

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6967006号
(P6967006)

(45) 発行日 令和3年11月17日(2021.11.17)

(24) 登録日 令和3年10月26日(2021.10.26)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6869 Z
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 P
G O 1 N 33/483 (2006.01)	G O 1 N 33/483 C
G O 1 N 21/64 (2006.01)	G O 1 N 21/64 F
B 8 2 Y 35/00 (2011.01)	B 8 2 Y 35/00

請求項の数 8 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2018-536442 (P2018-536442)	(73) 特許権者	512074375
(86) (22) 出願日	平成29年1月11日 (2017.1.11)		クアンタポール, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2019-504622 (P2019-504622A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(43) 公表日	平成31年2月21日 (2019.2.21)		25, メンロ パーク, アダムス
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/013036		ドライブ 1455, スイート 1081
(87) 国際公開番号	W02017/123647	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成29年7月20日 (2017.7.20)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	令和2年1月6日 (2020.1.6)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	62/279,503		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成28年1月15日 (2016.1.15)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
(31) 優先権主張番号	62/308,145	(74) 代理人	100181641
(32) 優先日	平成28年3月14日 (2016.3.14)		弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低減されたバックグラウンドの光学に基づくナノポア分析

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリヌクレオチドの配列を決定する方法であって、

(a) 第 1 の側面および第 2 の側面と、 (b) 固相膜およびそれと同一の広がりを持つ不透明層と、 (c) 複数のアパーチャーを含むナノポアアレイを提供するステップであって、前記固相膜は、前記ナノポアアレイの前記第 1 の側面上の第 1 のチャンバーと前記ナノポアアレイの前記第 2 の側面上の第 2 のチャンバーとを分離し、各アパーチャーが、前記第 1 のチャンバーと前記第 2 のチャンバーとの間の流体連通を提供し、シグナル発生領域を有し、前記不透明層が、光が前記ナノポアアレイを通過することを実質的に防止するステップと；

前記アパーチャーを通して前記第 1 のチャンバーから前記第 2 のチャンバーにポリヌクレオチドを通過させるステップであって、

(i) 各ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド鎖の異なる種類のヌクレオチドが、区別できる蛍光シグナルを発生する異なる蛍光標識で標識されたポリヌクレオチド鎖を含み、

(i i) 前記アパーチャーのそれぞれが、各前記ポリヌクレオチド鎖のヌクレオチドを拘束して、各アパーチャーの前記シグナル発生領域を一系列で通過させ、

(i i i) 各ポリヌクレオチド鎖の前記蛍光標識は相互に自己消光性であり、そうすることで、前記標識が前記シグナル発生領域の外側にある場合に励起された相互に自己消光性である標識からの蛍光シグナルは消光する、

ステップと；

励起ビームで、前記ポリヌクレオチド鎖の前記蛍光標識を、それらが前記アパーチャーの前記シグナル発生領域を通過する際に励起するステップであって、前記励起ビームが前記第2のチャンバーを通して前記ナノポアアレイに向けられ、それにより金属層が前記第1のチャンバーにおける光学標識の励起を実質的に防止する、ステップと；

前記シグナル発生領域における前記蛍光標識からの蛍光シグナルを検出するステップであって前記ポリヌクレオチド鎖の特性を決定するステップと；

各アパーチャーの前記シグナル発生領域において検出された前記蛍光シグナルから前記ポリヌクレオチド鎖のヌクレオチドの配列を決定するステップとを含む方法。

【請求項2】

前記不透明層が金属層である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記金属層がアルミニウム層または金属を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記アパーチャーのそれぞれの前記シグナル発生領域が、前記第2のチャンバーに最も近い前記金属層の表面から前記第2のチャンバーに延在する、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

励起および検出する前記ステップが落射照明システムとともに実施される、請求項2に記載の方法。

【請求項6】

前記ナノポアアレイの前記アパーチャーのそれぞれが、その中に固定化されたタンパク質ナノポアを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項7】

前記タンパク質ナノポアのそれぞれが、前記アパーチャーを横断して配置された脂質二重層に固定化される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記蛍光標識がアクセプター標識であり、前記励起ビームが前記アパーチャーのそれぞれにおいてドナー標識を励起し、前記ドナー標識が、前記アクセプター標識を、それらが前記シグナル発生領域を通過する際に励起する、請求項2に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2016年1月15日に出願された米国仮特許出願番号第62/279,503号および2016年3月14日に出願された同第62/308,145号に基づく優先権の利益を主張しており、これら仮特許出願の各々はその全体が本明細書中に参考として援用される。

【背景技術】

【0002】

(背景)

過去10年にわたり開発されてきたDNA配列決定技術は、生物学に変革をもたらした、例えば、van Dijkら、Trends in Genetics, 30(9): 418-426 (2014)。しかし、本技術の潜在性を完全に実現するには、1ラン当たりの配列決定コストの削減、試料調製の単純化、ランタイムの短縮、読取り長の増大、およびデータ解析の改善などを含む、克服しなければならない多くの課題が残っている。ナノポアに基づく配列決定などの単一分子配列決定技術は、これらの課題のいくつかに対処することができるが、これらの手法には、それ自体の一連の技術的難題、例えば信頼性あるナノ構造製作、DNA移行速度の制御、不明瞭なヌクレオチド識別、およびナノスケールセンサーのラージアレイからのシグナルの検出および処理などがある、例え

10

20

30

40

50

ば、Brantonら、Nature Biotechnology、26巻(10号) : 1146~1153頁(2008年)。

【0003】

ヌクレオチドの光学検出は、ナノポア配列決定の分野において、例えばナノポアの大きなアレイから独立したシグナルを収集することの困難さなどの技術的難題のいくつかに対する可能な解決策として提示されてきた。しかし、蛍光に基づくシグナルにおいて、単一分子の光学検出におけるバックグラウンドノイズを克服することは、顕著な課題として残っている。そのため全内部反射蛍光(TIRF)システムなどの顕微鏡システムがしばしば使用されるようになり、これはバックグラウンド励起を最小化するが、検出システムがさらに複雑かつ高価になった。

10

上記に鑑み、より簡単でより安価な顕微鏡システムを使用して単一分子解析のバックグラウンドの問題に対処できる方法およびデバイスが利用可能になれば、一般的ナノポアセンサー技術および光学に基づくナノポア配列決定などのその特定の適用例に有利であろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】van Dijkら、Trends in Genetics、30(9) : 418-426 (2014)

【非特許文献2】Brantonら、Nature Biotechnology、26巻(10号) : 1146~1153頁(2008年)

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の要旨

本発明は、光学標識およびナノポアを使用する単一分子解析のための方法およびデバイスを対象とする。一態様では、本発明の方法およびデバイスは、標識されたポリマー分析物がナノポアを通過する際に発生する光学シグナルの中のノイズを低減させることを対象とする。

【0006】

30

一部の実施形態では、本発明は、下記のステップ：(a) 固相膜およびそれと同一の広がりを持つ不透明層とを含むナノポアアレイを提供するステップであって、前記ナノポアアレイが複数のアパーチャーを含み、第1のチャンバーと第2のチャンバーとを分離し、各アパーチャーが第1のチャンバーと第2のチャンバーとの間の流体連通を提供し、シグナル発生領域を有し、不透明層が、光がナノポアアレイを通過することを実質的に防止するステップと；(b) アパーチャーを通して第1のチャンバーから第2のチャンバーにポリマーを通過させるステップであって、各ポリマーが、それに附着された、ポリマーの特性を示す少なくとも第1の波長を有する光学シグナルを発生させることができる1つまたは複数の光学標識を有するステップと；(c) 第2の波長を有する励起ビームで、ポリマーの光学標識を、それらがアパーチャーのシグナル発生領域を通過する際に励起するステップであって、検出領域における光学標識が、その第1の波長が第2の波長と異なる光学シグナルを発生するステップと；(d) シグナル発生領域における光学標識からの光学シグナルを検出するステップであってポリマーの特性を決定するステップとを含む、ポリヌクレオチドなどのポリマーの特性を決定する方法を対象とする。

40

【0007】

一部の実施形態では、本発明は、下記のステップ：(a) 第1の側面、第2の側面、およびそれらを通る複数のアパーチャーを有する固相膜を含むナノポアアレイを提供するステップであって、固相膜が第1のチャンバーと第2のチャンバーを分離し、それにより各アパーチャーが第1のチャンバーと第2のチャンバーとの間の流体連通を提供し、固相膜の第1の側面がその上に不透明なコーティングを有し、各アパーチャーが第1の側面の不

50

透明コーティングから第2の側面に向けて延在する検出領域を有するステップと；(b) アパーチャーを通して第1のチャンバーから第2のチャンバーにポリマーを通過させるステップであって、各ポリマーが、それに附着された、ポリマーの特性を示す少なくとも第1の波長を有するシグナルを発生させることができる1つまたは複数の光学標識を有するステップと；(c) 第2の波長を有する励起ビームでアパーチャーの検出領域における光学標識を固相膜の第2の側面から照明し、それにより検出領域における光学標識がその第1の波長が第2の波長と異なるシグナルを発生するステップと；(d) 検出領域における光学標識からのシグナルを検出するステップであってポリマーの特性を決定するステップとを含む、ポリマーの特性を決定する方法を対象とする。

【0008】

別の実施形態では、本発明は、ステップ：(a) 第1の側面、第2の側面、およびそれらを通る複数のアパーチャーを有する固相膜を含むナノポアアレイを提供するステップであって、固相膜が第1のチャンバーと第2のチャンバーを分離し、それにより各アパーチャーが第1のチャンバーと第2のチャンバーとの間の流体連通を提供し、固相膜の第2の側面がその上に不透明なコーティングを有し、各アパーチャーが第2の側面の不透明コーティングから第2のチャンバー内に延在する検出領域を有するステップと；(b) アパーチャーを通して第1のチャンバーから第2のチャンバーにポリマーを通過させるステップであって、各ポリマーが、それに附着された、ポリマーの特性を示す少なくとも第1の波長を有するシグナルを発生させることができる1つまたは複数の光学標識を有するステップと；(c) 第2の波長を有する励起ビームでアパーチャーの検出領域における光学標識を固相膜の第2の側面から照明し、それにより検出領域における光学標識がその第1の波長が第2の波長と異なるシグナルを発生するステップと；(d) 検出領域における光学標識からのシグナルを検出するステップであってポリマーの特性を決定するステップとを含む、ポリマーの特性を決定する方法を対象とする。

【0009】

さらに別の実施形態では、本発明は、下記のステップ：(a) 固相膜およびそれと同一の広がりを持つ不透明層とを含むナノポアアレイを提供するステップであって、ナノポアアレイが複数のアパーチャーを含み、第1のチャンバーと第2のチャンバーとを分離し、各アパーチャーが第1のチャンバーと第2のチャンバーとの間の流体連通を提供し、シグナル発生領域を有し、不透明層が、光がナノポアアレイを通過することを実質的に防止するステップと；(b) アパーチャーを通して第1のチャンバーから第2のチャンバーにポリヌクレオチドを通過させるステップであって、ポリヌクレオチドの異なる種類のヌクレオチドが、区別できる蛍光シグナルを発生する異なる蛍光標識で標識されており、アパーチャーのそれぞれがポリヌクレオチドのヌクレオチドを拘束して、シグナル発生領域を一列で通過させるステップと；(c) 励起ビームで、ポリヌクレオチドの前記蛍光標識を、それらがアパーチャーのシグナル発生領域を通過する際に励起するステップと；(d) シグナル発生領域における蛍光標識からの蛍光シグナルを検出するステップであってポリマーの特性を決定するステップと；(e) 各アパーチャーのシグナル発生領域において検出された蛍光シグナルからヌクレオチドの配列を決定するステップとを含む、ポリヌクレオチドの配列を決定する方法を対象とする。

【0010】

本発明は光学に基づくナノポア解析において直接照明システムによって生じる光学的ノイズの問題を有利に克服する。本発明のこれらおよび他の利点は、いくつかの実現例および適用例で例示され、それらのいくつかを、以下に、また本明細書の全体を通して要約される。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

ポリマーの特性を決定する方法であって、

固相膜およびそれと同一の広がりを持つ不透明層とを含むナノポアアレイを提供するステップであって、前記ナノポアアレイが複数のアパーチャーを含み、第1のチャンバーと

10

20

30

40

50

第 2 のチャンパーとを分離し、各アパーチャーが前記第 1 のチャンパーと前記第 2 のチャンパーとの間の流体連通を提供し、シグナル発生領域を有し、前記不透明層が、光が前記ナノポアアレイを通過することを実質的に防止するステップと；

前記アパーチャーを通して前記第 1 のチャンパーから前記第 2 のチャンパーにポリマーを通過させるステップであって、各ポリマーが、それに取着された、前記ポリマーの特性を示す少なくとも第 1 の波長を有する光学シグナルを発生させることができる 1 つまたは複数の光学標識を有するステップと；

第 2 の波長を有する励起ビームで、前記ポリマーの前記光学標識を、それらが前記アパーチャーの前記シグナル発生領域を通過する際に励起するステップであって、前記検出領域における前記光学標識が、その第 1 の波長が前記第 2 の波長と異なる光学シグナルを発生するステップと；

10

前記シグナル発生領域における前記光学標識からの光学シグナルを検出するステップであって前記ポリマーの特性を決定するステップとを含む方法。

(項目 2)

前記不透明層が金属層である、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記金属層が A l、A u、A g および C u からなる群から選択される金属を含む、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

20

前記ポリマーがポリヌクレオチドであり、前記特性がそのヌクレオチド配列である、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

前記光学標識が蛍光標識であり、前記光学シグナルが蛍光シグナルである、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

前記アパーチャーのそれぞれの前記シグナル発生領域が、前記第 2 のチャンパーに最も近い前記不透明層の表面から前記第 2 のチャンパーに延在する、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

前記ポリヌクレオチドの異なる種類のヌクレオチドが、区別できる蛍光シグナルを発生する異なる蛍光標識で標識されており、前記アパーチャーのそれぞれがポリヌクレオチドのヌクレオチドを拘束して、前記シグナル発生領域を一例で通過させる、項目 6 に記載の方法。

30

(項目 8)

前記シグナル発生領域の外側の励起された蛍光標識からの前記蛍光シグナルを、非蛍光消光剤を使用して消光するステップをさらに含む、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

前記消光剤が前記ポリヌクレオチドに結合する、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

前記消光剤が前記第 2 のチャンパーに配置される、項目 9 に記載の方法。

40

(項目 11)

前記シグナル発生領域の外側の励起された蛍光標識からの前記蛍光シグナルを、相互に自己消光性であるように前記蛍光標識を選択することによって消光するステップをさらに含む、項目 5 に記載の方法。

(項目 12)

前記励起ビームが前記第 2 のチャンパーを通して前記ナノポアアレイに向けられ、それにより前記不透明層が前記第 1 のチャンパーにおける光学標識の励起を実質的に防止する、項目 1 に記載の方法。

(項目 13)

前記ナノポアアレイの前記アパーチャーのそれぞれが、その中に固定化されたタンパク

50

質ナノポアを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記光学標識がアクセプター標識であり、前記励起ビームが前記アパーチャーのそれぞれにおいて、アクセプター標識をそれらが前記シグナル発生領域を通過する際に励起するドナー標識を励起する、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 5)

ポリヌクレオチドの配列を決定する方法であって、

固相膜およびそれと同一の広がりを持つ不透明層とを含むナノポアアレイを提供するステップであって、前記ナノポアアレイが複数のアパーチャーを含み、第 1 のチャンバーと第 2 のチャンバーとを分離し、各アパーチャーが前記第 1 のチャンバーと前記第 2 のチャンバーとの間の流体連通を提供し、シグナル発生領域を有し、前記不透明層が、光が前記ナノポアアレイを通過することを実質的に防止するステップと；

前記アパーチャーを通して前記第 1 のチャンバーから前記第 2 のチャンバーにポリヌクレオチドを通過させるステップであって、前記ポリヌクレオチドの異なる種類のヌクレオチドが、区別できる蛍光シグナルを発生する異なる蛍光標識で標識されており、前記アパーチャーのそれぞれがポリヌクレオチドのヌクレオチドを拘束して、前記シグナル発生領域を一系列で通過させるステップと；

励起ビームで、前記ポリヌクレオチドの前記蛍光標識を、それらが前記アパーチャーの前記シグナル発生領域を通過する際に励起するステップと；

前記シグナル発生領域における前記蛍光標識からの蛍光シグナルを検出するステップであって前記ポリマーの特性を決定するステップと；

各アパーチャーの前記シグナル発生領域において検出された前記蛍光シグナルからヌクレオチドの配列を決定するステップと

を含む方法。

(項目 1 6)

前記不透明層が金属層である、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記金属層がアルミニウム層または金層を含む、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記アパーチャーのそれぞれの前記シグナル発生領域が、前記第 2 のチャンバーに最も近い前記金属層の表面から前記第 2 のチャンバーに延在する、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記励起ビームが前記第 2 のチャンバーを通して前記ナノポアアレイに向けられ、それにより前記金属層が前記第 1 のチャンバーにおける光学標識の励起を実質的に防止する、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記シグナル発生領域の外側の励起された蛍光標識からの前記蛍光シグナルを、非蛍光消光剤を使用して消光するステップをさらに含む、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記消光剤が前記ポリヌクレオチドに結合する、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記消光剤が前記第 2 のチャンバーに配置される、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記シグナル発生領域の外側の励起された蛍光標識からの前記蛍光シグナルを、相互に自己消光性であるように前記蛍光標識を選択することによって消光するステップをさらに含む、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 2 4)

励起および検出する前記ステップが落射照明システムとともに実施される、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 2 5)

10

20

30

40

50

前記ナノポアアレイの前記アパーチャーのそれぞれが、その中に固定化されたタンパク質ナノポアを含む、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 2 6)

前記タンパク質ナノポアのそれぞれが、前記アパーチャーを横断して配置された脂質二重層に固定化される、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記蛍光標識がアクセプター標識であり、前記励起ビームが前記アパーチャーのそれぞれにおいてドナー標識を励起し、前記ドナー標識が、前記アクセプター標識を、それらが前記シグナル発生領域を通過する際に励起する、項目 1 6 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 1 1 】

