例えば膜から約500μm以内、膜から約200μm以内、膜から約100μm以内、膜から約50μm以内または膜から約30μm以内に置かれてもよい。

30

【0155】

微粒子は膜へ移動する。微粒子は、概して膜に移動する。微粒子は膜と接触してもよい。微粒子は膜と接触しなくてもよい。例えば、微粒子は、分析物で実質的にもしくは完全に被覆されている場合、またはその表面の実質的にすべてもしくはすべてが分析物に付着されている場合、膜と接触しない可能性がある。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドなどの分析物は、微粒子の粒径より大きいまたは長いことがある。分析物は、微粒子と膜とのクッションとして作用することができる。微粒子は、分析物をポアに送達するのに膜の十分近くに移動する。当業者は、分析物がポアに送達されるように系を設計することができる。

【0156】

微粒子は、いずれの様式で膜へ移動してもよい。方法は、好ましくは、微粒子を電気化学的勾配、拡散勾配、親水性勾配または疎水性勾配に沿って移動させるステップを含む。勾配は、1点から別の点に移るときに観察される特性の程度における増減である。当業者は、上で言及した勾配のいずれかの生成方法、および微粒子を勾配に沿って移動させる方法を理解するであろう。例えば、荷電微粒子は、概して電気化学的勾配に沿って移動することになる。微粒子は、概して膜の方へ拡散することになる。微粒子は、概して、圧力勾配に沿って溶液中を流れることになる。親水性または疎水性微粒子は、概して、親水性または疎水性勾配に沿って移動することになる。分析物、および1つまたは複数のアンカーなどの任意の関連分子は、微粒子の電荷および/または親水性/疎水性に影響を及ぼすことがある。

40

50

【0157】

方法は、好ましくは微粒子を磁場内で移動させるステップを含む。方法は、好ましくは、微粒子を膜に送達するために磁場を使用するステップを含む。磁性微粒子は、上で論じている。磁場を生成するための好適な方法は公知であり、磁性材料または電磁石が挙げられるが、これらに限定されない。

【0158】

方法は、好ましくは微粒子を電場内で移動させるステップを含む。方法は、好ましくは、微粒子を膜に送達するために電場を使用するステップを含む。荷電微粒子は、当技術分野において公知であり、上で論じられている。電場を生成するための好適な方法も公知である。

10

【0159】

方法は、好ましくは微粒子を圧力下で移動させるステップを含む。方法は、好ましくは、微粒子を膜に送達するために圧力または流れを使用するステップを含む。圧力は、物理的圧力または浸透圧であってもよい。そのような圧力を生成するための好適な方法は公知である。

【0160】

方法は、好ましくは微粒子を重力場内でまたは重力によって移動させるステップを含む。方法は、好ましくは、微粒子を膜に送達するために重力を使用するステップを含む。溶液中の膜の上に置かれた高密度微粒子は、重力の影響下で膜へ移動することになる。方法は、微粒子が表面に沿って膜へ進み、移動し、スライドしましたは転がることを可能にするステップを含むことがある。表面は、概して、膜を含むチャンバーの垂直壁（壁は膜の平面にほぼ垂直である）から約45°から約69°の角度で傾斜している。表面は、概して、膜の平面と比較して約21°、22°、23°、24°、25°、26°、27°、28°、29°、30°、31°、32°、33°、34°、35°、36°、37°、38°、39°、40°、41°、42°、43°、44°から約45°の角度で膜の方へ傾斜している。好ましい実施形態において、傾斜面は、膜を含むチャンバーの1つまたは複数の表面を、シリコン油、AR20またはヘキサデカンなどの好適な前処理法で前処理して形成される。本発明の方法において使用するためのチャンバーを含む好適な装置は、下で論じる。

20

【0161】

30

微粒子が膜と接触する場合、方法は、微粒子が膜に沿って進み、移動し、スライドしましたは転がることを可能にするステップを含むことがある。微粒子が膜と接触しない場合、方法は、微粒子が膜と平行して進み、移動し、スライドしましたは転がることを可能にするステップを含むことがある。

【0162】

カップリング

分析物は、好ましくは、膜とカップリングすることができる1つまたは複数のアンカーを含む。方法は、好ましくは、1つまたは複数のアンカーを使用して分析物を膜とカップリングするステップをさらに含む。

【0163】

40

アンカーは、分析物とカップリング（または結合）する基、および膜とカップリング（または結合）する基を含む。各アンカーは、分析物および/または膜と共有結合でカップリング（または結合）することがある。

【0164】

分析物は、2、3、4以上のアンカーなど、任意の数のアンカーを使用して膜とカップリングしてもよい。例えば、分析物は、各々のアンカーが分析物および膜の両方と別々にカップリング（または結合）する、2つのアンカーを使用して膜とカップリングしてもよい。

【0165】

1つまたは複数のアンカーは、1つまたは複数のポリヌクレオチド結合タンパク質を含

50

んでもよい。各アンカーは、1つまたは複数のポリヌクレオチド結合タンパク質を含んでもよい。ポリヌクレオチド結合タンパク質は、下で論じられるもののいずれであってもよい。

【0166】

膜が、両親媒性層、例えば、トリプロック共重合体膜である場合、1つまたは複数のアンカーは、好ましくは、膜中に存在するポリペプチドアンカー、および/または膜中に存在する疎水性アンカーを含む。疎水性アンカーは、好ましくは、脂質、脂肪酸、ステロール、カーボンナノチューブ、ポリペプチド、タンパク質またはアミノ酸、例えばコレステロール、パルミチン酸エステルまたはトコフェロールである。好ましい実施形態において、1つまたは複数のアンカーはポアではない。

10

【0167】

膜の成分、例えば、両親媒性分子、共重合体または脂質は、1つまたは複数のアンカーを形成するように化学的に修飾されるまたは官能化されることがある。好適な化学的修飾、および膜の成分を官能化する好適な方法の例は、下でより詳細に論じる。膜成分の任意の比率、例えば、少なくとも0.01%、少なくとも0.1%、少なくとも1%、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%または100%を官能化してもよい。

【0168】

分析物は、膜と直接カップリングされることもある。分析物を膜とカップリングするために使用される1つまたは複数のアンカーは、好ましくはリンカーを含む。1つまたは複数のアンカーは、1つまたは複数、例えば2、3、4以上のリンカーを含むことがある。1つのリンカーを使用して、1つより多く、例えば2、3、4以上の分析物を膜とカップリングしてもよい。

20

【0169】

好ましいリンカーとしては、重合体、例えばポリヌクレオチド、ポリエチレングリコール(PEG)、多糖類およびポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。これらのリンカーは、直鎖状であってもよく、分岐状であってもよく、または環状であってもよい。例えば、リンカーは、環状ポリヌクレオチドであることがある。分析物は、それ自体がポリヌクレオチドであるならば、環状ポリヌクレオチドリンカーにおける相補配列にハイブリダイズすることがある。

【0170】

30

1つもしくは複数のアンカーまたは1つもしくは複数のリンカーは、切断または破壊することができる成分、例えば、制限部位または光解離性基を含むことがある。

【0171】

官能化されたリンカー、およびそれらが分子をカップリングできる方法は、当技術分野において公知である。例えば、マレイミド基で官能化されたリンカーは、タンパク質中のシステイン残基と反応して、該システイン残基に付着することになる。本発明に関して、タンパク質は、膜中に存在することもあり、分析物それ自体であることもあり、または分析物とカップリング(または結合)するために使用されることもある。このことは、下でより詳細に論じる。

【0172】

40

分析物の架橋は、「鍵と鍵穴」配置を用いて回避することができる。各リンカーの1つの末端のみが一緒に反応してより長いリンカーを形成することがあり、リンカーの他の末端は、各々、分析物または膜とそれぞれ反応する。そのようなリンカーは、国際出願番号PCT/GB10/000132(国際公開第2010/086602号パンフレットとして公開された)に記載されている。

【0173】

下で論じるシークエンシング実施形態ではリンカーの使用が好ましい。ポリヌクレオチド分析物が、ポアと相互作用しているときにはアンカッピングしないという意味で永続的に膜と直接カップリングされている場合には、膜とポアの間の距離のためシークエンシング実行をポリヌクレオチドの末端まで継続することができないので、一部の配列データ

50

が失われることになる。リンカーを使用する場合には、ポリヌクレオチド分析物を完了まで処理することができる。

【0174】

カップリングは、永続的または安定性であることがある。言い換えれば、カップリングは、分析物が、ポアと相互作用すると、膜とカップリングされたままであるようなカップリングであることがある。

【0175】

カップリングは、一時的であることがある。言い換えれば、カップリングは、分析物が、ポアと相互作用すると、膜から分離されうるようなカップリングであることがある。アプタマー検出およびポリヌクレオチドシークエンシングなどの特定の用途には、カップリングの一時的性質が好ましい。永続的または安定性リンカーが、ポリヌクレオチドの5'または3'末端のいずれかに直接付着され、リンカーが、膜と膜貫通ポアのチャネルとの間の距離より短い場合には、シークエンシング実行をポリヌクレオチドの末端まで継続することができないので、一部の配列データが失われることになる。カップリングが一時的である場合には、カップリングされた末端から無作為に膜がなくなると、ポリヌクレオチドを完了まで処理することができる。永続的 / 安定性または一時的連結を形成する化学基は、下でより詳細に論じる。コレステロールまたは脂肪アシル鎖を使用して、分析物が両親媒性層またはトリプロック共重合体膜と一時的にカップリングされることがある。6 ~ 30個の炭素原子の長さを有する任意の脂肪アシル鎖、例えば、ヘキサデカン酸を使用してもよい。

10

20

【0176】

好ましい実施形態において、核酸などのポリヌクレオチド分析物は、トリプロック共重合体膜または脂質二重層などの両親媒性層とカップリングされる。核酸の合成脂質二重層へのカップリングは、様々な異なる繫留戦略を用いて以前に行われている。これらのことを行なうことを下の表3に要約する。

【0177】

【表1】

表3

アンカーが含むもの	カップリングのタイプ	参考文献
チオール	安定性	Yoshina-Ishii, C. and S. G. Boxer (2003). "Arrays of mobile tethered vesicles on supported lipid bilayers." <i>J Am Chem Soc</i> 125 (13): 3696-7.
ビオチン	安定性	Nikolov, V., R. Lipowsky, et al. (2007). "Behavior of giant vesicles with anchored DNA molecules." <i>Biophys J</i> 92 (12): 4356-68
コレステロール	一時的	Pfeiffer, I. and F. Hook (2004). "Bivalent cholesterol-based coupling of oligonucleotides to lipid membrane assemblies." <i>J Am Chem Soc</i> 126 (33): 10224-5
界面活性剤(例えば脂質、パルミチン酸塩など)	安定性	van Lengerich, B., R. J. Rawle, et al. "Covalent attachment of lipid vesicles to a fluid-supported bilayer allows observation of DNA-mediated vesicle interactions." <i>Langmuir</i> 26 (11): 8666-72

30

40

【0178】

合成ポリヌクレオチド分析物および / またはリンカーは、コレステロール、トコフェロール、パルミチン酸エステル、チオール、脂質およびビオチン基などの好適なアンカー基の直接付加に容易に適合する修飾ホスホラミダイトを合成反応において使用して、官能化されることがある。これらの様々な付着化学によって、ポリヌクレオチドへの付着の一連の選択肢が得られる。様々な修飾基各々がわずかに異なる方法でポリヌクレオチドにカッ

50

プリングし、カップリングは必ずしも永続的であるとは限らないため、膜への分析物の滞留に異なる時間が費やされる。一時的カップリングの利点は、上で論じている。

【0179】

リンカーとのまたは官能化膜とのポリヌクレオチドのカップリングは、相補的反応性基またはアンカー基をポリヌクレオチドに付加することができるという条件で、いくつかの他の手段によって果たすこともできる。ポリヌクレオチドのいずれかの末端への反応性基の付加は、以前に報告されている。T 4 ポリヌクレオチドキナーゼおよびATP-Sを使用して、チオール基をssDNAまたはdsDNAの5'に付加することができる (Grant, G. P. and P. Z. Qin (2007). "A facile method for attaching nitroxide spin labels at the 5' terminus of nucleic acids." Nucleic Acids Res 35(10): e77)。T 4 ポリヌクレオチドキナーゼおよび- [2-アジドエチル] - ATPまたは- [6-アジドヘキシル] - ATPを使用して、アジド基をssDNAまたはdsDNAの5'リン酸エステルに付加することができる。チオールまたはクリックケミストリーを使用して、チオール、ヨードアセトアミドOPSSもしくはマレイミド基(チオールに対して反応性)またはDIBO(ジベンゾシクロオクチニン)もしくはアルキン基(アジドに対して反応性)のいずれかを含有するテザーをポリヌクレオチド分析物に共有結合で付着させることができる。ターミナルトランスクレオチドキナーゼを使用して、ビオチン、チオールおよびフルオロフオアなどの化学基のより多様な選択物を付加して、ssDNAの3'に修飾オリゴヌクレオチドを組み込むことができる (Kumar, A., P. Tchen, et al. (1988). "Nonradioactive labeling of synthetic oligonucleotide probes with terminal deoxynucleotidyl transferase." Anal Biochem 169(2): 376-82)。ストレプトアビシン/ビオチンおよび/またはストレプトアビシン/デスチオビオチンカップリングを任意の他の分析物に使用してもよい。下の例は、ポリヌクレオチドが、ストレプトアビシン/ビオチンおよびストレプトアビシン/デスチオビオチンを使用して膜とどのようにカップリングされうるかを説明するものである。ターミナルトランスクレオチドキナーゼと好適に修飾されたヌクレオチド(例えばコレステロールまたはパルミチン酸エステル)を使用してアンカーがポリヌクレオチドに直接付加されうることも可能である。

【0180】

1つまたは複数のアンカーは、好ましくは、分析物をハイブリダイゼーションによって膜とカップリングする。ハイブリダイゼーションは、1つまたは複数のアンカーのいずれの部分に存在してもよく、例えば、1つもしくは複数のアンカーと分析物の間、1つもしくは複数のアンカー内、または1つもしくは複数のアンカーと膜の間に存在してもよい。1つまたは複数のアンカーのハイブリダイゼーションによって、上で論じたような一時的手法でのカップリングが可能になる。例えば、リンカーは、一緒にハイブリダイズされている2つ以上のポリヌクレオチド、例えば、3、4または5つのポリヌクレオチドを含むことがある。分析物がポリヌクレオチドである場合、1つまたは複数のアンカーは、ポリヌクレオチド分析物にハイブリダイズされることがある。1つまたは複数のアンカーは、ポリヌクレオチド分析物に直接、ポリヌクレオチド分析物に付着されているYアダプターおよび/もしくはリーダー配列に直接、または(下でより詳細に論じるように)ポリヌクレオチド分析物に付着されているヘアピンループアダプターに直接ハイブリダイズすることがある。あるいは、1つまたは複数のアンカーは、ポリヌクレオチド分析物にハイブリダイズされる1つまたは複数、例えば2つまたは3つの中間ポリヌクレオチド(または「スプリント」)、ポリヌクレオチド分析物に付着されているYアダプターおよび/もしくはリーダー配列、または(下でより詳細に論じるように)ポリヌクレオチド分析物に付着されているヘアピンループアダプターにハイブリダイズされることがある。

【0181】

1つまたは複数のアンカーは、一本鎖ポリヌクレオチドを含むこともあり、または二本鎖ポリヌクレオチドを含むこともある。アンカーの一部分は一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチド分析物にライゲートされていることがある。T 4 RNAリガーゼIを使用する短いssDNA片のライゲーションは報告されている (Troutt, A. B., M. G. McHeyzer-

10

20

30

40

50

Williams, et al. (1992). "Ligation-anchored PCR: a simple amplification technique with single-sided specificity." Proc Natl Acad Sci U S A 89(20): 9823-5)。あるいは、一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチド分析物のいずれかを二本鎖ポリヌクレオチドにライゲートし、次いで、2本の鎖を熱変性または化学変性によって分離することができる。二本鎖ポリヌクレオチドに対しては、その二重鎖の末端の一方もしくは両方に一本鎖ポリヌクレオチドの一部分を付加すること、または一方もしくは両方の末端に二本鎖ポリヌクレオチドを付加することが可能である。一本鎖ポリヌクレオチドの二本鎖ポリヌクレオチドへの付加については、この付加を、一本鎖ポリヌクレオチドの他の領域へのライゲーションの場合と同様に T 4 RNA リガーゼ I を使用して果たすことができる。次に、二本鎖ポリヌクレオチドの二本鎖ポリヌクレオチド分析物への付加については、ライゲーションは、分析物および付加されたポリヌクレオチドそれぞれに関する相補的 3' d A / d T テールを (多くの試料調製用途に鎖状体または二量体形成を防止するために常例的に行われているように) 用いる、「平滑末端型」であることもあり、または分析物の制限消化および適合性アダプターのライゲーションによって生成される「突出末端」の使用であることもある。次いで、二重鎖が融解されると、各一本鎖は、一本鎖ポリヌクレオチドが 5' 末端、3' 末端でのライゲーションもしくは修飾に使用された場合には 5' もしくは 3' 修飾、または二本鎖ポリヌクレオチドがライゲーションに使用された場合には両方の修飾、いずれかを有することになる。

