

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5190263号
(P5190263)

(45) 発行日 平成25年4月24日(2013.4.24)

(24) 登録日 平成25年2月1日(2013.2.1)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 40 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2007-525792 (P2007-525792)	(73) 特許権者	507044516
(86) (22) 出願日	平成17年8月12日 (2005.8.12)		プレジデント アンド フェローズ オブ
(65) 公表番号	特表2008-509671 (P2008-509671A)		ハーバード カレッジ
(43) 公表日	平成20年4月3日 (2008.4.3)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/028566		138, ケンブリッジ, マサチューセ
(87) 国際公開番号	W02006/020775		ッツ アベニュー 1350, スイート
(87) 国際公開日	平成18年2月23日 (2006.2.23)		727, ホールヨーク センター,
審査請求日	平成20年7月25日 (2008.7.25)		オフィス オブ テクノロジー ディベロ
(31) 優先権主張番号	60/601, 264	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成16年8月13日 (2004.8.13)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 超高スループットの光学ナノ細孔DNA読み取りプラットフォーム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的ポリヌクレオチドを分析する方法であって、該方法は：

(a) 複数の設計モノマーを提供する工程であって、ここで、1つ以上の設計モノマーは、所定のヌクレオチド塩基と対応し、設計モノマーの各々は、1つ以上のシグナル分子と関連付けられる、工程；

(b) リガーゼ酵素を使用して、標的ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列に対応する配列内に複数の設計モノマーを連結することにより、設計ポリマーを形成する工程；

(c) 該設計モノマーと関連付けられたシグナル分子を、該設計ポリマーにアニーリングさせて、設計ポリマー-シグナル複合体を形成する工程；および

(d) ナノ細孔を使用して該複合体の一方の末端から該シグナル分子を順次除去することによる、該複合体を分析に供する工程であって、該複合体からの該シグナル分子の除去は、該標的ポリヌクレオチド内のヌクレオチド塩基配列を同定するために用いられるシグナルのパターンを生成する、工程、
を包含する、方法。

【請求項2】

前記標的ポリヌクレオチドが、DNA、RNAおよびPNAからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記標的ポリヌクレオチドがDNAである、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記 DNA が、cDNA または gDNA のいずれかである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記設計モノマーが、5ヌクレオチド塩基～10ヌクレオチド塩基に及ぶヌクレオチド塩基の範囲を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記設計モノマーが、DNA、RNA または PNA を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記標的ポリヌクレオチド内のヌクレオチドの各々が、二進コードにより表される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記ヌクレオチドが、アデニン、シトシン、ウラシル(uracil)、グアニンおよびチミンからなる群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記二進コードが2つの分子ビーコンから構成され、ここで、該分子ビーコンの特定の配列が、前記ヌクレオチドに対応する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記シグナル分子が前記設計モノマーにハイブリダイズされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記シグナル分子と前記設計モノマーとの間のハイブリダイゼーションのパーセントが、90%以上である、請求項 10 に記載の方法。

20

【請求項 12】

前記シグナル分子と前記設計モノマーとの間のハイブリダイゼーションのパーセントが、80%～90%の間である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記シグナル分子と前記設計モノマーとの間のハイブリダイゼーションのパーセントが、70%～80%の間である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記シグナル分子と前記設計モノマーとの間のハイブリダイゼーションのパーセントが、60%～70%の間である、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 15】

前記シグナル分子が分子ビーコンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記分子ビーコンが、1つ以上のフルオロフォアと1つ以上のクエンチャーとを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記分子ビーコンの5'末端上のヌクレオチド配列が、該分子ビーコンの3'末端上のヌクレオチド配列と相補的である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

2つの分子ビーコンが存在し、各々の分子ビーコンが特定の設計モノマーに対応する、請求項 15 に記載の方法。

40

【請求項 19】

第一の分子ビーコンが第一の設計モノマーに対応し、第二の分子ビーコンが第二の設計モノマーに対応する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ナノ細孔システムへ前記設計ポリマー-シグナル分子複合体を導入する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記ナノ細孔システムが、複数のナノ細孔と1つ以上の検出システムとを備える、請求

50

項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記ナノ細孔システムが、1つ以上のチャンネルと脂質二重層とを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記ナノ細孔が、溶血素、バクテリオファージ に対するレセプター、グラミシジン、バリノマイシン、Omp F、Omp C、Pho E、Tsx、F線毛およびミトコンドリアポーチン(VDAC) からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記ナノ細孔が 溶血素である、請求項 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 5】

前記 溶血素が前庭とチャンネルとを含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記前庭が、2.5 nmの直径を有する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記チャンネルが、1.5 nmの直径を有する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記チャンネルが、0.5 nm ~ 2.0 nmの範囲に及ぶ細孔サイズを有する、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 9】

20

電圧を使用して前記ナノ細孔システム内のナノ細孔を通して前記設計ポリマーをトランスロケーションさせることによる前記設計ポリマー - シグナル分子複合体の解離をさらに包含し、ここで、該設計ポリマーの一本鎖部分が、前記ナノ細孔システムのチャンネルに侵入し、それを通過する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記解離が、前記ナノ細孔システムを横切って確立された電場によりもたらされる、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記チャンネルへ、かつ該チャンネルを通過しての前記一本鎖の設計ポリマーの移動が、前記ナノ細孔システムを横切る電場により促進される、請求項 2 9 に記載の方法。

30

【請求項 3 2】

前記解離プロセスが1つ以上のシグナル分子の遊離をもたらず、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記遊離されたシグナル分子が、検出可能なエネルギーを放出する分子とクエンチャー分子とを含み、該遊離されたシグナル分子が自己ハイブリダイズし、それにより該放出する分子をクエンチする、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記放出する分子がフルオロフォアである、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

40

前記フルオロフォアが、TMR、Cy 5 およびCPMからなる群より選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記クエンチング分子が、ダブシル(Dabcyl)、ダブシル(Dabsyl)、および、メチルレッドからなる群より選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 7】

工程(d)の分析が、前記シグナル分子からのエネルギーの検出を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記検出が蛍光の検出を包含する、請求項 3 7 に記載の方法。

50

【請求項 39】

前記検出システムが光学的な検出システムである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 40】

前記光学的な検出システムが蛍光検出器である、請求項 39 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、ポリマー分子を分析するためのシステムを提供する。詳しくは、本発明は、一本鎖のポリヌクレオチド分子の配列決定に関する。

10

【背景技術】

【0002】

(背景)

Watson および Crick が 1953 年に DNA 分子の構造を解明して以来、遺伝学研究者は、個々の DNA 分子を配列決定する、迅速かつ効率的な方法を見出そうとしてきた。Sanger / Barrell および Maxam / Gilbert は、1975 と 1977 との間に、配列決定技術において、主要なブレークスルーを代表する 2 つの新規の DNA 配列決定法を開発した。現在広範に使用される方法は全て、Sanger / Barrell 法に基づき、最近 23 年間に於ける DNA 配列決定の開発は、大体、この方法の改変であった。

20

【0003】

ポリヌクレオチドは、直線状の様式で互いに結合したヌクレオチドの反復性単位を含む、ポリマー分子である。ポリヌクレオチドの例は、デオキシリボ核酸 (DNA) およびリボ核酸 (RNA) である。DNA ポリマーは、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) およびチミン (T) として公知な 4 つの異なるヌクレオチド塩基のストリングから構成される。所定の遺伝子における、これらの塩基の特定の順序、すなわち「配列」は、遺伝子にコードされるタンパク質の構造を決定する。さらに、遺伝子の周囲の塩基配列は、代表的に、どの細胞型において、特定のタンパク質がどの程度の頻度で作られる筈かなど、についての情報を含む。遺伝子内およびその周囲の DNA 配列の知見は、遺伝子の構造および機能、それがコードするタンパク質、ならびに他の遺伝子およびタンパク質に対するその関連性についての価値のある情報を提供する。RNA は、DNA と構造的かつ化学的に関連するが、(デオキシリボースである DNA とは対照的に) RNA の糖成分はリボースであり、塩基であるチミンはウラシル (uracil) と置換される。

30

【0004】

特定の DNA 配列と特定の疾患状態との間の直接的な関連性が存在することが当業者により認識される。この事実は、多くの製薬企業が、ゲノム研究の分野において、これらの疾患の根底に存在する遺伝学的性質を発見する望みに多大な投資をすることを助長してきた。

【0005】

配列情報は重要であるという別の理由は、個体の遺伝学的な配列に基づいて、特定の疾患に対するその個体の感受性を決定する能力が期待されることである。遺伝学的な診断の分野は、ゲノム中のその存在が特定の障害の発症または特徴と関連するヌクレオチド配列要素を同定することに寄与する。集団中で観察されるゲノム配列要素について、利用可能な情報が多ければ多いほど、この分野がより強力となる。さらに、一般的な集団中の罹患率および配列要素の浸透率、ならびに試験されている特定の個体のゲノム中のこのような要素の存在についての情報が迅速であればあるほど、分析がより有効となる。

40

【0006】

配列情報は価値があるというなお別の理由は、多くの製薬企業が、個体の遺伝学的プロフィールに対し特別注文 (custom-tailored) される薬物を開発しようとしていることである。この望みは、おそらく低減された投薬レベル (これは、薬物が投与

50

される特定の個体の遺伝学的な特徴に適切である)で、標的化された強力な薬物を提供するはずである。

【0007】

大半の現在利用可能なヌクレオチド配列決定技術は、異なる長さの相補鎖の収集物(この収集物は、標的配列の各々の塩基において終結し、そして標的分子のほんの数個のヌクレオチドから全長のヌクレオチドのサイズに及ぶ分子を含む)を生じることによって所定のポリヌクレオチド鎖のヌクレオチド配列を決定する。続いて、標的分子の配列は、短縮型の相補鎖を分析し、各々、4つのDNAヌクレオチドのうちどれで終結するかを決定することにより決定される。「梯子(Ladder)」は、長さによる順序で短縮型の分子を並べることにより構築され、そして各々の梯子の末端残基が読み取られ、標的ポリヌクレオチド配列の相補体を提供する。

10

【0008】

現在利用可能なDNA配列決定システムは非常に強力である。しかしながら、これらは、速度、複雑さおよびコストにより制限される。現在利用可能な自動シーケンサーの速度は、一回に数百(代表的に、約600)ヌクレオチドの配列より多くは機械が分析できないことにより制限される。1000塩基長未満の鎖を正確につなぎ合わせるのに必要とされる重なりを可能にするために、標準的な配列決定プロセスは、ヒトゲノム配列を決定するために7千万回も実行されなければならない(非特許文献1;これは参考として本明細書に援用される)。一日あたり、1億塩基の理論的な速度において、一度ヒトゲノムを配列決定するのに少なくとも1年間かかる。これらの技術を使用するには、大規模な配列決定は、臨床的なツールとはなり得ない。臨床的な場面において遺伝学的な診断が実用的になるためには、配列決定速度を少なくとも3オーダー~5オーダーの大きさを増大させる必要がある。

20

【0009】

現在の配列決定技術の複雑さは、配列決定される遺伝学的な分子を増幅し、かつ改変する必要性から生じる。この改変は、化学的または酵素的のいずれかによって実行され、増幅は、加熱と冷却との多数のサイクルにより達成される。配列決定されるDNAを増幅および改変する最も一般的な方法の一つは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用することである。PCRは、DNAポリメラーゼを使用して、変性、アニーリングおよび伸長の連続的なラウンドを包含し、DNAの元の鎖の指数関数的な増幅をもたらす。サイクルの各々の部分に伴う時間の長さは、流体の体積および増幅されるDNAの長さに依存する。代表的な時間は、大体、変性工程が10~30秒間、アニーリング工程が5~30秒間、そして伸長工程が1~4分間である。このサイクルは、通常15~30回実行される。それゆえ、通常のPCRの時間は、増幅されるDNAの長さに依存して、1時間~3時間である。変性、アニーリングおよび標識化を束縛する、この基本的な物理的プロセスは、必要とされる検出可能な鎖の個数、このプロセスを実行するのに必要とされる時間、および酵素の処理能力(processivity)である。この全体的なプロセスは、時間がかかり、それに続く関連手順を必要とする。

30

【非特許文献1】Technology Review、1999 Mar/Apr 102(2):64~68

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

現在、ポリヌクレオチドを配列決定するためのより有効な方法に対する必要性が存在する。本発明は、このような方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

(要旨)

本発明は、ポリマー分子を分析するため方法に関する。これらの方法は、単一の分子の感度でのDNA分子およびRNA分子の高スループットな読み取りに使用される。本発明

50

の方法は、以下を包含する：(1) DNA (またはRNA) 二本鎖の電氣的に制御された解離 (unzipping)、(2) 1つ以上の分子シグナル検出を使用する、分子の正体 (identity) (またはコード) の読み取り、および(3) 核酸とハイブリダイズしたプローブとの間の分子の相互作用 (例えば、強力に相互作用するプローブは、移行速度にさらなる低下を生じる) による、ナノ細孔通過プロセス (nanopore threading process) の制御された減速。

【0012】

本発明は、配列決定法に関し、この方法は、標的ポリヌクレオチド (例えば、DNA) を設計されたポリヌクレオチドポリマー (または、単純に「設計ポリマー」) へ変換することを包含する。この設計ポリマーは、検出器により読み取られる二進コードによりコードされ、それにより、元の標的ポリヌクレオチドを反映する配列情報を提供する。

