

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成28年6月9日(2016.6.9)

【公表番号】特表2015-521030(P2015-521030A)

【公表日】平成27年7月27日(2015.7.27)

【年通号数】公開・登録公報2015-047

【出願番号】特願2015-505831(P2015-505831)

【国際特許分類】

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 H 19/06 (2006.01)

C 0 7 H 19/16 (2006.01)

C 0 8 J 9/36 (2006.01)

G 0 1 N 27/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 M 1/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 Z

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 H 19/06

C 0 7 H 19/16

C 0 8 J 9/36

G 0 1 N 27/00 Z

【手続補正書】

【提出日】平成28年4月7日(2016.4.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

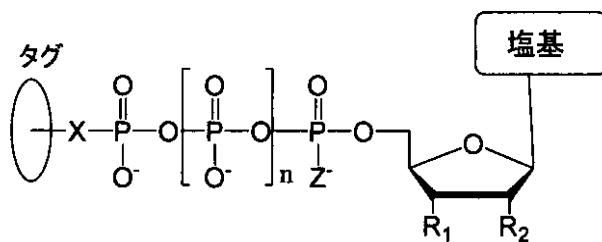
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

構造

【化1】



を有する化合物であって、前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペンタヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、ア

ルコール、チオール基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、またはそれらの組合せのうちの一つ以上を含み、 R_1 がOHであり、 R_2 がHまたはOHであり、XがO、NH、Sまたは CH_2 であり、ZがO、Sまたは BH_3 であり、前記塩基がアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルまたはこれら塩基のうちの一つの誘導体であり、nが1、2、3または4であり、前記タグが、前記化合物の残りの電荷に対して反対の符号の電荷を有する化合物。

【請求項2】

請求項1に記載の異なる4種類の化合物を含む組成物であって、第1の種類の化合物の前記塩基がアデニンまたはその誘導体であり、第2の種類の化合物の前記塩基がグアニンまたはその誘導体であり、第3の種類の化合物の前記塩基がシトシンまたはその誘導体であり、第4の種類の化合物の前記塩基がチミンもしくはその誘導体またはウラシルもしくはその誘導体であり、各種類の化合物にある前記タグが他の3種類の化合物の各々にある前記タグと異なる、組成物。

【請求項3】

化合物のアイデンティティを決定する方法であって、

(a) 前記化合物を、(i) ナノメートルスケールの直径を持つ少なくとも一つの細孔を有する物理的障壁によって分離されている第1および第2の電解質溶液が入った第1および第2の区画と；(ii) 前記障壁を越えて電界を印加するための手段と；(iii) 前記電界の変化を測定するための手段とを含む伝導性測定システムと接触させることと；

(b) 前記化合物が前記細孔を通り抜けて移行するときに、前記電界の前記変化を記録し、前記電界の前記変化が、前記化合物と前記電解質と前記細孔との相互作用の結果であり、前記化合物のサイズ、電荷および組成を示すことと

を含み、それによって、前記変化と所定の値との相関から前記化合物の前記アイデンティティを決定することが可能になる、方法。

【請求項4】

請求項3に記載の、化合物がタグであるかまたは前記タグの前駆体であるかどうかを決定する方法であって、前記電界の前記変化を、前記タグおよび前記タグの前記前駆体に対応する所定の値と比較することを含み、それによって、前記化合物が、前記タグであるかまたは前記その前駆体であるかどうかを決定する、方法。

【請求項5】

少なくとも第1および第2の電解質溶液を分離している電氣的抵抗がある障壁と；

前記電氣的抵抗がある障壁は、ナノメートルスケールの直径を持つ少なくとも一つの細孔を含み；

前記第1および第2の電解質溶液の少なくとも一方にある、タグを持つ少なくとも一つの化合物と；

前記少なくとも一つの細孔は、印加電位によって前記第1および第2の電解質溶液を跨いでイオン電流を起こすことができるように構成されており；

前記少なくとも一つの細孔は、前記化合物から前記タグを切断して前記タグを遊離するように構成された特徴部を含み；

前記イオン電流を測定する手段、ならびに前記少なくとも一つの細孔が前記タグによって遮られていない時間および前記タグが伝導性の低下したパルスを引き起こす時間も含めて、時系列としてその時間経過を記録する手段と

を含む伝導性測定システム。

【請求項6】

遮られていない細孔の伝導性レベルと統計的に一致する領域、および伝導性の低下したパルス、また伝導性の低下した個々のパルス内の統計的に定常なセグメントに伝導性時系列のセグメントを記述する方法であって、前記伝導性時系列が、請求項5に記載の伝導性測定システムで生成され；

伝導性時系列のセグメントを記述するための前記方法が、

(a) 前記未加工伝導性時系列から推定した、ヒドンマルコフモデルの連続密度の最尤

状態配列のピタビ復号と；

(b) 開孔伝導性レベルからの逸脱に対する閾値との比較による伝導性の低下したパルスの領域の記述と；

(c) 各セグメントに対する前記イオン電流レベルの前記中心傾向を推定することによって、または中心傾向とセグメント継続時間を一緒に測定することによって、伝導性の低下したパルスの特徴づける手段とからなる群から選択され、セグメント中心傾向の前記測定が、

(i) 連続密度ヒドンマルコフモデルの一部として前記伝導性時系列から推定した第1のGMMのガウス成分の平均パラメータと；

(ii) 算術平均と；

(iii) トリム平均と；

(iv) 中央値と；

(v) サンプル位置の最大事後推定量、またはサンプル位置の最尤推定量とからなる群から選択される方法。

【請求項7】

ヌクレオチド重合事象において切断され、ナノ細孔を用いて検出することができるタグを含む、タグ付けされたヌクレオチド。

【請求項8】

核酸配列を決定する方法であって、別々にアドレス可能な部位のアレイを用意し、各部位が、核酸ポリメラーゼが付着しているナノ細孔を有することと、前記アレイの所与の部位で、タグ付けされたヌクレオチドをポリメラーゼで重合させることとを含み、各タグ付けされたヌクレオチドが請求項7に記載のタグ付けされたヌクレオチドであり、タグが遊離し、前記所与の部位でナノ細孔によって検出される、方法。

【請求項9】

溶液中の化合物の少なくとも1つのパラメータを決定する方法であって、

第1の貯蔵部に第1の流体を入れることと；

第2の貯蔵部に第2の流体を入れることと；

前記第1および前記第2の流体の少なくとも一方は、少なくとも1つの化合物を含み、前記化合物は、請求項7に記載のタグ付けされたヌクレオチドまたは該タグ付けされたヌクレオチドから切断されたタグであり；

前記第1の貯蔵部内の前記第1の流体は、電気的抵抗がある障壁で前記第2の貯蔵部内の前記第2の流体と分離されており；

前記電気的抵抗がある障壁は、少なくとも1つの細孔を含み；

前記第1と前記第2の流体の間の電位により、前記第1の流体、前記少なくとも1つの細孔、および前記第2の流体にイオン電流を流すことと；

前記少なくとも1つの細孔を通して流れる前記イオン電流および前記イオン電流の変化の継続時間を測定することと；

前記イオン電流の前記測定は、前記少なくとも1つの細孔と相互作用している前記化合物によって引き起こされる前記イオン電流の減少を測定するのに十分な一定の時間実行され；

前記イオン電流の前記変化および前記一定の時間を通じての前記イオン電流の前記変化の前記継続時間を数理的に解析することによって、前記化合物の少なくとも1つのパラメータを決定することと

を含み、前記数理解析が、

i) 連続密度ヒドンマルコフモデルの一部として前記伝導性時系列から推定した第1のGMMのガウス成分の平均パラメータと；

ii) 事象平均抽出と；

iii) 最尤事象状態割り当てと；

iv) 閾値検出および平均化と；

v) スライディングウィンドウ分析と；

- v i) 算術平均と；
- v i i) トリム平均と；
- v i i i) 中央値と；
- i x) サンプル位置の最大事後推定量、またはサンプル位置の最尤推定量と
からなる群から選択される少なくとも1つの工程を含む、方法。