【図 1 A】図 1 A ~ 1 H は、特定の実施形態における本発明の要素を示す。

【図 1 B】図 1 A ~ 1 H は、特定の実施形態における本発明の要素を示す。

【図 1 C】図 1 A ~ 1 H は、特定の実施形態における本発明の要素を示す。

【図 1 D E】図 1 A ~ 1 H は、特定の実施形態における本発明の要素を示す。

【図 1 F】図 1 A ~ 1 H は、特定の実施形態における本発明の要素を示す。

【図 1 G】図 1 A ~ 1 H は、特定の実施形態における本発明の要素を示す。

【図 1 H】図 1 A ~ 1 H は、特定の実施形態における本発明の要素を示す。

【 0 0 1 2 】

【図 2】図 2 A ~ 2 B は、不透明層として多孔質層を用いる実施形態を示す。

20

【 0 0 1 3 】

【図 3】図 3 は、共焦点落射照明システムの基本的な構成要素を示す。

【 0 0 1 4 】

【図 4 A】図 4 A ~ 4 C は、不透明層を有するナノポアアレイの、消光を使用する光学に基づくナノポア配列決定の方法への適用を示す。

【図 4 B】図 4 A ~ 4 C は、不透明層を有するナノポアアレイの、消光を使用する光学に基づくナノポア配列決定の方法への適用を示す。

【図 4 C】図 4 A ~ 4 C は、不透明層を有するナノポアアレイの、消光を使用する光学に基づくナノポア配列決定の方法への適用を示す。

【発明を実施するための形態】

30

【 0 0 1 5 】

(発明の詳細な説明)

本発明は、様々な修正および代替形態を受け得るが、それらの詳細を図面に例として示しており、これより詳細に記述する。しかし、本発明を、記述される特定の実施形態に限定しようとするものではないことを理解すべきである。それどころか、本発明の精神および範囲内に入る全ての修正例、均等物、および代替例を包含するものである。例えば、本発明の特定のナノポアのタイプおよび数、特定の標識、FRET対、検出スキーム、製作手法は、例示の目的で示される。しかし本開示は、その他のタイプのナノポア、ナノポアのアレイ、およびその他の製作技術を利用して本明細書で論ずるシステムの様々な態様を実現することができるので、この点に限定するものではないことを理解すべきである。本発明の態様に関する指針は、その関連ある部分が参照により本明細書に組み込まれる、例えば、Cao, Nanostructures & Nanomaterials (Imperial College Press, 2004); Levinson, Principles of Lithography, Second Edition (SPIE Press, 2005); Doering and Nishi, Editors, Handbook of Semiconductor Manufacturing Technology, Second Edition (CRC Press, 2007); Sawyer et al, Electrochemistry for Chemists, 2nd edition (Wiley Interscience, 1995); Bard and Faulkner, Electrochemical Metho

40

50

ds: Fundamentals and Applications, 2nd edition (Wiley, 2000); Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition (Springer, 2006); Hermanson, Bioconjugate Techniques, Second Edition (Academic Press, 2008); などを含む、当業者に周知の多くの入手可能な参考文献および論文に見出される。

【0016】

本発明は、1つまたは複数の光遮蔽層、即ち1つまたは複数の不透明層を有するナノポアアレイを含む、核酸などの分子の光学に基づくナノポア解析のための方法およびデバイスを対象とする。典型的には、ナノポアアレイはケイ素、窒化ケイ素、酸化ケイ素、酸化アルミニウムなどの材料の薄いシートとして製造され、これらは特に使用される厚み、例えば50~100nm未満で容易に光を透過する。分析物の電気的検出にはこれは問題ではない。しかし、ナノポアを通過する標識された分子の光学に基づく検出においては、アレイを通して透過される光は意図された反応部位、即ちシグナル発生領域の外側の材料を常に励起し、それにより、例えば非特異的バックグラウンド蛍光、ナノポアにまだ入っていない分子の標識からの蛍光などの光学的ノイズを発生させる。一態様では、本発明は、励起ビームからの光を反射および/または吸収する1つまたは複数の光遮蔽層を有するナノポアアレイを提供し、それによりアレイのナノポアに付随する意図された反応部位において発生する光学シグナルへのバックグラウンドノイズを低減することによって、この問題に対処する。一部の実施形態では、意図された反応部位(より完全に以下に記述する検出ゾーンまたはシグナル発生ゾーンなど)における光学標識が直接照明によって励起されることがこれによって可能になる。一部の実施形態では、不透明層は金属層であってもよい。そのような金属層はSn、Al、V、Ti、Ni、Mo、Ta、W、Au、AgまたはCuを含んでよい。一部の実施形態では、そのような金属層はAl、Au、AgまたはCuを含んでよい。さらに他の実施形態では、そのような金属層はアルミニウムもしくは金を含んでよく、またはアルミニウムのみを含んでもよい。不透明層の厚みは広く変化してもよく、層を構成する材料の物理的および化学的特性による。一部の実施形態では、不透明層の厚みは少なくとも5nm、または少なくとも10nm、または少なくとも40nmであってもよい。他の実施形態では、不透明層の厚みは5~100nmの範囲であってもよく、他の実施形態では、不透明層の厚みは10~80nmの範囲であってもよい。不透明層は励起ビームからの光を100パーセント遮蔽する(即ち反射しまたは吸収する)必要はない。一部の実施形態では、不透明層は励起ビームからの入射光を少なくとも10パーセント遮蔽してもよく、他の実施形態では、不透明層は励起ビームからの入射光を少なくとも50パーセント遮蔽してもよい。

【0017】

図1Aは特定の実施形態のための本発明の上記の態様を示す。固体状態(solid-state)の膜(100)は第1の側面(104)に不透明コーティング(102)を有して、第1のチャンバー(112)に面する表面(105)および第2のチャンバー(114)に面する第2の側面(106)を有する積層膜(101)を形成している。積層膜(101)は第1のチャンバー(112)を第2のチャンバー(114)から分離し、それぞれが第1のチャンバー(112)と第2のチャンバー(114)との間の流体連通を提供するアパーチャー(110)のアレイを含む。アパーチャー(110)は固体状態または合成のナノポアであってもよく、直接使用しても、それを通して通過が起こるタンパク質ナノポアを固定化するために使用してもよい。一般に、アパーチャーは励起ビームの波長より小さい直径または断面寸法を有し、それによりそのようなビームからの光はアパーチャーを通して透過されない。一部の実施形態では、アパーチャーは100nmまたはそれ未満の直径を有する。一部の実施形態では、円形アパーチャーの直径は励起ビームの波長の0.586倍またはそれ未満である。

【0018】

前述の段落の一部の実施形態では、本発明の方法は、下記のステップ:(a)第1の側

10

20

30

40

50

面、第2の側面、およびそれらを通る複数のアパーチャーを有する固相膜を含むナノポアアレイを提供するステップであって、固相膜が第1のチャンバーと第2のチャンバーを分離し、それにより各アパーチャーが第1のチャンバーと第2のチャンバーとの間の流体連通を提供し、固相膜の第1の側面がその上に不透明なコーティングを有し、各アパーチャーが第1の側面の不透明コーティングから第2の側面に向けて延在する検出領域を有するステップと；(b)アパーチャーを通して第1のチャンバーから第2のチャンバーにポリマーを通過させるステップであって、各ポリマーが、それに取着された、ポリマーの特性を示す少なくとも第1の波長を有するシグナルを発生させることができる1つまたは複数の光学標識を有するステップと；(c)第2の波長を有する励起ビームでアパーチャーの検出領域における光学標識を固相膜の第2の側面から照明し、それにより検出領域における光学標識がその第1の波長が第2の波長と異なるシグナルを発生するステップと；(d)検出領域における光学標識からのシグナルを検出するステップであってポリマーの特性を決定するステップとによって実施され得る。

10

【0019】

別の実施形態では、図1Cに例示されるように、本発明の方法は、以下のステップ：(a)第1の側面、第2の側面、およびそれらを通る複数のアパーチャーを有する固相膜を含むナノポアアレイを提供するステップであって、固相膜が第1のチャンバーと第2のチャンバーを分離し、それにより各アパーチャーが第1のチャンバーと第2のチャンバーとの間の流体連通を提供し、固相膜の第2の側面がその上に不透明なコーティングを有し、各アパーチャーが第2の側面の不透明コーティングから第2のチャンバー内に延在する検出領域を有するステップと；(b)アパーチャーを通して第1のチャンバーから第2のチャンバーにポリマーを通過させるステップであって、各ポリマーが、それに取着された、ポリマーの特性を示す少なくとも第1の波長を有するシグナルを発生させることができる1つまたは複数の光学標識を有するステップと；(c)第2の波長を有する励起ビームでアパーチャーの検出領域における光学標識を固相膜の第2の側面から照明し、それにより検出領域における光学標識がその第1の波長が第2の波長と異なるシグナルを発生するステップと；(d)検出領域における光学標識からのシグナルを検出するステップであってポリマーの特性を決定するステップとによって実施され得る。

20

【0020】

一部の実施形態では、不透明コーティングまたは不透明層が金属の場合は常に、最近傍ナノポア距離と励起ビーム波長は、ナノポアアレイを通るプラズモン介在異常透過が最小になるように選択される。そのような選択の指針は、参考として援用される以下の引用文献に開示される：Ebbesenら、Nature, 391: 667-669(1998)；Ebbesenら、米国特許第5973316号；同第6040936号；同第6236033号；同第6856715号；同第7057151号；同第7248756号；同第8174696号；Gurら、Optics Comm., 284: 3509-3517(2011)；Ghaemiら、Physical Review B, 58: 6779-6782(1998)；Pacifi-ciら、Optics Express, 16(12): 9222-9238(2008)；など。一部の実施形態では、最近傍ナノポア距離(例えばナノポアのランダム(例えばPoisson分布)アレイにおいて予期される最近傍ナノポア距離)は、例えば光学標識を励起するための励起波長とほぼ等しくなるように選択される。

30

40

【0021】

一部の実施形態では、シグナル発生領域(116)(または等価な意図された反応部位)はそれぞれ、ナノポアの内部および第2の側面(106)上のナノポアの出口のすぐ隣りに隣接する領域を含み、そのような領域は他のナノポアの等価な領域とは重ならない。一部の実施形態では、標識された核酸分子などの標識された分子が第1のチャンバー(112)に装荷され、またはその中に配置され、直接または挿入されたタンパク質ナノポアを介してのいずれかで、積層膜(101)のアパーチャーを通して第1のチャンバー(112)から第2のチャンバー(114)へ通過する。標識された分子がアパーチャー(1

50

10)を通過し、そして/またはアパーチャー(110)を出るとともに、これらの分子は励起ビーム(118)によって直接照明され得る。励起ビーム(118)は標識された分子を直接励起するか、または標識された分子をFRET相互作用を介して間接的に励起するように選択され、または構成され得る。一部の実施形態(図1B)では、シグナル発生領域(120)(または等価な意図された反応部位)はそれぞれ、第1の側面(104)から第2の側面(106)までのナノポアの内部および第2の側面(106)上のナノポアの出口のすぐ隣りに隣接する領域を含み、そのような領域は他のアパーチャー(またはナノポア)の等価な領域とは重ならない。さらに他の実施形態では、シグナル発生領域(または意図された反応部位)はそれぞれ、第1のチャンバーのその入口から第2のチャンバーのその出口までのナノポアの内部およびナノポアの入口と出口のすぐ隣りに隣接する領域を含み、そのような領域は他のアパーチャーの等価な領域とは重ならない。

【0022】

上述のように、本発明の積層膜のアパーチャーは、直接ナノポアとして用いてもよく、1つまたは複数のタンパク質ナノポアを保持または固定化するために使用してもよい。後者の型の一部の実施形態では、1つまたは複数のタンパク質ナノポアを、不透明層の表面(例えば図1A、1B、または1Eの105)上、または積層膜の第2の側面(例えば図1Dの106)の表面上のいずれかに配置された脂質二重層の中に埋め込んでもよい。図1Dおよび1Eには、脂質二重層(126)(これは図1Dの表面(106)および図1Eの表面(105)の上に示されている)とともに不透明層またはコーティング(102)、固体状態の膜(100)、アパーチャー(110)を有する積層膜(101)の断面が示されている。示された特定の実施形態では、標識(124)(例えば量子ドット、金属ナノ粒子などのドナー標識、またはFRETシグナルを発生させるための他の蛍光ナノ粒子)が附着されたタンパク質ナノポア(122)が脂質二重層(126)の中に挿入されてが示されているが、他で注記するように、本発明はFRETシグナルの発生のための標識を有しない構成のタンパク質ナノポアを包含する。標識(124)に隣接する(即ち標識(124)のFRET距離内に)シグナル発生領域を有する図1Dの一部の実施形態は、シグナル発生領域が第1の側面(104)から第2の側面(106)のアパーチャーまたはナノポアの出口に近接したスペースまで延在する図1Bに示す構成に対応している。同様に、これも標識(124)に隣接する(例えば標識(124)のFRET距離内に)シグナル発生領域を有する図1Eの一部の実施形態は、シグナル発生領域が表面(105)から第2の側面(106)のアパーチャーまたはナノポアの出口に近接したスペースまで延在する図1Aに示す構成に対応している。

【0023】

図1A~1Eに示すような一部の実施形態では、金属層を安定化させるために、積層膜は酸化ケイ素コーティングなどの酸化物コーティングなどの不動化コーティングをさらに含んでよい。例えば、物理的または化学的堆積手法を使用して金属などの不透明材料で窒化ケイ素膜をコーティングして積層膜を形成させ、その後で集束電子またはイオンビームを使用してアパーチャーをエッチングまたは穿孔して積層膜にアパーチャーのアレイを形成させてもよい。次いでそのようなアレイを、再び化学的配置または蒸着手法を使用して酸化ケイ素などの保護層でさらにコーティングしてもよい。

【0024】

一部の実施形態では、本発明は、下記のステップ:(a)第1の側面、第2の側面、およびそれらを通る複数のアパーチャーを有する固相膜を含むナノポアアレイを提供するステップであって、固相膜が第1のチャンバーと第2のチャンバーを分離し、それにより各アパーチャーが第1のチャンバーと第2のチャンバーとの間の流体連通を提供し、固相膜の第1の側面がその上に不透明なコーティングを有し、各アパーチャーが第1の側面の不透明コーティングから第2の側面に向けて延在する検出領域を有するステップと;(b)アパーチャーを通して第1のチャンバーから第2のチャンバーにポリマーを通過させるステップであって、各ポリマーが、それに附着された、ポリマーの特性を示す少なくとも第1の波長を有するシグナルを発生させることができる1つまたは複数の光学標識を有する

10

20

30

40

50

ステップと；(c)少なくとも第2の波長を含む励起ビームでアパーチャーの検出領域における光学標識を固相膜の第2の側面から照明し、それにより検出領域における光学標識がその第1の波長が第2の波長と異なるシグナルを発生するステップと；(d)検出領域における光学標識からのシグナルを検出するステップであってポリマーの特性を決定するステップとによって、核酸およびタンパク質を含む生物学的ポリマーなどのポリマーを特性決定するための方法を含み得る。一部の実施形態では、ポリマーはポリヌクレオチドまたはタンパク質であってもよい。さらに他の実施形態では、ポリマーはポリヌクレオチドであってもよい。さらなる実施形態では、ポリヌクレオチドは一本鎖核酸であってもよい。一部の実施形態では、解析または決定されるポリマーの特性はヌクレオチド配列などのポリマーのモノマー配列である。一部の実施形態では、ポリマー上の光学標識は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許ならびに特許および国際公開：第8,771,491号；第2013/0203050号；またはWO2014/190322に記載されているようなFRET標識である。一部の実施形態では、アパーチャーはタンパク質ナノポアを含む。簡単に言うと、一部の実施形態ではFRET標識は各シグナル発生領域に少なくとも1つのFRETドナー標識および少なくとも1つのFRETアクセプター標識を含み、励起ビームはFRETドナー標識を励起し、これが次にドナー標識のFRET距離内にあるFRETアクセプター標識にエネルギーを伝達し、これが次に光学シグナルを放出する。典型的には、励起ビームは第2の波長を含み、光学シグナルは第2の波長とは異なる第1の波長を含み、例えば落射照明システムの使用が可能になる。一部の実施形態では、検出領域は第1の側面の不透明コーティングから第2の側面に向けて延在し、アパーチャーおよび/またはナノポアの出口のすぐ近くに隣接する膜外スペースを含む。一部の実施形態では、そのような膜外スペースはナノポアまたはアパーチャーの出口から50nmを超えて延在しない。他の実施形態では、そのような膜外スペースはナノポアまたはアパーチャーの出口から10nmを超えて延在しない。

【0025】

簡単に言うと、米国特許第8,771,491号に、より完全に記載されているように、一部の実施形態では、アパーチャーおよび/またはナノポアは1つまたは複数のFRETドナーで標識され、ポリマーはそれぞれFRETアクセプターで標識されて、それにより少なくとも選択されたドナーおよびアクセプターがFRET対を形成し、即ちドナーの発光スペクトルが少なくとも1つのアクセプターの吸光スペクトルと重なり、それにより他の条件が合致すれば（例えばドナー励起、ドナーとアクセプターがFRET距離内に存在する、ドナーとアクセプターが適正な相対的配向にあるなど）、FRET相互作用が起こり得る。FRET相互作用においてはドナーの励起エネルギーが非放射的にアクセプターに伝達され、その後アクセプターがドナーの励起エネルギーよりも低いエネルギーの光学シグナルを放出する。ドナーは通常、レーザーによって発生するような光ビームを照明することによって励起される。

【0026】

一部の実施形態では、参照により本明細書に組み込まれるHuberら、米国特許公開第2013/0203050号に記載されているように、タンパク質ナノポアを脂質二重層なしに、または僅か少量の脂質二重層とともに、固体状態の膜中に挿入してアレイを形成してもよい。そのようなタンパク質ナノポア/アパーチャー構成を図1Fに示す。この特定の実施形態では、固体状態の膜(100)および不透明層(102)を含む積層膜(101)は、量子ドットなどの光学活性粒子であってもよいドナー(128)で標識された、タンパク質ナノポア(122)がその中に固定化されたアパーチャー(107)を含む。アクセプターで標識されたポリマー(130)がタンパク質ナノポア(122)のポアを通過して出ていく際に、アクセプター標識はドナー(128)のFRET距離の中を通過する。アパーチャー(107)の大きさは単一のタンパク質ナノポアを固定化できるように作られている。励起ビーム(133)によってアパーチャー(107)を直接照明すれば、ドナー(128)が励起され、タンパク質ナノポア(122)を通過している標識されたポリマー(130)のアクセプターとのFRET相互作用に入ることが可能になる。

