

【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29年3月2日(2017.3.2)

【公表番号】特表2016-510218(P2016-510218A)

【公表日】平成28年4月7日(2016.4.7)

【年通号数】公開・登録公報2016-021

【出願番号】特願2015-557162(P2015-557162)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 M	1/00	(2006.01)
C 1 2 N	9/22	(2006.01)
C 1 2 N	9/16	(2006.01)
C 1 2 N	9/50	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
G 0 1 N	37/00	(2006.01)
G 0 1 N	27/447	(2006.01)
G 0 1 N	33/68	(2006.01)
G 0 1 N	33/48	(2006.01)
G 0 1 N	33/483	(2006.01)
C 0 7 K	1/14	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 M	1/00	Z N A A
C 1 2 N	9/22	
C 1 2 N	9/16	
C 1 2 N	9/16	Z
C 1 2 N	9/50	
C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	37/00	1 0 1
G 0 1 N	27/26	3 3 1 E
G 0 1 N	27/26	3 1 5 K
G 0 1 N	27/26	3 3 1 J
G 0 1 N	33/68	
G 0 1 N	33/48	A
G 0 1 N	33/483	F
C 0 7 K	1/14	

【手続補正書】

【提出日】平成29年1月26日(2017.1.26)

【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】

生体分子プロセッサを含む装置であって、各生体分子プロセッサが、  
固体基板によって画定される1つ以上のバイオリアクターチャンバー；  
各バイオリアクターチャンバー内にありかつ前記固体基板に取り付けられた支持構造体

;

前記支持構造体に固定化された切断酵素であって、前記切断酵素と機能的に結合したバイオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断するように前記バイオリアクターチャンバー内に機能的に配置された、切断酵素；並びに

前記固体基板内に形成されかつ前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーに流体的に連結された1つ以上の飛行時間型チャネルであって、前記1つ以上の飛行時間型チャネルのそれぞれが入力端及び出力端を有し、前記1つ以上の飛行時間型チャネルのそれぞれが、少なくとも（i）前記1つ以上の飛行時間型チャネルの入力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャネルに接触する第1のセンサーと（ii）前記1つ以上の飛行時間型チャネルの出力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャネルに接触する第2のセンサーとを含む2つ以上のセンサーを含む、1つ以上の飛行時間型チャネルを含む、装置。

【請求項2】

前記1つ以上のバイオリアクターチャンバー内及び前記1つ以上の飛行時間型チャネルの長さ方向に電場を生成するように機能的に配置された電場発生器をさらに含む、請求項1に記載の装置。

【請求項3】

前記1つ以上の飛行時間型チャネルが、幅50nm以下でありかつ深さ50nm以下である、請求項1に記載の装置。

【請求項4】

前記1つ以上の飛行時間型チャネルが、長さ5μm～250μmである、請求項1に記載の装置。

【請求項5】

前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーが、幅100～1000nmである、請求項1に記載の装置。

【請求項6】

前記1つ以上のバイオリアクターチャンバー内の前記支持構造体が、幅50～900nmである、請求項1に記載の装置。

【請求項7】

前記固体基板がポリマー材料で作られている、請求項1に記載の装置。

【請求項8】

前記切断酵素がエキソヌクレアーゼ又はエキソリボヌクレアーゼである、請求項1に記載の装置。

【請求項9】

前記2つ以上のセンサーがそれぞれ、貴金属ナノワイヤ、セグメント化されたナノワイヤ、又はナノ粒子から成る、1対の検出電極を含む、請求項1に記載の装置。

【請求項10】

前記1つ以上の飛行時間型チャネルが3つ以上のセンサーを含む、請求項1に記載の装置。

【請求項11】

前記生体分子プロセッサが、前記固体基板の壁によって画定されるフィーダーチャネルをさらに含み、前記フィーダーチャネルが、前記固体基板の表面の近位にある入力端から前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーの近位にある出力端まで延在する長さを有する、請求項1に記載の装置。

【請求項12】

前記1つ以上の飛行時間型チャネルが、電荷中性の親水性壁表面、荷電した親水性壁表面、又は電荷中性の疎水性壁表面を含む、請求項1に記載の装置。

【請求項13】

10,000個以上の生体分子プロセッサを含む、請求項1に記載の装置。

【請求項14】

以下の工程を含む、核酸分子の配列決定の方法：

請求項 1 に記載の装置を提供する工程；

前記装置の前記生体分子プロセッサに、1つ以上の核酸分子を含む試料を、前記バイオリアクターチャンバー内の前記固定化された切断酵素が前記試料中の前記1つ以上の核酸分子に結合して前記1つ以上の核酸分子を前記1つ以上の飛行時間型チャネルの前記入力端に1つずつ入る単量体ヌクレオチドへと切断するのに有効な条件下で供給する工程；

切断された前記単量体ヌクレオチドを前記1つ以上の飛行時間型チャネルを通して輸送するために、前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーを横切って及び前記1つ以上の飛行時間型チャネルの長さ方向に電場を印加する工程；

前記印加する工程に基づいて、切断された前記単量体ヌクレオチドを、それらが前記1つ以上の飛行時間型チャネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過する際に検出する工程；