【請求項10】

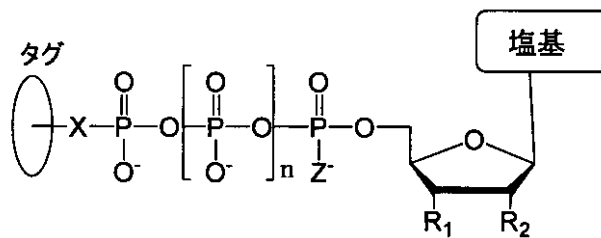
- (a) 前記細孔に付着している少なくとも1つのポリマーゼと；
- (b) 前記細孔に付着している2つ以上のホスファターゼ酵素と
を含む請求項5に記載の伝導性測定システム。

【請求項11】

一本鎖DNAのヌクレオチド配列を決定する方法であって、

- (a) 前記一本鎖DNAを
- (i) 請求項10に記載の伝導性測定システム、および
構造

【化2】



を有する異なる4種類の化合物を含む組成物と接触させ、

前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペンタヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、アルコール、チオール基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、またはそれらの組合せのうち1つ以上を含み、R₁がOHであり、R₂がHまたはOHであり、XがO、NH、SまたはCH₂であり、ZがO、SまたはBH₃であり、nが1、2、3または4であり、前記タグが、前記化合物の残りの電荷に対して反対の符号の電荷を有し、第1の種類の化合物の前記塩基がアデニンまたはその誘導体であり、第2の種類の化合物の前記塩基がグアニンまたはその誘導体であり、第3の種類の化合物の前記塩基がシトシンまたはその誘導体であり、第4の種類の化合物の前記塩基がチミンもしくはその誘導体であり、各種類の化合物にある前記タグが他の3種類の化合物の各々にある前記タグと異なり、

前記一本鎖DNAが、前記細孔に付着している前記ポリマーゼと接触して電解質溶液中にあり、DNA伸長産物を形成するように、プライマーの3'末端ヌクレオチド残基にハイブリダイズした前記一本鎖DNAのヌクレオチド残基の直ぐ5'側の前記一本鎖DNAのヌクレオチド残基に対して前記化合物が相補的である場合に、前記ポリマーゼが前記プライマーへの前記化合物のうち1つの組み込みを触媒するのを可能にする条件下で、前記一本鎖DNAがその部分にハイブリダイズした前記プライマーを有し、

前記化合物の組み込みにより前記タグが付着しているポリリン酸が遊離し、

前記細孔に付着している前記ホスファターゼ酵素が、前記ポリリン酸から前記タグを切断して前記タグを遊離することと；

(b) 前記障壁を越えて電界を印加し、工程(a)において生成した前記タグが前記細孔を通り抜けて移行することによりもたらされる前記細孔を跨ぐ電子的変化を測定することにより、工程(a)においてどの化合物が前記プライマーに組み込まれて前記DNA伸

長産物を形成したかを決定し、前記電子的変化が、タグの種類について異なり、それによって、前記組み込まれた化合物に相補的な前記一本鎖DNA中の前記ヌクレオチド残基を同定することと；

(c) 配列決定される前記一本鎖DNAの各ヌクレオチド残基に対して工程(b)を繰り返し実施することと

を含み、それによって、前記一本鎖DNAの前記ヌクレオチド配列を決定する、方法。

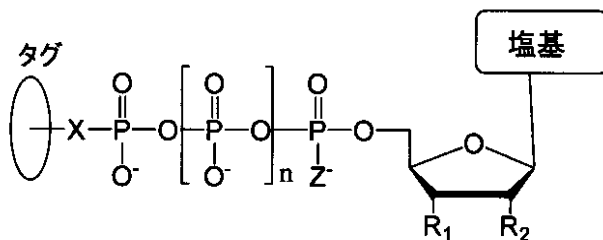
【請求項12】

一本鎖DNAのヌクレオチド配列を決定する方法であって、

(a) 前記一本鎖DNAを

(i) 請求項10に記載の伝導性測定システム、および構造

【化3】



を有する化合物と接触させ、

前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペンタヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、アルコール、チオール基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、またはそれらの組合せのうちの一つ以上を含み、 R_1 がOHであり、 R_2 がHまたはOHであり、XがO、NH、Sまたは CH_2 であり、ZがO、Sまたは BH_3 であり、前記塩基が、アデニン、グアニン、シトシン、チミンまたはこれらの塩基のうち一つの誘導體であり、nが1、2、3または4であり、前記タグが、前記化合物の残りの電荷に対して反対の符号の電荷を有し、

前記一本鎖DNAが、前記細孔に付着している前記ポリメラーゼと接触して電解質溶液中にあり、DNA伸長産物を形成するように、プライマーの3'末端ヌクレオチド残基にハイブリダイズした前記一本鎖DNAのヌクレオチド残基の直ぐ5'側にある前記一本鎖DNAのヌクレオチド残基に対して前記化合物が相補的である場合に、前記ポリメラーゼが前記プライマーへの前記化合物の組み込みを触媒するのを可能にする条件下で、前記一本鎖DNAがその部分にハイブリダイズした前記プライマーを有し、

前記化合物が組み込まれない場合は、化合物が組み込まれるまで、異なる化合物との前記接触を反復して繰り返し、ただし(1)前記化合物にある塩基の種類が、前の化合物の各々にある塩基の種類と異なり、(2)前記化合物にあるタグの種類が、前の化合物の各々にあるタグの種類と異なり、

前記化合物の組み込みにより前記タグが付着しているポリリン酸が遊離し、

前記細孔に付着している前記ホスファターゼ酵素が、前記ポリリン酸から前記タグを切断して前記タグを遊離することと；

(b) 前記障壁を越えて電界を印加し、工程(a)において生成した前記タグが前記細孔を通り抜けて移行することによりもたらされる前記細孔を跨ぐ電子的変化を測定することにより、工程(a)においてどの化合物が前記プライマーに組み込まれて前記DNA伸長産物を形成したかを決定し、前記電子的変化が、タグの種類について異なり、それによって、前記組み込まれた化合物に相補的な前記一本鎖DNA中の前記ヌクレオチド残基を同定することと；

(c) 配列決定される前記一本鎖DNAの各ヌクレオチド残基に対して工程(a)および(b)を反復して実施すること

を含み、それによって、前記一本鎖DNAの前記ヌクレオチド配列を決定する、方法。

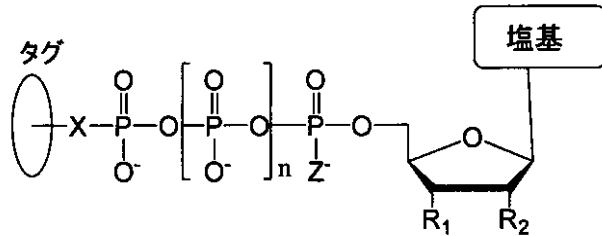
【請求項13】

一本鎖RNAのヌクレオチド配列を決定する方法であって、

(a) 前記一本鎖RNAを

(i) 請求項10に記載の伝導性測定システム、および構造

【化4】



を有する異なる4種類の化合物を含む組成物と接触させ、

前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペントヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、アルコール、チオール基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、またはそれらの組合せのうちの一つ以上を含み、 R_1 がOHであり、 R_2 がHまたはOHであり、XがO、NH、Sまたは CH_2 であり、ZがO、Sまたは BH_3 であり、nが1、2、3または4であり、前記タグが、前記化合物の残りの電荷に対して反対の符号の電荷を有し、第1の種類の化合物の前記塩基が、アデニンまたはその誘導体であり、第2の種類の化合物の前記塩基が、グアニンまたはその誘導体であり、第3の種類の化合物の前記塩基が、シトシンまたはその誘導体であり、第4の種類の化合物の前記塩基が、ウラシルまたはその誘導体であり、各種類の化合物にある前記タグが、他の3種類の化合物の各々にある前記タグと異なり、