10

20

30

40

50

一方、不透明層(102)は、ビーム(133)として不透明層(102)の反対側にある標識されたポリマー(131)の上にあるアクセプターを照明するビーム(133)の放射を減少させる。不透明層(102)は、ビーム(133)を吸収(135)および/または反射(137)することによって、ビーム(133)からの放射を遮蔽する。

【0027】

図1Gにさらなる実施形態を示す。ここでは金属層などの不透明層(102)の表面が第2のチャンバー(114)の境界を形成している。一部の実施形態では、固体状態のアパーチャー(146)のレイが従来のマイクロマシン手法を使用して製造され得る。例えば、シリコン基板(140)に窒化ケイ素層などの非電導性の固体状態の膜(100)が例えば化学蒸着法などの手法で加えられる。一部の実施形態では、層(100)は30 ~ 100 nmの範囲である。層(100)の上に、例えば化学蒸着法などの手法で金属層などの不透明層(102)が加えられて三層シートが形成される。不透明層(102)にフォトレジストの層を加えてもよく、これが除去された後にアパーチャーの位置にフォトレジスト材料が現像され、不透明層(102)および固体状態の膜(100)を通してエッチングすることによってホールが形成されて、アパーチャー(146)の部分が形成される。シリコン層(140)を通して第2のエッチングが行なわれて、レイ中に残りのアパーチャー(146)が形成される。本発明の一実施形態によるナノポアセンシングデバイスは、FRETドナー標識(124)を有する少なくとも1つのタンパク質ナノポア(122)がその中に挿入された不透明層(102)の表面(141)上に脂質二重層(126)を堆積配置することによって構成することができる。第1のチャンバー(112)の中に配置されると、例えば2つの異なる種類のモノマーのためのアクセプター標識(151)および(152)を含む帯電し標識されたポリマー(150)は、各アクセプター標識(151または152)を拘束するタンパク質ナノポア(122)を通過して、ドナー標識(124)のFRET距離(142)内に来ることができる。ドナー標識(124)はビーム(133)によって励起され、FRET距離(142)内にあるアクセプター標識に励起エネルギーを伝達し、これが次に標識が取着されたモノマーを示すFRETシグナル(144)を放出する。

【0028】

さらに他の実施形態では、図1Hに示すように、脂質二重層(126)が層(100)の表面(104)上に配置され、それにより励起ビーム(133)が向けられる側面に対向する積層膜(101)の側面にタンパク質ナノポア(122)が挿入される。

【0029】

一部の実施形態では不透明層は不透明な多孔質層を含んでもよく、これは一部の実施形態では、図2Aおよび2Bに示すように、不透明なナノ多孔質層であってもよい。そのような実施形態では、積層膜(101)は、固体状態の膜(200)と、アパーチャー(204)の層を横断する間接的なおよび/またはへび状の通路を提供するナノメートルサイズの孔を有する不透明材料を含むナノ多孔質層(202)とを含む。図2Bは、固体状態の膜(200)の第2の側面(216)に配置された脂質二重層(206)の中に挿入された、標識されたタンパク質ナノポア(210)を含む実施形態を示す。図1A~1Hの実施形態と同様に、ナノ多孔質層(202)は固体状態の膜(200)の第2の側面(216)に向けられた放射がナノ多孔質層(202)の他の側面上の標識されたポリマーまたは他の材料に到達することを遮蔽または低減し、それによりタンパク質ナノポア(210)の出口における検出事象からの光学シグナルにおける望ましくないノイズの発生を低減する。

【0030】

上述のように、一部の実施形態では、ポリマー分析物上の標識またはナノポア上のドナーを直接照明するために、励起ビームの送達と光学シグナルの収集が単一の対物レンズを通して起こる落射照明システムが使用される。本発明で使用する共焦点落射照明システムの基本的構成要素を図3に示す。励起ビーム(302)は二色性ミラー(304)を通過して対物レンズ(306)に向かって通過し、対物レンズ(306)は励起ビーム(302

10

20

30

40

50

)を積層膜(300)に集中させ(310)、その中で標識が直接励起されて蛍光シグナルなどの光学シグナルを放出するか、またはFRET相互作用を介して間接的に励起されて光学シグナルを放出する。そのような光学シグナルは対物レンズ(306)によって収集され、励起ビーム(302)の光は通過させるが光学シグナル(311)の光は反射するように選択された二色性ミラー(304)に向けられる。反射された光学シグナル(311)は、光学シグナル(311)をピンホール(316)を通して検出器(318)に集中させるレンズ(314)を通過する。

【0031】

一部の実施形態では、一本鎖核酸を含むポリマーのための上記の方法を実施するためのデバイスは、典型的には積層膜とナノポアを横断する電場を確立するための一組の電極を含む。一本鎖核酸は、チャンバー内に陰極を配置することによって積層膜の「シス」側として構成された第1のチャンバー内の電解質の中に配置することによってナノポアに曝される。電場を印加すると、陰荷電を有する一本鎖核酸はナノポアに捕捉され、チャンバー内に陽極を配置することによって膜の「トランス」側として構成された積層膜の他の側の第2のチャンバーに通過する。通過速度は、第1および第2のチャンバー内の電解質のイオン強度ならびにナノポアを横断して印加された電圧に部分的に依存する。光学に基づく検出においては、通過速度は、例えば異なる電圧でナノポアあたりに予想される異なる速度でシグナルを発生する標識された一本鎖核酸の所定の標準を使用する予備的較正測定によって選択され得る。したがって、DNA配列決定用途には、通過速度はそのような較正測定からのシグナル速度に基づいて選択され得る。したがって、そのような測定から、例えばナノポアのアレイにわたって信頼できるヌクレオチドの識別が可能になるか最大である電圧が選択され得る。一部の実施形態では、そのような較正は(所定の標準配列の代わりに、またはそれに加えて)分析されるテンプレートの試料からの核酸を使用して行なうことができる。一部の実施形態では、そのような較正は配列決定ランの間にリアルタイムで行なってもよく、印加する電圧は例えばヌクレオチド特異的シグナルの取得を最大にするためにそのような測定に基づいてリアルタイムで改変してもよい。

ナノポアおよびナノポアアレイ

【0032】

上述のように、本発明で使用するナノポアは固体状態のナノポア、タンパク質ナノポア、またはタンパク質ナノポアもしくは有機ナノチューブ、例えば固体状態の膜もしくは同様のフレームワークで構成された炭素もしくはグラフェンナノチューブを含むハイブリッドナノポアであってもよい。ナノポアの重要な特徴には、ポリヌクレオチドなどのポリマー分析物を拘束し、それによりそのモノマーが検出ゾーン(またはシグナル発生領域)を順に通過する(即ちヌクレオチドが検出ゾーンを一度に一つずつ、または一列で通過する)ことが含まれる。一部の実施形態では、ナノポアの追加的な特徴には、二本鎖核酸または等価の嵩高な分子を通過させずに一本鎖核酸を通過させることが含まれる。

【0033】

一部の実施形態では、本発明の方法およびデバイスと併せて使用されるナノポアは、平面上に規則的に配置され得るナノポアのクラスターのアレイのような、アレイの形態で提供される。一部の実施形態では、異なるクラスターのナノポアからの光学シグナルが、用いられる光学検出システムによって区別可能であるように、クラスターはそれぞれ個別の分解能限界区域内にあるが、同じクラスター内のナノポアからの光学シグナルは、用いられる光学検出システムによって、そのようなクラスター内の特定のナノポアに必ずしも割り当てることができる必要はない。

【0034】

固体状態のナノポアは、窒化ケイ素(Si_3N_4)および二酸化ケイ素(SiO_2)などを含むがこれらに限定されない様々な材料において製作されてもよい。DNA配列決定などの分析の適用例に関するナノポアの製作および動作は、参照により組み込まれる以下の例示的な参考文献に開示されている: Ling, 米国特許第7,678,562号; Hu et al, 米国特許第7,397,232号; Golovchenko et a

10

20

30

40

50

1, 米国特許第6,464,842号; Chu et al, 米国特許第5,798,042号; Sauer et al, 米国特許第7,001,792号; Su et al, 米国特許第7,744,816号; Church et al, 米国特許第5,795,782号; Bayley et al, 米国特許第6,426,231号; Akesson et al, 米国特許第7,189,503号; Bayley et al, 米国特許第6,916,665号; Akesson et al, 米国特許第6,267,872号; Meller et al, 米国特許公開第2009/0029477号; Howorka et al, 国際特許公開WO2009/007743; Brown et al, 国際特許公開WO2011/067559; Meller et al, 国際特許公開WO2009/020682; Polonsky et al, 国際特許公開WO2008/092760; Van der Zaag et al, 国際特許公開WO2010/007537; Yan et al, Nano Letters, 5(6):1129-1134(2005); Iqbal et al, Nature Nanotechnology, 2:243-248(2007); Wanunu et al, Nano Letters, 7(6):1580-1585(2007); Dekker, Nature Nanotechnology, 2:209-215(2007); Storm et al, Nature Materials, 2:537-540(2003); Wu et al, Electrophoresis, 29(13):2754-2759(2008); Nakane et al, Electrophoresis, 23:2592-2601(2002); Zhe et al, J. Micromech. Microeng., 17:304-313(2007); Henriquez et al, The Analyst, 129:478-482(2004); Jagtiani et al, J. Micromech. Microeng., 16:1530-1539(2006); Nakane et al, J. Phys. Condens. Matter, 15 R1365-R1393(2003); DeBlois et al, Rev. Sci. Instruments, 41(7):909-916(1970); Clarke et al, Nature Nanotechnology, 4(4):265-270(2009); Bayley et al, 米国特許公開第2003/0215881号; など。

【0035】

一部の実施形態では、本発明は、1つまたは複数の光遮蔽層、即ち1つまたは複数の不透明層を有するナノポアアレイを含む。典型的には、ナノポアアレイはケイ素、窒化ケイ素、酸化ケイ素、酸化アルミニウムなどの材料の薄いシートとして製造され、これらは特に使用される厚み、例えば50~100nm未満で容易に光を透過する。分析物の電気的検出にはこれは問題ではない。しかし、ナノポアを通過する標識された分子の光学に基づく検出においては、アレイを通して透過される光は意図された反応部位の外側の材料を常に励起し、それにより、例えば非特異的バックグラウンド蛍光、ナノポアにまだ入っていない分子の標識からの蛍光などの光学的ノイズを発生させる。一態様では、本発明は、励起ビームからの光を反射および/または吸収する1つまたは複数の光遮蔽層を有するナノポアアレイを提供し、それによりアレイのナノポアに付随する意図された反応部位において発生する光学シグナルへのバックグラウンドノイズを低減することによって、この問題に対処する。一部の実施形態では、意図された反応部位における光学標識が直接照明によって励起されることがこれによって可能になる。一部の実施形態では、不透明層は金属層であってもよい。そのような金属層はSn、Al、V、Ti、Ni、Mo、Ta、W、Au、AgまたはCuを含んでよい。一部の実施形態では、そのような金属層はAl、Au、AgまたはCuを含んでよい。さらに他の実施形態では、そのような金属層はアルミニウムもしくは金を含んでよく、またはアルミニウムのみを含んでもよい。不透明層の厚みは広く変化してもよく、層を構成する材料の物理的および化学的特性による。一部の実施形態では、不透明層の厚みは少なくとも5nm、または少なくとも10nm、または少なくとも40nmであってもよい。他の実施形態では、不透明層の厚みは5~100nmの

範囲であってもよく、他の実施形態では、不透明層の厚みは10～80nmの範囲であってもよい。不透明層は励起ビームからの光を100パーセント遮蔽する（即ち反射または吸収する）必要はない。一部の実施形態では、不透明層は励起ビームからの入射光を少なくとも10パーセント遮蔽してもよく、他の実施形態では、不透明層は励起ビームからの入射光を少なくとも50パーセント遮蔽してもよい。

【0036】

不透明層またはコーティングは、当該技術分野で公知の種々の手法によって固体状態の膜上に製作することができる。化学蒸着法、電着、エピタキシー、熱酸化、蒸発およびスパッタリングなどの物理蒸着法、キャストリングなどの材料堆積手法を使用することができる。一部の実施形態では、原子層堆積を使用することができる。例えば参照により組み込まれる米国特許第6,464,842号；Weiら、Small、6巻（13号）、1406～1414頁（2010年）。

10

【0037】

一部の実施形態では、1～100nmのチャンネルまたはアパーチャーが固体基材、通常は平面基材、例えば、膜を通して形成されてよく、一本鎖DNAなどの分析物がそこを通して移行するように誘発される。別の実施形態では、2～50nmのチャンネルまたはアパーチャーが基材を通して形成され、さらに別の実施形態では、2～30nm、または2～20nm、または3～30nm、または3～20nm、または3～10nmのチャンネルまたはアパーチャーが基材を通して形成される。ナノポアを生成する固体状態の手法は、堅牢で耐久性を提供すると同時にナノポアのサイズおよび形状を調整する能力、ウェハー規模でナノポアの高密度アレイを製作する能力、脂質ベースの系に比べて優れた機械的、化学的および熱的特性、ならびに電子または光学的読出し技法と一体化する可能性を提供する。一方、生物学的ナノポアは、再現性のある狭いポアまたは管腔、特に1～10ナノメートルの範囲にあるもの、ならびに従来のタンパク質を設計製作する方法によって、ナノポアの物理的および/または化学的性質を調整するための、かつFRETドナーまたはアクセプターであってもよい蛍光標識などの基または要素を直接または間接的に取着的なための技法を提供する。タンパク質ナノポアは、典型的には、機械的支持体に関する繊細な脂質二重層に依拠し、精密な寸法を持つ固体状態のナノポアの製作は、依然として難しいままである。一部の実施形態では、固体状態のナノポアは、生物学的ナノポアと組合わさっていわゆる「ハイブリッド」ナノポアを形成し、これは、これらの欠点のいくつかを克服し、そうすることで固体状態のナノポアの安定性に生物学的ポアタンパク質の精密さを提供する。光学的読出し技法では、ハイブリッドナノポアが、ナノポアの精密な場所を提供し、このことがデータ獲得を大幅に単純化する。

20

30

【0038】

一部の実施形態では、クラスターは、アパーチャーのアレイを含有する固相膜によって支持された脂質二重層内に、タンパク質ナノポアを配置することによって形成されてもよい。例えば、そのようなアレイは、固相支持体に製作された（例えば、穴を開けられ、またはエッチングされるなど）アパーチャーを含んでいてもよい。そのようなアパーチャーの幾何形状は、用いられる製作技法に応じて変わってもよい。一部の実施形態では、そのようなアパーチャーのそれぞれは、個別の分解能限界区域に関連付けられ、または包含され；しかし他の実施形態では、多数のアパーチャーが同じ分解能限界区域内であってもよい。アパーチャーの断面積は、広く様々であってもよく、異なるクラスター間と同じでもそうでなくてもよいが、そのような面積は通常、従来の製作手法の結果と実質的に同じである。一部の実施形態では、アパーチャーは、10から200nmの範囲の最小線寸法（例えば、円形アパーチャーの場合には直径）を有し、または約100から 3×10^4 nm²の範囲の面積を有する。アパーチャーを横切って、脂質二重層が配置されてもよい。アパーチャー当たりのタンパク質ナノポアの分布は、例えば挿入ステップ中にタンパク質ナノポアの濃度を制御することによって、様々にしてもよい。そのような実施形態では、ナノポアのクラスターは、ランダムな数のナノポアを含んでいてもよい。タンパク質ナノポアがアパーチャーにランダムに挿入される一部の実施形態では、平均して1つまたは複数

40

50

のアーチャーを含有するクラスターは、ゼロよりも大きい所定の数のタンパク質ナノポアを有し；他の実施形態では、そのようなクラスターは、0.25よりも大きい所定の数のタンパク質ナノポアを有し；他の実施形態では、そのようなクラスターは、0.5よりも大きい所定の数のタンパク質ナノポアを有し；他の実施形態では、そのようなクラスターは、0.75よりも大きい所定の数のタンパク質ナノポアを有し；他の実施形態では、そのようなクラスターは、1.0よりも大きい所定の数のタンパク質ナノポアを有する。

【0039】

一部の実施形態では、本発明の方法およびデバイスは、SiN膜などの固相膜を含み、それを通るアーチャーのレイを有して、第1のチャンバーと第2のチャンバー（場合によっては、「シスチャンバー」および「トランスチャンバー」とも呼ぶ）との間に連通を設け、第2のまたはトランスチャンバーに面する表面に脂質二重層を支持する。一部の実施形態では、そのような固相膜内のアーチャーの直径は、10から200nmの範囲または20から100nmの範囲であってもよい。一部の実施形態では、そのような固相膜は、そのような二重層がトランスチャンバーに面する表面のアーチャーに跨る領域で、脂質二重層に挿入されたタンパク質ナノポアをさらに含む。一部の実施形態では、そのようなタンパク質ナノポアは、本明細書に記述される技法を使用して、固相膜のシス側から挿入される。一部の実施形態では、そのようなタンパク質ナノポアは、軸に沿ってパレルまたはポアを含み、かつ一端に「キャップ」構造を有し他端に「ステム」構造をするという点で（Songら、Science、274巻：1859～1866頁（1996年）からの専門用語を使用する）、溶血素と同一のまたは類似の構造を有する。そのようなタンパク質ナノポアを使用する一部の実施形態では、脂質二重層への挿入は、そのキャップ構造がシスチャンバーに向けて露出し、かつそのステム構造がトランスチャンバーに向けて露出するように配向するタンパク質ナノポアをもたらす。

【0040】

一部の実施形態では、本発明は、特にポリヌクレオチドの光学ベースのナノポア配列決定をするために、クラスターにおいてハイブリッドナノポアを用いてもよい。そのようなナノポアは、固体状態のオリフィスまたはアーチャーを含み、その中に、タンパク質ナノポアなどのタンパク質バイオセンサーを安定して挿入する。帯電したポリマーは、従来のタンパク質工学技術によってタンパク質ナノポア（例えば、アルファ溶血素）に附着されてもよく、その後、印加電場が、タンパク質ナノポアを固体状態の膜のアーチャー内に案内するのに使用されてもよい。一部の実施形態では、固体状態の基材におけるアーチャーは、タンパク質よりも僅かに小さくなるように選択され、これによってタンパク質がアーチャーを移行するのを妨げる。代わりに、タンパク質は、固体状態のオリフィスに埋め込まれることになる。