【 0 1 8 2 】

ポリヌクレオチド分析物が合成鎖である場合、ポリヌクレオチドの化学合成中に 1 つまたは複数のアンカーを組み込むことができる。例えば、ポリヌクレオチドを、反応性基が付着されているプライマーを使用して合成することができる。

【 0 1 8 3 】

アデニル化ポリヌクレオチドは、アデノシン一リン酸をポリヌクレオチドの 5' リン酸エステルに付着させるライゲーション反応における中間体である。この中間体を生成するために、NEB からの 5' DNA アデニル化キットなどの様々なキットを利用できる。反応中に修飾ヌクレオチド三リン酸を ATP で置換することによって、その際、ポリヌクレオチドの 5' に反応性基 (例えばチオール、アミン、ビオチン、アジドなど) の付加が可能でありうる。5' DNA アデニル化キットと好適に修飾されたヌクレオチド (例えばコレステロールまたはパルミチン酸エステル) を使用してアンカーがポリヌクレオチドに直接付加されうることも可能でありうる。

【 0 1 8 4 】

ゲノム DNA のセクションを増幅するための一般的な技法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の使用である。ここで、2つの合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、DNA の同じセクションのいくつかのコピーを生成することができ、この場合、各コピーについて、二重鎖における各鎖の 5' は合成ポリヌクレオチドとなる。ポリメラーゼを利用することにより、単一または複数のヌクレオチドを一本鎖または二本鎖 DNA の 3' 末端に付加することができる。使用することができるポリメラーゼの例としては、ターミナルトランスフェラーゼ、クレノウおよび大腸菌 (E. coli) ポリ (A) ポリメラーゼが挙げられるが、これらに限定されない)。反応中に修飾ヌクレオチド三リン酸を ATP で置換することによって、その際、コレステロール、チオール、アミン、アジド、ビオチンまたは脂質などのアンカーを二本鎖ポリヌクレオチドに組み込むことができる。したがって、増幅されたポリヌクレオチドの各コピーは、アンカーを含有することになる。

【 0 1 8 5 】

理想的には、分析物は、該分析物を官能化する必要なく、膜とカップリングされる。これは、1つもしくは複数のアンカー、例えばポリヌクレオチド結合タンパク質または化学基を膜とカップリングし、1つもしくは複数のアンカーを分析物と相互作用させることによって、または膜を官能化することによって、果たすことができる。1つまたは複数のアンカーを本明細書に記載する方法のいずれかによって膜とカップリングしてもよい。特に、1つまたは複数のアンカーは、1つまたは複数のリンカー、例えばマレイミド官能化リ

ンカーを含むことがある。

〔 0 1 8 6 〕

この実施形態において、分析物は、概してRNA、DNA、PNA、TNAまたはLNAであり、二本鎖または一本鎖であってもよい。この実施形態は、ゲノムDNA分析物に特に適している。

〔 0 1 8 7 〕

1つまたは複数のアンカーは、一本鎖もしくは二本鎖ポリヌクレオチド、分析物内の特異的ヌクレオチド配列、または分析物内の修飾ヌクレオチドのパターン、またはポリヌクレオチド上に存在する任意の他のリガンドとカップリング、結合または相互作用する任意の基を含むことができる。

[0 1 8 8]

アンカーに使用するためには好適な結合タンパク質としては、下に列挙するものを含めて、大腸菌 (E. coli) 一本鎖結合タンパク質、P 5 一本鎖結合タンパク質、T 4 g p 3 2 一本鎖結合タンパク質、TOPO V dsDNA 結合領域、ヒトヒストンタンパク質、大腸菌 (E. coli) HU DNA 結合タンパク質、および他の古細菌性、原核性または真核性一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチド (または核酸) 結合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

〔 0 1 8 9 〕

特異的ヌクレオチド配列は、転写因子、リボソーム、エンドヌクレアーゼ、トポイソメラーゼまたは複製開始因子によって認識される配列であることがある。修飾ヌクレオチドのパターンは、メチル化または損傷のパターンであることがある。

〔 0 1 9 0 〕

1つまたは複数のアンカーは、ポリヌクレオチド分析物とカップリングする、結合する、それにインターラートする、または、それと相互作用する任意の基を含むことができる。この基は、静電相互作用、水素結合相互作用、またはファンデルワールス相互作用によって、ポリヌクレオチド分析物にインターラートすることもあり、またはポリヌクレオチドと相互作用することもある。そのような基としては、リシン単量体、ポリリシン (s s D N A または d s D N A と相互作用することになる) 、臭化工チジウム (d s D N A にインターラートすることになる) 、ユニバーサル塩基またはユニバーサルヌクレオチド (任意のポリヌクレオチド分析物とハイブリダイズすることができる) およびオスミウム錯体 (メチル化塩基と反応することができる) が挙げられる。したがって、ポリヌクレオチド分析物を膜と、その膜に付着している1つまたは複数のユニバーサルヌクレオチドを使用してカップリングしてもよい。1つまたは複数のリンカーを使用して各ユニバーサルヌクレオチドを膜とカップリングしてもよい。ユニバーサルヌクレオチドは、好ましくは、次の核酸塩基のうちの1つを含む：ヒポキサンチン、4 - ニトロインドール、5 - ニトロインドール、6 - ニトロインドール、ホルミルインドール、3 - ニトロピロール、ニトロイミダゾール、4 - ニトロピラゾール、4 - ニトロベンゾイミダゾール、5 - ニトロインダゾール、4 - アミノベンゾイミダゾールまたはフェニル (C 6 - 芳香族環) 。ユニバーサルヌクレオチドは、より好ましくは、次のヌクレオシドのうちの1つを含む：2 ' - デオキシイノシン、イノシン、7 - デアザ - 2 ' - デオキシイノシン、7 - デアザ - イノシン、2 - アザ - デオキシイノシン、2 - アザ - イノシン、2 - O ' - メチルイノシン、4 - ニトロインドール 2 ' - デオキシリボヌクレオシド、4 - ニトロインドールリボヌクレオシド、5 - ニトロインドール 2 ' - デオキシリボヌクレオシド、5 - ニトロインドールリボヌクレオシド、6 - ニトロインドール 2 ' - デオキシリボヌクレオシド、6 - ニトロインドールリボヌクレオシド、3 - ニトロピロール 2 ' - デオキシリボヌクレオシド、3 - ニトロピロールリボヌクレオシド、ヒポキサンチンの非環状糖類似体、ニトロイミダゾール 2 ' - デオキシリボヌクレオシド、ニトロイミダゾールリボヌクレオシド、4 - ニトロピラゾール 2 ' - デオキシリボヌクレオシド、4 - ニトロピラゾールリボヌクレオシド、4 - ニトロベンゾイミダゾール 2 ' - デオキシリボヌクレオシド、4 - ニトロベンゾイミダゾールリボヌクレオシド、5 - ニトロインダゾール 2 ' - デオキシリボヌクレオシド

10

20

30

40

50

シド、5-ニトロインダゾールリボヌクレオシド、4-アミノベンゾイミダゾール2'-デオキシリボヌクレオシド、4-アミノベンゾイミダゾールリボヌクレオシド、フェニルC-リボヌクレオシド、フェニルC-2'-デオキシリボシルヌクレオシド、2'-デオキシネブラリン、2'-デオキシイソグアノシン、K-2'-デオキシリボース、P-2'-デオキシリボースおよびピロリジン。ユニバーサルヌクレオチドは、より好ましくは、2'-デオキシイノシンを含む。ユニバーサルヌクレオチドは、より好ましくは、IMPまたはdIMPである。ユニバーサルヌクレオチドは、最も好ましくは、dPMP(2'-デオキシ-P-ヌクレオシドーリン酸)またはdKMP(N6-メトキシ-2',6-ジアミノプリンーリン酸)である。

【0191】

10

1つまたは複数のアンカーをフーグスティーン(Hoogsteen)水素結合(2つの核酸塩基が水素結合によって一緒に保持される)または逆フーグスティーン水素結合(一方の核酸塩基が他方の核酸塩基に対して180°回転される)によってポリヌクレオチド分析物とカップリング(または結合)してもよい。例えば、1つまたは複数のアンカーは、ポリヌクレオチド分析物とフーグスティーン水素結合または逆フーグスティーン水素結合を形成する、1つもしくは複数のヌクレオチド、1つもしくは複数のオリゴヌクレオチドまたは1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含むことがある。これらのタイプの水素結合は、第3のポリヌクレオチド鎖を二本鎖ヘリックスの周りに巻きつかせ、三重鎖を形成させる。1つまたは複数のアンカーは、二本鎖二重鎖と三重鎖を形成することによって、二本鎖ポリヌクレオチド分析物とカップリング(または結合)することができる。

20

【0192】

この実施形態において、膜成分の少なくとも1%、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%または100%は官能化されることがある。

【0193】

1つまたは複数のアンカーがタンパク質を含む場合、例えば、タンパク質が、膜と適合性である外部疎水性領域を既に有するならば、アンカーは、さらなる官能化なしに直接膜内に係留することができるであろう。そのようなタンパク質の例としては、膜貫通タンパク質、膜内タンパク質および膜タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、タンパク質は、膜と適合性である遺伝子融合された疎水性領域とともに発現されることがある。そのような疎水性タンパク質領域は、当技術分野において公知である。

30

【0194】

1つまたは複数のアンカーは、好ましくは、膜への送達の前に分析物と混合されるが、1つまたは複数のアンカーを膜と接触させ、その後、分析物と接触させてもよい。

【0195】

別の態様において、分析物は、上記の方法を用いて、特異的結合基が該分析物を認識できるように官能化されることがある。具体的には、分析物は、リガンド、例えば、ビオチン(ストレプトアビシンと結合させるため)、アミロース(マルトース結合タンパク質もしくは融合タンパク質と結合させるため)、Ni-NTA(ポリヒスチジンもしくはポリヒスチジンタグ付きタンパク質と結合させるため)、またはペプチド(例えば抗原)で官能化されることがある。

40

【0196】

好ましい実施形態によると、ポアを優先的に通り抜けるリーダー配列に分析物を付着させる場合、1つまたは複数のアンカーを使用してポリヌクレオチド分析物を膜とカップリングすることができる。リーダー配列は、下でより詳細に論じる。好ましくは、ポリヌクレオチド分析物は、ポアを優先的に通り抜けるリーダー配列に付着(例えばライゲート)される。そのようなリーダー配列は、ホモ重合体型ポリヌクレオチドまたは脱塩基領域を含むことがある。リーダー配列は、1つまたは複数のアンカーに直接、または1つもしくは複数の中間ポリヌクレオチド(もしくはスプリント)を介して、ハイブリダイズするように概して設計される。そのような場合、1つまたは複数のアンカーは、リーダー配列内の配列または1つもしくは複数の中間ポリヌクレオチド(もしくはスプリント)内の配列に

50

相補的であるポリヌクレオチド配列を概して含む。そのような場合、1つまたは複数のスプリントは、リーダー配列内の配列に相補的であるポリヌクレオチド配列を概して含む。

【0197】

両親媒性層など、ポリヌクレオチドを膜とカップリングするための上で論じた方法のいずれも、もちろん他の分析物と膜の組み合わせに当てはまりうる。いくつかの実施形態において、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、トリプロック共重合体層または脂質二重層などの両親媒性層とカップリングされる。そのような分析物の化学的付着のための様々な方法論が利用できる。化学的付着に使用される分子の例は、EDC (1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩) である。市販のキット (Thermo Pierce、部品番号 22980) を使用して反応性基をポリヌクレオチドの 5' に付加することもできる。好適な方法としては、ヒスチジン残基およびN i - N T A を使用する一時的親和性付着はもちろん、反応性システイン、リシンまたは非天然アミノ酸による、より強い共有結合性付着も挙げられるが、これらに限定されない。

【0198】

分析物特性評価

本発明は、膜貫通ポアを使用して分析物の有無または1つもしくは複数の特性を判定することにさらに関わることがある。これは、(i) 分析物を膜貫通ポアと相互作用させるステップ、および(ii) 相互作用中に、分析物の有無または1つもしくは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を取るステップを概して含む。

【0199】

様々な異なるタイプの測定を行ってもよい。この測定は、限定ではないが、電気的測定および光学的測定を含む。可能な電気的測定としては、電流測定、インピーダンス測定、トンネル効果測定 (Ivanov AP et al., Nano Lett. 2011 Jan 12; 11(1):279-85)、およびFET測定 (国際出願WO 2005/124888) が挙げられる。光学的測定は電気的測定と組み合わされることがある (Soni GV et al., Rev Sci Instrum. 2010 Jan; 81(1):014301)。測定は、膜貫通電流測定、例えば、ポアを通って流れるイオン電流の測定であつてもよい。

【0200】

電気的測定は、Stoddart D et al., Proc Natl Acad Sci, 12;106(19):7702-7、Lieberman KR et al., J Am Chem Soc. 2010;132(50):17961-72、および国際出願WO 2000/28312に記載されているような、標準的なシングルチャンネル記録装置を使用して行つてもよい。あるいは、電気的測定は、例えば、国際出願WO 2009/077734 および国際出願WO 2011/067559に記載されているような、マルチチャンネルシステムを使用して行つてもよい。

【0201】

方法は、好ましくは、膜を横断して印加される電位を用いて行われる。印加される電位は、電圧電位であつてもよい。あるいは、印加される電位は、化学的電位であつてもよい。この方法の例は、両親媒性層などの膜を横断する塩勾配の使用である。塩勾配は、Holden et al., J Am Chem Soc. 2007 Jul 11; 129(27):8650-5に開示されている。場合によつては、ポリヌクレオチド分析物がポアに対して移動するときにポアを通過する電流を用いて、ポリヌクレオチドの配列を推定または判定する。これは鎖シークエンシングである。

【0202】

方法は、好ましくは、(i) 分析物をポアと相互作用させるステップと、(ii) 相互作用中にポアを通過する電流を測定し、それによって分析物の有無または1つもしくは複数の特性を判定するステップとを含む。

【0203】

電流が分析物に特異的な様式でポアを通って流れるならば (すなわち、分析物に関連する特有の電流がポアを通って流れながら検出されるならば)、分析物は存在する。電流が分析物に特異的な様式でポアを通って流れないならば、分析物は存在しない。同様に、分

10

20

30

40

50

析物の特性は、相互作用中にポアを通って流れる電流を用いて判定することができる。

【0204】

したがって、本発明は、分析物のナノポア検知を含む。本発明は、分析物がポアを通過する電流に与える異なる影響に基づき、類似の構造の分析物を識別するために使用することができる。本発明は、試料中の特定の分析物の濃度を測定するために使用することもできる。

【0205】

本発明は、バルク検出用途で多数または数千のポアを使用するセンサーにおいて使用することもできる。

【0206】

分析物とポアとの相互作用中、分析物は、その分析物に特異的な様式でポアを通って流れる電流に影響を及ぼす。例えば、特定の分析物は、ポアを通って流れる電流を特定の平均期間および特定の程度低減することになる。言い換えれば、ポアを通って流れる電流は、特定の分析物に特有である。対照実験を、ポアを通って流れる電流に特定の分析物が与える影響を判定するために行ってもよい。試料中の特定の分析物を同定し、特定の分析物が試料中に存在するかどうかを判定し、または各分析物の特性を判定するために、試験試料での本発明の方法の実施結果は、次いで、そのような対照実験から得られるものと比較することができる。ポアを通って流れる電流が、特定の分析物を示す様式で影響を受ける頻度は、試料中の分析物の濃度を判定するために使用することができる。

【0207】

アンカップリング

本発明の方法は、分析物を膜からアンカップリングするステップを含むことがある。複数の分析物が、本発明の方法を用いて送達されている場合、分析物の少なくとも10%が好ましくは膜からアンカップリングされる。例えば、分析物の少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%が、膜からアンカップリングされてもよい。好ましくは、分析物のすべてが膜からアンカップリングされる。膜からアンカップリングされる分析物の量は、ポアを使用して判定することができる。