前記一本鎖RNAが、前記細孔に付着している前記ポリメラーゼと接触して電解質溶液中にあり、RNA伸長産物を形成するように、プライマーの3'末端ヌクレオチド残基にハイブリダイズした前記一本鎖RNAのヌクレオチド残基の直ぐ5'側の前記一本鎖RNAのヌクレオチド残基に対して前記化合物が相補的である場合に、前記ポリメラーゼが前記プライマーへの前記化合物のうちの一つの組み込みを触媒するのを可能にする条件下で、前記一本鎖RNAがその部分にハイブリダイズした前記プライマーを有し、

前記化合物の組み込みにより前記タグが付着しているポリリン酸が遊離し、

前記細孔に付着している前記ホスファターゼ酵素が、前記ポリリン酸から前記タグを切断して前記タグを遊離することと；

(b) 前記障壁を越えて電界を印加し、工程(a)において生成した前記タグが前記細孔を通り抜けて移行することによりもたらされる前記細孔を跨ぐ電子的変化を測定することにより、工程(a)においてどの化合物が前記プライマーに組み込まれて前記RNA伸長産物を形成したかを決定し、前記電子的変化が、タグの各種類について異なり、それによって、前記組み込まれた化合物に相補的な前記一本鎖RNA中の前記ヌクレオチド残基を同定することと；

(c) 配列決定される前記一本鎖RNAの各ヌクレオチド残基に対して工程(b)を繰り返し実施することと

を含み、それによって、前記一本鎖RNAの前記ヌクレオチド配列を決定する、方法。

【請求項14】

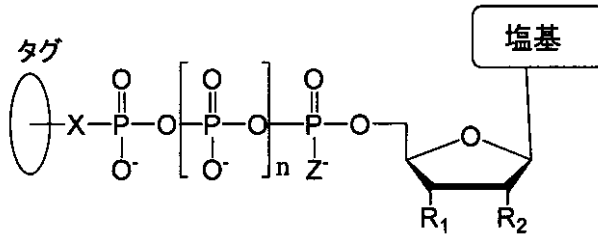
一本鎖RNAのヌクレオチド配列を決定する方法であって、

(a) 前記一本鎖RNAを

(i) 請求項10に記載の伝導性測定システム、および

構造

【化5】



を有する化合物と接触させ、

前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペンタヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、アルコール、チオール基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、またはそれらの組合せのうちの一つ以上を含み、 R_1 がOHであり、 R_2 がHまたはOHであり、XがO、NH、Sまたは CH_2 であり、ZがO、Sまたは BH_3 であり、前記塩基が、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはこれら塩基のうちの一つの誘導體であり、nが1、2、3または4であり、前記タグが、前記化合物の残りの電荷に対して反対の符号の電荷を有し、

前記一本鎖RNAが、前記細孔に付着している前記ポリメラーゼと接触して電解質溶液中にあり、RNA伸長産物を形成するように、プライマーの3'末端ヌクレオチド残基にハイブリダイズした前記一本鎖DNAのヌクレオチド残基の直ぐ5'側にある前記一本鎖RNAのヌクレオチド残基に対して前記化合物が相補的である場合に、前記ポリメラーゼが前記プライマーへの前記化合物の組み込みを触媒するのを可能にする条件下で、前記一本鎖RNAがその部分にハイブリダイズした前記プライマーを有し、

前記化合物が組み込まれない場合は、化合物が組み込まれるまで、異なる化合物との前記接触を反復して繰り返し、ただし(1)前記化合物にある塩基の種類が、前の化合物の各々にある塩基の種類と異なり、(2)前記化合物にあるタグの種類が、前の化合物の各々にあるタグの種類と異なり、

前記化合物の組み込みにより前記タグが付着しているポリリン酸が遊離し、

前記細孔に付着している前記ホスファターゼ酵素が、前記ポリリン酸から前記タグを切断して前記タグを遊離することと；

(b) 前記障壁を越えて電界を印加し、工程(a)において生成した前記タグが前記細孔を通り抜けて移行することによりもたらされる前記細孔を跨ぐ電子的変化を測定することにより、工程(a)においてどの化合物が前記プライマーに組み込まれて前記RNA伸長産物を形成したかを決定し、前記電子的変化が、タグの各々種類について異なり、それによって、前記組み込まれた化合物に相補的な前記一本鎖RNA中の前記ヌクレオチド残基を同定することと；

(c) 配列決定される前記一本鎖RNAの各ヌクレオチド残基に対して工程(a)および(b)を反復して実施することと

を含み、それによって、前記一本鎖RNAの前記ヌクレオチド配列を決定する、方法。

【請求項15】

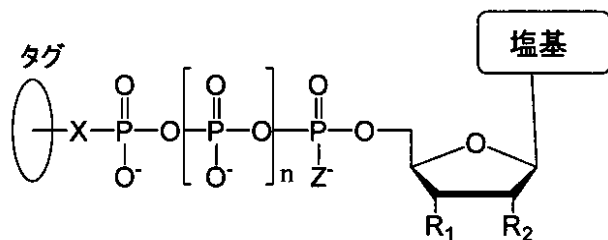
一本鎖DNAまたはRNAのヌクレオチド配列を決定する方法であって、

(a) 前記一本鎖DNAまたはRNAを

(i) ナノメートルスケール、好ましくは約1~10nmの直径を持つ少なくとも1つの細孔を有する物理的障壁によって分離されている第1および第2の電解質溶液が入った第1および第2の区画であって、前記細孔が生物学的なもの、好ましくはタンパク質性のもの、さらに好ましくは溶血素タンパク質であるか、または前記細孔が合成によるもの、好ましくは固体細孔、さらに好ましくはグラフェンからなり；前記第1および第2の電解質溶液は好ましくは同一であり；前記細孔の内部が、好ましくは前記タグのまたは前記タグが付着している前記ポリリン酸の電荷に対して反対の符号の電荷、さらに好ましくは負電荷を有し；前記第1および第2の区画は好ましくは電荷、さらに好ましくは極性が反対である電荷を有し；(ii) 前記障壁を越えて電界を印加するための手段と；(iii) 前記電界の変化を測定するための手段と；(iv) 前記細孔に付着している少なくとも1つのポリメラーゼと；(v) 前記細孔に付着している2つ以上のホスファターゼ酵素を含む伝導性測定システムであって、好ましくはポリメラーゼより多くのホスファターゼ酵素が前記細孔に付着し、好ましくはポリメラーゼ反応において前記ポリメラーゼによって生じたポリリン酸が前記細孔に入る前に前記ホスファターゼ酵素と相互作用するように前記ホスファターゼ酵素が位置する伝導性測定システム、および

構造

【化6】



を有する異なる4種類の化合物を含む組成物と接触させ、

前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペンタヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、アルコール、チオール基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、またはそれらの組合せのうち1つ以上を含み、 R_1 がOHであり、 R_2 がHまたはOHであり、XがO、NH、Sまたは CH_2 であり、ZがO、Sまたは BH_3 であり、nが1、2、3または4であり、好ましくは前記タグが前記化合物の残りの電荷に対して反対の符号の電荷、さらに好ましくは正電荷を有し；好ましくは前記タグの前記電荷の大きさが、前記化合物の残りの前記電荷の大きさと同じであり；第1の種類の化合物の前記塩基がアデニンまたはその誘導体であり、第2の種類の化合物の前記塩基がグアニンまたはその誘導体であり、第3の種類の化合物の前記塩基がシトシンまたはその誘導体であり、第4の種類の化合物の前記塩基がチミンもしくはその誘導体またはウラシルもしくはその誘導体であり、各種の化合物にある前記タグが他の3種類の化合物の各々にある前記タグと異なり、