【0041】

一部の実施形態では、ドナーフルオロフォアをタンパク質ナノポアに附着する。次いでこの複合体を、タンパク質ナノポアが固体状態のナノホールに輸送されてハイブリッドナノポアを形成するまで、固体状態のナノホールの両端間に電場を印加することによって、固体状態のアーチャーまたはナノホール（例えば、直径3～10nm）に挿入する。ハイブリッドナノポアの形成は、（a）固体状態のナノホール、またはアーチャー、の部分遮断に基づく電流の降下を引き起こす、挿入されたタンパク質ナノポアによって、および（b）ドナーフルオロフォアの光学検出によって検証することができる。

【0042】

固体状態または合成によるナノポアは、上記引用した参考文献に例示されるような様々な方法で調製され得る。一部の実施形態では、例えば参照により本明細書に組み込まれるYangら、Nanotechnology、22巻：285310頁（2011年）に開示されるように、ヘリウムイオン顕微鏡を使用して様々な材料に合成ナノポアを開けてもよい。自立型膜に加工された薄膜材料、例えば窒化ケイ素の1つまたは複数の領域を支持するチップを、ヘリウムイオン顕微鏡（HIM）チャンバーに導入する。顕微鏡を低倍率に設定しながら、HIMモーター制御を使用して自立型膜をイオンビームの経路に導く。

焦点および非点補正を含むビームパラメーターを、自立型膜に隣接するが固体基材上にある領域で調節する。パラメーターを適正に固定したら、自立型膜領域がイオンビームスキャン領域の中心になるようにかつビームがブランクされるように、チップ位置を移動させる。HIMの視野を、予想されるナノポアパターン全体を含有するのに十分な、かつ将来の光学読出しに役立てるのに十分な（即ち、光学倍率、カメラ解像度などに依存する）寸法（単位 μm ）に設定する。次いでイオンビームを、画素ドウェル時間で全視野を通して1回ラスタ処理し、その結果、膜自動蛍光の全てまたはほとんどを除去するのに十分な全イオン線量が得られる。次いで視野を、適正な値（上記にて使用された場合よりも小さい）に設定して、単一ナノポアまたはナノポアのレイのいずれかの、リソグラフィにより画定されたミリングを行う。パターンの画素ドウェル時間は、試料加工前に較正試料の使用を通して決定された、1つまたは複数の所定の直径のナノポアをもたらすように設定する。この全プロセスを、単一チップ上でそれぞれ所望の領域で、および/またはHIMチャンバーに導入された各チップごとに、繰り返す。

【0043】

一部の実施形態では、ナノポアには、光学に基づくナノポア配列決定方法における使用のために1つまたは複数の標識が装着されている。標識は、Forster共鳴エネルギー伝達(FRET)対のメンバーであってもよい。そのような標識は、有機フルオロフォア、化学ルミネセンス標識、量子ドット、金属ナノ粒子、および/または蛍光タンパク質を含んでいてもよい。標的核酸は、ヌクレオチド当たり1つの全く異なる標識を有していてもよい。ヌクレオチドに装着される標識は、有機フルオロフォアからなる群から選択されてもよい。ポアタンパク質中の標識装着部位は、従来のタンパク質工学方法によって発生させることができ、例えば、標識の特異的な結合が可能になる変異タンパク質を構築することができる。例としてシステイン残基を、標識を装着するのに使用することができるチオール(SH)基を挿入する、タンパク質の所望の位置に挿入してもよい。システインは、天然に存在するアミノ酸と置き換えることができ、または付加アミノ酸として組み込むことができる。次いでマレイミド活性化標識を、タンパク質ナノポアのチオール残基に共有結合に装着する。好ましい実施形態では、タンパク質ナノポアへの標識または核酸上の標識の装着は、可逆的である。切断可能な架橋剤を実現することによって、容易に破断可能な化学結合（例えば、S-S結合またはpHにより変化し易い結合）が導入され、標識は、該当する条件が満たされたときに除去されてもよい。

FRETシグナルによる光学に基づくナノポア配列決定

【0044】

一部の実施形態では、ナノポアは、1つまたは複数の量子ドットで標識され得る。特に、一部の実施形態では、1つまたは複数の量子ドットは、ナノポアに装着されてもよく、または隣接する（ナノポアの入口および出口からのFRET距離内にある）固相支持体に装着されてもよく、分析物上のアクセプターとのFRET反応におけるドナーとして用いられてもよい。量子ドットのそのような使用は周知であり、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,252,303号；第6,855,551号；第7,235,361号；などの、科学および特許文献に広く記載されている。

【0045】

ポア標識として利用され得る量子ドットの一例は、水溶液中で合成することができるCdTe量子ドットである。CdTe量子ドットは、求核基、例えば第1級アミン、チオール、またはカルボン酸などの官能基などで機能化されてもよい。CdTe量子ドットは、量子ドットをタンパク質ポアの外側の第1級アミンに共有結合により連結するのに利用することができるカルボン酸官能基を有する、メルカプトプロピオン酸キャッピングリガンドを含んでいてもよい。架橋反応は、生体共役反応の当業者に公知である標準的な架橋試薬（ホモ二官能性ならびにヘテロ二官能性）を使用して、実現されてもよい。修飾が、核酸がナノポアを通して移行するのを損なわないまたは実質的に損なわないことを確実にするのに、注意を払ってもよい。これはドナー標識をナノポアに装着するのに使用される、用いられる架橋剤分子の長さを様々にすることによって、実現されてもよい。

【0046】

例えば、天然アルファ溶血素タンパク質のリシン残基131の第1級アミン(Song, L.ら、Science 274巻(1996年):1859~1866頁)を使用して、カルボキシ修飾されたCdTe量子ドットを、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩/N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(EDC/NHS)カップリング化学を介して共有結合してもよい。あるいは、アミノ酸129(トレオニン)をシステインに交換してもよい。天然アルファ溶血素タンパク質には他のシステイン残基がないので、新たに挿入されたシステインのチオール側基を使用して、他の化学的部分を共有結合により取着的にもよい。

【0047】

生物学的ポリマー、例えば核酸分子またはポリマーは、1つまたは複数のアクセプター標識で標識されてもよい。核酸分子の場合、4種のヌクレオチドのそれぞれまたは核酸分子のビルディングブロックをアクセプター標識で標識してもよく、それによって、天然に生ずるヌクレオチドのそれぞれに対する標識された(例えば、蛍光)対応物が創出される。アクセプター標識は、変換された核酸の一部または鎖全体にある1つまたは複数のヌクレオチドに取着的することができる、エネルギー受容分子の形をとってもよい。

【0048】

核酸分子またはポリマーのモノマーまたはヌクレオチドを標識するのに、様々な方法を利用してよい。標識されたヌクレオチドは、鑄型として当初の試料を使用して、新しい核酸の合成中に、核酸に組み込まれてもよい(「合成による標識」)。例えば核酸の標識は、PCR、全ゲノム増幅、ローリングサークル増幅、もしくはプライマー伸長などを介して、または当業者に公知の上記方法の様々な組合せおよび拡張を介して実現されてもよい。

【0049】

標識は、求核試薬など(アミン、チオールなど)の反応性基を含んでいてもよい。次いで、天然の核酸中に存在しない、そのような求核試薬は、NHSエステル、マレイミド、エポキシ環、イソシアネートなどのアミンまたはチオール反応性化学を介して蛍光標識を取着的のに使用することができる。そのような求核性の反応性蛍光色素(即ち、NHS-色素)は、異なる供給元から容易に購入可能である。小さい求核試薬で核酸を標識する利点は、「合成による標識」手法が使用されるときに、そのような標識されたヌクレオチドの組込みが高い効率でなされることにある。大量に蛍光標識された核酸ビルディングブロックは、新たに合成されたDNAに、重合プロセス中の標識の立体障害に起因してポリメラーゼにより不十分に組み込まれる可能性がある。

【0050】

2つまたはそれ超の互いに消光する色素が使用されるときにはいつでも、そのような色素を、直交付着化学を使用してDNAに取着的してもよい。例えば、NHSエステルは、第1級アミンと非常に特異的に反応するように使用することができ、またはマレイミドは、チオール基と反応することになる。第1級アミン(NH₂)またはチオール(SH)で修飾されたヌクレオチドは、市販されている。これらの比較的小さい修飾は、ポリメラーゼ媒介型DNA合成に容易に組み込まれ、NHSまたはマレイミドで修飾された色素のいずれかを使用する後続の標識反応に使用することができる。そのような直交リンカー化学を選択し使用するための指針は、Hermanson(前掲)に見出すことができる。

【0051】

典型的な取着的位置についての追加の直交取着的化学として、銅触媒された反応および非触媒反応に関するHuisgen型環状付加;例えばGutsmiedlら、Org. Lett.、11巻:2405~2408頁(2009年)に開示されるような、アルケンおよび酸化ニトリル環状付加;例えばSeeligら、Tetrahedron Lett.、38巻:7729~7732頁(1997年)に開示される、Diels-Alder環状付加;例えばCasiら、J. Am. Chem. Soc.、134巻:5887~5892頁(2012年);Shaoら、J. Am. Chem. Soc.、117巻:3

10

20

30

40

50

893~3899頁(1995年); Rideout、Science、233巻:561~563頁(1986年)に開示されるような、カルボニルライゲーション;例えばBrinkley、Bioconjugate Chemistry、3巻:2~13頁(1992年)に開示される、Michael付加;例えばSchulerら、Bioconjugate Chemistry、13巻:1039~1043頁(2002年); Dawsonら、Science、266巻:776~779頁(1994年);に開示される、本来の化学的ライゲーション;または例えばHermanson(前掲)に開示される、活性エステルを介したアミド形成、が挙げられる。

【0052】

核酸鎖における1、2、3、または4つのヌクレオチドの組合せは、それらの標識された対応物と交換されてもよい。標識されたヌクレオチドの様々な組合せは、並行して配列決定することができ、例えば供給源である核酸またはDNAを、4つの単一標識された試料に加えて2つの標識されたヌクレオチドの組合せで標識し、その結果、合計で10個の異なる状態で標識された試料の核酸分子またはDNA(G、A、T、C、GA、GT、GC、AT、AC、TC)が得られることになる。得られた配列パターンは、冗長配列読出しにおけるヌクレオチドの位置の重なり合いに起因して、より正確な配列アライメントを可能にすることができる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドまたはペプチドなどのポリマーを、単一の種類のモノマーに取着された単一蛍光標識で標識し、例えば、ポリヌクレオチドの全てのT(または実質的に全てのT)が、蛍光標識、例えばシアニン色素で標識される。そのような実施形態では、ポリマーからの蛍光シグナルの収集または配列が、特定のポリマーに関するシグネチャーまたはフィンガープリントを形成し得る。一部のそのような実施形態では、そのようなフィンガープリントは、決定されるべきモノマーの配列に関する十分な情報を提供してもしなくてもよい。

【0053】

一部の実施形態では、本発明の特徴は、互いに消光する組のメンバーである蛍光色素または標識による、ポリマー分析物の実質的に全てのモノマーの標識付けである。ポリマー分析物の標識付けに関連する「実質的に全ての」という用語の使用は、化学的および酵素標識技法が典型的には100パーセント未満で効率的であることを認めることである。一部の実施形態では、「実質的に全ての」は、全てのモノマーの少なくとも80パーセントに蛍光標識が取着されていることを意味する。他の実施形態では、「実質的に全ての」は、全てのモノマーの少なくとも90パーセントに蛍光標識が取着されていることを意味する。他の実施形態では、「実質的に全ての」は、全てのモノマーの少なくとも95パーセントに蛍光標識が取着されていることを意味する。

【0054】

核酸分子などのポリマーを配列決定するための方法は、膜または膜様構造またはその他の基材に挿入されたナノポアまたはポアタンパク質(または合成ポア)を設けるステップを含む。ポアのベースまたはその他の部分は、1つまたは複数のポア標識で修飾されてもよい。ベースは、ポアのトランス側を指してもよい。任意選択で、ポアのシスおよび/またはトランス側を、1つまたは複数のポア標識で修飾してもよい。分析されまたは配列決定される核酸ポリマーは、標識されたタイプの核酸ポリマーであって、得られたポリマー中の4つのヌクレオチドの1つまたは最大で4つ全てのヌクレオチドがヌクレオチドの標識された類似体(複数可)で置き換えられた核酸ポリマーを、生成するための鋳型として使用されてもよい。電場をナノポアに印加して、標識された核酸ポリマーをナノポア内に強制的に通し、一方、外部単色またはその他の光源を使用してナノポアを照明し、それによってポア標識を励起してもよい。核酸の標識されたヌクレオチドがナノポアを通り、ナノポアから出て行き、またはナノポアに進入するにつれ、またはその後にもしくは前に、エネルギーはポア標識からヌクレオチド標識に伝達され、その結果、より低いエネルギー放射線の放出が生じる。次いでヌクレオチド標識放射線を、当業者に公知の単一分子検出が可能な、共焦点顕微鏡装置またはその他の光学検出システムまたは顕微鏡法システムにより検出する。そのような検出システムの例には、共焦点顕微鏡法、落射照射蛍光顕微

10

20

30

40

50

鏡法などが含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、落射照射蛍光顕微鏡法が使用される。

【0055】

エネルギーは、標識されたモノマーがナノポアから出て行き、ナノポアに進入し、またはナノポアを通るにつれ、またはその後もしくは前に、ポリマーのアクセプター標識モノマー（例えば、ヌクレオチド）のアクセプター標識がドナー標識と相互作用するとき、ポアまたはナノポアドナー標識（例えば、量子ドット）からポリマー（例えば、核酸）上のアクセプター標識に伝達されてもよい。例えば、ドナー標識は、標識されたモノマーがナノポアから出て行きかつナノポアのチャネルまたは開口の外側のドナー標識の付近または近傍に来るまで、ドナー標識とアクセプター標識との間の相互作用またはエネルギー伝達が生じないように、ナノポアのシスもしくはトランス側または表面のナノポアに位置決めされまたは取着されてもよい。その結果、標識間の相互作用、ドナー標識からアクセプター標識へのエネルギー伝達、アクセプター標識からのエネルギーの放出、および/またはアクセプター標識からのエネルギーの放出の測定もしくは検出を、ナノポア内、例えばナノポアのシスまたはトランス側のシスまたはトランスチャンバー内を走る通路、チャネル、または開口の外側で行ってもよい。モノマーのアクセプター標識から放出されるエネルギーの測定または検出は、モノマーを識別するのに利用されてもよい。

10

【0056】

ナノポア標識は、標識が目に見えまたは露出して、標識の励起または照明が容易になるように、ナノポアの通路、チャネル、または開口の外側に位置決めされてもよい。ドナー標識とアクセプター標識との間の相互作用およびエネルギー伝達、ならびにエネルギー伝達の結果としてのアクセプター標識からのエネルギーの放出は、ナノポアの通路、チャネル、または開口の外側で生じ得る。これは例えば光学検出または測定デバイスを介した、アクセプター標識からのエネルギーまたは光放出の検出または測定の容易さおよび正確さを促進させると考えられる。

20

【0057】

ドナー標識は、様々な手法および/またはナノポア上の様々な部位で、取着されてもよい。例えば、ドナー標識は、ナノポアの一部または単位に、直接または間接的に取着されまたは接続されてもよい。あるいは、ドナー標識は、ナノポアに隣接して位置決めされてもよい。

30

【0058】

ポリマー（例えば、核酸）の、アクセプターで標識されたモノマー（例えば、ヌクレオチド）のそれぞれは、ポリマーが通過するナノポアまたはチャネルの出口の上にもしくは隣りに位置決めされまたは直接もしくは間接的に取着されたドナー標識と順次、互いに作用することができる。ドナーおよびアクセプター標識の間の相互作用は、例えばアクセプターで標識されたモノマーがナノポアから出て行った後にまたはモノマーがナノポアに進入する前に、ナノポアチャネルまたは開口の外側で生じ得る。相互作用は、例えばアクセプターで標識されたモノマーがナノポアを通り、ナノポアに進入し、またはナノポアから出て行く間に、ナノポアチャネルまたは開口の内部でまたは部分的に内部で生じ得る。

40

【0059】

核酸の4つのヌクレオチドの1つが標識される場合、単一ヌクレオチド標識放出から生ずる時間依存性シグナルは、核酸配列中の標識されたヌクレオチドの位置に対応する配列に変換される。次いでプロセスを、個別の試料中の4つのヌクレオチドのそれぞれに関して繰り返し、次いで4つの部分配列を整列させて全核酸配列を組み立てる。

【0060】

多色標識された核酸（DNA）配列について分析する場合、1つまたは複数のドナー標識から、核酸分子上に存在し得る4つの全く異なるアクセプター標識のそれぞれへのエネルギー伝達は、4つの全く異なる波長または色（それぞれ、4つのヌクレオチドの1つに関連付けられる）で発光をもたらすことができ、直接配列読出しが可能になる。

【0061】

50

ドナー標識（本明細書において、場合によっては「ポア標識」とも呼ぶ）は、アパーチャーの可能な限り近くに（例えばナノポアの出口に）核酸がナノポアを通過して移行するのを損なう閉塞を引き起こすことなく、配置されてもよい。ポア標識は、様々な適切な性質および/または特性を有していてもよい。例えば、ポア標識は、特定の要件を満たすエネルギー吸収特性を有していてもよい。ポア標識は、例えば約0から1000 nmまたは約200から500 nmに及ぶ、大きい放射線エネルギー吸収断面を有していてもよい。ポア標識は、アクセプター標識など、核酸標識のエネルギー吸収よりも高い、特定のエネルギー範囲内の放射線を吸収してもよい。ポア標識の吸収エネルギーは、エネルギー伝達が2つの標識間で生じ得る距離を制御するために、核酸標識の吸収エネルギーに対して調整されてもよい。ポア標識は、少なくとも 10^6 から 10^9 回の励起およびエネルギー伝達サイクルにわたり、安定かつ機能的であってもよい。