【0208】

分析物は、任意の公知の方法を用いて膜からアンカップリングすることができる。分析物は、好ましくは、ポアを使用して膜からアンカップリングされない。分析物は、好ましくは、電圧または印加電位を用いて膜からアンカップリングされない。

【0209】

方法は、好ましくは、1つまたは複数のアンカーを膜から除去することにより、分析物を膜からアンカップリングするステップをさらに含む。方法は、より好ましくは、1つまたは複数のアンカーが膜に対して有するより高い親和性を1つまたは複数のアンカーに対して有する作用物質と、1つまたは複数のアンカーを接触させるステップを含む。分子の特異的結合能力を判定するための競合的結合アッセイまたは免疫放射線測定アッセイに関する様々なプロトコールは、当技術分野において周知である（例えばMaddox et al, J. Exp. Med. 158, 1211-1226, 1993を参照されたい）。作用物質は1つまたは複数のアンカーを膜から除去し、それによって分析物をアンカップリングする。作用物質、好ましくは糖である。1つまたは複数のアンカーが膜に対して有するより高い親和性で、1つまたは複数のアンカーと結合する任意の糖を使用してもよい。糖は、下で論じるようにシクロデキストリンまたはその誘導体であってもよい。

【0210】

1つまたは複数のアンカーは、好ましくは、コレステロールなどの疎水性アンカーを含み、作用物質は、好ましくは、シクロデキストリンもしくはその誘導体、または脂質である。シクロデキストリンまたはその誘導体は、Eliseev, A. V., and Schneider, H-J. (1994) J. Am. Chem. Soc. 116, 6081-6088に開示されているもののいずれであってもよい。作用物質は、より好ましくは、ヘプタキス-6-アミノ-シクロデキストリン(a

10

20

30

40

50

m_7 - C D)、6 - モノデオキシ - 6 - モノアミノ - - シクロデキストリン (a m₁ - C D) またはヘプタキス - (6 - デオキシ - 6 - グアニジノ) - シクロデキストリン (g u₇ - C D) である。本明細書において開示されている脂質のいずれも、使用することができる。

【 0 2 1 1 】

1つまたは複数のアンカーは、好ましくは、ストレプトアビジン、ビオチンまたはデスチオビオチンを含み、作用物質は、好ましくは、ビオチン、デスチオビオチンまたはストレプトアビジンである。ビオチンおよびデスチオビオチンの両方は、ストレプトアビジンが膜と結合するより高い親和性でストレプトアビジンと結合し、逆もまた同様である。ビオチンは、ストレプトアビジンに対してデスチオビオチンより強い親和性を有する。したがって、ストレプトアビジンを含むアンカーは、ビオチンまたはデスチオビオチンを使用して膜から除去することができ、逆もまた同様である。

【 0 2 1 2 】

1つまたは複数のアンカーは、好ましくはタンパク質を含み、作用物質は、好ましくは、タンパク質と特異的に結合する抗体またはその断片である。抗体が、優先的なまたは高い親和性でタンパク質と結合するならば、抗体はタンパク質と特異的に結合するが、低親和性のみでは他のまたは異なるタンパク質と結合しない。抗体は、 1×10^{-6} M以下、より好ましくは 1×10^{-7} M以下、 5×10^{-8} M以下、より好ましくは 1×10^{-8} M以下、またはより好ましくは 5×10^{-9} M以下の Kd で結合するならば、優先的なまたは高い親和性で結合する。抗体は、 1×10^{-6} M以上、より好ましくは 1×10^{-5} M以上、より好ましくは 1×10^{-4} M以上、より好ましくは 1×10^{-3} M以上、さらにより好ましくは 1×10^{-2} M以上の Kd で結合するならば、低い親和性で結合する。任意の方法が、結合または特異的結合を検出するために使用されることもある。タンパク質に対する抗体の結合を定量的に測定する方法は、当技術分野において周知である。抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であってもよい。抗体の好適な断片としては、Fv、F(ab')₁ および F(ab')₂ 断片、ならびに一本鎖抗体が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、抗体またはその断片は、キメラ抗体もしくはその断片、CDR移植抗体もしくはその断片、またはヒト化抗体もしくはその断片であってもよい。

【 0 2 1 3 】

方法は、1つまたは複数のアンカーを、膜とカップリングするその能力を低減する作用物質と接触させるステップを含むことがある。例えば、作用物質は、1つまたは複数のアンカーの構造および / または疎水性に干渉し、それによって膜とカップリングするその能力を低減しうる。1つまたは複数のアンカーは、好ましくはコレステロールを含み、作用物質は、好ましくはコレステロールデヒドロゲナーゼである。1つまたは複数のアンカーは、好ましくは脂質を含み、作用物質は、好ましくはホスホリパーゼである。1つまたは複数のアンカーは、好ましくはタンパク質を含み、作用物質は、好ましくはプロテイナーゼまたは尿素である。好適なアンカーおよび作用物質の他の組み合わせは、当業者には明らかであろう。

【 0 2 1 4 】

方法は、分析物を1つまたは複数のアンカーから分離することによって、分析物を膜からアンカップリングするステップを含むことがある。これは、いずれの様式でも行うことができる。例えば、リンカーは、リンカーを含む1つまたは複数のアンカーにおいて切断されうる。この実施形態は、ハイブリダイゼーションによる結合を伴う1つまたは複数のアンカーに特に適用可能である。そのようなアンカーは、上で論じている。

【 0 2 1 5 】

方法は、分析物および1つまたは複数のアンカーを、1つまたは複数のアンカーへの結合に関して分析物と競合する作用物質と接触させることによって、分析物を膜からアンカップリングするステップを含むことがある。競合的結合を判定および測定する方法は、当技術分野において公知である。作用物質は、好ましくは、1つまたは複数のアンカーへの

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーションに関して分析物と競合するポリヌクレオチドである。例えば、ハイブリダイゼーションを伴う1つまたは複数のアンカーを使用して、分析物が膜とカップリングされる場合、分析物は、ハイブリダイゼーションの部位に同様にハイブリダイズするポリヌクレオチドと1つまたは複数のアンカーを接触させることによって、アンカカップリングすることができる。ポリヌクレオチド作用物質は、概して、分析物および1つまたは複数のアンカーの濃度より高い濃度で添加される。あるいは、ポリヌクレオチド作用物質は、1つまたは複数のアンカーに分析物より強くハイブリダイズしてもよい。

【0216】

方法は、(i) 分析物および1つまたは複数のアンカーを、尿素、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、ジチオスレイトール(DTT)、ストレプトアビジンもしくはビオチン、UV光、酵素、または結合剤と接触させることによって、アンカカップリングすることができる。ポリヌクレオチド作用物質は、概して、分析物および1つまたは複数のアンカーの濃度より高い濃度で添加される。あるいは、ポリヌクレオチド作用物質は、1つまたは複数のアンカーに分析物より強くハイブリダイズしてもよい。

10

【0217】

分析物を1つまたは複数のアンカーから分離することによって、分析物が膜からアンカカップリングされる場合、1つまたは複数のアンカーは膜に残存するであろう。残存する1つまたは複数のアンカーは、膜に送達された別の分析物をカップリングするために使用されることもある。例えば、第二の分析物が、膜に残存する1つまたは複数のアンカーにハイブリダイズするポリヌクレオチドとともに送達されることもある。あるいは、第二の分析物を、第一の分析物(すなわち、他の1つまたは複数のアンカー)から分離されたものとは別の1つまたは複数のアンカーを使用して、膜とカップリングしてもよい。別の1つまたは複数のアンカーは、第一の分析物を膜とカップリングするために使用される同じタイプのアンカーであってもよく、または異なるタイプのアンカーであってもよい。

20

【0218】

方法は、微粒子を膜から除去することによって、分析物を膜からアンカカップリングするステップを好ましくはさらに含む。微粒子を膜から除去する方法は、下で論じる。微粒子との分析物の付着強度が、膜との分析物のカップリング強度より大きい場合、微粒子の除去は、分析物を膜からアンカカップリングすることになる。付着およびカップリングの強度は、下で論じるように測定することができる。微粒子を使用する分析物のアンカカップリングは、分析物の全ての例を系から除去するのに役立つことがあるため、別の微粒子が第二の分析物(第一の分析物と同じであってもよく、または異なってもよい)を膜貫通ポアに送達するために使用されることがある。

30

【0219】

除去または洗浄

方法は、微粒子を膜から除去するステップを好ましくはさらに含む。複数の微粒子が使用される場合、微粒子の少なくとも10%が除去されてもよく、例えば微粒子の少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%が除去されてもよい。方

40

50

法は、より好ましくは、微粒子の全てを膜から除去するするステップをさらに含む。これは、任意の方法で行うことができる。微粒子は、磁場を用いて膜から除去されてもよい。あるいはまたはさらに、微粒子は、フローベースの方法を用いて膜から除去されてもよい。例えば、膜は緩衝液で洗浄することができる。好適な緩衝液は、下で論じる。

【0220】

方法は、好ましくは、

(a) 第一の微粒子に付着している第一の試料中の第一の分析物を用意するステップと、
(b) 第一の微粒子を膜へ送達し、それによって第一の分析物を膜貫通ポアに送達するステップと、

(c) 第一の微粒子を膜から除去するステップと、

10

(d) 第二の微粒子に付着している第二の試料中の第二の分析物を用意するステップと、
(e) 第二の微粒子を膜へ送達し、それによって第二の分析物を膜貫通ポアに送達するステップと

を含む。

【0221】

第一の分析物は、第二の分析物と同じであってもよい。2つの分析物がポリヌクレオチドである場合、これにより、校正が可能になる。第一の分析物は、例えばタイプ（例えばタンパク質およびポリヌクレオチド）および／または同一性（例えば2つの異なるポリヌクレオチド）において、第二の分析物と異なってもよい。2つの試料は同じであってもよく、または異なってもよい。

20

【0222】

1つの実施形態において、方法は、(i)ステップ(b)と(c)の間に、第一の分析物を膜貫通ポアと相互作用させ、第一の分析物の有無または1つもしくは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を相互作用中に取るステップ、および／または(ii)ステップ(e)後に、第二の分析物を膜貫通ポアと相互作用させ、第二の分析物の有無または1つもしくは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を相互作用中に取るステップを好ましくはさらに含む。

【0223】

別の実施形態において、第一および第二の分析物はポリヌクレオチドであり、方法は、(i)ステップ(b)と(c)の間に、第一のポリヌクレオチドがポアを通って移動するように、第一のポリヌクレオチドを膜貫通ポアと相互作用させ、第一のポリヌクレオチドがポアに対して移動するときに、第一のポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を取り、それによって第一のポリヌクレオチドを特性評価するステップ、および／または(ii)ステップ(e)後に、第二のポリヌクレオチドがポアを通って移動するように、第二のポリヌクレオチドを膜貫通ポアと相互作用させ、第二のポリヌクレオチドがポアに対して移動するときに、第二のポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を取り、それによって第二のポリヌクレオチドを特性評価するステップをさらに含む。

30

【0224】

除去方法におけるステップ(c)は、好ましくは、微粒子および第一の分析物を除去するステップを含む。

40

【0225】

ポリヌクレオチド特性評価

本発明の方法は、好ましくは、ポリヌクレオチドを特性評価するステップを含む。ポリヌクレオチドは、本発明を用いて膜貫通ポアに送達され、ポアは、ポリヌクレオチドを特性評価するために使用される。

【0226】

送達後、方法は、(i)ポリヌクレオチドがポアを通って移動するように、ポリヌクレオチドを膜貫通ポアと相互作用させるステップと、(ii)ポリヌクレオチドがポアに対して移動するときに、ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示す1つまたは複数の

50

測定値を取り、それによってポリヌクレオチドを特性評価するステップとを含む。

【 0 2 2 7 】

任意の数のポリヌクレオチドを調査することができる。例えば、本発明の方法は、2つ以上のポリヌクレオチド、例えば3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、50以上、100以上、500以上、1,000以上、5,000以上、10,000以上、100,000以上、1,000,000以上、10,000,000以上、または50,000,000以上のポリヌクレオチドを特性評価することに関わることがある。2つ以上のポリヌクレオチドは、同じまたは異なる微粒子を使用して送達されてもよい。

【 0 2 2 8 】

2つ以上のポリヌクレオチドが特性評価される場合、それらは互いに異なっていてよい。2つ以上のポリヌクレオチドは、同じポリヌクレオチドの2つ以上の例であってよい。これにより、校正が可能になる。

【 0 2 2 9 】

ポリヌクレオチドは、天然に存在するものであることもあり、または人工的なものであることもある。例えば、方法を用いて、2つ以上の製造されたオリゴヌクレオチドの配列を検証してもよい。方法は、概してインピトロで行われる。

【 0 2 3 0 】

方法は、各ポリヌクレオチドの 2、3、4 または 5 以上の特性を測定するステップを含むことがある。1つまたは複数の特性は、好ましくは、(i) ポリヌクレオチドの長さ、(ii) ポリヌクレオチドの同一性、(iii) ポリヌクレオチドの配列、(iv) ポリヌクレオチドの二次構造、および(v) ポリヌクレオチドが修飾されているか否かから選択される。{i}、{ii}、{iii}、{iv}、{v}、{i, ii}、{i, iii}、{i, iv}、{i, v}、{ii, iii}、{ii, iv}、{ii, v}、{iii, iv}、{iii, v}、{iv, v}、{i, ii, iii}、{i, ii, iv}、{i, ii, v}、{i, iii, iv}、{i, iii, v}、{i, iv, v}、{i, ii, ii, iii}、{i, ii, ii, iv}、{i, ii, ii, v}、{i, ii, iii, iii}、{i, ii, iii, iv}、{i, ii, iii, v}、{i, ii, iv, iv}、{i, ii, iv, v}、{i, ii, v, v}、{i, ii, ii, ii, iii}、{i, ii, ii, ii, iv}、{i, ii, ii, ii, v}、{i, ii, ii, iii, iii}、{i, ii, ii, iii, iv}、{i, ii, ii, iii, v}、{i, ii, ii, iv, iv}、{i, ii, ii, iv, v}、{i, ii, ii, v, v} または {i, ii, ii, ii, ii, iii} などの、(i) ~ (v) のいずれの組み合わせを、本発明に従って測定してもよい。

〔 0 2 3 1 〕

(i) については、ポリヌクレオチドの長さは、例えば、ポリヌクレオチドとポアとの相互作用数、またはポリヌクレオチドとポアとの相互作用の継続時間を判定することによって測定することができる。

【 0 2 3 2 】

(i i) については、ポリヌクレオチドの同一性は、いくつかの方法で測定することができる。ポリヌクレオチドの同一性は、ポリヌクレオチドの配列測定とともに測定されることもあり、またはポリヌクレオチドの配列測定なしで測定されることもある。前者は容易であり、ポリヌクレオチドをシークエンシングし、それによって同定する。後者は、いくつかの方法で行うことができる。例えば、ポリヌクレオチド内の特定のモチーフの存在が（ポリヌクレオチドの残存配列を測定せずに）測定されることがある。あるいは、方法の中で特定の電気および / または光シグナルを測定することによって、ポリヌクレオチドを特定の源に由来すると同定することができる。

〔 0 2 3 3 〕

(i i i)については、ポリヌクレオチドの配列を以前に記載されているように判定することができる。好適なシークエンシング方法、特に電気的測定を用いるものは、Stoddart D et al., Proc Natl Acad Sci, 12;106(19):7702-7、Lieberman KR et al, J Am Chem Soc.2010;132(50):17961-72、および国際出願WO 2000 / 28312に記載されている。

【0234】

(i v)については、二次構造を様々な方法で測定することができる。例えば、方法が電気的測定を含む場合、滞留時間の変化、またはポアを通って、流れる電流の変化を利用して、二次構造が測定されることがある。これによって、一本鎖ポリヌクレオチド領域と二本鎖ポリヌクレオチド領域を区別することが可能になる。

【0235】

(v)については、任意の修飾の存在または不在を測定することができる。方法は、ポリヌクレオチドがメチル化によって、酸化によって、損傷によって、1つもしくは複数のタンパク質で、または1つもしくは複数の標識、タグもしくはスペーサーで修飾されているか否かを判定するステップを好ましくは含む。特異的修飾は、ポアとの特異的相互作用をもたらすことになり、下で説明する方法を用いてそのような特異的相互作用を測定することができる。例えば、メチルシトシンとシトシンとを、各ヌクレオチドとの相互作用中にポアを通って、流れる電流に基づいて区別してもよい。

