

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-505414
(P2018-505414A)

(43) 公表日 平成30年2月22日(2018.2.22)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)	
GO 1 N	27/00 (2006.01)	GO 1 N	27/00	Z 2 G O 6 0
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A 4 B O 6 3
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68	A
GO 1 N	33/53 (2006.01)	GO 1 N	33/53	M

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 54 頁)

(21) 出願番号 特願2017-540801 (P2017-540801)
 (86) (22) 出願日 平成28年2月2日 (2016.2.2)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年9月15日 (2017.9.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/016233
 (87) 国際公開番号 W02016/126746
 (87) 国際公開日 平成28年8月11日 (2016.8.11)
 (31) 優先権主張番号 62/111,075
 (32) 優先日 平成27年2月2日 (2015.2.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516331111
 ツー ポア ガイズ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 95060 カリフォルニア州 サンタクルーズ デラウェア アベニュー 2161 #ビー
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サンプルバックグラウンドからの標的ポリヌクレオチドのナノ細孔検出方法

(57) 【要約】

本明細書では、標的ポリヌクレオチドの増幅およびナノ細孔デバイスでの検出によって、混合サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出するための方法および組成物が開示される。

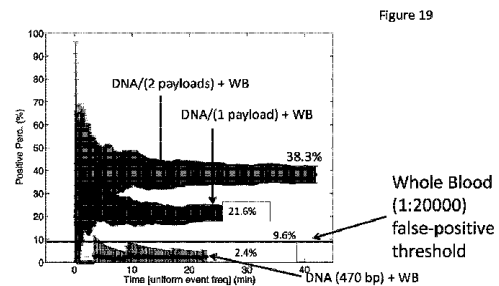
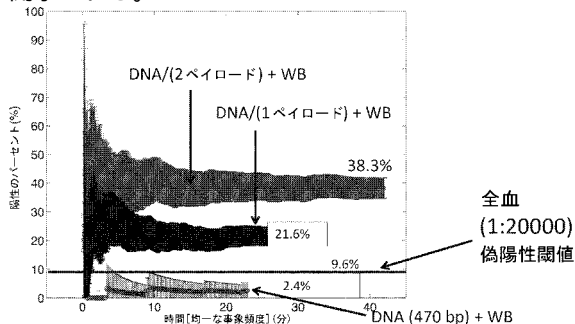


Figure 19

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプル中に存在すると予想される標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出するための方法であって、以下の段階を含む方法：

プライマーのセットを提供する段階であって、該プライマーの少なくとも1つが、該標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつ該プライマーの少なくとも1つが、ペイロード分子に特異的に結合することができるコンジュゲーション部位を含むように修飾されている、段階；

増幅反応により生成される、該標的ポリヌクレオチド配列を含むアンプリコンが、該コンジュゲーション部位を含むように、該サンプルに対して該増幅反応を実施する段階であって、該サンプルが該プライマーセットおよび増幅用の試薬を含む、段階；

該ペイロード分子を該コンジュゲーション部位に結合させる段階；

ナノ細孔を含むデバイスに該サンプルを投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分ける、段階、および、1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように該デバイスを構成する段階であって、該デバイスが、ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、段階；ならびに

ペイロード分子に結合した標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過したかどうかを、該センサからのデータを用いて判定することによって、該サンプル中の標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出する段階。

【請求項 2】

前記サンプルが、前記増幅前に前記デバイスに投入される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記サンプルが、前記増幅後に前記デバイスに投入される、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

前記ペイロード分子が、前記増幅後に前記アンプリコンのコンジュゲーション部位に結合する、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

前記ペイロード分子が、前記増幅前に前記プライマーのコンジュゲーション部位に結合する、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

前記サンプルが、前記増幅とナノ細孔内での前記検出との間に精製ステップを経ない、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

前記サンプルが、少なくとも1：20000、1：10000、1：5000、1：2000、1：1000、1：500、1：200、1：100、1：50、1：20、1：10、1：5、1：2、1：1.5、1：1.2、1：1.1または1：1.05の希釈率で前記ナノ細孔デバイスに投入される、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

前記サンプルが希釈せずに前記ナノ細孔デバイスに投入される、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

前記サンプルが、非標的ポリヌクレオチドおよび増幅反応試薬を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

前記ナノ細孔の直径が少なくとも5nm、10nm、20nm、30nm、40nm、または50nmである、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

前記増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写PCR、ライゲーション媒介PCR、ループ介在増幅(LAMP)、等温増幅、鎖置換増幅(SDA)、多重置換増幅、鎖置換増幅、ヘリカーゼ依存性増幅、ニッキング酵素増幅反応、または組換えポリメラーゼ増幅からなる群

10

20

30

40

50

より選択される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

前記増幅反応が前記デバイスの内部空間で行われる、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

標的ポリヌクレオチドが、二本鎖デオキシリボ核酸(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、ペプチド核酸(PNA)、一本鎖リボ核酸(ssRNA)、DNA/RNAハイブリッド、または二本鎖リボ核酸(dsRNA)を含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

標的ポリヌクレオチドが天然に存在するポリヌクレオチドである、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項15】

標的ポリヌクレオチドが人工的に合成されたポリヌクレオチドである、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

標的ポリヌクレオチドが組換えポリヌクレオチドである、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

前記ペイロード分子が、 dendリマー、二本鎖DNA、一本鎖DNA、DNAアプタマー、フルオロフォア、タンパク質、抗体、ポリペプチド、ナノビーズ、ナノロッド、ナノチューブ、ナノ粒子、フラーレン、PEG分子、リボソーム、またはコレステロール-DNAハイブリッドからなる群より選択される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項18】

前記ペイロード分子が電荷を含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

前記荷電したペイロード分子が、ペプチド、アミノ酸、荷電ナノ粒子、合成分子、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、金属、またはイオンからなる群より選択される、請求項18記載の方法。

【請求項20】

標的ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出の感度または特異度が、該標的ポリヌクレオチドを荷電ペイロード分子に結合させた場合に、未結合の標的ポリヌクレオチドと比較して増加する、請求項18記載の方法。

30

【請求項21】

標的ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出の感度または特異度が、該標的ポリヌクレオチドを前記ペイロード分子に結合させた場合に、未結合の標的ポリヌクレオチドと比較して増加する、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

前記2つの容積の間に電圧差を印加し、かつ該2つの容積を分けるナノ細孔を流れる電流を測定して、電流事象シグネチャを生成するように構成された電極対を、前記センサを含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項23】

ペイロードに結合した標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過するときに生成される電流事象シグネチャが、その平均深度、最大深度、持続時間、深度レベル数、深度面積と持続時間、またはノイズレベルによって、バックグラウンド分子の電流事象シグネチャから識別可能である、請求項22記載の方法。

【請求項24】

前記コンジュゲーション部位とペイロード分子が共有結合を介して結合される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項25】

前記共有結合がクリックケミストリーによって形成される、請求項24記載の方法。

50

- 【請求項 26】
前記クリックケミストリーが銅触媒による、請求項25記載の方法。
- 【請求項 27】
前記クリックケミストリーが銅フリーである、請求項25記載の方法。
- 【請求項 28】
前記コンジュゲーション部位とペイロード分子が非共有結合を介して結合される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 29】
前記非共有結合が、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、極性結合、カチオン- 相互作用、平面スタッキング相互作用、または金属結合である、請求項28記載の方法。 10
- 【請求項 30】
前記コンジュゲーション部位が前記プライマーの3'末端または5'末端に位置する、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 31】
前記コンジュゲーション部位が前記アンプリコンの3'末端または5'末端に位置する、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 32】
前記コンジュゲーション部位が、化学基、反応基、小分子、またはペプチドを含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。 20
- 【請求項 33】
前記小分子がビオチンを含む、請求項32記載の方法。
- 【請求項 34】
前記反応基がジベンゾシクロオクチル(DBCO)またはアジドを含む、請求項32記載の方法。
- 【請求項 35】
2つ以上のペイロード分子が前記アンプリコンに結合される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 36】
前記デバイスが少なくとも2つのナノ細孔を直列に含み、かつ、前記ペイロード分子に結合した前記アンプリコンが、移動中に該少なくとも2つのナノ細孔内に同時に存在する、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。 30
- 【請求項 37】
サンプル中に存在すると予想される標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出するための方法であって、以下の段階を含む方法：
プライマーのセットを提供する段階であって、該プライマーの少なくとも1つが、該標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつ該プライマーの少なくとも1つがペイロード分子に結合されている、段階；
増幅反応により生成される、該標的ポリヌクレオチド配列を含むアンプリコンが、該ペイロード分子に結合されるように、該サンプルに対して該増幅反応を実施する段階であって、該サンプルが該プライマーセットおよび増幅用の試薬を含む、段階； 40
ナノ細孔を含むデバイスに該サンプルを投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分ける、段階、および、1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように該デバイスを構成する段階であって、該デバイスが、ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、段階；ならびに
ペイロード分子に結合した標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過したかどうかを、該センサからのデータを用いて判定することによって、該サンプル中の標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出する段階。
- 【請求項 38】
前記サンプルが、前記増幅前に前記デバイスに投入される、請求項37記載の方法。 50

- 【請求項39】
前記サンプルが、前記増幅後に前記デバイスに投入される、請求項37記載の方法。
- 【請求項40】
前記サンプルが、前記増幅とナノ細孔内での前記検出との間に精製ステップを経ない、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項41】
前記サンプルが、1：10000、1：1000、1：500、1：200、1：100、1：50、1：20、1：10、1：5、1：2、1：1.5、1：1.2、1：1.1または1：1.05の希釈率で前記ナノ細孔デバイスに投入される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項42】 10
前記サンプルが希釈せずに前記ナノ細孔デバイスに投入される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項43】
前記サンプルが非標的ポリヌクレオチドおよび増幅反応試薬を含む、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項44】
前記ナノ細孔の直径が少なくとも5nm、10nm、20nm、30nm、40nm、または50nmである、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項45】 20
前記増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写PCR、ライゲーション媒介PCR、ループ介在増幅(LAMP)、等温増幅、鎖置換増幅(SDA)、多重置換増幅、鎖置換増幅、ヘリカーゼ依存性増幅、ニッキング酵素増幅反応、または組換えポリメラーゼ増幅からなる群より選択される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項46】
前記増幅反応が前記デバイスの内部空間で行われる、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項47】
標的ポリヌクレオチドが、二本鎖デオキシリボ核酸(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、ペプチド核酸(PNA)、一本鎖リボ核酸(ssRNA)、DNA/RNAハイブリッド、または二本鎖リボ核酸(dsRNA)を含む、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。 30
- 【請求項48】
標的ポリヌクレオチドが天然に存在するポリヌクレオチドである、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項49】
標的ポリヌクレオチドが人工的に合成されたポリヌクレオチドである、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項50】
標的ポリヌクレオチドが組換えポリヌクレオチドである、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項51】 40
ペイロード分子が、 dendリマー、二本鎖DNA、一本鎖DNA、DNAアプタマー、フルオロフォア、タンパク質、抗体、ポリペプチド、ナノビーズ、ナノロッド、ナノチューブ、ナノ粒子、フラーレン、PEG分子、リボソーム、またはコレステロール-DNAハイブリッドからなる群より選択される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項52】
ペイロード分子がイオン電荷を含む、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項53】
荷電したペイロード分子が、ペプチド、アミノ酸、荷電ナノ粒子、合成分子、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、金属、またはイオンからなる群より選択される、請求項52記載の方法。 50

【請求項 5 4】

標的ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出の感度または特異度が、該標的ポリヌクレオチドを荷電ペイロード分子に結合させた場合に、未結合の標的ポリヌクレオチドと比較して増加する、請求項52記載の方法。

【請求項 5 5】

標的ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出の感度または特異度が、該標的ポリヌクレオチドを前記ペイロード分子に結合させた場合に、未結合の標的ポリヌクレオチドと比較して増加する、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 6】

前記2つの容積の間に電圧差を印加し、かつ該2つの容積を分けるナノ細孔を流れる電流を測定して電流事象シグネチャを生成するように構成された電極対を、前記センサが含む、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 5 7】

ペイロードに結合した標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過するときに生成される電流事象シグネチャが、その平均深度、最大深度、持続時間、深度レベル数、深度面積と持続時間、またはノイズレベルによって、バックグラウンド分子の電流事象シグネチャから識別可能である、請求項56記載の方法。

【請求項 5 8】

前記プライマーとペイロード分子が共有結合を介して結合される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 5 9】

前記プライマーとペイロード分子が非共有結合を介して結合される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 0】

ペイロード分子が前記プライマーの3'末端または5'末端に結合される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 1】

2つ以上のペイロード分子が前記プライマーに結合される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 2】

前記アンプリコンとペイロード分子が共有結合を介して結合される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 6 3】

前記アンプリコンとペイロード分子が非共有結合を介して結合される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 4】

2つ以上のペイロード分子が前記アンプリコンに結合される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 5】

前記デバイスが少なくとも2つのナノ細孔を直列に含み、かつ、前記ペイロード分子に結合した前記アンプリコンが、移動中に該少なくとも2つのナノ細孔内に同時に存在する、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 6 6】

サンプル中に存在すると予想される標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出するための方法であって、以下の段階を含む方法：

プライマーのセットを提供する段階であって、該プライマーの少なくとも1つが、該標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能である、段階；

増幅反応により生成される、該標的ポリヌクレオチド配列を含むアンプリコンが、少なくとも100塩基対の長さであるように、該サンプルに対して該増幅反応を実施する段階であって、該サンプルが該プライマーセットおよび増幅用の試薬を含む、段階；

50

ナノ細孔を含むデバイスに該サンプルを投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分ける、段階、および、1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように該デバイスを構成する段階であって、該デバイスが、ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、段階；ならびに

ペイロード分子に結合した標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過したかどうかを、該センサからのデータを用いて判定することによって、該増幅サンプル中の標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出する段階であって、該増幅サンプルが精製されていない、段階。

【請求項67】

前記サンプルが、前記増幅前に前記デバイスに投入される、請求項66記載の方法。

10

【請求項68】

前記サンプルが、前記増幅後に前記デバイスに投入される、請求項66記載の方法。

【請求項69】

前記アンプリコンが少なくとも200、500、1,000、2,000、5,000または10,000塩基対の長さである、請求項66記載の方法。

【請求項70】

前記サンプルが、前記増幅とナノ細孔内での前記検出との間に精製ステップを経ない、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項71】

前記サンプルが、1:10000、1:1000、1:500、1:200、1:100、1:50、1:20、1:10、1:5、1:2、1:1.5、1:1.2、1:1.1または1:1.05の希釈率で前記ナノ細孔デバイスに投入される、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項72】

前記サンプルが希釈せずに前記ナノ細孔デバイスに投入される、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項73】

前記サンプルが非標的ポリヌクレオチドおよび増幅反応試薬を含む、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項74】

前記ナノ細孔の直径が少なくとも2nm、3nm、5nm、10nm、20nm、30nm、40nm、または50nmである、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項75】

前記増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写PCR、ライゲーション媒介PCR、ループ介在増幅(LAMP)、等温増幅、鎖置換増幅(SDA)、多重置換増幅、鎖置換増幅、ヘリカーゼ依存性増幅、ニッキング酵素増幅反応、組換えポリメラーゼ増幅、ループ介在等温増幅(LAMP)、自家持続配列複製、全ゲノム増幅、またはリガーゼ媒介PCRからなる群より選択される、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項76】

前記増幅反応が前記デバイスの内部空間で行われる、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項77】

標的ポリヌクレオチドが、二本鎖デオキシリボ核酸(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、DNA/RNAハイブリッド、ペプチド核酸(PNA)、一本鎖リボ核酸(ssRNA)、または二本鎖リボ核酸(dsRNA)を含む、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項78】

標的ポリヌクレオチドが天然に存在するポリヌクレオチドである、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項79】

標的ポリヌクレオチドが人工的に合成されたポリヌクレオチドである、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

50

【請求項 80】

標的ポリヌクレオチドが組換えポリヌクレオチドである、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項 81】

前記2つの容積の間に電圧差を印加し、かつ該2つの容積を分けるナノ細孔を流れる電流を測定して電流事象シグネチャを生成するように構成された電極対を前記センサが含む、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項 82】

標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過するときに生成される電流事象シグネチャが、その平均深度、最大深度、持続時間、深度レベル数、深度面積と持続時間、またはノイズレベルによって、バックグラウンド分子の電流事象シグネチャから識別可能である、請求項81記載の方法。

10

【請求項 83】

前記デバイスが少なくとも2つのナノ細孔を直列に含み、かつ、前記アンプリコンが、移動中に該少なくとも2つのナノ細孔内に同時に存在する、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項 84】

デバイスの内部空間を2つの容積に分けるナノ細孔を含み、かつ1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように構成されるデバイスであって、該ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、デバイス；

20

プライマーの少なくとも1つが、標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつプライマーの少なくとも1つが、ペイロード分子に特異的に結合することができるコンジュゲーション部位を含むように修飾されている、プライマーセット；

増幅前、増幅中または増幅後に該コンジュゲーション部位に結合させるためのペイロード分子；

サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または非存在を検出するための使用のための使用説明書

を含むキット。

30

【請求項 85】

デバイスの内部空間を2つの容積に分けるナノ細孔を含み、かつ1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように構成されるデバイスであって、該ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、デバイス；

プライマーの少なくとも1つが、標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつプライマーの少なくとも1つがペイロード分子に結合されている、プライマーセット；

サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または非存在を検出するための使用のための使用説明書

を含むキット。

40

【請求項 86】

デバイスの内部空間を2つの容積に分けるナノ細孔を含み、かつ1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように構成されるデバイスであって、該ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、デバイス；

プライマーの少なくとも1つが、標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、該プライマーが、増幅反応中に少なくとも100、200、500、1,000、2,000、5,000、または10,000塩基対の標的ポリヌクレオチド配列を含むアンプリコンを生成する、プライマーセット；および

サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または非存在を検出するための使用のための使用説明書

を含むキット。

50

【請求項 87】

サンプル中に存在する標的ポリヌクレオチド配列の量を定量化するための方法であって、以下の段階を含む方法：

既知量の対照ポリヌクレオチドを含む対照サンプルおよび未知量の標的ポリヌクレオチドを含む実験サンプルを提供する段階；

対照ポリヌクレオチドを含む第1アンプリコンを生成するために対照サンプルを増幅する段階、および標的ポリヌクレオチドを含む第2アンプリコンを生成するために実験サンプルを増幅する段階；

該対照サンプルと該実験サンプルを別々に、ナノ細孔を含むデバイスに投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分ける、段階、および、1つ以上の細孔を通して該第1または第2のアンプリコンを通過させるように該デバイスを構成する段階であって、該デバイスが、ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、段階；ならびに

該ナノ細孔内の第1アンプリコンの捕捉率と該ナノ細孔内の第2アンプリコンの捕捉率とを比較して、実験サンプル中の標的ポリヌクレオチド配列の量を定量化する段階。

【請求項 88】

対照サンプルまたは実験サンプルを前記デバイスに投入した後に増幅が行われる、請求項87記載の方法。

【請求項 89】

対照サンプルおよび実験サンプルが同一条件下で増幅される、請求項87記載の方法。

【請求項 90】

対照ポリヌクレオチドおよび標的ポリヌクレオチドが同じ長さまたは配列である、請求項87記載の方法。

【請求項 91】

第1および第2のアンプリコンの捕捉率が、同じ条件下で同じナノ細孔を用いて測定される、請求項87記載の方法。

【請求項 92】

第1および第2のアンプリコンの捕捉率が、同様のサイズのナノ細孔を用いて測定される、請求項87記載の方法。

【請求項 93】

実験サンプル中の標的ポリヌクレオチドの濃度の推定値が、前記対照サンプルおよび前記実験サンプルについて経時的に記録されたセンサ測定値のセットを集計し、2つのデータセットを比較して捕捉率を濃度に変換することによって数学的に生成される、請求項87記載の方法。

【請求項 94】

増幅反応内の各サイクルの後に、標的ポリヌクレオチドの濃度の推定値が、前記対照サンプルおよび前記実験サンプルについて経時的に記録されたセンサ測定値のセットを集計し、2つのデータセットを比較して捕捉率を濃度に変換することによって数学的に生成される、請求項87記載の方法。

【請求項 95】

センサ測定値の前記比較から、増幅前の実験サンプル中の標的ポリヌクレオチドの量を決定する段階をさらに含む、請求項94記載の方法。

【請求項 96】

サンプル中に存在する標的ポリヌクレオチド配列の量を定量化するための方法であって、以下の段階を含む方法：

既知量の対照ポリヌクレオチドを含む対照サンプルおよび未知量の標的ポリヌクレオチドを含む実験サンプルを提供する段階；

該対照サンプルを希釈して、対照ポリヌクレオチドの少なくとも2つの異なる既知濃度を生成する段階；

該対照サンプルを、対照ポリヌクレオチドの該少なくとも2つの異なる既知濃度で、ナ

10

20

30

40

50

ノ細孔を含むデバイスに投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分ける、段階、および、1つ以上の細孔を通して対照ポリヌクレオチドを通過させるように該デバイスを構成する段階であって、該デバイスが、ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、段階；

該少なくとも2つの既知濃度のそれぞれにおける対照ポリヌクレオチドのナノ細孔内での捕捉率を検出する段階；ならびに

該実験サンプルを増幅して、標的ポリヌクレオチドを含むアンプリコンを生成する段階；

該ナノ細孔を含むデバイスに該実験サンプルを投入する段階；

該ナノ細孔内での標的ポリヌクレオチドの捕捉率を検出する段階；

該ナノ細孔内の第1アンプリコンの捕捉率と該ナノ細孔内の第2アンプリコンの捕捉率とを比較して、実験サンプル中の標的ポリヌクレオチド配列の量を定量化する段階。

【請求項 97】

前記希釈が段階希釈である、請求項96記載の方法。

【請求項 98】

対照ポリヌクレオチドを増幅する段階をさらに含む、請求項96記載の方法。

【請求項 99】

対照サンプルを前記デバイスに投入した後で前記希釈が行われる、請求項96記載の方法。

【請求項 100】

実験サンプルを前記デバイスに投入した後で前記増幅が行われる、請求項96記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年2月2日に出願された米国仮特許出願第62/111,075号の恩典を主張するものであり、その開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