前記検出する工程に基づいて、切断された各単量体ヌクレオチドが前記1つ以上の飛行時間型チャネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過するのにどれくらい時間がかかるかを測定する工程；並びに

前記測定する工程に基づいて前記単量体ヌクレオチドを同定する工程。

#### 【請求項 1 5】

以下の工程を含む、試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法：

そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれ自身ハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程であって、前記1つ以上の核酸分子及びそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれが、標的特異的部分とヘアピン形成に好適な一本鎖3'アダプター部分とを含む、工程；

前記試料を、前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の3'アダプター部分がヘアピンを形成するのに有効な条件に供する工程；

ポリメラーゼを提供する工程；

伸長混合物を形成させるために、1つ以上の3'ヘアピン化核酸分子及びその相補体を前記ポリメラーゼと混合する工程；

1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子及びその相補体を、それらのそれぞれの3'ヘアピン化領域から伸長させる工程；並びに

前記試料中の1つ以上の核酸分子を同定するために、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子の少なくとも一部を配列決定する工程。

#### 【請求項 1 6】

以下の工程を含む、試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法：

そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれ自身ハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程であって、前記1つ以上の核酸分子及びそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれが、標的特異的部分、5'アダプター部分、及び3'アダプター部分を含み、前記5'及び3'アダプター部分がそれぞれヘアピン形成に好適である、工程；

1つ以上的一本鎖核酸分子及びその相補体の収集物を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子をその相補体から変性させる工程であって、前記1つ以上的一本鎖核酸分子及びその相補体のそれぞれの5'及び3'アダプター部分のヘアピン配列がヘアピンを形成する、工程；

複数の固定化された捕捉オリゴヌクレオチドプローブを含む固体支持体を提供する工程であって、各捕捉オリゴヌクレオチドプローブが前記1つ以上の核酸分子又はその相補体の標的特異的部分の領域に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、工程；

変性させた前記一本鎖核酸分子及びその相補体のうちの1つ以上を、前記固体支持体上に固定化されたそれらの相補的な捕捉オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成させる工程；

ポリメラーゼを提供する工程；

前記ポリメラーゼを、ハイブリッド形成させた前記核酸分子及びその相補体のうちの1

つ以上を含有する前記固体支持体に接触させる工程；

1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子又はその相補体を、それらのそれぞれの3'ヘアピン化領域から伸長させる工程であって、それによって前記1つ以上の核酸分子が前記捕捉オリゴヌクレオチド及び前記固体支持体から遊離する、工程；並びに

前記試料中の1つ以上の核酸分子を同定するために、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子の少なくとも一部を配列決定する工程。

#### 【請求項17】

以下の工程を含む、試料中の複数の標的核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法：

そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれれハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程であって、前記1つ以上の核酸分子及びそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれが、標的特異的部分、5'アダプター部分、及び一本鎖ホモポリマー反復配列を含む3'アダプター部分を含む、工程；

1つ以上の一一本鎖核酸分子及びその相補体の収集物を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子をその相補体から変性させる工程；

前記1つ以上の一一本鎖核酸分子及びその相補体の3'末端に対して相補的な複数のオリゴヌクレオチドプライマーを提供する工程；

ポリメラーゼを提供する工程；

伸長混合物を形成させるために、前記1つ以上の一一本鎖核酸分子及びその相補体の収集物を前記ポリメラーゼ及びプライマーと混合する工程；

前記オリゴヌクレオチドプライマーを、それらの相補的な、前記1つ以上の一一本鎖核酸分子及びその相補体の3'末端とハイブリッド形成させる工程；

1つ以上の完全長の二本鎖核酸分子を形成させるために、ハイブリッド形成させた前記プライマーを伸長させる工程；並びに

前記試料中の1つ以上の核酸分子を同定するために、前記1つ以上の完全長の二本鎖核酸分子の少なくとも一部を配列決定する工程。

#### 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

本明細書で提案されるアプローチは、その全体が参照によって本明細書に組み入れられるBrantonら、The Potential and Challenges of Nanopore Sequencing, "Nat.Biotechnol." 26:1146-1153(2008)によって言及されたような、ナノポアベースのDNA配列決定技術に関連する主要な難題に直接対処する。第1に、移動速度の低下を必要とするナノポアシーケンシングに関連するバンド幅の限界は、個々の塩基は、酵素の切り取り速度及び印加される電場並びに単量体の電気泳動移動度によって決まる長さだけ間隔を空ける( $t$ )という事実によって否定される。例えば、1,000ヌクレオチド $s^{-1}$ のエキソヌクレアーゼの切り取り速度(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるMatsuura et al., "Real Time Observation of a Single DNA Digestion by Lambda Exonuclease Under a Fluorescence Microscope Field," Nucleic Acids Res. 29:e79 (2001))及び0.1mm $s^{-1}$ の線速度を用いると、ヌクレオチドの間隔は100nmである。開始時間及び停止時間は、飛行管内に備えられた少なくとも2つの電極対によって測定されるので、飛行管ナノチャネル内に複数のヌクレオチドが存在することは課題ではない。第2に、ナノポアの厚さが0.34nm未満であるという単一塩基分析のための要件は、エキソヌクレアーゼによって課されるdNMPの間隔、及び、ヌクレオチド塩基の識別には阻止電流を用いないという事実のために、必要ではない。実際、ヌクレオチドの識別は、ヌクレオチド実体の確立されたクロマトグラフィ特性及び電気泳動特性に基づく(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるCzarnecka et al., "Application of Solid Phas