前記タグがエチレングリコールを含む場合には、前記タグは好ましくは16、20、24、または36個のエチレングリコール単位を含み；

好ましくは、前記タグはリン酸の数の均衡を保つ適切な数のリシンまたはアルギニンをさらに含み；

好ましくは、前記タグはその電荷、形状、サイズまたはそれらの任意の組合せによって検出可能であり；

前記一本鎖DNAまたはRNAが、前記細孔に付着している前記ポリメラーゼと接触して電解質溶液中にあり、DNAまたはRNA伸長産物を形成するように、プライマーの3'末端ヌクレオチド残基にハイブリダイズした前記一本鎖DNAまたはRNAのヌクレオ

チド残基の直ぐ5'側の前記一本鎖DNAまたはRNAのヌクレオチド残基に対して前記化合物が相補的である場合に、前記ポリメラーゼが前記プライマーへの前記化合物のうちの1つの組み込みを触媒するのを可能にする条件下で、前記一本鎖DNAまたはRNAがその部分にハイブリダイズした前記プライマーを有し、

前記化合物の組み込みにより前記タグが付着しているポリリン酸が遊離し、

前記細孔に付着している前記ホスファターゼ酵素が、前記ポリリン酸から前記タグを切断して前記タグを遊離し、好ましくは前記ホスファターゼ酵素が、ポリメラーゼ反応において前記ポリメラーゼによって生じたポリリン酸が前記ホスファターゼ酵素と相互作用するように位置することと；

(b) 前記障壁を越えて電界を印加し、工程(a)において生成した前記タグが前記細孔を通り抜けて移行することによりもたらされる前記細孔を跨ぐ電子的変化を測定することにより、工程(a)においてどの化合物が前記プライマーに組み込まれて前記DNAまたはRNA伸長産物を形成したかを決定し、前記電子的変化が、タグの各種類について異なり、好ましくは前記遊離したタグの少なくとも85~99%が前記細孔を通り抜けて移行し、それによって、前記組み込まれた化合物に相補的な前記一本鎖DNAまたはRNA中の前記ヌクレオチド残基を同定する、ここで好ましくは精度は4より大きく、より好ましくは5より大きく、さらにより好ましくは6シグマよりも大きい、ことと；

(c) 配列決定される前記一本鎖DNAまたはRNAの各ヌクレオチド残基に対して工程(b)を繰り返し実施することと

を含み、それによって、前記一本鎖DNAまたはRNAの前記ヌクレオチド配列を決定する、方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0657

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0657】

特定の実装を説明および記載してきたが、様々な改変をそれに対して行い、ここで想定することができるものが、前述のことから理解されるべきである。また、本発明が、明細書内に提供される特定例により限定されることも意図されない。本発明を上記の明細書を参照して記載してきたが、ここで好ましい態様の記載および説明は限定的な意味で解釈されることを意味するものではない。さらに、本発明の全ての側面は、様々な条件および変数に依存するここに記載される特定の描写、構成または相対的割合に限定されないことが理解されるべきである。本発明の態様の形態および詳細における様々な改変は、当業者には明らかである。従って、本発明は任意のそのような改変、変更および等価物も包含することが想定される。以下の特許請求の範囲は本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内にある方法および構造ならびにその等価物がそれによって包含されることが意図される。

また、以下に本願の出願当初の請求項を実施の態様として付記する。

[1] (a) ナノメートルスケールの直径を持つ少なくとも1つの細孔を有する物理的障壁によって分離されている第1および第2の電解質溶液が入った第1および第2の区画と；

(b) 前記障壁を越えて電界を印加するための手段と；

(c) 前記電界の変化を測定するための手段と；

(d) 前記細孔に付着している少なくとも1つのポリメラーゼと；

(e) 前記細孔に付着している2つ以上のホスファターゼ酵素と

を含む伝導性測定システム。

[2] 前記細孔が、約1~10nmの直径を有する、[1]に記載の伝導性測定システム。

[3] 前記ポリメラーゼと前記ホスファターゼ酵素が、前記細孔に共有結合している

、 [1] に記載の伝導性測定システム。

[4] ポリメラーゼより多くのホスファターゼ酵素が、前記細孔に付着している、 [1] に記載の伝導性測定システム。

[5] ポリメラーゼ反応において前記ポリメラーゼによって生じたポリリン酸が、前記細孔に入る前に前記ホスファターゼ酵素と相互作用するように前記ホスファターゼ酵素が位置する、 [1] ~ [4] のいずれか一項に記載の伝導性測定システム。

[6] 前記ホスファターゼ酵素と前記ポリリン酸との相互作用の速度が、前記ポリメラーゼが前記ポリリン酸を生じる速度と同じか、それを超える、 [5] に記載の伝導性測定システム。

[7] 前記第 1 および前記第 2 の区画の各々が、電荷を有する、 [1] ~ [6] のいずれか一項に記載の伝導性測定システム。

[8] 前記細孔の内部が負電荷を有する、 [1] ~ [7] のいずれか一項に記載の伝導性測定システム。

[9] 前記細孔が、生物学的なものまたは合成によるものである、 [1] ~ [8] のいずれか一項に記載の伝導性測定システム。

[10] 前記細孔が、タンパク質性のものである、 [9] に記載の伝導性測定システム。

[11] 前記細孔が、溶血素タンパク質である、 [10] に記載の伝導性測定システム。

[12] 前記細孔が、固体細孔である、 [1] ~ [8] のいずれか一項に記載の伝導性測定システム。

[13] 前記細孔が、グラフェンからなる、 [1] ~ [12] のいずれか一項に記載の伝導性測定システム。

[14] 各々が実質的に同一の特徴を有する細孔のアレイをさらに含む、 [1] ~ [13] のいずれか一項に記載の伝導性測定システム。

[15] 異なる直径の細孔のアレイをさらに含む、 [1] ~ [13] のいずれか一項に記載の伝導性測定システム。

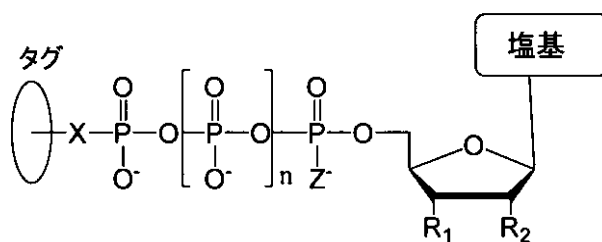
[16] 細孔のアレイをさらに含み、前記細孔が、前記障壁を越えて異なる電界を印加するように構成されている、 [1] ~ [13] のいずれか一項に記載の伝導性測定システム。

[17] 前記伝導性測定システムが、CMOS電子回路と一体化している、 [1] ~ [16] のいずれか一項に記載の伝導性測定システム。

[18] 図 46 に示すように、前記細孔または細孔のアレイが、CMOSダイに直接一体化している、 [17] に記載の伝導性測定システム。

[19] 構造

【化 69】



を有する化合物であって、前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペンタヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、アルコール、チオール基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基

、アジド基、またはそれらの組合せのうちの一つ以上を含み、 R_1 がOHであり、 R_2 がHまたはOHであり、XがO、NH、Sまたは CH_2 であり、ZがO、Sまたは BH_3 であり、前記塩基がアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルまたはこれら塩基の一つの誘導体であり、nが1、2、3または4であり、前記タグが、前記化合物の残りの電荷に対して反対の符号の電荷を有する化合物。