背景

生物ゲノムの特定の核酸配列または部分および他の生化学的機構を検出する核酸検査は、病原体検出、遺伝子突然変異分析、疾患スクリーニングおよび導入遺伝子スクリーニングを含めて、広範囲に及ぶ有用性を有する。核酸検査の1つの方法は、核酸標的の存在および/または量に関する情報を得るために、DNAの一部を増幅して複数のアンプリコン(すなわちDNA標的クローン)を生成させることである。これは、例えば、生物が存在するとみなされるか(例えば、ウイルス)、遺伝子が突然変異を起こしているか、または遺伝子が発現されているか、を判定するために使用され得る。一般的な核酸検査方法は、増幅DNAの光学的検出に依存する。これは、ポイント・オブ・ケア検査(point-of-care testing)が望まれる場合に、デバイスの持ち運びを制限する可能性がある。さらに、光学的な検出方法は開発製造コストおよび複雑性を増大させることが多い。新たに出現した技術は、非常に単純な化学作用なしの検出方法、電気化学的センシングまたは純粋に電氣的なセンシングを用いることにより、これらの問題を改善しつつある。残念なことに、デバイスの高い製造コストおよび低い生産性は、これらの技術が商業的に実施可能になるのを妨げている。したがって、必要とされるものは、迅速で単純で正確であり、かつ高価なもしくは時間のかかる光学的または化学的検出を必要としない、標的ポリヌクレオチド配列のロバストな検出のための方法、デバイスおよび組成物である。

【発明の概要】

【0003】

概要

10

20

30

40

50

本明細書で開示される様々な局面は、上述の必要性の1つ以上を満たすことができる。本明細書に記載のシステムおよび方法は、それぞれがいくつかの側面を持ち、そのうちの1つがその望ましい属性に単独で関与するものではない。後続の特許請求の範囲によって表される本開示の範囲を限定することなく、より顕著な特徴をここで簡潔に述べることにする。この記述を検討した後で、特に「詳細な説明」と題するセクションを読んだ後では、本明細書に記載のサンプル特徴が改善されたシステムおよび方法をどのように提供するかを理解するであろう。

【0004】

いくつかの態様では、サンプル中の標的分子もしくは状態の存在または非存在を電氣的に検出するための方法、組成物、およびデバイスが本明細書で提供される。

10

【0005】

いくつかの態様では、サンプル中に存在すると予想される標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出するための方法が本明細書で提供され、該方法は以下の段階を含む：プライマーのセットを提供する段階であって、該プライマーの少なくとも1つが、該標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつ該プライマーの少なくとも1つが、ペイロード分子に特異的に結合することができるコンジュゲーション部位を含むように修飾されている、段階；増幅反応により生成される、該標的ポリヌクレオチド配列を含むアンプリコンが、該コンジュゲーション部位を含むように、該サンプルに対して該増幅反応を実施する段階であって、該サンプルが該プライマーセットおよび増幅用の試薬を含む、段階；該ペイロード分子を該コンジュゲーション部位に結合させる段階；ナノ細孔を含むデバイスに該サンプルを投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分ける、段階、および、1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように該デバイスを構成する段階であって、該デバイスが、ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、段階；ならびにペイロード分子に結合した標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過したかどうかを、該センサからのデータを用いて判定することによって、該サンプル中の標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出する段階。

20

【0006】

いくつかの実施態様では、前記サンプルを、増幅前に前記デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記サンプルを、増幅後に前記デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記ペイロード分子を、増幅後に前記アンプリコンのコンジュゲーション部位に結合させる。いくつかの実施態様では、前記ペイロード分子を、増幅前に前記プライマーのコンジュゲーション部位に結合させる。

30

【0007】

いくつかの実施態様では、前記サンプルは、増幅とナノ細孔内での検出との間に精製ステップを経ない。いくつかの実施態様では、前記サンプルを、少なくとも1:20000、1:10000、1:5000、1:2000、1:1000、1:500、1:200、1:100、1:50、1:20、1:10、1:5、1:2、1:1.5、1:1.2、1:1.1または1:1.05の希釈率で前記ナノ細孔デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記サンプルを希釈せずに前記ナノ細孔デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記サンプルは、非標的ポリヌクレオチドおよび増幅反応試薬を含む。いくつかの実施態様では、前記ナノ細孔は、直径が少なくとも5nm、10nm、20nm、30nm、40nm、または50nmである。

40

【0008】

いくつかの実施態様では、増幅反応は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写PCR、ライゲーション媒介PCR、ループ介在増幅(LAMP)、等温増幅、鎖置換増幅(SDA)、多重置換増幅、鎖置換増幅、ヘリカーゼ依存性増幅、ニッキング酵素増幅反応、または組換えポリメラーゼ増幅からなる群より選択される。いくつかの実施態様では、増幅反応は前記デバイスの内部空間で行われる。

【0009】

いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、二本鎖デオキシリボ核酸(dsDNA)

50

、一本鎖DNA(ssDNA)、ペプチド核酸(PNA)、一本鎖リボ核酸(ssRNA)、DNA/RNAハイブリッド、または二本鎖リボ核酸(dsRNA)を含む。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチドである。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、人工的に合成されたポリヌクレオチドである。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、組換えポリヌクレオチドである。

【0010】

いくつかの実施態様では、ペイロード分子は、デンドリマー、二本鎖DNA、一本鎖DNA、DNA/aptamer、フルオロフォア、タンパク質、抗体、ポリペプチド、ナノビーズ、ナノロッド、ナノチューブ、ナノ粒子、フラーレン、PEG分子、リボソーム、またはコレステロール-DNAハイブリッドからなる群より選択される。

10

【0011】

いくつかの実施態様では、ペイロード分子は電荷を含む。いくつかの実施態様では、荷電したペイロード分子は、ペプチド、アミノ酸、荷電ナノ粒子、合成分子、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、金属、またはイオンからなる群より選択される。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出の感度または特異度は、該標的ポリヌクレオチドを荷電ペイロード分子に結合させた場合に、未結合の標的ポリヌクレオチドと比較して増加する。

【0012】

いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出の感度または特異度は、該標的ポリヌクレオチドを荷電ペイロード分子に結合させた場合に、未結合の標的ポリヌクレオチドと比較して増加する。

20

【0013】

いくつかの実施態様では、前記2つの容積の間に電圧差を印加し、かつ該2つの容積を分けるナノ細孔を流れる電流を測定して電流事象シグネチャ(current event signature)を生成するように構成された電極対を、前記センサは含む。いくつかの実施態様では、ペイロードに結合した標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過するとき生成される電流事象シグネチャは、その平均深度、最大深度、持続時間、深度レベル数、深度面積と持続時間、またはノイズレベルによって、バックグラウンド分子の電流事象シグネチャから識別可能である。

【0014】

いくつかの実施態様では、コンジュゲーション部位とペイロード分子は、共有結合を介して結合される。いくつかの実施態様では、共有結合はクリックケミストリーによって形成される。いくつかの実施態様では、クリックケミストリーは銅触媒による。いくつかの実施態様では、クリックケミストリーは銅フリーである。いくつかの実施態様では、コンジュゲーション部位とペイロード分子は、非共有結合を介して結合される。いくつかの実施態様では、非共有結合は、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、極性結合、カチオン- 相互作用、平面スタッキング相互作用、または金属結合である。いくつかの実施態様では、コンジュゲーション部位は前記プライマーの3'末端または5'末端に位置する。いくつかの実施態様では、コンジュゲーション部位は前記アンプリコンの3'末端または5'末端に位置する。

30

40

【0015】

いくつかの実施態様では、コンジュゲーション部位は、化学基、反応基、小分子、またはペプチドを含む。いくつかの実施態様では、小分子はビオチンを含む。いくつかの実施態様では、反応基は、ジベンゾシクロオクチル(DBCO)またはアジドを含む。いくつかの実施態様では、2つ以上のペイロード分子が前記アンプリコンに結合される。いくつかの実施態様では、前記デバイスは少なくとも2つのナノ細孔を直列に含み、かつ、前記ペイロード分子に結合した前記アンプリコンは、移動中に該少なくとも2つのナノ細孔内に同時に存在する。

【0016】

また、サンプル中に存在すると予想される標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存

50

在を検出するための方法が本明細書で提供され、該方法は以下の段階を含む：プライマーのセットを提供する段階であって、該プライマーの少なくとも1つは、該標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつ該プライマーの少なくとも1つはペイロード分子に結合されている、段階；増幅反応により生成される、該標的ポリヌクレオチド配列を含むアンプリコンが、該ペイロード分子に結合されるように、該サンプルに対して該増幅反応を実施する段階であって、該サンプルが該プライマーセットおよび増幅用の試薬を含む、段階；ナノ細孔を含むデバイスに該サンプルを投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分ける、段階、および、1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように該デバイスを構成する段階であって、該デバイスが、ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、段階；ならびにペイロード分子に結合した標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過したかどうかを、該センサからのデータを用いて判定することによって、該サンプル中の標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出する段階。

10

【0017】

いくつかの実施態様では、前記サンプルを、増幅前に前記デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記サンプルを、増幅後に前記デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記サンプルは、増幅とナノ細孔内での検出との間に精製ステップを経ない。

【0018】

いくつかの実施態様では、前記サンプルを、1：10000、1：1000、1：500、1：200、1：100、1：50、1：20、1：10、1：5、1：2、1：1.5、1：1.2、1：1.1または1：1.05の希釈率で前記ナノ細孔デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記サンプルを希釈せずに前記ナノ細孔デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記サンプルは、非標的ポリヌクレオチドおよび増幅反応試薬を含む。いくつかの実施態様では、前記ナノ細孔は、直径が少なくとも5nm、10nm、20nm、30nm、40nm、または50nmである。

20

【0019】

いくつかの実施態様では、増幅反応は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写PCR、ライゲーション媒介PCR、ループ介在増幅(LAMP)、等温増幅、鎖置換増幅(SDA)、多重置換増幅、鎖置換増幅、ヘリカーゼ依存性増幅、ニッキング酵素増幅反応、または組換えポリメラーゼ増幅からなる群より選択される。いくつかの実施態様では、増幅反応は前記デバイスの内部空間で行われる。

30

【0020】

いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、二本鎖デオキシリボ核酸(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、ペプチド核酸(PNA)、一本鎖リボ核酸(ssRNA)、DNA/RNAハイブリッド、または二本鎖リボ核酸(dsRNA)を含む。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチドである。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、人工的に合成されたポリヌクレオチドである。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、組換えポリヌクレオチドである。

【0021】

いくつかの実施態様では、ペイロード分子は、 dendriマー、二本鎖DNA、一本鎖DNA、DNAアプタマー、フルオロフォア、タンパク質、抗体、ポリペプチド、ナノビーズ、ナノロッド、ナノチューブ、ナノ粒子、フラーレン、PEG分子、リボソーム、またはコレステロール-DNAハイブリッドからなる群より選択される。

40

【0022】

いくつかの実施態様では、ペイロード分子はイオン電荷を含む。いくつかの実施態様では、荷電したペイロード分子は、ペプチド、アミノ酸、荷電ナノ粒子、合成分子、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、金属、またはイオンからなる群より選択される。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出の感度または特異度は、該標的ポリヌクレオチドを荷電ペイロード分子に結合させた場合に、未結合の標的ポリヌクレオチドと比較して増加する。

【0023】

50

いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出の感度または特異度は、該標的ポリヌクレオチドをペイロード分子に結合させた場合に、未結合の標的ポリヌクレオチドと比較して増加する。

【0024】

いくつかの実施態様では、前記2つの容積の間に電圧差を印加し、かつ該2つの容積を分けるナノ細孔を流れる電流を測定して電流事象シグネチャを生成するように構成された電極対を、前記センサは含む。いくつかの実施態様では、ペイロードに結合した標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過するときに生成される電流事象シグネチャは、その平均深度、最大深度、持続時間、深度レベル数、深度面積と持続時間、またはノイズレベルによって、バックグラウンド分子の電流事象シグネチャから識別可能である。

10

【0025】

いくつかの実施態様では、前記プライマーとペイロード分子は、共有結合を介して結合される。いくつかの実施態様では、前記プライマーとペイロード分子は、非共有結合を介して結合される。いくつかの実施態様では、ペイロード分子は前記プライマーの3'末端または5'末端に結合される。

【0026】

いくつかの実施態様では、2つ以上のペイロード分子が前記プライマーに結合される。いくつかの実施態様では、前記アンプリコンとペイロード分子は、共有結合を介して結合される。いくつかの実施態様では、前記アンプリコンとペイロード分子は、非共有結合を介して結合される。いくつかの実施態様では、2つ以上のペイロード分子が前記アンプリコンに結合される。

20

【0027】

いくつかの実施態様では、前記デバイスは少なくとも2つのナノ細孔を直列に含み、かつ、前記ペイロード分子に結合した前記アンプリコンは、移動中に該少なくとも2つのナノ細孔内に同時に存在する。

【0028】

また、サンプル中に存在すると予想される標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出するための方法が本明細書で提供され、該方法は以下の段階を含む：プライマーのセットを提供する段階であって、該プライマーの少なくとも1つは、該標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能である、段階；増幅反応により生成される、該標的ポリヌクレオチド配列を含むアンプリコンが、少なくとも100塩基対の長さであるように、該サンプルに対して該増幅反応を実施する段階であって、該サンプルが該プライマーセットおよび増幅用の試薬を含む、段階；ナノ細孔を含むデバイスに該サンプルを投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分ける、段階、および、1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように該デバイスを構成する段階であって、該デバイスが、ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、段階；ならびにペイロード分子に結合した標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過したかどうかを、該センサからのデータを用いて判定することによって、該増幅サンプル中の標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出する段階であって、該増幅サンプルが精製されていない、段階。

30

40

【0029】

いくつかの実施態様では、前記サンプルを、増幅前に前記デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記サンプルを、増幅後に前記デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記アンプリコンは、少なくとも200、500、1,000、2,000、5,000または10,000塩基対の長さである。いくつかの実施態様では、前記サンプルは、増幅とナノ細孔内での検出との間に精製ステップを経ない。

【0030】

いくつかの実施態様では、前記サンプルを、1:10000、1:1000、1:500、1:200、1:100、1:50、1:20、1:10、1:5、1:2、1:1.5、1:1.2、1:1.1または1:1.05の希釈率で前記ナノ細孔デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記サンプルを希釈せ

50

ずに前記ナノ細孔デバイスに投入する。いくつかの実施態様では、前記サンプルは、非標的ポリヌクレオチドおよび増幅反応試薬を含む。

【0031】

いくつかの実施態様では、前記ナノ細孔は、直径が少なくとも2nm、3nm、5nm、10nm、20nm、30nm、40nm、または50nmである。

【0032】

いくつかの実施態様では、増幅反応は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写PCR、ライゲーション媒介PCR、ループ介在増幅(LAMP)、等温増幅、鎖置換増幅(SDA)、多重置換増幅、鎖置換増幅、ヘリカーゼ依存性増幅、ニックング酵素増幅反応、組換えポリメラーゼ増幅、ループ介在等温増幅(LAMP)、自家持続配列複製、全ゲノム増幅、またはリガーゼ媒介PCRからなる群より選択される。いくつかの実施態様では、増幅反応は前記デバイスの内部空間で行われる。

10

【0033】

いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、二本鎖デオキシリボ核酸(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、DNA/RNAハイブリッド、ペプチド核酸(PNA)、一本鎖リボ核酸(ssRNA)、または二本鎖リボ核酸(dsRNA)を含む。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチドである。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、人工的に合成されたポリヌクレオチドである。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドは、組換えポリヌクレオチドである。

20

【0034】

いくつかの実施態様では、前記2つの容積の間に電圧差を印加し、かつ該2つの容積に分けるナノ細孔を流れる電流を測定して電流事象シグネチャを生成するように構成された電極対を、前記センサは含む。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過するときに生成される電流事象シグネチャは、その平均深度、最大深度、持続時間、深度レベル数、深度面積と持続時間、またはノイズレベルによって、バックグラウンド分子の電流事象シグネチャから識別可能である。

【0035】

いくつかの実施態様では、前記デバイスは少なくとも2つのナノ細孔を直列に含み、かつ、前記アンプリコンは、移動中に該少なくとも2つのナノ細孔内に同時に存在する。

30

【0036】

また、以下を含むキットが本明細書で提供される：デバイスの内部空間を2つの容積に分けるナノ細孔を含み、かつ1つ以上の該細孔を通して核酸を通過させるように構成されるデバイスであって、該ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、デバイス；プライマーの少なくとも1つが、標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつプライマーの少なくとも1つが、ペイロード分子に特異的に結合することができるコンジュゲーション部位を含むように修飾されている、プライマーセット；増幅前、増幅中または増幅後に該コンジュゲーション部位に結合させるためのペイロード分子；サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または非存在を検出するための使用のための使用説明書。

40

【0037】

さらに、以下を含むキットが本明細書で提供される：デバイスの内部空間を2つの容積に分けるナノ細孔を含み、かつ1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように構成されるデバイスであって、該ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔用のセンサを備える、デバイス；プライマーの少なくとも1つが、標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつプライマーの少なくとも1つがペイロード分子に結合されている、プライマーセット；サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または非存在を検出するための使用のための使用説明書。

【0038】

さらに、以下を含むキットが本明細書で提供される：デバイスの内部空間を2つの容積に分けるナノ細孔を含み、かつ1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように構成され

50

るデバイスであって、該ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、デバイス；プライマーの少なくとも1つが、標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、該プライマーが、増幅反応中に少なくとも100、200、500、1,000、2,000、5,000、または10,000塩基対の標的ポリヌクレオチド配列を含むアンプリコンを生成する、プライマーセット；およびサンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または非存在を検出するための使用のための使用説明書。

【0039】

また、サンプル中に存在する標的ポリヌクレオチド配列の量を定量化する方法が本明細書で提供され、該方法は以下の段階を含む：既知量の対照ポリヌクレオチドを含む対照サンプルおよび未知量の標的ポリヌクレオチドを含む実験サンプルを提供する段階；対照ポリヌクレオチドを含む第1アンプリコンを生成するために対照サンプルを増幅する段階、および標的ポリヌクレオチドを含む第2アンプリコンを生成するために実験サンプルを増幅する段階；該対照サンプルと該実験サンプルを別々に、ナノ細孔を含むデバイスに投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分ける、段階、および、1つ以上の細孔を通して該第1または第2のアンプリコンを通過させるように該デバイスを構成する段階であって、該デバイスが、ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、段階；ならびに該ナノ細孔内の第1アンプリコンの捕捉率と該ナノ細孔内の第2アンプリコンの捕捉率とを比較して、実験サンプル中の標的ポリヌクレオチド配列の量を定量化する段階。

【0040】

いくつかの実施態様では、対照サンプルまたは実験サンプルを前記デバイスに投入した後に増幅を行う。いくつかの実施態様では、対照サンプルおよび実験サンプルを同一条件下で増幅する。いくつかの実施態様では、対照ポリヌクレオチドおよび標的ポリヌクレオチドは同じ長さまたは配列である。いくつかの実施態様では、第1および第2のアンプリコンの捕捉率は、同じ条件下で同じナノ細孔を用いて測定される。いくつかの実施態様では、第1および第2のアンプリコンの捕捉率は、同様のサイズのナノ細孔を用いて測定される。

【0041】

いくつかの実施態様では、実験サンプル中の標的ポリヌクレオチドの濃度の推定値は、対照サンプルおよび実験サンプルについて経時的に記録されたセンサ測定値のセットを集計し、2つのデータセットを比較して捕捉率を濃度に変換することによって数学的に生成される。いくつかの実施態様では、標的ポリヌクレオチドの濃度の推定値は、増幅反応内の各サイクルの後に対照サンプルおよび実験サンプルについて経時的に記録されたセンサ測定値のセットを集計し、2つのデータセットを比較して捕捉率を濃度に変換することによって数学的に生成される。

【0042】

いくつかの実施態様では、前記方法は、センサ測定値の前記比較から、増幅前の実験サンプル中の標的ポリヌクレオチドの量を決定する段階をさらに含む。

【0043】

さらに、サンプル中に存在する標的ポリヌクレオチド配列の量を定量化するための方法が本明細書で提供され、該方法は以下の段階を含む：既知量の対照ポリヌクレオチドを含む対照サンプルおよび未知量の標的ポリヌクレオチドを含む実験サンプルを提供する段階；該対照サンプルを希釈して、対照ポリヌクレオチドの少なくとも2つの異なる既知濃度を生成する段階；該対照サンプルを、対照ポリヌクレオチドの該少なくとも2つの異なる既知濃度で、ナノ細孔を含むデバイスに投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分ける、段階、および、1つ以上の細孔を通して対照ポリヌクレオチドを通過させるように該デバイスを構成する段階であって、該デバイスが、ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、段階；該少なくとも2つの既知濃度のそれぞれにおける対照ポリヌクレオチドのナノ細孔内での捕捉率を検出する段階；該実験サンプルを増幅して、標的ポリヌクレオチドを含むアンプリコ

ンを生成する段階；該ナノ細孔を含むデバイスに該実験サンプルを投入する段階；該ナノ細孔内での標的ポリヌクレオチドの捕捉率を検出する段階；ならびに該ナノ細孔内の第1アンプリコンの捕捉率と該ナノ細孔内の第2アンプリコンの捕捉率とを比較して、実験サンプル中の標的ポリヌクレオチド配列の量を定量化する段階。

【0044】

いくつかの実施態様では、前記希釈は段階希釈である。いくつかの実施態様では、前記方法は、対照ポリヌクレオチドを増幅する段階をさらに含む。いくつかの実施態様では、対照サンプルを前記デバイスに投入した後で前記希釈を行う。いくつかの実施態様では、実験サンプルを前記デバイスに投入した後で前記増幅を行う。

【図面の簡単な説明】

10

【0045】

前述のおよび他の目的、特徴および利点は、添付の図面(同様の参照符号は異なる図全体を通して同じ部分を指す)に示される本発明の特定の実施態様の以下の説明から明らかになるであろう。図面は必ずしも縮尺通りではなく、本発明の様々な実施態様の原理を説明することに重点が置かれている。また、限定ではなく単なる例示により特徴を示すデータ図も、本開示の実施態様として提供される。

【図1】図1は、ナノ細孔を通過するペイロード分子に結合した標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを示す。

【図2】図2は、ペイロード結合標的ポリヌクレオチドが細孔を通過するときの電流シグネチャの差を、非標的ポリヌクレオチドおよび一般的な非ポリヌクレオチドバックグラウンド分子と比較して、示す。

20

【図3】図3は、標的配列をピオチン化プライマーで増幅し、次いでストレプトアビジンによって結合されたピオチン化アンプリコンをナノ細孔により検出するためのプロセスを示す。