10

【0236】

ポアが膜内に存在する膜／ポア系の調査に適しているいづれの装置を使用して方法を行ってもよい。膜貫通ポア検知に適しているいづれの装置を使用して方法を行ってもよい。例えば、装置は、水溶液を含むチャンバーと、該チャンバーを2区画に分ける遮断壁とを備えている。遮断壁は、ポアを含有する膜を形成する開口部を概して有する。あるいは、遮断壁は、ポアが存在する膜を形成する。

【0237】

20

国際出願番号PCT/GB08/000562(国際公開第2008/102120号パンフレット)に記載されている装置を使用して方法を行ってもよい。

【0238】

方法は、ポリヌクレオチドがポアに対して移動するときポアを通過する電流を測定するステップを含むことがある。したがって、装置は、電位を印加することができ、膜およびポアを横断する電気シグナルを測定することができる電気回路も含むことがある。方法をパッチクランプまたは電圧クランプを用いて行ってもよい。方法は、好ましくは電圧クランプの使用を含む。

【0239】

30

本発明の方法は、ポリヌクレオチドがポアに対して移動するときポアを通過する電流を測定するステップを含むことがある。膜貫通タンパク質ポアを通るイオン電流の測定に好適な条件は、当技術分野において公知であり、実施例において開示する。方法は、概して、電圧を膜およびポアを横断して印加して行われる。使用される電圧は、概して、+5V~-5V、例えば、+4V~-4V、+3V~-3V、または+2V~-2Vである。使用される電圧は、概して、-600mV~+600mVまたは-400mV~+400mVである。使用される電圧は、好ましくは、-400mV、-300mV、-200mV、-150mV、-100mV、-50mV、-20mVおよび0mVから選択される下限と+10mV、+20mV、+50mV、+100mV、+150mV、+200mV、+300mVおよび+400mVから独立して選択される上限とを有する範囲である。使用される電圧は、より好ましくは、100mV~240mVの範囲、最も好ましくは120mV~220mVの範囲である。増加した印加電位を使用することによって、ポアによる異なるヌクレオチド間の識別を増すことができる。

40

【0240】

方法は、金属塩、例えばアルカリ金属塩、ハロゲン化物塩、例えば塩化物塩、例えばアルカリ金属塩化物塩などの、任意の電荷担体の存在下で概して行われる。電荷担体としては、イオン性液体または有機塩、例えば塩化テトラメチルアンモニウム、塩化トリメチルフェニルアンモニウム、塩化フェニルトリメチルアンモニウムまたは塩化1-エチル-3-メチルイミダゾリウムを挙げることができる。上で論じた例示的装置において、塩は、チャンバー内の水溶液中に存在する。塩化カリウム(KCl)、塩化ナトリウム(NaCl)、塩化セシウム(CsCl)、またはフェロシアン化カリウムとフェリシアン化カリ

50

ウムの混合物が概して使用される。K C 1、N a C 1、およびフェロシアン化カリウムとフェリシアン化カリウムの混合物が好ましい。電荷担体は、膜に対して非対称であることがある。例えば、電荷担体のタイプおよび／または濃度は膜の両側で異なることがある。

【0241】

塩濃度は、飽和時のものでありうる。塩濃度は、3 M以下でありうるが、通常は0.1～2.5 M、0.3～1.9 M、0.5～1.8 M、0.7～1.7 M、0.9～1.6 M、または1 M～1.4 Mである。塩濃度は、好ましくは、150 mM～1 Mである。方法は、好ましくは、少なくとも0.3 M、例えば、少なくとも0.4 M、少なくとも0.5 M、少なくとも0.6 M、少なくとも0.8 M、少なくとも1.0 M、少なくとも1.5 M、少なくとも2.0 M、少なくとも2.5 M、または少なくとも3.0 Mの塩濃度を用いて行われる。高い塩濃度は、高いシグナル対ノイズ比をもたらし、ヌクレオチドの存在を示す電流を、正常電流変動のバックグラウンドと対照して同定することを可能にする。
10

【0242】

方法は、緩衝液の存在下で概して行われる。上で論じた例示的装置において、緩衝液は、チャンバー内の水溶液中に存在する。いずれの緩衝液を本発明の方法において使用してもよい。通常は、緩衝液はリン酸緩衝液である。他の好適な緩衝液は、H E P E S およびTri s - H C l 緩衝液である。方法は、4.0～12.0、4.5～10.0、5.0～9.0、5.5～8.8、6.0～8.7、または7.0～8.8、または7.5～8.5のp Hで概して行われる。使用されるp Hは、好ましくは約7.5である。
20

【0243】

方法は、0～100、15～95、16～90、17～85、18～80、19～70、または20～60で行われることがある。方法は、概して室温で行われる。方法は、場合により、酵素機能を支援する温度、例えば、約37で行われる。

【0244】

送達後、方法は、好ましくは、a) ポリヌクレオチドがポアを通って移動し、ポリヌクレオチド結合タンパク質がポアを通るポリヌクレオチドの移動を制御するように、ポリヌクレオチドをポアおよびポリヌクレオチド結合タンパク質と相互作用させるステップと、b) ポリヌクレオチドがポアに対して移動するときに、ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示す、ポアを通過する電流を測定し、それによってポリヌクレオチドを特性評価するステップとを含む。
30

【0245】

ポリヌクレオチド結合タンパク質は、ポリヌクレオチドと結合することができ、かつポアを通る、その移動を制御することができる、いずれのタンパク質であってもよい。当技術分野においてタンパク質がポリヌクレオチドと結合するか否かを判定することは容易である。タンパク質は、概して、ポリヌクレオチドと相互作用し、ポリヌクレオチドの少なくとも1つの特性を修飾する。タンパク質は、ポリヌクレオチドを切断して個々のヌクレオチドまたはより短いヌクレオチド鎖、例えばジもしくはトリヌクレオチドを形成することによって、ポリヌクレオチドを修飾することができる。その部分は、ポリヌクレオチドを配向させることによって、または特定の位置に移動させること、すなわち、その移動を制御することによって、ポリヌクレオチドを修飾することができる。
40

【0246】

ポリヌクレオチド結合タンパク質は、好ましくはポリヌクレオチドハンドリング酵素に由来する。ポリヌクレオチドハンドリング酵素は、ポリヌクレオチドと相互作用してポリヌクレオチドの少なくとも1つの特性を修飾することができるポリペプチドである。この酵素は、ポリヌクレオチドを切断して個々のヌクレオチドまたはより短いヌクレオチド鎖、例えばジもしくはトリヌクレオチドを形成することによって、ポリヌクレオチドを修飾することができる。この酵素は、ポリヌクレオチドを配向させることによって、または特定の位置に移動させることによって、ポリヌクレオチドを修飾することができる。ポリヌクレ
50

オチドハンドリング酵素は、ポリヌクレオチドに結合することができ、かつポアを通る、その移動を制御することができるのであれば、酵素活性を示す必要はない。例えば、酵素は、その酵素活性を除去するように修飾されることもあり、または酵素として作用することを妨げる条件下で使用されることもある。そのような条件は、下でより詳細に論じる。

【0247】

ポリヌクレオチドハンドリング酵素は、好ましくは核酸分解酵素に由来する。酵素の構築物に使用されるポリヌクレオチドハンドリング酵素は、より好ましくは、酵素分類 (E C) 群 3 . 1 . 1 1 、 3 . 1 . 1 3 、 3 . 1 . 1 4 、 3 . 1 . 1 5 、 3 . 1 . 1 6 、 3 . 1 . 2 1 、 3 . 1 . 2 2 、 3 . 1 . 2 5 、 3 . 1 . 2 6 、 3 . 1 . 2 7 、 3 . 1 . 3 0 および 3 . 1 . 3 1 のいずれかのメンバーに由来する。酵素は、国際出願番号 P C T / G B 10 10 / 0 0 0 1 3 3 (国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 6 6 0 3 号パンフレットとして公開された) に開示されているもののいずれかであってもよい。

【0248】

好ましい酵素は、ポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼ、ヘリカーゼ、トランスロカーゼ、およびトポイソメラーゼ、例えばジャイレースである。好適な酵素としては、大腸菌 (E. coli) からのエキソヌクレアーゼ I (配列番号 1 1)、大腸菌 (E. coli) からのエキソヌクレアーゼ I I I 酵素 (配列番号 1 3)、サーマス・サーモフィラス (T. thermophilus) からの R e c J (配列番号 1 5)、およびバクテリオファージ エキソヌクレアーゼ (配列番号 1 7)、T a t D エキソヌクレアーゼならびにこれらの変異体が挙げられるが、それらに限定されない。配列番号 1 5 で示される配列またはその変異体を含む 3 つのサブユニットは相互作用して三量体エキソヌクレアーゼを形成する。ポリメラーゼは、P y r o P h a g e (登録商標) 3 1 7 3 D N A ポリメラーゼ (L u c i g e n (登録商標) C o r p o r a t i o n から市販されている)、S D ポリメラーゼ (B i o r o n (登録商標) から市販されている)、またはそれらの変異体であることがある。酵素は、好ましくは P h i 2 9 D N A ポリメラーゼ (配列番号 9) またはその変異体である。トポイソメラーゼは、好ましくは、部分分類 (E C) 群 5 . 9 9 . 1 . 2 および 5 . 9 9 . 1 . 3 のいずれかのメンバーである。

【0249】

酵素は、最も好ましくはヘリカーゼに由来する。ヘリカーゼは、H e l 3 0 8 ヘリカーゼ、R e c D ヘリカーゼ、例えば T r a I ヘリカーゼもしくは T r w C ヘリカーゼ、X P D ヘリカーゼ、または D d a ヘリカーゼであってもよく、あるいはこれらのヘリカーゼに由来してもよい。ヘリカーゼは、H e l 3 0 8 M b u (配列番号 1 8)、H e l 3 0 8 C s y (配列番号 1 9)、H e l 3 0 8 T g a (配列番号 2 0)、H e l 3 0 8 M h u (配列番号 2 1)、T r a I E c o (配列番号 2 2)、X P D M b u (配列番号 2 3) もしくはその変異体であってよくまたはそれらに由来しうる。

【0250】

ヘリカーゼは、国際出願番号 P C T / G B 2 0 1 2 / 0 5 2 5 7 9 (国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 7 4 9 5 号パンフレットとして公開された)、P C T / G B 2 0 1 2 / 0 5 3 2 7 4 (国際公開第 2 0 1 3 / 0 9 8 5 6 2 号パンフレットとして公開された)、P C T / G B 2 0 1 2 / 0 5 3 2 7 3 (国際公開第 2 0 1 3 0 9 8 5 6 1 号パンフレットとして公開された)、P C T / G B 2 0 1 3 / 0 5 1 9 2 5 (国際公開第 2 0 1 4 / 0 1 3 2 6 0 号パンフレットとして公開された)、P C T / G B 2 0 1 3 / 0 5 1 9 2 4 (国際公開第 2 0 1 4 / 0 1 3 2 5 9 号パンフレットとして公開された)、P C T / G B 2 0 1 3 / 0 5 1 9 2 8 (国際公開第 2 0 1 4 / 0 1 3 2 6 2 号パンフレットとして公開された)、および P C T / G B 2 0 1 4 / 0 5 2 7 3 6 (国際公開第 2 0 1 5 / 0 5 5 9 8 1 号パンフレットとして公開された) に開示されている、ヘリカーゼ、修飾ヘリカーゼまたはヘリカーゼ構築物のいずれであってもよい。

【0251】

ヘリカーゼは、配列番号 2 5 (T r w c C b a) で示される配列もしくはその変異体、配列番号 1 8 (H e l 3 0 8 M b u) で示される配列もしくはその変異体、または配

10

20

30

40

50

列番号 2 4 (D d a) で示される配列もしくはその変異体を好ましくは含む。変異体は、膜貫通ポアについて下で論じる点のいずれかにおいてネイティブ配列と異なることがある。配列番号 2 4 の好ましい変異体は、(a) E 9 4 C および A 3 6 0 C、または(b) E 9 4 C、A 3 6 0 C、C 1 0 9 A および C 1 3 6 A、次いで場合により(M 1) G 1 (すなわち、M 1 の欠失および次いで付加 G 1) を含む。これは、M 1 G と呼ばれることもある。上で論じた変異体のいずれも、M 1 G をさらに含むことができる。

【 0 2 5 2 】

任意の数のヘリカーゼを本発明に従って使用してもよい。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 以上のヘリカーゼを使用してもよい。いくつかの実施形態において、異なる数のヘリカーゼを使用してもよい。

10

【 0 2 5 3 】

本発明の方法は、好ましくは、ポリヌクレオチドを 2 つ以上のヘリカーゼと接触させるステップを含む。その 2 つ以上のヘリカーゼは、概して同じヘリカーゼである。2 つ以上のヘリカーゼは、異なるヘリカーゼであってもよい。

【 0 2 5 4 】

2 つ以上のヘリカーゼは、上で言及したヘリカーゼの任意の組み合わせであってもよい。2 つ以上のヘリカーゼは、2 つ以上の D d a ヘリカーゼであってもよい。2 つ以上のヘリカーゼは、1 つまたは複数の D d a ヘリカーゼおよび 1 つまたは複数の T r w C ヘリカーゼであってもよい。2 つ以上のヘリカーゼは、同じヘリカーゼの異なる変異体であってもよい。

20

【 0 2 5 5 】

2 つ以上のヘリカーゼは、好ましくは、互いに付着されている。2 つ以上のヘリカーゼは、より好ましくは、互いに共有結合で付着されている。ヘリカーゼはいずれの順序で、およびいずれの方法を用いて付着させてもよい。本発明において使用するための好ましいヘリカーゼ構築物は、国際出願番号 P C T / G B 2 0 1 3 / 0 5 1 9 2 5 (国際公開第 2 0 1 4 / 0 1 3 2 6 0 号パンフレットとして公開された) 、 P C T / G B 2 0 1 3 / 0 5 1 9 2 4 (国際公開第 2 0 1 4 / 0 1 3 2 5 9 号パンフレットとして公開された) 、 P C T / G B 2 0 1 3 / 0 5 1 9 2 8 (国際公開第 2 0 1 4 / 0 1 3 2 6 2 号パンフレットとして公開された) および P C T / G B 2 0 1 4 / 0 5 2 7 3 6 に記載されている。

【 0 2 5 6 】

30

配列番号 9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 または 2 5 の変異体は、配列番号 9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 または 2 5 のものとは異なるアミノ酸配列を有する酵素であって、ポリヌクレオチド結合能力を保持する酵素である。この能力は、当技術分野において公知の任意の方法を用いて測定することができる。例えば、変異体をポリヌクレオチドと接触させることができ、ポリヌクレオチドと結合するおよびポリヌクレオチドに沿って移動するその能力を測定することができる。変異体は、ポリヌクレオチドの結合を助長するならびに / または高い塩濃度および / もしくは室温でその活性を助長する修飾を含むことがある。変異体は、ポリヌクレオチドに結合する (すなわち、ポリヌクレオチド結合能力を保持する) が、ヘリカーゼとして機能しない (すなわち、移動を助長するためのすべての必要成分、例えば A T P および M g ²⁺ が備わっているときにポリヌクレオチドに沿って移動しない) ように修飾されることがある。そのような修飾は、当技術分野において公知である。例えば、ヘリカーゼ中の M g ²⁺ 結合ドメインの修飾は、ヘリカーゼとして機能しない変異体を概してもたらす。これらのタイプの変異体は、分子ブレーキとして作用することができる (以下を参照されたい) 。

40

【 0 2 5 7 】

配列番号 9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 または 2 5 のアミノ酸配列の全長にわたって、変異体は、好ましくは、アミノ酸同一性に基づきその配列と少なくとも 5 0 % 相同であることになる。より好ましくは、変異体ポリペプチドは、アミノ酸同一性に基づき、配列全体にわたって配列番号 9、1 1、1 3、1 5

50

、17、18、19、20、21、22、23、24または25のアミノ酸配列と少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同であることがある。200以上、例えば230、250、270、280、300、400、500、600、700、800、900または1000以上の連続するアミノ酸のストレッチにわたって、少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%または95%のアミノ酸同一性（「確かな相同性（hard homology）」）があることがある。相同性は、上で記載したように判定される。変異体は、下の配列番号2および4に関しては、上で論じた点のいずれかにおいて野生型配列とは異なることがある。酵素は、ポアに共有結合で付着されることがある。任意の方法が、酵素をポアに共有結合で付着させるために使用されることがある。