e Extraction and High-Performance Liquid Chromatography to Qualitative and Quantitative Analysis of Nucleotides and Nucleosides in Human Cerebrospinal Fluid," J. Chromatogr. B 822:85-90 (2005) )。加えて、トランスクンダクタンス又はトンネル電流の使用、及び、変換されたシグナルに対する分子配向効果に関する潜在的な課題は、本発明には存在しない(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるZikic et al., "Characterization of the Tunneling Conductance Across DNA Bases," Phys. Rev. E 74(1 Pt 1):011919 (2006))。マイクロ流体要素及びナノ流体要素の双方が、確立された複製技術を用いて成形可能な物質にて作製されるので、それらは低コスト且つ高生産率で作製することができる。加えて、多孔性鋳型における鋳型法又は本明細書に記載されている他の方法を用いてナノ規模の電極を生成し、検出要素の高規模製造を可能にするであろう。第4に、本発明の生体分子プロセッサは、本明細書に記載されているようにマイクロ規模のモジュールに接続することができ、配列解析にかけられる前に試料を処理する自律システムを生成することができる。例えば、DNAの標的細胞からの選択、精製、及び切り取りを、配列決定前に完全に自動化された方法で実施することができる。加えて、多種多様な成形可能な物質によりもたらされる物質特性の柔軟性及びモジュール式アプローチの採用は、適用に最適な基板物質の選択と共に、これらのシステムの組み立てを可能にするであろう。最後に、これらのモジュールの低成本での製造及びそれらの単純な組み立て並びに組み立てられたシステムの高い機能性は低成本のプラットフォームを提供するであろうし、その自動化能力は、再配列決定又はデノボシーケンシングのためのプラットフォームを、臨床の現場又は小さな発見ベースの研究室の中で直接作製するであろう。

#### [本発明1001]

生体分子プロセッサを含む装置であって、各生体分子プロセッサが、  
固体基板によって画定される1つ以上のバイオリアクターチャンバー；  
各バイオリアクターチャンバー内にありかつ前記固体基板に取り付けられた支持構造体；

前記支持構造体に固定化された切断酵素であって、前記切断酵素と機能的に結合したバイオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断するよう前記バイオリアクターチャンバー内に機能的に配置された、切断酵素；並びに

前記固体基板内に形成されかつ前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーに流体的に連結された1つ以上の飛行時間型チャネルであって、前記1つ以上の飛行時間型チャネルのそれぞれが入力端及び出力端を有し、前記1つ以上の飛行時間型チャネルのそれぞれが、少なくとも(i)前記1つ以上の飛行時間型チャネルの入力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャネルに接触する第1のセンサーと(ii)前記1つ以上の飛行時間型チャネルの出力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャネルに接触する第2のセンサーとを含む2つ以上のセンサーを含む、1つ以上の飛行時間型チャネルを含む、装置。

#### [本発明1002]

前記1つ以上のバイオリアクターチャンバー内及び前記1つ以上の飛行時間型チャネルの長さ方向に電場を生成するよう機能的に配置された電場発生器をさらに含む、本発明1001の装置。

#### [本発明1003]

前記1つ以上の飛行時間型チャネルが、幅50nm以下でありかつ深さ50nm以下である、本発明1001の装置。

#### [本発明1004]

前記1つ以上の飛行時間型チャネルが、長さ5μm～250μmである、本発明1001の装置。

#### [本発明1005]

前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーが、幅100～1000nmである、本発明1001の装置。

[本発明1006]

前記1つ以上のバイオリアクターチャンバー内の前記支持構造体が、幅50～900nmである、本発明1001の装置。

[本発明1007]

前記固体基板がポリマー材料で作られている、本発明1001の装置。

[本発明1008]

前記切断酵素がエキソヌクレアーゼ又はエキソリボヌクレアーゼである、本発明1001の装置。

[本発明1009]

前記切断酵素がプロセッサーなエキソヌクレアーゼ又はエキソリボヌクレアーゼである、本発明1008の装置。

[本発明1010]

前記切断酵素がプロテアーゼである、本発明1001の装置。

[本発明1011]

前記2つ以上のセンサーがそれぞれ、貴金属ナノワイヤ、セグメント化されたナノワイヤ、又はナノ粒子から成る、1対の検出電極を含む、本発明1001の装置。

[本発明1012]

各検出電極対が、それらが前記飛行時間型チャネルに接触する狭い断面を有する、本発明1011の装置。

[本発明1013]

前記1つ以上の飛行時間型チャネルが3つ以上のセンサーを含む、本発明1001の装置。

[本発明1014]