【図4】図4は、PCRアンプリコンを定量化する方法の一環として、本発明者らの整数(m)ナノ細孔(n)観測可能(o)PCR(Integer(m)nanopore(n)observable(o)PCR:mnoPCR)ワークフローを示す。

【図5】図5は、増幅またはペイロード結合の前または後に精製を必要としない、標的配列を検出するためのワークフローを示す。

【図6】図6は、3250bpのDNAをナノ細孔で検出し、バックグラウンド事象からポリヌクレオチド事象を識別するときの、(a)代表的なナノ細孔電流事象および(b)ナノ細孔電流事象集団を示す。

30

【図7】図7は、470bp DNA事象とバックグラウンドノイズ事象とを比較するデータを示し、これら2つを識別することができなかったことを示す。

【図8】図8は、プライマー修飾なし、1ピオチン修飾プライマー、および2ピオチン修飾プライマーで増幅された470bp DNAのアガロースゲル(左)、その後のモノストレプトアビジンペイロード結合後のアガロースゲル(右)を示す。

【図9】図9は、470bp DNA-[1ピオチン]-[1モノストレプトアビジン]と470bp DNA-[2ピオチン]-[2モノストレプトアビジン]とのナノ細孔電流事象集団を比較する。

【図10】図10は、バックグラウンド(電氣的ノイズ)事象から確立された偽陽性閾値に対して、470bp DNA、470bp DNA-[1ピオチン]-[1モノストレプトアビジン]および470bp DNA-[2ピオチン]-[2モノストレプトアビジン]の陽性率検出基準を比較する。

40

【図11】図11は、(1)プライマー修飾なしで増幅された470bp DNA、(2)1ピオチン修飾プライマーで増幅されたDNA、および(3)2ピオチン修飾プライマーで増幅されたDNAの、抗ピオチン抗体ペイロード結合後の、アガロースゲルを示す。

【図12】図12は、470bp DNA(ペイロードなし)と470bp DNA-[2ピオチン]-[2抗ピオチン抗体]とのナノ細孔電流事象集団を比較する。

【図13】図13は、1:10希釈のPCRバックグラウンドと、同じPCRバックグラウンドにおける増幅1074bp DNAとのナノ細孔電流事象集団を比較する。

【図14】図14は、1:10希釈のPCRバックグラウンド、同じPCRバックグラウンドにお

50

る増幅1074bp DNA、ペイロードのない増幅500bp DNA、および増幅500bp DNA-[1ピオチン]-[1モノストレプトアビジン]のナノ細孔電流事象集団を比較する。

【図15】図15は、(1、4) 470bp DNA(ピオチンプライマー修飾なし)、(2) 470bp DNA-[1ピオチン]-[1モノストレプトアビジン]、および(3) 470bp DNA-[2ピオチン]-[2モノストレプトアビジン]のアガロースゲルを示し、20倍過剰のモノストレプトアビジンの存在下でのレーン1~3は、非特異的ペイロード結合がないことを示す。

【図16】図16は、PCRバックグラウンドのみ(1:60希釈)と、PCRバックグラウンド(1:60希釈)の存在下での470bp DNA(ペイロードなし)、470bp DNA-[1ピオチン]-[1モノストレプトアビジン]および470bp DNA-[2ピオチン]-[2モノストレプトアビジン]とのナノ細孔電流事象集団を比較する。

【図17】図17は、バックグラウンド事象(PCRバックグラウンド1:60希釈)から確立された偽陽性閾値に対して、470bp DNA、470bp DNA-[1ピオチン]-[1モノストレプトアビジン]および470bp DNA-[2ピオチン]-[2モノストレプトアビジン]の陽性率検出基準を比較する。

【図18】図18は、全血バックグラウンドのみ(1:20000希釈)と、全血バックグラウンド(1:20000希釈)の存在下での470bp DNA(ペイロードなし)、470bp DNA-[1ピオチン]-[1モノストレプトアビジン]および470bp DNA-[2ピオチン]-[2モノストレプトアビジン]とのナノ細孔電流事象集団を比較する。

【図19】図19は、バックグラウンド事象(全血バックグラウンド1:20000希釈)から確立された偽陽性閾値に対して、470bp DNA、470bp DNA-[1ピオチン]-[1モノストレプトアビジン]および470bp DNA-[2ピオチン]-[2モノストレプトアビジン]の陽性率検出基準を比較する。

【図20】図20は、(1) 362bp DNA(ピオチンプライマー修飾なし)、(2) 362bp DNA-[1ピオチン]-[1モノストレプトアビジン]、および(3) 362bp DNA-[2ピオチン]-[2モノストレプトアビジン]のアガロースゲルを示す。

【図21】図21は、362bp標的DNAと470bp非標的DNA(ペイロードなし)の組み合わせと、362bp標的DNA-[1ピオチン]-[1モノストレプトアビジン]とのナノ細孔電流事象集団を比較する。

【図22】図22は、バックグラウンドDNA事象(ペイロードのない470bp非標的DNA)から確立された偽陽性閾値に対して、362bp標的DNA-[1ピオチン]-[1モノストレプトアビジン]の陽性率検出基準を比較する。

【図23】図23は、対照を用いて線形捕捉率対濃度傾向を確立し、続いて、測定された捕捉率を線形傾向にマッピングすることによって標的ポリヌクレオチドの未知濃度を推定することを示す。

【図24】図24は、PCR反応から生成された12、13および14サイクルアンプリコンの捕捉率対濃度傾向への濃度マッピングを示す。

【図25】図25は、別個のPCR反応から生成された異なるセットの20サイクルアンプリコンの捕捉率対濃度傾向への濃度マッピングの再現性を示す。

【図26】図26は、推定濃度対PCRサイクル10、12、13、14、15、17、20、30、35、40のシグモイド(S字状)傾向を示す。

【図27】図27は、最小(1:1.17)希釈のPCRバックグラウンドと、同じPCRバックグラウンドにおける増幅1074bp DNAとのナノポア電流事象集団を比較する。

【図28】図28は、希釈率1:5、1:2、1:1.43および1:1.17での陰性対照(10サイクルのPCR不在の出発鋳型)の捕捉率対濃度傾向への濃度マッピングを示す。

【発明を実施するための形態】

【0046】

詳細な説明

本出願全体を通して、本文は、本デバイス、組成物、システムおよび方法の様々な実施態様に言及する。記載された種々の実施態様は、説明に役立つ様々な例を提供するものであり、代替種(alternative species)の記載として解釈されるべきではない。むしろ、本

10

20

30

40

50

明細書に提供された様々な実施態様の説明は、重複する範囲のものであってもよいことに留意すべきである。本明細書で述べられる実施態様は単なる例示であり、本発明の範囲を限定するものではない。

【0047】

また、本開示を通じて、様々な刊行物、特許および公開特許明細書は、識別引用(identified citation)によって参照される。これらの刊行物、特許および公開特許明細書の開示は、その全体が参照により本開示に組み入れられる。

【0048】

本明細書で使用する用語「含む」(comprising)は、システム、デバイスおよび方法が列挙された構成要素またはステップを含むが、その他を排除しないことを意味することが意図される。システム、デバイスおよび方法を定義するために使用する場合の「から本質的になる」とは、その組み合わせに対して本質的に意義のある他の構成要素またはステップを排除することを意味するものとする。「からなる」とは、他の構成要素またはステップを排除することを意味するものとする。これらの接続語(transition term)の各々によって定義される実施態様は、本発明の範囲内にある。

10

【0049】

範囲を含めて、全ての数字表示、例えば距離、サイズ、温度、時間、電圧および濃度は、0.1きざみで(+)または(-)に変化する近似値である。必ずしも明記されるわけではないが、全ての数字表示の前に用語「約」が付されることは理解されるべきである。また、必ずしも明記されるわけではないが、本明細書に記載された構成要素は単なる例示であり、その均等物が当技術分野で公知であることも理解されるべきである。

20

【0050】

本明細書で使用する「内部空間を分けるナノ細孔を含むデバイス」は、内部空間を2つの容積またはチャンバに分ける構造体内の開口部を含む細孔を有するデバイスを指すものとする。該デバイスはまた、2つ以上のナノ細孔を有することができ、細孔の各対の間に1つの共通チャンバを有する。

【0051】

本明細書で使用する用語「ポリヌクレオチド」は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。この用語は該分子の一次構造のみを指す。したがって、この用語は二本鎖と一本鎖のDNAおよびRNAを含む。

30

【0052】

本明細書で使用する用語「標的ポリヌクレオチド」は、関心対象の配列(すなわち、標的ポリヌクレオチド配列または標的配列)を含むポリヌクレオチドを指す。標的ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド増幅用のプライマーにハイブリダイズするための領域(例えば、十分に相補的な配列)を含むことができる。これらの領域は、関心対象の配列の一部であるか、関心対象の配列に隣接するか、または増幅反応を介した関心対象の配列の増幅を可能にするのに十分近接して関心対象の配列のさらに上流もしくは下流にあり得る。いくつかの実施態様では、プライマーにハイブリダイズするためのこれらの領域は、増幅反応によって生成されるアンプリコンの2つの末端に位置する。関心対象の配列を含む標的ポリヌクレオチドを検出するための方法、デバイスおよび組成物が本明細書に記載される。

40

【0053】

本明細書で使用する用語「プライマー」は、コピーされるポリヌクレオチド鎖(例えば、標的ポリヌクレオチド)の合成の開始点として作用することができるオリゴマーを指す。したがって、ハイブリダイゼーションをもたらす条件下で、プライマーは、標的配列を含むポリヌクレオチドの相補的な領域にアニールする。適切な反応物質(例えば、ポリメラーゼ、ヌクレオチド三リン酸など)を添加すると、プライマーは重合剤によって伸長されて、標的ポリヌクレオチドのコピーを形成する。プライマーは一本鎖であってもよいし、あるいは部分的にまたは完全に二本鎖であってもよい。

50

【0054】

本明細書で使用する用語「ハイブリダイズ可能な」は、ハイブリダイズすることができること、すなわちRNA:RNA、RNA:DNAおよび/またはDNA:DNA分子のような二本鎖分子を形成することができることを意味する。増幅の目的のために、プライマーが増幅反応のためのDNA合成の開始点として作用するのに十分相補的な塩基対合相互作用を介して標的ポリヌクレオチド鎖と二重鎖を形成することができる場合、そのプライマーは標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能である。

【0055】

本明細書で使用する用語「結合」は、化学結合、例えば、共有結合、イオン結合、または金属結合の形成を指す。結合には、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、カチオン- 相互作用、および/または平面スタッキング相互作用を介した2つの分子間の安定な会合が含まれる。結合には、クリックケミストリーを介した2つの分子のコンジュゲーションが含まれる。

10

【0056】

本明細書で使用する用語「コンジュゲーション部位」は、1つの生体分子を別の生体分子にコンジュゲートするための分子上の部位を指す。いくつかの実施態様では、本明細書に開示されるプライマーは、ナノ細孔でのペイロード結合アンプリコンの検出のために、プライマー自体またはプライマーによって生成されたアンプリコンのいずれかをペイロード分子にコンジュゲートさせるためのコンジュゲーション部位を含む。コンジュゲーション部位への結合のメカニズムには、安定した結合相互作用、例えばクリックケミストリーが含まれる。

20

【0057】

本明細書で使用する用語「増幅」または「増幅反応」は、標的ポリヌクレオチド配列から標的ポリヌクレオチド配列を含む複数のクローン性アンプリコンを生成する反応を指す。本明細書で使用する増幅反応試薬には、標的ポリヌクレオチド配列の増幅を実施するために必要なあらゆる分子が含まれる。増幅反応試薬としては、限定するものではないが、遊離プライマー、dNTP(デオキシヌクレオチド三リン酸、dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、ポリメラーゼ酵素(例えば、TaqまたはPfu)、塩類(塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム)、BSA(ウシ血清アルブミン)安定剤、および界面活性剤(例えば、トリトンX-100)が挙げられる。増幅反応としては、限定するものではないが、PCR、リガーゼ連鎖反応(LCR)、転写媒介増幅(TMA)、逆転写酵素開始PCR、DNAまたはRNAハイブリダイゼーション技術、シーケンシング、等温増幅、およびループ介在等温増幅(LAMP)が挙げられる。標的ポリヌクレオチド配列からアンプリコンを生成するための増幅技術は、当業者に周知である。

30

【0058】

本明細書で使用する用語「足場」または「ポリマー足場」は、電圧印加時にナノ細孔を通して移動する負または正に荷電したポリマーを指す。いくつかの実施態様では、ポリマー足場は、切断可能なドメインまたは切断可能なリンカーを含む。いくつかの実施態様では、ポリマー足場は、切断可能なリンカーを含む融合分子に結合されるか、結合することができ、電圧印加時にナノ細孔を通して移動することができる。いくつかの局面では、ポリマー足場は、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ペプチド核酸(PNA)、DNA/RNAハイブリッド、またはポリペプチドを含む。足場はまた、天然に存在する分子または生物学的な分子ではなく、化学的に合成されたポリマーであってもよい。好ましい実施態様では、ポリマー足場はdsDNAであり、dsDNAはナノ細孔を通して移動する時に、より予測可能な信号を可能にし、かつssDNAまたはRNAに存在する二次構造を低減させる。いくつかの実施態様では、ポリマー足場は、足場の一端または足場の両端に存在し得る融合分子結合部位を含む。足場と融合分子とは、共有結合、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、カチオン- 相互作用、平面スタッキング相互作用、または金属結合を介して連結され得る。あるいは、切断可能なリンカー成分の足場への直接共有結合テザリング(tethering)が、足場と融合分子とを連結してもよい。あるいは、融合物のコネク

40

50

タ成分が、切断可能なリンカーを直接共有結合テザリングにより足場に連結してもよい。好ましい実施態様では、融合分子は、足場結合ドメインを含み、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、コレステロール/DNAハイブリッド、またはDNA/RNAハイブリッドであり得る。

【0059】

本明細書で使用する用語「ペイロード」または「ペイロード分子」は、ナノ細孔における検出の選択性および/または感度を高めるためにポリヌクレオチド(例えば、プライマー)に結合される分子または化合物を指す。いくつかの実施態様では、ペイロード分子は、デンドリマー、二本鎖DNA、一本鎖DNA、DNAアダプター、フルオロフォア、タンパク質、ポリペプチド、ナノロッド、ナノチューブ、フラーレン、PEG分子、リボソーム、またはコレステロール-DNAハイブリッドであり得る。好ましい実施態様では、ポリヌクレオチドとペイロードとは、共有結合、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、カチオン- 相互作用、平面スタッキング相互作用、または金属結合によって直接または間接的に連結される。ペイロードは、標的ポリヌクレオチドまたはアンプリコンにサイズを追加し、ペイロードに結合したアンプリコンがナノ細孔を通過する時にバックグラウンド分子とは著しく異なる電流シグネチャを有することから、検出を容易にする。

10

【0060】

本明細書で使用する用語「バックグラウンド」は、ナノ細孔によって検出可能であるが、関心対象の標的ポリヌクレオチド配列を含まない、サンプル中の分子を指す。本発明の重要な局面は、混合サンプル中のバックグラウンドからの標的ポリヌクレオチドの識別である。

20

【0061】

本明細書で使用する用語「ナノ細孔」は、特定のサイズのポリマーの通過を可能にするのに十分な大きさの開口部(孔またはチャンネル)を指す。増幅器により、電圧が印加されると、負に荷電したポリマーがナノ細孔を通過して駆動され、該細孔を流れる電流によって、分子が該細孔を通過しているかどうかを検出される。

【0062】

本明細書で使用する用語「センサ」は、ナノ細孔デバイスからの信号を収集する機器を指す。多くの実施態様では、センサは、分子または他の物質、特にポリマー足場、が細孔を通過する時に細孔を横切るイオン電流を測定するために、細孔の両側に配置された1対の電極を含む。電極に加えて、追加のセンサ、例えば光学センサを用いて、ナノ細孔デバイスの中の光信号を検出することができる。電流遮断、電子トンネリング電流、電荷誘起電界効果、ナノ細孔通過時間、光信号、光散乱、およびプラズモン共鳴のような特性を検出するために、他のセンサを使用してもよい。

30

【0063】

本明細書で使用する用語「電流測定」は、ナノ細孔を流れる印加電圧での電流の経時的な一連の測定を指す。電流は事象を定量化するための測定値として表され、電圧によって正規化された電流(コンダクタンス)もまた事象を定量化するために使用される。

【0064】

本明細書で使用する用語「オープンチャンネル」(open channel)は、電流が解析ソフトウェアによって規定された閾値から外れない場合に、ノイズ範囲内でナノ細孔チャンネルを流れる電流のベースラインレベルを指す。

40

【0065】

本明細書で使用する用語「事象」は、電流測定がオープンチャンネル値から規定された閾値だけ外れる時に開始して、電流がオープンチャンネル値の閾値内に戻る時に終了する、電流インピーダンス測定のセットを指す。

【0066】

本明細書で使用する用語「電流インピーダンスシグネチャ」は、検出された事象内で同定される電流測定および/またはパターンの収集を指す。分子タイプ間の識別を高めるために、1つの事象内に複数のシグネチャが存在することもできる。

【0067】

50

本明細書で使用する用語「捕捉率」(capture rate)は、ナノ細孔デバイスで経時的に検出される事象の数を指す。いくつかの実施態様では、捕捉率は、具体的には、特定の標的分子に関連した事象の捕捉および/または移動の割合、例えばペイロード結合アンプリコンの移動の割合、を指すことができる。本明細書に記載されるように、捕捉率は、類似のナノ細孔条件下で同様の質量/電荷比を有する対照と比較して濃度を推測するために使用することができる。

【0068】

概説

本明細書には、ナノ細孔デバイスで検出可能な修飾アンプリコンの生成による標的ポリヌクレオチドの検出方法が開示される。本明細書に開示された方法、組成物およびデバイスは、DNA分子がナノ細孔を通過するときに該DNA分子の純粋に電気的な計数を可能にする。本明細書に提供される実施例は、単一のDNA分子がナノ細孔を通過するたびに、「ペイロード結合DNA」が明確でロバストな信号を提供することを実証する。これは、混合サンプルからの正確で精密なDNA定量の迅速かつ簡便な手段を可能にし、化学的または光学的検出を必要としない電気的検出方法を使用して、数百~数千の標的分子を数分でカウントしてバックグラウンド非標的分子から識別することができる。さらに、該デバイスの安価なハードウェア、低電力要件、小さなサイズ、および様々なナノ細孔形状の許容性を考慮すると、製造コストとデバイスコストは極めて低い。本明細書に開示された本発明のいくつかの実施態様によって提供される特徴は、持ち運びを可能にする小さなナノ細孔デバイスサイズと併せて、ポリヌクレオチド標的配列の新規かつ効率的な検出・診断方法を提供する。

10

20

【0069】

バックグラウンド識別性

いくつかの局面では、サンプル中に存在する標的ポリヌクレオチドは、無数のバックグラウンド分子の集団を含む、元の(さらにフィルタリングされた)天然の液体(血液、唾液、尿など)由来であり得る。このようなバックグラウンド分子は、正の印加電圧で十分に負に帯電したとき、ナノ細孔を通過する。場合によっては、そのようなナノ細孔事象は標的ポリヌクレオチドのように見えるかもしれない。こうして、これらのバックグラウンド分子は偽陽性を生じる可能性があり、検出のエラー率が高くなる。より大きな分子を除去するのに十分なサンプル調製を加えることはこれを助けるが、偽陽性事象を生み出すバックグラウンド分子は依然として存在し、ナノ細孔デバイスでの標的ポリヌクレオチドの検出の感度および特異度を損なうであろう。

30

【0070】

バックグラウンド分子と標的ポリヌクレオチドとの識別を提供するために、プライマーラベリングスキームを使用することができる。

【0071】

具体的には、標識または標識の配列(例えば、ペイロード分子)を、標的ポリヌクレオチドの配列にハイブリダイズ可能なプライマーまたはプローブに結合させる。あるいは、プライマーまたはプローブが、所定の標識またはペイロード分子に特異的に結合する標識結合部位を有する。標的ポリヌクレオチドの増幅中に、これらのプライマーまたはプローブはアンプリコンに組み込まれ、それ故に、標識もしくはペイロード分子または標識/ペイロード分子結合部位が標的ポリヌクレオチドを含むアンプリコンに組み込まれる。ペイロード分子に結合したアンプリコンは独特の電流シグネチャをもたらし、こうした電流シグネチャを用いて、ナノ細孔を通過して移動した標的配列を含む標的ポリヌクレオチド/アンプリコン産物の存在および/または正体(identity)を同定することができる。

40

【0072】

別の実施態様では、アンプリコン単独(標識に結合していない)が、バックグラウンドとは十分に異なる識別シグネチャを提供する。これらの実施態様は、バックグラウンドから識別するのに十分な信号を発生させるために、より小さいナノ細孔および/またはより長いアンプリコンを一般に必要とする。

50

【0073】

混合サンプル中の標的ポリヌクレオチドの検出

固体(solid-state)のナノ細孔は、アンプリコンDNAを電氣的に検出するために使用することができ、ペイロードが標的DNAにのみ結合する場合には、ペイロードの結合により標的DNAの検出が容易になる(図1)。

【0074】

特に、アンプリコンが、細孔を通過しながら、オープンチャンネルコンダクタンスおよび記録中に存在するノイズまたはバックグラウンド分子よりも十分に大きいインピーダンス信号を提供する場合には、固体ナノ細孔を用いて、該アンプリコンを電氣的に検出することができる(図2)。標的配列に「嵩高さ」(bulk)を加えることは、嵩高さがバックグラウンドノイズおよび分子を上回って容易に測定される必要な信号を提供するので、より大きな細孔(5~100nm)でのナノ細孔検出を可能にする。嵩高さなしでは、500bpより短いアンプリコンの場合、大半のアンプリコンが約5nm以上のナノ細孔では見逃され、PCR産物の正確な定量化を妨げる。例えば、修飾されたプライマー(複数可)を用いて増幅反応を行うことにより、プライマーの修飾がアンプリコンに組み込まれ、この修飾は、アンプリコンを必要な「嵩高い」ペイロードでタグ付けして、ナノ細孔内での検出を可能にするために使用され得る。一実施態様では、図3に示されるように、プライマーをビオチンで修飾する。得られたPCRアンプリコンをストレプトアビジンペイロードに結合させ、それらの存在をナノ細孔で検出する。