【0258】

好ましい分子ブレーキは、TrwC Cba-Q594A（突然変異Q594Aを有する配列番号25）である。この変異体は、ヘリカーゼとして機能しない（すなわち、ポリヌクレオチドと結合するが、移動を助長するためのすべての必要成分、例えばATPおよびMg²⁺が備わっているときにポリヌクレオチドに沿って移動しない）。

【0259】

鎖シーケンシングにおいてポリヌクレオチドは、印加電位によってまたは逆らって、ポアを通って移行される。二本鎖ポリヌクレオチドにおいて漸進性または進行性に作用するエキソヌクレーゼは、残存する一本鎖を通すために印加電位下でポアのシス側で、または逆電位下でトランス側で使用することができる。同様に、二本鎖DNAを巻き戻すヘリカーゼも、同じように使用することができる。ポリメラーゼも使用することができる。印加電位に逆らった鎖移行を必要とするシーケンシング用途の可能性もあるが、DNAを逆電位または無電位下で酵素によって最初に「捕らえ」なければならない。結合後に次いで切り替えられた電位により、鎖はシスからトランスへポアを通過し、電流の流れによって延長された立体構造で保持されることになる。一本鎖DNAエキソヌクレーゼまたは一本鎖DNA依存性ポリメラーゼは、印加電位に逆らって、制御された段階的様式でトランスからシスにポアを通って移行されたばかりの一本鎖を引き戻すための分子モーターとして作用することができる。

【0260】

いずれかのヘリカーゼが該方法において使用されることもある。ヘリカーゼは、ポアに対して2つのモードで機能しうる。第一に、方法は好ましくは、印加電圧から生じた場によってポリヌクレオチドをポアを通って移動させるようにヘリカーゼを使用して行われる。このモードでは、ポリヌクレオチドの5'末端がポア中で最初に捕捉され、ヘリカーゼは、ポリヌクレオチドが最終的に膜のトランス側に移行するまで場によってポアを通過するように、ポリヌクレオチドをポア中に移動させる。あるいは、方法は好ましくは、印加電圧から生じた場に逆らってヘリカーゼがポリヌクレオチドをポアを通って移動させるように行われる。このモードではポリヌクレオチドの3'末端がポア中で最初に捕捉され、ヘリカーゼは、ポリヌクレオチドが最終的に膜のシス側に押し戻されるまで印加された場に逆らってポアから引き出されるように、ポリヌクレオチドをポアを通って移動させる。

【0261】

方法は、反対方向で行われることもある。ポリヌクレオチドの3'末端は、ポア中で最初に捕捉されてもよく、ヘリカーゼは、ポリヌクレオチドが最終的に膜のトランス側に移行するまで場によってポアを通過するように、ポリヌクレオチドをポア中に移動させてもよい。

【0262】

ヘリカーゼに助長するための必要成分が備わっていない場合、またはヘリカーゼが、移動を妨害もしくは防止するように修飾されている場合、ヘリカーゼはポリヌクレオチドと結合し、印加された場によってポリヌクレオチドがポア中に引き入れられるときにポリヌクレオチドの移動を遅速させるブレーキとして作用することができる。不活性モードでは

10

20

30

40

50

、ポリヌクレオチドが3'または5'下流のいずれで捕捉されるかは問題にならず、ブレーキとして作用する酵素によってポリヌクレオチドをトランス側へポアに引き入れる印加された場が問題になる。不活性モードの場合、ヘリカーゼによるポリヌクレオチドの移動制御は、漸減、スライドおよび制動をはじめとするいくつかの方法で説明することができる。ヘリカーゼ活性を欠くヘリカーゼ変異体も、このようにして使用することができる。

【0263】

ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド結合タンパク質およびポアとはいずれの順序でも接触することができる。ポリヌクレオチドをヘリカーゼなどのポリヌクレオチド結合タンパク質、およびポアと接触させると、ポリヌクレオチドは、先ずタンパク質と複合体を形成することが好ましい。電圧がポアを横断して印加される場合、ポリヌクレオチド/タンパク質複合体は、次いで、ポアと複合体を形成し、ポアを通るポリヌクレオチドの移動を制御する。

【0264】

ポリヌクレオチド結合タンパク質を使用する方法におけるいずれのステップも、遊離ヌクレオチドまたは遊離ヌクレオチド類似体と、ポリヌクレオチド結合タンパク質の作用を助長する酵素補因子との存在下で、概して行われる。遊離ヌクレオチドは、上で論じた個々のヌクレオチドのいずれか1つまたは複数であってもよい。遊離ヌクレオチドとしては、アデノシン一リン酸(AMP)、アデノシン二リン酸(ADP)、アデノシン三リン酸(ATP)、グアノシン一リン酸(GMP)、グアノシン二リン酸(GDP)、グアノシン三リン酸(GTP)、チミジン一リン酸(TMP)、チミジン二リン酸(TDP)、チミジン三リン酸(TTP)、ウリジン一リン酸(UMP)、ウリジン二リン酸(UDP)、ウリジン三リン酸(UTP)、シチジン一リン酸(CMP)、シチジン二リン酸(CDP)、シチジン三リン酸(CTP)、環状アデノシン一リン酸(cAMP)、環状グアノシン一リン酸(cGMP)、デオキシアデノシン一リン酸(dAMP)、デオキシアデノシン二リン酸(dADP)、デオキシアデノシン三リン酸(dATP)、デオキシグアノシン一リン酸(dGMP)、デオキシグアノシン二リン酸(dGDP)、デオキシグアノシン三リン酸(dGTP)、デオキシチミジン一リン酸(dTMP)、デオキシチミジン二リン酸(dTDP)、デオキシチミジン三リン酸(dTTP)、デオキシリジン一リン酸(dUMP)、デオキシリジン二リン酸(dUDP)、デオキシリジン三リン酸(dUTP)、デオキシチジン一リン酸(dCMP)、デオキシチジン二リン酸(dCDP)およびデオキシチジン三リン酸(dCTP)が挙げられるが、これらに限定されない。遊離ヌクレオチドは、好ましくは、AMP、TMP、GMP、CMP、UMP、dAMP、dTTP、dGMPまたはdCMPから選択される。遊離ヌクレオチドは、好ましくはアデノシン三リン酸(ATP)である。酵素補因子は、構築物を機能させる因子である。酵素補因子は、好ましくは二価金属カチオンである。二価金属カチオンは、好ましくは、Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺またはCo²⁺である。酵素補因子は、最も好ましくはMg²⁺である。

【0265】

ヘリカーゼおよび分子ブレーキ

好ましい実施形態において、方法は、

(a) ポリヌクレオチド分析物に1つまたは複数のヘリカーゼおよび1つまたは複数の分子ブレーキを付着させた、微粒子に付着しているポリヌクレオチド分析物を用意するステップと、

(b) 微粒子を膜へ送達し、それによってポリヌクレオチドを膜貫通ポアに送達するステップと、

(c) 1つまたは複数のヘリカーゼと1つまたは複数の分子ブレーキを一緒にし、両方がポアを通るポリヌクレオチドの移動を制御するように、ポアを横断して電位を印加するステップと、

(d) ポリヌクレオチドがポアに対して移動するとき、ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を取り、それによってポリヌクレオチドを特性

10

20

30

30

40

50

評価するステップと
を含む。

【0266】

このタイプの方法は、国際出願第PCT/GB2014/052737号明細書に詳細に論じられている。

【0267】

1つまたは複数のヘリカーゼは、上で論じたもののいずれであってもよい。1つまたは複数の分子ブレーキは、ポリヌクレオチドと結合してそのポリヌクレオチドのポアを通る、移動を遅速させるいずれの化合物または分子であってもよい。1つまたは複数の分子ブレーキは、ポリヌクレオチドと結合する1つまたは複数の化合物を好ましくは含む。1つまたは複数の化合物は、好ましくは、1つまたは複数の大環状分子である。好適な大環状分子としては、シクロデキストリン、カリックスアレーン、環状ペプチド、クラウンエーテル、ククルビツリル、ピラーアレーン、これらの誘導体またはそれら組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない。シクロデキストリンまたはその誘導体は、Eliseev, A. V., and Schneider, H-J. (1994) J. Am. Chem. Soc. 116, 6081-6088に開示されているもののいずれであってもよい。この作用物質は、より好ましくは、ヘプタキス-6-アミノ- -シクロデキストリン(a m_1 - CD)、6-モノデオキシ-6-モノアミノ- -シクロデキストリン(a m_1 - CD)またはヘプタキス-(6-デオキシ-6-グアニジノ)-シクロデキストリン(g u_1 - CD)である。

【0268】

ポリヌクレオチド分析物中のスペーサー

1つまたは複数のヘリカーゼは、国際出願第PCT/GB2014/050175号明細書において論じられているように、1つまたは複数のスペーサーで停止させてよい。国際出願に開示されている1つまたは複数のヘリカーゼおよび1つまたは複数のスペーサーのいずれの配置を本発明において使用してもよい。

【0269】

二本鎖ポリヌクレオチド

ポリヌクレオチド分析物が二本鎖である場合、方法は、好ましくは、ポリヌクレオチドの一方の末端にヘアピングアダプターを有するポリヌクレオチドを用意するステップと、ポリヌクレオチドの二本鎖を分離して一本鎖ポリヌクレオチド構築物を形成するステップとをさらに含む。次いで、一本鎖ポリヌクレオチド構築物を本発明に従って、ポアと接触させてよい。このようにして二本鎖構築物上の両方の鎖を連結し、調べることにより、特性評価の効率および精度が増す。

【0270】

好適なヘアピングアダプターは当技術分野において公知の方法を用いて設計することができる。ヘアピングループは、いずれの長さであってもよい。ヘアピングループは、概して110ヌクレオチド以下、例えば、100ヌクレオチド以下、90ヌクレオチド以下、80ヌクレオチド以下、70ヌクレオチド以下、60ヌクレオチド以下、50ヌクレオチド以下、40ヌクレオチド以下、30ヌクレオチド以下、20ヌクレオチド以下、または10ヌクレオチド以下の長さである。ヘアピングループは、好ましくは、約1~110、2~100、5~80、または6~50ヌクレオチドの長さである。ループがアダプターの差次の選択性に関与する場合、50~110ヌクレオチドなどの、より長いヘアピングループ長が好ましい。同様に、ループが、下で論じるような選択可能結合に関与しない場合、1~5ヌクレオチドなどの、より短いヘアピングループ長が好ましい。

【0271】

ヘアピングアダプターは、ポリヌクレオチドのいずれかの末端、すなわち、5'または3'末端に提供されることがある。ヘアピングアダプターは、当技術分野において公知の任意の方法を用いてポリヌクレオチドにライゲートされることがある。ヘアピングアダプターは、T4 DNAリガーゼ、大腸菌(E. coli)DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼ、Tma DNAリガーゼおよび9°N DNAリガーゼなどのリガーゼを使用してライ

ゲートされることがある。

【0272】

当技術分野において公知のいずれの方法を用いてポリヌクレオチドの2本の鎖を分離してもよい。例えば、ポリヌクレオチド結合タンパク質によって、または脱ハイブリダイゼーションに有利に働く条件を用いて、それらの鎖を分離してもよい(脱ハイブリダイゼーションに有利に働く条件の例としては、高温、高pH、ならびに水素結合または塩基対合を破壊することができる作用物質、例えばホルムアミドおよび尿素の添加が挙げられるが、これらに限定されない)。

【0273】

ヘアピンアダプターは、選択可能結合部分を好ましくは含む。これによって、ポリヌクレオチドを精製または単離することが可能になる。選択可能結合部分は、その結合特性に基づいて選択することができる部分である。したがって、選択可能結合部分は、好ましくは、表面と特異的に結合する部分である。選択可能結合部分は、本発明において使用される任意の他の部分よりはるかに大きい程度に表面と結合する場合、その表面に特異的に結合する。好ましい実施形態において、部分は、本発明で使用される他の部分が結合しない表面と結合する。

10

【0274】

好適な選択的結合部分は、当技術分野において公知である。好ましい選択的結合部分としては、ビオチン、ポリヌクレオチド配列、抗体、抗体断片、例えばFabおよびScSv、抗原、ポリヌクレオチド結合タンパク質、ポリヒスチジンテールおよびGSTタグが挙げられるが、これらに限定されない。最も好ましい選択的結合部分は、ビオチンおよび選択可能ポリヌクレオチド配列である。ビオチンは、アビジンで被覆された表面と特異的に結合する。選択可能ポリヌクレオチド配列は、相同配列で被覆された表面と特異的に結合(すなわちハイブリダイズ)する。あるいは、選択可能ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド結合タンパク質で被覆された表面と特異的に結合する。

20

【0275】

ヘアピンアダプターおよび/または選択可能結合部分は、切る、切れ目を入れる、切断するまたは加水分解することができる領域を含みうる。そのような領域は、ポリヌクレオチドを該ポリヌクレオチドが結合している表面から精製または単離後に除去することを可能にするように設計することができる。好適な領域は、当技術分野において公知である。好適な領域としては、RNA領域、デスチオビオチンおよびストレプトアビジンを含む領域、ジスルフィド結合ならびに光切断性領域が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0276】

リーダー配列

ポリヌクレオチド分析物に、ポアを優先的に通り抜けるリーダー配列を備えさせてもよい。リーダー配列は、本発明の方法を助長する。リーダー配列は、膜貫通ポアを優先的に通り抜けるように、およびそれによってポリヌクレオチド分析物のポアを通る、移動を助長するように設計される。リーダー配列を使用して、ポリヌクレオチドを上で論じたような1つまたは複数のアンカーに連結させることもできる。

【0277】

40

リーダー配列は、重合体を概して含む。重合体は、好ましくは負電荷を有する。重合体は、好ましくは、ポリヌクレオチド、例えばDNAもしくはRNA、修飾ポリヌクレオチド(例えば脱塩基DNA)、PNA、LNA、ポリエチレングリコール(PEG)またはポリペプチドである。リーダーは、好ましくはポリヌクレオチドを含み、より好ましくは一本鎖ポリヌクレオチドを含む。リーダー配列は、上で論じたポリヌクレオチドのいずれかを含むことができる。一本鎖リーダー配列は、最も好ましくは、DNAの1本の鎖、例えば、ポリdTセクションを含む。リーダー配列は、好ましくは1つまたは複数のスペーサーを含む。

【0278】

リーダー配列は、任意の長さでありうるが、概して10~150ヌクレオチドの長さ、

50

例えば20～150ヌクレオチドの長さである。リーダーの長さは、方法に使用される膜貫通ポアに概して依存する。

【0279】

二重カップリング

本発明の方法は、二本鎖ポリヌクレオチドの二重カップリングを含むことがある。方法は、好ましくは、

(a) ポリヌクレオチドが、一方の末端にYアダプターおよび他方の末端にヘアピンループアダプターを有し、Yアダプターが、ポリヌクレオチドを膜とカップリングするための1つまたは複数の第一のアンカーを含み、ヘアピンループアダプターがポリヌクレオチドを膜とカップリングするための1つまたは複数の第二のアンカーを含み、ならびにヘアピンループアダプターの膜とのカップリング強度が、Yアダプターの膜とのカップリング強度より大きい、微粒子に付着している二本鎖ポリヌクレオチドを用意するステップと、

(b) 微粒子を膜へ送達し、それによってポリヌクレオチドを膜貫通ポアに送達するステップと、

(c) ポリヌクレオチドの少なくとも一方の鎖がポアを通って移動するように、ポリヌクレオチドをポアと相互作用させるステップと、

(d) ポリヌクレオチドの少なくとも一方の鎖がポアに対して移動するときに、ポリヌクレオチドの少なくとも一方の鎖の1つまたは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を取り、それによってポリヌクレオチドを特性評価するステップと
を含む。好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドの両方の鎖がポアを通って移動する。

【0280】

このタイプの方法は、国際出願番号PCT/GB2015/050991において詳細に論じられている。

【0281】

二本鎖ポリヌクレオチドは、一方の末端にYアダプターおよび他方の末端にヘアピンループアダプターが備わっている。Yアダプターおよび/またはヘアピンアダプターは、概してポリヌクレオチドアダプターである。それらのアダプターを上で論じたポリヌクレオチドのいずれから形成してもよい。

【0282】

Yアダプターは、概して、(a)二本鎖領域および他方の末端に(b)一本鎖領域または相補的でない領域を含む。Yアダプターは、一本鎖領域を含む場合、オーバーハングを有すると記述されることがある。Yアダプター内の非相補領域の存在はこのアダプターをY形にする。2つの鎖が、通常、二本鎖部分とは異なり互いにハイブリダイズしないからである。Yアダプターは、1つまたは複数の第一のアンカーを含む。アンカーは、上でより詳細に論じている。