10

【0062】

一部の実施形態では、モノマーの配列に取着された光学標識をそれぞれが有するポリマーを分析するためのデバイスは、以下の要素：（a）第1のチャンバーおよび第2のチャンバーを分離する固相膜内のナノポアアレイであって、ナノポアアレイのナノポアがそれぞれ第1のチャンバーと第2のチャンバーとの間に流体連通を提供し、かつナノポアの異なるクラスターのそれぞれが異なる分解能限界区域内に配置されるように、および各クラスターが、1よりも大きいか、またはゼロよりも大きい平均値を有するランダムな変数で所定の数のナノポアを含むように、クラスターに配置されているナノポアアレイと、（b）ナノポアアレイのナノポアを通して、第2のチャンバーに第1のチャンバー内でポリマーを移動させるための、ポリマー移行システムと、（c）光学標識が分解能限界区域内でナノポアから出て行くときにはいつでも、ポリマーに取着された光学標識によって発生した光学シグナルを収集するための、検出システムとを含む。

20

自己消光性色素および/または消光剤による光学に基づくナノポア配列決定

【0063】

一態様では、本発明には配列決定のための不透明層を有するナノポアアレイの使用および蛍光標識されたポリヌクレオチドの直接照明が含まれる。一部の実施形態では、そのような適用には、蛍光標識されたポリヌクレオチド分析物のヌクレオチドを逐次識別するための、蛍光消光、および蛍光シグナル伝達が含まれる。ポリヌクレオチド分析物のそのような分析は、複数のポリヌクレオチドに関して、同時に並行して、例えば不透明層を含有するナノポアのアレイを使用することによって実施されてもよい。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドに取着している間に少なくとも3つの状態であることが可能な蛍光標識で、ヌクレオチドを標識する：（i）実質的に消光した状態であって、取着された蛍光標識の蛍光が、すぐ隣りに隣接したモノマーの蛍光標識または消光剤との相互作用によって消光した状態；例えば、本発明によるポリヌクレオチドに取着された蛍光標識は、標識されたポリヌクレオチドが、ポリヌクレオチドを研究し、操作するための従来の水溶液または水性緩衝液中で遊離しているとき、実質的に消光している。（ii）立体的に拘束された状態であって、自由溶液の運動または取着された蛍光標識のアライメントが破壊されまたは限定されて、蛍光標識から発生する検出可能な蛍光シグナルがほとんどまたは全くなくなるように、標識されたポリヌクレオチドが、ナノポアを移行している状態。（iii）遷移状態であって、蛍光標識のヌクレオチドがナノポアから出て行くときに（「遷移インターバル」または「インターバル」中）、ポリヌクレオチドに取着された蛍光標識が、立体的に拘束された状態から消光状態に遷移する状態。遷移インターバルの間、（そうでなければ実質的に完全に標識され、自己消光したまたは消光されたポリヌクレオチド上の）蛍光標識は検出可能な蛍光シグナルを発生することができ、しかも、測定されるシグナルに寄与する、出ていく標識の数は、標識されたポリヌクレオチドの通過速度を制御することによって（少なくとも部分的に）制御することができる。通過速度（例えばミリ秒あたりにナノポアを出ていくヌクレオチド）が遷移速度（シグナル可能から消光まで、即ち消光速度）より速い場合には、測定された蛍光シグナル、即ちシグナル試料は、1つより多い標識からの寄与を含み得る。

30

40

50

【 0 0 6 4 】

上記プロセスを裏付けるいかなる理論にも限定するものではないが、遷移インターバルの間に発生した蛍光シグナルは、ナノポアから出現する、蛍光標識の1つまたは複数の自由に回転可能な双極子の存在に起因すると考えられ、そのため蛍光標識は、例えば直接励起後に、またはFRETを介する励起を介して蛍光シグナルを発生させることが可能になる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチド、例えばDNAまたはRNAであるが、特に一本鎖DNAである。一部の実施形態では、本発明は、ポリヌクレオチドがナノポアを通過して移行するときに、蛍光標識が1つずつナノポアから出て行くとき、その蛍光標識により発生したシグナルを記録することによって、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定するための方法を含む。通過速度は測定された蛍光シグナルが実質的に単一の標識のみからの蛍光を含む可能性を最大にするように選択され、そのような選択は操作の間に制御できるパラメーター（ナノポアを横断する電圧、温度など）のリアルタイムの調節によって、または予め決定された装置の設定（例えば反応緩衝液の粘度、イオン濃度など）のいずれかによって行なうことができる。出る際に、取着された蛍光標識のそれぞれは、ナノポアにおける拘束状態から、自由溶液中のポリヌクレオチドでの消光状態へと、遷移インターバルの間に遷移する。遷移インターバルの間、標識は測定できる蛍光シグナルを発生することができる。言い換えれば、一部の実施形態では、方法のステップは、ナノポアにおける拘束状態から自由溶液中のポリマーでの消光状態へと遷移するときに、各蛍光標識を励起することを含んでもよい。上述のように、この遷移インターバルまたは期間の間に、蛍光標識は、それが取着されるヌクレオチドを示す、検出可能な蛍光シグナルを放出することが可能である。

10

20

【 0 0 6 5 】

一部の実施形態では、上記使用される「実質的に消光した」は、蛍光標識が、同じ条件下であるが隣接した互いに消光する標識なくして発生したシグナルから、少なくとも30パーセント低減した蛍光シグナルを発生させることを意味する。一部の実施形態では、上記使用される「実質的に消光した」は、蛍光標識が、同じ条件下であるが隣接した互いに消光する標識なくして発生したシグナルから、少なくとも50パーセント低減した蛍光シグナルを発生させることを意味する。

【 0 0 6 6 】

上記の概念を図4A～4Bに示す。これらの図はナノポア(4002)を通過する標識されたポリヌクレオチド(4000)を図式的に示す。標識されたポリヌクレオチド(4000)は2つの標識「a」および「b」（例えば「a」で標識されたdCおよび「b」で標識されたdA、dGおよびdTなどに対応する）を含む。ナノポア(4002)から遊離しているヌクレオチドの標識は、他の標識(4011)との相互作用によって、または消光剤(図示せず)の作用のいずれかによって消光される。ナノポア(4002)内のヌクレオチドの標識は拘束され、そして/または配向されており(4014)、それによりナノポアを通るその通過の全てまたは一部の間に検出可能なシグナルを発生しない。標識されたポリヌクレオチド(4000)のヌクレオチドがナノポア(4002)の出口(4015)から現れると、これらは励起ビーム(4010)によって励起され、消光される前のインターバルで検出可能なシグナルを発生することができるようになる。通過速度 V_1 が速ければ、消光される前にヌクレオチドが移動する距離(4008)はポリヌクレオチド(4000)のヌクレオチド間の距離を超え、それにより1つより多い標識(図4Aに示す)が検出器(4018)によって収集される蛍光シグナル、即ち測定される蛍光シグナルへの蛍光に寄与し得る。通過速度 V_2 が遅ければ、消光される前にヌクレオチドが移動する距離(4008)はポリヌクレオチド(4000)のヌクレオチド間の距離とほぼ等しいかこれより小さく、それにより1つを超えない標識(図4Bに示す)が検出器(4018)によって収集される蛍光シグナル(即ち測定される蛍光シグナル)への蛍光に寄与し得る。隣接する標識の間の距離は励起光(4010)の回折限界より小さいので標識の順序に関する情報は得られないが、特別のアルゴリズム、例えばAndersonら、米国仮特許出願第62/322343号; Timpら、Biophys. J.、102巻、L37～L39

30

40

50

頁(2012年);Carsonら、Nanotechnology、26巻、074004頁(2015年)を使用してそのような情報を推測するアプローチがある。異なる発光バンドを有する蛍光標識を使用する光学検出の場合には、測定された蛍光シグナルを、例えばバンドパスフィルターを使用して、2つまたはそれより多いチャンネルに分割し、複数の標識からの蛍光の相対的寄与を評価することができる。しかし、蛍光に寄与する蛍光標識の数が例えば3倍、4倍またはそれより多い倍数だけ増加するにつれて、ヌクレオチドの正しい順序を決定することの困難は増加する。2つのチャンネル、例えば2つの蛍光標識の最大発光に対応するシグナル強度を、2つの蛍光標識が測定されたシグナルに寄与する図4A(4031および4032)ならびに単一の蛍光標識が測定されたシグナルに寄与する図4B(4041および4042)に示す。実線、例えば4033で表わされる強度値は標識「a」からのものであり、点線、例えば4036で表わされる強度値は標識「b」からのものである。図4Aの両方のチャンネルにおける実線と点線の存在は、蛍光標識の重なる発光バンドを反映しており、測定された強度の量が両方の標識からのものであるため、これは共に収集した場合に解析を複雑にする。単一の蛍光標識のみが測定されたシグナルに寄与する図4Bでは、強度値は他の標識の重なる発光バンドによる寄与を含まず、したがって標識(およびしたがってヌクレオチド)の決定が容易になる。

10

【0067】

ナノポアを通るポリヌクレオチドの通過速度の役割およびその制御の必要性は、通過する分析物を識別するために電流の変化が使用されるナノポア技術の分野において認識されてきた。通過速度を制御するために広範囲の方法が使用されており、その中には顕著な困難なしにリアルタイムで調節できる方法(例えばナノポアを横断する電圧、温度など)および操作の間に困難さを伴ってのみ調節できる方法(反応緩衝液の粘度、タンパク質ナノポアのポアの中の帯電した側鎖の存在もしくは非存在、反応緩衝液のイオン組成および濃度、ポリヌクレオチド分析物に附着されたまたはハイブリダイズされた速度低減基、分子モーターなど)が含まれる。例えば、Batesら、Biophysical J., 84: 2366-2372(2003);Carsonら、Nanotechnology, 26(7): 074004(2015);Yehら、Electrophoresis, 33(23): 58-65(2012);Meller, J. Phys. Cond. Matter, 15: R581-R607(2003);Luanら、Nanoscale, 4(4): 1068-1077(2012);Keyser, J. R. Soc. Interface, 8: 1369-1378(2011);などであり、これらは参考として本明細書に援用される。一部の実施形態では、本発明の方法を実施する間に通過速度を積極的に制御するための1つまたは複数のステップ、例えば電圧、温度などが含まれる。他の実施形態では、本発明の方法を実施する間に積極的に制御または変動されない、通過速度を決定する1つまたは複数のステップ、例えば反応緩衝液粘度、イオン濃度などが含まれる。後者に関しては、一部の実施形態で1~60パーセントの範囲のグリセロールまたは等価の試薬の濃度を有する反応緩衝液を提供することによって、通過速度が選択される。

20

30

【0068】

前者の実施形態(リアルタイムの通過速度調節)に関しては、1つまたは1つより多い標識が測定されたシグナルへの蛍光に寄与しているか否かの尺度は、蛍光を収集する複数のチャンネルの間の蛍光強度の分布に基づいてもよい。典型的には複数のチャンネルは使用する蛍光標識の発光バンドに対応する2、3、または4つのチャンネルを含む。ナノポアの出口に隣接する領域から放射される蛍光の測定された試料において、単一の標識のみが測定されたシグナルに寄与するならば、異なるチャンネル(例えば4つのチャンネル)の間のシグナル強度の相対的分布は、理想的には(1, 0, 0, 0);(0, 1, 0, 0);(0, 0, 1, 0);または(0, 0, 0, 1)で表わされる。一方、1つより多い標識が測定された蛍光シグナルに寄与した場合には、相対的分布は1つより多いチャンネルにおける非ゼロ値を含み、最悪の場合には4つの異なる標識が同等に寄与して、上の表現で(.25, .25, .25, .25)と表わされる。リアルタイムで通過速度を制御するために、

40

50

相対的強度分布(1, 0, 0, 0); (0, 1, 0, 0); (0, 0, 1, 0); または(0, 0, 0, 1)に対応する最大値と相対的強度分布(.25, .25, .25, .25)に対応する最小値との間で単調に変化し得る尺度を使用することができる。例えば、初期通過速度はその最小値に近かったそのような尺度の値に基づいて低下させることができる。そのような低下は、例えばナノポアを横断する可能な電圧を所定量だけ低下させることによって実施でき、その後で尺度を再計算することができる。プロセスが最適化されるまで、そのようなステップを繰り返すことができる。

【0069】

上述のように、通過速度はナノポアを横断する電圧差(または電場強度)およびポリヌクレオチドが(例えば第1のチャンバーの1つの壁を構成する固相膜の中に配置された)ナノポアに曝される第1のチャンバーの反応混合物または緩衝液の条件に部分的に依存する。ナノポアによるポリヌクレオチドの捕捉速度はそのようなポリヌクレオチドの濃度に依存する。一部の実施形態では、ナノポア配列決定のための従来の反応混合物の条件、例えば1M KCl(またはNaCl、LiClなどの等価な塩)およびpH緩衝システム(これは例えば使用するタンパク質、例えばタンパク質ナノポア、ヌクレアーゼなどが変性しないことを保証する)が、(ナノポアを横断する電圧を変化させることによって通過速度を制御するために)本発明とともに用いられる。一部の実施形態では、pH緩衝システムはpHを6.8~8.8の範囲の値に実質的に一定に保つために使用される。一部の実施形態では、ナノポアを横断する電圧差は70~200mVの範囲であってもよい。他の実施形態では、ナノポアを横断する電圧差は80~150mVの範囲であってもよい。操作のための適切な電圧は従来の測定手法を使用して選択される。ナノポアを横断する電流(または電圧)は市販の装置を使用して容易に測定できる。電圧差は通過速度が所望の範囲内になるように選択される。一部の実施形態では、通過速度の範囲は1秒あたり1000ヌクレオチド未満の速度を含む。別の実施形態では、通過速度の範囲は1秒あたり10~800ヌクレオチドである;別の実施形態では、通過速度の範囲は1秒あたり10~600ヌクレオチドである;別の実施形態では、通過速度の範囲は1秒あたり200~800ヌクレオチドである;別の実施形態では、通過速度の範囲は1秒あたり200~500ヌクレオチドである。同様に、通過速度に影響する他の因子、例えば温度、粘度、イオン濃度、タンパク質ナノポアのポアの中の帯電した側鎖などを選択して、上記の範囲の通過速度を得ることができる。

【0070】

一部の実施形態では、一本鎖核酸のための上記の方法を実施するためのデバイスは、典型的にはナノポア(アレイを含んでもよい)を横断する電場を確立するための一組の電極を提供することを含む。一本鎖核酸は、チャンバー内に陰極を配置することによって積層膜の「シス」側として構成された第1のチャンバー内の電解質(すなわち、反応緩衝液)の中に配置することによってナノポアに曝される。電場を印加すると、陰荷電を有する一本鎖核酸はナノポアに捕捉され、チャンバー内に陽極を配置することによって膜の「トランス」側として構成された積層膜の他の側の第2のチャンバーに通過する。上記の通り、通過速度は、第1および第2のチャンバー内の電解質のイオン強度ならびにナノポアを横断して印加された電圧に部分的に依存する。光学に基づく検出においては、通過速度は、例えば異なる電圧でナノポアあたりに予想される異なる速度でシグナルを発生する標識された一本鎖核酸の所定の標準を使用する予備的較正測定によって選択され得る。したがって、DNA配列決定用途には、初期通過速度はそのような較正測定からのシグナル速度に基づいて選択され得、同様に尺度は上記の相対シグナル強度分布に基づいてもよい。したがって、そのような測定から、例えばナノポアのアレイにわたって信頼できるヌクレオチドの識別が可能になるか最大である電圧が選択され得る。一部の実施形態では、そのような較正は(所定の標準配列の代わりに、またはそれに加えて)分析されるテンプレートの試料からの核酸を使用して行なうことができる。一部の実施形態では、そのような較正は配列決定ランの間にリアルタイムで行なってもよく、印加する電圧は例えばヌクレオチド特異的シグナルの取得を最大にするためにそのような測定に基づいてリアルタイムで改変

10

20

30

40

50

してもよい。

相互消光標識および自己消光標識を用いる実施形態

【0071】

上述のように、一部の実施形態では、ナノポアを出るヌクレオチド上の標識からの発光以外の蛍光の放出を低減するために、消光剤に加えて自己消光および相互消光蛍光標識を使用することができる。そのような蛍光標識の使用は、参照により組み込まれる米国特許出願公開第2016/0122812号に開示されている。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに取着的している間に少なくとも3つの状態であることが可能な蛍光標識で、モノマーを標識する：(i)実質的に消光した状態であって、取着的された蛍光標識の蛍光が、すぐ隣りに隣接したモノマーの蛍光標識消光した状態；例えば、本発明によるポリヌクレオチドに取着的された蛍光標識は、標識されたポリヌクレオチドが、ポリヌクレオチドを研究し、操作するための従来の水溶液中で遊離しているとき、実質的に消光している。(ii)立体的に拘束された状態であって、自由溶液の運動または取着的された蛍光標識のアライメントが破壊されまたは限定されて、蛍光標識から発生する検出可能な蛍光シグナルがほとんどまたは全くなくなるように、標識されたポリヌクレオチドが、ナノポアを移行している状態。(iii)遷移状態であって、ポリヌクレオチドがナノポアを移行しながら、蛍光標識がナノポアから出て行くときに(「遷移インターバル」中)、ポリヌクレオチドに取着的された蛍光標識が、立体的に拘束された状態から消光状態に遷移する状態。

10

【0072】

一部では、この例は、遷移インターバル中に、通常は蛍光標識(そうでなければ実質的に完全に標識され自己消光するポリヌクレオチド上の)が検出可能な蛍光シグナルを発生することが可能であるという発見の適用である。この発見を裏付けるいかなる理論にも限定するものではないが、遷移インターバルの間に発生した蛍光シグナルは、自由に回転可能な双極子起因すると考えられる。この発見を裏付けるいかなる理論にも限定するものではないが、遷移インターバルの間に発生した蛍光シグナルは、ナノポアから出現する、蛍光標識中の自由に回転可能な双極子の存在に起因すると考えられ、そのため蛍光標識は、例えば直接励起後に、またはFRETを介する励起を介して蛍光シグナルを発生させることが一時的に可能になる。立体的拘束された状態ならびに消光状態では、共に、双極子はその回転自由度が限定され、それによって、放出される光子の数が低減しまたは限定される。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドがポリヌクレオチドであり、通常は一本鎖ポリヌクレオチド、例えばDNAまたはRNAであるが、特に一本鎖DNAである。一部の実施形態では、本発明は、ポリヌクレオチドがナノポアを通して移行するときに、取着的された蛍光標識が1つずつナノポアから出て行くとき、その蛍光標識により発生したシグナルを記録することによって、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定するための方法を含む。出る際に、取着的された蛍光標識のそれぞれは、ナノポアにおける拘束状態から、自由溶液中のポリヌクレオチドでの消光状態へと、遷移インターバルの間に遷移する。言い換えれば、一部の実施形態では、本発明の方法のステップは、ナノポア中の拘束状態から自由溶液中のポリヌクレオチド上での消光状態へと遷移するときに、各蛍光標識を励起することを含む。上述のように、この遷移インターバルまたは期間の間に、蛍光標識は、それが取着的されるヌクレオチドを示す、検出可能な蛍光シグナルを放出することが可能である。