10

【0075】

提示される嵩高化(bulking)の例としては、ビオチン/ストレプトアビジンおよびエプタープ/抗体が挙げられ、2つの例示的な方法である。あるいは、プライマーを化学的反応基、例えばアルキン、で修飾することができる。これは、アルキン含有アンプリコンを、嵩高いアジド含有分子、例えばアジド-ポリエチレングリコール(PEG)で、クリックケミストリーを用いて、修飾することを可能にする。細孔を通る光検出を使用するのであれば、プライマーをフルオロフォアで修飾することができ、その結果として、蛍光を用いてアンプリコンを検出することができる。要約すると、分子を組み込む方法であって、その分子の組み込みが増幅反応に依存する方法はどれも、本明細書の開示に組み入れられる。

20

【0076】

結合反応は、最初にPCRアンプリコンを精製することなく、または増幅緩衝液および増幅成分から抽出することなく、PCRアンプリコンをタグ付けできるような、高親和性の反応である。タグ付け後、アンプリコンは適切なナノ細孔記録緩衝液(例えば、1M LiCl, 10 mM Tris, 1mM EDTA)中でナノ細孔を用いて検出される。PCR反応混合物に関連したまたはサンプルからのバックグラウンドは、ペイロード結合標的DNA分子とは明確に異なるナノ細孔電流インピーダンスシグネチャを与える(図2)。この方法では、バックグラウンドの存在下で定量を行うことができ、サンプルまたはPCR反応混合物の精製が不要となり、ワークフローが大幅に簡素化される。ひいては、サイクルPCR反応を実施し、かつサイクル間にアンプリコン産物のナノ細孔測定を行うデバイスは、測定前に反応混合物の希釈のみを必要とすることにより、パッケージにまとめて、安価に作製することができる。一方、複雑な精製ステップを必要とするデバイスは、よりインフラ集約的であり、したがってより高価で複雑であろう。

30

40

【0077】

図4は、「mnoPCR」(Integer(m) nanopore(n) observable(o) PCR)と題するアンプリコンのリアルタイム検出および定量方法を示す。mnoPCRが進行するにつれて、各サイクル後に生成された産物はペイロードに結合され、その後ナノ細孔内で検出される。このリアルタイム検出方法は、検出を容易にする嵩高いペイロードを結合させる前にPCRアンプリコンを精製する必要がないので、実現される。この測定は、様々な希釈率(希釈なしを含む)でのPCR反応混合物バックグラウンド、様々な希釈率(PCR反応を最適化するための要件による)でのサンプルバックグラウンド、およびペイロードバックグラウンド(標的ポリヌクレオチドに結合していない過剰のペイロード)に対して耐性がある。

50

【0078】

反応の進行に従って産物を測定する能力は、鋳型/標的の数または濃度が異なっていてよい2つ以上のサンプルを比較する非常に効率のよい方法を提供する。さらに、ナノ細孔は単一分子を検出してカウントするので、実施例に示されるように、生じるアンプリコンの正確な定量が達成可能である。

【0079】

本明細書に記載の方法を用いると、標的ヌクレオチド配列の量が異なる2つ以上のサンプルを比較して、対比することができる。その2つの非限定的なシナリオは、(1)変異型転写産物と野生型配列の混合物を含むサンプル、および(2)導入遺伝子の含有量が異なるサンプルである。

10

【0080】

シナリオ1では、サンプルが突然変異を含むか否かにかかわらず、標的配列を増幅するプライマーセットを用いてサンプルを増幅し、次に、生成された産物の量を、変異型配列のみを増幅するプライマーセットを用いて生成された産物の量と比較することによって、サンプル中の変異型転写産物の量を推測し、その値をサンプル間で比較することができる。例えば、サンプルAは20%のKRAS突然変異を含み、一方サンプルBは30%のKRAS突然変異を含むことが分かるであろう。

【0081】

シナリオ2では、あらゆる転写産物に存在するDNAの一部(ハウスキーピング領域)を増幅し、その存在量を、導入遺伝子のみを標的とする反応から生成された転写産物の量と比較することができる。物質の全量は、ナノ細孔を用いてハウスキーピングアンプリコンを定量することにより決定され、生成された導入遺伝子アンプリコンの量との比較を行うことができる。ハウスキーピング遺伝子アンプリコンはサンプルの全濃度を決定するために使用されるので、出発濃度が異なる2つの異なるサンプルを、導入遺伝子の存在量について比較することが可能である。

20

【0082】

これらの同じ概念を用いて、例えば口腔スワブからの、サンプル中にある属の細菌が存在するかどうかを判定し、次に、その属に含まれる細菌種をさらに詳しく記述することができる。具体的には、全ての細菌、例えばブドウ球菌属(*Staphylococcus*)の細菌、に存在する遺伝子を最初に定量化し、続いて*mecA*のような抗生物質耐性ブドウ球菌のみに存在する遺伝子を特異的に増幅して、定量化する。

30

【0083】

図5は、開示された方法を用いて関心対象の核酸配列を検出するためのワークフローを示す。

【0084】

検出への統計的有意性の割り当て

いくつかの実施態様では、経時的に記録されたセンサ測定値のセットを集計し、数学的ツールを適用することは、前のセクションで詳述したように、サンプル中に存在すると予想される標的ポリヌクレオチドの検出に数値的信頼度を割り当てるために行われる。

【0085】

40

最近、ナノ細孔事象集団の特性の差に基づいて、ある分子タイプをバックグラウンド(すなわち、他の分子タイプ)から識別する定量的方法が開発された(Morin, T.J., et al., "Nanopore-based target sequence detection," *PLoS One*に提出, Dec. 31, 2015)。この識別方法は、様々なタイプの他のバックグラウンド分子の存在の中から特定の分子タイプを検出することができ、かつ検出の統計的有意性(例えば、99%信頼度での試薬Xの検出)を割り当てることができることを指す。この方法を下記の実施例に適用するために、最初にこの方法をここで手短かに説明することにする。

【0086】

一般的に言えば、細孔の上のチャンバには2種類の分子が存在する：タイプ1は全てのバックグラウンド分子であり、タイプ2は関心対象の分子である。以下の実施例では、標的D

50

NA-パイロードはタイプ2の分子と一般的に見なされ、非標的DNA、遊離パイロード、プライマー、またはサンプルもしくはPCR反応混合物からの分子はバックグラウンド(タイプ1)と見なされる。実験からのデータに基づいて、タイプ2事象のかなりの割合に存在し、かつタイプ1事象の比較的小さな割合に存在する事象シグネチャ基準が同定される。シグネチャ基準は、G、持続時間、各事象内のレベルの数および特徴、ならびに/または事象信号から計算された任意の他の数値または値の組み合わせに依存しうる。

【0087】

事象シグネチャ基準は、手動で、またはテーブルルックアップ(table look-up)によって、または自動化された方法で選択することができることに留意されたい。例えば、先行実験は、ある範囲の細孔サイズおよび所与の試験に存在すると予測される他の条件について、陽性対照と陰性対照の挙動を確立することができ、このような対照から同定された所定の基準は、所与の試験について(すなわち、所与のアンプリコン長さについて、および所与のパイロードタイプについて)同等の条件に出くわした場合には、(テーブルルックアップ様式で)使用することができる。自動化基準は、例えば、サンプルの直前に実施される対照に基づいて、リアルタイムでも同定することができる。本出願に開示されるように、PCRアンプリコンをリアルタイムで定量化するには、自動基準選択が適切かつ好ましいアプローチである。具体的には、対照が分子サイズ/電荷およびナノ細孔事象の特性/形状の点でアンプリコンをまねる時、その対照事象は、開示されるように、捕捉率対濃度傾向を構築するために使用することができる一方で、増幅サンプルを測定する場合に、バックグラウンドの中から「アンプリコン」タイプ2事象にフラグを立てるための基準を確立する「タイプ2事象境界」の計算を自動化する際の事象集団をも提供することができる。該境界は、2Dプロットのポイント(例えば、該ポイントは平均シフト 対 持続時間プロット内の事象である)に沿った曲線に対してフィッティングする任意の方法によって算定することができる。曲線フィッティング法は、最小2乗法、線型もしくは二次計画法、または数値最適化の任意の形式を含み、区分的多項式(piece-wise polynomial)またはスプライン(spline)の係数を介して該境界をパラメータ化することができる。凸包(convex hull)を計算することで境界が得られる。より高次元の境界フィッティングルーチンもまた可能であり、例えば、事象を特徴付ける3つの特性(3D境界)が使用される。結果として生じる境界は多角形状または平坦であり得る。特定のパーセンテージの事象を含む境界で事象のサブセットを取り囲む目的で(すなわち、自動基準同定のためのポイントを囲むときに外れ値を切り取るメカニズムとして)、関連する技法は、全確率のz分率を含む最小領域の境界として定義される、z分位数(z-quantile)の境界を計算することである。例えば、95%分位数の境界は、全確率の95%(データの95%)を含む最小領域の境界である。確率密度は不明であるが、それは、標準的な技法を用いて、データから推定することができる。

【0088】

ひとたび基準が(手動で、テーブルルックアップによって、または自動化された方法で)選択されると、そのシグネチャ基準が事象について満たされる場合、その事象はタイプ2として「タグ付け」される。本発明者らは、pを捕捉事象がタイプ2である確率と定義する。タイプ2分子を含まない対照実験では $p=0$ であり、タイプ2分子を含む実験では $p>0$ であるが、その値は不明である。我々は、偽陽性確率 $q_1 = \Pr(\text{タグ付き} | \text{タイプ1事象})$ を定義する。(例えば、非標的DNAを用いる20サイクル後のPCR反応混合物を含み、ナノ細孔に隣接する記録緩衝液中に希釈された)タイプ2分子を含まない対照実験または実験のセットでは、 q_1 は、妥当な数の捕捉事象から良好な精度で決定される。タイプ2分子がバルク溶液中に存在するかどうかを判定する検出実験では、捕捉事象がタグ付けされる確率はpの関数であり、次式として近似され得る：

$$Q(p) = (\text{タグ付け事象の数})/N$$

【0089】

上記式中、Nは事象の総数である。99%信頼区間 $Q(p) \pm Q_{s_d}(p)$ は、 $Q_{s_d}(p) = 2.57 * \sqrt{Q(p) * (1-Q(p)) / N}$ を用いて計算することができ、ここで $\sqrt{\quad}$ は平方根関数である。実験の過程で、事象数Nが増加するにつれてQ(p)の値は収束し、かつ不確実性境界は減衰する

。記録時間の関数としての $Q(p) \pm Q_{s,d}(p)$ のプロットは、それが各試薬タイプについてどのように展開するかを示している(図10、17、19および22)。タイプ2分子を含まない対照実験では、 $Q(0) = q_1$ であることに気付く。ある確率 $p^* > 0$ で存在することが知られているタイプ2分子を含む対照実験では、計算された値 $Q(p^*)$ は、下記のように、タイプ2分子が存在しないかどうかを判定する検出実験において使用され得る。

【0090】

検出実験では、下記の基準が当てはまる場合、タイプ2分子は99%の信頼度で存在する：

$$Q(p) - Q_{s,d}(p) > q_1 \quad (1)$$

【0091】

上記の基準が当てはまれば、 $p > 0$ と結論される；それが当てはまらなければ、 $p > 0$ とは言えない。このフレームワークは、以下に示す実施例において利用される。

【0092】

測定された捕捉率からの濃度の推定

ここでは、標的分子の一連の既知濃度に対応して測定された捕捉率により表される直線関係に基づいて濃度を推定する方法について述べる。これは対照を用いて確立される。 C を濃度とし、 $r(C)$ を濃度 C に対応する真の/正確な捕捉率とする。 $r(C)$ は C に比例すると予想される。

$$r(C) = aC$$

【0093】

一連の既知濃度 $\{C_1, C_2, \dots, C_N\}$ に対応して測定された捕捉率を収集する。測定された捕捉率のそれぞれは、以下の形式である：

$$C_j \text{ に対する測定された捕捉率: } r_j \pm d_j$$

【0094】

C_j について測定された捕捉率は次のように解釈される： r_j は正規分布 $N(aC_j, d_j^2)$ からのランダムサンプルであり、ここで aC_j は正確な捕捉率であり、捕捉率定数 a は未知である。データセット $\{r_j \pm d_j, j=1, 2, \dots, N\}$ と仮定すると、 a の事後分布は正規分布： $a \sim N(u, s^2)$ を有し、ここで u および s は次式を有する：

$$s^2 = \frac{1}{\sum_{j=1}^N \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2}, \quad u = \frac{1}{\sum_{j=1}^N \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2} \sum_{j=1}^N \frac{r_j}{C_j} \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2$$

【0095】

捕捉率対濃度プロットにおいて対照に対してフィッティングさせるための代表的な例を、図23~25および図28に示す。

【0096】

次に、未知の濃度を推定する方法を説明すると、最初に対照を用いて(先に詳述したように)確立される捕捉率対濃度傾向を使用し、続いて未知濃度の標的分子の捕捉率を測定する。表記法では、未知濃度 C_x に対応する捕捉率が測定され、

$$C_x \text{ に対する測定された捕捉率: } r_x \pm d_x$$

とする。

【0097】

C_x は、

$$C_x = \frac{aC_x}{a} = \frac{r_x + d_x \varepsilon_1}{u + s \varepsilon_2}$$

と表される。ここで、 ε_1 および ε_2 は、独立した標準正規確率変数である。

$$\varepsilon_1 \sim N(0,1) \text{ および } \varepsilon_2 \sim N(0,1)$$

【0098】

10

20

30

40

50

傾きaは小さな相対不確実性(relative uncertainty)で他のデータ点から決定されると仮定する： $s/u < 1$ 。この仮定の下で、 C_x を近似することができる。具体的には、 C_x の推定値は、

$$C_x = \frac{r_x}{u} \left(1 \pm \sqrt{\left(\frac{d_x}{r_x}\right)^2 + \left(\frac{s}{u}\right)^2} \right)$$

として記録される。ここで、 u および s は、

$$s^2 = \frac{1}{\sum_{j=1}^N \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2}, \quad u = \frac{1}{\sum_{j=1}^N \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2} \sum_{j=1}^N \frac{r_j}{C_j} \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2 \quad 10$$

を用いてデータ点から計算される。

【0099】

測定された捕捉率を捕捉率対濃度傾向(対照を用いて確立された)に対してフィッティングさせることによって未知濃度を推定するための代表的な例を、図23~25および図28に示す。

【0100】

提供される実施例では、「実施例9：アンプリコン濃度の定量」は、このセクションで提示された方法がどのように実行に移されるかについて、例を挙げて教示している。 20

【0101】

組成物

いくつかの実施態様では、ペイロード分子に結合したプライマーが本明細書で提供される。いくつかの実施態様では、ペイロード分子結合部位を含むプライマーが本明細書で提供される。いずれの実施態様においても、プライマーは、ナノ細孔内での検出を高めるために、ペイロード分子に結合されたまたはペイロード分子に結合することが可能な、アンプリコンを生成することができる。

【0102】

いくつかの実施態様では、ペイロード分子は、 dendrimer、二本鎖DNA、一本鎖DNA、DNAアプタマー、フルオロフォア、タンパク質、ポリペプチド、ナノロッド、ナノチューブ、フラレン、PEG分子、リボソーム、またはコレステロール-DNAハイブリッドであり得る。好ましい実施態様では、ポリヌクレオチドとペイロードは、共有結合、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、カチオン- 相互作用、平面スタッキング相互作用、または金属結合を介して直接または間接的に連結される。ペイロードは、標的ポリヌクレオチドまたはアンプリコンにサイズを追加して、検出を容易にする。ペイロードに結合したアンプリコンは、バックグラウンド分子よりもナノ細孔を通過する際に著しく異なる電流シグネチャを有する。いくつかの実施態様では、ペイロード分子は、プライマーへの結合のためのアジドケミカルハンドルを含む。いくつかの実施態様では、プライマーはビオチン分子に結合される。いくつかの実施態様では、ペイロード分子は、別の分子に結合して該分子の嵩高性に影響を及ぼし、それによってナノ細孔内でのアンプリコン検出の感度を高める。いくつかの実施態様では、プライマーは、ビオチン分子に結合されるか、またはビオチン分子に結合するための結合部位を含む。いくつかの実施態様では、ビオチンは、バックグラウンド分子と比べてナノ細孔内での検出向上に向けてペイロード分子のサイズを増大させるために、ストレプトアビジンによってさらに結合される。追加された嵩高さは、標的配列を含むアンプリコンとバックグラウンド分子との間によりはっきりとしたシグネチャ差を生み出すことができる。 30 40

【0103】

この実施態様において、プライマーまたはアンプリコンへのペイロードの結合は、様々な方法で達成することができる。例えば、プライマーはジベンゾシクロオクチン(DBCO)修 50

飾プライマーとすることができ、この修飾プライマーは全てのアンプリコンをDBCO化学基で効果的に標識し、アジド標識されたアンプリコンまたはプライマーへの銅フリーの「クリック」ケミストリーを介したコンジュゲーション目的のために使用される。

【0104】

いくつかの局面では、プライマーは、ペイロード分子の認識および結合を引き起こすまたは容易にする化学修飾を含む。例えば、メチル化DNA配列は、転写因子、DNAメチルトランスフェラーゼまたはメチル化修復酵素によって認識され得る。他の実施態様では、ピオチンをアビジンファミリーメンバーに組み込んで、該メンバーにより認識させることができる。そのような実施態様では、ピオチンは融合物結合ドメインを形成し、アビジンまたはアビジンファミリーメンバーは該融合物上のポリマー足場結合ドメインである。それらの結合相補性のため、プライマー/アンプリコン上のペイロード分子結合ドメインおよびペイロード分子上のプライマー結合ドメインは、該ペイロード結合ドメインが該プライマー結合ドメインとなるように逆転させることができ、その逆も同じことが言える。

10

【0105】

ヌクレオチド結合モチーフを特異的に認識することができる分子、特にタンパク質は、当技術分野で公知である。例えば、ヘリックスターンヘリックス、ジンクフィンガー、ロイシンジッパー、ウィングドヘリックス(winged helix)、ウィングドヘリックスターンヘリックス、ヘリックスループヘリックスおよびHMGボックスのようなタンパク質ドメインは、ヌクレオチド配列に結合できることが知られている。これらの分子はどれも、アンプリコンまたはプライマーに結合するペイロード分子として作用し得る。

20

【0106】

いくつかの局面では、ペイロード結合ドメインは、ロックド核酸(LNA)、架橋核酸(BNA)、あらゆるタイプのタンパク質核酸(例えば、ピスPNA、ガンマ-PNA)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、クラスター化され規則的に間隔の空いた短い回文型反復配列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat: CRISPR)、またはアプタマー(例えば、DNA、RNA、タンパク質、またはそれらの組み合わせ)であり得る。

【0107】

いくつかの局面では、ペイロード結合ドメインは、DNA結合タンパク質(例えば、ジンクフィンガータンパク質)、抗体フラグメント(Fab)、化学合成結合剤(例えば、PNA、LNA、TALENS、またはCRISPR)、または合成ポリマー足場中の化学的修飾(すなわち、反応性部分)(例えば、チオレート、ピオチン、アミン、カルボキシレート)の1つ以上である。

30

【0108】

ナノ細孔デバイス

提供されるナノ細孔デバイスは、デバイスの内部空間を2つの容積に分ける構造体に開口部を形成する少なくとも1つの細孔、および該細孔を通過する物体を(例えば、物体を示すパラメータの変化を検出することによって)同定するように構成された少なくとも1つのセンサを含む。本明細書に記載の方法に使用されるナノ細孔デバイスは、PCT公開WO/2013/012881にも開示されており、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0109】

ナノ細孔デバイスの細孔(複数可)は、ナノスケールまたはミクロスケールのものである。一局面では、各細孔は、小さいもしくは大きい分子または微生物が通過することができるサイズを有する。一局面では、各細孔は少なくとも約1nmの直径である。あるいは、各細孔は、少なくとも約2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、11nm、12nm、13nm、14nm、15nm、16nm、17nm、18nm、19nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nmまたは100nmの直径である。

【0110】

一局面では、該細孔は約100nm以下の直径である。あるいは、該細孔は、約95nm、90nm、85nm、80nm、75nm、70nm、65nm、60nm、55nm、50nm、45nm、40nm、35nm、30nm、25nm、20nm、15nm、または10nm以下の直径である。

50

【0111】

一局面では、該細孔は、約1nm～約100nmの直径、あるいは約2nm～約80nm、または約3nm～約70nm、または約4nm～約60nm、または約5nm～約50nm、または約10nm～約40nm、または約15nm～約30nmの直径を有する。

【0112】

いくつかの局面では、ナノ細孔デバイスは、該細孔を横切ってポリマー足場を動かす手段および/または該細孔を通過する物体を同定する手段をさらに含む。さらなる詳細は以下に提供され、2細孔デバイスとの関連において記載される。

【0113】

単一細孔のナノ細孔デバイスと比較して、2細孔デバイスは、該細孔を横切るポリマー足場の移動の速度および方向を良好に制御するように、より容易に設定することができる。

10

【0114】

一実施態様では、ナノ細孔デバイスは複数のチャンバを含み、各チャンバは少なくとも1つの細孔を介して隣接チャンバと連通している。これらの細孔のうち、2つの細孔、すなわち第1の細孔と第2の細孔は、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部が第1の細孔から出て第2の細孔内へ移動することができるように、配置される。さらに、該デバイスは、移動中に標的ポリヌクレオチドを同定することが可能なセンサを各細孔に含む。一局面では、同定は、標的ポリヌクレオチドの個々の構成成分を同定することを伴う。別の局面では、同定は、標的ポリヌクレオチドに結合されたペイロード分子を同定することを伴う。単一のセンサが使用される場合、その単一センサは、細孔を横切るイオン電流を測定するための、細孔の両端に配置された2つの電極を含むことができる。別の実施態様では、単一センサは電極以外の構成要素を含む。

20

【0115】

一局面では、前記デバイスは、2つの細孔を介して接続された3つのチャンバを含む。3つより多いチャンバを有するデバイスは、3チャンバデバイスのどちらの側にも、または3つのチャンバのいずれか2つの間に、1つ以上の追加のチャンバを含めるように容易に設計することができる。同様に、チャンバ同士を接続するために、2つより多い細孔を該デバイスに含めることができる。

【0116】

一局面では、複数のポリマー足場が1つのチャンバから次のチャンバに同時に移動することができるように、2つの隣接チャンバ間に2つ以上の細孔が存在し得る。このような多重細孔設計は、該デバイスにおける標的ポリヌクレオチド分析のスループット(処理量)を高めることができる。多重化の場合には、1つのチャンバが1つのタイプの標的ポリヌクレオチドを有することができ、別のチャンバは別の標的ポリヌクレオチドタイプを有することができる。