10

【0013】

本発明の一実施形態において、標的二本鎖ポリヌクレオチドは、設計ポリマーに変換される。一局面において、標的の一本鎖が加工される。この変換は、標的ポリヌクレオチドの各々のヌクレオチド塩基を2つの設計モノマーに置き換え、それによってそれらの塩基を二進コードとして表現することを包含する。例えば、塩基アデニンは0+0により、塩基シトシンは0+1により、塩基グアニンは1+0により、そして塩基チミンは1+1により表現され得る。特定の局面において、各々の設計モノマーは二本鎖ポリヌクレオチド配列である。設計モノマーの各々は、「0」または「1」のいずれかを表現する。したがって、標的ポリヌクレオチドの各々かつ全ての塩基に対して、2つの対応する二本鎖の設計モノマーが存在する。一局面において、設計モノマーは、標的ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を反映するような様式で結合し、それによって設計ポリマーを形成する。一局面において、二本鎖の設計ポリマーは、一本鎖の分子に変換される。一本鎖の設計ポリマーは、適切な分子ビーコンとハイブリダイズされる。この各々の分子ビーコンは、1つ以上のシグナル分子と1つ以上のクエンチャー (quencher) 分子とを含む。

20

【0014】

本発明の一局面において、設計ポリマーは、2つのセットの設計モノマーのみを含む：(1) 一方のセットの設計モノマーは「0」をコードし、(2) 他方のセットの設計モノマーは「1」をコードする。本発明の特定の局面において、2つのセットのみの分子ビーコンを使用する。一方のセットの分子ビーコンは「0」を表す設計モノマーにハイブリダイズする一方で、第二のセットの分子ビーコンは「1」を表す設計モノマーにハイブリダイズする。一局面において、2つのセットの分子ビーコンは固有のシグナル分子を含み、その結果、「0」設計モノマーにハイブリダイズする分子ビーコンは、「1」設計モノマーにハイブリダイズする分子ビーコンとは異なるシグナル分子を有する。個々の設計モノマーへの設計ポリマーのハイブリダイゼーションは、ビーコン-設計ポリマー複合体 (または単純に「BDP複合体」) を形成する。

30

【0015】

本発明の一局面において、分子ビーコンは、シグナル分子として適切なフルオロフォアを含む。別の局面において、分子ビーコンは、フルオロフォアのみならず、クエンチャーも含む。特定の局面において、フルオロフォアは、ビーコンの5'末端に位置するが、クエンチャーは、その3'末端に位置する。

40

【0016】

本発明の方法は、電氣的に駆動される二本鎖の核酸の解離を使用する。電氣的に駆動されるナノ細孔解離方法を使用することにより、解離時間の制御を維持することができ、例えば、広範に使用される分子ビーコンのような自己クエンチされる蛍光プローブの使用を許容する。有利なことに、解離事象により定められる蛍光プローブの読み取りの瞬間まで、蛍光プローブがクエンチされる異なる測定スキームを使用することができる。

【0017】

本発明の一実施形態は、ナノ細孔システムに関する。一局面において、ナノ細孔は、溶血素を含む。本発明のナノ細孔を使用して、ポリヌクレオチドの配列情報を得ることが

50

できる。BDP複合体を本発明のナノ細孔に導入することができる。一局面において、本発明のナノ細孔に導入される設計ポリマー（BDP複合体）の3'突出が存在する。この3'突出配列は、BDP複合体の二本鎖部分が細孔の入り口と並列されるまでナノ細孔を通過し得る。ナノ細孔の寸法は、一本鎖のポリヌクレオチドのみが通過し得、それによって二本鎖のBDP複合体の侵入を防止するようになっている。ナノ細孔を横切る電圧を印加して、二本鎖のBDP複合体を解離することができる。この二本鎖の解離は、設計ポリマーからの分子ビーコンの除去を容易にし、それによって、シグナル分子（例えば、フルオロフォア）がそのシグナル（例えば、ルミネセンス）を発生することを可能にする。さらに、解離は、ナノ細孔への、かつナノ細孔を通過しての一本鎖の設計ポリマーの侵入を可能にする。シグナルは、適切な検出器により検出され得る。適切な時間後、遊離された分子ビーコンは、自己ハイブリダイズし、それによって自身のシグナルをクエンチする。

10

【0018】

これは反復プロセスである。印加された電圧は、一本鎖の設計ポリマーの次の部分が完全に通り抜けるまで、細孔を通過しての解離された一本鎖の設計ポリマーのトランスロケーションを続ける。その際、適切な検出器によりシグナルが記録され、配列中の次の分子ビーコン由来のその次のシグナルが発せられる。その後、BDP複合体から遊離されると分子ビーコンは自己クエンチする。この様式で、設計されたポリマー全体を読むことができる。

【0019】

また、本発明は、単一の分子の検出に使用することができる光学系にも関する。この光学系は、1つ以上のナノ細孔システムと組み合わせて使用することができる。この光学系は、ナノ細孔支持体と2つの電極とを有する特製（custom made）のフローセルを備える。電極を使用して、解離プロセスに必要とされる電場を印加する一方で、支持体は、ガラスカバースリップの近位でリン脂質二重層を懸架することを可能にし、高倍率の顕微鏡対物レンズを使用して、この二重層の画像化（imaging）を可能にする。フローセルは、倒立顕微鏡内のXYZナノポジショナー（nanopositioner）上にマウントされ、平行移動ステージを使用して、光軸と正確に位置合わせするために移動され得る。

20

【0020】

特定の実施形態の以下の説明において、説明の一部をなす添付の図面に対して参照がなされ、これらは、本発明が実施され得る特定の実施形態を例示する手段として示される。他の実施形態が利用され得、かつ構造的な変化が本発明の範囲を逸脱することなくなされ得ることが理解されなければならない。任意の構造の場合、これらの図が幾分単純化されることが理解されなければならない。なぜなら、これらは、示される構造についての全ての従来の詳細を示しておらず、関連する要素のみを示しているにすぎないからである。さらに、本明細書で特定の実施形態が示されるが、これは、限定するとは意図されない。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

（詳細な説明）

本発明は、ポリマー分子を分析する方法に関する。これらの方法は、単一の分子の感度での、DNA分子およびRNA分子の高スループットな読み取りに使用される。本発明の方法は、以下を包含する：（1）DNA（またはRNA）二本鎖の電氣的に制御された解離、（2）1つ以上の分子シグナル検出を使用する分子の正体（またはコード）の読み取り、および（3）核酸とハイブリダイズしたプローブとの間の分子の相互作用（例えば、強力に相互作用するプローブは、移行速度にさらなる低下を生じる）による、ナノ細孔通過プロセスの制御された減速。

40

【0022】

2種類の単一の分子の検出法の利用が本明細書に記載される：（1）ナノ細孔の検出、および（2）単一の分子シグナルの探索（例えば、蛍光の探索）。ナノ細孔に印加された電場の能動的な制御を使用して、二本鎖ポリヌクレオチド（例えば、二重ヘリックスDN

50

A)を解離することができる。この二本鎖ポリヌクレオチドの解離は、ナノ細孔のチャネルを通過し得る一本鎖の要素を生成する一方で、二本鎖部分が侵入することは防止される。それゆえ、ポリヌクレオチドの一本鎖の要素が侵入することは、その分析(例えば、配列情報を取得すること)を容易にする。

【0023】

本発明の方法は、二進コードの設計ポリマーへ標的ポリヌクレオチド分子を変換することを包含する。標的ポリヌクレオチドは、あらゆる供給源から取得することができる。一局面において、標的ポリヌクレオチドは、二本鎖のポリヌクレオチド分子(例えば、二重ヘリックスDNA)であり得る。他のポリヌクレオチドもまた本発明の範囲内であり、それらとしては、RNA分子およびPNA分子が挙げられるが、それらに限定されない。標的ポリヌクレオチドは一本鎖であってもよい。標的分子は、天然のヌクレオチド塩基と改変ヌクレオチド塩基との両方を含み得る。標的はあらゆる起源であってもよい。例えば、標的は、超高密度な様式で任意の情報をコードするように使用される、cDNA配列であっても、gDNA配列であっても、人工(man-made)(合成)配列であってもよい。標的ポリヌクレオチドは、部分的に合成されても、完全に合成されてもよい。標的は、天然起源(植物および動物を含む)のヌクレオチドを含み得る。標的ポリヌクレオチドは、任意の長さであってもよい。例えば、そのサイズの範囲は、約10ヌクレオチド塩基~約10万ヌクレオチド塩基以上であってもよい。

【0024】

図1を参照して、標的ポリヌクレオチド10が取得される(図1a)。この標的ポリヌクレオチド10は、生化学的な変換に供される。Lexowに対する米国特許第6,723,513号(この全体の教示は、参考として本明細書に援用される)を参照のこと。例示的な目的のために、例えば、3つのヌクレオチドが標的ポリヌクレオチドから単離されている(図1b)。3つのヌクレオチドは、「G」、「T」および「A」(それぞれ、グアニン、チミンおよびアデニン)である。これらの3つのヌクレオチドのみを使用して、変換プロセスを説明する。

【0025】

この変換プロセスにおいて、各々のヌクレオチドは、「1」と「0」とを使用する二進コードにより表される。したがって、例えば、グアニン(G)は二進コード「1+0」により表され得、チミン(T)は「1+1」により表され得、アデニン(A)は「0+0」により表され得、そしてシトシン(C)は「0+1」により表され得る。二進コードの「1」と「0」とは、「設計モノマー」12と呼ばれる、それら固有のポリヌクレオチドにより表される。図1bを参照のこと。図1bは、このような設計モノマー12の一例を提供する。図1bに示されるものは、「0」に対する設計モノマー12'および「1」に対する設計モノマー12''である(設計モノマーについての正確なポリヌクレオチド配列は、熟練者によって決定することができる)。したがって、設計ポリマー12は二進コードからなるので、各々「1」または「0」のいずれかを表すが、同時には「1」と「0」との両方を表さない、2つの設計モノマー12'、12''が存在する。

【0026】

図1に示される例において、「0」に対する設計モノマー12'(配列番号4~5)と「1」に対する設計モノマー12''(配列番号6~7)が存在する。もし各々のヌクレオチドが二進コードにより表されるとするならば、各々のヌクレオチドが2つの設計モノマーに表されることを必要とする。例えば、グアニンは、二進コード「1+0」により表されると、グアニンは、設計モノマー12''により「1」と表され、設計モノマー12'により「0」と表される。しかしながら、設計モノマーは、それらが表している特定のヌクレオチドを反映するように適切な配列でなければならぬ。したがって、グアニンに対して、設計モノマー12''「1」の次に設計モノマー12'「0」が続かなければならぬ(5' 3'の従来のマップ割り当て(map assignment)を使用して)。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

設計ポリマー 1 4 は、特定の配列で整列された設計モノマー 1 2 '、1 2 ' ' からなる。図 1 c を参照のこと。設計モノマー 1 2 '、1 2 ' ' が、元の標的ポリヌクレオチド 1 0 内のそれらの同起源のヌクレオチドにより見出される同じ順序で 5 ' ~ 3 ' に並べられるという点において、設計ポリマー 1 4 の配列は、元の標的ポリヌクレオチド 1 0 のヌクレオチド配列を反映する。

【 0 0 2 8 】

図 1 に示されるプロセスを、全体のポリヌクレオチド分子について反復することができる。標的ポリヌクレオチドのサイズは、便宜上操作され得るが、その原理は同一なままである。

10

【 0 0 2 9 】

本発明の設計モノマーは、ポリヌクレオチド分子からなる。設計モノマーのサイズは変動してもよい。一局面において、設計モノマーのサイズは、約 1 0 ヌクレオチド ~ 約 1 0 0 ヌクレオチドの範囲に及び得る。別の局面において、設計モノマーは、二本鎖のポリヌクレオチドである。ポリヌクレオチドは、DNA であっても、RNA であっても、PNA であってもよい。設計モノマーのヌクレオチドの構成要素は、天然であっても、改変されていても、それらの組み合わせであってもよい。これらは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシルおよびそれらの改変などからなる群から選択され得る。熟練者は、所定のプロトコルのパラメータに基づいて設計モノマーを構築することができる。本発明の二進コードの特徴を達成するために、少なくとも 2 つの異なる設計モノマーを構築しなければならないことが重要である。

20

【 0 0 3 0 】

本発明の設計ポリマーは、複数の設計モノマーからなる。設計ポリマーは、生化学的に変換された標的ポリヌクレオチドを表す。設計ポリマーと元の標的ポリヌクレオチドとの間の関連性は、設計ポリマーのみを使用して、熟練者が元の標的ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定することができるようなものである。設計ポリマーの設計モノマーは、互いに連結（例えば、共有結合）されて、ポリヌクレオチド分子を形成する。再度、設計モノマーを連結することの順序は、その連結した配列が標的内のヌクレオチドの元の配列を反映するようなものである。

【 0 0 3 1 】

ハイブリッドのシステムもまた本発明の範囲内である。例えば、標的ポリヌクレオチドは RNA 分子であり、二進コードを構築するのに使用される設計モノマーはデオキシリボヌクレオチド (deoxyribonucleotide) から構成され得る。その逆も等しく有効である。熟練者が望む場合、ハイブリッドの構築物であってもよい。例えば、設計モノマー（単数または複数）は、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとのハイブリッドを含んでもよい。種々のハイブリッドの置換もまた十分に本発明の範囲内である。

30

【 0 0 3 2 】

図 2 を参照して、ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド（そのサイズに関してのみ異なる）は、上記の方法にしたがって処理することができる。図 1 に記載される方法は反復的なプロセスであり得、それによってオリゴマーを設計ポリマーへ変換することを可能にする。図 2 は、このような状況を示す。この例に関して、2 1 塩基対のオリゴマー 1 6 を使用して、本方法を例示する。種々のサイズのオリゴマーは、本発明の範囲内である。例えば、約 1 0 ヌクレオチド ~ 約 5 0 0 0 ヌクレオチドに及ぶオリゴヌクレオチドを処理することができる。先に記載されるように、当業者に周知の従来法を使用して、相当な長さのポリヌクレオチドを消化し、より短いオリゴヌクレオチドを形成することができる。