前記生体分子プロセッサが、前記固体基板の壁によって画定されるフィーダーチャネルをさらに含み、前記フィーダーチャネルが、前記固体基板の表面の近位にある入力端から前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーの近位にある出力端まで延在する長さを有する、本発明1001の装置。

[本発明1015]

前記フィーダーチャネルの前記入力端の近位にある、前記フィーダーチャネルに接触するセンサーをさらに含む、本発明1014の装置。

[本発明1016]

前記フィーダーチャネルのセンサーが1対の検出電極を含む、本発明1015の装置。

[本発明1017]

前記フィーダーチャネルが、前記入力端と前記出力端の間に1つ以上のエントロピートラップを含む、本発明1014の装置。

[本発明1018]

前記フィーダーチャネルが、幅100nm以下でありかつ深さ100nm以下である、本発明1014の装置。

[本発明1019]

前記1つ以上の飛行時間型チャネルが、電荷中性の親水性壁表面、荷電した親水性壁表面、又は電荷中性の疎水性壁表面を含む、本発明1001の装置。

[本発明1020]

10,000個以上の生体分子プロセッサを含む、本発明1001の装置。

[本発明1021]

100,000個以上の生体分子プロセッサを含む、本発明1001の装置。

[本発明1022]

以下の工程を含む、核酸分子の配列決定の方法：

本発明1001の装置を提供する工程；

前記装置の前記生体分子プロセッサに、1つ以上の核酸分子を含む試料を、前記バイオリアクターチャンバー内の前記固定化された切断酵素が前記試料中の前記1つ以上の核酸分子に結合して前記1つ以上の核酸分子を前記1つ以上の飛行時間型チャネルの前記入力端

に1つずつ入る単量体ヌクレオチドへと切斷するのに有効な条件下で供給する工程；

切斷された前記単量体ヌクレオチドを前記1つ以上の飛行時間型チャネルを通して輸送するため、前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーを横切って及び前記1つ以上の飛行時間型チャネルの長さ方向に電場を印加する工程；

前記印加する工程に基づいて、切斷された前記単量体ヌクレオチドを、それらが前記1つ以上の飛行時間型チャネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過する際に検出する工程；

前記検出する工程に基づいて、切斷された各単量体ヌクレオチドが前記1つ以上の飛行時間型チャネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過するのにどれくらい時間がかかるかを測定する工程；並びに

前記測定する工程に基づいて前記単量体ヌクレオチドを同定する工程。

[本発明1023]

前記同定する工程に基づいて、前記試料中の前記1つ以上の核酸分子のヌクレオチド配列の少なくとも一部を得る工程をさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1024]

前記試料中の前記1つ以上の核酸分子のうちの1つより多くのヌクレオチド配列の少なくとも一部を得るために、前記印加する工程、前記検出する工程、前記測定する工程、前記同定する工程を繰り返す工程をさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1025]

前記繰り返す工程を行って、少なくとも10,000個の核酸分子のヌクレオチド配列又はその一部を得る、本発明1024の方法。

[本発明1026]

前記繰り返す工程を行って、少なくとも100,000個の核酸分子のヌクレオチド配列又はその一部を得る、本発明1024の方法。

[本発明1027]

前記測定する工程が、切斷された各単量体ヌクレオチドが前記1つ以上の飛行時間型チャネルにおける前記第1及び第2のセンサーのうちの少なくとも一方を通過する際の前記切斷された各単量体ヌクレオチドの電気的ピークの振幅を測定することをさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1028]

前記1つ以上の核酸分子が、二本鎖デオキシリボ核酸分子(DNA)、一本鎖DNA分子、1つ以上のメチル化されたヌクレオチド塩基を含むDNA分子、1つ以上の修飾又は損傷を受けたヌクレオチド塩基を含むDNA分子、リボ核酸(RNA)分子、1つ以上の修飾又は損傷を受けたヌクレオチド塩基を含むRNA分子、及びRNA/DNAハイブリッド分子から成る群より選択される、本発明1022の方法。

[本発明1029]

前記1つ以上の核酸分子が、長い非コードRNA(lncRNA)、リボソームRNA(rRNA)、小分子核RNA(snoRNA)、マイクロRNA(miRNA)、転移RNA(tRNA)及び小分子干渉RNA(siRNA)から成る群より選択されるRNA分子を含む、本発明1028の方法。

[本発明1030]

前記1つ以上の核酸分子が二本鎖DNA分子を含み、かつ、前記二本鎖DNA分子の双方の鎖に由来する単量体ヌクレオチドの少なくとも一部が同定される、本発明1028の方法。

[本発明1031]

前記1つ以上の核酸分子が、1つ以上のヌクレオチド塩基の挿入、欠失、転座、及び変異、並びに/又は損傷を受けたヌクレオチド塩基を含むDNA分子を含み、前記1つ以上のヌクレオチド塩基の挿入、欠失、転座、及び変異、並びに/又は損傷を受けたヌクレオチド塩基が、前記測定する工程に基づいて同定される、本発明1028の方法。

[本発明1032]