30

【0117】

いくつかの局面では、前記デバイスは、標的ポリヌクレオチドを1つのチャンバから別のチャンバに移動させる手段をさらに含む。一局面では、その移動により、標的ポリヌクレオチド(例えば、標的配列を含む増幅産物またはアンプリコン)は、第1の細孔と第2の細孔の両方に同時に投入される結果となる。別の局面では、前記手段はさらに、両方の細孔を通過して同じ方向に標的ポリヌクレオチドを移動させることを可能にする。

40

【0118】

例えば、3チャンバ2細孔デバイス(「2細孔」デバイス)では、チャンバの各々は、チャンバ間の細孔のそれぞれに別々の電圧を印加することができるように、電源に接続するための電極を含むことができる。

【0119】

本開示の一実施態様によれば、上部チャンバと、中間チャンバと、下部チャンバとを備えたデバイスが提供され、ここで、上部チャンバは第1の細孔を介して中間チャンバと連通しており、中間チャンバは第2の細孔を介して下部チャンバと連通している。このよう

50

なデバイスは、デュアル細孔デバイス(Dual-Pore Device)と題する米国特許出願公開第2013-0233709号に以前に開示された寸法または他の特性のいずれかを有してよく、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0120】

一局面では、各細孔は少なくとも約1nmの直径である。あるいは、各細孔は、少なくとも約2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、11nm、12nm、13nm、14nm、15nm、16nm、17nm、18nm、19nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nmまたは100nmの直径である。

【0121】

一局面では、各細孔は約100nm以下の直径である。あるいは、該細孔は、約95nm、90nm、85nm、80nm、75nm、70nm、65nm、60nm、55nm、50nm、45nm、40nm、35nm、30nm、25nm、20nm、15nm、または10nm以下の直径である。

10

【0122】

一局面では、該細孔は、約1nm～約100nmの直径、あるいは約2nm～約80nm、または約3nm～約70nm、または約4nm～約60nm、または約5nm～約50nm、または約10nm～約40nm、または約15nm～約30nmの直径を有する。

【0123】

いくつかの局面では、該細孔は実質的に丸い形状を有する。本明細書で使用する「実質的に丸い」とは、円筒の形が少なくとも約80または90%である形状を指す。いくつかの実施態様では、該細孔は、正方形、長方形、三角形、楕円形、または六角形の形状である。

20

【0124】

一局面では、該細孔は、約1nm～約10,000nmの深さ、あるいは約2nm～約9,000nm、または約3nm～約8,000nmなどの深さを有する。

【0125】

いくつかの局面では、ナノ細孔は膜を貫通して延びている。例えば、該細孔は、脂質二重層膜に挿入されたタンパク質チャンネルであってよく、あるいは、二酸化ケイ素、窒化ケイ素、グラフェン、またはこれらの材料もしくは他の材料の組み合わせから形成された層などの固体基板を通してドリリング、エッチングまたは他の方法で細孔を形成することによって作製されてもよい。ナノ細孔は、足場：融合物：ペイロードまたは酵素活性後のこの分子の産物が細孔を通過するのを可能にする大きさである。他の実施態様では、分子

30

【0126】

いくつかの局面では、ナノ細孔の長さまたは深さは、2つの、さもなければ分かっている容積を接続するチャンネルを形成するように十分に大きくする。いくつかのこのような局面では、各細孔の深さは、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、または900nmより大きい。いくつかの局面では、各細孔の深さは、2000nmまたは1000nm以下である。

【0127】

一局面では、該細孔は、約10nm～約1000nmの距離をあけて配置される。いくつかの局面では、細孔間の距離は、1000nm、2000nm、3000nm、4000nm、5000nm、6000nm、7000nm、8000nm、または9000nmより大きい。いくつかの局面では、該細孔は、3000nm、2000nm、または1000nm以下の距離をあけて配置される。一局面では、その距離は、少なくとも約10nm、あるいは少なくとも約20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、250nm、または300nmである。別の局面では、その距離は、約1000nm、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、250nm、200nm、150nm、または100nm以下である。

40

【0128】

さらに別の局面では、細孔間の距離は、約20nm～約800nm、約30nm～約700nm、約40nm～約500nm、または約50nm～約300nmである。

【0129】

50

2つの細孔は、それらがチャンバ間の流体連通を可能にし、かつそれらの間に規定のサイズおよび距離を有する限り、任意の位置に配置することができる。一局面では、該細孔は、それらの間に直接の遮断物がないように配置される。さらに、一局面では、これらの細孔は実質的に同軸である。

【0130】

一局面では、前記デバイスは、1つ以上の電源に接続された電極をチャンバ内に有する。いくつかの局面では、電源は、各細孔に電圧を供給しかつ各細孔を流れる電流を独立して測定することができる、電圧クランプまたはパッチクランプを含む。これに関して、電源および電極の配置は、両電源の共通接地に中間チャンバを設定することができる。一局面では、電源(複数可)は、上部チャンバ(チャンバA)と中間チャンバ(チャンバB)との間に第1電圧 V_1 を、中間チャンバと下部チャンバ(チャンバC)との間に第2電圧 V_2 を印加するように構成される。

10

【0131】

いくつかの局面では、第1電圧 V_1 および第2電圧 V_2 は、独立して調整可能である。一局面では、中間チャンバは、2つの電圧に対して接地(ground)となるように調整される。一局面では、中間チャンバは、中間チャンバ内の細孔の各々と電極との間にコンダクタンス(伝導性)を与えるための媒体を含む。一局面では、中間チャンバは、中間チャンバ内の細孔の各々と電極との間に抵抗を与えるための媒体を含む。こうした抵抗をナノ細孔抵抗と比べて十分に小さく保つことは、細孔を横切る2つの電圧および電流を切り離すのに有用であり、電圧の独立した調整に役立つ。

20

【0132】

電圧の調整は、チャンバ内の荷電粒子の移動を制御するために使用され得る。例えば、両方の電圧が同じ極性に設定された場合には、適切に荷電された粒子を、上部チャンバから中間チャンバに、そして下部チャンバに、またはその逆の方向に、順次移動させることができる。いくつかの局面において、2つの電圧が反対の極性に設定された場合には、荷電粒子を上部または下部チャンバから中間チャンバに移動させて、そこに保持することができる。

【0133】

前記デバイスにおける電圧の調整は、両方の細孔を同時に横切るのに十分な長さの、荷電ポリマー足場のような、大きな分子の移動を制御するのに特に有用であり得る。このような局面では、該分子の移動の方向および速度は、以下に記載されるような電圧の相対的な大きさ(magnitude)および極性によって制御することができる。

30

【0134】

前記デバイスは、液体サンプル、特に生物学的サンプルを保持するのに適した材料、および/またはナノ加工に適する材料を含むことができる。一局面では、このような材料には、限定するものではないが、シリコン、窒化ケイ素、二酸化ケイ素、グラフェン、カーボンナノチューブ、 TiO_2 、 HfO_2 、 Al_2O_3 、もしくは他の金属層、またはこれらの材料の任意の組み合わせなどの、誘電材料が含まれる。いくつかの局面では、例えば、約0.3nmの厚さのグラフェン膜の単一シートを細孔保持膜として使用することができる。

【0135】

40

マイクロ流体用であるデバイス、および2細孔のマイクロ流体チップの実装を収容するデバイスは、様々な手段および方法によって作製することができる。2つの平行な膜からなるマイクロ流体チップの場合、両方の膜を単一のビームで同時に穿孔して2つの同心の細孔を形成することができるが、膜の各側に異なるビームを使用することもまた、任意の適切なアラインメント技術と併せて可能である。一般的に言えば、ハウジングはチャンバA~Cの密閉された区分けを保証する。

【0136】

一局面では、前記デバイスは、スペーサーによって接続された2つの平行な膜から構成されたマイクロ流体チップ(「デュアル細孔チップ」(Dual-pore chip)と表示)を含む。各膜は、膜の中心を通る単一ビームによって開けられた細孔を含む。さらに、前記デバイス

50

は、該チップ用のテフロン(登録商標)ハウジングまたはポリカーボネートハウジングを有することが好ましい。このハウジングは、チャンバA~Cの密閉された区分けを保証し、かつ電極に最小のアクセス抵抗を提供して、各電圧が主に各細孔を横切って印加されることを確実にする。

【0137】

より具体的には、細孔保持膜は、厚さ5~100nmのシリコン、窒化ケイ素、または二酸化ケイ素の窓を有する透過型電子顕微鏡(TEM)グリッドを用いて作製することができる。スパーサーは、膜を分離するために使用され、SU-8、フォトレジスト、PECVD酸化物、ALD酸化物、ALDアルミナ、またはAg、AuもしくはPtなどの蒸着金属材料のような絶縁体を使用して、膜間のチャンバBのさもなければ水性の部分の内部の小体積を占有する。ホルダーは、チャンバBの最大容積割合からなる水性浴中に取り付けられる。チャンバAおよびCは、膜シールに通じるより大きな直径のチャンネル(アクセス抵抗が低い)によってアクセス可能である。

10

【0138】

集束した電子ビームまたはイオンビームは、膜を貫通する細孔を、当然それらを整列させて、開けるために使用することができる。細孔はまた、各層に正確なビーム集束を適用することによって、より小さなサイズに造形する(縮小させる)こともできる。任意の単一ナノ細孔ドリリング法を用いて、所与の方法に可能なドリル深さおよび膜の厚さに考慮しつつ、2つの膜に細孔の対を開けることもできる。また、マイクロ細孔を所定の深さまで前もって開けておき、その後膜の残部を貫通してナノ細孔を開けることも、膜の厚さをさらに精密化することが可能である。

20

【0139】

前記デバイスの細孔に存在する電圧によって、荷電分子はチャンバ間の細孔を通過して移動することができる。移動の速度および方向は、電圧の大きさおよび極性によって制御され得る。さらに、2つの電圧のそれぞれは独立して調整することができるので、荷電分子の移動の方向および速度は、各チャンバ内での微調整が可能である。

【0140】

1つの例は、両細孔の深さと2細孔間の距離を合わせた距離よりも長い鎖長を有する、標的ポリヌクレオチドに関する。例えば、1000bpのdsDNAは、長さが約340nmであり、2つの深さ10nmの細孔が20nm離れて存在する広がり40nmよりも実質的に長くなる。第1のステップでは、該ポリヌクレオチドを上部チャンバまたは下部チャンバのいずれかに投入する。約pH7.4の生理学的条件下でのその負電荷のために、該ポリヌクレオチドは、電圧が加えられた細孔を横切って移動することができる。したがって、第2のステップでは、同じ極性で、同じまたは同様の大きさの、2つの電圧を細孔に印加して、両方の細孔を横切って該ポリヌクレオチドを連続して移動させる。

30

【0141】

該ポリヌクレオチドが第2の細孔に達する時点あたりで、一方または両方の電圧を変化させることができる。2つの細孔間の距離は該ポリヌクレオチドの長さよりも短くなるように選択されるので、該ポリヌクレオチドが第2の細孔に到達するとき、それは第1の細孔内にもある。したがって、第1の細孔における電圧の極性の迅速な変化は、該ポリヌクレオチドを第2の細孔から引き離す力を発生させるだろう。

40

【0142】

2つの細孔が同一の電圧印加の影響を有し、かつ $|V_1| = |V_2| + V$ であると仮定すると、 $V > 0$ (または < 0)の値を、 $|V_1|$ (または V_2)方向での調節可能な動きに対して調整することができる。実際には、各細孔での電圧誘起力は、 $V_1 = V_2$ の場合に同一ではないが、キャリブレーション実験により、所与の2細孔チップに対して等しい引っ張り力をもたらす適切なバイアス電圧を特定することができる；その後、そのバイアス電圧付近の変動を方向制御のために使用することができる。

【0143】

この時点で、第1細孔での電圧誘起力の大きさが第2細孔での電圧誘起力の大きさよりも

50

小さい場合、該ポリヌクレオチドは、第2の細孔に向かって、しかしより遅い速度で、両方の細孔を横断し続ける。この点において、該ポリヌクレオチドの移動の速度および方向は、両方の電圧の極性および大きさによって制御されることが容易に理解される。以下でさらに説明するように、このような移動の微調整は広い用途を有する。標的ポリヌクレオチドを定量する場合、2細孔デバイス実現の有用性は、制御された送達および検出の間に、標的ポリヌクレオチドまたはペイロード結合標的ポリヌクレオチドを繰り返し測定して、検出結果に信頼性を加えることである。

【0144】

したがって、一局面では、ナノ細孔デバイスを通る荷電ポリマー足場の移動を制御するための方法が提供される。この方法は、以下の段階を含む：(a) 標的ポリヌクレオチド(例えば、標的ポリヌクレオチドアンプリコン)を含むサンプルを、上記実施態様のいずれかのデバイスの上部チャンバ、中間チャンバまたは下部チャンバのうちの1つに投入する段階であって、上部チャンバと中間チャンバとの間に第1電圧を供給し、中間チャンバと下部チャンバとの間に第2電圧を供給するための、1つ以上の電源に、該デバイスが接続されている、段階；(b) 標的ポリヌクレオチドがチャンバ間を移動するように初期の第1電圧および初期の第2電圧を設定し、それによって該ポリマー足場を第1および第2の両方の細孔を横切って位置付ける段階；および(c) 荷電標的ポリヌクレオチドを中間チャンバから引き離す力を両方の電圧が生成するように、第1電圧と第2電圧を調整する段階(電圧競合モード)であって、標的ポリヌクレオチド足場がいずれかの方向にかつ制御された方法で両細孔を横切って移動するように、2つの電圧は制御された条件下で大きさが異なる、段階。

10

20

【0145】

一局面では、標的ポリヌクレオチドを含有するサンプルを上部チャンバに投入し、その標的ポリヌクレオチドを上部チャンバから中間チャンバに引っ張るように初期の第1電圧を設定し、そして該標的ポリヌクレオチドを中間チャンバから下部チャンバに引っ張るように初期の第2電圧を設定する。同様に、サンプルを最初に下部チャンバに投入して、標的ポリヌクレオチドを中間チャンバおよび上部チャンバに引っ張ることができる。

【0146】

別の局面では、標的ポリヌクレオチドを含有するサンプルを中間チャンバに投入し、その荷電ポリマー足場を中間チャンバから上部チャンバに引っ張るように初期の第1電圧を設定し、そして該標的ポリヌクレオチドを中間チャンバから下部チャンバに引っ張るように初期の第2電圧を設定する。

30

【0147】

一局面では、ステップ(c)における第1電圧と第2電圧に対するリアルタイムまたはオンライン調整は、数百メガヘルツまでのクロックレートで、専用のハードウェアおよびソフトウェアを使用するアクティブ制御またはフィードバック制御によって行われる。第1もしくは第2のまたは両方の電圧の自動制御は、第1もしくは第2のまたは両方のイオン電流測定値のフィードバックに基づく。

【0148】

センサ

上述したように、様々な局面において、ナノ細孔デバイスは、標的ポリヌクレオチドの検出を行うための1つ以上のセンサをさらに含む。

40

【0149】

前記デバイスに使用されるセンサは、ペイロード分子に結合したまたは非結合の標的ポリヌクレオチドアンプリコンを同定するのに適したどのようなセンサであってもよい。例えば、センサは、該ポリマーに関連する電流、電圧、pH値、光学的特性または滞留時間を測定することによって、標的ポリヌクレオチドを同定するように構成され得る。他の局面では、センサは、標的ポリヌクレオチドの1つ以上の個々の構成成分、または標的ポリヌクレオチドに結合もしくは付着した1つ以上の成分を同定するように構成され得る。センサは、測定可能なパラメータの変化を検出するように構成された任意の構成要素から形成

50

することができ、この場合には、該変化は標的ポリヌクレオチド、標的ポリヌクレオチドの構成成分、好ましくは、標的ポリヌクレオチドに結合または付着した成分を示している。一局面では、センサは、分子または他の物質、特に標的ポリヌクレオチド、が細孔を通過して移動するときに、該細孔を流れるイオン電流を測定するための、該細孔の両側に配置された一対の電極を含む。特定の局面において、細孔を通過する標的ポリヌクレオチドセグメントがペイロード分子に結合されていると、細孔を流れるイオン電流が測定可能に変化する。このような電流の変化は、例えば、存在する標的ポリヌクレオチド分子の存在、非存在、および/またはサイズに対応して、予測可能かつ測定可能な方法で変化し得る。

【0150】

好ましい実施態様では、センサは、電圧を印加する電極を含み、ナノ細孔を流れる電流を測定するために使用される。ナノ細孔を通る分子の移動は、オームの法則 $V=IZ$ (ここで、 V は印加される電圧であり、 I はナノ細孔を流れる電流であり、 Z はインピーダンスである)に従ってナノ細孔を流れる電流に影響を及ぼす電気インピーダンス(Z)を提供する。反対に、コンダクタンス $G=1/Z$ は、ナノ細孔事象を信号化して定量するためにモニターされる。分子が電場の中で(例えば、印加電圧下で)ナノ細孔を通過して移動するときの結果は、電流シグネチャであり、この電流シグネチャは、電流信号のさらなる分析の際にナノ細孔を通過する分子に相関させることができる。

10

【0151】

電流シグネチャからの滞留時間測定が使用される場合、構成成分のサイズは、それが検出装置を通過するのにかかる時間の長さに基づいて、特定の構成成分に相関させることができる。

20

【0152】

一実施態様では、ポリマー、ポリマーの構成成分(もしくは単位)、またはポリマーに結合もしくは付着した成分の光学的特性を測定するセンサがナノ細孔デバイスに設けられる。このような測定の一例には、特定の単位に固有の吸収帯を赤外(または紫外)分光法で同定することが含まれる。

【0153】

いくつかの実施態様では、センサは電気センサである。いくつかの実施態様では、センサは蛍光シグネチャを検出する。細孔の出口の放射線源を使用して、そのシグネチャを検出することができる。

30

【実施例】

【0154】

本技術は、以下の実施例および実験を参照することによってさらに定義される。当業者であれば、本発明の範囲から逸脱することなく、多くの変更が実施され得ることが明らかである。

【0155】

実施例1：DNAのナノ細孔検出

固体(solid-state)ナノ細孔は、2つの水性容積を分ける薄い固体膜に形成されたナノスケールの開口部である。電圧クランプ増幅器は、開いた細孔を流れるイオン電流を測定しながら、膜に電圧 V を印加する。他の単一分子センサとは異なり、ナノ細孔デバイスは、非常に低コストで携帯用のフォームファクタ(form factor)にパッケージングすることができる。二本鎖DNA(dsDNA)などの単一荷電分子が捕捉されて、電気泳動により細孔を通して駆動されるとき、測定された電流シフト、ならびにコンダクタンスシフト深さ($G=I/V$)および持続時間がその事象を特徴付けるために使用される(図6a)。

40

【0156】

いくつかの実施態様では、値 G (G とも表記される)は、平均電流シフトを電圧で割ったものとして計算される。他の実施態様では、値 G (G とも表記される)は、最大電流シフトを電圧で割ったものとして計算される。一般に、持続時間はシフト幅として計算される。

【0157】

50

実験中に多くの事象を記録した後で、対応する分子を特徴付けるために事象の分布を解析する。図6bは、電圧 $V = 100\text{mV}$ (1M LiCl)で直径27nmのナノ細孔を通過する0.1nMの3.2kb dsDNAについての事象特性を示し、10分間で744の事象が記録された。2つの取り囲まれた代表的な事象は、次のことを示している：折りたたまれていない状態で通過するDNAに対応する、より幅広く浅い事象；折りたたまれた状態で通過するDNAに対応する、より速いがより深い事象。約1kb以下の短いdsDNAの場合、該DNAは折りたたまれていない状態のみ細孔を通過する。

【0158】

ナノ細孔実験では、電気的ノイズスパイクが誤った事象(電気的「バックグラウンドノイズ」)を生成することが一般的である。これらの誤った事象は、3.2kb事象よりも速くて浅いので、識別するのが容易である。膜の過渡容量の変化のために、分あたりバックグラウンド事象1~2が緩衝液のみで一般に観察され、速い($< 0.1\text{ms}$)浅い($< 1.5\text{nS}$)事象を生じる。以下の例で詳述するように、より短いDNAを使用する場合、バックグラウンド電気的ノイズの誤った事象を真のDNA事象から区別することは困難であり、したがって、真の事象を誤った事象から区別することを困難にする。5nmより小さいナノ細孔は、DNA真事象をノイズ誤事象から区別することを可能にし得るが(Briggs, Kyle, Harold Kwok, and Vincent Tabard-Cossa. "Automated Fabrication of 2-Nm Solid-State Nanopores for Nucleic Acid Analysis." *Small* 10, no. 10 (May 28, 2014): 2077-86. doi: 10.1002/smll.201303602)、そのような細孔は、他のタイプのバックグラウンド分子(例えば、サンプルもしくはPCR反応混合物に由来する分子、または非結合ペイロード分子)が少量でも存在する場合には、詰まるおそれがある。それは、バックグラウンド分子の多くが5nm以上の大きさであり(例えば、ペイロードとして作用するモノストレプトアビジンタンパク質は約5nmである)、そのため細孔に捕捉され得るが、その細孔が5nm以下である場合にはそれを通過することができないからである。様々なタイプのこうしたバックグラウンド分子に耐えられるように、直径が少なくとも5nmの細孔が好ましい。結果として、より短いアンプリコン(例えば、500bp以下)は、定量が可能であるように(より大きい)ナノ細孔でそれらを十分に観察可能にするために、ペイロードの結合を必要とする。他方、500bpより大きいアンプリコン(例えば、1kb)は、ペイロードの結合なしに、様々な希釈率のサンプル(口腔粘膜スワブ、全血)およびPCR反応混合物由来を含めて、様々なタイプのバックグラウンドの存在下で、より大きな細孔(少なくとも10nmで、50nmまでの直径)を用いて定量化することができる。

【0159】

実施例2：アンプリコン生成およびペイロード結合方法

ペイロード結合DNAを利用する以下の実施例は、次のアンプリコンの長さを使用する：500bpのDNA、470bpのDNA(SRY遺伝子を含む)、および362bpのDNA(SMCY遺伝子を含む)。