[2 0] 前記タグの前記電荷の大きさが、前記化合物の残りの前記電荷の大きさと同じである、[1 9]に記載の化合物。

[2 1] 前記タグが、複数のエチレングリコール単位を含む、[1 9]または[2 0]に記載の化合物。

[2 2] 前記タグが、16、20、24、または36個のエチレングリコール単位を含む、[1 9] ~ [2 1]のいずれか一項に記載の化合物。

[2 3] 前記タグが、追加の識別可能な部分を含む、[1 9] ~ [2 2]のいずれか一項に記載の化合物。

[2 4] 前記追加の識別可能な部分が、クマリン性色素である、[2 3]に記載の化合物。

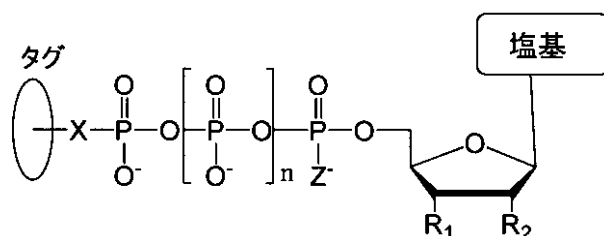
[2 5] 前記タグが、正電荷を有する、[1 9] ~ [2 4]のいずれか一項に記載の化合物。

[2 6] 前記タグの除去により、前記化合物の前記電荷が変化する、[1 9] ~ [2 5]のいずれか一項に記載の化合物。

[2 7] 前記タグが、適切な数のリシンまたはアルギニンをさらに含み、リン酸の数の均衡を保っている、[1 9] ~ [2 6]のいずれか一項に記載の化合物。

[2 8] 構造

【化70】



を有する異なる4種類の化合物を含む組成物であって、前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペンタヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、アルコール、チオール基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、またはそれらの組合せのうちの一つ以上を含み、 R_1 がOHであり、 R_2 がHまたはOHであり、XがO、NH、Sまたは CH_2 であり、ZがO、Sまたは BH_3 であり、nが1、2、3または4であり、前記タグが、前記化合物の残りの前記電荷に対して反対の符号の電荷を有し、第1の種類化合物の前記塩基がアデニンまたはその誘導体であり、第2の種類化合物の前記塩基がグアニンまたはその誘導体であり、第3の種類化合物の前記塩基がシトシンまたはその誘導体であり、第4の種類化合物の前記塩基がチミンもしくはその誘導体またはウラシルもしくはその誘導体であり、各種類の化合物にある前記タグが他の3種類の化合物の各々にある前記タグと異なる、組成物。

[2 9] 前記塩基および前記タグにおいて前記4種類の化合物の各々と異なる第5の種類化合物をさらに含み、前記第4の種類化合物の前記塩基がチミンまたはその誘導体である場合に、前記第5の種類化合物の前記塩基がウラシルまたはその誘導体であり、または前記第4の種類化合物の前記塩基がウラシルまたはその誘導体である場合に、

前記第 5 の種類の化合物の前記塩基がチミンまたはその誘導体である、[2 8] に記載の組成物。

[3 0] 化合物のアイデンティティを決定する方法であって、

(a) 前記化合物を、(i) ナノメートルスケールの直径を持つ少なくとも 1 つの細孔を有する物理的障壁によって分離されている第 1 および第 2 の電解質溶液が入った第 1 および第 2 の区画と；(i i) 前記障壁を越えて電界を印加するための手段と；(i i i) 前記電界の変化を測定するための手段とを含む伝導性測定システムと接触させることと；

(b) 前記化合物が前記細孔を通り抜けて移行するときに、前記電界の前記変化を記録し、前記電界の前記変化が、前記化合物と前記電解質と前記細孔との相互作用の結果であり、前記化合物のサイズ、電荷および組成を示すことと

を含み、それによって、前記変化と所定の値との相関から前記化合物の前記アイデンティティを決定することが可能になる、方法。

[3 1] 工程 (a) の前にホスファターゼ酵素で前記化合物を処理する工程をさらに含む、[3 0] に記載の方法。

[3 2] 化合物がタグであるかまたは前記タグの前駆体であるかどうかを決定する方法であって、

(a) 前記化合物を (i) ナノメートルスケールの直径を持つ少なくとも 1 つの細孔を有する物理的障壁によって分離されている第 1 および第 2 の電解質溶液が入った第 1 および第 2 の区画と；(i i) 前記障壁を越えて電界を印加するための手段と；(i i i) 前記電界の変化を測定するための手段とを含む伝導性測定システムと接触させることと；

(b) 前記化合物が前記細孔を通り抜けて移行するときに、前記電界の前記変化を記録することと；

(c) 前記電界の前記変化を、前記タグおよび前記タグの前記前駆体に対応する所定の値と比較することと

を含み、それによって、前記化合物が、前記タグであるかまたは前記その前駆体であるかどうかを決定する、方法。

[3 3] 工程 (a) において前記電界の電流バイアスを調節する工程をさらに含む、[3 0] ~ [3 2] のいずれか一項に記載の方法。

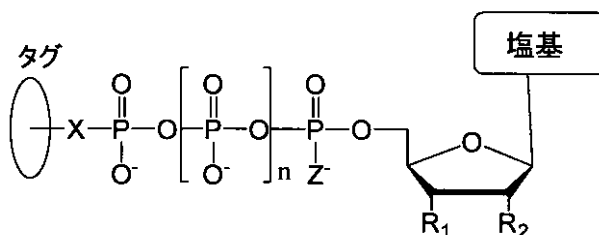
[3 4] 一本鎖 DNA のヌクレオチド配列を決定する方法であって、

(a) 前記一本鎖 DNA を

(i) ナノメートルスケールの直径を持つ少なくとも 1 つの細孔を有する物理的障壁によって分離されている第 1 および第 2 の電解質溶液が入った第 1 および第 2 の区画と；(i i) 前記障壁を越えて電界を印加するための手段と；(i i i) 前記電界の変化を測定するための手段と；(i v) 前記細孔に付着している少なくとも 1 つのポリメラーゼと；(v) 前記細孔に付着している 2 つ以上のホスファターゼ酵素とを含む伝導性測定システム、および

構造

【化 7 1】



を有する異なる 4 種類の化合物を含む組成物と接触させ、

前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化

合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペ
 ンタヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、アルコール、チオール基、
 シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、またはそれ
 らの組合せのうち1つ以上を含み、 R_1 がOHであり、 R_2 がHまたはOHであり、Xが
 O、NH、Sまたは CH_2 であり、ZがO、Sまたは BH_3 であり、nが1、2、3または
 4であり、前記タグが、前記化合物の残りの電荷に対して反対の符号の電荷を有し、第1
 の種類の化合物の前記塩基がアデニンまたはその誘導体であり、第2の種類の化合物の前
 記塩基がグアニンまたはその誘導体であり、第3の種類の化合物の前記塩基がシトシンま
 たはその誘導体であり、第4の種類の化合物の前記塩基がチミンもしくはその誘導体であ
 り、各種類の化合物にある前記タグが他の3種類の化合物の各々にある前記タグと異なり

前記一本鎖DNAが、前記細孔に付着している前記ポリメラーゼと接触して電解質溶液
 中にあり、DNA伸長産物を形成するように、プライマーの3'末端ヌクレオチド残基に
 ハイブリダイズした前記一本鎖DNAのヌクレオチド残基の直ぐ5'側の前記一本鎖DNA
 のヌクレオチド残基に対して前記化合物が相補的である場合に、前記ポリメラーゼが前
 記プライマーの前記化合物のうち1つの組み込みを触媒するのを可能にする条件下で、
 前記一本鎖DNAがその部分にハイブリダイズした前記プライマーを有し、