1つ以上のヌクレオチド塩基の挿入、欠失、転座、及び変異、並びに／又は損傷を受けたヌクレオチド塩基を有する少量の核酸分子が、前記少量の核酸分子と類似のヌクレオチド配列を有するが前記1つ以上のヌクレオチド塩基の挿入、欠失、転座、及び変異、並びに／又は損傷を受けたヌクレオチド塩基を有しない、試料中の100～10,000倍過剰な核酸分子と区別される、本発明1031の方法。

[本発明1033]

前記1つ以上の核酸分子が、1つ以上のメチル化又は修飾されたヌクレオチド塩基を含むDNA分子又はRNA分子を含み、かつ、前記1つ以上のメチル化又は修飾されたヌクレオチド塩基が前記測定する工程に基づいて同定される、本発明1028の方法。

[本発明1034]

1つ以上のメチル化又は修飾されたヌクレオチド塩基を有する少量の核酸分子が、前記少量の核酸分子と類似するヌクレオチド配列を有するがメチル化又は修飾されていない又ヌクレオチド塩基を有する、試料中の100～10,000倍過剰の核酸分子と区別される、本発明1033の方法。

[本発明1035]

1つ以上のメチル化又は修飾されていないヌクレオチド塩基を有する少量の核酸分子が、前記少量の核酸分子に類似するヌクレオチド配列を有するがメチル化又は修飾されたヌクレオチド塩基を有する、試料中の100～10,000倍過剰の核酸分子と区別される、本発明1032の方法。

[本発明1036]

前記供給する工程の前に、前記1つ以上の核酸分子を組織、細胞、血清、血漿、血液、又はエキソソームから単離する工程をさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1037]

前記方法を実施する間に、前記1つ以上の核酸分子の200～50,000個の単量体ヌクレオチドが同定される、本発明1022の方法。

[本発明1038]

前記同定する工程に基づいて、病態を診断又は予後診断する工程及び遺伝子型又は発生段階を区別する工程をさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1039]

前記切断酵素が、エキソヌクレアーゼ又はエキソリボヌクレアーゼである、本発明1022の方法。

[本発明1040]

前記切断酵素が、プロセッシブなエキソヌクレアーゼ又はプロセッシブなエキソリボヌクレアーゼである、本発明1039の方法。

[本発明1041]

前記切断酵素が、-エキソヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼII、T7エキソヌクレアーゼ、XRN-1、RNase II、及びエキソソーム複合体から選択されるか又はその構成成分である、本発明1039の方法。

[本発明1042]

前記生体分子プロセッサが、前記固体基板の壁によって画定されるフィーダーチャネルをさらに含み、前記フィーダーチャネルが、前記固体基板の表面の近位にある入力端から前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーの近位にある出力端まで延在する長さを有し、

前記方法が、

前記1つ以上の核酸分子を含む前記試料を前記フィーダーチャネルに導入する工程；および

前記フィーダーチャネル内で前記1つ以上の核酸分子を引き延ばすために、前記フィーダーチャネルの長さ方向に電場を印加する工程をさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1043]

前記フィーダーチャネルが、前記入力端と前記出力端の間に、前記1つ以上の核酸分子の方向を調整するための1つ以上のエントロピートラップをさらに含む、本発明1042の方法。

[本発明1044]

前記装置が、前記フィーダーチャネルの前記入力端の近位にある、前記フィーダーチャネルに接触するセンサーをさらに含み、

前記方法が、

前記1つ以上の核酸分子を、それらが前記フィーダーチャネルのセンサーを通り抜ける際に検出する工程；および

前記検出する工程の持続時間に基づいて、前記1つ以上の核酸分子の長さを決定する工程

をさらに含む、本発明1042の方法。

[本発明1045]

前記フィーダーチャネルのセンサーが1対の検出電極を含む、本発明1042の方法。

[本発明1046]

以下の工程を含む、1つ以上のタンパク質又はポリペプチドを同定する方法：

本発明1001の装置を提供する工程；

前記装置の前記生体分子プロセッサに、1つ以上のタンパク質又はポリペプチドを含む試料を、前記バイオリアクターチャンバー内の前記固定化された切断酵素が前記試料中の前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドに結合して前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドを前記1つ以上の前記飛行時間型チャネルの前記入力端に入るより小さなペプチド断片へと切断するのに有効な条件下で供給する工程；

切断された前記ペプチド断片を前記1つ以上の飛行時間型チャネルを通して輸送するために、前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーを横切って及び前記1つ以上の飛行時間型チャネルの長さ方向に電場を印加する工程；

前記印加する工程に基づいて、前記ペプチド断片が前記1つ以上の飛行時間型チャネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過する際に前記ペプチド断片を検出する工程；

前記検出する工程に基づいて、(i)各ペプチド断片が前記1つ以上の飛行時間型チャネルにおける少なくとも第1及び第2のセンサーを通過するのにどれくらい時間がかかるか及び/又は(ii)各ペプチド断片が前記1つ以上の飛行時間型チャネルにおける第1又は第2のセンサーのうちの少なくとも一方を通過する際の各ペプチド断片の電気ピークの振幅を測定する工程；並びに