【0160】

SRY(性決定領域Y)遺伝子は、Y染色体上にあり、したがって男性に特有の遺伝子である。SRY遺伝子(または、より正確には、該遺伝子の領域)の欠如は、男性不妊(Abusheikha, N., A. Lass, and P. Brinsden. "XX males without SRY gene and with infertility: Case report." *Human Reproduction* 16.4 (2001): 717-718)または他の健康状態(例えば、Swyer症候群)の一般的な理由である。したがって、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)アッセイは、不妊男性には欠如しているSRY遺伝子の部分を増幅するように設計することができ、男性として特徴的である特性(maleness)および不妊候補についての検査を提供する。アンプリコンが生成されるならば、そのサンプルは男性由来であり、かつSRY遺伝子の前記領域を含む。

【0161】

SRY遺伝子の470塩基対の部分の増幅は、生殖能力のある男性からの口腔粘膜スワブを50 μl のPCR反応混合物と混合することによって達成された。該PCR反応混合物は、1x Terra Direct Buffer (p/n 639287)、0.3 μM のSRYフォワードプライマー(GAATATTCCTCCGCTCTCCGGA)

10

20

30

40

50

、0.3 μ MのSRYリバースプライマー
(GCTGGTGCTCCATTCTTGAG)

および1 μ lのPCR Direct Polymerase Terra Mix (p/n 639287)を含んでいた。この反応混合物を次のように6ステップのPCRプロトコルに供した：1) 98 で2分、2) 98 で10秒、3) 60 で15秒、4) 68 で1分、5) 40サイクルについてステップ2~4を繰り返す、6) 4 で保持する。該分子の5'および/または3'末端にビオチンを組み込むために、5'末端がビオチン化されたプライマーを反応混合物中で使用した。また、この同じ反応を、出発サンプル物質として血液滴の1:1000希釈物2 μ lを用いて実施した。陰性対照としての非特異的増幅と比較して試験するために、水または女性の口腔粘膜スワブを、増幅産物がまったく生成されないことを見込んで、サンプル入力として使用した。

10

【0162】

SMCY遺伝子は、Y染色体上にあり、したがって男性に特有の遺伝子である。SMCYの欠損は、前立腺癌で観察され、癌が進行するにつれて頻度が高くなる(PERINCHERY, GEETHA, et al. "Deletion of Y-chromosome specific genes in human prostate cancer." The Journal of urology 163.4 (2000): 1339-1342)。

【0163】

SMCY遺伝子の増幅は、上記と全く同じプロトコルを使用した。SMCY遺伝子特異的プライマー(フォワードプライマー
CCTCCAGACCTGGACAGAAT
、リバースプライマー
TGTGGTCTGTGGAAGGTGTCA

20

)を用いて達成された。これにより、362塩基対のアンプリコンが生成された。

【0164】

サーモサイクリング後、(SRYおよびSMCYの)ビオチン化DNAは、利用可能なビオチン分子に対して約10倍過剰のペイロードを添加することにより、モノstreプトアビジンペイロードまたは抗ビオチン抗体ペイロードでタグ付けした。増幅反応の間に(SRYおよびSMCYの)ビオチン化DNAがどれほど多く生成されるかを立証するために、PCR産物をPCR反応混合物から精製して、分光光度法を用いて定量化する別個の実験を行った。

【0165】

複数の反応からの増幅の一貫性は、5 μ lの個別のPCR反応産物を2%アガロースゲルで電気泳動することによって実証した(図8、左の画像)。続いて、ペイロード(なし、1つまたは2つ)を結合させるために、モノstreプトアビジンタンパク質(ビオチン部位に対して10倍)とのインキュベーションを行った。PCR産物が1つのモノstreプトアビジンタンパク質(1つのビオチン修飾プライマーを使用した場合)または2つのモノstreプトアビジンタンパク質(2つの修飾プライマーを使用した場合)によって効率的に高画質化されることを確認するために、血液滴供給物質について2%アガロースゲル電気泳動を行った(図8、右の画像)。また、女性の口腔粘膜スワブを出発物質として用いる陰性対照もゲル電気泳動で確認したところ、観察可能なバンドが生じなかった(図示せず)。

30

【0166】

SRYアンプリコンを生成するために用いた口腔スワブ供給物質から、試薬類を5%ポリアクリルアミドゲルで150V、80分間電気泳動した。次いで、Sybr Green DNA特異的蛍光色素の1x溶液(7.5 μ lのサンプル+1.5 μ lの色素)を用いてDNAを染色し、UV光を用いて画像化した。全てのゲル中の「M」は、図示される場合、DNAを追跡するための100bpサイジングマーカーを示す。図11は、以下の順序で電気泳動したSRYアンプリコンを示す：レーン1) SRYアンプリコン、レーン2) 1つの抗ビオチン抗体ペイロードが結合しているSRYアンプリコン、レーン3) 2つの抗ビオチンペイロードが結合しているSRYアンプリコン。レーン2およびレーン3のマイナーなより低いバンドは、それぞれ、ペイロードなしのSRYおよび1つのペイロードを有するSRYを示していた。別のゲル(図15)は、プライマー修飾なしのSRY(レーン1)、1つのビオチン化プライマーを含むSRY(レーン2)、および2つのビオチン化プライマーを含むSRY(レーン3)を、すべて20倍のモノstreプトアビジンの存在下で比較して

40

50

おり、結合反応の特異性を示す(レーン4はSRYなしのモノストレプトアビジンである)。

【0167】

SMCYアンプリコンを生成するために用いた口腔スワブ供給物質から、5 μ l (約100ngのDNA)のPCR反応物を5%ポリアクリルアミドゲルで150V、80分間電気泳動した。図20は、以下の順序で電気泳動されたSMCYアンプリコンを示す：レーン1) SMCYアンプリコン、レーン2) 1つのモノストレプトアビジンペイロードが結合しているSMCYアンプリコン、レーン3) 2つのモノストレプトアビジンペイロードが結合しているSMCY。

【0168】

サーモサイクリングおよび(該当する場合は)ペイロード結合の後、サンプルを記録緩衝液中に希釈して、1M LiCl、10mM Tris-HCl、1mM EDTA (pH7.5)中0.1nM~1nMの最終SRYまたはSMCY濃度にする。

【0169】

実施例3：SRY遺伝子検出

ペイロードが結合していないSRYアンプリコンの事象と電気ノイズバックグラウンドの誤事象は識別することができず、アッセイは偽陽性を生じやすくなる。具体的には、図7は、細孔(100mV)を通過する個々の分子の最大シフト 対 持続時間の事象プロットを示し、ペイロードなしのSRYアンプリコン(黒色)と電気バックグラウンド事象(赤色)とが比較される。SRYが1nM(高濃度)であるにもかかわらず、ほとんどの事象は見逃され、ここでは1分間に検出された事象がたったの3.5であった(69事象、20分間)。これは事象率および事象分布においてバックグラウンド事象集団(47事象、75分)と重複する。捕捉率からの濃度の推定は、ほとんどのDNA事象を検出できず、しかもバックグラウンドから識別できないことから、不可能である。この実験では、15nm膜中の20nm細孔を使用した。

【0170】

一方、1つおよび2つのモノストレプトアビジンタンパク質ペイロードが結合しているSRYアンプリコン(それぞれ、SRY-1MSおよびSRY-2MS)は、事象率の増加およびノイズ事象によっては生じないより明確な事象分布の増加により、電気ノイズバックグラウンドの誤事象からはっきりと識別された。具体的には、ペイロード結合SRY分子をゲル検査した後(図8)、試薬類を図7に示した同じナノ細孔で逐次試験して、図9aの最大シフト 対 持続時間の事象分布プロットを作成した。最大シフト事象ヒストグラムを図9bに示す。SRY-1MS複合体は45分間で1074の事象をもたらし、0.072msより長い事象の割合は41.5%(446)であった。SRY-2MS複合体は80分間で937の事象をもたらし、0.072msより長い事象の割合は43.9%(411)に相当した。比較すると、ノイズ誤事象は28%の0.072msより長い事象を記録した。さらに、ペイロードのないSRY事象は、0.072msより長い事象をわずか4.4%しかもたらさなかった。

【0171】

セクション「検出への統計的有意性の割り当て」で確立されたフレームワークを適用することにより、1および2ペイロード結合SRYアンプリコンの検出に統計的信頼度を割り当てることができる。具体的には、バックグラウンド事象はタイプ1とみなされ、DNA-ペイロード事象はタイプ2とみなされる。一例としての基準は、事象が0.072msより長い場合にそれをタイプ2としてタグ付けすることである。バックグラウンドノイズ偽陽性事象を用いて、 $q_1 = 0.28$ (28%)を算出することができる。

【0172】

DNA-ペイロード結果は、モック(mock)検出実験として使用され、数学的フレームワークの式(1)を適用することによってタイプ2分子が存在するかどうかを判定するために使用することができる。タイプ2分子としてのSRY-1MSの場合、その結果は、 $Q(p) - Q_{s_d}(p) = 0.415 - 0.037 = 0.38 > 0.28$ であり、これは、SRY-1MS分子が99%の信頼度で存在すると言えることを意味する。タイプ2分子としてのSRY-2MSの場合、その結果は、 $Q(p) - Q_{s_d}(p) = 0.439 - 0.04 = 0.40 > 0.28$ であり、これは、SRY-2MS分子が99%の信頼度で存在すると言えることを意味する。一方、SRY事象集団は式(1)の基準を満たさないので、99%の信頼度でSRY分子がバックグラウンドを超えて存在するとは言えない。

10

20

30

40

50

【0173】

記録時間の関数としての $Q(p) \pm Q_{s_d}(p)$ のプロットは、各試薬タイプ(SRY、SRY-1MS、SRY-2MS)について図10に示される。それらの傾向はまた、バックグラウンド偽陽性事象から確立された偽陽性閾値と比較される。SRY-1MSとSRY-2MSは、記録の最初の5分以内に99%の信頼度で検出されることにも注目されたい。

【0174】

ある事象をタイプ2としてタグ付けする基準例は、その事象の持続時間が0.072msより長い場合であり、それは、両方のペイロード結合SRY分子タイプについて陽性の検出結果をもたらした。この結果は、持続時間閾値を変化させている間も維持され、その結果が一意的なまたは狭い基準値範囲に依存しないことを示す。事象持続時間が0.02~0.1msの間の任意の値である場合に、同じ検出結果が支持される。

10

【0175】

さらに、異なる基準を使用することもでき、検出結果は依然として保存される。具体的には、最大 $G > 1nS$ である場合に、事象をタイプ2としてタグ付けする基準を検討する。バックグラウンドノイズ偽陽性事象を用いて、 $q1 = 0.23$ (23%)を算出することができる。この基準を用いると、タイプ2分子としてのSRY-1MSの場合、結果は、 $Q(p) - Q_{s_d}(p) = 0.333 - 0.037 = 0.29 > 0.23$ であり、これは、SRY-1MS分子が99%の信頼度で存在すると言えることを意味する。タイプ2分子としてのSRY-2MSについては、2ペイロードを有するこれらの分子が比較的多数のより深い事象を生じさせるので、結果はより顕著である。具体的には、 $Q(p) - Q_{s_d}(p) = 0.581 - 0.041 = 0.54 > 0.23$ であり、これは、SRY-2MS分子が99%の信頼度で存在すると言えることを意味する。前述と同様に、SRY事象集団は、 $(Q(p) = 0.13$ であるので)式(1)の基準を満たさず、そのため99%の信頼度でSRY分子がバックグラウンドを超えて存在するとは言えない。

20

【0176】

最大 $G > 1nS$ の基準を用いる結果は、この基準が、SRY-1MS分子を含むバックグラウンドを超えてSRY-2MS分子を検出するためにも使用され得ることを示唆する。すなわち、アッセイが最初に単一MSペイロードを用いて1MS結合標的を検出し、続いて二重MSペイロード産物について試験する場合、最大 $G > 1nS$ 基準は、2MS結合標的が存在するかどうかを判定するために使用され得る。これは多重化(multiplexing)の形態を提供する。このデータセットでは、SRY-1MSがバックグラウンドの形態である場合、式(1)の適用において $q1 = 0.333$ である。 $Q(p) - Q_{s_d}(p) = 0.581 - 0.041 = 0.54 > 0.333$ であるので、SRY-2MS分子は、SRY-1MS分子を含むバックグラウンドを超えて99%の信頼度で存在すると言える。

30

【0177】

実施例4：より大きなペイロードを用いたより大きなナノ細孔内でのSRY遺伝子の検出

以下のデータは、化学修飾(ビオチン)を含むプライマーを用いてアンプリコンを「嵩高化」(bulking)する方法および「嵩高化」ペイロードが抗体である方法を実証する。ゲル画像は、1ペイロード結合SRY分子および2ペイロード結合SRY分子の信頼度を実証した(図11)。抗ビオチン抗体(bAb)は、モノストレプトアビジン(66kDa)よりも約3倍大きく(150kDa)、より大きなペイロードを提供する。より大きなペイロードを用いると、Ab結合SRY事象は、MS結合SRYについて観察されたよりも深いインピーダンスシフトを有することが予測され、データはそのことを示した。一例として、1.5nSよりも深いSRY-2MS事象の割合は、20nm細孔を用いて、16.0085%(150/937)である。比較すると、1.5nSよりも深いSRY-2bAb事象の割合は60.023%(1042/1736)であり、これには2倍大きい細孔(直径45nmの細孔、30nmの膜)を用いた。対照的に、ペイロードのないSRYは30分でわずか41事象しか生成せず、1.5nSよりも深い事象は12.2%にすぎなかった。図12は、ペイロードのないSRY(黒色)およびSRY-2bAb(ピンク色)について、細孔を通過する個々の分子の最大 G 対 持続時間の事象プロットを示す。したがって、より大きなペイロードは、より深い事象シグネチャを提供し、より大きなナノ細孔を用いてさえも(99%の信頼度での)検出を可能にする。

40

【0178】

実施例5：PCRバックグラウンドからのアンプリコンの識別

50

以下の実施例は、PCRアンプリコンがPCR反応混合物に起因するバックグラウンド事象から、2つの方法のうちの1つで識別され得ることを示す：少なくとも1000bpの長さのアンプリコンを使用することによる(図13)、またはペイロードを付加することによる(図14)。

【0179】

図13は、PCRバックグラウンドの存在下での0.7nMの1074bpアンプリコン(青色)、およびPCRバックグラウンド単独(黒色)についての、22nm膜中の25nm細孔を用いた、事象分布プロットを示す。PCRバックグラウンドの1:10希釈を両方の場合に使用した。希釈は、バックグラウンド事象率が期待されるアンプリコン率と比較してあまり大きくならないように、制御され得る。PCRからのバックグラウンドに起因する、かなりの分散した事象では、バックグラウンドと比較される標的配列の検出可能な事象率が識別因子になる。ここではアンプリコンが十分に長いので、検出は実行可能である。

10

【0180】

0.7nMの1074bp DNAは、15サイクルのPCR(5.6足場を使用する808pgの鑄型)後に達成され、精製することなく記録緩衝液に1:10で希釈し、10分間で1502事象(2.51/秒)を生じさせた。PCRバックグラウンドは、10分間に97事象(0.171/秒)をもたらした。測定されたPCR反応混合物は、鑄型の代わりに水(鑄型を加えた場合に使用されたであろう等量の水)を含む反応物を用いて生成され、同様に15回サイクリングし、その後記録緩衝液に1:10で希釈した。

【0181】

PCRバックグラウンドは、使用される増幅プロトコルに応じて存在し得る要素の中で特に、ハイブリダイズしていないプライマー、dNTP(デオキシヌクレオチド三リン酸、dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、ポリメラーゼ酵素(例えばTaqまたはPfu)、塩類(塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム)、BSA(ウシ血清アルブミン-安定剤)、界面活性剤(トリトンX-100)を含む。

20

【0182】

図14は、より短いアンプリコンが、PCR反応混合物のバックグラウンドを上回って検出可能であるために、どれだけペイロード結合を必要とするかを概念的に示す。具体的には、1MSペイロードを含まない(緑色)および含む(赤色)0.2nMの500bpアンプリコン事象(単一のプライマーが5'末端にビオチン修飾を有する)を、図13からのデータに重ね合わせる。ペイロードがないと、ペイロードのないDNAの事象率は、PCRバックグラウンドと比較して十分ではなく(30分間で29事象)、センサを通過するほとんどのDNAは検出されない。一方、ペイロード(500bp-MS)があると、事象率は検出にとって十分に高く(18分間で238事象)、DNA-ペイロード事象集団によって囲まれた事象のサブセット周辺の検出基準を同定することによって、統計的信頼度をもってバックグラウンドから識別され得る。PCRバックグラウンドを超えてアンプリコンを識別するための統計的信頼度を評価することは、以下の実施例で重点的に取り組む。

30

【0183】

実施例6：PCRバックグラウンドの存在下でのSRY遺伝子の検出

図16および17は、SRY-1MSおよびSRY-2MSが、PCRバックグラウンドの1:60希釈物の存在下に99%の信頼度で検出され得るが、SRY単独はPCRバックグラウンドから識別することができないことを示す。これらの結果は、15nm膜中の20nm細孔(100mV)を使用して得られた。図16は、PCRバックグラウンドのみ(赤色)、ペイロードのないSRY(青色)、SRY-1MS(黒色)およびSRY-2MS(シアン色)について、細孔を通過する個々の分子の平均G対持続時間の事象プロットを示し、その際、全てのSRY試薬はPCRバックグラウンドの1:60希釈物の存在下で試験した。PCRバックグラウンドのみでは40分で10の事象が生じ、20分で73事象のSRY(ビオチンなし、ペイロードなし)と比較される。SRY事象率はバックグラウンドよりもやや高いが、これらの事象集団はあまりにも重複しすぎて、信頼度をもってSRYを検出することができない。一例として、PCRバックグラウンドおよびSRYは、0.072msより長い事象を、それぞれ10%および4%有していた。対照的に、0.5nMのペイロード結合SRY事象は、これらの分子がペイロードのおかげでより観測可能にされるので、有意に高い捕捉率

40

50

を有していた。SRY-1MSは34分で1769の事象を生じさせ、SRY-2MSはわずか6分で326の事象を生じさせた。また、これら両方のペイロード結合アンプリコンについて検出の99%信頼度を達成するために、提示された数学的フレームワークを、次に詳述するように、適用することもできる。

【0184】

視覚的には、図16の事象プロットは、ペイロード結合事象が、より深い事象を比較的高い割合でもたらすことを示唆する。このことから、事象の深さに基づく基準が選択され得る。具体的には、平均 $G > 2.7\text{nS}$ の場合に、事象をタイプ2としてタグ付けする基準を検討する。PCRバックグラウンド偽陽性事象を用いて、 $q1 = 0.1$ (10%)を算出することができる。この基準を用いると、タイプ2分子としてのSRY-1MSの場合、結果は、 $Q(p) - Q_{s_d}(p) = 0.22 - 0.025 = 0.19 > 0.1$ であり、これは、SRY-1MS分子が99%の信頼度で存在すると言えることを意味する。タイプ2分子としてのSRY-2MSについては、2ペイロードを含むこれらの分子が比較的多数のより深い事象を生じさせるので、結果はより顕著である。具体的には、 $Q(p) - Q_{s_d}(p) = 0.34 - 0.067 = 0.27 > 0.1$ であり、これは、SRY-2MS分子が99%の信頼度で存在すると言えることを意味する。前述と同様に、SRY事象集団は、 $Q(p) = 0.066$ であるので式(1)の基準を満たさず、そのため99%の信頼度でSRY分子がバックグラウンドを超えて存在するとは言えない。

【0185】

記録時間の関数としての $Q(p) \pm Q_{s_d}(p)$ のプロットは、1:60希釈のPCRバックグラウンドの存在下での各試薬タイプについて図17に示され、ここでは記録時間の大きな違いのため横軸上の時間の正規化を行った。これらの傾向もまた、PCRバックグラウンド偽陽性事象から確立された偽陽性閾値と比較される。SRY-1MSとSRY-2MSの両方は、記録の最初の60秒以内に99%の信頼度で検出される。

【0186】

実施例7：PCRおよび全血バックグラウンドの存在下でのSRY遺伝子の検出

図18および図19は、SRY-1MSおよびSRY-2MSが、同時に2つの形態のバックグラウンドの存在下に99%の信頼度で検出され得ることを示す：第1の形態はモック「サンプル」(全血の1:20000希釈物)であり、第2はアンプリコンを生成するために使用したPCR反応試薬の1:100希釈物である。上記で検討された他の場合と同様に、SRY単独はこの形態のバックグラウンドから識別することができない。これらの結果は、25nm膜中の25nm細孔(100mV)を用いて得られた。

【0187】

全血の1:1000希釈物を最初に試験したところ、14分後に細孔の目詰まりが生じた。細孔を復活させるために、文献(Beamish, Eric, Harold Kwok, Vincent Tabard-Cossa, and Michel Godin. "Precise Control of the Size and Noise of Solid-State Nanopores Using High Electric Fields." *Nanotechnology* 23, no. 40 (September 14, 2012): 40530 1-8)において確立された技術に従って、該希釈物を灌流させ、制御された誘電コンディショニングを用いて細孔を広げた。短いアンプリコン(ペイロードなし)を検出するために小さい細孔を必要とした場合には、細孔拡大を必要とするそのような目詰まり現象が試験を終了させて、結果をもたらさないことに留意されたい。本発明者らのペイロード結合法は大きな細孔においてもアンプリコンの検出をもたらすので、細孔拡大を必要とする目詰まり現象(特に「ごちゃ混ぜの」(messy)サンプルを用いたとき、頻繁に起こり得る)が試験の失敗をもたらすことはない。代わりに、より大きな細孔はより一層多くのバックグラウンドに耐えることができ(より大きな細孔は目詰まりしにくい)、試験結果を依然として得ることができる。

【0188】

図18は、細孔を通過する個々の分子の最大 G 対 持続時間の事象プロットを示す。記録されたエポックは以下を含む：緩衝液のみ(12事象、30分)；全血(WB) 1:1000 (154事象、14分) - プロットされない；WB 1:20000 (157事象、16分) - プロットされた(シアン色)；およびDNA (0.5nMのピオチンなしのSRY、1:20000血液希釈物中)(23分間で293事

象)。ペイロードのないSRYは、WB単独の場合よりもタイトな持続時間および振幅分布を有していた。例えば、WBセットは0.072msより長い事象を20%有するのに対して、SRY単独はわずか8%を有する(より速い事象)。SRYに続いて、1:20000 WB中0.5nMのSRY-1MSを試験したところ、事象数の有意な増加が生じた:26分間で1093事象。これに続いて1:20000 WB中0.5nMのSRY-2MSを試験したところ、42分で1297の事象が生じた(全ての場合に、1:100 PCR反応混合物も存在した)。先の例と同様に、両方のペイロード結合アンプリコンについて検出の99%信頼度を達成するために、提示された数学的フレームワークを、次に詳述するように適用することができる。