前記化合物の組み込みにより前記タグが付着しているポリリン酸が遊離し、

前記細孔に付着している前記ホスファターゼ酵素が、前記ポリリン酸から前記タグを切
 断して前記タグを遊離することと；

(b) 前記障壁を越えて電界を印加し、工程(a)において生成した前記タグが前記細
 孔を通り抜けて移行することによりもたらされる前記細孔を跨ぐ電子的変化を測定するこ
 とにより、工程(a)においてどの化合物が前記プライマーに組み込まれて前記DNA伸
 長産物を形成したかを決定し、前記電子的変化が、タグの各種類について異なり、それ
 によって、前記組み込まれた化合物に相補的な前記一本鎖DNA中の前記ヌクレオチド残基
 を同定することと；

(c) 配列決定される前記一本鎖DNAの各ヌクレオチド残基に対して工程(b)を繰
 り返し実施することと

を含み、それによって、前記一本鎖DNAの前記ヌクレオチド配列を決定する、方法。

[35] 一本鎖DNAのヌクレオチド配列を決定する方法であって、

(a) 前記一本鎖DNAを

(i) ナノメートルスケールの直径を持つ少なくとも1つの細孔を有する物理的障壁に
 よって分離されている第1および第2の電解質溶液が入った第1および第2の区画と；

(ii) 前記障壁を越えて電界を印加するための手段と；

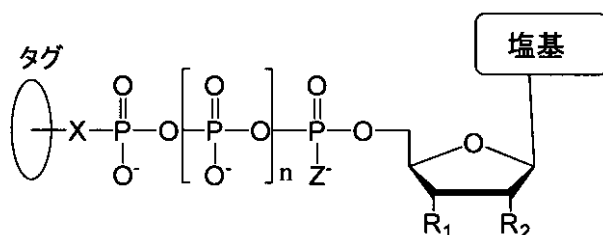
(iii) 前記電界の変化を測定するための手段と；

(iv) 前記細孔に付着している少なくとも1つのポリメラーゼと；

(v) 前記細孔に付着している2つ以上のホスファターゼ酵素とを含む伝導性測定システ
 ム、および

構造

【化72】



を有する化合物と接触させ、

前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペントヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、アルコール、チオール基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、またはそれらの組合せのうち1つ以上を含み、 R_1 がOHであり、 R_2 がHまたはOHであり、XがO、NH、Sまたは CH_2 であり、ZがO、Sまたは BH_3 であり、前記塩基が、アデニン、グアニン、シトシン、チミンまたはこれらの塩基のうち1つの誘導体であり、nが1、2、3または4であり、前記タグが、前記化合物の残りの電荷に対して反対の符号の電荷を有し、

前記一本鎖DNAが、前記細孔に付着している前記ポリメラーゼと接触して電解質溶液中にあり、DNA伸長産物を形成するように、プライマーの3'末端ヌクレオチド残基にハイブリダイズした前記一本鎖DNAのヌクレオチド残基の直ぐ5'側にある前記一本鎖DNAのヌクレオチド残基に対して前記化合物が相補的である場合に、前記ポリメラーゼが前記プライマーへの前記化合物の組み込みを触媒するのを可能にする条件下で、前記一本鎖DNAがその部分にハイブリダイズした前記プライマーを有し、

前記化合物が組み込まれない場合は、化合物が組み込まれるまで、異なる化合物との前記接触を反復して繰り返し、ただし(1)前記化合物にある塩基の種類が、前の化合物の各々にある塩基の種類と異なり、(2)前記化合物にあるタグの種類が、前の化合物の各々にあるタグの種類と異なり、

前記化合物の組み込みにより前記タグが付着しているポリリン酸が遊離し、

前記細孔に付着している前記ホスファターゼ酵素が、前記ポリリン酸から前記タグを切断して前記タグを遊離することと；

(b)前記障壁を越えて電界を印加し、工程(a)において生成した前記タグが前記細孔を通り抜けて移行することによりもたらされる前記細孔を跨ぐ電子的変化を測定することにより、工程(a)においてどの化合物が前記プライマーに組み込まれて前記DNA伸長産物を形成したかを決定し、前記電子的変化が、タグの各種類について異なり、それによって、前記組み込まれた化合物に相補的な前記一本鎖DNA中の前記ヌクレオチド残基を同定することと；

(c)配列決定される前記一本鎖DNAの各ヌクレオチド残基に対して工程(a)および(b)を反復して実施することと

を含み、それによって、前記一本鎖DNAの前記ヌクレオチド配列を決定する、方法。

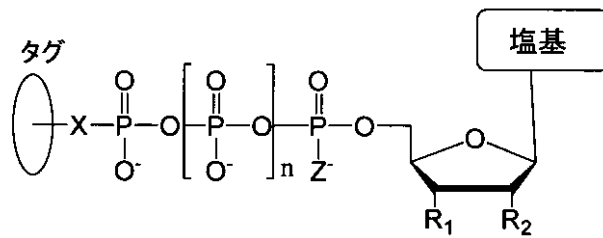
[36] 一本鎖RNAのヌクレオチド配列を決定する方法であって、

(a)前記一本鎖RNAを

(i)ナノメートルスケールの直径を持つ少なくとも1つの細孔を有する物理的障壁によって分離されている第1および第2の電解質溶液が入った第1および第2の区画と；(ii)前記障壁を越えて電界を印加するための手段と；(iii)前記電界の変化を測定するための手段と；(iv)前記細孔に付着している少なくとも1つのポリメラーゼと；(v)前記細孔に付着している2つ以上のホスファターゼ酵素とを含む伝導性測定システム、および

構造

【化 7 3】



を有する異なる 4 種類の化合物を含む組成物と接触させ、

前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペンタヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、アルコール、チオール基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、またはそれらの組合せのうちの一つ以上を含み、 R_1 が OH であり、 R_2 が H または OH であり、X が O、NH、S または CH_2 であり、Z が O、S または BH_3 であり、n が 1、2、3 または 4 であり、前記タグが、前記化合物の残りの電荷に対して反対の符号の電荷を有し、第 1 の種類の化合物の前記塩基が、アデニンまたはその誘導体であり、第 2 の種類の化合物の前記塩基が、グアニンまたはその誘導体であり、第 3 の種類の化合物の前記塩基が、シトシンまたはその誘導体であり、前記第 4 の種類の化合物の前記塩基が、ウラシルまたはその誘導体であり、各種類の化合物にある前記タグが、他の 3 種類の化合物の各々にある前記タグと異なり、

前記一本鎖 RNA が、前記細孔に付着している前記ポリメラーゼと接触して電解質溶液中にあり、RNA 伸長産物を形成するように、プライマーの 3' 末端ヌクレオチド残基にハイブリダイズした前記一本鎖 RNA のヌクレオチド残基の直ぐ 5' 側の前記一本鎖 RNA のヌクレオチド残基に対して前記化合物が相補的である場合に、前記ポリメラーゼが前記プライマーへの前記化合物のうちの一つの組み込みを触媒するのを可能にする条件下で、前記一本鎖 RNA がその部分にハイブリダイズした前記プライマーを有し、

前記化合物の組み込みにより前記タグが付着しているポリリン酸が遊離し、

前記細孔に付着している前記ホスファターゼ酵素が、前記ポリリン酸から前記タグを切断して前記タグを遊離することと；

(b) 前記障壁を越えて電界を印加し、工程 (a) において生成した前記タグが前記細孔を通り抜けて移行することによりもたらされる前記細孔を跨ぐ電子的変化を測定することにより、工程 (a) においてどの化合物が前記プライマーに組み込まれて前記 RNA 伸長産物を形成したかを決定し、前記電子的変化が、タグの各種類について異なり、それによって、前記組み込まれた化合物に相補的な前記一本鎖 RNA 中の前記ヌクレオチド残基を同定することと；

(c) 配列決定される前記一本鎖 RNA の各ヌクレオチド残基に対して工程 (b) を繰り返し実施することと

を含み、それによって、前記一本鎖 RNA の前記ヌクレオチド配列を決定する、方法。

[37] 一本鎖 RNA のヌクレオチド配列を決定する方法であって、

(a) 前記一本鎖 RNA を

(i) ナノメートルスケールの直径を持つ少なくとも一つの細孔を有する物理的障壁によって分離されている第 1 および第 2 の電解質溶液が入った第 1 および第 2 の区画と；