【0283】

Yアダプターは、ポアを優先的に通り抜けるリーダー配列を好ましくは含む。リーダー配列は、上で論じている。

【0284】

ヘアピンアダプターは、上で論じたような選択可能結合部分を好ましくは含む。ヘアピンアダプターおよび/または選択可能結合部分は、上で論じたような、切る、切り目を入れる、切断するまたは加水分解することができる領域を含むことがある。

【0285】

当技術分野において公知のいずれの方法を用いてYアダプターおよび/またはヘアピンアダプターをポリヌクレオチドにライゲートしてもよい。リガーゼ、例えば、T4 DN Aリガーゼ、大腸菌(E. coli)DN Aリガーゼ、Taq DN Aリガーゼ、Tma DN Aリガーゼおよび9°N DN Aリガーゼを使用して、アダプターの一方または両方をライゲートしてもよい。あるいは、アダプターは、下で論じる本発明の方法を用いてポリヌクレオチドに付加することができる。

10

20

30

40

50

【0286】

好ましい実施形態において、方法は、二本鎖ポリヌクレオチドが一方の末端にYアダプターおよび他方の末端にヘアピンループアダプターを含むように、二本鎖ポリヌクレオチドを修飾するステップを含む。いずれの様式の修飾も使用することができる。方法は、好ましくは、本発明に従って二本鎖ポリヌクレオチドを修飾するステップを含む。このことは、下でより詳細に論じる。修飾および特性評価の方法は、任意の方法で組み合わせることができる。

【0287】

ヘアピンアダプターの膜とのカップリング（または結合）強度は、Yアダプターの膜とのカップリング（または結合）強度より大きい。この強度は任意の方法で測定することができる。カップリング（または結合）強度を測定する好適な方法は、英國出願第1406147.7号および140781.8号の実施例に開示されている。

10

【0288】

ヘアピンループアダプターのカップリング（または結合）強度は、好ましくは、ヘアピンループアダプターのカップリング（または結合）強度の少なくとも1.5倍、例えば、アンカーアダプターのカップリング（または結合）強度の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5、または少なくとも10倍である。膜に対するヘアピンループアダプターの親和定数（Kd）は、好ましくは、Yアダプターの親和定数の少なくとも1.5倍、例えば、Yアダプターのカップリング強度の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5、または少なくとも10倍である。

20

【0289】

ヘアピンループアダプターがYアダプターより強く膜とカップリング（または結合）する方法はいくつかある。例えば、ヘアピンループアダプターは、Yアダプターより多くのアンカーを含むことがある。例えば、ヘアピンループアダプターは、2個、3個以上の第二のアンカーを含むことがあり、これに対してYアダプターは、1個の第一のアンカーを含むことがある。

【0290】

1つまたは複数の第二のアンカーの膜とのカップリング（または結合）強度は、1つまたは複数の第一のアンカーの膜とのカップリング（または結合）強度より大きいことがある。1つまたは複数の第二のアンカーのヘアピンループアダプターとのカップリング（または結合）強度は、1つまたは複数の第一のアンカーのYアダプターとのカップリング（または結合）強度より大きいことがある。1つまたは複数の第一のアンカーおよび1つまたは複数の第二のアンカーは、それらのそれぞれのアダプターにハイブリダイゼーションによって付着されることがあり、このハイブリダイゼーション強度は、1つまたは複数の第一のアンカーにおけるより1つまたは複数の第二のアンカーにおけるほうが大きい。これらの実施形態のいずれの組み合わせを本発明において使用してもよい。当技術分野における公知の技法を用いてカップリング（または結合）強度を測定してもよい。

30

【0291】

1つまたは複数の第二のアンカーは、膜とカップリング（または結合）する1つまたは複数の第一のアンカー中の1つまたは複数の基より大きい強度で膜とカップリング（または結合）する1つまたは複数の基を好ましくは含む。好ましい実施形態において、ヘアピンループアダプター／1つまたは複数の第二のアンカーは、コレステロールを使用して膜とカップリング（または結合）し、Yアダプター／1つまたは複数の第一のアンカーは、パルミチン酸エステルを使用して膜とカップリング（または結合）する。コレステロールは、パルミチン酸エステルより強くトリプロック共重合体膜および脂質膜と結合する。代替実施形態において、ヘアピンループアダプター／1つまたは複数の第二のアンカーは、パルミチン酸エステルなどのモノアシル種を使用して膜とカップリング（または結合）し、Yアダプター／1つまたは複数の第一のアンカーは、ジパルミトイロホスファチジルコレインなどのジアシル種を使用して膜とカップリング（または結合）する。

40

【0292】

50

ヘアピンループおよびリーダー配列の付加

二本鎖ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドを MuA トランスポーザーおよび二本鎖 MuA 基質の集団と接触させることによって、Y アダプターおよびヘアピンアダプターを備えさせてもよく、集団中の基質の比率はリーダー配列を含む Y アダプターであり、集団中の基質の比率はヘアピンループアダプターである。トランスポーザーは、二本鎖ポリヌクレオチド分析物を断片化し、MuA 基質をそれらの断片の一方または両方の末端にライゲートする。これは、リーダー配列を一方の末端に含み、ヘアピンループを他方に含む、複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを生成する。次いで、本発明の方法を用いてそれらの修飾二本鎖ポリヌクレオチドを調査してもよい。

【0293】

10

これらの MuA ベースの方法は、(国際公開第 2015/022544 号パンフレット)として公開された PCT 出願番号 PCT/GB2014/052505 に開示されている。それらは、PCT 出願番号 PCT/GB2015/050991 においても詳細に論じられている。

【0294】

修飾ポリヌクレオチド分析物

本発明に従って送達および特性評価する前に、ポリメラーゼが、ポリヌクレオチド分析物をテンプレートとして使用して修飾ポリヌクレオチド分析物を形成する条件下で、ポリヌクレオチド分析物は、ポリヌクレオチド分析物をポリメラーゼおよび遊離ヌクレオチドの集団と接触させることによって修飾されることがあり、ポリメラーゼは、修飾ポリヌクレオチド分析物を形成するときに、ポリヌクレオチド分析物中のヌクレオチド種の 1 つまたは複数を異なるヌクレオチド種と置き換える。次いで、修飾ポリヌクレオチド分析物は、微粒子に付着され、膜へ送達されてもよい。このタイプの修飾は、国際出願番号 PCT/GB2015/050483 に記載されている。上で論じたポリメラーゼのいずれかを使用してもよい。ポリメラーゼは、好ましくは、クレノウまたは 9°North である。

20

【0295】

他の特性評価方法

別の実施形態において、膜貫通ポアに送達後、ポリヌクレオチド分析物は、ポリメラーゼがヌクレオチドをポリヌクレオチドに組み込むときに放出される標識種を検出することによって特性評価される。ポリメラーゼは、ポリヌクレオチド分析物をテンプレートとして使用する。各標識種は、各ヌクレオチドに対して特異的である。ポリヌクレオチド分析物は、膜貫通ポアに送達され、次いで、ヌクレオチドがポリメラーゼによってポリヌクレオチドに付加されるときにリン酸標識種が連続的に放出されるように、ポリメラーゼおよび標識されたヌクレオチドと接触させる。リン酸種は、各ヌクレオチドに特異的な標識を含有する。ポリメラーゼは、上で論じたもののいずれであってもよい。リン酸標識種はポアを使用し、それによってポリヌクレオチド分析物を特性評価する。このタイプの方法は、欧州出願番号 13187149.3 (欧州特許出願公開第 EP 2682460 号明細書として公開された) に開示されている。上で論じた実施形態のいずれも、この方法に同等に当たる。

30

【0296】

40

キット

本発明は、分析物を膜中の膜貫通ポアに送達するためのキットであって、(a) 微粒子と、(b) 分析物を膜とカップリングすることができる 1 つまたは複数のアンカーとを含むキットも提供する。微粒子および 1 つまたは複数のアンカーは、本発明の方法に関して上で論じたもののいずれであってもよい。キットがポリヌクレオチドをポアに送達するためのものである場合、微粒子は、好ましくは、ポリヌクレオチドを抽出および/または精製するためのキットの一部である。

【0297】

キットは、好ましくは、膜貫通ポアを優先的に通り抜けることができるヘアピンループおよび/またはリーダー配列をさらに含む。キットは Y アダプターを含むことがある

50

。キットは、好ましくは、ポリヌクレオチド結合タンパク質をさらに含む。好ましいヘアピンループ、リーダー配列、Yアダプターおよびポリヌクレオチド結合タンパク質は、上で論じている。

【0298】

発明の方法に関して上で論じた実施形態のいずれも、キットに同等に当てはまる。キットは、膜の成分、例えば、両親媒性層またはトリプロック共重合体膜の成分をさらに含むことがある。キットは、膜貫通タンパク質ポアをさらに含むことがある。

【0299】

本発明のキットは、上述の実施形態のいずれかを実施できるようにする1つまたは複数の他の試薬または器具をさらに含むことがある。キットは、磁石または電磁石を含むことがある。そのような試薬または器具としては、次のものの1つまたは複数が挙げられる：好適な緩衝液（水溶液）、対象から試料を得るための手段（例えば、容器、もしくは針を備えている器具）、ポリヌクレオチドを増幅および／もしくは発現させるための手段、上で定義した通りの膜、または電圧もしくはパッチクランプ装置。試薬は、流体試料が該試薬を再懸濁するように、乾燥状態でキット内に存在することがある。キットは、場合により、キットを本発明の方法で使用できるようにする説明書、またはその方法をどの生物に使用してもよいのかに関する詳説も含むことがある。

10

【0300】

以下の実施例は、本発明を例証するものである。

実施例

20

【実施例1】

【0301】

この例は、DNAと結合されたヘリカーゼを his - tag isolation and pulldown Dynabeads（登録商標）（Life Technologies）に付着させ、次いでビーズをナノポア系に添加して、ヘリカーゼによって制御されるDNAの移動を検出するための試料調製手順を説明するものである。図1は、DNAをどのようにビーズに付着させたかの略画表現を示す。DNAは、アンカーを付着させたDNA鎖にもハイブリダイズした（アンカーを有する1個のDNAをYアダプターにハイブリダイズし、アンカーを有する第二のDNAをヘアピンアダプターにハイブリダイズした（図1を参照されたい））。これは、DNAを膜中のナノポアに送達するのを支援した。DNAをナノポアに送達するためにビーズを使用した実験は、同じ濃度のDNAをナノポア系に添加した対照と比較して、濃度の増大をもたらすことが観察された。

30

【0302】

材料および方法

1.1 His - tag Isolation and Pulldown Dynabeads（登録商標）の洗浄処理

溶液全体にわたってDynabeads（登録商標）を十分に再懸濁させるために、his - tag Isolation and pulldown Dynabeads（登録商標）を含有するストック試料をボルテックスした。ビーズ溶液試料（10 μL）をストック溶液から除去し、Eppendorf Protein Low - Bindチューブ（1.5 mL）に添加した。チューブを磁気ラックに入れ、ビーズのすべてが磁石にくついたら上清を除去した。緩衝液を磁性ビーズ試料（500 μLの500 mM KCl、pH 8.0、25 mM リン酸カリウム緩衝液）に添加し、ボルテックスすることによりビーズを再懸濁させた。次いで、チューブを磁気ラックに置き、ビーズが磁石にくついたら上清を除去した。緩衝液洗浄および上清除去ステップをさらに2回繰り返し、その結果、ビーズは緩衝液（500 mM KCl、pH 8.0、25 mM リン酸カリウム緩衝液）を使用して合計3回洗浄した。次いで、ビーズを（10 μLの500 mM KCl、pH 8.0、および25 mM リン酸カリウム緩衝液）に再懸濁させた。これを、別名、洗浄ビーズストック溶液とした。溶液全体にわたってDynabeads（登録商標）を十分に再懸濁させるために、使用前にビーズストック溶液をボルテックスした。

40

50

【0303】

1.2 Dynabeads (登録商標)へのDNA (ヘリカーゼが事前結合している)の付着

DNAライブラリー (断片化し、次いでYアダプター (ヘリカーゼがリーダーに付着した) およびヘアピンアダプター (異なるh i s タグ付けヘリカーゼがヘアピンに付着した) に付着させ、最後に、アンカーが付着したDNAの二本鎖にハイブリダイズした二本鎖ラムダDNAを含有する (図1を参照されたい)) を洗浄Dynabeads (登録商標) に添加し (下の表5を参照されたい) 、試料を室温で少なくとも1時間インキュベートした。この試料を、別名DNA / ビーズ試料2とした。

【0304】

【表2】

試薬	体積	最終濃度
DNA ライブラリー	0.12 μ l	1 nM
ステップ1.1で生成された洗浄 His 結合	0.4 μ l	
Dynabeads(登録商標)		
合計	0.52 μ l	

10

20

表5

【0305】

1.3 電気生理学

実験を始める前に、DNA / ビーズ試料2 (0.52 μ L) を緩衝液 (145.5 μ L、25 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0、500 mM KCl) および燃料ミックス (4 μ L のMgCl₂ (75 mM) およびATP (75 mM)) に添加した。

【0306】

緩衝液 (25 mM リン酸カリウム緩衝液、150 mM フェロシアン化カリウム (II) 、および150 mM フェリシアン化カリウム (III) 、pH 8.0) 中のプロック共重合体に挿入された単一MspA ナノポアから電気的測定値を得た。プロック共重合体に挿入された単一ポアを得た後に、次いで緩衝液 (2 mL、25 mM リン酸カリウム緩衝液、150 mM フェロシアン化カリウム (II) 、150 mM フェリシアン化カリウム (III) 、pH 8.0) をその系に流して一切の過剰MspA ナノポアを除去した。

30

【0307】

過剰な緩衝液 (500 mM KCl、25 mM リン酸カリウム、pH 8.0) を、試料を添加する前にナノポア系に流した。DNA / ビーズ試料2 および燃料プレミックス (合計155 μ L) を、次いでその單一ナノポア実験系に流した。実験を -120 mV で実行し、ヘリカーゼによって制御されるDNAの移動をモニターした。

40

【0308】

上で記載したように、同じ濃度のDNAライブラリー (Dynabeads (登録商標) と結合されていない) をナノポア系に添加し、ヘリカーゼによって制御されるDNAの移動をモニターした類似の対照実験も行った。

【0309】

結果

対照反応 (DNAがビーズと結合されなかった) およびDNA / ビーズ試料2の両方について、ヘリカーゼによって制御されるDNAの移動が観察された。図2は、7つの異なるナノポア実験を示す (1 ~ 3はビーズなしの対照反応であり、4 ~ 7はDNA / ビーズ試料2であった)。対照実験が2つのアンカーを有するDNAを使用した一方、ビーズ実

50

験は、ナノポアへのDNAの送達を助けるためにビーズおよび2つのアンカーの両方を使用した。図2に示されているスループット値は、試験した泳動（泳動4）で観察された最大スループットと比べて正規化した。ビーズと結合されなかったDNAライブラリーは、3つの実験すべてにおいて約15の正規化スループット値を観察した。一方、DNA／ビーズ試料2は、約90の正規化スループット値をもたらした。したがって、DNAライブラリーをDynabeads（登録商標）とプレインキュベートした場合、正規化スループットの大幅な増加が観察された。これは、Dynabeads（登録商標）がナノポア系へのDNAの直接送達を支援し、対照と比較して濃度の増大をもたらすことを意味した。

【実施例2】

10

【0310】

この例は、MspAナノポアが存在する膜にDynabeads（登録商標）がDNAを直接送達することをどのように観察したかを示すナノポアチップアレイの画像の撮影の仕方を説明するものである。系を経時的に撮影した画像は、ビーズがナノポアが挿入された膜表面に集中することが観察されたことを示した。

【0311】

材料および方法

2.1 DNAが付着したDynabeads（登録商標）の調製

Dynabeads（登録商標）を実施例1.1に記載されているように洗浄し、DNAを実施例1.2に記載されているようにビーズに付着させた。

20

【0312】

2.2 チップの撮像

対物レンズが20×の顕微鏡を使用して、ナノポアチップ系の一連の明視野画像を捕捉した。

【0313】

結果

図3および4は、ナノポアチップ系を撮影した2つの明視野画像を示す。図3は、DNA／ビーズ試料を添加した直後のチップを示す。ナノポア挿入用の膜が位置するチップウェルの上にわずかな小さな黒いビーズが見えた（ビーズのいくつかが図では黒い矢印で強調されている）。図4は、DNA／ビーズ試料を添加した20分後のナノポアチップ系の同じ領域を示す。ビーズの大きなクラスターが、ナノポア挿入用の膜が位置するチップウェルの上で観察された（これらのビーズクラスターのいくつかが、図ではクラスターの周りの白い破線の円によって強調されている）。図8Aは、ビーズがどのように膜に集中したかの略画表現を示す。したがって、ビーズがDNA試料をナノポア付近に送達しながら各膜の中心に局在していることは、チップを撮影した画像から明らかであった。