40

【 0 0 3 3 】

図 2 a は、2 つの設計モノマーを示す。一方の 1 2 ' は「 0 」を表し、他方の 1 2 ' ' は「 1 」を表す。より詳細な試験の際に、2 つの設計モノマー 1 2 '、1 2 ' ' が異なる

50

ヌクレオチド配列から構成されることが観察され得る。この特定の例において、各々の設計モノマーは、10塩基対から構成される。ここで、これらの2つの設計モノマー12'、12''を使用して、二進コードにより標的ヌクレオチド16配列を表すことができる。図2bは、二進コードの割り当てを例示し、また図2bは、設計モノマー12'、12''を互いに連結することにより形成される設計ポリマー14を示す。設計モノマー12'、12''の長さ配列とは可変性であり、これらは、生じる設計ポリマー14が注文どおりに作製される(tailored made)ことを可能にする。

【0034】

図2cは、設計ポリマーへの標的の変換サイクルを示す。標的ポリヌクレオチド16(配列番号8および配列番号9)は、3つの酵素的な工程(A、BおよびC)により循環され得る。この図において、1サイクルあたり、3つの標的塩基が変換される。この図中の標的ポリヌクレオチド16は21塩基対から構成され、したがって、標的を完全に変換するのに全部で7回のサイクルが必要とされる。図2cにおいて、上側の鎖(太字)がこの図中で変換される。

10

【0035】

酵素的な工程Aは、変換および設計ポリマーの連結のための突出を生成するために、少なくとも2つのIIs制限酵素(例えば、NlaIII)による標的16の消化を含む。当該分野で公知の他の制限酵素を使用して、標的ポリヌクレオチドの消化を達成することができることは、当業者により十分に認識される。

20

【0036】

工程Bは、連結(ligation)工程であり、ここで、二進法の設計ポリマー配列が、その5'末端と対応する配列を有する標的フラグメントの3'末端に特異的に結合される。この工程は、別個のウェルへの標的フラグメントの分割を包含し、ここで、ウェルの個数は、変換されている塩基の置換の個数に一致する(例えば、3つの塩基の変換には64個のウェルを必要とする)。各々のウェルにおいて、その特定のウェル内で変換されるべき配列と一致する、設計ポリマー配列および特異的なアダプター(示さず)が存在する(すなわち、各々のフラグメントの3'末端への設計ポリマーの非特異的な結合と正しいフラグメントの5'末端へのアダプターの特異的な連結とが存在する)。連結後、これらのウェルは、一つの容器にプールされ得る。

30

【0037】

工程Cは、増幅工程である。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)工程を実行して、設計ポリマーと特異的なアダプターとに首尾よく結合したフラグメントを増幅および選択する。

【0038】

この変換法を、大量に並行して実行することができ、ここで、数十億の異なる標的分子が同一の反応で変換される。米国特許第6,723,513号を参照のこと。

【0039】

一度、設計ポリマーを形成すると、1つ以上のシグナル分子が設計ポリマーに結合する。一局面において、シグナル分子は分子ビーコンである。一本鎖の設計ポリマーは、当業者に周知の手段によって取得される。一本鎖の設計ポリマーは、ハイブリダイゼーションに適切な条件(例えば、緩衝液(100mM KCl、1mM MgCl₂、10mM Tris-HCl、pH 8.0)中でのゆっくりとした温度の低下(quenching)による)下で分子ビーコンと混合され、ビーコン-設計ポリマー複合体(BDP複合体)を形成する。

40

【0040】

図3は、代表的な分子ビーコン18を概略的に示す(Tyagi S, Kramer FR. 1996 Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization, Nature Biotech. 14: 303-8; Bonnet G, Tyagi S, Libchaber A, and Kramer FR. 1999. Thermodynamic basis o

50

f the enhanced specificity of structured DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 6171-76を参照のこと)。分子ビーコン(または、単純に「ビーコン」)は、フルオロフォア(「F」)20をオリゴヌクレオチドのある位置(例えば、その5'末端)に、そしてクエンチャー(「Q」)22をオリゴヌクレオチドの別の位置(例えば、その3'末端)に有する、オリゴヌクレオチドである。図3aを参照のこと。図3aに示されるように、フルオロフォア20は、蛍光シグナルを発することができる。なぜなら、それは、クエンチャー22により妨害されていないからである。しかしながら、ビーコン18の5'末端と3'末端とは、それらが相補的な塩基を有することにより自己ハイブリダイズすることができる。図3bを参照のこと。5'末端と3'末端とがハイブリダイズするか、または緊密に接近する場合に、クエンチャー22がフルオロフォア20をクエンチし、それによってシグナルが生成されることを防止する。

10

【0041】

本発明の方法において、少なくとも2つの異なる分子ビーコンを使用する。ある分子ビーコンは、「0」を表す設計モノマーにハイブリダイズする一方で、別の分子ビーコンは、「1」を表す設計モノマーにハイブリダイズする。設計モノマー「0」にハイブリダイズする分子ビーコンは、シグナル(例えば、フルオロフォア)を含み、このシグナルは、設計モノマー「1」にハイブリダイズする分子ビーコンとは異なる。例えば、分子ビーコン「0」(すなわち、設計モノマー「0」にハイブリダイズする分子ビーコン)はフルオロフォア「F0」を有し得、分子ビーコン「1」はフルオロフォア「F1」を有し得る。これらの両方は、互いに異なりかつ識別可能なシグナルを発する。

20

【0042】

一局面において、ビーコンと設計モノマーとの間のハイブリダイゼーションのパーセントは、約90%以上である。別の局面において、設計モノマーに対するビーコンのハイブリダイゼーションのパーセントは、約80%~約90%である。なお別の局面において、設計モノマーに対するビーコンのハイブリダイゼーションのパーセントは、約70%~約80%である。さらなる局面において、設計モノマーに対するビーコンのハイブリダイゼーションのパーセントは、約60%~約70%である。

【0043】

図4は、BDP複合体24を形成する、分子ビーコン「M1」18'または「M0」18'と一本鎖の設計ポリマー24とのハイブリダイゼーションを示す。このBDP複合体24において、M1分子ビーコン18'は設計モノマー「1」12'にハイブリダイズする一方で、M0分子ビーコン18'は設計モノマー「0」12'にハイブリダイズする。図4に示されるように、M1分子ビーコン18'はフルオロフォア「F1」を有するが、M0分子ビーコン18'はフルオロフォア「F0」を有する。これらの2つのフルオロフォアは、異なる波長のシグナルを発する(例えば、F1は青色を発し得る一方で、F0は橙色を発し得る)。

30

【0044】

本方法は、二進コードベースのポリマー(すなわち、設計ポリマー)への標的ポリヌクレオチドの変換を包含するので、本方法は2つのフルオロフォアのみを必要とする。一方のフルオロフォアは「0」を表し、他方のフルオロフォアは二進コード「0」+「1」の「1」を表す。当業者は、他のシグナル分子を、本明細書に記載されているものと矛盾することなく使用し得ることを認識する。

40

【0045】

ここで、ビーコン-設計ポリマー複合体がナノ細孔システムに導入され得る。本発明のナノ細孔システム(例えば、細菌の溶血素(α -HL)のようなタンパク質チャネル)を使用して、ポリヌクレオチドの長さおよび配列についての情報を取得し、細孔の改変された部分に対する種々の分析物の確率論的な結合動態(binding kinetics)を検出することができる。Kasianowicz, Jら、1996, PNAS USA, 93, 13770-3; Akesson, Mら、1999, Biophys. J.

50

, 77, 3227-33; Meller, A.ら、2001, PNAS USA, 97, 1079-1084; および Meller, A.ら、2001, Phys. Rev. Lett, 86, 3435-38 (これらの全体の教示は、参考として本明細書に援用される)を参照のこと。一局面において、ポリヌクレオチドは、一本鎖の分子(例えば、一本鎖の設計ポリマー)である。複数のナノ細孔を使用し得、そして多くの設計ポリマー、それゆえ多くの標的ポリヌクレオチドの分析を可能とし得ることに留意することが重要である。一局面において、ナノ細孔システムに使用される細孔の個数は、5個~約10個の範囲に及ぶ。より多くの細孔を使用することができることが当業者により認識されるはずである。

【0046】

ナノ細孔システムは、設計ポリマーを受容し、所定のプロトコルに基づいてそれらを分析することができる。ナノ細孔システムは、当該分野で周知の種々のデバイス(検出器が挙げられる)を備え得る。ナノ細孔システムを分子(例えば、レセプターなど)に結合させてもよい。

【0047】

当業者は、当該分野で周知の方法を利用し、薬品(または、ペプチド)(例えば、ナイスタチン);イオノフォア(例えば、A23187(Calcimycin)、ETH 5234、ETH 157(全てFluka, Ronkonkoma, N.Y.から利用可能な薬品));ペプチドチャンネル(例えば、Alamethicinなど)を使用して、化学的なチャンネルまたは細孔を脂質二重層中に形成することができることを認識する。

【0048】

本発明の範囲内であるナノ細孔システムとしては、米国特許第5,795,782号、同第6,015,714号、WO 01/81896 A1、およびWO 01/81908 A1(これらの教示は、参考として本明細書に援用される)に記載されるものが挙げられる。

【0049】

本発明のナノ細孔システムは、細孔分子(例えば、バクテリオファージ(LamB)または溶血素に対するレセプター)を有し得る。ナノ細孔システムに使用される装置は以下を備える:(a)イオン伝導性細孔またはチャンネル;(b)設計ポリマーを特徴付けるのに必要な試薬;および(c)設計ポリマーが細孔に侵入し前進するにつれての、細孔を横切ったコンダクタンスの変化を検出するための記録機構。種々の電子デバイスが利用可能である。それらは、本発明に使用される測定を実行するのに十分に感度がよく、コンピュータによる取得の収集(rates)能力および保管能力は、迅速な速度の配列データの蓄積に適している。

【0050】

他の細孔形成タンパク質としては、グラミシジン(例えば、グラミシジンA、B、C、DまたはS(Bacillus brevis由来;Fluka, Ronkonkoma, N.Y.から利用可能);バリノマイシン(Streptomyces fulvisimus由来;Flukaから利用可能)、大腸菌、赤痢菌属および他の腸内細菌科由来のOmpF、OmpCまたはPhoE、Tsx、F線毛、およびミトコンドリアポーチン(VDAC)が挙げられる。

【0051】

本発明で有用なチャンネルおよび細孔は変動し得る(例えば、最小の細孔サイズは約2nm~9nmである)。ポリマーを引き込む細孔サイズは、例えば、一本鎖のDNAに対して、約0.5nm~2.0nmである。

【0052】

同一のメンブレンに包埋された複数の細孔が存在してもよい。同一のメンブレンに包埋された多くの細孔(例えば、ナノ細孔)の組み合わせ、または「ナノ細孔アレイ」により、本発明に記載の光学的な読み取りプラットフォームは、大量の並行するシグナルの読み取りに適している。最近、研究者は、最先端の電子増幅CCDカメラを使用して、毎秒2

10

20

30

40

50

00フレームより速いフレームレートで256×256画素領域の読み取りを達成できることを示した。重要なことに、このフレームレートで、個々のフルオロフォアから発せられる光を解析し得ることが示されている。このことは、高度に並行化された(parallel)読み取りを達成できることを実証する。原理上は、半導体(solid-state)フィルム内に製造された100×100個の細孔のアレイは、単一のCCDカメラを使用して画像化され得る。したがって、読み取りのスループットは、単一のナノ細孔のスループットと比較して、約4桁の大きさを加速され得る。

【0053】

ヒトゲノムは、約 3×10^9 塩基対を含む。迅速かつ安価なゲノム配列決定を可能にする方法は、高度に並行化されなければならない。一局面において、1つのナノ細孔あたり、毎秒500塩基の本発明の読み取り速度は、100×100個の細孔を含む単一のチップ内で、全部で毎秒 5×10^6 ヌクレオチドの読み取りをもたらす。このことは、約10分以内にヒトゲノム全体を単回で読み取ることに等しく、最先端の方法よりも、4～5桁の大きさでの増大である。

【0054】

改変された電位型チャンネル(天然か、または不活化を除去するための改変後のいずれか)もまた本発明で使用することができ、かつ、例えば、ポリメラーゼの付着(組換え融合タンパク質)に適した物理的パラメータを有するか、またはポリマーの通過に適した細孔の直径を有する。電位型チャンネルの不活化特徴を変更する方法は、当該分野で周知である(例えば、Pattonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10905-09(1992); Westら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10910-14(1992); Auldら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:323-27(1990); Lopezら、Neuron, 7:327-36(1991); Hoshiら、Neuron, 7:547-56(1991); Hoshiら、Science, 250:533-38(1990)(これらの全体の教示は、参考として本明細書に援用される)を参照のこと)。

【0055】

本方法の一局面において、ナノ細孔は -HLである。米国特許第6,528,258号(これらの全体の教示は、参考として本明細書に援用される)を参照のこと。

【0056】

-HL細孔は、2つの主要な部分から構成される:約2.5nmの直径の空洞(「前庭」)および約1.5nmの直径のチャンネル(「基部(stem)」)(これは細胞膜を貫通している)。二本鎖のポリヌクレオチドドメインは、2.5nmの前庭部分に留まることができるが、1.5nmのチャンネルには侵入することはできない(dsDNAの直径は大体2.2nmである)。最近、短い平滑末端DNAヘアピン(3～8塩基対)の開閉(closing-opening)動態が、ナノ細孔を使用して、-HLの前庭にヘアピンを留ませ、ヘアピンの熱的に活性化された開口に必要とされる時間を検出することによって、直接測定されることが実証されている。ヘアピンの自発的な開口の際に、一本鎖のDNAは1.5nmのチャンネルに侵入し、細孔を流れるイオン電流の短時間(だが、識別可能な)の遮断を生じ、それによって、ヘアピン(または、二本鎖ポリヌクレオチド)の滞留からその最初の開口までの時間間隔の検出を可能にする。