【0189】

視覚的には、図18の事象プロットは、ペイロード結合事象が、特により長い事象について、より深い事象を比較的高い割合でもたらすことを示唆する。このことから、事象の深さに基づく基準が最小持続時間と共に選択され得る。具体的には、最大 $G > 3nS$ および持続時間 $> 24\mu s$ の場合に、事象をタイプ2としてタグ付けする基準を検討する。1:20000 WB + 1:100 PCRバックグラウンド偽陽性事象を用いて、 $q1 = 0.096$ (9.6%)を算出することができる。この基準を用いると、タイプ2分子としてのSRY-1MSについて、結果は、 $Q(p) - Q_{s_d}(p) = 0.184 > 0.096$ であり、これは、SRY-1MS分子が99%の信頼度で存在すると言えることを意味する。タイプ2分子としてのSRY-2MSについては、2ペイロードを有するこれらの分子が比較的多数のより深い事象を生じさせるので、結果はより顕著である。具体的には、 $Q(p) - Q_{s_d}(p) = 0.348 > 0.096$ であり、これは、SRY-2MS分子が99%の信頼度で存在すると言えることを意味する。前述と同様に、ペイロードのないSRY事象集団は、($Q(p) = 0.024$ であるので)バックグラウンドの存在下で式(1)の基準を満たさず、そのため99%の信頼度でSRY分子がバックグラウンドを超えて存在するとは言えない。

【0190】

記録時間の関数としての $Q(p) \pm Q_{s_d}(p)$ のプロットは、1:20000 WB + 1:100 PCRバックグラウンドの存在下での各試薬タイプについて図19に示される。これらの傾向もまた、バックグラウンド偽陽性事象から確立された偽陽性閾値と比較される。SRY-1MSとSRY-2MSは両方とも、記録の最初の90秒以内に99%の信頼度で検出される。

【0191】

実施例8：非標的DNAバックグラウンドの存在下でのSMCY遺伝子の検出

図21および22は、SMCY-1MSが、モック形態のバックグラウンドとして豊富にある非標的DNAの存在下に99%の信頼度で検出され得ることを示す。対照的に、SMCY単独では、この形態のバックグラウンドから識別することができない。これらの結果は、15nm膜中の21nm細孔(100mV)を用いて得られた。

【0192】

ペイロード結合SMCYアンプリコンをゲル検査した後(図20)、以下の試薬類を同じナノ細孔で逐次試験した。モック形態のバックグラウンドとして、等しい濃度のSRY(470bp)の存在下でのSMCY(362bp)を合計0.5nM(それぞれ0.25nM)で試験した。SMCY単独(図示せず)はSRY単独から識別することができなかった。具体的には、より短いSMCYアンプリコンは、電氣的バックグラウンドのみに匹敵する事象率を有するのに対して、SRYは電気ノイズバックグラウンド事象の約5倍の事象率を有していた。したがって、SRY + SMCYにおいて28分にわたって記録された560事象の大部分は、SRYに起因する可能性が高いが、どの事象がいずれのアンプリコンに起因するかを識別する方法はない。この形態のバックグラウンドの中でSMCYの存在を検出するために、一端にビオチン化プライマーを用いて、MSを結合させた。0.5nMのSMCY-1MSでは、1879の事象が20分にわたって記録された。

【0193】

図21は、細孔を通過する個々の分子の平均 G 対 持続時間の事象プロットを示す。視覚的には、該事象プロットは、ペイロード結合事象が、より深い事象を比較的高い割合でもたらすことを示唆する。このことから、最大 $G > 4nS$ の場合に事象をタイプ2としてタグ付けする基準が選択され得る。SRY + SMCYバックグラウンド偽陽性事象を用いて、 $q1 = 0.116$ (11.6%)を算出することができる。この基準を用いると、タイプ2分子としてのSRY-

1MSについて、結果は、 $Q(p) - Q_{s,d}(p) = 0.287 - 0.026 = 0.26 > 0.116$ であり、これは、SRY-1MS分子が99%の信頼度で存在すると言えることを意味する。前述と同様に、ペイロードのないSRY事象集団は、バックグラウンドの存在下で式(1)の基準を満たさず(図示せず)、そのため99%の信頼度でSMCY分子がバックグラウンドを超えて存在するとは言えない。

【0194】

記録時間の関数としての $Q(p) \pm Q_{s,d}(p)$ のプロットは、非標的DNA(主にSRY)バックグラウンドと比較して、SMCY-1MSについて図22に示される。SRY-1MSは、記録の最初の2分以内に99%の信頼度で検出される。

【0195】

実施例9：アンプリコン濃度の定量化

図23は、捕捉率が濃度と線形であること、および対照を用いて線形傾向を確立し、濃度を推定するためにその線に測定された捕捉率をマッピングすることによって、未知の濃度が推定され得ることを示している。これは、未知サンプルの捕捉率動態に一致する対照(すなわち、同じアンプリコン長さを使用し、ペイロードを用いる場合は同じペイロード(複数可)を有する対照)を使用することを意味する。細孔サイズ間に捕捉率の違いがあるが、同じ細孔に未知サンプルに先立って対照を通すことによって、この不確実性の原因は取り除かれる。

【0196】

図23のデータは、15nm膜中の24nm細孔を用いて、ペイロードのない1074bpアンプリコンを用いて確立された。それぞれの既知および未知濃度についての捕捉率は、捕捉までの時間分布(time-to-capture distribution)を指数分布としてフィッティングすることによって決定される(これはナノポア科学の分野で周知であり、例えば、Wang, Hongyun, Nicholas Hurt, and William B Dunbar. "Measuring and Modeling the Kinetics of Individual DNA-DNA Polymerase Complexes on a Nanopore." ACSNano 7, no. 5 (May 28, 2013): 3876-86に記載される)。

【0197】

1074bpのアンプリコンのストックを作るためにエンドポイントPCRを用いて、対照を生成させた。それをシリカで精製し、分光光度法を用いて定量化した。各対照を生成するために、ストック溶液を記録緩衝液中に希釈し、記録実験の前に再度測定した。使用した標準濃度は、0.075nMから1.1nMまで(0.075nM、0.15nM、0.8nM、1.1nM)の範囲であった。未知サンプルを生成するために、長さが5600bpである出発物質100pgから1074bpのアンプリコンを生成するプライマーを用いて、20回のPCRサイクルを行った。サイクリング後、その反応物を記録緩衝液で1:50に希釈し、ナノ細孔実験を実施した。対照に対してフィッティングして未知濃度を推定し、その推定値に不確実性を割り当てる方法は、セクション「測定された捕捉率からの濃度の推定」に示される。この例での推定値の場合、50倍希釈での0.7nMは35nMに相当し、これは希釈前のサンプルについて分光測定値から推定された値51nMに近い。

【0198】

実施例10：mnoPCRの性能

図24および25は、本発明者らの整数(m) ナノ細孔(n) 観測可能(o) PCR (Integer(m) nanopore(n) observable(o) PCR : mnoPCR)法の有効性を示す。両方のデータセットについて、3つの既知濃度の標準品の捕捉率を、ナノ細孔を用いて最初に測定し、未知サンプルをマッピングすることができる曲線を確立した。図24では、未知濃度のサンプルをPCRサイクル12、13および14の後に通し、対応する濃度を推定した。図25では、その後、一般的な出発物質およびサイクル数を用いた3つの別個のPCR反応物の測定された捕捉率を比較することによって、未知サンプルの測定の精度を評価した。

【0199】

図24は、0.2、0.7および1.2nMの標準品からの標準曲線を示し、未知サンプルのサイクル12、13および14を、該測定における99%信頼度を示すエラーバー(+/-0.46nM)つきの該曲線にマッピングした。1M LiCl, 10mM Tris, 1mM EDTA (pH7.5)中100mVで記録を取り、1

10

20

30

40

50

0kHzで再フィルタリングした。細孔径は22~25nmであり、膜の厚さは30nmであった。得られた未知サンプルの濃度は、12、13および14サイクルについて、それぞれ1.32nM、2.42nMおよび4.56nMであった。先の例と一致して、バックグラウンド事象は記録された事象の総数の1%未満であった。標準品および未知サンプルについての事象プロット(図示せず)は、記録されたアンプリコンの全てが同じ長さであることから、予想通りに、タイトな重複したグルーピングを示した。図24のプロットは、標準品(赤色の点)および青色の未知サンプル(サイクル12、13および14)が標準曲線にほぼ一致することを示す。各標準品の測定における該線および誤差の直線性に基づいて、記録された濃度は誤差5%以内で99%正確である。

【0200】

反応の進行に従って各サイクル(またはサイクルの任意の組み合わせ)後に測定することにより、アンプリコンがどのサイクルで検出可能であるかを決定できるようになる。さらなる情報は、例えば反応が対数期にあるとき、反応の進行に従ってアンプリコンを測定する場合に得ることができ、PCR反応の実際の効率(すなわち、理論上の倍加は正確には達成されないことが多いため)、エンドポイント検出、および異なる標的配列数の2つ以上のサンプル間の正確な比較に関する情報が得られる。ここで、対数期はサイクル13で開始し、反応あたりの効率は1.8倍である(理論上の2.0ではない)。サイクル10で検出を開始した。

【0201】

これらのデータは推定された濃度の5%最大誤差を生じ、これは出発物質の1.1倍の差の識別が可能ならずであることを示唆する。この例は、出発濃度が様々である2つ以上のサンプル間で正確な比較を行うことができることを示し、これはqPCRによく似ているが、分子の集合体からの蛍光とは対照的に、ナノ細孔が単一分子をカウントするので、より正確である。

【0202】

図25は、定量精度を評価した結果を示す。具体的には、同じ対数期サイクル数(20サイクル)および同じ出発物質質量を使用して、3つの独立したPCR反応を行って産物を生成させた。濃度の推定値は非常に保存されていて、精度を実証する。結果は次の推定値を含む: 20サイクルA = 54.3nM; 20サイクルB = 57.4nM; 20サイクルC = 58.1nM。アッセイ精度 = 4% (散らばり/平均)。さらに、サイクル数が変化する場合、繰り返し実験を通して1~5%の精度性能が観察された。

【0203】

実施例11: mnoPCRによる出発物質の推論

この実施例の集計データは、増幅前のサンプル中の分子の開始数を計算するためのワークフローのコンポーネントを示す。対照を用いると、mnoPCR法の反応効率を特定し、かつ反応がいつ対数期に入るかを特定することができる。図26は、サイクル10、12、13、14、15、17、20、30、35、40後の反応を測定した後のシグモイド(S字状)曲線を示す。具体的には、PCRを行って、サイクル10、12、13、14、15、17、20、30、35、40後にサンプルを採取する。各サイクルをナノ細孔に独立して流し込む。対照として、これを用いて捕捉率対濃度の線形傾向を確立することができる; 未知のサンプルとして、その捕捉率を該線に対してフィッティングして、示されたサイクルの後に生成された産物の量を濃度推定方法によって決定する。一連のPCRサイクル産物を試験する前に捕捉率対濃度の傾向を確立するために、2つの対照(高濃度および低濃度)しか試験する必要がないことに留意されたい。この対照データセットでは、該反応はサイクル15の後に対数期に入り、1.7倍の準最適倍加を示し、サイクル35の後に終点に達した。実際には、これは、定量化された反応効率性能および出発物質の量を推定するための未知の曲線と共に使用される、対照曲線として役立ち得る。

【0204】

アンプリコンが添加(または生成)される共通のチャンバを共有する細孔のアレイを用いると、より低いサイクル数を、許容される大きな希釈度でより早く検出することができ、

10

20

30

40

50

該曲線のより低い濃度端において良好な分解能および散らばりが得られることに留意されたい。これは、ひいては、未知サンプルの定量化およびより低い推論誤差を改善するであろう。

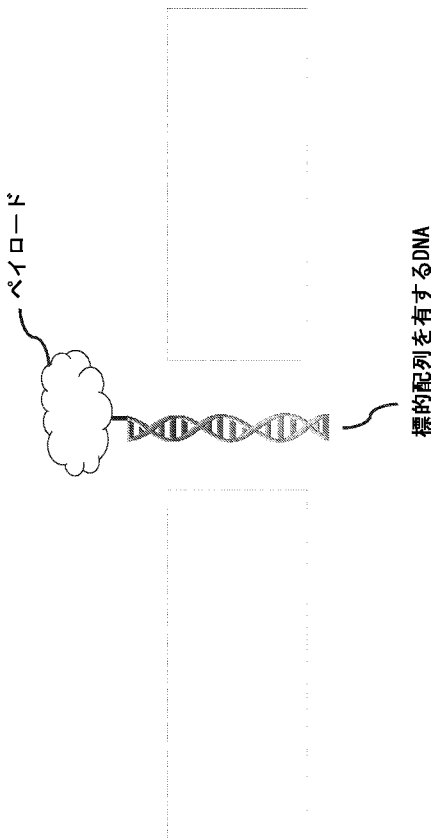
【0205】

実施例12：PCR反応混合物の最小希釈度の検討

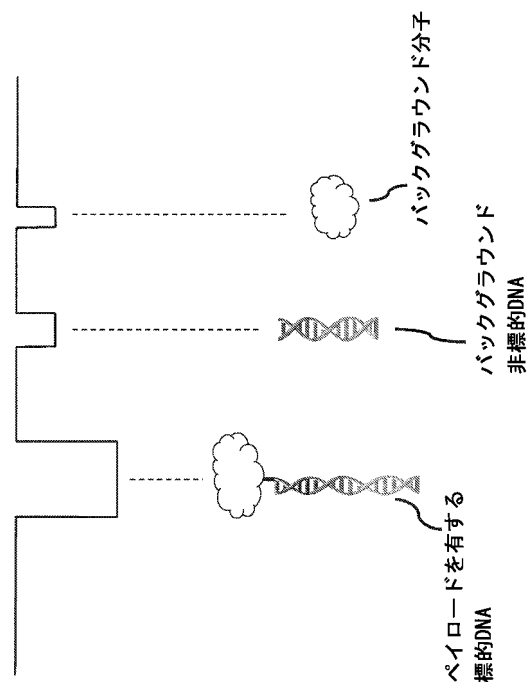
図27および28は、mnoPCR法の忠実度を依然として維持しながら、希釈がどの程度必要であるかを検討する。図27は、細孔を通過する個々の分子の平均 G 対 持続時間の事象プロットを示す。該プロットは、陰性対照(水)を用いた15サイクル後の1：1.17希釈のPCR反応混合物(85.7%のPCR反応混合物)についての事象(赤色)、続いて、事象の大きな増加を示す、同じ混合物であるが生成された1074bpアンプリコンを含む混合物(陽性対照、15サイ