20

30

40

【0073】

一部の実施形態では、本発明は、ポリヌクレオチドがナノポアを通して移行する間に、モノマーに取着的された蛍光標識を強制的に拘束状態にして、蛍光標識が検出可能な蛍光シグナルを生成することができなくなる(または実質的にできなくなる)ように、蛍光標識およびナノポアを選択することができる、という発見の適用を含む。一部の実施形態では、ナノポアは、直径が1から4nmの範囲にあるポアまたは管腔を有するように選択され；他の実施形態では、ナノポアは、直径が2から3nmの範囲にあるポアまたは管腔を有するものが選択される。一部の実施形態では、そのようなポアの直径は、タンパク質ナノ

50

ポアによって提供される。一部の実施形態では、そのようなナノポアは、本発明に従って、蛍光標識を強制的に拘束状態にするために使用され、したがって蛍光標識がナノポアから出るときはいつでも、蛍光シグナルを実質的に発生させることができない状態から、放出を誘発させることができる蛍光シグナルによって検出可能で識別可能な状態へと遷移する。このように、ポリヌクレオチドのモノマーの配列のそれぞれに到着された蛍光標識は、ナノポアの出口のすぐ隣りに隣接する領域で（「遷移ゾーン」または「遷移容積」または「検出ゾーン」）蛍光シグナルを突然発生させるので、逐次検出することができる。一部の実施形態では、有機蛍光色素を、上記直径のナノポアとともに蛍光標識として使用する。一部の実施形態では、少なくとも1つのそのような有機蛍光色素は、キサントゲン色素、ローダミン色素、およびシアニン色素からなる組から選択される。ポリヌクレオチドのモノマー配列を決定するための一部の実施形態は、下記のステップ：（a）ナノポアを通過してポリマーを移行させるステップであって、ポリヌクレオチドのモノマーが蛍光標識で標識され、検出可能なシグナルがその中で実質的に発生しないように、ナノポアがそのポア内の蛍光標識を拘束状態に拘束するステップと；（b）ナノポアから出る際、各モノマーの蛍光標識を励起するステップと；（c）検出ゾーンにおいて、出て行く蛍光標識によって発生した蛍光シグナルを測定して、蛍光標識が到着されるモノマーを識別するステップと；（d）検出ゾーンの外で励起された蛍光標識からの蛍光シグナルを消光するステップと；（d）蛍光シグナルの配列からポリヌクレオチドのモノマー配列を決定するステップとで実施される。さらなる実施形態では、蛍光標識はFRET対のアクセプターであり、FRET対の1つまたは複数のドナーが、出口からFRET距離内のナノポアに到着される。

10

20

【0074】

一部の実施形態では、上記使用される「実質的に消光した」は、蛍光標識が、同じ条件下であるが隣接した互いに消光する標識なくして発生したシグナルから、少なくとも30パーセント低減した蛍光シグナルを発生させることを意味する。一部の実施形態では、上記使用される「実質的に消光した」は、蛍光標識が、同じ条件下であるが隣接した互いに消光する標識なくして発生したシグナルから、少なくとも50パーセント低減した蛍光シグナルを発生させることを意味する。

【0075】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、4つの個別の反応を実施することによって決定され、これらの反応では、標的ポリヌクレオチドのコピーが、単一蛍光標識で標識された、その4つの異なる種類のヌクレオチド（A、C、G、およびT）のそれぞれを有する。そのような実施形態の変形例では、標的ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、4つの個別の反応を実施することによって決定され、これらの反応では、標的ポリヌクレオチドのコピーが、1つの蛍光標識で標識されたその4つの異なる種類のヌクレオチド（A、C、G、およびT）のそれぞれを有し、それと同時に、同じ標的ポリヌクレオチドのその他のヌクレオチドは第2の蛍光標識で標識される。例えば、第1の蛍光標識が、第1の反応で標的ポリヌクレオチドのAに到着される場合、第2の蛍光標識は、第1の反応において標的ポリヌクレオチドのC、G、およびT（即ち、「非A」ヌクレオチド）に到着される。同様に、この例の続きとして、第2の反応では、第1の標識は、標的ポリヌクレオチドのCに到着され、第2の蛍光標識は、標的ポリヌクレオチドのA、G、およびT（即ち、「非C」ヌクレオチド）に到着される。以下、ヌクレオチドGおよびTについても同様である。

30

40

【0076】

同じ標識スキームは、ヌクレオチド型のサブセットに関する従来の専門用語の観点から表すことができ；したがって上記例において、第1の反応では、第1の蛍光標識がAに到着され、第2の蛍光標識がBに到着され；第2の反応では、第1の蛍光標識がCに到着され、第2の蛍光標識がDに到着され；第3の反応では、第1の蛍光標識がGに到着され、第2の蛍光標識がHに到着され；第4の反応では、第1の蛍光標識がTに到着され、第2の蛍光標識がVに到着される。

50

【0077】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドまたはペプチドなどのポリマーを、単一の種類のモノマーに取着された単一蛍光標識で標識し、例えば、ポリヌクレオチドの全てのT（または実質的に全てのT）が、蛍光標識、例えばシアニン色素で標識される。そのような実施形態では、ポリヌクレオチドからの蛍光シグナルの収集または配列が、特定のポリヌクレオチドに関するシグネチャーまたはフィンガープリントを形成し得る。一部のそのような実施形態では、そのようなフィンガープリントは、決定されるべきモノマーの配列に関する十分な情報を提供してもしなくてもよい。

【0078】

一部の実施形態では、本発明の特徴は、互いに消光する組のメンバーである蛍光色素または標識による、ポリヌクレオチド分析物の実質的に全てのモノマーの標識付けである。ポリヌクレオチド分析物の標識付けに関連する「実質的に全ての」という用語の使用は、化学的および酵素標識技法が典型的には100パーセント未満で効率的であることを認めることである。一部の実施形態では、「実質的に全ての」は、全てのモノマーの少なくとも80パーセントに蛍光標識が取着されていることを意味する。他の実施形態では、「実質的に全ての」は、全てのモノマーの少なくとも90パーセントに蛍光標識が取着されていることを意味する。他の実施形態では、「実質的に全ての」は、全てのモノマーの少なくとも95パーセントに蛍光標識が取着されていることを意味する。相互に消光する組の蛍光色素には、以下の性質がある：(i)各メンバーは、全てのメンバーの蛍光を消光し（例えば、FRETによってまたは静止もしくは接触機構によって）、(ii)各メンバーは、励起したとき、および非消光状態にあるときに、明確な蛍光シグナルを発生する。即ち、互いに消光する組が2種の色素、D1およびD2からなる場合、(i)D1は自己消光し（例えば、別のD1分子と接触消光することによって）、またD2によって消光し（例えば、接触消光によって）、(ii)D2は自己消光し（例えば、別のD2分子との接触消光によって）、またD1によって消光する（例えば、接触消光によって）。互いに消光する組に関して蛍光色素または標識を選択するための指針は、参照により本明細書に組み込まれる以下の参考文献に見出すことができる：Johansson、Method in Molecular Biology、335巻：17~29頁（2006年）；およびMarrasら、Nucleic Acids Research、30巻：e122（2002年）など。一部の実施形態では、互いに消光する組のメンバーは、芳香環構造などの、相互作用を積み重ねることが可能な成分または部分である有機蛍光色素を含む。例示的な互いに消光する組の蛍光色素または標識は、ローダミン色素、フルオレセイン色素、およびシアニン色素から選択され得る。一実施形態では、互いに消光する組は、ローダミン色素、TAMRA、およびフルオレセイン色素、FAMを含んでもよい。別の実施形態では、互いに消光する組の蛍光色素は、Oregon Green 488、Fluorescein-EX、フルオレセインイソチオシアネート、Rhodamine Red-X、LissamineローダミンB、Calcein、Fluorescein、Rhodamine、1つまたは複数のBODIPY色素、Texas Red、Oregon Green 514、および1つまたは複数のAlexa Fluorからなる群から2種またはそれ超の色素を選択することによって形成されてもよい。代表的なBODIPY色素には、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR、BODIPY 581/591、BODIPY TR、BODIPY 630/650、およびBODIPY 650/665が含まれる。代表的なAlexa Fluorには、Alexa Fluor 350、405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、635、647、660、680、700、750、および790が含まれる。

【0079】

上述のように、一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドのモノマー配列は、標的ポリヌクレオチドのコピーが互いに、または自己消光する蛍光標識で標識された異なる種類のモノマーをそれぞれ有する、個別の反応を実施することによって決定される（それぞれ

10

20

30

40

50

の種類モノマーごとに1つ)。他の実施形態では、標的ポリヌクレオチドのモノマー配列は、標的ポリヌクレオチドのコピーが、同じ互いに消光する組から選択される、異なる互いに消光する蛍光標識で標識された異なる種類のモノマーのそれぞれを有する、個別の反応を実施することによって決定される(それぞれの種類のモノマーごとに1つ)。互いに消光する組が2種の色素のみを含む実施形態では、選択されたモノマー(即ち、モノマーX)は、第1の相互消光色素で標識され、他の全ての種類のモノマー(即ち、非モノマーX)は、同じ組からの第2の互いに消光する色素で標識される。このように、実施形態のステップは、一連の2つの異なる蛍光シグナル、モノマーXを示すシグナルと、非モノマーXを示す別のシグナルを発生させる。

【0080】

一部の実施形態では、単一蛍光標識(例えば、多数の種類モノマーを含むポリヌクレオチド中の、単一の種類モノマーに取着された)は、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドなど、ポリヌクレオチド上の隣接するモノマー(同じ種類の)に取着されたときに自己消光するものが使用されてもよい。例示的な自己消光蛍光標識には、Oregon Green 488、フルオレセイン-EX、FITC、Rhodamine Red-X、LissamineローダミンB、カルセイン、フルオレセイン、ローダミン、BODIPYS、およびTexas Redであって、例えばMolecular Probes Handbook、11版(2010年)に開示されたものが含まれるが、これらに限定されない。

消光剤を用いる実施形態

【0081】

より完全に以下に説明するように、非対称シアニン色素などの多くの周知の有機色素の誘導体、ならびにそのような化合物とオリゴヌクレオチドのコンジュゲートおよび/またはそれらの類似体を含む様々な非蛍光消光剤が本発明とともに使用するために利用可能である。消光剤はシスチャンパー、トランスチャンパー、またはその両方のいずれかに配置することができる。図4Cは、以下の要素:脂質二重層(402)の中に配置されたタンパク質ナノポア(400);バックグラウンド蛍光を防止または低減するための固相膜(406)中の不透明層(408)を有する蛍光標識の落射照明;およびトランスチャンパー(426)内に配置された消光剤(410)を含む実施形態を示す。上記のように、蛍光標識されたヌクレオチド(標識を(422)のように「f」で示す)を含むポリヌクレオチド(420)は、ナノポア(400)を通過してシスチャンパー(424)からトランスチャンパー(426)へと通過する。オリゴヌクレオチド消光剤(410)は、ナノポア(400)から現れるポリヌクレオチド(420)の部分へのオリゴヌクレオチド消光剤(428)のハイブリダイゼーションを可能にする条件(例えば濃度、温度、塩濃度など)の下で、トランスチャンパー(426)内に配置される。ナノポア(400)は、参照により本明細書に組み込まれるHuberら、米国特許公開第2016/0076091号に記載されているように、ナノポアの通過の間に蛍光標識からのシグナルが抑制されるように選択され得る。したがって、標識されたヌクレオチドが領域(428)においてナノポア(400)から現れる際に、これらは抑制されなくなり、シグナルを発生することができる。全てでないにしても大部分の直接照明の形態(例えば非FRET)では、そのような現れた標識はトランスチャンパー(426)内にさらに移動するとともに蛍光を放出し続け、それによりシグナルの収集に大いに貢献する。現れるポリヌクレオチドに結合するトランスチャンパー(426)内の消光剤によって、そのような発光は顕著に低減され、検出ゾーン(428)を画定してそこから収集されたシグナルを解析してポリヌクレオチド(420)に関するヌクレオチド配列情報を得ることができる。一部の実施形態では、標識されたポリヌクレオチドが検出ゾーンを通過して移動するとともに、単一の蛍光標識からの蛍光シグナルが検出時間の間に検出ゾーン(428)から検出される。他の実施形態では、複数の蛍光シグナルが所定の時間の間に検出ゾーン(428)で複数の蛍光標識から収集される。一部の実施形態では、そのような検出時間は、1 msec未満、または0.1 msec未満、または0.01 msec未満である。一部の実施形態では、そのよ

10

20

30

40

50

うな検出時間は、少なくとも0.01 msec、または少なくとも0.1 msec、または少なくとも0.5 msecである。

【0082】

本発明の消光剤には、ナノポア配列決定の条件下で(i)実質的に非蛍光性であり、(ii)一本鎖核酸、特に一本鎖DNAに結合し、(iii)他の分子から非放射的に励起エネルギーを吸収し、これを非放射的に放出する任意の化合物(または化合物の組)が含まれる。一部の実施形態では、消光剤は一本鎖DNAに非共有結合でさらに結合する。より完全に以下に記述されるように、これだけに限らないが、シアニンおよびキサンテン色素などの一般的な合成色素の非蛍光性誘導体を含む様々な消光化合物が本発明とともに使用するために利用可能である。消光性化合物の選択のガイダンスは、参照により本明細書

10

【0083】

一部の実施形態では、消光剤は、蛍光を消光することが知られている重い原子(臭素またはヨウ素など)によって共有結合で修飾された、またはニトロ基もしくはアゾ基などの蛍光を消光することが知られている他の基によって共有結合で修飾された一本鎖DNA結合性色素であってもよい。一本鎖DNAに結合することが知られている色素の例には、Sybr Green (Zipperら、(2004年)、Nucleic Acid Research、32巻(12号))がある。シアニンSybr Green構造へのニトロ、臭素、ヨウ素、および/またはアゾ基の組み込みによって、DNA上に存在するかも知れない蛍光標識を消光

20

【0084】

一部の実施形態では、消光剤は結合部分と1つまたは複数の消光部分とを含む。結合部分には、実質的な配列特異性なしに一本鎖核酸に結合する任意の化合物が含まれ得る。結合部分には、ペプチドもしくはオリゴヌクレオチドまたは修飾されたリンケージおよび/もしくはモノマーを有するいずれかの類似体が含まれ得る。オリゴヌクレオチドおよびその類似体は、二重鎖の形成を介して、または非塩基対のアプタマー結合を介して、ポリヌクレオチドへの結合を提供し得る。一部の実施形態では、結合部分は6~60ヌクレオチドの範囲の長さを有するオリゴヌクレオチドまたはその類似体を含む。そのようなオリゴヌクレオチドまたは類似体は、1つの消光部分または複数の消光部分にコンジュゲート

30

【0085】

オリゴヌクレオチドまたは類似体は単一種として提供され、または異なる配列、したがって異なる結合特異性を有する複数のオリゴヌクレオチドまたは類似体の混合物として提供され得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドまたは類似体はランダム配列ポリマーである。即ち、これらは所与の長さを有するあらゆる可能な配列の混合物として提供される。例えば、そのようなオリゴヌクレオチドまたは類似体は、6マーについては「NNNNNN」、または8マーについては「NNNNNNNN」という式で表わされ、ここでNはA、C、GもしくはT、またはその類似体であってもよい。

40

【0086】

オリゴヌクレオチドに関する「類似体」は、1つまたは複数のヌクレオチド類似体を含むオリゴヌクレオチドを意味する。定義のセクションに記述するように、「ヌクレオチド類似体」は修飾された連結部分、糖部分、または塩基部分を有し得るヌクレオチドである。本発明とともに使用される例示的なオリゴヌクレオチド類似体には、これだけに限らな

50

いが、ペプチド核酸 (PNA)、ロックされた核酸 (LNA) (2'-O-メチルRNA)、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、架橋された核酸 (BNA) などが含まれる。

【0087】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合部分はユニバーサル塩基を含む。即ち、これらは塩基対相互作用を不安定化することなしに4つの天然のヌクレオチドのいずれかを置き換えることができる1つまたは複数のヌクレオチド類似体を含む。ユニバーサル塩基特性を有するヌクレオチド類似体は、参照により本明細書に組み込まれるLoakes、Nucleic Acids Research、29巻(12号)、2437~2447頁(2001年)に記載されている。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合部分には2'-デオキシノシン、7-デアザ-2'-デオキシノシン、2-アザ-2'-デオキシノシン、3-ニトロピロールヌクレオチド、5-ニトロインドールヌクレオチドなどが含まれる。

10

【0088】

一部の実施形態では、消光剤には共同で作用して一本鎖標識ポリヌクレオチドの望ましくない蛍光シグナルを消光する2つまたはそれより多い化合物の組合せが含まれ得る。例えば、消光剤には、標識されたポリヌクレオチドおよび個別に消光剤である二本鎖インターカレーターと二重鎖を形成し得るオリゴヌクレオチド(例えばポリデオキシノシン)が含まれ得る。したがって、ポリデオキシノシンが標識されたポリヌクレオチドに結合する場合にはいつも、得られる二重鎖に消光性インターカレーターが結合して、ポリヌクレオチドからの蛍光シグナルを消光する。

20

【0089】

標識されたポリヌクレオチドの蛍光標識の蛍光シグナルを検出可能に消光することができる任意の合成色素は、本発明の目的のための許容される消光部分である。具体的には、本発明で使用するように、消光部分は、標識されたポリヌクレオチドの蛍光標識の発光バンドと少なくともいくつかのスペクトルの重なりを示す吸収バンドを有する。十分なスペクトルの重なりが存在するならば、この重なりは、消光部分(アクセプター)の極大吸収波長よりも低い、またはより高い波長の発光極大において起こる蛍光標識(ドナー)の発光とともに起こり得る。エネルギー伝達は、ドナーの発光のアクセプターのより高い電子状態への移行を通して起こり得る。当業者は、使用される蛍光標識の発光スペクトルに関して色素の励起バンドを検討することによって、所与の消光部分の有用性を決定することができる。