【0057】

図5を参照して、ビーコン-設計ポリマー複合体24'は、ナノ細孔システム26に導入される。示されるように、設計ポリマー16''の一本鎖28が、ナノ細孔システム26の細孔30を通過する。一局面において、一本鎖部分は、設計ポリマー16''の3'末端である。一本鎖28(設計ポリマー16'')の移動のための駆動力は、ナノ細孔26を横切って確立される電場により提供される。2つの電極を使用することにより、電場を印加および使用して、二本鎖のビーコン-設計ポリマー複合体24'を「解離させる」。この電場(field)はまた、生じる一本鎖の設計ポリマー16''がナノ細孔に侵入するための駆動力を提供する。解離が起こるにつれ、分子ビーコンの部分32、34は

10

20

30

40

50

、システム 26 自身のチャンネル 30 においてか、またはその近傍で、設計ポリマー 16 ' 'との相互作用から遊離される。最初の先導する (leading) ビーコンが BDP 複合体 24 ' から外れるにつれて、それに続くフルオロフォアが最初のビーコンのクエンチャーから遊離され、それにより、フルオロフォアが発光し得、適切な検出器により検出され得る。例えば、図 5 における分子ビーコン 32 は、クエンチャー 22 ' 'を有し、これは、フルオロフォア F2 20 ' 'のシグナルをクエンチし、分子ビーコン 34 上に位置する。最初の分子ビーコン 32 が解離され、B-D 複合体から外れる場合、フルオロフォア F2 20 ' 'は、クエンチャー 22 ' 'の作用から遊離され、それによりそのシグナルを発する。図 5 b を参照のこと。最初の分子ビーコン 32 は自己ハイブリダイズし、その結果、そのクエンチャー 22 ' '部分が、そのフルオロフォア F1 20 ' をクエンチする。この自己クエンチ機構は、バックグラウンドのノイズを最小限にする。このプロセスは、設計ポリマー 16 ' '全体が分析されるまで反復させることができる。

【0058】

まとめると、設計ポリマーからハイブリダイズしたビーコンを解離 (または、融解 (melt off)) させるために、電圧ランプ (ramp) を印加すると同時に、(設計ポリマーへ) ハイブリダイズした分子ビーコンの一番目のフルオロフォアが検出され、記録される。先に記載されるように、解離は、電圧ランプの開始からほぼ 10 ms 後に生じ、フルオロフォアの記録に十分な時間を提供する。解離は、最初のビーコンの遊離と、設計ポリマーにハイブリダイズした次のフルオロフォアの即時の露出 (クエンチされないこと (un-quenching)) をもたず。遊離されたビーコンは、直ちに自己ハイブリダイズし、そして自身のフルオロフォアを自己クエンチングする。蛍光強度 (2 つの色のうちのいずれか) の変化は、次の電圧ランプの印加により検出および誘発される。このサイクルは、設計ポリマー全体が読み取られるまで反復する。一局面において、設計ポリマーはヘアピンを有する。最終的なヘアピンは、設計ポリマーの 5 ' 末端に配置され、分子が一方の方向 (すなわち、一本鎖の 3 ' 末端) でのみ、ナノ細孔システムに侵入することを強いる。ナノ細孔システムへの、かつそれを通っての設計ポリマーのトランスロケーション完了の際に、イオン電流が開口 (open) 細孔レベルに上昇し、光学系 (以下で考察される) は、ポリマーの読み取りが終了したこと (DNA が細孔を通過したこと) を検知する。

【0059】

DNA のより長い二本鎖ヘリックスドメイン (50 bp) の力 (force) に誘発される解離は、HL の細孔を使用して実証されている。Sauer-Budger, A. F. ら、2003, Phys. Rev. Lett., 90, 238101 (これらの全体の教示は、参考として本明細書に援用される) を参照のこと。特徴的な通過 (細孔への一本鎖の滑走 (sliding) を含む) 時間とそれらの解離時間とが、印加される電圧 (140 mV ~ 180 mV の範囲) に対する指数関数的な相関関係にしたがうことが見出されている。したがって本発明において、ビーコンを解離させるために印加される電圧を、繊細な制御パラメータとして使用して、(DNA に沿う連続的なビーコンの) 各々の解離工程の間の時間遅延を決定することができる。このことは、本発明者らの最近のデータにより詳細に示されている (図 10 ~ 図 15)。

【0060】

電圧に制御される解離は、Biophysical Journal: Mathes J. ら、2004 Biophys. J. 87, 3205-12 (この全体の教示は、参考として本明細書に援用される) に記載されている。この論文は、長い相補的な一本鎖の DNA にハイブリダイズした短いオリゴヌクレオチド (約 10 塩基) が、電圧に制御される様式によりナノ細孔内で解離され得、この解離プロセスの特徴的な時間スケールが電圧に強く依存し、さらに、この時間を、1 ms ~ 10 ms の範囲内であるように選択することができることを実証する。この時間スケールは、非常に重要であり、これは、以下のことを示す: (a) 細孔内の DNA のトランスロケーション速度を制御することができ、特に、これは、DNA プローブの解離により減速され得る。トランスロケーションが減速され

10

20

30

40

50

る量は、DNAとハイブリダイズしたプローブとの相互作用の強さおよび印加された電圧に指数関数的に依存する。したがって、プローブの配列を選択することにより、異なるレベルの「減速」を達成することができる。印加される電圧を使用して、解離、それゆえトランスロケーション速度を調整することができることも示されている。DNAトランスロケーションの減速は、この分野において長年にわたる課題である；ならびに(b)研究者は、単一のフルオロフォアの光学的な検出に適合する速度(1塩基あたり、0.1ms~50ms)の範囲までトランスロケーションを減速することができた。この減速がない場合、読み取り時に光子のノイズが著しく目立ち、既存の技術を使用して、単一のフルオロフォアの読み取りを実現することはできない。

【0061】

本発明にしたがう使用のための光学因子(optical agent)は、例えば、クエンチャー分子と近接した場合にクエンチされる蛍光分子を含む。蛍光および、この挙動を示す他の型の分子、ならびにこれらの化合物の特定の特性(例えば、蛍光減衰時間、吸光スペクトル、発光スペクトル、光安定性、および量子効率)を記載する、広範な文献が利用可能である(例えば、Gilbertら、Essentials of Molecular Photochemistry, CRC Press, 1991; Laxowicz, JR, Principles of Fluorescence Spectroscopy(第2版), Kluwer academic 1999(これらの全体の教示は、参考として本明細書に援用される)を参照のこと)。蛍光のクエンチングの詳細な説明が利用可能である(例えば、Kavarnosら、Chem. Rev. 86: 401, 1986; Wagoner, Methods Enzymol. 246: 362, 1995; Millar, Curr. Opin. Struct. Biol. 6: 637, 1996; Petitら、Biol. Cell 78: 1, 1993(これらの全体の教示は、参考として本明細書に援用される))。

【0062】

近年、単一の蛍光分子の検出において、大きな進展がなされている(例えば、Mathisら、Bioimaging 5: 116-128, 1997; Haら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6264-6268, June 1996; Goodwinら、Ace. Chem. Res. 29: 607, 1996; Mullerら、Chem. Phys. Lett. 262: 716, 1996; Sauerら、Chem. Phys. Lett. 254: 223, 1996(これらの全体の教示は、参考として本明細書に援用される)を参照のこと)。このような分子は、特徴的な蛍光減衰時間を有し、かつ分子の電子的な環境に感受性であり、それゆえ、その環境を変更するポリマーとの会合よりクエンチされ得る。

【0063】

本発明において使用することができるフルオロフォアの例としては、TMRおよびCy5が挙げられる。使用され得る他の型の蛍光分子は、CPM, Molecular Probes, Inc.からのAlexaシリーズの蛍光マーカー、ローダミンファミリー、およびTexas Redである。当業者に公知の他のシグナル分子は、本発明の範囲内である。本発明において、多くの他のフルオロフォアが使用され得、それらとしては、米国特許第6,528,258号(この全体の教示は、参考として本明細書に援用される)に列挙されるものが挙げられる。

【0064】

本発明で使用され得るクエンチング分子としては、ダブシル(Dabcyl)、ダブシル(Dabsyl)、および、メチルレッドが挙げられる。当業者に公知の他のクエンチャー分子は、本発明の範囲内である。

【0065】

本発明で使用される検出システムは、使用されている光学因子に依存する。検出システムは、本明細書に記載の配列決定法に関連する、時間スケール上での光学因子の光学特性の変化を検出することが可能でなければならない。一局面において、フルオロフォアは、

10

20

30

40

50

光学因子として使用される。したがって、適切な蛍光検出器が妥当である。当業者は蛍光検出器を熟知する。

【0066】

図6を参照して、パネル(a)は、印加された電圧対時間(ミリ秒)を示す。単一のナノ細孔チャンネルを流れるイオン電流のリアルタイム分析において、一本鎖のポリヌクレオチドが細孔に侵入するにつれて、ナノ細孔システムの電圧ランプが引き起こされる。ナノ細孔への一本鎖のポリヌクレオチドの侵入(細孔電流の急落により合図される)から約0.1ms以内に、電圧は「保持(holding)」レベルへ低下し、その後一定の割合で上昇する。図6bは、測定された、細孔を通るイオン電流を示す。チャンネルへ分子の一本鎖部分が侵入した後、細孔電流は、その閉鎖(blocked)レベル(開口細孔電流の約10%または約10pA)まで低下する。電圧ランプが始まると、電流は最初は、閉鎖レベルに留まるが、 $t \sim 10$ msにおいて、電流が開口細孔レベルまで急激に上昇する。なぜなら、二本鎖ポリヌクレオチドが解離し、迅速に細孔を通過するからである(細孔の通過は、0.05ms未満続く)。解離電圧(破線)は、容易に測定することができる。

10

【0067】

図7を参照して、(A)、(B)、(C)および(D)により表される4つの異なる工程が示され、これらはサンプルポリヌクレオチドの代表的な分析において生じる。これらの工程は、配列決定が完了するまで反復され得る。上部のパネルは、ナノ細孔チャンネル30を流れるB-D-P複合体24'の侵入および移行を示す。中央のパネルは、光子カウント/ms対時間を示し、そして下部のパネルは、記録されている電圧を示す。

20

【0068】

工程(A)において、設計ポリマー28'の一本鎖の突出が、電場により引き入れられるにつれて細孔30'が侵入する場合には、読み取りを開始する。細孔30'を流れるイオン電流の急激な低下(これは、設計ポリマー28'の侵入に起因する)は、以下により読み取りを始動させる: 1)「駆動(driving)」レベルから「保持(hold)」レベルまで電圧を低下させ、最初の電圧ランプを開始すること; および2)例えば、蛍光分析用のレーザーの電源を入れる。設計ポリマーにハイブリダイズした最初のビーコンはクエンチされないため、それに対応する蛍光レベルの即時の上昇を引き起こす(中央パネルの薄いトレースとして示される)。代表的な解離時間は約10msであることに留意すること。この時点で、最初のクエンチされていないフルオロフォアから発せられた光子が適切な検出器により記録される。

30

【0069】

工程(B)は、最初のビーコン32'が解離された直後に開始される。分子ビーコン32'の解離は、一本鎖の設計ポリマー16''がナノ細孔26のさらに内部へ移動することを可能にする。この解離プロセスは、分子ビーコンを遊離することにより、次のフルオロフォアがクエンチされないことをもたらす。遊離したビーコンは、熱力学的な力によって自動的に自己ハイブリダイズし、それゆえ、ビーコン自身のフルオロフォアがクエンチされる。自己ハイブリダイズしたビーコンは、最終的に拡散する。有利なことに、この特徴は、バックグラウンドのノイズを回避するか、最小限にするのに役立つ。生じる蛍光シグナル(中央パネル)は、フルオロフォア34に対応する赤色(暗色)発光の増大、ならびに分子ビーコン32'の喪失および自己ハイブリダイゼーションに対応する橙色(明色)発光の低下を示す。ビーコンが自己クエンチするのにかかる限定された時間によって、最初のビーコン32'のクエンチングにわずかな遅延(約50 μ s)が存在する。このわずかな遅延時間の間に、移行を正確に指し示すのに使用することができる、フルオロフォア32'と34との両方からの蛍光強度が存在し、これを、電圧ランプを始動させるのに使用することができる。

40

【0070】

工程(C)において、最初のビーコン32'に対する類似の読み取りが存在し、これは、より明るい線により示される。同一の型に由来する両方のビーコンが読み取られる工程

50

(C)と工程(D)との間に、橙色の強度(明灰色)に一過的な急上昇(spike)が存在することに留意すること。これは、先に説明されるように、2つのフルオロフォアの寄与に起因する。この方法で、システムは、設計ポリマー全体を読み取る。設計ポリマー16'''がその5'(その3'ではなく)から細孔に侵入することを防止するために、7塩基のヘアピン36を、設計ポリマー16'''の変換プロセスの間に付加することができる。このヘアピン26は、最終的に解離され、設計ポリマー16'''がナノ細孔システム26の内部または前庭へ完全にトランスロケーションすることを可能にする。

【0071】

本発明はまた、ポリヌクレオチドの配列を決定するための装置にも関する。メンブレンに包埋されたナノ細孔の内部を通過した、個々のDNA分子からの蛍光シグナルの検出のための光学系300が、本明細書に記載される。

10

【0072】

図8は、本発明の配列決定法と組み合わせて使用することができる光学系300の概略図であり、ここで、システム300は、光学的なシグナルの検出に必要な構成要素を備える。詳しくは、図8は、1つ以上の二重層メンブレンを使用する、単一の分子の光学的な検出のための光学的な構成を示す。