(ii) 前記障壁を越えて電界を印加するための手段と；

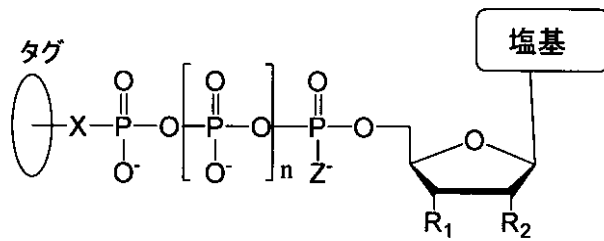
(iii) 前記電界の変化を測定するための手段と；

(iv) 前記細孔に付着している少なくとも一つのポリメラーゼと；

(v) 前記細孔に付着している 2 つ以上のホスファターゼ酵素とを含む伝導性測定システム、および

構造

【化 7 4】



を有する化合物と接触させ、

前記タグが、エチレングリコール、アミノ酸、炭水化物、ペプチド、色素、化学発光化合物、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、ペンタヌクレオチド、ヘキサヌクレオチド、脂肪酸、芳香族酸、アルコール、チオール基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、またはそれらの組合せのうちの一つ以上を含み、 R_1 がOHであり、 R_2 がHまたはOHであり、XがO、NH、Sまたは CH_2 であり、ZがO、Sまたは BH_3 であり、前記塩基が、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはこれら塩基のうちの一つの誘導體であり、nが1、2、3または4であり、前記タグが、前記化合物の残りの電荷に対して反対の符号の電荷を有し、

前記一本鎖RNAが、前記細孔に付着している前記ポリメラーゼと接触して電解質溶液中にあり、RNA伸長産物を形成するように、プライマーの3'末端ヌクレオチド残基にハイブリダイズした前記一本鎖DNAのヌクレオチド残基の直ぐ5'側にある前記一本鎖RNAのヌクレオチド残基に対して前記化合物が相補的である場合に、前記ポリメラーゼが前記プライマーへの前記化合物の組み込みを触媒するのを可能にする条件下で、前記一本鎖RNAがその部分にハイブリダイズした前記プライマーを有し、

前記化合物が組み込まれない場合は、化合物が組み込まれるまで、異なる化合物との前記接触を反復して繰り返し、ただし(1)前記化合物にある塩基の種類が、前の化合物の各々にある塩基の種類と異なり、(2)前記化合物にあるタグの種類が、前の化合物の各々にあるタグの種類と異なり、

前記化合物の組み込みにより前記タグが付着しているポリリン酸が遊離し、

前記細孔に付着している前記ホスファターゼ酵素が、前記ポリリン酸から前記タグを切断して前記タグを遊離することと；

(b)前記障壁を越えて電界を印加し、工程(a)において生成した前記タグが前記細孔を通り抜けて移行することによりもたらされる前記細孔を跨ぐ電子的変化を測定することにより、工程(a)においてどの化合物が前記プライマーに組み込まれて前記RNA伸長産物を形成したかを決定し、前記電子的変化が、タグの各々について異なり、それによって、前記組み込まれた化合物に相補的な前記一本鎖RNA中の前記ヌクレオチド残基を同定することと；

(c)配列決定される前記一本鎖RNAの各ヌクレオチド残基に対して工程(a)および(b)を反復して実施することと

を含み、それによって、前記一本鎖RNAの前記ヌクレオチド配列を決定する、方法。

[38] ポリメラーゼより多くのホスファターゼ酵素が、前記細孔に付着している、[34]~[37]のいずれか一項に記載の方法。

[39] 前記一本鎖DNAまたはRNAが、どちらを適用するにしても、二本鎖DNAまたはRNAを変性させることによって得られる、[34]~[37]のいずれか一項に記載の方法。

[40] 同じ一本鎖DNAまたはRNAの複数のコピーが、ビーズに固定化されてい

る、[3 4] ~ [3 7] のいずれか一項に記載の方法。

[4 1] 前記一本鎖DNAまたはRNAの前記ヌクレオチド配列が、同じ一本鎖DNAまたはRNAの複数のコピーを使用して決定される、[4 0] に記載の方法。

[4 2] 工程 (b) の各反復後に、前記一本鎖DNAまたはRNAとの接触によって組み込まれていない化合物を除去する洗浄工程をさらに含む、[3 4] ~ [4 1] のいずれか一項に記載の方法。

[4 3] 工程 (b) の各反復後に、前記タグに付着している追加の識別可能な部分のアイデンティティを決定する工程をさらに含む、[3 4] ~ [4 2] のいずれか一項に記載の方法。

[4 4] 前記遊離したタグの少なくとも85 ~ 99 % が、前記細孔を通り抜けて移行する、[3 4] ~ [4 3] のいずれか一項に記載の方法。

[4 5] 前記化合物が、可逆性ターミネーターをさらに含む、[3 4] ~ [4 4] のいずれか一項に記載の方法。

[4 6] 工程 (b) の各反復後に、前記可逆性ターミネーターを除去する工程をさらに含む、[4 5] に記載の方法。

[4 7] 前記可逆性ターミネーターが、生物学的手段、化学的手段、物理的手段によって、または光照射によって除去される、[4 6] に記載の方法。

[4 8] 前記細孔の内部が、前記タグのまたは前記タグが付着している前記ポリリン酸の電荷に対して反対の符号の電荷を有する、[3 4] ~ [4 7] のいずれか一項に記載の方法。

[4 9] 前記伝導性測定システムの前記第1および前記第2の区画の各々が、電荷を有する、[3 4] ~ [4 8] のいずれか一項に記載の方法。

[5 0] 前記第1および前記第2の区画の前記電荷の極性が、反対である、[4 9] に記載の方法。

[5 1] 前記第1および前記第2の区画の前記電荷が、調節可能である、[4 9] に記載の方法。

[5 2] 工程 (b) において前記細孔を通り抜けて移行する前記タグの速度が、タグの前記電荷と前記第1および前記第2の区画の前記電荷とに基づいて決定される、[3 4] ~ [5 1] のいずれか一項に記載の方法。

[5 3] 前記第1および前記第2の区画の各々が、工程 (a) において前記タグまたは前記タグが付着している前記ポリリン酸が遊離する速度を超えるか、または同じ速度で、工程 (b) において前記タグが前記細孔を通り抜けて移行するような電荷を有する、[3 4] ~ [5 2] のいずれか一項に記載の方法。

[5 4] 少なくとも第1および第2の電解質溶液を分離している電気的抵抗がある障壁と；

前記電気的抵抗がある障壁は、ナノメートルスケールの直径を持つ少なくとも1つの細孔を含み；

前記第1および第2の電解質溶液の少なくとも一方にある、タグを持つ少なくとも1つの化合物と；

前記少なくとも1つの細孔は、印加電位によって前記第1および第2の電解質溶液を跨いでイオン電流を起こすことができるように構成されており；

前記少なくとも1つの細孔は、前記化合物から前記タグを切断して前記タグを遊離するように構成された特徴部を含み；

前記イオン電流を測定する手段、ならびに前記少なくとも1つの細孔が前記タグによって遮られていない時間および前記タグが伝導性の低下したパルスを引き起こす時間も含めて、時系列としてその時間経過を記録する手段と

を含む伝導性測定システム。

[5 5] 前記タグが、前記細孔においてイオン電流帯域幅の制限より長い滞留時間および前記イオン電流を測定する前記手段の電流ショットノイズを有する、[5 4] に記載の伝導性測定システム。