30

【実施例3】

【0314】

この例は、ナノポアチップアレイ実験で形成された膜の安定性にどう影響を及ぼすかを見るために、異なるタイプのビーズをどのように試験したかを説明するものである。試験したビーズはいずれも膜に著しい損傷をもたらさなかった。したがって、これらのビーズは、ナノポア系へのDNAの送達の増大に使用されうる。

40

【0315】

材料および方法

2.1 様々な表面被覆によるDynabeads（登録商標）の調製

次の官能化（1-シラン、2-ストレプトアビシン、3-短いビオチン化DNA鎖と結合したストレプトアビシン、4-コバルトベースのHis-tag Isolation and pull down）を有するDynabeads（登録商標）を試験して、それらが膜にどんな影響を与えたかを判定した。Dynabeads（登録商標）は異なる保存液中に提供された。ストックバイアルを10秒間ボルテックスし、次いで保存液中のビーズ試料（30 μL）をエッペンドルフに添加した。エッペンドルフを磁石の隣りに

50

置き、次いで上清を除去ことによってビーズを保存液から分離した。緩衝液 (500 μL、25 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0、500 mM KCl) を次いでチューブに添加し、試料を 10 秒間ポルテックスした。次いで、緩衝液およびビーズを分離し、洗浄緩衝液を捨てた。次いで、ビーズを緩衝液 (30 μL、25 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0、500 mM KCl) に再懸濁させ、次いでビーズを希釈した (4 μL ストックビーズを、ランダム配列DNAの短い鎖も含有する 150 μL の緩衝液 (25 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0、500 mM KCl) に)。

【0316】

2.2 膜の安定性を判定するための電気的試験

ブロック共重合体が膜を形成するいくつかのウェル、および緩衝液 (25 mM リン酸カリウム緩衝液、150 mM フェロシアン化カリウム (II)、および 150 mM フェリシアン化カリウム (III)、pH 8.0) 中の膜に挿入された個々の MspA ナノポアを有するアレイチップで、電気的測定値を得た。ブロック共重合体に単一ポアを得た後、次いで緩衝液 (3 mL、25 mM リン酸カリウム緩衝液、150 mM フェロシアン化カリウム (II)、150 mM フェリシアン化カリウム (III)、pH 8.0) をその系に流して一切の過剰 MspA ナノポアを除去した。ビーズ溶液の添加前に、緩衝液 (3 mL、25 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0、500 mM KCl) を系に流し、次いで 180 mV の電位を印加し、系 (ビーズの添加前の) をモニターした。次いで、緩衝液 (ランダム配列DNAの短い鎖と混合した) 中の種々の Dynabeads (登録商標) 試料を、単一ナノポア実験チップ系に流し、180 mV の電位を印加した。鎖がナノポアを通って移行しながら特徴的な電流シグナルを生成したときに、単一 MspA ナノポアの同定を支援するために、ランダムDNA配列の短い鎖を添加した。

【0317】

結果

飽和し使用することができない個々のチャネル数を、ビーズを添加する前後にカウントした。図 5 の点 X は、Dynabeads (登録商標) を種々の Dynabead 官能化 (1* = シラン、2* = ストレプトアビジンおよび 3* = 短いビオチン化DNA鎖と結合したストレプトアビジン) のために添加する前の飽和チャネル数を示す。図 5 の点 Y は、種々の Dynabeads (登録商標) (1 = シラン、2 = ストレプトアビジンおよび 3 = 短いビオチン化DNA鎖と結合したストレプトアビジン) を添加した後の飽和チャネル数を示す。飽和チャネル数の比較的わずかな増加が、ストレプトアビジン官能化ビーズおよびビオチン化DNAの短い鎖と結合したストレプトアビジン官能化ビーズについて観察された。しかし、ビーズをシランで被覆した場合、飽和チャネル数のやや大きな増加が観察された。

【0318】

図 6 は、もはや活性でなかった単一チャネル MspA ナノポアのパーセンテージ、およびビーズ (1 - シラン、2 - ストレプトアビジン、3 - 短いビオチン化DNA鎖を有するストレプトアビジン、4 - コバルトベースの his-tag isolation and pull down) をナノポア系に添加したときに飽和したチャネルのパーセンテージを示す。種々の被覆ビーズのすべてが、シランを除いて、 MspA ナノポアの 20% 未満の喪失 (もはや活性なナノポアでない) および 10% 未満のチャネル飽和をもたらした。シランは、 MspA ナノポアの 50% 未満の喪失、および 30% 前後のチャネル飽和をもたらした。ビーズを添加した後に飽和したチャネルのパーセンテージが、もはや活性でない MspA ナノポアのパーセンテージより低かったことから、 MspA ナノポアの低減が膜破裂のみによるものであったとは考えにくかった。

【0319】

図 7 は、オープンポア電流がストレプトアビジン被覆ビーズの添加によって影響を及ぼされなかったことを示す。線 0 はビーズの存在がないことに対応し、線 2 はストレプトアビジン被覆ビーズの存在に対応し、両方とも 180 mV の印加電位で 350 pA 前後のオープンポア電流をもたらした。

10

20

30

40

50

【0320】

図5～7に示されたデータから、試験した磁性ビーズ官能化(1-シラン、2-ストレプトアビジン、3-短いビオチン化DNA鎖と結合したストレプトアビジン、4-コバルトベースのhis-tag Isolation and Pull down))のいずれも、DNAをナノポアに送達するために使用することができた。

【実施例4】

【0321】

この例は、いくつかの異なる試料を、磁性微粒子を使用してどのように膜貫通タンパク質ポアに送達したかを説明するものである。試料Aは、磁性微粒子を使用して膜貫通タンパク質ポア(MspA)に送達した。次いで、ナノポア系を使用してこの試料を検出した。次いで、試料Aを、膜表面から磁石を使用して除去した。微粒子への試料Aの付着強度は、膜との試料Aのカップリング強度より大きく、したがって、微粒子の除去は試料Aを膜からアンカップリングした。試料Aを除去したら、次いで試料Bを磁性微粒子を使用してナノポアに送達した。この試料もナノポア系によって検出し、その後、磁石を使用して除去した。複数の試料を、ナノポア系においてこのプロセスを用いて試験した。

10

【0322】

材料および方法

4.1 ビーズの調製および試料の付着

磁性ビーズを、上の実施例1、ステップ1.1に記載されたプロセスに類似したプロセスで洗浄した。試料AおよびBを、実施例1、ステップ1.2に記載されたプロセスに類似したプロセスで磁性微粒子に付着させた。

20

【0323】

4.2 電気生理学

試料AまたはBのいずれかが付着した微粒子を、実施例1、ステップ1.3に記載されているように緩衝液および燃料ミックスに希釈した。単一MspAナノポアを実施例1、ステップ1.3に記載されているように調製した。

【0324】

試料Aをナノポア系に添加し、ヘリカーゼによって制御されるDNAの移動をモニターした。試料Aに関する十分なデータを回収した後、次いで磁石をナノポア系の上に10分間置いた。これは、磁性微粒子を磁石の方へ、膜中の膜貫通タンパク質ポアから離れて付着させた。試料Aを系から除去した後、次いで、試料Bが付着した磁性微粒子をナノポア系に流し、ヘリカーゼによって制御されるDNAの移動をモニターした。試料Bに関する十分なデータを回収した後、次いで磁石をナノポア系の上に10分間置いた。これは、試料Bが付着した磁性微粒子を、磁石の方へ、膜中の膜貫通タンパク質ポアから離れて付着させた。これは、試料Bをナノポア系から除去し、今後の試料の検出に利用できるようにした。

30

【0325】

結果

この例は、磁性微粒子を使用して、いくつかの異なる試料をナノポア系に送達し、検出し、次いでその後、ナノポア系から除去することが可能であったことを示した。これは、微粒子との試料AおよびBの付着強度が膜との試料AおよびBのカップリング強度より大きく、したがって、微粒子の除去が試料AおよびBを膜からアンカップリングし、それらをナノポア系から除去したために可能であった。図9は、上の4.2に記載されているステップの略画表現を示す。

40

【実施例5】

【0326】

この例は、DNA分子をDynabeads(登録商標)MyOne(商標)ストレプトアビジンC1(Thermo Fisher Scientific 製品番号65001)に付着させ、次いでビーズをナノポア系に添加して、ヘリカーゼによって制御されるDNAの移動を検出するための試料調製手順を説明するものである。DNAは、「アンカ

50

ー」オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした。すなわち、1つのオリゴはYアダプターにハイブリダイズし、DNAを膜中のナノポアに送達するのを支援し、ヘアピンアダプターにハイブリダイズした第二のオリゴは、磁性ビーズとのDNA分子の結合を容易にするビオチン部分を含有した(図10を参照されたい)。

【0327】

材料および方法

MyOne C1 Dynabeads(登録商標)の洗浄処理

溶液全体にわたってDynabead(登録商標)を十分に再懸濁させるために、MyOne C1 Dynabeads(登録商標)を含有するストック試料をボルテックスした。ビーズ溶液試料(1 μL)をストック溶液から除去し、Eppendorf DNA LoBindチューブ(1.5 mL)に添加した。チューブを磁気ラックに入れ、ビーズのすべてが磁石にくついたら上清を除去した。結合緩衝液(Thermofisher Kit、カタログ番号60101の一部として提供された)を磁性ビーズ試料(Dynabeads(登録商標)kilobase Binder(商標)キット)に添加し(40 μL)、ボルテックスすることによりビーズを再懸濁させた。次いで、チューブを磁気ラックに置き、ビーズが磁石にくついたら上清を除去した。緩衝液洗浄および上清除去ステップをさらに2回繰り返し、その結果、ビーズは緩衝液を使用して合計3回洗浄した。これを、別名、洗浄ビーズストック溶液とした。溶液全体にわたってDynabead(登録商標)を十分に再懸濁させるために、使用前にビーズストック溶液をボルテックスした。

【0328】

Dynabeads(登録商標)へのDNA(ヘリカーゼが事前結合している)の付着

DNAライプラリー(断片化し、次いでYアダプター(ヘリカーゼがリーダーに付着した)およびヘアピンアダプターに付着させ、次いで2つのアンカーオリゴヌクレオチドにハイブリダイズした二本鎖ラムダDNAを含有する(図10に示すように))を洗浄Dynabeads(登録商標)に添加し(下の表6を参照されたい)、試料を室温で15分間インキュベートした(混合しながら)。15分後、試料を磁気ラックに入れてビーズをペレット化した。上清を除去し、ビーズを80 μL洗浄緩衝液(2 M NaCl、10 mM Tris·HCl(pH 7.5)、1 mM EDTA)(Dynabeads(登録商標)kilobase Binder(商標)キット)で洗浄した。洗浄緩衝液を除去し、洗浄ステップを繰り返した。最後に、洗浄およびペレット化したビーズを12 μL 500 mM KCl、pH 8.0、25 mMリン酸カリウム緩衝液に再懸濁させた。この試料は、DNA/ビーズ試料3であった。

【0329】

【表3】

試薬	体積(μL)
DNAライプラリー	30
ステップ1.1で生成された洗浄	30
Dynabeads(登録商標)	
合計	60

表6

【0330】

電気生理学

実験を始める前に、DNA/ビーズ試料3(3 μL)を緩衝液(143 μL、25 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 8.0、500 mM KCl)および燃料ミックス(4 μL

のMgCl₂ (75 mM) およびATP (75 mM))に添加した。

【0331】

緩衝液 (25 mM リン酸カリウム緩衝液、150 mM フェロシアン化カリウム (II) 、および150 mM フェリシアン化カリウム (III) 、pH 8.0) 中のブロック共重合体に挿入された単一MspA ナノポアから電気的測定値を得た。ブロック共重合体に挿入された単一ポアを得た後に、次いで緩衝液 (2 mL、25 mM リン酸カリウム緩衝液、150 mM フェロシアン化カリウム (II) 、150 mM フェリシアン化カリウム (III) 、pH 8.0) をその系に流して一切の過剰MspA ナノポアを除去した。

【0332】

過剰な緩衝液 (500 mM KC1、25 mM リン酸カリウム、pH 8.0) を、試料を添加する前にナノポア系に流した。DNA / ビーズ試料3 および燃料プレミックス (合計155 μL) を、次いでその單一ナノポア実験系に流した。実験を -120 mV で実行し、ヘリカーゼによって制御されるDNA の移動をモニターした。

10

【0333】

結果

DNA / ビーズ試料3 について、ヘリカーゼによって制御されるDNA の移動が観察された。Dynabeads (登録商標) MyOne (商標)ストレプトアビシンC1 (Thermo Fisher Scientific 製品番号 65001) とプレインキュベートしたDNA ライブラリーは、Hisタグ付けビーズを使用して実施例1で観察されたものと類似した濃度の増大を示した。これは、Dynabeads (登録商標) がナノポア系へのDNA の直接送達を支援することを意味した。

20

【実施例6】

【0334】

この例は、緩衝液フラッシュを使用してフローセルからビーズを物理的に除去することによって、ビーズに付着した試料がナノポアチップアレイからどのように除去されるかを示す。

【0335】

材料および方法

2つの別々の生物由来のDNA 試料を個々に調製し、実施例1に記載されているように His-tag isolation and pull down 磁性ビーズに付着させた (1.1 および 1.2 を参照されたい)。第一の生物から調製された試料 (試料A) を、実施例1.3 に記載されているようにナノポア系に添加し、第一の生物由来のDNA のヘリカーゼによって制御されるDNA の移動を1時間モニターした。次いで、ビーズを系から洗い流すために、ナノポアアレイ系を3 × 1 mL 体積の緩衝液を使用して洗い流した。次いで、第二の生物から調製された試料 (試料B) を、実施例1.3 に記載されているようにナノポア系に添加し、第二の生物由来のDNA のヘリカーゼによって制御されるDNA の移動を1時間モニターした。ヘリカーゼによって制御されるDNA の移動を、2つのゲノムからなる参照にマッピングした (図11を参照されたい)。図11 (A) は、試料Aのみが系に存在した場合の実験の被覆深度を示し、図11 (B) は、緩衝液を系から洗い流し、試料Bを添加した後の第二時限の実験に関する被覆深度を示す。マッピングは、単純な緩衝液フラッシュがナノポア系から試料Aのほとんどを除去したことを示した。系から除去される、試料Aが付着したビーズの数を増やすために、さらなるフラッシュを系で行うことができた。図12は、試料Aを添加し、3 × 1 mL 緩衝液を洗い流した後のナノポア系の同じ領域の拡大画像を示す (図12A)。図12Aは、膜が形成されるナノポア系の領域にビーズが集中したことを示し、図12Bは、緩衝液フラッシュ後にビーズが系から除去されたことを示す。

30

【実施例7】

【0336】

この例は、PCRを必要とすることなくローインプット試料 (< 100 ng 出発材料) のスループットを最大化するために、ワークフローをどう改善することができるかを示す

40

50

。

【0337】

材料および方法：

図13Aは、新たなローインプットプロトコールの略図を示す。このプロトコールでは、鎖を依然としてビーズと結合させながら、ライプラリーを分析のためにナノポア系にロードした。

【0338】

対照的に、図13Bは、PCRベースのローインプットプロトコールの略図を示す。PCRベースのプロトコールの最終ステップは長々しい。すなわち、ユーザーは、分析のためにナノポア系にロードする前に、調製されたシークエンシングライプラリーをストレプトアビジンビーズを使用してきれいにし、ビーズからライプラリーを溶出する必要がある。

10

【0339】

結果：

新たなローインプットプロトコールでは、重力を使用してビーズを膜表面に引っ張り、膜上のDNA分子の局所濃度を上昇させる。これは、系の感度を1桁以上改善し、本発明者らがインプット要件を1 μgから0.025 μg(25 ng)に下げることを可能にした。PCRステップの省略は、增幅バイアスが排除され、実験室時間が節約されたことを意味した。PCRなしのプロトコールはより長い断片と適合可能であり、より長い読み取りをもたらす。さらに、後成的修飾が保存される。約8 kbに剪断されたゲノムDNAで使用する場合、新たなローインプットプロトコールからの2D読み取り長分布は、インプットDNAの断片長分布と類似していた。これは、ビーズローディングがいずれの目立った断片長バイアスも導入しないことを示すものである。