【0073】

本光学系300は、ナノ細孔支持体304と2つの電極306および308とを含む特製のフローセル302を備える。電極306および308を使用して、解離プロセスに必要な電場を印加する一方で、支持体304は、ガラスカバーリップ312の近位にリン脂質二重層310を懸架することを可能にし、それにより、高倍率の顕微鏡の対物レンズ314を使用して二重層310の画像化を可能にする。フローセル302を、特製の倒立顕微鏡内のXYZナノポジショナー316にマウントされ、平行移動ステージを使用して、光軸208と正確に位置合わせするために移動され得る。

20

【0074】

フルオロフォアは、ダイオードレーザー318から光学系300へ放射された光により励起され得る。レーザー318は、単一モード、偏光保存性光ファイバー320と連結された、532nmの半導体レーザー(例えば、New Focus 3951-20またはPoint Source iFLEX 2000)であり得る。レーザー光は、ミラー321を介して、自家製(home made)の調整可能なビームエクspander(5x)322に向けられ、拡大され、ミラー324および326ならびにダイクロイックミラー328(Chroma z532 rdc)を使用して、対物レンズ314の背後の開口部に向かう。

30

【0075】

レーザー光は、対物レンズ314の焦点でわずかに拡大され、より大きな照射面積を可能にする。ビームの拡大は、入射する拡大されたレーザー光を顕微鏡の対物レンズ314への入り口でわずかに発散させることにより達成される。ビームエクspander322上のレンズの一つを他方のものに対して動かすことにより、ビームは、対物レンズ314の焦点でわずかに焦点を外され(defocus)、より大きな照射面積(約10 μ m)を達成する。蛍光の発光は、同一の対物レンズ314を使用して収集され、ロングパス(long pass)フィルター330(Chroma hq560 lp)を使用してフィルター処理される(filtered)。次に、光は、フレーム転送バック照射(back illuminated)冷却CCDカメラ332、または、まずピンホール334に光の焦点をあわせ、2つの高速検出用のアバランシェ光ダイオード点検出器336および338(Perkin Elmer SPCM AQR-14)上でピンホールを画像化することのいずれかにより画像化される。光学系300(励起経路と発光経路を除く)は、遮蔽された銅製の箱(示さず)に完全に封入され、ひろいあげる電磁気ノイズを低減する。CCDカメラを使用することにより、数個の細孔が、同時に画像化されること可能にし、それにより検出システム300のスループットを増大させる。

40

【0076】

50

機器制御およびデータ収集のソフトウェアを使用して、自動的な位置決めおよび単一の分子の画像化ならびにリアルタイムのナノ細孔力 (force) 分光法を制御する。蛍光と電流との両方のデータ収集のための主要なトリガーは、ナノ細孔 302 に侵入する単一の分子の閉鎖電流シグナルである。ハードウェアの電気機器は、以下の 3 つの PC ボードを備える: P Z T コントローラを有するインターフェースへの高速デジタル I / O (P h y s i k I n s t r u m e n t e P I - E 7 1 0)、光子計数ボード (N a t i o n a l I n s t r u m e n t s P C I - 6 6 0 2)、およびイオン電流をサンプリングし、細孔を横切ったのプログラム可能な電圧勾配を生成する高速 A / D ボード (例えば、 N a t i o n a l I n s t r u m e n t s P C I - 6 0 5 2 E)。

【 0 0 7 7 】

10

機器は、約 20 μm のリン脂質二重層を水平に支持し、緩衝溶液を交換するために使用される特製の微小流体 (microfluidic) セルから構成される。図 9 を参照して、微小流体セル 402 が示され、これは、以下を備える: (a) 石英基板 404、(b) 特製の (custom machined) ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) フィルム 406、(c) ポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のチャンバー 408、(d) 覆い 410、ならびに (e) 電極 412 および 414。20 ~ 30 μm の開口部 416 は、機械的なインプリントにより PTFE フィルム 406 内に製造される。挿入図 416 は、RNA 分子 422 を含むメンブレン 418 と -HL 細孔 420 とを示し、メンブレン 418 は、開口部 416 により支持される。

【 0 0 7 8 】

20

図 10 は、PTFE フィルム 406 内に製造された約 30 μm の開口部 416 の SEM 像を示す。メンブレン 418 は、12 μm 厚のテフロン (登録商標) フィルム 406 内の円状開口部 416 に懸架され、約 100 μm、ガラスカバースリップ 424 の上方にある。このことは、60x / 1.2 N.A. 水浸顕微鏡対物レンズ 426 (Olympus UPLAPO60XW) を使用して、メンブレン 418 の高分解能の蛍光画像化を可能にする。これは、油浸を使用する先行技術の設計とは対照的である。油浸対物レンズではなく水浸顕微鏡対物レンズ 426 (高 NA) を使用することは、より長い作業用距離を提供する (約 250 μm)。テフロン (登録商標) フィルム 406 は、特別なチュービング (tubing) による流体の交換に利用できる 2 つの小型のチャンバー 428 と 430 (それぞれ約 50 μl) とを分ける。2 つの Ag / Ag - Cl 電極 412 および 414 は、流体チャンバー 428 および 430 と接触し、高分解能のパッチクランプ上部ステージ (head-stage) の増幅器 (示さず) (例えば、Axon Instruments 200U) に接続される。これらを使用して、メンブレンを横切ったの電圧を印加する。

【 0 0 7 9 】

30

図 9 を参照して、ナノ細孔 (例えば、-HL 細孔 420) は、文献 (例えば、Meller, A. ら、(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 1079 - 1084; Meller, A. ら、(2001) Phys. Rev. Lett. 86, 3435 - 3438 (全て、参考として援用される) を参照のこと) に記載される方法を使用して、メンブレン 418 に包埋され、そして細孔 420 を通って流れるイオン電流が、パッチクランプ増幅器を使用して測定され、リアルタイムで分析される。先に検討されるように、セル 402 は、XYZ ナノポジショナー (例えば、Polytec PI - P527.3CL) 上にマウントされ、対物レンズの視野でセル 402 とナノ細孔 420 とを正確に位置合わせし、シグナルのリアルタイム分析に基づいて側面で蛍光標識されたナノ細孔 420 を追跡することを可能にする。

40

【 0 0 8 0 】

メンブレンセルの少なくとも 2 つの異なる実施形態が存在し、これらは本発明の範囲内である。メンブレンセルは、上部の流体チャンバーおよび下部の流体チャンバーを有する特製の PDMS ガスケットにテフロン (登録商標) フィルムを包埋することによって作製され得る。PDMS ガスケットは、支持プラスチックキャップに収容される。セルは、

50

幅約25mm、厚み約3mmである。これは、チュービングを使用するのに利用可能な下部チャンバー(約10 μ l)を備える。下部チャンバーのAg/AgCl電極およびテフロン(登録商標)フィルムは、PDMSガスケットに包埋される。セルは、ガラスカバースリップにより底面から覆われ、このガラスカバースリップを通して画像化が行われる。

【0081】

あるいは、メンブレンセルは、2つの同軸シリンダー、上部チャンバーおよび下部チャンバーからなり得、これらは、互いに数ミリメートルスライドし得る。上部チャンバーの底面において、テフロン(登録商標)フィルムは熱により融合される。上部チャンバーは、テフロン(登録商標)フィルムがカバースリップに達するまで、下部チャンバー内を自由にスライドし、顕微鏡により下から画像化され得る。約20 μ mの円状開口部が、脂質二重層を支持するために使用されるテフロン(登録商標)フィルム内に製造され得る。下部チャンバーは、幅約20mmのチャンバー(高さ6mm)であり、その底面に配置される薄いガラスカバースリップを支持する。セルは、流体チュービングと2つの電極とに接続される。

【0082】

本発明の一実施形態は、所定のサンプルマトリクスにおいて、ポリマーの個数または量を定量化することに関する。例えば、ポリマーは、ポリヌクレオチドであってもよい。一局面において、所定のポリマーがサンプル内にあると推定される。この局面において、少なくとも一部の配列が既知である。この部分は、約5ヌクレオチド~約50ヌクレオチド以上の範囲に及び得る。本発明の方法を使用して、設計モノマーは、目的のポリヌクレオチドにハイブリダイズするように設計され得、そして本明細書に記載されるナノ細孔システムを使用して、標的ポリヌクレオチドが検出および測定され得る。

【0083】

本発明の別の実施形態は、サンプルマトリクスにおいて、ポリヌクレオチドの検出に関する。所定のヌクレオチド配列に特異的な設計モノマーが構築され得る。これらの設計モノマーは、ポリヌクレオチドを含むサンプルへ導入され得る。サンプルは、異種サンプルであっても、同種サンプルであってもよい。設計モノマーは、当業者に周知のハイブリダイゼーションに適切な条件下でサンプルに導入される。したがって、本発明の方法を使用して、所定の設計モノマーにハイブリダイズするポリヌクレオチドが単離および/または加工され得る。

【0084】

特定のポリヌクレオチド配列の検出は、本発明の方法により達成され得る。例えば、PCRに使用されるポリメラーゼのフィデリティは100%ではなく、それゆえPCRを使用して生成されるポリヌクレオチドは、配列のフィデリティについてモニタリングされなければならない。本明細書に記載される方法を使用して、熟練者は、ポリメラーゼおよびPCRプロセス全体のフィデリティを確かめることができる。標的ポリヌクレオチドの一部を反映し、続いて本方法を使用して配列決定され得る設計ポリマーを形成する、所定の設計モノマーが構築され得る。

【0085】

一実施形態は、所定のポリヌクレオチド配列内の単一または複数の突然変異の検出に関する。標的配列が部分的に既知であるか、またはその全体が既知であると仮定すると、ポリヌクレオチド配列の試験を達成することができるように設計モノマーが構築され得る。設計モノマーは、設計ポリマーを形成するハイブリダイゼーションに適切な条件下で、推定標的ポリヌクレオチドを有するサンプルマトリクスに導入され得る。次に、この構築物は、配列決定のための本発明の方法に供され得る。突然変異は、1つ以上の設計モノマーのミスマッチにより反映される。

【0086】

本発明の一実施形態は、情報の保管に関する。本発明が任意のポリヌクレオチド配列に対する二進コードを利用することを考えると、ヌクレオチド配列を、二進コードのみを使用して保存することができる。一局面において、設計ポリマーは、ちょうどコンピュータ

10

20

30

40

50

ファイルのように数（「0」および「1」）の配列をコードするように設計され得る。ある意味では、DNAを、静的な、超高密度の保存媒体とみなすことができる。本発明のナノ細孔システムは、配列にコードされる情報を回収する（読み取る）のに有効な手段である。

【0087】

本明細書に記載される方法は多くの実用的な応用を有し、これらは本発明から逸脱しないことが当業者により理解されるべきである。

【実施例】

【0088】

（実施例： - HLを使用する、個々のDNAヘアピン分子のナノ細孔解離）

時間依存的な電場によるナノ細孔測定（例えば、配列決定法）を可能にするために、解離法を開発した。本解離法は、解離電圧を可変にしたまま、細孔への侵入速度を最適化する高い電圧を使用する。したがって、数百の個々の分子を、短い間の時間（数秒間）で調べることができる。本方法は、ポリヌクレオチドの通過の間に、熟練者が、ナノ細孔を横切って印加される電場を迅速に変化させることを可能にする。

【0089】

この解離法は、30 mV ~ 150 mVにわたる広範囲の電圧、そして異なる負荷速度（0.5 V/s ~ 100 V/s）で、個々のDNAヘアピン分子の解離動態を研究するのに特に有利である。さらに、本方法は、一定の力ではなく一定の負荷速度が印加される動態作用の測定を可能とする。これら2つの相補的な測定は、DNAヘアピンの小さなエンタルピー変化を1 kcal/molに至るまで決定することを可能にする。

【0090】

DNAヘアピンのナノ細孔解離プロセスには、以下の3つの連続的な工程が存在する：（A） それ自身の二本鎖（ヘリックス）部分が - HLの2.5 nm前庭に滞留するまで、一本鎖のDNA突出（50 nt）が進入およびスライドすること；（B） ヘリックス部分の解離；ならびに（C）解離された一本鎖部分が細孔を通過してトランスロケーションすること。

【0091】

図11 ~ 17を参照して、異なる電圧で、代表的な時間スケールを決定するための工程を特徴付けた。能動的な電圧制御法を使用することにより、突出の侵入（部分A）は、その他の工程から切り離され得、そして、解離された鎖（部分C）のトランスロケーション時間は、代表的な解離時間より大幅に短いので、これを無視することができる。

【0092】

最初に、実験により、10 bpヘアピンの解離についての代表的な時間スケールがssDNAの通過時間よりもかなり短いことを示すことによって、電圧の関数として、細孔内の一本鎖のDMA（「ssDNA」）通過に伴う時間スケールを特徴付けた。次に、30 mV ~ 150 mVの範囲に及ぶ定常（または、工程の作用）電圧についての解離動態の情報を示し、細孔内のDNA鎖についての有効電荷を決定した。最後に、実験により、負荷速度に対する解離動態の依存性を示した。データは、他の単一の分子（「SM」）解離（unbinding）実験のために開発されたものと類似する、単純な理論的なモデルを使用して解釈した。

【0093】

（材料と方法）

PAGEで精製されたssDNAおよびDNAヘアピン（Eurogentec, San Diego, CA）を、10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.5溶液中で緩衝化させ、測定の前に、10分間、75 °Cまで加熱し、その後、4 °Cまで急冷した。ヘアピン分子は、3'の一本鎖の突出（50マーのポリ-dA）、以下の配列（自己相補的な部分には下線が施してある）を有し、介在する6塩基ループを含む10 bpのヘリックス部分から構成されている：

【0094】

10

20

30

40

50

【化1】

HP1: 5'-GCTCTGTTGCTCTCTCGCAACAGAGC(A)₅₀; (配列番号 1)