前記ペプチド断片を測定する前記工程に基づいて、前記試料中の前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドの少なくとも一部を同定する工程。

[本発明1047]

前記試料の前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドから切断された前記ペプチド断片の(i)及び(ii)の測定値を、既知のタンパク質又はポリペプチドの切断により生成されたペプチド断片の対応する測定値と比較する工程をさらに含む、本発明1046の方法。

[本発明1048]

前記供給する工程の前に、生体試料から前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドを濃縮又は単離する工程をさらに含む、本発明1046の方法。

[本発明1049]

前記濃縮又は単離する工程が、アフィニティー精製、リガンド結合、又は抗体に基づく濃縮を用いて実施される、本発明1048の方法。

[本発明1050]

前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドが、Gタンパク質共役型受容体、核内受容体、電位依存性イオンチャネル、リガンド依存性イオンチャネル、受容体チロシンキナーゼ、増殖因子、プロテアーゼ、配列特異的プロテアーゼ、ホスファターゼ、プロテインキ

ナーゼ、生物活性のある脂質、サイトカイン、ケモカイン、ユビキチンリガーゼ、ウイルス調節因子、細胞分裂タンパク質、足場タンパク質、DNA修復タンパク質、細菌リボソーム、ヒストン脱アセチル化酵素、アポトーシス制御因子、シャペロンタンパク質、セリン／スレオニンプロテインキナーゼ、サイクリン依存性キナーゼ、増殖因子受容体、プロテアーゼ、シグナル伝達タンパク質複合体、タンパク質／核酸輸送体、及びウイルスカプシドから成る群より選択される、本発明1046の方法。

[本発明1051]

前記供給する工程の前に、1つ以上の細胞内区画から前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドを単離又は濃縮する工程をさらに含む、本発明1046の方法。

[本発明1052]

前記1つ以上のタンパク質又はポリペプチドが1つ以上の修飾されたアミノ酸残基を含み、前記測定する工程が前記1つ以上のアミノ酸の修飾を同定する、本発明1046の方法。

[本発明1053]

前記アミノ酸の修飾が、メチル化、アセチル化、及びリン酸化から選択される、本発明1052の方法。

[本発明1054]

前記切断酵素がプロテアーゼである、本発明1046の方法。

[本発明1055]

前記切断酵素が、プロティナーゼK、黄色ブドウ球菌(S. aureus)V-8プロテアーゼ、トリプシン、リジンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、及びキモトリプシンプロテアーゼから成る群より選択される、本発明1054の方法。

[本発明1056]

以下の工程を含む、試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法：

そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれ自身ハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程であって、前記1つ以上の核酸分子及びそのハイブリッド形成した相補体のそれが、標的特異的部分とヘアピン形成に好適な一本鎖3'アダプター部分とを含む、工程；

前記試料を、前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の3'アダプター部分がヘアピンを形成するのに有効な条件に供する工程；

ポリメラーゼを提供する工程；

伸長混合物を形成させるために、1つ以上の3'ヘアピン化核酸分子及びその相補体を前記ポリメラーゼと混合する工程；

1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子及びその相補体を、それらのそれぞれの3'ヘアピン化領域から伸長させる工程；並びに

前記試料中の1つ以上の核酸分子を同定するために、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子の少なくとも一部を配列決定する工程。

[本発明1057]

前記方法が、前記配列決定する工程の前に、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を1つ以上の生体分子プロセッサに導入する工程をさらに含み、

前記生体分子プロセッサが、

固体基板によって画定される1つ以上のバイオリアクターチャンバー；

各バイオリアクターチャンバー内にありかつ前記固体基板に取り付けられた支持構造体；

前記支持構造体に固定化された切断酵素であって、前記切断酵素と機能的に結合したバイオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断するように前記バイオリアクターチャンバー内に機能的に配置された、切断酵素；並びに

前記固体基板内に形成されかつ前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーに流体的に連結された1つ以上の飛行時間型チャネルであって、前記1つ以上の飛行時間型チャネルのそれが入力端と出力端を有し、前記1つ以上の飛行時間型チャネルのそれが、少

なくとも ( i ) 前記1つ以上の飛行時間型チャネルの前記入力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャネルに接触する第1のセンサーと ( ii ) 前記1つ以上の飛行時間型チャネルの前記出力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャネルに接触する第2のセンサーとを含む2つ以上のセンサーを含む、1つ以上の飛行時間型チャネルを含む、本発明1056の方法。

[本発明1058]

前記ポリメラーゼが、前記伸長させる工程の間に、前記1つ以上の核酸分子を、そのそれぞれの相補体核酸分子から解離させる、本発明1056の方法。

[本発明1059]

前記ポリメラーゼが、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性又は鎖置換活性を含む、本発明1058の方法。

[本発明1060]

前記伸長させる工程の前に、前記1つ以上の3'ヘアピン化核酸分子及びその相補体を変性させる工程をさらに含む、本発明1056の方法。

[本発明1061]

前記1つ以上の完全長ヘアピン化核酸分子の5'末端がリン酸化されている、本発明1056の方法。

[本発明1062]