20

【実施例8】

【0340】

この例は、配列捕捉がシークエンシング前に目的とする遺伝子座をいかに濃縮させ、したがってシークエンシングランのより効率的な使用を可能にするかを示す。

【0341】

材料および方法：

配列捕捉は、目的とする領域に特異的なプローブにライプラリー断片をハイブリダイズすることによって、ライプラリー調製中に行った(図14を参照されたい)。Agilentによって合成され1塩基間隔でタイル表示された120ntオリゴからなる、ラムダファージゲノムに特異的なカスタムプローブセットを設計した。ラムダゲノムDNAを、ゲノムが等モル比で混合された大腸菌(E. coli)DNAと混合した。ゲノムDNAを、フラグメント化を使用して約2 kbに断片化した。PCR伸長時間をより長い断片に合わせて調整し、配列捕捉をAgilentの標準的なSureSelectプロトコールに従って行った。次いで、得られたライプラリーをナノポア系を使用して分析した。

30

【0342】

結果：

ラムダDNAは出発DNAの約1%を構成したが、捕捉後、本発明者らは標的において読み取りの70%を得た。

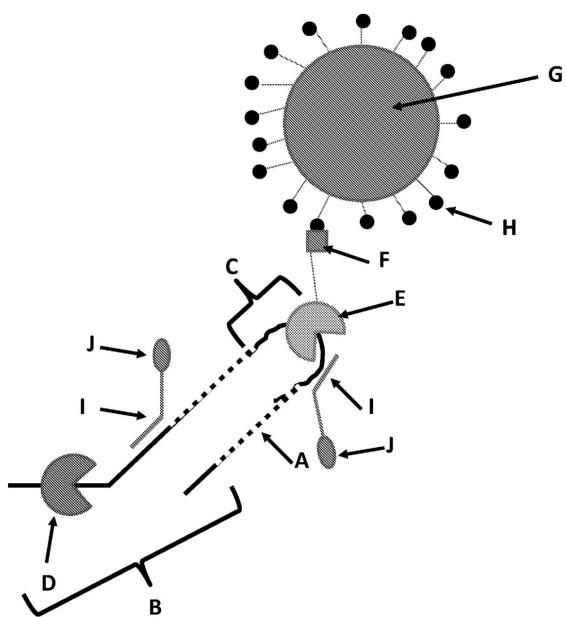
40

【0343】

配列捕捉は、ゲノム全体の分析が望まれない場合、またはゲノムがシーケンサーのスループットには大きすぎる場合に有用である。目的とする領域は、PCRによる濃縮に現実的である領域より全体として長いことがあり、またはあまりに多くのPCRが必要とされることがある。配列捕捉は、シークエンシングおよびデータ分析の際のお金と時間を節約する。

【図1】

図1



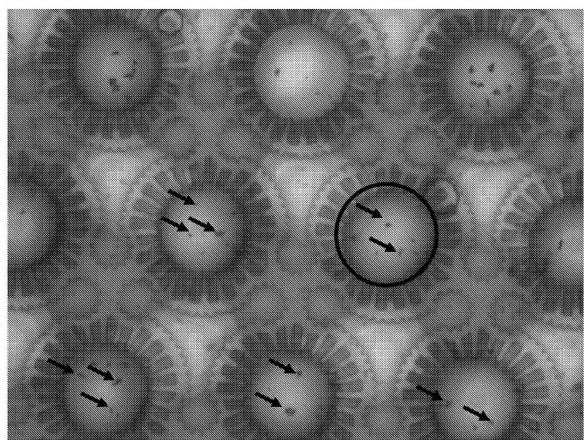
【図2】

図2



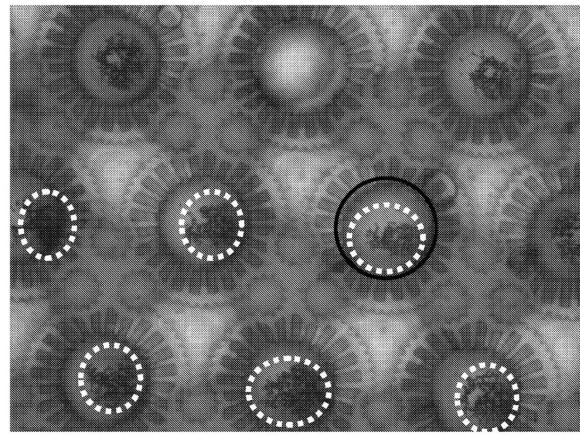
【図3】

図3



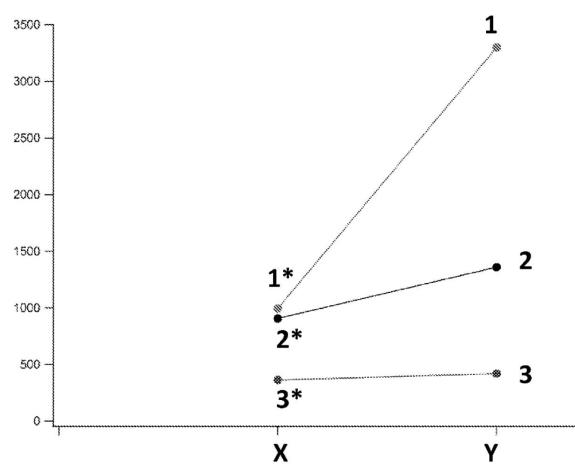
【図4】

図4



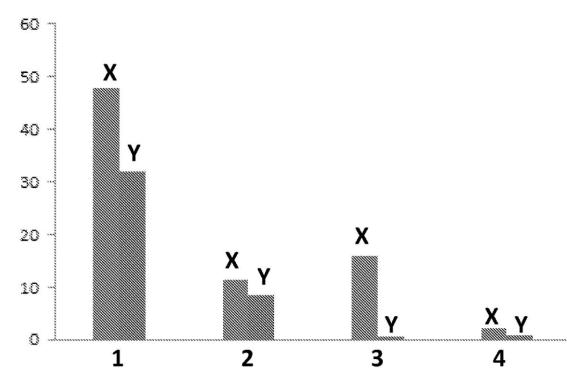
【図5】

図5



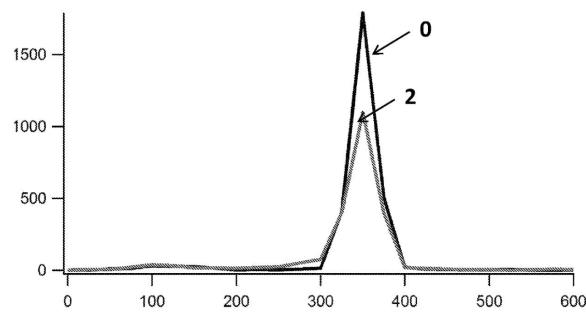
【図6】

図6



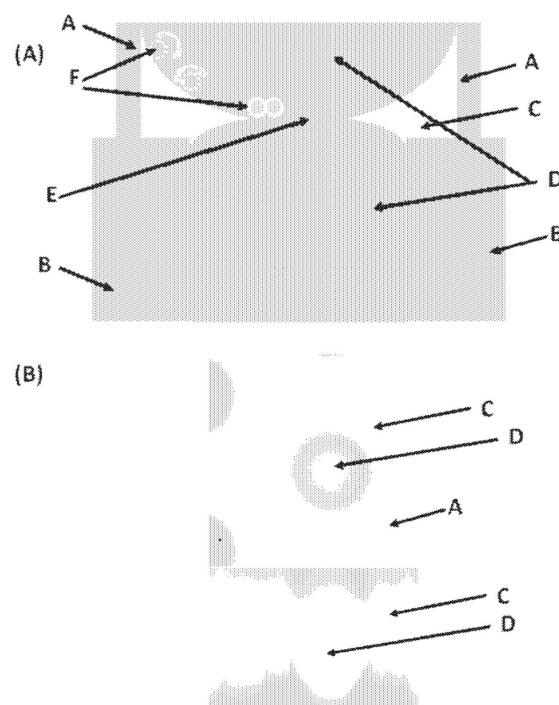
【図7】

図7

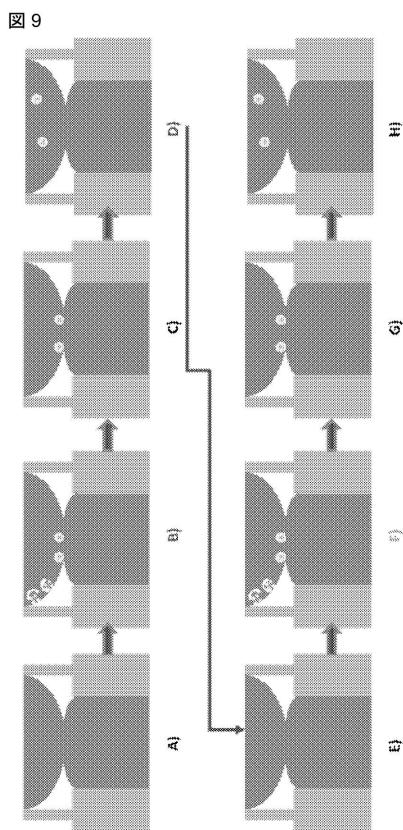


【図8】

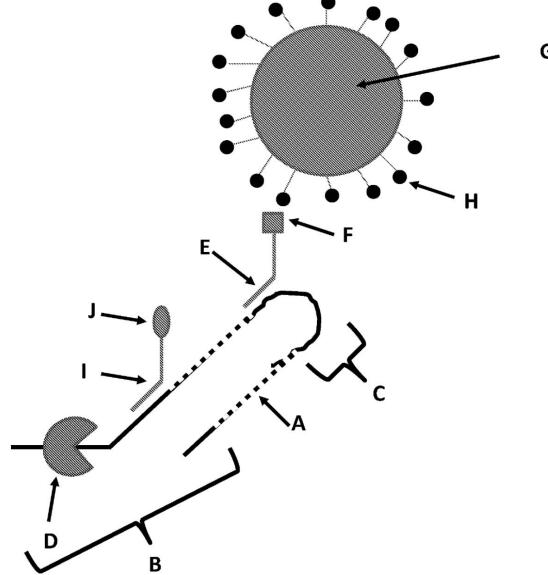
図8



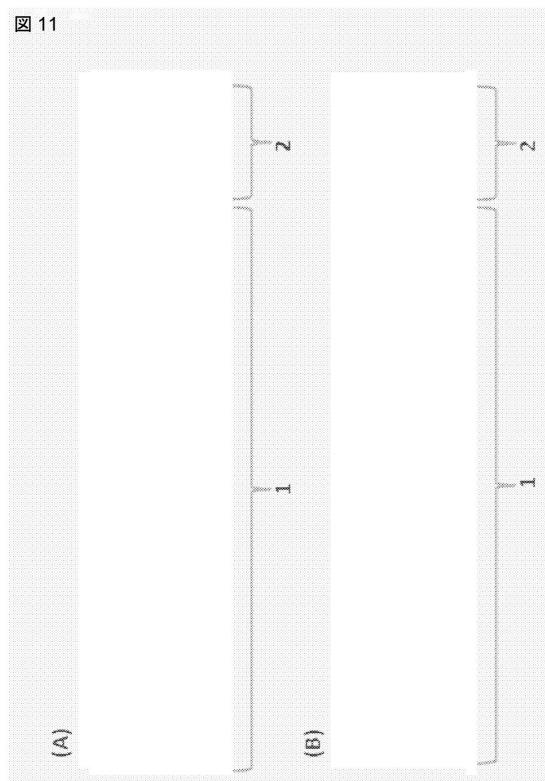
【図9】



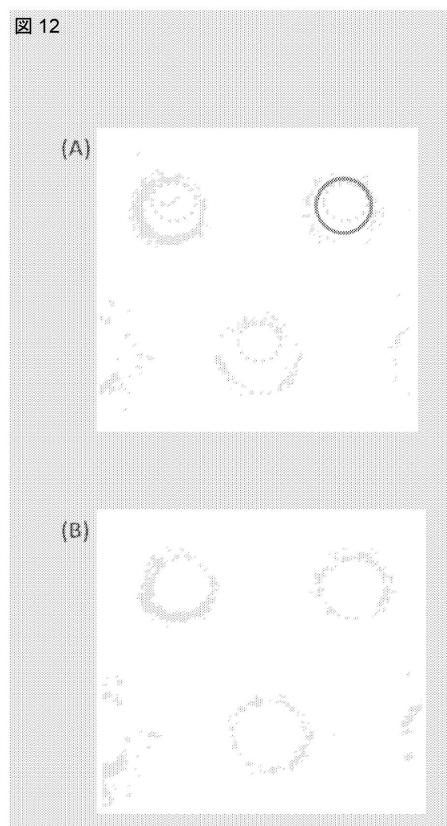
【図10】



【図11】

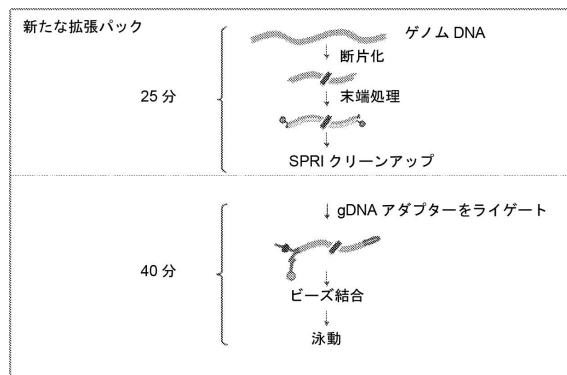


【図12】



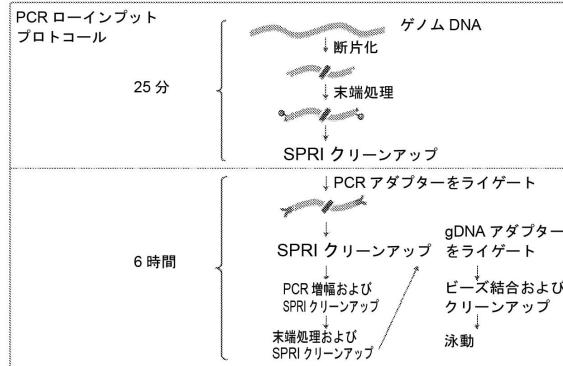
【図 1 3 A】

図 13A



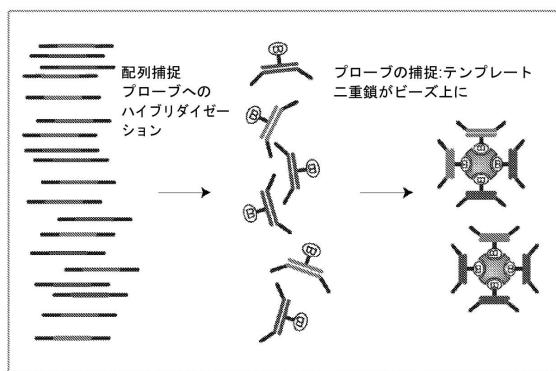
【図 1 3 B】

図 13B



【図 1 4】

図 14



【配列表】

0006721581000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 40 B 40/06

(72)発明者 ブラウン , クライブ

イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャイアー オーエックス4 4ジーエー , オックスフォード サイエンス パーク , ロバート ロビンソン アベニュー 4 , エドマンド カートライト ハウス , オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド

(72)発明者 ギャラルド , ダニエル リヤン

イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャイアー オーエックス4 4ジーエー , オックスフォード サイエンス パーク , ロバート ロビンソン アベニュー 4 , エドマンド カートライト ハウス , オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド

(72)発明者 ヘロン , アンディ

イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャイアー オーエックス4 4ジーエー , オックスフォード サイエンス パーク , ロバート ロビンソン アベニュー 4 , エドマンド カートライト ハウス , オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド

(72)発明者 ターナー , ダニエル ジョン

イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャイアー オーエックス4 4ジーエー , オックスフォード サイエンス パーク , ロバート ロビンソン アベニュー 4 , エドマンド カートライト ハウス , オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド

(72)発明者 ホワイト , ジェームス

イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャイアー オーエックス4 4ジーエー , オックスフォード サイエンス パーク , ロバート ロビンソン アベニュー 4 , エドマンド カートライト ハウス , オックスフォード ナノポール テクノロジーズ リミテッド

審査官 福間 信子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2014/0134618(US, A1)

特表2012-516146(JP, A)

米国特許出願公開第2013/0146456(US, A1)

特表2014-519823(JP, A)

特表2017-501678(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12 N 15/00 - 90

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

JSTplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)