さらに、5'末端から5番目の塩基に単一の(TT)ミスマッチを有する、同様なヘアピン(HP2)を、以下の配列とともに調製した:

【0095】

【化2】

HP2: 5'-GCTCTGTTGCTCTCTCGCAACTGAGC(A)₅₀; (配列番号 2)

10

また、7bpのヘリックスヘアピン(HP3)は、以下の配列を有する:

【0096】

【化3】

HP3: 5'-GTCGAACTTTTGTTCGAC(A)₅₀; (配列番号 3)

(水平に支持された平面状脂質二重層に -HLチャネルを再構成するのに使用される基本的な装置および実験法は、先に記載される)。システムの温度を、特注のセル設計を使用して、 15.0 ± 0.1 に維持した。緩衝溶液は、1M KCl、10mM Tris-HCl、pH 8.5であった。これらの条件下での -HL開口細孔コンダクタンスは、順方向バイアス(forward bias)で0.82pSであった。パッチクランプ増幅器(Axopatch 200B, Axon Instruments, Union City, CA)を使用して、イオン電流を測定し、100kHzローパス(low-pass)4極Butterworthフィルター(Krohn Hite 3302, Avon, MA)を使用して、シグナルをフィルター処理した。DAQカードを使用して、シグナルを1MHz/22ビットでデジタル処理した。全ての制御ソフトウェアおよび取得ソフトウェアを、National Instruments' LabViewを使用して作成した。装置は、膜を貫通する印加電圧を制御するために使用するフィードバックループを内蔵する。制御電圧による、工程に対する膜電位の応答時間は、 4 ± 1 μ sであった。各々の実験(電圧または電圧ランプにより設定される所定の条件で実行された)において、代表的にデータを、1,000回より多い解離事象を収集した。ソフトウェアおよびハードウェアは、高スループットの無人のデータ収集を可能にし、その結果、各々の実験についての総取得時間は約10分間であった。

20

30

【0097】

各々の解離事象は、以下の3つの部分からなる: 1)ヘリックス部分が -HLの前庭の内部に引っかかるまで、一本鎖の突出が通過およびスライドすること; 2)低電圧で細孔内にヘアピンを保持すること; および3)二本鎖DNAを解離させること。

【0098】

第一の部分と第二の部分とを設計して、第三の部分のためのシステムを調製し、その結果、解離が、細孔に対する分子の所定の構成で常に開始する。

40

【0099】

あらゆる単一の分子の実験と同様に、分子間または事象間のバリエーションは不可避である。コントロールの測定のセット(以下に記載される)が存在し、データの散乱を低減するために、多数回の解離実験を反復した。解離部分は、以下の2つの型の測定からなった: 定常の力での解離、および固定の負荷速度での解離。これらの実験は、「結果」のセクションで記載される。

【0100】

最初の2つの部分(スライドおよび保持)について選択した電圧および時間は、全ての実験において変えなかった。図11は、一定の力で実行した代表的な解離事象の最初の数

50

ミリ秒 (ms) を示す。上部のパネルは、時間の関数として印加される電圧を示し、下部パネルは、生じた細孔電流である。事象は、細孔内での一本鎖のポリ (dA) 末端の通過から始まる。チャンネルへのポリヌクレオチドの侵入は、開口細孔電流の急激な低下により検出され、これは取得システムのトリガーを作動させ、かつ $t = 0$ の点 (破線) を規定する。分子は、 $V = 220 \text{ mV}$ でチャンネル内に、 $t_d = 300 \mu\text{s}$ の時間で引き込まれる。結果に示されるように、この時間は、40 マーの DNA について最も可能性のあるトランスロケーション時間 (t_p) よりもわずかに長いように選択した。したがって、 $t = t_d$ において、大半の DNAヘアピンが -HL の前庭内に完全に滞留することが予測される。この仮定を、以下の2つの相補的な測定により確かめた：最初の実験において、 t_d は $50 \sim 700 \mu\text{s}$ まで変動し、 $t = t_d$ において、 $V = -120 \text{ mV}$ への電圧の逆転に際しての、遊離 (escape) 時間の分布を測定した。 $50 \mu\text{s}$ と $300 \mu\text{s}$ との t_d 値の間に分子が細孔から引き抜かれるのに必要とされる代表的な時間に単調な増加が存在した。しかし、 $t_d > 300 \mu\text{s}$ に関して、曲線は一定のレベルに飽和し (saturate)、このことは、DNA の一本鎖の突出がチャンネルを通過し、その後、二本鎖のヘリックス部分が前庭に侵入した場合に停止したことを示した。さらに、証拠は、 t_d の間における、閉鎖イオン電流のレベルの分析から得られた。詳しくは、平均の電流 ($t_d = 300 \mu\text{s}$) は、明確な2つのピークを示した：約 6 pA での低電流の主要なピーク、および通常のポリ (dA) 閉鎖レベル (約 11 pA) における副次的なピーク。より低い電流のピークは、-HL の前庭を占めるヘアピンのヘリックス部分による、細孔のさらなる閉鎖に起因した。

10

20

【0101】

$t = t_d = 300 \mu\text{s}$ での解離したヘアピンの画分はほんのわずかであった。 $V = 120 \text{ mV}$ でのヘアピン分子のトランスロケーションの確率分布を測定することにより、この画分を定量化した (データは示していない)。この分布から、 $t = t_d = 300 \mu\text{s}$ での解離したヘアピンの画分は 0.5% 未満であることを推定した。 $t = t_d$ での DNA の最初のスライドに続いて、時間 $t_H = 500 \mu\text{s}$ の間、電圧を、低い「保持」電位 (20 mV) まで低下させた。この電圧は、前庭内にヘアピンを保持するのに十分大きい。以下に示されるデータから明らかのように、著しい解離を誘発するには小さいことが見出されている。 $500 \mu\text{s}$ を選択したことは、便利ゆえであった (実験の別のセットにおいて、5 秒間まで、ヘアピンを細孔に保持した)。保持期間の終わりにおいて、解離電圧である V_U (または、負荷速度)

30

【0102】

【化4】

$$\dot{V} = dV/dt$$

を印加した。

【0103】

(結果)

(ssDNA のトランスロケーション時間の分布)

40

各々個々の DNA のトランスロケーション時間 (t_T) は、-HL の細孔のチャンネル部分内へ最初の数塩基の DNA 分子の侵入から、チャンネルの他方の側から分子が抜け出るまでの時間間隔として規定される。これらの事象は、開口細孔電流の約 10% までの、細孔を流れるイオン電流の急激な低下により明確に観察される。ヘアピンの場合に、DNA は、その一本鎖の $3'$ 突出によりチャンネルに侵入することしかできない。なぜなら、その他方の末端のループは、細孔に侵入するには大きすぎるからである。この場合において、 t_T は、上記の3つの連続的なプロセスの合計である (すなわち、 $t_T = t_{s1} + t_{unzip} + t_{s2}$ 、ここで、 t_{s1} は、一本鎖の突出 (ポリ (dA) 50) のスライド時間であり、 t_{s2} は、解離したヘアピン + ループ (26 塩基) のスライド時間であり、そして t_{unzip} は解離時間である)。

50

【 0 1 0 4 】

図 1 2 は、 $V = 120 \text{ mV}$ および 150 mV で測定される、一本鎖の DNA (ポリ (dA)₉₀) のトランスロケーション時間の分布を示す。ヒストグラムを約 1,500 回の個々の事象から構築した。ssDNA の分布は、 $t_p = 0.5 \text{ ms}$ での顕著なピークを示し、これを使用してプロセスを特徴付けた。 $t_T > t_P = 0.5 \text{ ms}$ (最も可能性のあるトランスロケーション時間) の後、分布は、 0.32 ms の時間定数を有する、単一の指数関数にフィットする。先の研究は、 t_P が塩基の個数 (22 マー以上) とともに線形に上昇することを実証した。したがって、ポリ (dA)₉₀ のトランスロケーション分布から、 t_{s_1} が 0.28 ms ($0.5 \text{ ms} \times 50 / 90$) であることを推定した。この時間は、同様な方法で測定される DNAヘアピンの特徴的な t_T (約 $2 \text{ ms} \sim 10 \text{ ms}$) (データは示していない) よりも大幅に短いことに留意すること。それにもかかわらず、以下に記載されるように、解離プロセスから最初のスライドを切り離すことが可能であり、それにより、 t_{s_1} を完全に除去する。

10

【 0 1 0 5 】

解離プロセスへの t_{s_2} の寄与を、 V の関数として、ポリ (dA) のトランスロケーション時間の研究から推定することができる。これらの測定に基づいて、26ヌクレオチドに関して、 t_{s_2} は 30 mV で約 $660 \mu\text{s}$ 、 150 mV で約 $100 \mu\text{s}$ と推定される。電圧の関数としての t_{s_2} の推定値を、各々の事象で測定される解離時間全体から引くことができ、 t_{unzip} についてのより正確な推定を得ることができる。この補正は小さく (以下参照のこと)、結果に影響しない。

20

【 0 1 0 6 】

t_{s_2} の測定はまた、1ヌクレオチドあたりの平均スライド時間 (例えば、 100 mV で $6 \mu\text{s}$) についての考えを与える。以下に示されるように、この時間スケールは、細孔内での解離機構の解明に重要である。ヘアピンが細孔内で滞留される場合、その解離動態は、再会合 (re-zipping) とスライドプロセスとの間の競合により影響される (解離したヌクレオチドは、ヘアピンと再会合 (rejoin) し得るか、またはチャンネルに沿ってスライドし得、それによって再会合をブロックする)。再会合時間と比べて、スライド時間が短い場合、再会合が阻害される。対照的に、スライド時間が長い場合、解離を完了する前に、ヘアピンは、開閉 (opening-closing) の移行を頻発する。

30

【 0 1 0 7 】

(1 . 一定の力での解離動態)

定常電圧 (または、力) での DNAヘアピンの解離を研究した。電圧の急激な変化をナノ細孔を横切って印加し、そして解離動態を測定した。この実験で使用した代表的な電圧および電流のトレースを図 1 3 に示す。DNA は、時間 $t = 0$ でチャンネルに侵入する。図 1 0 に説明されるように、分子は、短時間の間、細孔内に引き込まれ、保持される。 $t = 0.8 \text{ ms}$ において、解離電圧 (90 mV) を印加するが、解離が $t = t_U = 70 \text{ ms}$ (電流の急激な上昇により示される) で生じるまで、電流はブロックされる (より低いレベル)。解離電圧 V_U を印加すると、電流は、その適切な閉鎖細孔レベルまでわずかに上昇し (細孔電流の拡大図については、図 1 1 を参照のこと)、 $t \sim 70 \text{ ms}$ (解離電圧の印加から測定される) まで、この閉鎖レベルに留まった。この時点において、電流は、この電圧に対応する開口細孔電流レベルまで急激に上昇した。解離したヘアピンのスライド時間は、図 1 3 の時間スケールで決定するには短すぎるので、この移行は、ヘアピンの解離の瞬間を示す。1分間あたり約 100 回の個別の解離事象を累積する自動化手順を使用して、解離プロセスを反復した。

40

【 0 1 0 8 】

時間間隔 $[0 \sim t]$ (ここで、 $t = 0$ は、 V_U が印加される瞬間として規定される) 内で解離事象が生じる確率を計算することによって、データを分析した。この計算のために、約 1000 回の解離事象を取得し、時間 t を中心とする $50 \mu\text{s}$ の時間枠 (time window) 内に測定された平均細孔電流をプロットした。電流の分布は、ブロックさ

50

れた細孔の状態および空の細孔の状態にそれぞれ関する、2つの良好に分離したピークを示す(図13の挿入図)。事象の総数に対する「空の細孔」(高電流)事象の個数の比を計算することによって、時間tにおける累積の解離の確率を取得した。以下の電圧レベルを使用した:(円)30mV、(正方形)60mV、(三角形)90mV、(逆三角形)220mVおよび(菱形)150mV。上記の測定を V_U の種々の値(30mV、60mV、90mV、220mVおよび150mV)で反復し、同様の分析手順を適用した。探索時間の関数として、11ヘアピンを解離する確率を表すデータを、図14に示す。PUNZIPを、各々の探索時間に関して、事象の総数に対する、高い電流ピーク下での事象の個数の比として計算した(図13の挿入図を参照のこと)。短時間(すなわち、 $t < 1$ ms)で、 V_U の振幅(amplitude)に関係なく、解離の確率は非常に低い。 $t \sim 10$ msにおいて、小さな V_U 値と大きな V_U 値との間の解離の確率に明確な差異が存在する。解離の直後に、細孔を通過しての26nt(一本鎖)のトランスロケーションが続くので、測定した解離時間は、以下の2つの期間を含む:真の解離時間および26マーのスライド時間(t_{s2})。先に説明されるように、 t_{s2} を推定することにより、測定を補正した。しかしながら、補正は、解離時間よりもはるかに小さい(約1%)ので、結果に非常にわずかな影響しか与えない。

10

【0109】

図14に示される解離の確率分布を、単一の指数関数によってフィットさせ、種々の電圧レベルでの特徴的な解離時間 τ_U を得た。図15において、解離電圧 V_U に対する τ_U の依存性を、それぞれHP1(完全な円)、HP2(三角形)およびHP3(正方形)に対してプロットする。直線フィットから明らかのように、 τ_U が V_U に指数関数的に依存することに留意すること。この依存性は、改変Kramers速度モデルから予測される:

20

【0110】

【化5】

$$(24) \tau_U(V_U) = \tau_0 e^{(-V_U/V_\beta)}, \text{ ここで } \tau_0 = A e^{(E_b/k_B T)}$$

は、0電圧転移時間であり、 E_b は、ヘアピンの解離についてのエネルギー障壁(energy barrier)であり、そして、 $V_\beta = k_B T / Q_{eff}$ 。図11の線の傾きは、 $V_\beta = 22 \pm 2$ mVの単一の値を与え、これを使用して、有効なDNA電荷

30

【0111】

【化6】

$$Q_{eff} \approx 1.13 \pm 0.10e.$$

を推定することができる。この電荷は、-HLのチャンネルにまたがる約22ヌクレオチドに伴い、したがって、1ヌクレオチドあたりの有効電荷は： $1.13 / 12 = 0.094e$ である。このフィットと縦軸との切片から、 $\tau_U(0)$ (力が0)の値を推測することができる。実験結果は、HP1について $\tau_U(0) = 2.1 \pm 0.2$ s、HP2について 1.2 ± 0.1 s、そしてHP3について 0.34 ± 0.05 であることを示した。

40

【0112】

(2.一定の負荷速度での解離動態)

能動的な制御法によって、任意の時間依存的な電圧 $V(t)$ を印加して、結合の切断の動態を測定することができる。特に、力分光法の測定を、代表的に、一定の負荷速度または

【0113】

【化7】

ランプ $\dot{V} = dV/dt$.