[5 6] 遮られていない細孔の伝導性レベルと統計的に一致する領域、および伝導性の低下したパルス、また伝導性の低下した個々のパルス内の統計的に定常なセグメントに伝導性時系列のセグメントを記述する方法であって、前記伝導性時系列が、

少なくとも第 1 および第 2 の電解質溶液を分離している電氣的抵抗がある障壁と；

前記電氣的抵抗がある障壁は、ナノメートルスケールの直径を持つ少なくとも 1 つの細孔を含み；

前記第 1 および第 2 の電解質溶液の少なくとも一方にある、タグを持つ少なくとも 1 つの化合物と；

前記少なくとも 1 つの細孔は、印加電位によって前記第 1 および第 2 の電解質溶液を跨いでイオン電流を起こすことができるように構成されており；

前記少なくとも 1 つの細孔は、前記化合物から前記タグを切断して前記タグを遊離するように構成された特徴部を含み；

前記イオン電流を測定する手段、ならびに前記少なくとも 1 つの細孔が前記タグによって遮られていない時間および前記タグが伝導性の低下したパルスを引き起こす時間も含めて、前記伝導性時系列を記録する手段と

を含む伝導性測定システムで生成され；

伝導性時系列のセグメントを記述するための前記方法が、

(a) 前記未加工伝導性時系列から推定した、ヒドンマルコフモデルの連続密度の最尤状態配列のビタビ復号と；

(b) 開孔伝導性レベルからの逸脱に対する閾値との比較による伝導性の低下したパルスの領域の記述と；

(c) 各セグメントに対する前記イオン電流レベルの前記中心傾向を推定することによって、または中心傾向とセグメント継続時間を一緒に測定することによって、伝導性の低下したパルスの特徴づける手段とからなる群から選択され、セグメント中心傾向の前記測定が、

(i) 連続密度ヒドンマルコフモデルの一部として前記伝導性時系列から推定した第 1 の GMM のガウス成分の平均パラメータと；

(i i) 算術平均と；

(i i i) トリム平均と；

(i v) 中央値と；

(v) サンプル位置の最大事後推定量、またはサンプル位置の最尤推定量とからなる群から選択される方法。

[5 7] (a) 伝導性セグメントの中心傾向の前記測定に基づく第 2 の混合ガウスモデルの最尤法推定と；

(b) 前記伝導性時系列のセグメントの中心傾向の前記推定の経験的確率密度の補間および平滑化、ならびに前記補間する関数の導関数の平方根によるピーク検出と；

(c) 多モード分布推定量のモードを位置指定する別の手段との少なくとも 1 つをさらに含む、[5 6] に記載の方法。

[5 8] 溶液中の化合物の少なくとも 1 つのパラメータを決定する方法であって、

第 1 の貯蔵部に第 1 の流体を入れることと；

第 2 の貯蔵部に第 2 の流体を入れることと；

前記第 1 および前記第 2 の流体の少なくとも一方は、少なくとも 1 つの化合物を含み、前記化合物は、タグ付けされたヌクレオチドまたはタグ付けされたヌクレオチドから切断されたタグであり；

前記第 1 の貯蔵部内の前記第 1 の流体は、電氣的抵抗がある障壁で前記第 2 の貯蔵部内の前記第 2 の流体と分離されており；

前記電氣的抵抗がある障壁は、少なくとも 1 つの細孔を含み；

前記第 1 と前記第 2 の流体の間の電位により、前記第 1 の流体、前記少なくとも 1 つの細孔、および前記第 2 の流体にイオン電流を流すことと；

前記少なくとも 1 つの細孔を通して流れる前記イオン電流および前記イオン電流の変化

の継続時間を測定することと；

前記イオン電流の前記測定は、前記少なくとも1つの細孔と相互作用している前記化合物によって引き起こされる前記イオン電流の減少を測定するのに十分な一定の時間実行され；

前記イオン電流の前記変化および前記一定の時間を通じての前記イオン電流の前記変化の前記継続時間を数理的に解析することによって、前記化合物の少なくとも1つのパラメータを決定することと

を含み、前記数理解析が、

i) 連続密度ヒドンマルコフモデルの一部として前記伝導性時系列から推定した第1のGMMのガウス成分の平均パラメータと；

i i) 事象平均抽出と；

i i i) 最尤事象状態割り当てと；

i v) 閾値検出および平均化と；

v) スライディングウインドウ分析と；

v i) 算術平均と；

v i i) トリム平均と；

v i i i) 中央値と；

i x) サンプル位置の最大事後推定量、またはサンプル位置の最尤推定量と

からなる群から選択される少なくとも1つの工程を含む、方法。

[5 9] 前記化合物が、前記イオン電流の前記減少を測定する前に、ホスファターゼで処理される、[5 6] ~ [5 8] のいずれか一項に記載の方法。

[6 0] 前記化合物が、第1の正味電荷、および化学的、物理的または生物学的反応の後に、異なる第2の正味電荷を有する選択的に帯電した化合物である、[5 6] ~ [5 9] のいずれか一項に記載の方法。

[6 1] 前記数理解析が、GMM、閾値検出および平均化、ならびにスライディングウインドウ分析からなる群から選択される、[5 6] ~ [6 0] のいずれか一項に記載の方法。

[6 2] 前記少なくとも1つのパラメータが、前記化合物の濃度、サイズ、電荷および組成からなる群から選択される、[5 6] ~ [6 1] のいずれか一項に記載の方法。

[6 3] 前記伝導性測定システムを較正する工程をさらに含む、[3 0] ~ [5 3] および [5 6] ~ [6 2] のいずれか一項に記載の方法。

[6 4] 精度が、4 より大きい、[3 0] ~ [5 3] および [5 6] ~ [6 3] のいずれか一項に記載の方法。

[6 5] 精度が、5 より大きい、[3 0] ~ [5 3] および [5 6] ~ [6 3] のいずれか一項に記載の方法。

[6 6] 精度が、6 より大きい、[3 0] ~ [5 3] および [5 6] ~ [6 3] のいずれか一項に記載の方法。

[6 7] ヌクレオチド重合事象において切断され、ナノ細孔を用いて検出することができるタグを含む、タグ付けされたヌクレオチド。

[6 8] 前記タグが、前記ヌクレオチドの5' - リン酸に付着している、[6 7] に記載のヌクレオチド。

[6 9] 前記タグが発蛍光団ではない、[6 7] に記載のヌクレオチド。

[7 0] 前記タグが、その電荷、形状、サイズまたはそれらの任意の組合せによって検出可能である、[6 7] に記載のヌクレオチド。

[7 1] 前記第1および第2の電解質溶液が同じである、[1] に記載の伝導性測定システム。

[7 2] 前記第1および前記第2の電解質溶液が同じである、[5 4] に記載の伝導性測定システム。

[7 3] 前記第1および前記第2の電解質溶液が同じである、[5 6] に記載の方法

[7 4] 前記第 1 の流体および前記第 2 の流体が同じである、[5 8] に記載の方法
。

[7 5] ヌクレオチド重合事象において切断され、ナノ細孔を用いて検出することが
できるタグを含む、タグ付けされたヌクレオチド。

[7 6] 前記タグが、前記ヌクレオチドの 5' - リン酸に付着している、[7 5] に
記載のヌクレオチド。

[7 7] 前記タグが発蛍光団ではない、[7 5] に記載のヌクレオチド。

[7 8] 前記タグが、その電荷、形状、サイズまたはその任意の組合せによって検出
可能である、[7 5] に記載のヌクレオチド。

[7 9] 核酸配列を決定する方法であって、別々にアドレス可能な部位のアレイを用
意し、各部位が、核酸ポリメラーゼが付着しているナノ細孔を有することと、前記アレイ
の所与の部位で、タグ付けされたヌクレオチドをポリメラーゼで重合させることとを含み
、タグが遊離し、前記所与の部位でナノ細孔によって検出される、方法。