10

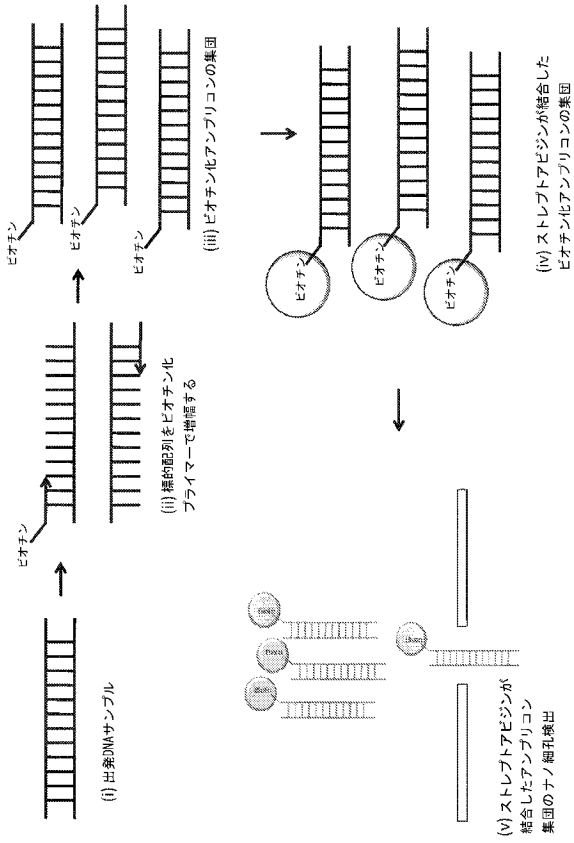
【図1】



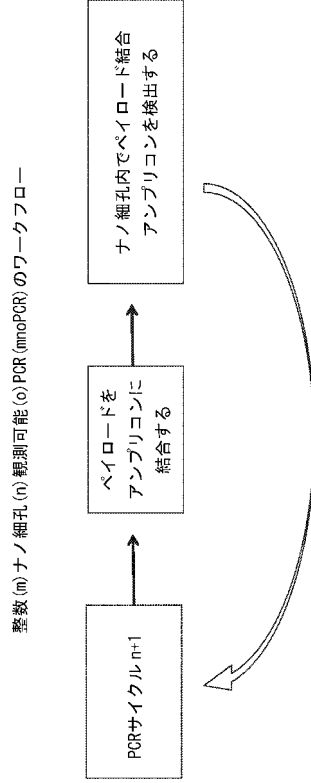
【図2】



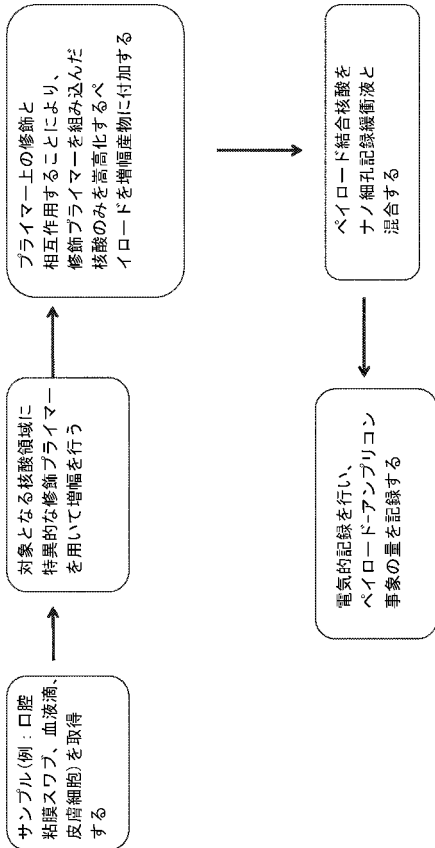
【図 3】



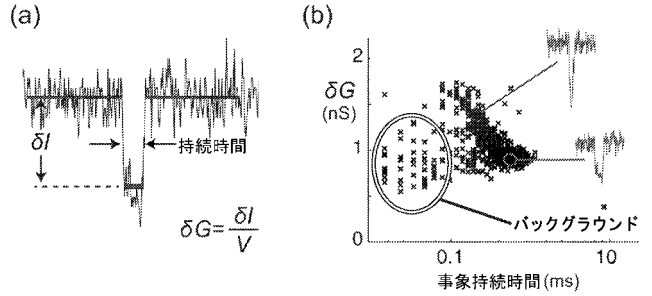
【図 4】



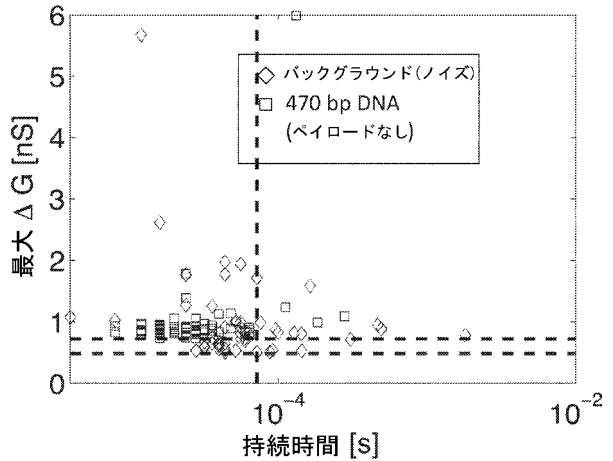
【図 5】



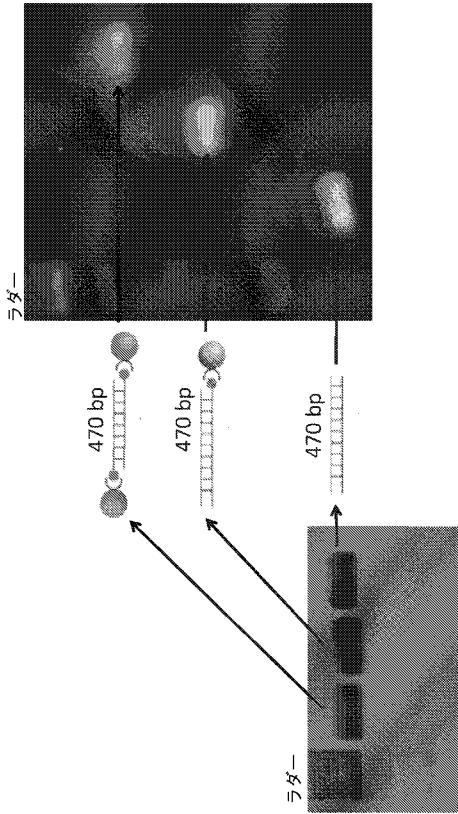
【図 6】



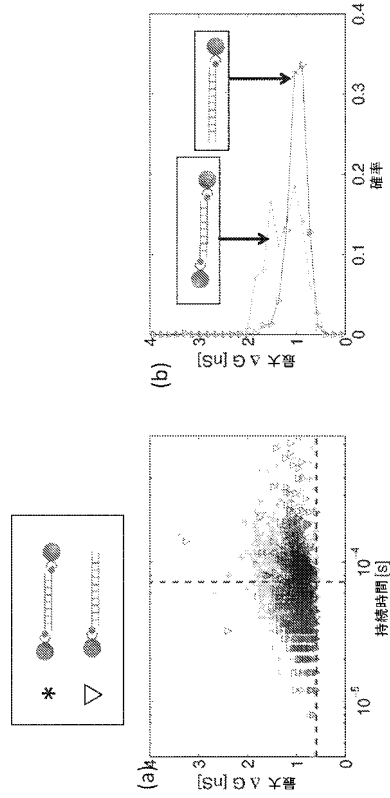
【図 7】



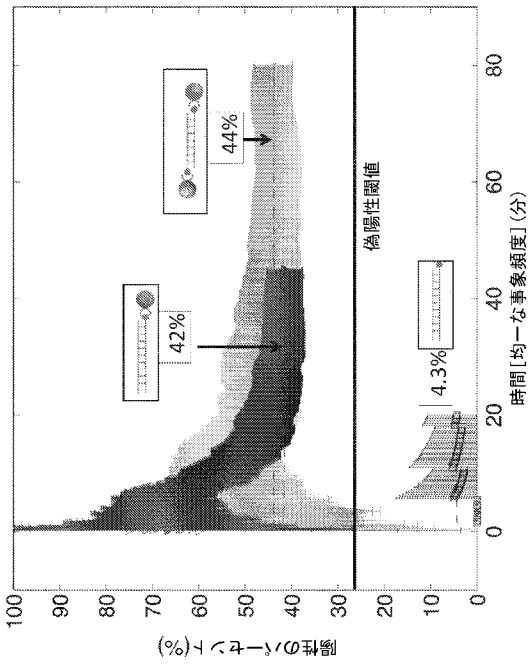
【 図 8 】



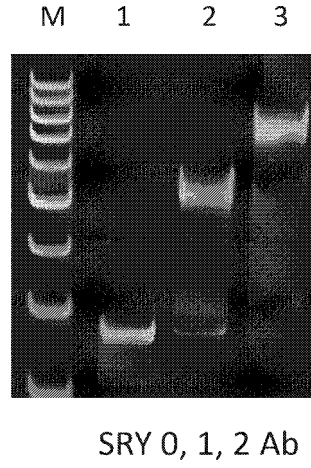
【 図 9 】



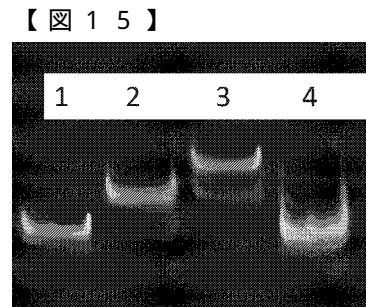
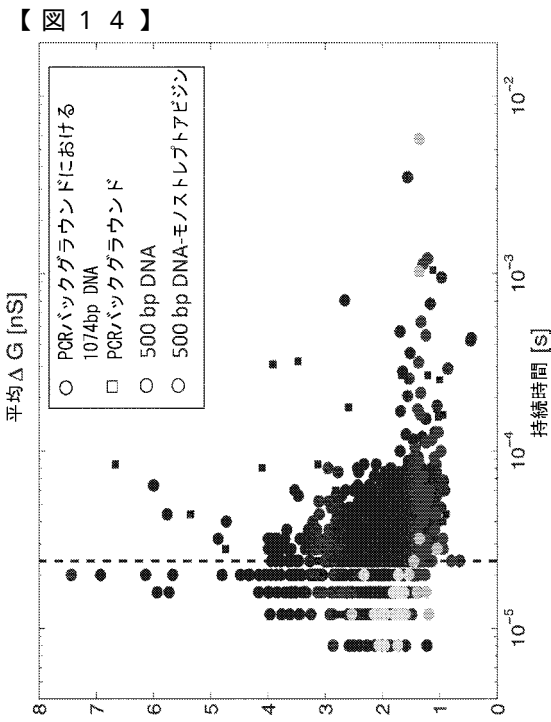
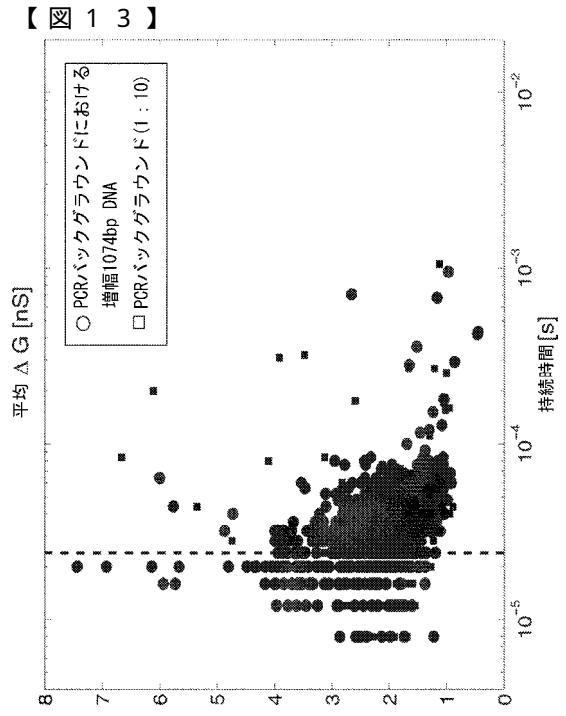
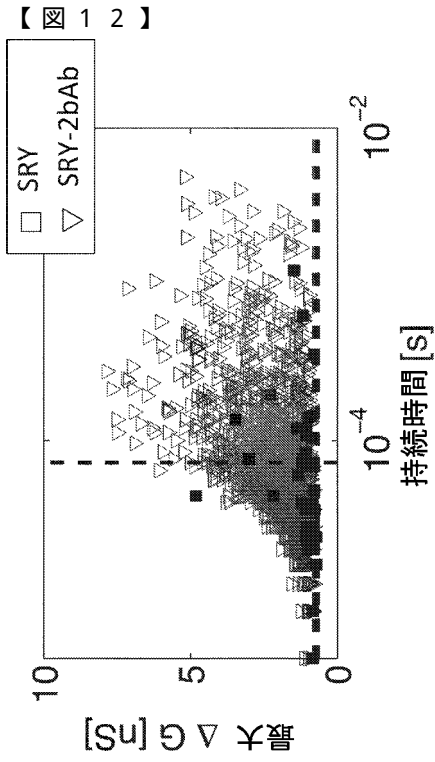
【 図 10 】



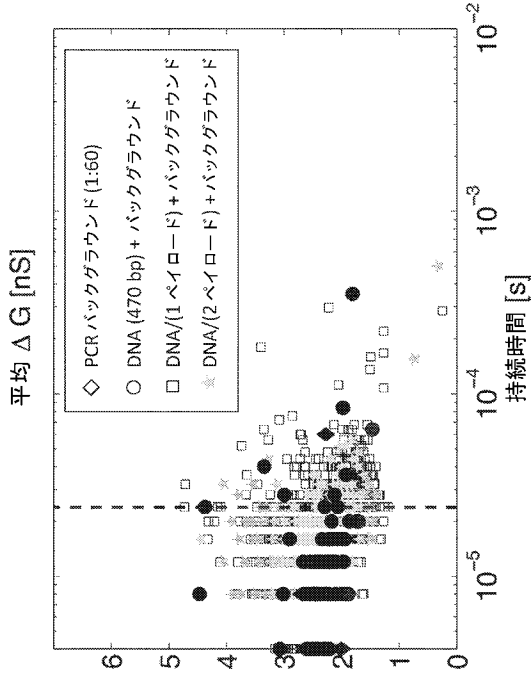
【 図 11 】



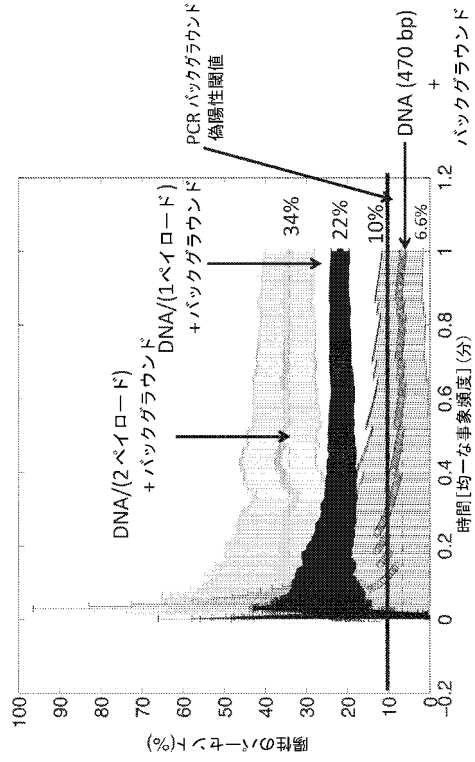
SRY 0, 1, 2 Ab



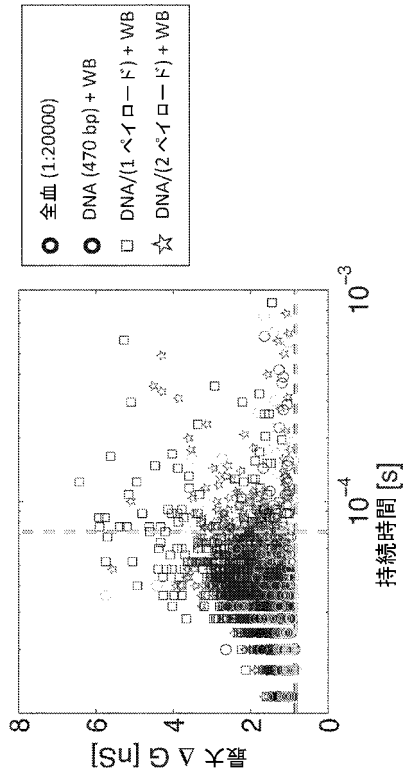
【図 16】



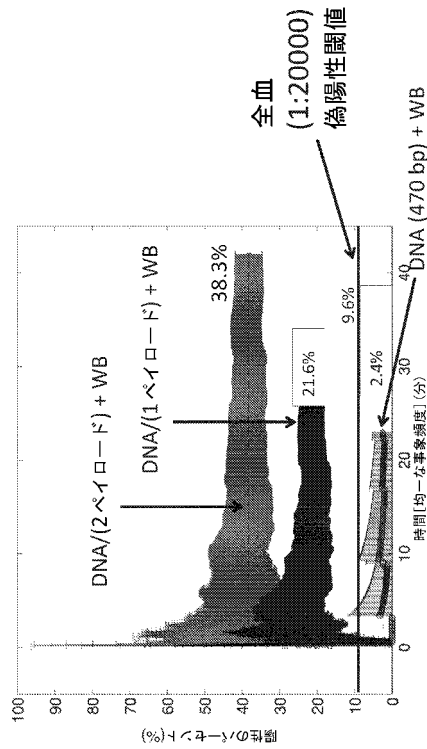
【図 17】



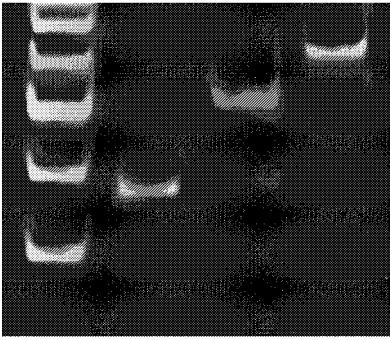
【図 18】



【図 19】

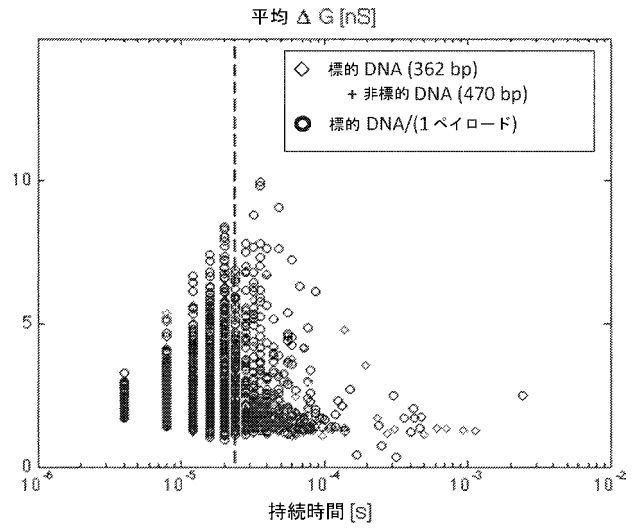


【図 20】
M 1 2 3

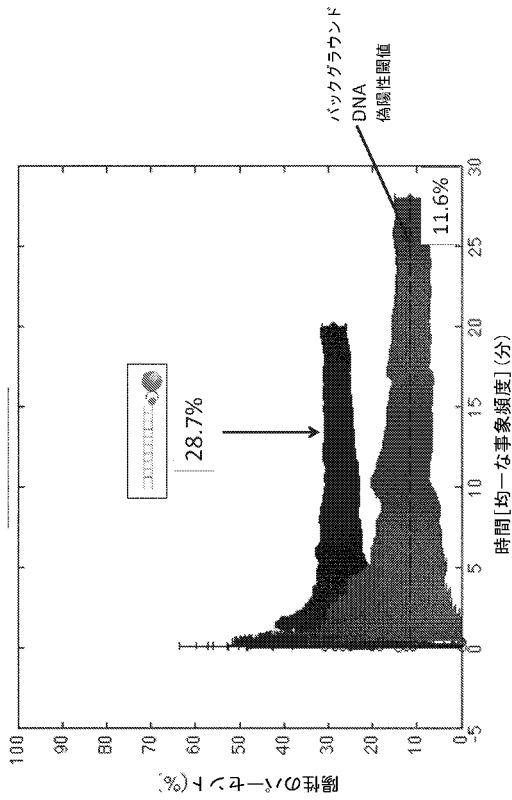


SMCY 0, 1, 2 MS

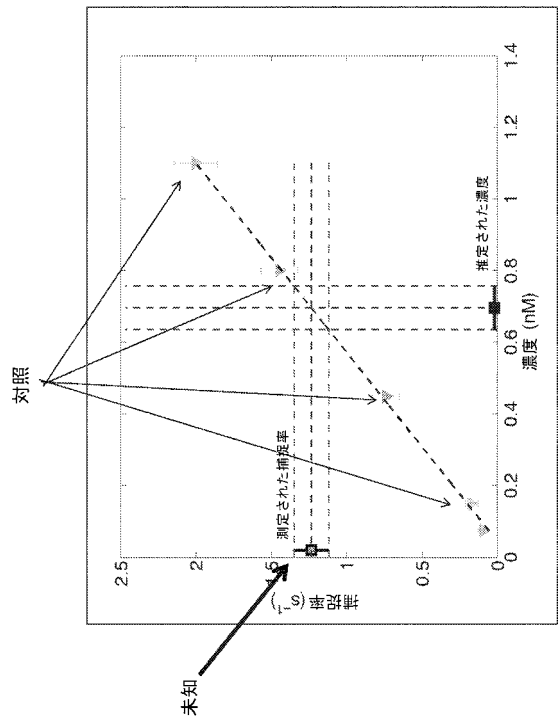
【図 21】



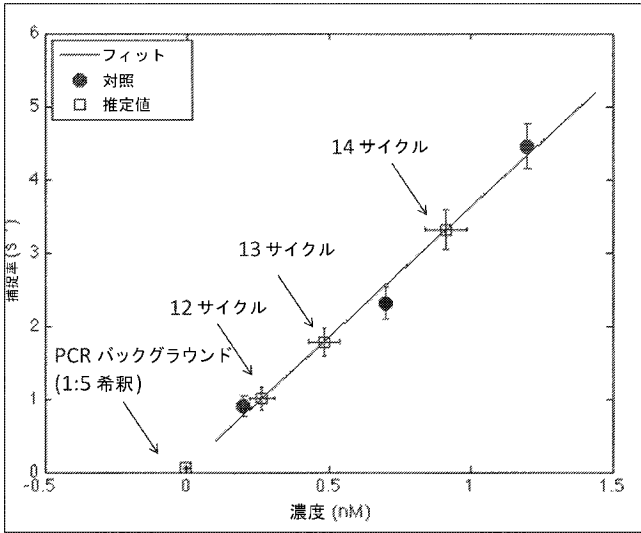
【図 22】



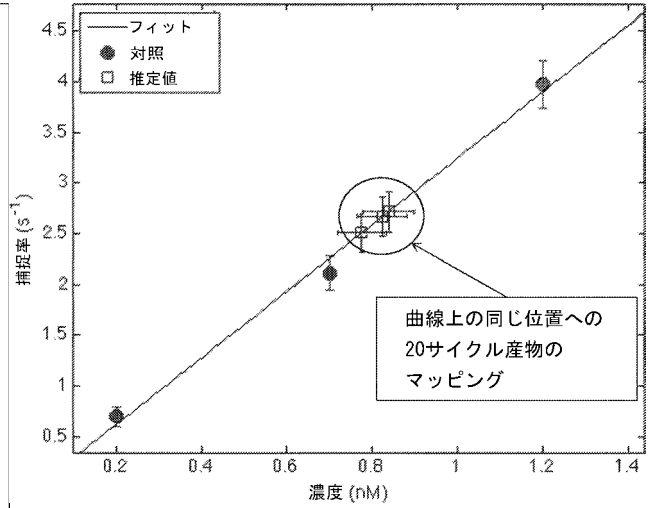
【図 23】



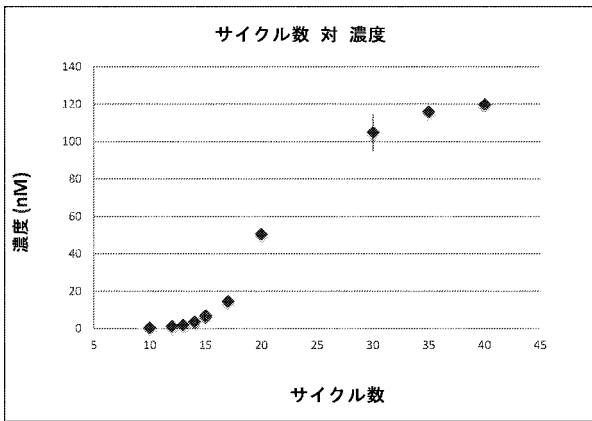
【 図 2 4 】



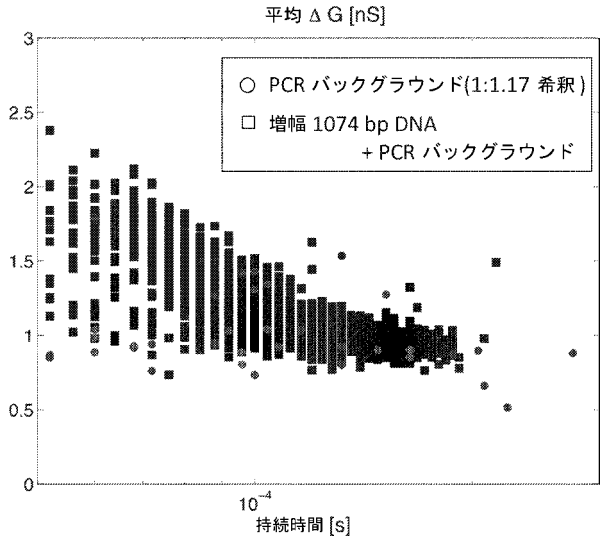
【 図 2 5 】



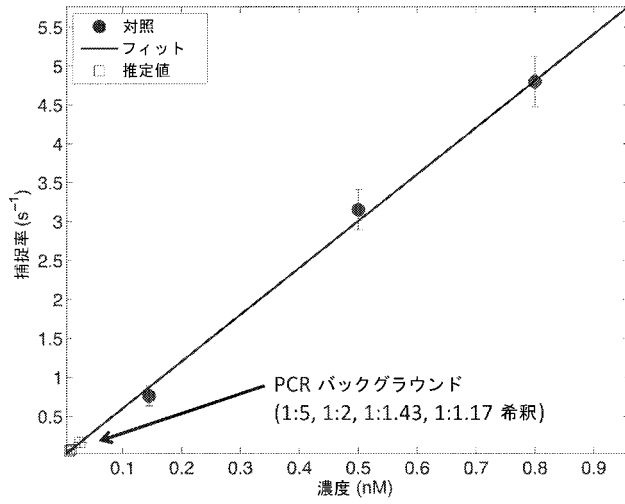
【 図 2 6 】



【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成29年9月15日 (2017.9.15)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

[201850541400001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/016233

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)
1.	<p>With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> forming part of the international application as filed:</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input checked="" type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:</p> <p style="margin-left: 20px;"><input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p>
2.	<p><input checked="" type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p>
3.	<p>Additional comments:</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/016233

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68 (2016.01) CPC - C12Q 1/68 (2016.02) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12Q 1/00, 1/68; G01N 33/00, 33/48 (2016.01) CPC - C12Q 1/00, 1/68; G01N 33/00, 33/48 (2016.02)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched U.S. Classes - 435/4, 283.1, 287.1, 287.2 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, PubMed, Google. Search terms used: detect polynucleotide sequence primer hybridize amplification nanopore pass through sensor		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014/0329225 A1 (TWO PORE GUYS, INC.) 06 November 2014 (06.11.2014) entire document	1-100
A	US 2008/0280369 A1 (BAZAN et al) 13 November 2008 (13.11.2008) entire document	1-100
A	GU et al. "Detection of miRNAs with a nanopore single-molecule counter," Expert Review of Molecular Diagnostics, 09 January 2014 (09.01.2014), Vol. 12, Iss. 6, Pgs. 573-584 (Pgs. 1-19 of PDF), entire document	1-100
A	US 2007/0048745 A1 (JOYCE et al) 01 March 2007 (01.03.2007) entire document	1-100
A	US 2002/0197618 A1 (SAMPSON) 26 December 2002 (26.12.2002) entire document	1-100
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defying the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 April 2016		Date of mailing of the international search report 06 May 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 モリン トレバー ジェイ .
アメリカ合衆国 95060 カリフォルニア州 サンタクルーズ デラウェア アベニュー 2
161 #ビー ツー ポア ガイズ インコーポレイテッド内

(72) 発明者 シュロップシャー タイラー
アメリカ合衆国 95060 カリフォルニア州 サンタクルーズ デラウェア アベニュー 2
161 #ビー ツー ポア ガイズ インコーポレイテッド内

(72) 発明者 ダンバー ウィリアム ビー .
アメリカ合衆国 95060 カリフォルニア州 サンタクルーズ デラウェア アベニュー 2
161 #ビー ツー ポア ガイズ インコーポレイテッド内

(72) 発明者 ヘラー ダニエル エイ .
アメリカ合衆国 95060 カリフォルニア州 サンタクルーズ デラウェア アベニュー 2
161 #ビー ツー ポア ガイズ インコーポレイテッド内

(72) 発明者 ワン ホンユン
アメリカ合衆国 95060 カリフォルニア州 サンタクルーズ デラウェア アベニュー 2
161 #ビー ツー ポア ガイズ インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 2G060 AA07 AD06 AE20 AF20 AG11 HC13 KA09
4B063 QA01 QA18 QQ01 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR41 QR50 QR51
QR55 QR62 QS24 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39 QX01 QX04