前記試料を提供する工程が、  
1つ以上の核酸分子及びその相補体を含む試料を提供する工程；並びに

前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の前記標的特異的部分に前記アダプター部分を付加する工程  
を含む、本発明1056の方法。

[本発明1063]

前記アダプター部分又はその相補体が、前記1つ以上の核酸分子又はその相補体の前記標的特異的部分に、リガーゼ、ポリメラーゼ、リコンビナーゼ、ターミナルトランスフェラーゼ、エンドヌクレアーゼ、DNA修復酵素、及び逆転写酵素から成る群より選択される1種以上の酵素を用いて付加される、本発明1062の方法。

[本発明1064]

前記アダプター部分が、1種以上の一意のヌクレオチド配列タグをさらに含む、本発明1056の方法。

[本発明1065]

前記配列決定する工程の前に、前記1つ以上の完全長ヘアピン化核酸分子のヘアピン化部分に移動度変更因子 (mobility modifier) を付加する工程をさらに含む、本発明1056の方法。

[本発明1066]

以下の工程を含む、試料中の複数の核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法：  
そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれぞれハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程であって、前記1つ以上の核酸分子及びそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれが、標的特異的部分、5'アダプター部分、及び3'アダプター部分を含み、前記5'及び3'アダプター部分がそれぞれヘアピン形成に好適である、工程；

1つ以上の一一本鎖核酸分子及びその相補体の収集物を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子をその相補体から変性させる工程であって、前記1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体のそれぞれの5'及び3'アダプター部分のヘアピン配列がヘアピンを形成する、工程；

複数の固定化された捕捉オリゴヌクレオチドプローブを含む固体支持体を提供する工程であって、各捕捉オリゴヌクレオチドプローブが前記1つ以上の核酸分子又はその相補体の標的特異的部分の領域に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、工程；

変性させた前記一本鎖核酸分子及びその相補体のうちの1つ以上を、前記固体支持体上に固定化されたそれらの相補的な捕捉オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成させる工程

;

ポリメラーゼを提供する工程；

前記ポリメラーゼを、ハイブリッド形成させた前記核酸分子及びその相補体のうちの1つ以上を含有する前記固体支持体に接触させる工程；

1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子又はその相補体を、それらのそれぞれの3'ヘアピン化領域から伸長させる工程であって、それによって前記1つ以上の核酸分子が前記捕捉オリゴヌクレオチド及び前記固体支持体から遊離する、工程；並びに

前記試料中の1つ以上の核酸分子を同定するために、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子の少なくとも一部を配列決定する工程。

[本発明1067]

前記方法が、前記配列決定する工程の前に、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を1つ以上の生体分子プロセッサに導入する工程をさらに含み、

前記生体分子プロセッサが、

固体基板によって画定される1つ以上のバイオリアクターチャンバー；

各バイオリアクターチャンバー内にありかつ前記固体基板に取り付けられた支持構造体；

前記支持構造体に固定化された切断酵素であって、前記切断酵素と機能的に結合したバイオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断するようにバイオリアクターチャンバー内に機能的に配置された、切断酵素；並びに

前記固体基板内に形成されかつ前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーに流体的に連結された1つ以上の飛行時間型チャネルであって、前記1つ以上の飛行時間型チャネルのそれらが入力端と出力端を有し、前記1つ以上の飛行時間型チャネルのそれらが、少なくとも(i)前記1つ以上の飛行時間型チャネルの前記入力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャネルに接触する第1のセンサーと(ii)前記1つ以上の飛行時間型チャネルの前記出力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャネルに接触する第2のセンサーとを含む2つ以上のセンサーを含む、1つ以上の飛行時間型チャネルを含む、本発明1066の方法。

[本発明1068]

前記試料を提供する工程が、

1つ以上の核酸分子及びその相補体を含む試料を提供する工程；並びに

前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の前記標的特異的部分に前記アダプター部分を付加する工程

を含む、本発明1066の方法。

[本発明1069]

前記アダプター部分又はその相補体が、前記1つ以上の核酸分子又はその相補体の前記標的特異的部分に、リガーゼ、ポリメラーゼ、リコンビナーゼ、ターミナルトランスフェラーゼ、エンドヌクレアーゼ、DNA修復酵素、及び逆転写酵素から成る群より選択される1種以上の酵素を用いて付加される、本発明1068の方法。

[本発明1070]

前記アダプター部分が、1種以上の一意のヌクレオチド配列タグをさらに含む、本発明1066の方法。

[本発明1071]

前記完全長ヘアピン化標的核酸分子の5'末端がリン酸化されている、本発明1066の方法。

[本発明1072]

前記配列決定する工程の前に、前記完全長ヘアピン化核酸分子のヘアピン化部分に移動度変更因子を付加する工程をさらに含む、本発明1066の方法。

[本発明1073]

以下の工程を含む、試料中の複数の標的核酸分子のうちの1つ以上を同定する方法：

そのそれぞれの相補的な核酸分子とそれ自身ハイブリッド形成した1つ以上の核酸分子を含有する試料を提供する工程であって、前記1つ以上の核酸分子及びそのハイブリッド形成した相補体のそれぞれが、標的特異的部分、5'アダプター部分、及び一本鎖ホモポリマー反復配列を含む3'アダプター部分を含む、工程；