30

【0090】

典型的には、本発明の蛍光消光は蛍光標識と本発明の消光部分との間の蛍光共鳴エネルギー伝達(FRETまたは電荷移動錯体の形成)を通して起こる。ドナーおよびアクセプター化合物のスペクトルおよび電子的特性は、標識されたポリヌクレオチドの蛍光標識と消光部分との間の分離距離と同様に、観察されるエネルギー伝達の程度に強い影響を有する。分離距離が増加するとともに、蛍光消光の程度は減少する。

【0091】

標識されたポリヌクレオチドに結合した際の色素の極大発光波長が蛍光標識の極大発光波長から十分に分離されている場合には、消光部分は任意選択で蛍光性であってもよい。しかし好ましくは、オリゴヌクレオチドまたは類似体に共有結合でコンジュゲートしている場合には、消光部分は僅かに蛍光性であるか、実質的に非蛍光性である。本明細書において使用する実質的に非蛍光性とは、本明細書の方法のいずれにおいても、記載された分析溶液中における消光部分の蛍光効率が5パーセント未満またはそれに等しく、好ましくは1パーセント未満またはそれに等しいことを意味する。他の実施形態では、共有結合で結合した消光部分は約0.1未満、より好ましくは約0.01未満の量子収率を示す。一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドの消光に付随する蛍光標識の蛍光は、共有結合で結合した消光部分がない場合と同じ蛍光標識に付随する同じオリゴヌクレオチドに対して50%を超えて消光される。別の実施形態では、蛍光標識は標識されていないオリゴヌクレオチドに対して90%を超えて消光される。さらに別の実施形態では、核酸染

40

50

色は標識されていないオリゴヌクレオチドに対して95%を超えて消光される。

【0092】

一部の実施形態では、消光部分はピレン、アンスラセン、ナフタレン、アクリジン、スチルベン、インドールもしくはベンズインドール、オキサゾールもしくはベンズオキサゾール、チアゾールもしくはベンゾチアゾール、4-アミノ-7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール(NBD)、シアニン、カルボシアニン、カルボスチリル、ポルフィリン、サリシレート、アンスラニレート、アズレン、ペリレン、ピリジン、キノリン、クマリン(ヒドロキシクマリン類およびアミノクマリン類ならびにフッ素化されたおよびスルホン化されたそれらの誘導体を含む)(参考として援用されるGeera(1998)の米国特許第5,830,912号、およびWangら(1997)の米国特許第5,696,157号に記載されるような)、ポリアザインダセン(例えば、Hauglandら(1988)の米国特許第4,774,339号;Kangら(1993)の米国特許第5,187,288号;Hauglandら(1993)の米国特許第5,248,782号;Kangら(1993)の米国特許第5,274,113号;Kangら(1995)の5,433,896号;Wuら(1999)の米国特許第6,005,113号であり、全て参考として援用される)、キサントレン、オキサジンもしくはベンズオキサジン、カルバジン(参照により組み込まれるCoreyの米国特許第4,810,636号(1989年))、またはフェナレノンもしくはベンズフェナレノン(参照により組み込まれるBabbらの米国特許第4,812,409号(1989年))であってもよい。

10

【0093】

他の実施形態では、実質的に非蛍光性色素である消光部分には、特にアゾ色素(DABCYLまたはDABSYL色素およびそれらの構造的類似体など)、マラカイトグリーンまたはフェノールレッド、4',5z-ジエテル置換フルオレセイン(米国特許第4,318,846号(1982年))、または非対称シアニン色素消光剤(PCI国際出願WO9937,717(1999年))が含まれる。

20

【0094】

消光部分がキサントレンである実施形態では、合成色素は任意選択でフルオレセイン、ロドール(参照により組み込まれるHauglandらの米国特許第5,227,487号(1993年))、またはローダミンである。本明細書で使用するフルオレセインには、ベンゾ-もしくはジベンゾフルオレセイン類、セミナフトフルオレセイン類、またはナフトフルオレセイン類が含まれる。同様に、本明細書で使用するロドールには、セミナフトロダフルオル類(参照により組み込まれるHauglandらの米国特許第4,945,171号(1990年))が含まれる。キサントレン類には、キサントレン色素のフッ素化誘導体(参照により組み込まれる国際公開第WO97/39064号、Molecular Probes, Inc.(1997年))、およびキサントレン色素のスルホン化誘導体(参照により組み込まれる国際公開第WO99/15517号、Molecular Probes, Inc.(1999年))が含まれる。本明細書で使用するオキサジン類には、レゾルフム類、アミノオキサジノン類、ジアミノオキサジン類、およびそれらのベンゾ置換類似体が含まれる。

30

【0095】

さらなる実施形態では、消光部分は、例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,399,392号に記載されている、1つまたは複数のアミノ窒素原子が芳香族または複素芳香族環システムによって置換された3-および/または6-アミノキサントレンの実質的に非蛍光性の誘導体である。これらの消光色素は典型的には530nmを超える吸収極大を有し、観察できる蛍光をほとんどまたは全く有さず、例えば化学発光体、リン光体、または蛍光体から放出される広いスペクトルの発光を効率的に消光する。一実施形態では、消光色素は置換ローダミンである。別の実施形態では、消光化合物は置換ロドールである。

40

【0096】

さらに他の実施形態では、消光部分は、参照により本明細書に組み込まれる以下の特許

50

、第7,019,129号;第7,109,312号;第7,582,432号;第8,410,025号;第8,440,399号;第8,633,307号;第8,946,404号;第9,018,369号;または第9,139,610号に記載されている、Black Hole Quenchers (商標)化合物(BHQ)として公知の、1つまたは複数の非蛍光消光剤を含んでもよい。

【0097】

さらなる消光部分は、参照により本明細書に組み込まれる以下の米国特許第6,699,975号;第6,790,945号;および第8,114,979号に開示されている。

【実施例】

【0098】

光学に基づくナノポア配列決定法における標的ポリヌクレオチドの通過

本実施例では、例示的な光学に基づくナノポア配列決定法とともに本発明が使用される。例示的な光学に基づくナノポア配列決定法では、少なくとも3つの状態であることが可能な蛍光標識で、標的ポリヌクレオチドのヌクレオチドを標識する:(i)消光した状態であって、取着された蛍光標識の蛍光が、すぐ隣りに隣接したヌクレオチドの蛍光標識によって消光した状態;例えば、ポリヌクレオチドに取着された蛍光標識は、標識されたポリヌクレオチドが、水溶液中で遊離しているとき、消光している。(ii)立体的に拘束された状態であって、自由溶液の運動または取着された蛍光標識のアライメントが破壊されまたは限定されて、蛍光標識から発生する検出可能なシグナルがほとんどまたは全くなくなるように、標識されたポリヌクレオチドが、ナノポアを移行している状態。(iii)遷移状態であって、ポリヌクレオチドがナノポアを移行しながら、蛍光標識がナノポアから出て行くときに(「遷移インターバル」中)、ポリヌクレオチドに取着された蛍光標識が、立体的に拘束された状態から消光状態に遷移する状態。ポリヌクレオチドがナノポアを移行するとき取着された蛍光標識が1つずつナノポアから出て行くとき、その蛍光標識により発生したシグナルを記録することによって、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が決定される。出る際に、取着された蛍光標識のそれぞれは、ナノポアにおける拘束状態から、自由溶液中のポリヌクレオチドでの消光状態へと、遷移インターバルの間に遷移する。この遷移インターバルの間、蛍光標識はそれが取着されたヌクレオチドを示す検出可能な蛍光シグナルを放出することができる。

【0099】

一部の実施形態では、本発明は、以下のステップ:(a)反応混合物中のテンプレート上で5'非相補性テイルを有するプライマーを伸長するステップであって、一本鎖オーバーハングとして伸長された鎖と5'非相補性テイルを含む二本鎖生成物を産生するステップと;(b)第1のチャンパーと第2のチャンパーとを分離してその間に流体連通を提供するナノポア(またはナノポアのアレイ)を提供するステップであって、ナノポアが二本鎖核酸ではなく一本鎖核酸を通過させることができるステップと;(c)第1のチャンパー内に二本鎖生成物を配置するステップと;(d)ナノポアを横断して電場を印加することによって、分離された二本鎖生成物の5'非相補性テイルをナノポアによって捕捉するステップと;(e)ポアおよび出口を有するナノポアを通してポリマー分析物を移行させるステップであって、各ポリマー分析物はモノマーの配列を含み、実質的にそれぞれのモノマーは、隣接するモノマーの蛍光標識がナノポアの外側での互いの自己消光によって消光状態にあるようにかつ蛍光標識が立体的に拘束された状態にあってナノポアの内部で検出可能な蛍光シグナルを発生させることができないように、蛍光標識で標識されているステップと;(f)各蛍光標識を、立体的に拘束された状態から消光状態に遷移するときに、ナノポアの出口で励起して、蛍光標識が取着されるモノマーを示す蛍光シグナルを発生させるようにするステップと;(g)蛍光シグナルを検出してモノマーを識別するステップとを使用する、このようなナノポア配列決定法とともに使用することができる。本明細書で使用される、「実質的にあらゆる」、「実質的に全ての」、または同様の用語は、モノマー、特にヌクレオチドの標識付けについて言及する場合、化学的標識手順は全てのモ

10

20

30

40

50

ノマーの完全な標識化をもたらさなくてもよいと理解され；実施可能な程度まで、これらの用語は、本発明に関連した標識反応が終了するまで継続されると理解され；一部の実施形態では、そのような完全な標識反応は、モノマーの少なくとも50パーセントを標識することを含み；他の実施形態では、そのような標識反応は、モノマーの少なくとも80パーセントを標識することを含み；他の実施形態では、そのような標識反応は、モノマーの少なくとも95パーセントを標識することを含み；他の実施形態では、そのような標識反応は、モノマーの少なくとも99パーセントを標識することを含む。

【0100】

上記の方法の一部の実施形態では、蛍光標識は、FRET対のメンバーである。FRET対は一般に、1つまたは複数のFRETドナーおよび1つまたは複数のFRETアクセプターであり、各ドナーは各アクセプターとFRET反応することが可能である。一態様において、上記内容は、FRET対のドナーが、アクセプターの吸収スペクトルに実質的に重なる放出スペクトルを有することを意味する。別の態様では、ドナーおよびアクセプターの遷移双極子は、効率的なエネルギー伝達が可能になるように整列されなければならない。一部の態様において、本発明は部分的には、ナノポアの蛍光、特にFRET抑制特性の発見および理解と、この特性を、ナノポアを通して移行する標識ポリマーの検出が可能になるように適用することに基づく。ナノポアは、ナノポアを通して移行する間にFRET対標識がFRET相互作用に関与するよう配向することができないように寸法決めされた、ポアを持つものが選択されてもよいと考えられるが、本発明はそれによって限定されるものではない。ナノポアのポアにおけるポリヌクレオチドの標識の双極子は、ナノポアの限定された直径に基づいてそれらの回転自由度が拘束される。ナノポアに附着された対応するFRET対のアライメントとの双極子のアライメントのこの低減は、FRET効率を劇的に限定する。標識されたポリヌクレオチドは、ポリマー（例えば、ポリヌクレオチド）上のFRETアクセプターまたはドナーが回転自由度を再び得てFRET事象が可能になる点で、ナノポアから出た後に、FRET相互作用に関与することができる。

【0101】

定義

「FRET」または「Forsterまたは蛍光共鳴エネルギー伝達」は、励起されたドナーフルオロフォアから基底状態のアクセプターフルオロフォアへの非放射双極子-双極子エネルギー伝達メカニズムを意味する。FRET相互作用におけるエネルギー伝達の速度は、ドナーの放出スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルとのスペクトルの重なり程度、ドナーの量子収率、ドナーおよびアクセプターの遷移双極子の相対的な配向、ならびにドナー分子とアクセプター分子との間の距離に依存し、Lakowitz、Principles of Fluorescence Spectroscopy、第3版、(Springer、2006年)がある。特定の目的のFRET相互作用は、アクセプターに伝達され、次にそのドナーを励起する光の周波数よりも低い周波数で、光子としてアクセプターにより放出される、エネルギーの一部をもたらすものである（即ち、「FRETシグナル」）。「FRET距離」は、FRET相互作用を引き起こすことができ、かつ検出可能なFRETシグナルがFRETアクセプターによって生成される、FRETドナーとFRETアクセプターとの間の距離を意味する。

【0102】

「キット」は、本発明の方法を実施する材料または試薬を送達するための、任意の送達システムを指す。反応アッセイの文脈において、そのような送達システムは、1つの場所から別の場所への、反応試薬（例えば、適切な容器内の、互いに消光する蛍光標識、蛍光標識連結剤、酵素などの蛍光標識）および/または支持材料（例えば、緩衝剤、アッセイを行うために文書にされた取扱説明書など）の貯蔵、輸送、または送達を可能にするシステムを含む。例えばキットは、関係のある反応試薬および/または支持材料を含有する1つまたは複数のエンクロージャー（例えば、ボックス）を含む。そのような内容物は、一緒にまたは別々に、意図される受取人に送達される。例えば、第1の容器には、アッセイで使用される酵素が入っていてもよく、一方、第2のまたはそれ超の容器には、互いに消

10

20

30

40

50

光する蛍光標識が入っていてもよい。

【0103】

「ナノポア」は、基材が所定のまたは識別可能な順序で分析物を通る、またはポリマー分析物の場合、そのモノマー単位が所定のまたは識別可能な順序で基材を通るのを可能にする、基材に位置決めされた任意の開口を意味する。後者の場合、所定のまたは識別可能な順序は、ポリマー中のモノマー単位の一次配列であってもよい。ナノポアの例には、タンパク質様またはタンパク質ベースのナノポア、合成または固体状態のナノポア、およびタンパク質ナノポアがその内部に埋め込まれている固体状態のナノポアを含むハイブリッドナノポアが含まれる。ナノポアは、内径が1~10nmまたは1~5nmまたは1~3nmであってもよい。タンパク質ナノポアの例には、アルファ-溶血素、電圧依存性ミトコンドリアポリン(VDAC)、OmpF、OmpC、MspA、およびLamB(マルトポリン)、例えば、参照により本明細書に組み込まれるRhee, M.ら、Trends in Biotechnology、25巻(4号)(2007年):174~181頁; Bayleyら(前掲); Gundlachら、米国特許公開第2012/0055792号などに開示されているものが含まれるが、これらに限定されない。単一核酸分子の通過を可能にする任意のタンパク質ポアを用いてもよい。ナノポアタンパク質は、ポアの外側の特定の部位で、またはポア形成タンパク質を構成する1つまたは複数のモノマー単位の外側の特定の部位で標識されてもよい。ポアタンパク質は、アルファ-溶血素、MspA、電圧依存性ミトコンドリアポリン(VDAC)、アンスラックスポリン、OmpF、OmpC、およびLamB(マルトポリン)などであるがこれらに限定されないタンパク質の群から選択される。固体状態のホールへのポアタンパク質の一体化は、帯電したポリマーをポアタンパク質に取着することによって実現される。電場を印加した後、帯電した複合体を、電気泳動によって固体状態のホールに引き込む。合成ナノポアまたは固体状態のナノポアは、様々な形態の固体基材中に創出されてもよく、その例には、シリコン(例えば、Si₃N₄、SiO₂)、金属、金属酸化物(例えば、Al₂O₃)、プラスチック、ガラス、半導体材料、およびこれらの組合せが含まれるがこれらに限定されない。合成ナノポアは、脂質二重層膜内に位置決めされた生物学的タンパク質ポアよりも安定と考えられる。合成ナノポアは、重合エポキシなどであるがこれに限定されない適切な基材に埋め込まれたカーボンナノチューブを使用することによって、創出されてもよい。カーボンナノチューブは、均一で十分定められた化学的および構造的性質を有することができる。1から100ナノメートルに及ぶ様々なサイズのカーボンナノチューブを得ることができる。カーボンナノチューブの表面電荷は、約ゼロであることが公知であり、その結果、ナノポアを通る核酸の電気泳動輸送は単純かつ予測可能になる(Ito, T.ら、Chem. Commun. 12巻(2003年):1482~83頁)。合成ナノポアの基材表面は、タンパク質ポアの共有結合による取着が可能になるようにまたは表面特性を光学ナノポア配列決定に適切なものにするように、化学修飾されてもよい。そのような表面修飾は、共有結合または非共有結合にすることができる。ほとんどの共有結合による修飾は、オルガノシラン堆積を含み、それに関する最も一般的なプロトコールが記述されている: 1) 水性アルコールからの堆積。これはシリル化表面を調製するための最も容易な方法である。95%エタノール-5%水の溶液を、酢酸でpH4.5~5.5に調節する。シランを、攪拌しながら添加して、2%の最終濃度が得られる。加水分解およびシラノール基形成の後、基材を2~5分間添加する。濯いだ後、過剰な材料は、エタノール中に短時間浸漬することによってなくなる。シラン層の硬化は、摂氏110度で5~10分である。2) 気相堆積。乾燥非プロトン性条件下、化学気相堆積法によって、シランを基材に付着させることができる。これらの方法は、単層堆積が容易である。閉鎖チャンバーのデザインで、5mmの蒸気圧が達成されるような十分な温度に基材を加熱する。あるいは、シランの蒸発が観察されるまで、真空を印加することができる。3) スピンオン堆積。スピンオン付着は、最大源の官能化および多層堆積が好まれる加水分解条件下で、または単層堆積が好まれる乾燥条件下で行うことができる。一部の実施形態では、単一ナノポアが本発明では用いられる。他の実施形態では、複数のナノポアが用いられる。後者の実

10

20

30

40

50

施形態のいくつかでは、複数のナノポアを、ナノポアのアレイとして用い、これらは固相膜などの平面基材に通常は堆積される。ナノポアアレイのナノポアは、規則的に、例えば直線的なパターンで、間隔を空けて配置されてもよく、またはランダムに間隔を空けて配置されてもよい。好ましい実施形態では、ナノポアは、平面状の固相基材において、直線上のパターンとして規則的に間隔を空けて配置される。