で実行する。以下の段落では、まず、任意の所定の

【0114】

【化8】

 \dot{V}

10

に対する解離電圧の予測された分布の誘導の結果、および

【0115】

【化9】

 \dot{V}

に対する臨界電圧（または、最も可能性のある解離電圧）の依存性を示す。分析は、ナノ細孔の場合に適合された Evans および Ritchie のアプローチにしたがう。結果は、大きな負荷速度についてはこの単純化モデルに一致するが、より低い速度ではこのモデルから外れる。単一のエネルギー障壁とともに、印加された力の方向に沿う理想的な 1D エネルギー地形 (energy landscape) を仮定する。平衡（力を印加しない）において、閉じたヘアピン状態は、エネルギー地形の深い最小値として表され、エネルギー障壁 E_b により開口状態から隔てられている。ヘアピンを解離させるために、分子はこのエネルギー障壁を横切らなければならない。バイアスをかけた電圧（または、力）の存在下で、障壁は低減され、Kramers 時間 (τ_0) は、

20

【0116】

【化10】

$$\tau(V) = \tau_0 e^{(-V/V_\beta)}$$

30

（ここで、 τ_0 および V_β は先に定義される）にしたがって改変される。ここで、 $V = V(t)$ は時間依存性である。解離が t と $t + dt$ との間で生じている単位時間あたりの確率は、

【0117】

【化11】

$$P(t) = \tau^{-1}(t) \exp\left(-\int_0^t \frac{dt'}{\tau(t')}\right)$$

40

により与えられる。この式は、 $V(t) = Vt$ に関して表現され得、解離電圧の分布を与える：

【0118】

【化 1 2】

$$p(V) = \frac{1}{\tau_0 \dot{V}} \exp \left[\frac{V}{V_\beta} - \frac{V_\beta}{\tau_0 \dot{V}} \left(\exp \left(\frac{V}{V_\beta} \right) - 1 \right) \right] \quad (1)$$

臨界解離電圧 (V_c) は、この分布の最大値により規定され、これは：

【0 1 1 9】

10

【化 1 3】

$$V_c = V_\beta \ln \left[\frac{\tau_0 \dot{V}}{V_\beta} \right] \quad (2)$$

である。

【0 1 2 0】

図 1 6 は、 4.5 V/s の一定の負荷速度で実行した、代表的な解離事象を示す。上部のパネルは印加された電圧を示し、下部のパネルは細孔電流を示す。解離は、電圧のランプの間の、閉鎖細孔電流レベルから開口細孔電流レベルへの電流の急上昇により容易に観察可能である。解離電圧 V_U は、各々の事象から直接取得される。先の実験と同様に、細孔への DNA の最初の侵入を行った（すなわち、細孔内の分子の 0.3 ms のスライドおよび 0.5 ms の保持）。電圧ランプを印加すると、電流は閉鎖レベルのままだが、 $t \sim 22 \text{ ms}$ （ランプの開始から測定される）において、解離された鎖が迅速に細孔へスライドし、そして細孔電流に鋭い上昇が存在する。曲線から、解離電圧 V_U （この場合、 130 mV ）を直接測定することができる。スライド時間（ t_{s2} ）は、見かけの解離時間（それゆえ V_U ）をわずかに長くする。しかしながら、先に検討されるように、これは、ほんのわずかな影響である：ここで示される場合において、 $t_{s2} \sim 0.12 \text{ ms}$ であり、したがって補正は、 $0.12 / 22 = 0.005$ （観察した時間の微小な画分）。

20

30

【0 1 2 1】

十分な統計データを取得するために、解離実験を、任意の所定のランプ値について、少なくとも $1,000$ 回反復した。測定した V_U 値の代表的な分布は、図 1 7 の挿入図に示される。この分布は、式 1 により良好に近似される（挿入図の実線）。分布のピークは、最も可能性のある解離力（unzipping force）（または、臨界電圧、 V_c ）である。HP1（単一のミスマッチを有するヘアピン）、HP2 および HP3（7bp ヘリックス）について、測定を反復し、 $0.5 \sim 100 \text{ V/s}$ の範囲の電圧ランプに対する V_c の依存性を取得した。データを、図 1 4 の片対数プロット上に示す（HP1、HP2 および HP3 に対して、それぞれ円、三角形および正方形）。中程度および高い電圧ランプ（ $5 \sim 100 \text{ V/s}$ ）において、 V_c は、式 2 により予測される

40

【0 1 2 2】

【化 1 4】

 \dot{V}

への対数的な相関関係にしたがう。式 2 にしたがって、図 1 7 の直線の傾きは、単純に V である。対数フィットから V は、HP1 については $24.7 \pm 1.0 \text{ mV}$ 、HP2 については $22.5 \pm 1.1 \text{ mV}$ 、そして HP3 については $23.3 \pm 1.9 \text{ mV}$ であり、これらは、上記の一定電圧の測定と良好に一致する。 V が細孔内の DNA の有効電荷に

50

のみ依存する事実から予測されるように、全ての分子はほとんど同じ傾きを有した。より低いランプの方式において、データが、式2により予測される、単純な対数的な相関関係から外れることに留意すること。この偏差は、以下で議論される。式2へデータ(ランプ $> 1.6 \text{ V/s}$)をフィットさせることにより、HP1およびHP2について、それぞれ、 $\tau(0) = 0.72 \text{ s}$ および 0.49 s を得、これらの値は、一定の電圧の方法を使用して得た値よりも小さい。

【0123】

先の研究は、次のことを実証した。2.4 nmの -HLの前庭に滞留した、短い平滑末端のDNAヘアピンの開閉動態が、単一の工程プロセスとして記載され得、計算されたヘアピン全体の自由エンタルピーに近いエネルギー障壁を超えての急上昇に対応する時間スケールを得ることができる。これらの実験において、ほとんど力を印加しないか、または力を印加せずに、分子を変性させる。なぜなら、平滑末端DNAは、-HLのチャンネル部分に侵入することができないからである。電流実験において、DNAヘアピンの一方の末端から伸長する一本鎖の突出がチャンネル内を通過し、それゆえ、おそらく鎖に力を印加することによってヘアピンの動態に偏りが生じる。

【0124】

能動的な制御法により、220 mV以上から、より小さな電圧で実行される解離の測定を延長することができ、それゆえ、0の力と強力な力の限界とのギャップを埋めることができる。任意の所定の電圧Vにおいて、 $Q_{eff} V/d$ によりDNA鎖に印加される力を推定することができる(ここで、 Q_{eff} はチャンネル内のssDNAの有効電荷であり、そしてd(約5 nm)はチャンネルの長さである)。比較的小さな電圧(小さなバイアスにかかる力(biasing force))においてさえも、熱的に「融解した」塩基対の迅速な再アニーリングが、ほとんどこの再アニーリング同じ速さの、細孔内の対合していない鎖の進行によりブロックされ得ることに留意すること。特徴的なssDNAのスライド時間を、トランスロケーション実験から推定した。この「歯止め(ratchet)」機構は、ヘアピン全体の解離を数個の連続的な工程へ分けることができる。したがって、この場合における15の総解離時間は、0のバイアス動態(bias kinetics)と比較して、著しく短いことが予測される。

【0125】

実験は、一定の力(τ)で測定した特徴的な解離時間が解離電圧レベル V_{τ} により指数関数的に減少することを示す。直線フィットの傾きが、ヘアピンの配列(したがって、そのエンタルピー)とは無関係であることが見出され、チャンネル内のssDNAフラグメント上の有効電荷を推定することを可能にした。 $V_{\tau} = 0$ に対する指数関数フィットの切片が、 $\tau(0)$ の推定を提供する。これらの値と、ヘアピンの完全な変性移行に十分近くするのにかかる、計算上の平衡時間スケールとを比較することが興味深い。1M Na⁺でmfoldサーバを使用して、HP1について $G^0 = -16.4 \text{ kcal/mole}$ 、そしてHP2について $G^0 = -12.2 \text{ kcal/mole}$ を得、数時間のおよその(閉鎖から開口までを完了する)時間スケールを得た。対照的に、推定により、 $\tau(0) \sim 1 \text{ s}$ を得、これは数桁の強度でより短い。時間スケールのこの相違は、先に示される「歯止め」の考えに合致する。特に、1つではなく2つの熱的に活性化された工程によりナノ細孔解離が生じる場合(各々、約5塩基)、これらの時間全体は、数秒のオーダーまで低減される。

【0126】

1.5 nmの -HLチャンネル内のssDNA上の有効電荷を、2つの独立したアプローチ(一定の力または固定の負荷速度)により推定した。両方の方法は、細孔内の鎖について1.13 eの有効電荷または1ヌクレオチドあたり0.094 eの有効電荷を得、このことは、チャンネル内のDNAの負電荷が、正に荷電したカリウムイオンの「濃縮(condensation)」および -HLチャンネルの内壁上の極性基の存在により効果的に釣り合うことを示し、また先の結果と合致する。この有効電荷を使用して、任意の所定のVでの力を計算することができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 7 】

動態作用の測定は、上記の図と合致する。高い負荷速度（ランプ $> 2 \text{ V / s}$ ）において、解離時間（それゆえ V_c ）を、力による電位障壁の高さの急速な変化により決定する。この制限において、システムは、開口閉鎖移行を多数回は起こさず、 V_c は

【 0 1 2 8 】

【化 1 5】

$$\log(\dot{V}).$$

に直接比例する。

【 0 1 2 9 】

【化 1 6】

$$\dot{V}_c$$

の小さな値に対して、負荷速度に対する臨界電圧の弱い依存性により特徴付けられる、別の方式への柔軟な重複（soft crossover）が存在する。この方式において、電圧は、十分低いまま維持され、このことは、システムが、最終的な解離の前に、閉鎖状態と開口状態との間で変動することを可能にするのに十分長い時間を提供する。

【 0 1 3 0 】

図 1 7 の対数曲線の傾きは、式 2 により定義される V_c を与える。フィットパラメータは、一定の力による方法を使用して得た値と極めて良好に合致する。さらに、

【 0 1 3 1 】

【化 1 7】

$$\dot{V}=1 \text{ V/s(すなわち、}\log(\dot{V})=0)$$

へのフィットの外挿を使用して、2つのヘアピンについての $U_c(0)$ を推定することができる。動的測定から取得した値は、一定の力で得た外挿値よりも一貫して小さい（約 2 分の 1）。HP 1 および HP 2 に対応する曲線は、大体 20 mV で置き換えることに留意すること。DNA 上の測定された有効電荷を使用して、この変化を、約 $1 \text{ k}_B T$ （約 0.6 kcal/mol）のエネルギーの相違に解釈することができる。

【 0 1 3 2 】

本発明は、種々の実施形態に関して記載されたが、本発明が、添付の特許請求の範囲の意図および範囲内の、広範な種類のさらなる実施形態および他の実施形態も可能であることも認識されなければならない。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 3 3 】

【図 1】図 1 は、設計ポリマーへの標的ポリヌクレオチドの変換の概略図である。ここで、(a) は標的ポリヌクレオチドであり、(b) は標的の単離された部分（配列番号 4 ~ 7）であり、(c) は生じる設計ポリマーである。

【図 2】図 2 は、標的ポリヌクレオチドの設計ポリマーへの変換に関するサイクルの概略図である。ここで、(a) は 2 つの設計モノマー（配列番号 4 ~ 7）であり、(b) は設計ポリマーであり、そして (c) は、その標的の変換（配列番号 8 ~ 17）に関するサイクルを図示する。

【図 3】図 3 は、分子ビーコンの概略図である。ここで、(a) はそのビーコンの直線にされた図であり、そして (b) は自己ハイブリダイズしたビーコンを示す。

【図 4】図 4 は、ビーコン - 設計ポリマー複合体の概略図である。

【図 5】図 5 は、ナノ細孔によるビーコン - 設計ポリマーのトランスロケーションプロセスの概略図である。ここで、(a) は、このトランスロケーションプロセスに関する最初

10

20

30

40

50

の工程を示し、そして (b) は、そのプロセスのより後の段階を図示する。

【図 6】図 6 は、能動的な制御を使用する、10 bp ヘアピン DNA の解離による結果を示すグラフである。ここで、(a) は、印加された電圧対時間 (ミリ秒) を表し、そして (b) は、細孔を通る測定されたイオン電流を表す。

【図 7】図 7 は、(A)、(B)、(C) および (D) によって示される 4 つの異なる工程を示し、サンプルポリヌクレオチドの代表的な分析において起こる工程が示されている。ここで、上部のパネルは、ナノ細孔システム内へ、およびナノ細孔システムを通る、設計ポリマーのトランスロケーションの概略図を示し、中央のパネルは、光子カウント / m s 対時間を示し、そして下部のパネルは、記録した電圧を示す。