1つ以上の一一本鎖核酸分子及びその相補体の収集物を形成させるために、前記1つ以上の核酸分子をその相補体から変性させる工程；

前記1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体の3'末端に対して相補的な複数のオリゴヌクレオチドプライマーを提供する工程；

ポリメラーゼを提供する工程；

伸長混合物を形成させるために、前記1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体の収集物を前記ポリメラーゼ及びプライマーと混合する工程；

前記オリゴヌクレオチドプライマーを、それらの相補的な、前記1つ以上の一本鎖核酸分子及びその相補体の3'末端とハイブリッド形成させる工程；

1つ以上の完全長の二本鎖核酸分子を形成させるために、ハイブリッド形成させた前記プライマーを伸長させる工程；並びに

前記試料中の1つ以上の核酸分子を同定するために、前記1つ以上の完全長の二本鎖核酸分子の少なくとも一部を配列決定する工程。

#### [本発明1074]

前記方法が、前記配列決定する工程の前に、前記1つ以上の完全長のヘアピン化核酸分子を1つ以上の生体分子プロセッサに導入する工程をさらに含み、

前記生体分子プロセッサが、

固体基板によって画定される1つ以上のバイオリアクターチャンバー；

各バイオリアクターチャンバー内にありかつ前記固体基板に取り付けられた支持構造体；

前記支持構造体に固定化された切断酵素であって、前記切断酵素と機能的に結合したバイオポリマー分子の単量体単位又は多量体単位を切断するように前記バイオリアクターチャンバー内に機能的に配置された、切断酵素；並びに

前記固体基板内に形成されかつ前記1つ以上のバイオリアクターチャンバーに流体的に連結された1つ以上の飛行時間型チャネルであって、前記1つ以上の飛行時間型チャネルのそれぞれが入力端と出力端を有し、前記1つ以上の飛行時間型チャネルのそれぞれが、少なくとも(i)前記1つ以上の飛行時間型チャネルの前記入力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャネルに接触する第1のセンサーと(ii)前記1つ以上の飛行時間型チャネルの前記出力端の近位にある、前記1つ以上の飛行時間型チャネルに接触する第2のセンサーとを含む2つ以上のセンサーを含む、1つ以上の飛行時間型チャネルを含む、本発明1073の方法。

#### [本発明1075]

前記試料を提供する工程が、

前記1つ以上の核酸分子及びその相補体を含む試料を提供する工程；

前記3'及び5'アダプター部分を、前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の前記標的特異的部分に付加する工程；並びに

前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の、一本鎖ホモポリマー反復配列を有する3'アダプター部分を伸長させる工程を含む、本発明1073の方法。

#### [本発明1076]

前記付加する工程及び伸長させる工程が、リガーゼ、ポリメラーゼ、リコンビナーゼ、ターミナルトランスフェラーゼ、エンドヌクレアーゼ、DNA修復酵素、及び逆転写酵素から成る群より選択される1種以上の酵素を用いて実施される、本発明1075の方法。

#### [本発明1077]

前記アダプター部分が、1種以上の一意のヌクレオチド配列タグを含む、本発明1073の方法。

[本発明1078]

前記オリゴヌクレオチドプライマーが、3'アダプターに特異的な部分及び3'ホモポリマー反復配列に特異的な部分を含む、本発明1073の方法。

[本発明1079]

前記5'アダプター部分が5'リン酸部分を含む、本発明1073の方法。

[本発明1080]

複数の固定化された捕捉オリゴヌクレオチドプローブを含む固体支持体を提供する工程であって、各捕捉オリゴヌクレオチドプローブが前記1つ以上の核酸分子及びその相補体の標的特異的部分の領域に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、工程；並びに

標的特異的な濃縮を達成するために、前記混合する工程の前に前記1つ以上の変性させた一本鎖核酸分子及びその相補体を前記固体支持体上でそれらの相補的な固定化された捕捉オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成させる工程であって、前記伸長させる工程の前に又はその間に前記1つ以上の核酸分子及びその相補体が前記固体支持体の前記捕捉オリゴヌクレオチドから解離する、工程

をさらに含む、本発明1073の方法。

[本発明1081]

前記ポリメラーゼが、前記伸長させる工程の間に、前記1つ以上の核酸分子及びその相補体を、前記固体支持体の前記捕捉オリゴヌクレオチドから解離させる、本発明1080の方法。

[本発明1082]

前記ポリメラーゼが、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性又は鎖置換活性を有する、本発明1081の方法。

[本発明1083]

前記オリゴヌクレオチドプライマーをハイブリッド形成させる工程の後かつ前記伸長させる工程の前に、前記固体支持体の前記捕捉オリゴヌクレオチドから前記1つ以上の核酸分子及びその相補体を変性させる工程をさらに含む、本発明1080の方法。

[本発明1084]

前記配列決定する工程の前に、前記1つ以上の伸長させた完全長の二本鎖標的核酸分子の3'末端に移動度変更因子を付加する工程をさらに含む、本発明1073の方法。