【0104】

「ナノ構造」(「ナノスケール構造」および「ナノスケール特徴」と交換可能に使用される)は、数ナノメートルから数百ナノメートルの範囲内、例えば1から1000ナノメートルの範囲内にある少なくとも1つの寸法を有する構造を意味する。いくつかの適用例では、そのような範囲は2から500ナノメートルであり;他の適用例では、そのような範囲は3から500ナノメートルである。ナノ構造の形状および幾何学的形状は、広く様々であってもよく、ナノポア、ナノウェル、ナノ粒子、および反応のシーケンスを実施するのに特に適した任意のその他の都合のよい形状を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、ナノ構造は、固相膜に動作可能に関連付けられたタンパク質ナノポアであってもよい。ナノポアおよびナノウェルなどのいくつかのナノ構造は、ナノポアまたはナノウェルのアレイが形成されるよう、固相膜またはその他の固体などのより大きい共通基材に形成されてもよい。特定の目的のナノ構造は、化学的、物理的(例えば、FRET)、酵素的、および/もしくは結合反応、またはそのような反応のシーケンスを支持するか、または含有することが可能なものである。一部の実施形態では、ナノウェルなどのナノ構造は、1ナノリットル(10^{-9} リットル)未満、1ピコリットル未満、または1フェムトリットル未満の体積を取り囲む。他の実施形態では、個々のナノウェルのそれぞれは、1000zeptoliter未満、100zeptoliter、80zeptoliter、または50zeptoliter未満、または1zeptoliter未満、またはさらに100ヤクトリットル未満の体積を提供する。一部の実施形態では、ナノウェルは、ゼロモード導波路を含む。

【0105】

ペプチドについて言及する際の、「ペプチド」、「ペプチド断片」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、または「断片」は、本明細書では同義に使用され、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸残基の単一の非分岐鎖を構成する化合物を指す。ペプチドまたはポリペプチド中のアミノ酸は、ポリエチレングリコール、色素、ビオチン、ハプテン、または同様の部分を含むがこれらに限定されない様々な部分により誘導体化されてもよい。タンパク質またはポリペプチドまたはペプチド中のアミノ酸残基の数は、広く様々であってもよく;しかし一部の実施形態では、本明細書で言及するタンパク質またはポリペプチドまたはペプチドは、2から70個のアミノ酸残基を有していてもよく;他の実施形態では、2から50個のアミノ酸残基を有していてもよい。他の実施形態では、本明細書で言及されるタンパク質またはポリペプチドまたはペプチドは、数十個のアミノ酸残基、例えば20個から、最大で千個またはそれ超のアミノ酸残基、例えば1200個までのアミノ酸残基を有していてもよい。さらに他の実施形態では、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、もしくはそれらの断片は、10から1000個のアミノ酸残基を有していてもよく;またはそれらは20から500個のアミノ酸残基を有していてもよく;またはそれらは20から200個のアミノ酸残基を有していてもよい。

【0106】

「ポリマー」は、直鎖状に接続された複数のモノマーを意味する。通常、ポリマーは、複数のタイプのモノマーを、例えばA、C、G、およびTを含むポリヌクレオチドとして、または複数の種類のアミノ酸を含むポリペプチドとして含む。モノマーは、ヌクレオシドおよびその誘導体または類似体、ならびにアミノ酸およびその誘導体および類似体を、限定することなく含んでいてもよい。一部の実施形態では、ポリマーは、ヌクレオシドモノマーがホスホジエステル結合によって接続されているポリヌクレオチド、またはその類似体である。

【0107】

10

20

30

40

50

「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」は交換可能に使用され、それぞれヌクレオチドモノマーの直鎖状ポリマーを意味する。ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドを構成するモノマーは、Watson-Crick型の塩基対合、塩基スタッキング、またはHoogsteenもしくは可逆的Hoogsteen型の塩基対合などの、モノマー間相互作用の規則的なパターンを経て天然のポリヌクレオチドに特異的に結合することが可能である。そのようなモノマーおよびそれらのヌクレオチド間連結は、天然に生じてもよく、またはその類似体、例えば、天然に存在するか、または天然に存在しない類似体であってもよい。天然に存在しない類似体は、PNA、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結、およびフルオロフォアまたはハプテンなどの標識の取着を可能にする連結基を含有する塩基などを含んでいてもよい。オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの使用に際してポリメラーゼによる伸長またはリガーゼによるライゲーションなどの酵素処理を必要とするときにはいつでも、当業者には、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドがそれらの場合に任意のまたはいくつかの位置でヌクレオチド間連結、糖部分、または塩基の類似体を含有しなくてもよいことを理解するであろう。ポリヌクレオチドは、典型的にはそのサイズが、それらが通常「オリゴヌクレオチド」と呼ばれる場合には、数モノマー単位、例えば5~40単位から、数千モノマー単位に及ぶ。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、「ATGCTG」などの文字(大文字または小文字)の配列によって表される場合はいつでも、ヌクレオチドは左から右に5' 3'の順序であり、文脈から他に指示されずまたは明らかにされない限り、「A」はデオキシアデノシンを示し、「C」はデオキシシチジンを示し、「G」はデオキシグアノシンを示し、「T」はチミジンを示し、「I」はデオキシイノシンを示し、「U」はウリジンを示すことが理解されよう。他に記述されない限り、専門用語および原子付番規則は、StrachanおよびRead、Human Molecular Genetics 2 (Wiley-Liss、New York、1999年)に開示されたものに従うことになる。通常、ポリヌクレオチドは、ホスホジエステル結合によって連結された4種の天然ヌクレオチド(例えば、DNAに関してはデオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシン、デオキシチミジンであり、またはRNAに関してはそれらのリボース対応物である)を含み;しかし、それらは、例えば修飾された塩基、糖、またはヌクレオチド間の結合を含む非天然ヌクレオチド類似体を含んでいてもよい。酵素が、活性に関して特定のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド基材要件、例えば一本鎖DNA、またはRNA/DNA二重鎖などを有する場合、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド基材に適切な組成物の選択は、特にSambrookら、Molecular Cloning、第2版(Cold Spring Harbor Laboratory、New York、1989年)などの論文および同様の参考文献による指針により、十分に当業者の知識の範囲内にあることは、当業者には明らかである。同様に、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、一本鎖の形態または二本鎖の形態(即ち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの二重鎖と、そのそれぞれの相補体)を指してもよい。どの形態が意図されるのかまたは両方の形態が意図されるのか否かは、用語の使用の文脈から、当業者には明らかであろう。

【0108】

「プライマー」は、ポリヌクレオチドテンプレートとの二重鎖の形成に際して、核酸合成の開始点として作用することができ、その3'末端からテンプレートに沿って伸長されて、それにより伸長された二重鎖を形成することができる、天然または合成のオリゴヌクレオチドを意味する。プライマーの伸長は、通常、DNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼなどの核酸ポリメラーゼによって行なわれる。伸長プロセスにおいて添加されるヌクレオチドの配列は、テンプレートポリヌクレオチドの配列によって決定される。通常、プライマーはDNAポリメラーゼによって伸長される。プライマーは通常、14~40ヌクレオチドの範囲、または18~36ヌクレオチドの範囲の長さを有する。プライマーは種々の核酸増幅反応、例えば単一のプライマーを使用する直線的増幅反応、または2つもしくはそれより多いプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応に用いられる。特定の用

10

20

30

40

50

途のためのプライマーの長さおよび配列の選択のガイダンスは、参照により組み込まれる以下の参考文献：Dieffenbach編、PCR Primer:A Laboratory Manual、第2版（Cold Spring Harbor Press、New York、2003年）で証明されるように、当業者には周知である。

【0109】

ポリヌクレオチドに言及する際の「配列決定」、「配列決定すること」または「ヌクレオチド配列を決定すること」または同様の用語は、ポリヌクレオチドの部分的ならびに完全な配列情報の決定を含む。すなわち、上記用語は、4種の天然ヌクレオチド、A、C、G、およびTの全ての組のサブセットの配列、例えば標的ポリヌクレオチドのAおよびCのみの配列などを含む。即ち用語は、標的ポリヌクレオチド内のヌクレオチドの4つのタイプの1つ、2つ、3つ、または全ての同一性、順序、および場所を決定することを含む。一部の実施形態では、用語は、標的ポリヌクレオチド内のヌクレオチドの4つのタイプの2つ、3つ、または全ての同一性、順序、および場所を決定することを含む。一部の実施形態では、配列決定は、標的ポリヌクレオチド「c a t c g c . . .」内のヌクレオチドの単一タイプ、例えばシトシンの、順序および場所を識別することによって実現されてもよく、したがってその配列は、「c - (非c) (非c) c - (非c) - c . . .」などを表すバイナリーコード、例えば「100101 . . .」として表されるようになる。一部の実施形態では、用語は、標的ポリヌクレオチドのフィンガープリントとしての役割をする標的ポリヌクレオチドの配列を含んでもよく；即ち、一組のポリヌクレオチド内の標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリヌクレオチドのクラスを独自に識別する配列であり、例えばセルによって表される全ての異なるRNA配列である。

10

20

【0110】

本開示は、記述される特定の形態の範囲を限定するものではなく、本明細書に記述される変形例の代替例、修正例、および均等物を包含するものとする。さらに、本開示の範囲は、本開示に鑑み当業者に明らかになり得るその他の変形例を、完全に包含する。本発明の範囲は、添付される特許請求の範囲によってのみ限定される。

【図 1 A】

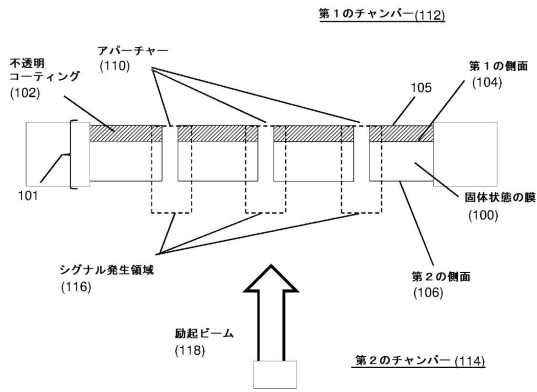


Fig. 1A

【図 1 B】

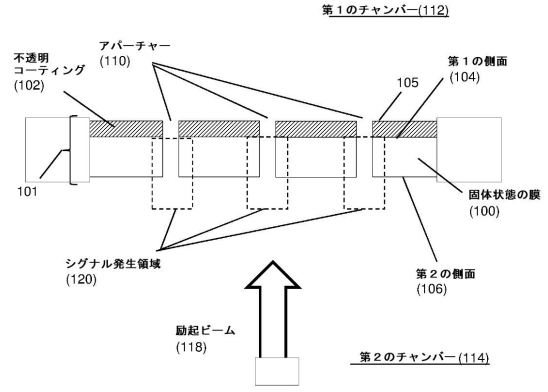


Fig. 1B

【図 1 C】

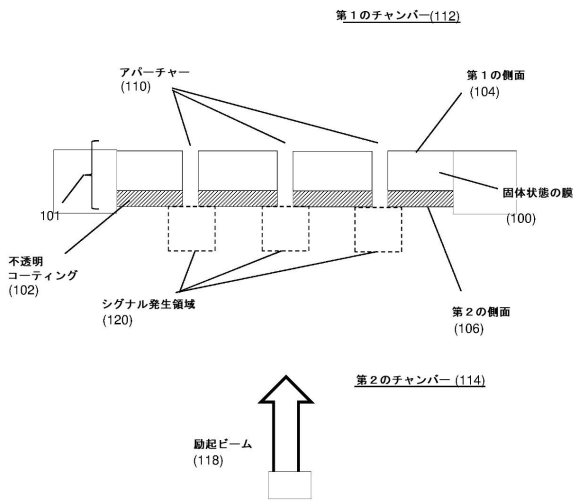


Fig. 1C

【図 1 D】

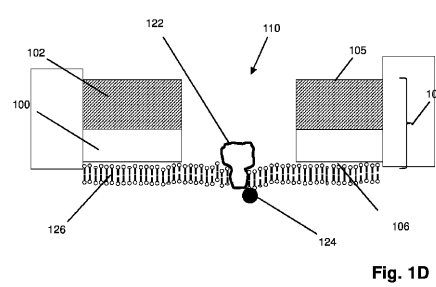


Fig. 1D

【図 1 E】

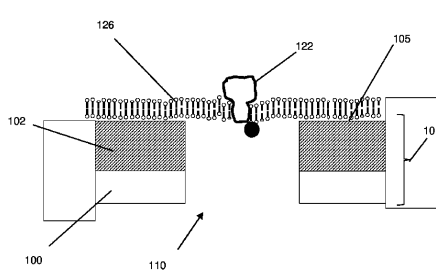


Fig. 1E

【図 1 F】

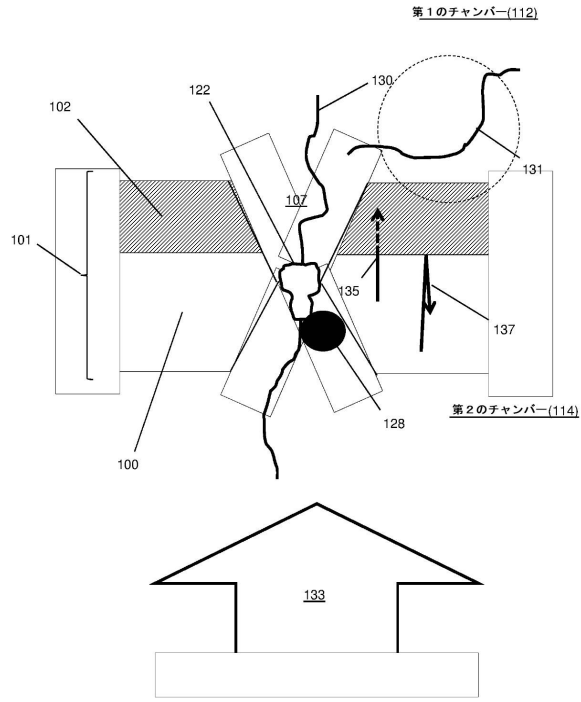


Fig. 1F

【図 1 G】

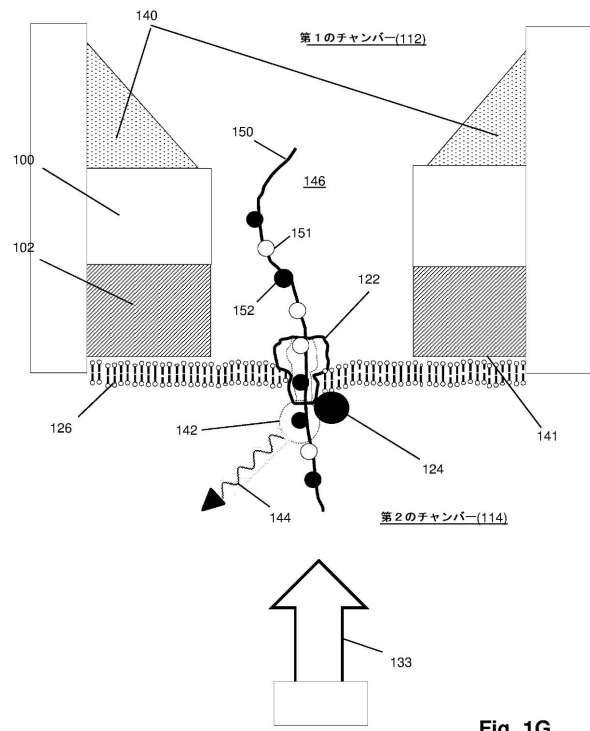


Fig. 1G

【図 1 H】

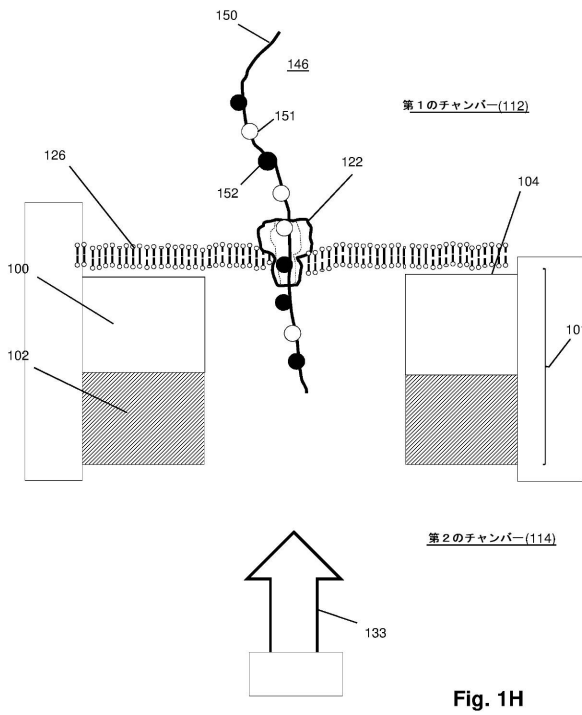


Fig. 1H

【図 2 A】

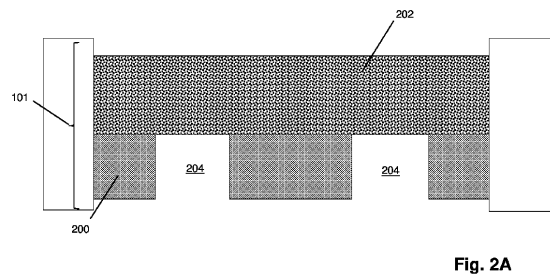


Fig. 2A

【図 2 B】

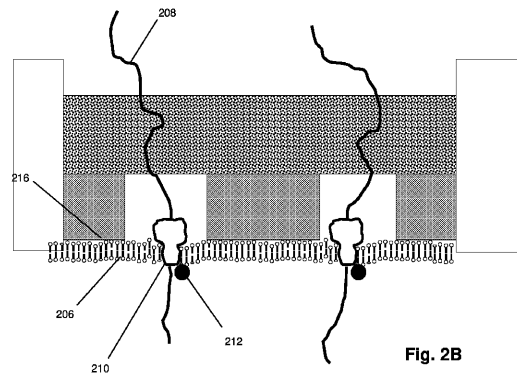


Fig. 2B

フロントページの続き

- (72)発明者 コスロバー, ダニエル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025, メンロ パーク, アダムス ドライブ 14
55, スイート 1081
- (72)発明者 アンダーソン, ブレット エヌ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025, メンロ パーク, アダムス ドライブ 14
55, スイート 1081

審査官 野村 英雄

- (56)参考文献 米国特許第08278055(US, B2)
国際公開第2009/022152(WO, A1)
米国特許出願公開第2006/0019247(US, A1)
国際公開第2011/040996(WO, A1)
米国特許出願公開第2012/0135410(US, A1)
国際公開第2014/190322(WO, A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 3/00
C12N 15/00 - 15/90
C12M 1/00 - 3/10
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
PubMed