【図 8】図 8 は、ナノ細孔システムと組み合わせて使用される光学系の概略図である。

【図 9】図 9 は、図 8 において示された光学系の拡大部分である。

【図 10】図 10 は、薄い T e f l o n フィルムに製作された約 30 μ m の孔の S E M 像である。

【図 11】図 11 は、一定の力で実施された代表的な解離事象の最初の数ミリ秒 (m s) を示すグラフである。ここで、上部のパネルは、細孔を横切って印加される制御された電圧を示し、一方、下部のパネルは、その印加された電圧から生じる細孔電流を示す。t = 0 において、DNA はその細孔の中に入る。

【図 12】図 12 は、V = 120 m V かつ 15 において測定された一本鎖 DNA (ポリ (D A) 90) のトランスロケーション時間の分布を示すヒストグラムである。このヒストグラムは、約 1,500 回の個別の事象から構築した。t T > t P = 0.5 m s (最も好ましいトランスロケーション時間) の後、この分布を、0.32 m s の時間定数の単一指数関数によってフィッティングする。

【図 13】図 13 は、定常電圧実験についての代表的な解離事象を示すグラフである。上部のパネルは、印加した電圧パターンを示し、下部のパネルは、生じる細孔電流であり、挿入図は、約 1000 回の別個の解離事象から t = 5 m s において測定された細孔電流の代表的な分布を示す。

【図 14】図 14 は、HP 1 に対する異なる解離電圧レベルに対する t の関数として、解離の可能性 P u n z i p を示すグラフである。使用した電圧レベルは：(円形) 30 m V、(正方形) 60 m V、(三角形) 90 m V、(逆三角形) 120 m V および (菱形) 150 m V である。

【図 15】図 15 は、解離電圧 V_U についての P_U の依存性をプロットしたグラフである。解離電圧 V_U は、HP 1 (完全な円)、HP 2 (三角形) および HP 3 (正方形) について、図 5 においてプロットされる。特徴的な時間スケールが、V_U の関数として P U N Z I P (図 4) の指数関数によるフィッティングから得られる。

【図 16】図 16 は、4.5 V / s の一定の負荷速度において実施された、一定の負荷速度の下での代表的な解離事象を示すグラフである。ここで、上部のパネルは、時間 t = 0 において印加された電圧を示す。この時間は、細孔への DNA 進入の開始を表す。一方、下部のパネルは、制御された電圧ランプの間の細孔電流を示す。

【図 17】図 17 は、約 1500 の解離事象 (図 6 のように) の集合を示すグラフである。これらの解離事象は、V_U および最も好ましい解離電圧 V_C の分布を得るために使用され得る。メインの図：HP 1 (黒丸)、HP 2 (三角形) および HP 3 (正方形) に対する、ランプ V & の関数としての V_C の片対数プロット。

10

20

30

40

【 図 1 】

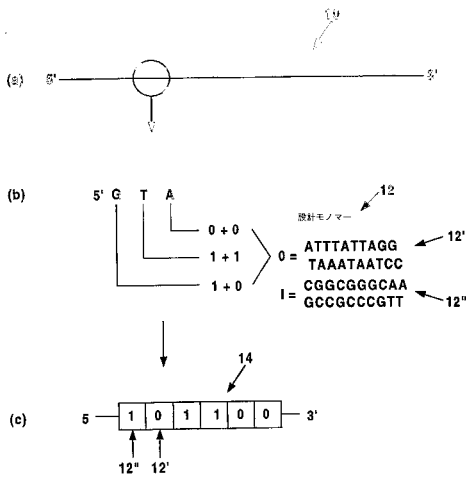


Fig. 1

【 図 2 】

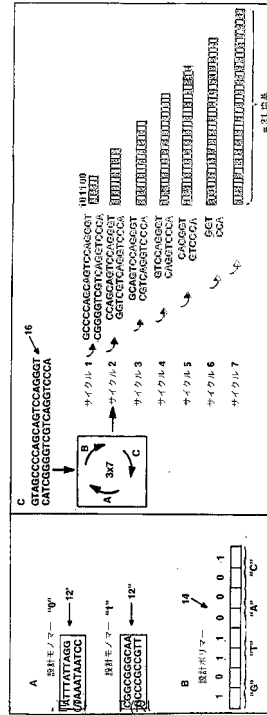


Fig. 2

【 図 3 】

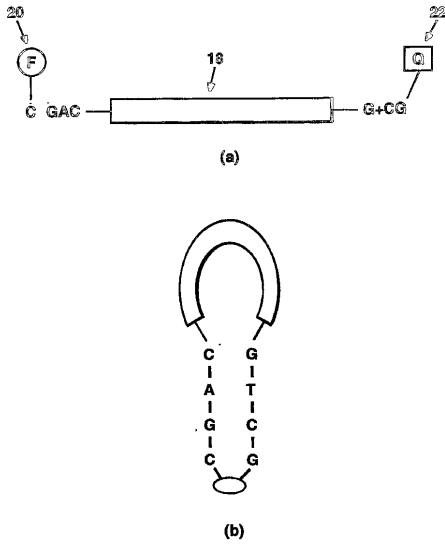


Fig. 3

【 図 4 】

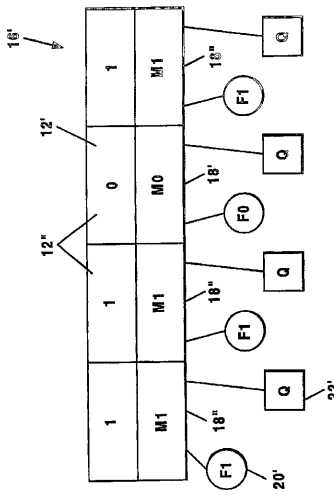
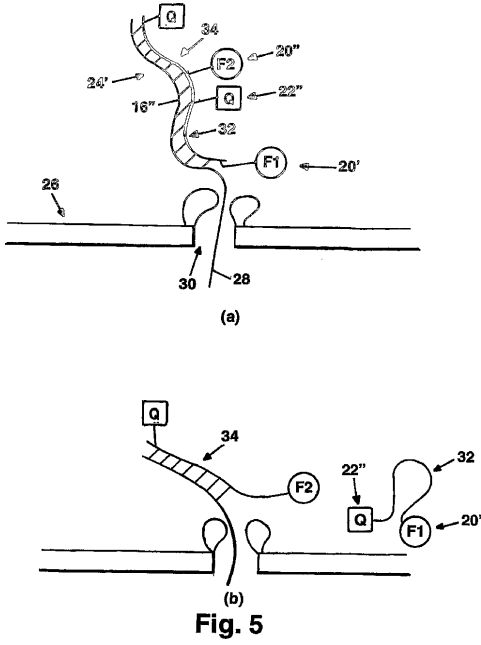


Fig. 4

【 図 5 】



【 図 6 】

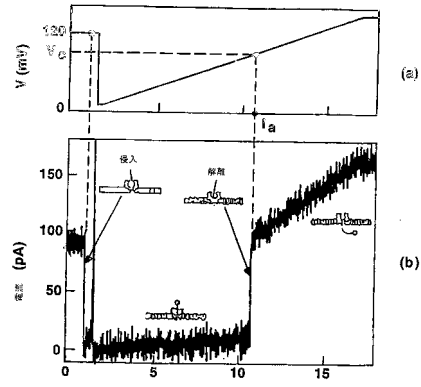
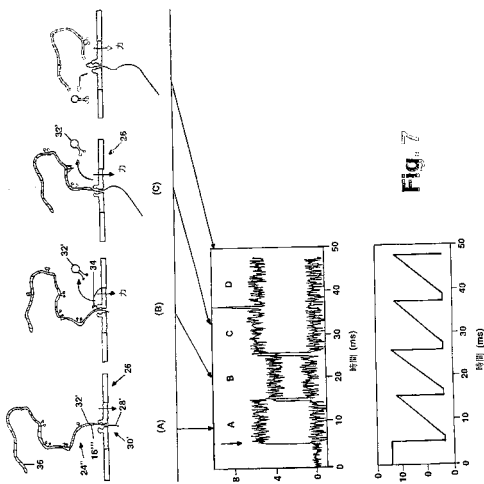
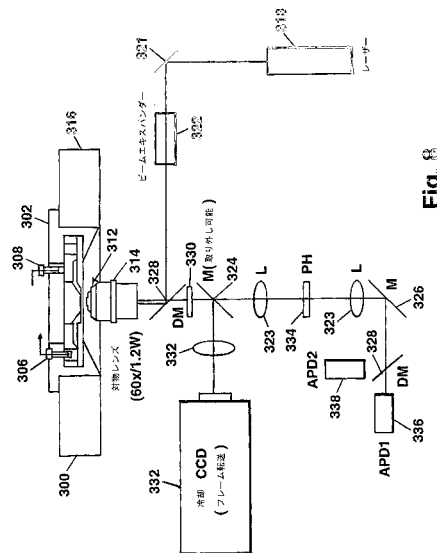


Fig. 6

【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

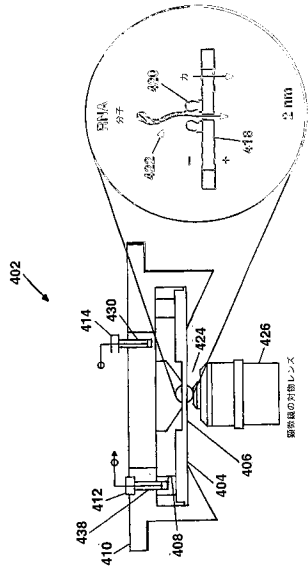


Fig. 9

【 図 10 】

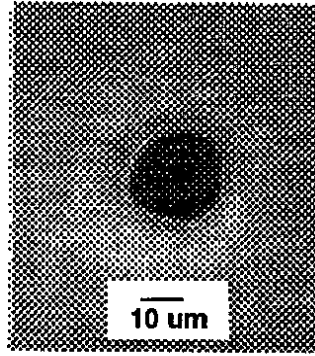


Fig. 10

【 図 11 】

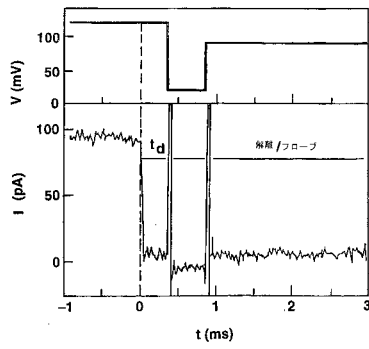


Fig. 11

【 図 13 】

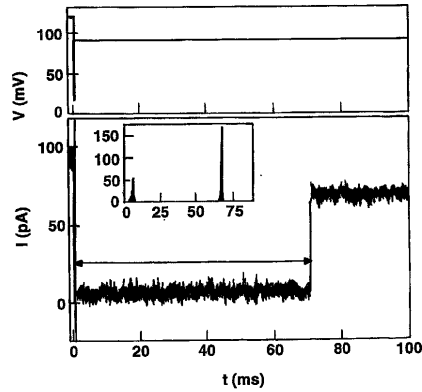


Fig. 13

【 図 12 】

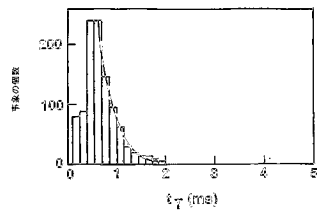


Fig. 12

【 図 14 】

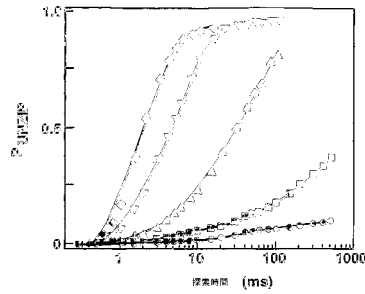


Fig. 14

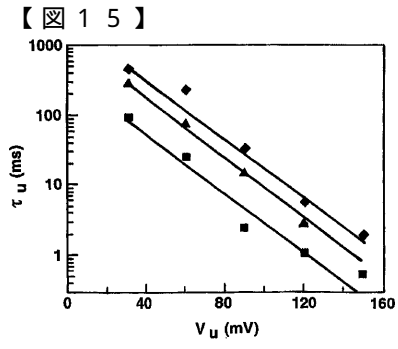


Fig. 15

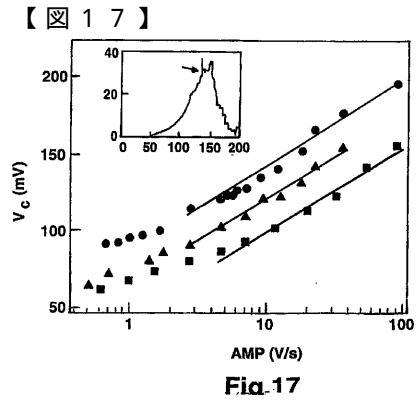


Fig.17

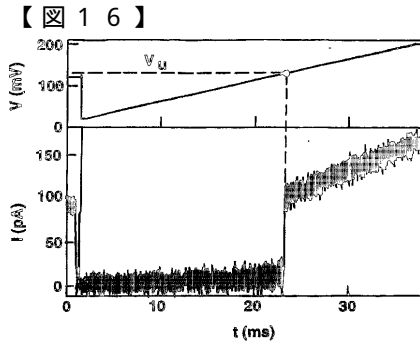


Fig.16

【 配列表 】

0005190263000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 メラー, アミット
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446, ブルックライン, マリオン ストリート
94, アpartment 1
- (72)発明者 マス, ジェローム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02144, サマービル, キングストン ストリート
25
- (72)発明者 エイド, ジョン エス.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02413, サマービル, ライン ストリート 98,
アpartment 2

審査官 長谷川 茜

- (56)参考文献 特表2003-503007(JP, A)
国際公開第02/042496(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12Q 1/68
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed