

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6046058号
(P6046058)

(45) 発行日 平成28年12月14日 (2016. 12. 14)

(24) 登録日 平成28年11月25日 (2016. 11. 25)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 27/00 (2006.01) GO 1 N 27/00 Z

請求項の数 21 (全 46 頁)

(21) 出願番号	特願2013-556907 (P2013-556907)	(73) 特許権者	506115514
(86) (22) 出願日	平成24年3月2日 (2012. 3. 2)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア
(65) 公表番号	特表2014-508300 (P2014-508300A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 607 オークランド フランクリン ス トリート 1111 トゥエルフス フロ ア
(43) 公表日	平成26年4月3日 (2014. 4. 3)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/027531	(74) 代理人	100147485
(87) 国際公開番号	W02012/122029		弁理士 杉村 憲司
(87) 国際公開日	平成24年9月13日 (2012. 9. 13)	(74) 代理人	100119530
審査請求日	平成27年3月2日 (2015. 3. 2)		弁理士 富田 和幸
(31) 優先権主張番号	61/449, 379	(74) 代理人	100136858
(32) 優先日	平成23年3月4日 (2011. 3. 4)		弁理士 池田 浩
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可逆的なイオン及び分子検出又は移動用ナノポアデバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の検体を検出する装置に用いるナノピペットであって、このナノピペットが、
(a) ナノポアに至るナノピペットの内部ポアを規定するキャピラリー部分
を具備、

(b) 前記内部ポアは、その内部に電極と、前記ナノポアを通して外部溶液と連通する内
部溶液とを含むように適合されており、
前記ナノピペットが更に、

(c) 前記ナノポアの内側表面上の被膜であって、

(i) 前記内側表面に直接結合された高分子電解質の層と、

(ii) 前記高分子電解質に結合され、イオン又は200原子質量単位よりも少ない分
子量を有する小分子より成る群から選択した検体を結合するのに特異的な結合分子と
を有する当該被膜
を具備しているナノピペット。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のナノピペットにおいて、前記結合分子をボロン酸としたナノピペット
。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のナノピペットにおいて、前記高分子電解質をポリカチオンとしたナノ
ピペット。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のナノピペットにおいて、前記ポリカチオンをポリアルキルピリジン又はポリアミンとしたナノピペット。

【請求項 5】

請求項 2 に記載のナノピペットにおいて、前記被膜が更に、前記ナノポア内に延在するとともにこのナノポアを部分的に封鎖する部分を有しているナノピペット。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のナノピペットにおいて、前記結合分子をキレート剤としたナノピペット。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のナノピペットにおいて、前記高分子電解質の層を、(a) ポリアクリルの層と、(b) ポリアミンの層と、(c) ポリアクリル及びポリアミンの交互に重なった層とより成る群から選択したナノピペット。

10

【請求項 8】

請求項 7 に記載のナノピペットにおいて、前記ポリアミンをポリアルキルピリジンとしたナノピペット。

【請求項 9】

請求項 1 に記載のナノピペットにおいて、前記結合分子を、多糖又はポリペプチドであるイオン結合ポリマーとしたナノピペット。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のナノピペットにおいて、前記イオン結合ポリマーをキトサンとしたナノピペット。

20

【請求項 11】

請求項 9 に記載のナノピペットにおいて、前記イオン結合ポリマーをカルモジュリンとしたナノピペット。

【請求項 12】

試料中の糖検体を測定するナノピペット装置であって、このナノピペット装置が、前記試料内に開口するナノポアを有する請求項 1 に記載のナノピペットと、内部溶液と接触するように配置された、前記内部ポア内の電極、及び前記試料と接触するように配置された基準電極と、

30

を具え、

前記被膜は、糖を結合するのに特異的であり、この糖を結合させるのに有効な結合分子を有しており、

前記ナノピペット装置が更に、

電極間に電圧を発生させるとともに、前記試料、前記ナノポア及び前記内部溶液を通る正及び負のイオン電流を測定し、前記試料中の糖が、前記結合分子を有する前記被膜に結合された際に、負のイオン電流に濃度に依存する変化を生ぜしめるようにする電圧制御回路

を具えているナノピペット装置。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のナノピペット装置において、前記結合分子をタンパク質としたナノピペット装置。

40

【請求項 14】

請求項 12 に記載のナノピペット装置において、前記結合分子をボロン酸としたナノピペット装置。

【請求項 15】

請求項 12 に記載のナノピペット装置において、前記ナノピペットを石英としたナノピペット装置。

【請求項 16】

請求項 12 に記載のナノピペット装置において、前記電圧制御回路が電圧クランプ増幅

50

器を有しているナノピペット装置。

【請求項 17】

請求項 12 に記載のナノピペット装置において、前記被膜がポリカチオンを有しているナノピペット装置。

【請求項 18】

前記結合分子が検出用分子であり、そして、前記高分子電解質の層および前記検出用分子は、ナノポア内に延在してこのナノポアを部分的に遮断するようにナノポアに被着する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 19】

結合分子を、多糖であるイオン結合ポリマーとした請求項 1 に記載のデバイス。

10

【請求項 20】

糖尿病の危険性がある対象者が必要としうるためにグルコース検出に対し適合させた請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 21】

請求項 1 に記載されたナノピペット装置を用いて、試料中の検体を決定する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ナノ材料、特にナノポアデバイス及びセンサに関するものである。特に、本発明は、ナノスケールでのイオン電流測定を用いてイオン及び糖質（炭水化物）を検出したり、操作及び検出したりすることに関するものである。

20

【背景技術】

【0002】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2011年3月4日に出願された出願番号61/449,379の米国特許仮出願の優先権を主張するものであり、この全体は、参考のためにここに導入されるものである。

【0003】

[政府支援声明]

本発明は、米国航空宇宙局（NASA）により与えられた契約番号NCC9 165及びNNX08BA47Aや、米国国立衛生研究所により与えられた契約番号P01 HG 000205や、NASAにより与えられた契約番号NNX09AQ44Aや、米国国立がん研究所により与えられた契約番号U54CA143803の下での政府支援に基づいて達成されたものである。米国政府はこの発明に、ある権利を有するものである。

30

【0004】

[配列表、コンピュータプログラム又はコンパクトディスクに関する参照]

該当なし。

【0005】

[関連技術]

本発明の幾つかの観点に関する背景情報を以下に記載する。その理由は、これらの背景技術は、本発明の詳細な説明において関連するも、必ずしも詳細に説明していない技術的な特徴に関するものである為である。すなわち、本発明で用いられる個々の部分及び方法は、以下に記載する資料に詳細に説明されており、これらの資料により、特許請求の範囲に記載した本発明の幾つかの観点を達成又は使用する上で当業者に更なる助言を与えうるものである。以下の説明は、本発明の特許請求の範囲の如何なる請求項又は説明資料の従来技術の効果に対する情報の妥当性に関し承認されたものとして解釈されるべきものではない。

40

【0006】

（ナノポアイオン電流モジュレータ）

固体（ソリッドステート）のナノポアは、ナノ粒子のサイズ選択的合成のために、生体チャンネルを模倣するのに用いる安定構造体として、又はナノスケールセンサとして極め

50

て関心があるものである。円錐形の、又は非対称のナノポアは、電位依存性のイオン電流を表示するとともにナノ流体ダイオードとして機能しうるナノチャネルの明確な範疇に属するものである。幾つかの組織は、非対称のナノポアを含む膜を横切るイオン電流測定を用いる電気センサを開発した（文献：Langmuir 22, 10837-10843, doi: 10.1021/la061234k (2006) の “Resistive-pulse DNA detection with a conical nanopore sensor” (Harrrell C. C.氏等著)、Nanomedicine 3, 787-796, doi: 10.2217/17435889.3.6.787 (2008) の “Resistive-pulse detection of short dsDNAs using a chemically functionalized conical nanopore sensor” (Kececi K. 氏等著)、Mol. Biol. Syst. 3, 667-685, doi: 10.1039/b708725j (2007) の “Developing synthetic conical nanopores for biosensing applications” (Sexton氏等著)、BiosciL 10, 28-32, doi: 10.1002/mabL200900198 (2010) の “Biosensing with Functionalized Single Asymmetric Polymer Nanochannels, Macromol” (Au M.氏等著)参照)。このようなデバイスは一般に、トラックエッチング法により形成されている。石英キャピラリー（毛管）から製造された石英ベースのナノポアは、多くの同じ電気特性を呈するが、レーザブラーを用いて急速に形成されている。ナノピペットとも称される石英の円錐状ナノポアは、他の非対称のナノチャネルの多くの特性を呈するものであり、しかもポアを、高空間解像度で、すなわち細胞をナノスケールで撮像するのに用いられている特性で操作しうるという点で有利なものである。

【 0 0 0 7 】

円錐状のナノポアを調査したところ、バルク材料に関する現存の着想に対し課題となる新たな化学的及び電氣的現象が生じた。最近、ポリエチレンテレフタレート（PET）膜内の円錐状のナノポア（2～8 nmの直径）での整流に対してイオン電流の発振（振動）が観察され、これらの発振は、電圧誘起により溶解性の弱い塩類が集中することにより生ぜしめられたポア内での動的析出に起因するものであった。窒化珪素又はホウケイ酸塩のガラスのより大きなポア内での電流発振は、溶解度が異なる有機分子を用いる2種の溶媒の界面に発生させることができる。これらの現象は、析出のような非平衡事象を実時間及びナノスケールで電氣的に観察する新たな方法を提供する。

【 0 0 0 8 】

（ナノポアセンサ）

生体チャネルを模倣する能力及び安定性は、ナノポアベースのプラットフォームを（生体）分子の相互作用を研究するための対象とする。固体のナノポアは安定であり、これらの直径はその製造処理中制御でき、これらをデバイス及びアレイ中に集積化しうる。更に、これらの表面特性を化学的官能化により容易に調整し、化学的及び生化学的に反応するナノポアの開発を可能にすることができる。ナノポアベースのセンサは、タンパク質を含む受容体、DNA、アプタマー、リガンド及び小さな生体分子が合体して、種々の検体を標的とするようにしうる。多くの固体のナノポアの反応にとって不可欠であるのは、溶液中のイオンと、帯電した非対称形状のナノチャネル又は円錐状のナノポアの表面との間の選択的相互作用から生じるイオン電流整流（ICR）の特性である。ICRを呈し且つセンサとして用いられるナノ材料は、ポリマー膜及び石英ナノピペット内にトラックエッチングされたナノポアを有する。何れの場合にも、主要課題は、使用する受容体による表面改質である。

【 0 0 0 9 】

円錐状の石英ナノポアは、検出応用のために官能化もされている（文献：Anal. Chem., 82, 9663-9666, doi: 10.1021/ac102619j (2010) の “Reversible Cobalt Ion Binding to Imidazole-Modified Nanopipettes” Sa N., Fu V. 及び Baker I. A. 氏著；文献：Chem Commun (Camb), 4877-4879, doi: 10.1039/b910511e (2009) の “Nanopore DNA sensors based on dendrimer-modified nanopipettes” Fu Y., Tokuhisa H. 及び Baker I. A. 氏著；文献：Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 4611-4616, doi: 10.1073/pnas.0900306106 (2009) の “Label-free biosensing with functionalized nanopipette probes” Umehara S., Karhanek M., Davis R. W. 及び Pourmand N. 氏著；文献：Bioanalytical Reviews 1, 177-185, doi: 10.1007/s12566-010-0013-y (2010) の “

Functionalized nanopipettes: toward label-free, single cell biosensors” Actis P.、Mak A.及び Pourmand N.氏著；文献：Biosensors and Bioelectronics 26, 333-337 (2010)の“Ultrasensitive mycotoxin detection by STING sensors” Actis P.、Jejelow O.及び Pourmand N.氏著参照)。

【0010】

現在まで、検体とナノポアセンサとの可逆的な結合が、チャレンジングであることが確かめられている。しかし、このことは、1つのセンサで連続的に監視するか又は繰り返し測定するような分野に上述したデバイスを用いる場合には重要な問題となる。1つのセンサを多重使用することにより、同じ寸法のプローブを再現性良く形成する場合の、文献に記載されている多くのセンサに対する定量的測定を制限するという問題をも解決する。このよ
10
うな分野の場合、ナノピペットが有望なプラットフォームである。その理由は、センサの先端部は、サンプル間で又は単一のサンプル内でナノスケールの精度で正確に且つ急速に操作することができる為である。現在まで、pHに反応する感応化されたナノポアは、急速な反転及び選択動作に関して最良な特性を呈した。イミダゾールで官能化され、コバルトイオンに反応するナノピペットは、低pHの溶液内に浸漬させ、リガンドを再プロトン化することにより再生させることができる(文献：Anal. Chem. 2010, 82 (24), 9963-9966の“Reversible Cobalt Ion Binding to Imidazole-Modified Nanopipettes” Sa N.、Fu V.、Baker L. A.氏著参照)。

【0011】

ナノポアを通る輸送は、電圧及び圧力を含む種々の外部刺激により修正することができる(文献：J. Am. Chem. Soc. 2011, 133 (34), 13300-13303の“Pressure-Dependent Ion Current Rectification in Conical-Shaped Glass Nanopores” Lan W.-J.、Holden D. A.及び White H. S.氏著参照)。ナノポアにまたがる塩勾配を単に変化させることにより、輸送に影響を及ぼすことができ、この効果を用いて抵抗パルス測定に対しDNAを集中させるのに用いられた(文献：Nat Nano 2010, 5 (2), 160-165の“Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient” Wanunu M.、Morrison W.、Rabin Y.、Grosberg A. Y.及び Meller A.氏著参照)。ナノポアは、溶媒極性のような刺激に反応するように改変することもできる。このことは、ナノポアをポリマーでデコレートした、いわゆる「ヘアリーナノポア」で達成しうる(文献：ACS Nano 2011, 5 (6), 4737-4747の“Morphology Control of Hairy Nanopores” Peleg O.、Tagliacruzchi M.、Kroger M.、Rabin Y.及び Szleifer I.氏著参照)。幾つかの人工のナノポアを、表面の修飾を用いてpH反応に対して改変した。又、他の荷電種を結合させるために円錐状のナノポアを受容体で修飾し、これにより電流整流を同様に修正する。ターゲットには、核酸、金属イオン、タンパク質及び小分子が含まれている。核酸及びタンパク質のような大きな生体分子の場合には、ポアの物理的な遮断も表面電荷の変調に加えた同様の役割を奏する。現在までは、小さな非荷電種での電流整流の変調は困難であることが確かめられている。しかし、このようなシステムは反応性ナノポアに対する刺激を拡大させてドラッグ、ペプチド及び糖質を含めるようにする。
20
30

【0012】

(グルコース/ジオール検出)

血糖を監視するには糖質認識が不可欠である(文献：Anal. Bioanal. Chem. 388, 545-563 (2007)(Kondepati氏等著)参照)。糖質の検出及び定量化も、バイオプロセスモニタリングにおいて且つ代謝性の糖(サッカリド)、ヌクレオチド又は糖たんぱく質に基づく医療診断に対して用いることができる(文献：Curr. Op. Chem. Biol. 11, 59-65 (2007)(Timmer氏等著)参照)。グルコースを測定する殆どの電気化学方法はブドウ糖酸化酵素のような酸化還元酵素に依存している(文献：Diabetic Med. 26, 197-210 (2009)(Oliver氏等著)参照)。殆どの一般的な人工の受容体は、光プローブに対し主として用いられているボロン酸を用いている(文献：Microwchimica Acta 162, 1-34 (2008)(Mader及びWolfbeis氏著)参照)。グルコースの電気化学測定に対する非酵素的方法も開発されたが、これは殆どグルコースの酸化に依存している(文献：Anal. Chim. Acta 556, 46-57
40
50

(2006) (Park氏等著) 及び “Nanopore structured electrochemical biosensors” と題する米国特許出願公開US2008/0237063 (発明者: E.T. Chen氏) 参照)。

【0013】

現在まで、糖質に反応するナノ流体ポアに関して文献には殆ど報告されていない。抵抗パルス法を用いて小分子を検出するのにナノポア分析論が用いられているが、この技術は一般にタンパク質やその他の高分子により一層できしているものである。MW 500 ~ 10,000程度のオリゴ糖は、アルファ溶血素ポアに対し抵抗パルス技術を用いることにより判別された。

【0014】

受容体で修飾されるナノポアの一例は、共有結合されているHRP酵素を用いるものであり、この場合この酵素は超分子的にConAに、すなわちHRP分子に関してマンノースユニットと相互作用する糖結合タンパク質に結合されている(文献: Nanoscale 3, 1894-1903 (2011) (Ali氏著)参照)。単糖(ガラクトース及びグルコース)の添加が、ポアを流れるイオン電流を変化させるConAに匹敵する。2つの最近の例は、化学受容体としてボロン酸を用いており、この場合受容体は人工のナノポアの壁部に共有結合している(文献: Chem. Commun. (Cambridge, U. K.) 2012 の “pH gated glucose responsive biomimetic single nanochannels” (Sun Z., Han C., Wen L., Tian D., Li H.及びJiang L.氏著)及び文献: Sensors and Actuators B: Chemical 2012, 162 (1), 216-222の “Saccharide/glycoprotein recognition inside synthetic ion channels modified with boric acid” (Nguyen Q. H., Ali M., Neumann R.及び Ensinger W.氏著)参照)。前者の場合、糖結合を戻し且つ信号を回復させるのに酸性溶液を必要とした。後者の場合には、可逆的な結合が実行されなかった。

【0015】

ナノポアの製造及び界面化学における多くの最近の進歩にも拘らず、上述した研究により、外部刺激として糖質を用いてイオン電流を変調させる新たな計画の必要性があることが分かった。この問題は、ナノポアと結合(インターフェース)しうる新たな機能材料に対して取り組むことができる。

【0016】

[特定の特許文献及び非特許文献]

・2010年3月25日に公開された米国特許出願公開US2010/0072080 (発明者: Karhanek氏等) には、ペプチド及びタンパク質を含む生体分子検出用のペプチドリガンドを上にも有するナノピペットを具える方法及びデバイスが開示されている。

・2010年3月4日に発行された米国特許 US7,708,871 (発明者: Siwy氏等) には、電解質内の荷電粒子の流れを制御するためのナノデバイスを有する装置が開示されている。このような装置は、電解質内の荷電粒子の流れを制御するために、高分子膜のホイルにより分割された電解質浴容器を具えている。

・Analytical Chemistry 2010, 82 (24), pp 9963-9966 (Sa氏等著) には、イミダゾール末端シランで修飾した石英のナノピペットは溶液中の金属イオン(Co^{2+})に反応することが開示されている。このナノピペットの反応は、イオン電流の整流比を検査することにより評価された。ナノピペットが異なるpHの溶液間で循環されると、吸着された Co^{2+} がナノピペットの表面から釈放されてナノピペットの結合部位を再生した。

・Proceedings of the National Academy of Sciences, vol 106, pages 4611-4616, March 24, 2009 (Umehara氏等著) には、官能化されたナノピペットの電極を用いる無標識の実時間タンパク質測定が開示されている。ナノピペットの先端部の表面上での、静電気のピオチン-ストレプトアビジン相互作用及び抗体-抗原相互作用により50nmのポアを流れるイオン電流に影響を及ぼすことが確かめられた。

・Nano Lett. 6(11):2486-2492 (2006)の “Current Rectification with Poly-L-lysine Coated Quartz nanopipettes” (Umehara氏等著) には、浴溶液中のナノピペットを用いる非被覆のナノピペット及びポリエルリジンで被覆されたナノピペットの電流反応が開示されている。

10

20

30

40

50

・ Nano Lett. 2005 Feb;5(2):403-7の “Single DNA molecule detection using nanopipettes and nanoparticles” (Karhanek M., Kemp J.T., Pourmand N., Davis R.W. 及び Webb C.D.氏著)には、ナノ粒子で標識された単一DNA分子は、プリング処理されたガラスキャピラリーにより形成されたナノピペットの先端部を通して移動する為、これらの分子はイオン電流の遮断により検出するということが開示されている。ここに開示されている機構は、浴中の単一検出電極を用いてナノ粒子 DNA電流遮断を検出する電圧クランプ回路を用いている。

・ Biochemical Society Transactions, vol 37, pages 702-706, 2009 (Ying Liming 氏著)は、イオン、(生体分子を含む)分子及び細胞のナノセンシング及びナノマニピュレーションにおけるナノピペット及びこれらの使用を論評している。

10

・ 2006年1月5日に発行された国際公開 WO2006/000064 (発明者: Borghs Gustaaf氏等)には、膜を貫通するナノポアを通る電荷キャリアの流れを制御するナノ流体デバイスが開示されている。

・ 2005年11月24日に公開された米国特許出願公開US2005/0260119 (発明者: Sunkara 氏等)には、マイクロ波プラズマと関連する化学蒸着法を用いて、ナノピペットと称されるテーパ形状のウイスカの形態とした管状炭素のナノ構造を合成する方法が開示されている。

・ 2008年10月2日に発行された “Nanopore structured electrochemical biosensors” と題する米国特許出願公開US2008/0237063 (発明者: Chen氏)には、ナノポア構造の触媒活性シクロデキストリンが付着されてグルコースを直接測定するためのバイオセンサが開示されている。

20

・ Phys. Chem. Chem. Phys. 8:4976-4988 (2006)の “Biosensing with conically shaped nanopores and nanotubes” (Choi氏等著)には、トラックエッチング処理を用いて合成された円錐状のナノポアの生成及び特徴が開示されている。膜電位の印加状態の下でポアを通して流れるイオン電流を整流しうる円錐状のナノポア的设计及び機能も開示されている。

・ Biomacromolecules 10(1): 113-118 (2009)の “Development of boronic acid grafted random copolymer sensing fluid for continuous glucose monitoring” (Li氏等著)には、粘性に基づいたグルコースの検出のための生物的に適合性のある共重合体のポリ(アクリルアミド ran 3 アクリルアミドフェニルボロン酸) (PAA ran PAAPBA)が開示されている。

30

・ Chem. Commun. (Cambridge, U. K.) (2012) の “pH gated glucose responsive biomimetic single nanochannels” (Sun Z., Han C., Wen L., Tian D., Li H. 及び Jiang L. 氏著)には、フェニルボロン酸受容体で共有結合的に修飾されたポリエチレンテレフタレート (PET) 内の、トラックエッチングされた円錐状のナノチャネルが記載されている。

・ Sensors and Actuators B: Chemical 2012, 162 (1), 216-222の “Saccharide/glycoprotein recognition inside synthetic ion channels modified with boronic acid” (Nguyen Q. H., Ali M., Neumann R. 及び Ensinger W. 氏著)には、フェニルボロン酸受容体で共有結合的に修飾されたポリエチレンテレフタレート (PET) 内の、トラックエッチングされた円錐状のナノチャネルが記載されている。チャネルは単糖類及び糖たんぱく質に反応する。

40

【発明の概要】

【0017】

以下の概要は、本発明の全ての特徴及び態様を含めるためのものでも、本発明がこの概要で説明した全ての特徴及び態様を含む必要があるということの意味するものでもない。

【0018】

ある態様においては、本発明は、試料中の検体を検出する装置に用いるためのナノピペットに向けたものであり、このナノピペットは、ナノポアの開口に通じるこのナノピペッ

50

トの内部ポアを規定する毛細管部分を有しており、前記内部ポアは、その内部に電極を有するのに適しているとともに前記ナノポアを通して外部溶液と連通する内部溶液を含むのに適しており（電極構造に対しては、ポアが細長くなっているとともに前記開口に向けて先細となっている図1を参照）、前記ナノピペットは前記ナノポアの内側表面上の被膜を有しており、この被膜は前記内側表面（代表的に石英）に直接結合（すなわち、接触）されている高分子電解質を有しており、前記ナノピペットは更に、前記高分子電解質に結合された結合分子であって、イオン又は小分子より成る群から選択した検体を結合させるのに特有の結合分子を有しているものである。

【0019】

本発明のある態様では、前記高分子電解質に結合された結合分子を、グルコースを検出するためのボロン酸とするか、又は前記高分子電解質をポリカチオンとして被膜の電荷が変化するようにするか、又は前記高分子電解質をポリアルキルピリジン又はポリアミンとするか、或いはこれらの任意の組み合わせを達成するようにすることができる。

【0020】

本発明のある態様においては、前記高分子電解質/検出用分子を、ナノポア内に延在してこのナノポアを部分的に遮断するようにこのナノポアに被着し、検出用分子をより多く試料に曝すようにする。

【0021】

本発明のある態様においては、結合分子を、ポリマー又は高分子電解質の被膜に結合されるキレート剤とする。更に、ポリマーの被膜は、ピペットのポアとイオン結合用のポリマーとの間で高分子電解質層を有するようにしうる。この高分子電解質層は、被膜の形態にすることができ、好ましくは連続的とし、これにより裸の石英が被覆されるようにしうる。ある例では、キレート剤を、多糖、例えば、キトサン、線状多糖類であるイオン結合ポリマーとすることができる。又、ある例では、キレート剤を、ポリペプチドとすることができる。ある他の例では、被膜が糖結合分子を有するようにしうる。ある例では、糖結合分子を、レクチンのようなタンパク質とすることができる。又、ある例では、糖結合分子がボロン酸又はボロン酸エステルを有するようにする。

【0022】

他の例では、本発明が、炭水化物分子、特にシスジオール基を有する炭水化物、更に特にグルコースを検出するためのナノピペットデバイスを有する。このナノピペットデバイスは、チャンネルを有するナノポアが形成された不活性基板を具えるようにしうる。ある態様では、チャンネルを石英のナノチャンネルとする。ある態様では、不活性基板が、チャンネルを経てアクセスされる内部と、試料に接触するための外部とを規定しているようにする。ある態様では、ナノポアが更に、チャンネル内に高分子被膜を有し、前記ポリマーを炭水化物結合分子（ボロン酸のような“CBM”）に結合させる。ある態様では、ナノポアが更に、前記CBMに結合されたポリマーを有し、このCBMがポリマー内に埋め込まれて、チャンネル内に半透過性のマトリックスを形成するようにする。

【0023】

ナノピペットデバイスは、ナノポアにおけるイオン状態によるイオン電流の整流をグルコース検体の結合により変調させる測定回路により動作させる。好適例では、ポリマー結合されたボロン酸に糖を結合させることによりイオン整流の逆を生ぜしめる。従って、ナノピペットデバイスは、チャンネルを流れる電流を生ぜしめるとともにこのチャンネルを通る電流の流れの変化を測定する電子回路を有し、これにより前記試料における炭水化物分子を前記CBMに結合させ、これにより電流の流れの測定変化が試料中の炭水化物の存在を表すようにしうる。

【0024】

ある態様では、本発明は、ナノピペット測定回路を具えており、このナノピペット測定回路は、内部電極及び内部溶液を保持するポアを有するナノピペットと、外部溶液用の容器と、外部溶液と接触するように適合させるとともに配置した外部電極及び前記内部電極間の測定回路とを具え、この測定回路は、前記内部電極と前記外部電極との間の可逆電圧

10

20

30

40

50

差を生ぜしめる増幅器を具え、更に前記ポアと前記外部溶液間の電流を測定する検出器を具えているようにする。

【0025】

本発明のある態様は、溶液、すなわちナノスケールのリアクタ内の2種類の異なるイオンを組み合わせるによりイオン化合物を生ぜしめる方法であって、ナノポアを有するナノピペットの内側の溶液中の電荷を有する少なくとも1つの第1のイオンを、ナノピペットの内部と外部溶液との間に供給するステップと、第2のイオン種を外部溶液中に供給するステップと、ナノピペットの内側の溶液中の電荷を有する前記1つの第1のイオンに、反対の電荷のナノポアにまたがる電圧を印加するステップとを有し、この電圧は、前記イオン種をナノポアに移動させて前記第2のイオンと反応させ、前記イオン化合物を形成するのに十分な電圧となるようにする方法に関するものである。

10

【0026】

ある態様では、本発明の方法は更に、ナノポアを通るイオン電流を測定するとともに、イオン化合物の形成を表す電流の変化を検出するステップを有する。

【0027】

ある例では、イオン化合物は不溶性とする。本発明の方法は更に、沈殿物が形成された後に電圧を反転させるステップを有するようにしうる。

【0028】

第1のイオン及び第2のイオンは、アニオンと反応してイオン化合物を形成する金属イオンとしうる。金属は遷移金属としうる。金属イオンは、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 、 Mo^{2+} 、 Co^{3+} 、 Co^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Al^{3+} 、 Al^{2+} 、 Ar^{3+} 、 Ar^{3-} 及び Pb^{2+} より成る群から選択しうる。アニオンは、リン酸塩、塩化物、硫酸塩、一リン酸塩、ピロリン酸塩、メタリン酸塩、トリポリリン酸塩、トリメタリン酸塩及びオルトリン酸塩より成る群から選択しうる。ある例では、アニオンを、グルコン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、リンゴ酸塩、乳酸塩、クエン酸塩、EDTA、シトラコン酸塩、シトラマル酸塩、ステアリン酸塩、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、オクトエートアスコルピン酸塩、ピコリン酸塩及びオロチン酸塩より成る群から選択した有機カルボン酸アニオンより成る群から選択しうる。ある他の例では、アニオンをタンパク質としうる。

20

【0029】

ある態様では、本発明は、ナノピペット内から外部溶液内にイオンを供給する方法に向けるものであり、この方法は、ナノピペットの内部と外部溶液との間にナノポアを有するナノピペットの内側の溶液内に電荷を有する少なくとも1つの第1のイオンを供給するステップと、前記第1のイオンに対し反対の電荷のナノポアにまたがる電圧を印加するステップとを有し、この電圧は前記ナノポアを横切るイオンの移動を生ぜしめるのに十分な電圧とするものである。

30

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1は、電気化学機構と、センサ上への第二銅イオンの可逆結合とを示し、前記センサは、ナノピペットの先端部付近でこのナノピペットの内部の付近にこれらのイオンを特異結合させるように官能化してある線図である。

40

【図2】図2は、図1に示すような電気化学機構で、ナノポアにおける沈殿物の形成によりイオン電流の測定可能な遮断を生ぜしめる状態を示す線図である。

【図3】図3は、浴中の2マイクロモルの塩化亜鉛及び -350 mV の電位で沈殿を測定するのに用いるナノピペット機構における電流発振を示すグラフ線図であり、1つの開放状態の拡張図を差し込んだグラフ線図である。

【図4】図4は、図1に108で示すように適用されるイオン結合表面の修飾（カルモジュリン/PAA/PLL）から得られるデータを示す $I-V$ プロットであり、ナノピペットのバイオセンサのイオン反応を示す（実線が裸のピペットであり、破線がPAAであり、三角形がCaMである）線図である。

50

【図5】図5 Aは、センサCaM 1の表面に対する整流係数を示すグラフ線図である。図5 Bは、図5 Aのセンサの電流を示すトレース図である。

【図6】図6は、裸のナノピペット（三角形）及びキトサン/PAAにより改善したナノピペットセンサ（円）のpH反応を示すグラフ線図である。

【図7】図7は、整流係数対pH3及び7で堆積したキトサン/PAA層の個数の変化を示すグラフ線図である。

【図8】図8は、裸のナノピペット（三角形）及びキトサン/PAAセンサ（円）のpH反応を示すグラフ線図である。

【図9】図9は、0.1M KCl、10mMリン酸緩衝材内でキトサンによりセンサを官能化した場合の効果を表す、種々の状態の下でのイオン電流を示すグラフ線図である。

【図10】図10は、センサの再循環後の整流係数の変化を示すグラフ線図であり、Cu²⁺濃度を100μMとし、センサをpH3の溶液内に60秒間浸漬させることによりセンサを再生させた線図である。

【図11】図11は、pH7の0.1M KCl、10mM Tris（トリス）HCl内のCu²⁺の種々の濃度に対するセンサの反応を示すトレース図であり、1/ln及び1/CCOPPer間の線形フィット（図示せず）を計算し（R=0.997）、イオン電流をナノピペットの平行内の電極に印加した-500mVの電位でイオン電流を決定した場合の図である。

【図12】図12は、ナノピペットとの第二銅イオンの相互作用に関する電気泳動の役割を示す線図である。

【図13】図13は、出力電流を示すトレース図であり、矢印がCu²⁺イオンの付加を示し（溶液中の最終濃度は150μM）、正電圧の印加中は変化が検出されず、負電位に切替えると即時に反応し、続く正のステップで変化を生ぜしめる図である。

【図14】図14は、ナノピペットの先端部でナノピペットから沈殿物を排除した場合のイオン電流における発振を示す線図である。

【図15】図15 Aは、リン酸緩衝材（pH7）が充填されたピペットであって、2マイクロモルの塩化亜鉛を有するTris-HCl緩衝材（pH7）の浴内に浸漬させたピペットに負電位を印加した場合の発振を示すグラフ線図である。図15 Bは、図15 Aの事象をコンダクタンス（導電率）が高い状態と低い状態とで示す線図である。

【図16】図16は、ナノピペットを修飾するためのカチオン（陽イオン）高分子電解質の合成を示す線図であり、ポリカチオンをアルキル主鎖上でピリジンユニットを繰り返すことにより表した図である。

【図17】図17は、ボロン酸による石英表面172の直接的な2ステップ官能化を示す線図である。

【図18】図18は、ナノポアの端面を示す一連の図であり、受容体をナノポアに固定させる3つの方法を示す図であり、図18 Aは、受容体をナノポアの壁部に直接共有結合させる場合を示す図であり、図18 Bは、ポリマーに結合させた受容体により官能化ポリマーをポア壁部に吸着させた場合の図であり、図18 Cは、3次元官能マトリックスをポアの内部に固着させた状態を示し、ポリマー上の受容体がナノポアにまたがるメッシュ、すなわち網状体を形成した、すなわち被膜が前記ナノポア内に延在するとともにこのナノポアを部分的に遮断した場合を示す図である。

【図19】図19は、pH7のリン酸緩衝材内にグルコース（3mM）を入れた場合の制御及び官能化ピペットの反応を示す一組のグラフ線図であり、ピペットは、3アミノプロピルトリエトキシシラン及びこれに続くm-ブromoメチルフェニルボロン酸により官能化し、+500及び-500mVでのイオン電流から計算した整流係数を差し込んだ図であり、図19 Aは修飾していないピペットのイオン電流反応を示すグラフ線図であり、図19 Bはボロン酸で修飾したピペットのイオン電流反応を示すグラフ線図であり、図19 Cは図19 A及び19 Bに示すピペットシステムの整流を示すグラフ線図である。

【図20】図20は、単糖類が存在する場合のPVP BAの沈殿量を示す棒グラフであり、pH2のメタノール/水中のPVP BAのかくはん溶液を沈殿が生じるまで水酸化ナトリウムで滴定したものであり、エラーバーは3つの別々の実験からの標準偏差を示し

10

20

30

40

50

ている図である。

【図21】図21は、1マイクロモルのポリマー濃度でPVP BA及びPVP Bnを存在させた場合のARSの吸着変化を示すグラフ線図であり、染料溶液は1:1のメタノール/水中0,25mMとした図である。

【図22】図22は、ARSが存在する場合のイオンの透過率変調を示すI-Vプロット図であり、ポリマーPVP BAに埋め込まれているナノピペットを0,60又は360 μ mのARSの何れかを入れたpH9.5の炭酸塩緩衝材中に浸漬させた場合で、エラーバーが繰り返し電圧ランプ(N=5)からの標準偏差を示している図である。

【図23】図23は、果糖によりイオン電流の整流が反転する状態を示すグラフ線図であり、電流-電圧曲線は、果糖を加えない場合と10mMの果糖を加えた場合とのpH9.5におけるPVP BAで埋め込んだナノチャンネルに対するものとした図である。

【図24】図24は、果糖を加えた場合と加えない場合とで-0.5Vで測定したイオン電流変調の順次のサイクルを示すグラフ線図であり、エラーバーが繰り返し電圧走査(N=5)からの標準偏差を示し、平衡時間は各々の状態で5分とした場合の図である。

【図25】図25は、3つの別々のナノピペットセンサに対する可逆的なイオン電流整流の値を示すグラフ線図であり、果糖(10mM)を加えた場合と加えない場合とで炭酸塩緩衝材(pH9.5)内にセンサを浸漬させ、緩衝材中のセンサS1に対する正の整流を254で示し、果糖中のセンサS1の負の整流を252で示している図である。

【図26】図26は、溶液相の蛍光測定におけるPVP BAを用いる果糖に対する結合等温線を示す線図である。

【図27】図27は、修飾した円錐状のナノチャンネルを用いる電気化学法を用いる、図26に示すようなデータを示すグラフ線図であり、図26及び27は、25%のメタノールを有するpH9.5の炭酸塩緩衝材内にPVP BA(0.003%w/v)及びHPTS(1.5 μ m)を入れたプローブ溶液内に果糖を滴定することにより生じたものであり、エラーバーが3つの別々の沈殿物による標準偏差を示し、グラフBは、炭酸塩緩衝材内の糖類の濃度を増大させた場合の、PVP BAにより埋め込んだ円錐状のナノチャンネルに対する-500mVの電位におけるイオン電流を示し、エラーバーが5回の順次の電圧走査による標準偏差を示し、データポイントは実験区分で説明するように結合等温線に適合していることを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

(概説)

本発明は、電気化学センサに設けられるナノポアデバイス、すなわちナノピペットに関するものである。このナノポアデバイスは、第1の電極を収容する内部領域を有するとともに、他の電極を収容する外部溶液と接触するように構成されている。これらの電極は、ナノポアに生じる現象を検出するとともに測定しうる検出回路に接続されている。好適実施例では、ナノポアは、例えば上述した米国特許出願公開US2008/0237063明細書に記載されているように、ナノピペットの一部である。用語「ナノ」は、ポア内の寸法や、ほぼ200nmよりも小さい直径を有する内部電極のような付随部品を言及するものである。この寸法は、以下に詳細に説明する電気化学的な反応を生ぜしめるのに重要となるものである。

【0032】

本発明は更に、 H^+ 及び金属カチオンのような小イオン並びにジオール(以下に説明する)を結合させるとともにその結合を検出しうる可逆的なイオンセンサに関するものである。この可逆的なイオンセンサはセンサのキャピティ(すなわち、ナノピペットのポア)内で極性を反転する点で可逆的なものであり、重要なことに、イオンはナノポアに可逆的に結合されている。本発明のデバイスは、イオンをセンサ内に移動させたり、センサのナノポアから外に移動させたりするのに用いることができ、このセンサはナノピペットの形態にするのが好ましい。ピペット内のイオンの結合は、結合したイオンの無い溶液内にピペットの先端部を入り込ませることにより反転させることができる。小イオンの結合も

10

20

30

40

50

、溶液中のpHのような状態を変えることにより反転させることができる。本発明は、ナノピペットに基づく可逆的なイオン移動デバイスにも関するものである。このようなイオン移動は、外部溶液に対してナノピペット内の電位を変化させることにより生ぜしめることができる。イオン移動は、イオンをナノピペットのポアから出るように移動させることにより生ぜしめられる沈殿を起こさせて、外部溶液内のイオンが過剰となるようにするのに用いることができる。沈殿は、ナノピペットのナノポア先端部の付近で生じ、この先端部でナノポアを通る電流発振の変化により早期の段階で検出する。この沈殿は、内部溶液及び外部溶液間の印加電位によりナノポア先端部を通過させるイオン電流を変化させる。小イオン濃度及び小沈殿物寸法の際に検出された沈殿は、種々のシステムに適用する。例えば、少量のタンパク質を用いてタンパク質の結晶化を検出する。

10

【0033】

本発明のセンサ技術は、官能化されたナノピペットの先端部における結合事象を無標識的に変換する簡単な電気化学的な読出しに依存している。ナノピペットの先端部のインピーダンスが高いことにより、先端部の開口の寸法及び幾何学的形状をセンサの性能にとって重要なものとするデバイスの反応を制限する。更に、本発明のセンサ技術は、圧電アクチュエータと容易に一体化でき、空間解像度が高いセンサを形成する。ナノピペットが表面に近づくにつれ、ピペットを通るイオン電流が、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)における重大な利点を利用した周知の効果である「電流のスケーリング」により低減される。検出に加えて、単細胞内の分子を制御して取り出すために、ナノピペットに基づいたプラットフォームを用いて単一分子生物物理学を研究している。

20

【0034】

ある実施例では、本発明のデバイスが、固体のナノポア内の沈殿を用いて電流発振の誘起及び測定 of 双方又は何れか一方を行うための新たな機構を提供する。この技術を用いて、イオン移動をナノピペットの先端部における2種類の溶液の界面へ積極的に向かわせるようにする。ポアはしきい値電位でのみ遮断する為、反応を時間的及び空間的に制御する。このような沈殿は種々のイオンに対して行わせることができる。ナノスケールでの塩析沈殿の反応速度を制御及び測定するこの能力により、バイオミネラル化及び溶解のような動的処理を研究する新規な技術を可能とする。電圧発振によるナノリアクタ内の沈殿物の捕捉は、ナノ粒子の寸法及び表面電荷の研究に対する更なる手段である。不溶性塩類の、制御されるナノ沈殿も、選択性があり且つ反応性の高いイオンセンサを開発するのに価値あるものである。以下に説明する反応は、僅かに2マイクロモルの塩類を検出でき、他のカチオンの存在により影響を受けなかった。例えば、低濃度(2µmまで)の硫化亜鉛の塩類を検出でき、これはカリウム又はマグネシウムのような他のカチオンの存在により影響されなかった。更に、沈殿により封鎖されたナノポアを発振電位により開放させる能力は、ナノポアに関して検出する分野を拡大させることができる。例えば、ナノ沈殿物を検出するのに一定の電圧を用いることができ、一方発振電位は他の検出分野に対するイオン電流を測定するものである。

30

【0035】

本発明の方法は、種々のタンパク質結晶化法に用いることができる。一般にタンパク質の溶解度を徐々に減少させることにより、タンパク質溶液を過飽和状態にするのに種々の異なる結晶化法が用いられる。タンパク質の結晶化でタンパク質の溶解率を減少させる最も一般的な方法は、ポリエチレングリコール及び硫酸アンモニウムのような沈殿剤を添加する方法である。沈殿剤は、その濃度が、例えば蒸気拡散法を用いることにより増大するために水と結合する。その結果、タンパク質に対して得られる溶媒の量が減少する。このことは主として、タンパク質の濃度が増大することを意味する。ある有効なタンパク質の濃度で、沈殿が開始し、状態が正しいと結晶を生じる。正しいpH、正しい結晶化状態は、イオン強度、温度、タンパク質の濃度、種々の塩類又はリガンド又は添加物の存在、沈殿剤の種類及び実際の結晶化法(ハンギングドロップ法、シッティングドロップ法、透析法等)の組み合わせを含む正しい結晶化状態は、実際上予め予測するのが不可能である。その結果、種々の異なる状態を用いる結晶化スクリーンが開発された。本発明のデバイス

40

50

は、種々の異なるタンパク質の結晶化状態の影響を検査する多数の並列実験に用いることができる。

【0036】

本発明の方法の他の適用は、分析に関するイオン検出の分野におけるものである。最初に見られるものとして、化学的に官能化した固体のナノポアの分析に関する適用がイオン検出に対し見られている。印加電圧の周波数及び波形は、信号対雑音比を最大にするように調節し、印加電圧がセンサ上に Cu^{2+} を結合しうることを表すようにすることが分かっている。分子の結合を時間的に且つ空間的に達成する能力によれば、正確なバイオセンシングデバイスの開発が検体受容体の相互作用の熱力学的な且つ動力学的な特性を研究しうるようにする。

10

【0037】

ここに開示するバイオセンサは、整流用のナノポアにおける選択的で可逆的な結合を示す。この種類の可逆センサは、ICRをベースとするセンサにおける一体化ポア構造のナノポアの形成と関連する課題を解決する。高分子電解質層の堆積を監視することにより、更なる化学的な修飾が、ICRが最も反応する個所でポアに局所化されるということを確実にする。更なる実験及び理論的なモデリングや、ナノポアの表面を特徴づける改良された方法によれば、高分子電解質をポア内にどの程度入れ込む必要があるかを決定し、更にバルク溶液と外側のナノピペットポアとの間の界面における相互作用を調査する必要がある。この領域における向上が分析手段としてのナノポアセンサの使用を進歩させる。ここに記載したセンサのような可逆ナノピペットセンサは、水質、ナノスケールでのイオン濃度の空間解像度（機能的マッピング）又は特定の検体の連続的な細胞内測定を監視するのに用いることができる。

20

【0038】

本発明のデバイスは、糖尿病の危険性がある対象者が必要としうるためにグルコース検出に対し適合させた。これらのデバイスは、グルコース監視を必要とする対象者から取り出した全血に適用しうる又はその対象者内の全血さえにも適用しうる携帯デバイスとして構成することができる。すなわち、例えば、石英のナノピペットの先端部を皮膚に貫通させて真皮付近の体液内のグルコースに接触させることができる。

【0039】

本発明のグルコース検出デバイスは、ボロン酸のような受容体（糖に対する受容体）と、先端部（ナノポア）における又はその付近におけるナノピペットの内側表面に被着した混合物とに結合されたポリマーを採用するのが好ましい。糖結合ポリマー混合物は以下の特性を有するのが最も好ましい。

30

- 1) ポリマーは、正に荷電され、負に荷電されたポア壁部との相互作用を高めるようにする。
- 2) ポリマーは、正の各電荷に対しほぼ1つのボロン酸を有し、これによりボロナートの形態に変換する際にポリマーを中和させる。
- 3) ポリマーは、有機溶媒内で溶解しうるが、水媒体内では溶解できず、ポリマーをナノピペットの先端部内に捕捉しうるようにする。
- 4) ポリマーにより形成された不溶性マトリックスは水、イオン及び検体を透過できる。
- 5) センサにおける信号変調を反転させるには溶媒又は媒体に変化が生じないようにする必要がある。

40

【0040】

重要なことに、浸透性マトリックス法は、他のナノポア官能化法よりも優れているものと考えられていることを銘記する必要がある。その理由は、ポア壁部のみを除くナノポアのポリウム全体に受容体が含まれている為である。ポリマー結合受容体（例えば、ボロン酸）は、ナノポアを通して移動するイオンとの大きな相互作用を有し、従って、検体が存在する場合の信号変調を大きくする。更に、検体が結合すると、多くのポリマーが構造の変化を受け、イオン電流変調を更に高めるようにすることができる。更に、検体は、電界によりポアを通るように駆動する必要はなく、むしろポリマーマトリックスを通る検体

50

の受動拡散により電気信号を変調させる。これらの特徴が、固定されたポリマーの網状体を、受容体の共有結合又は官能化されたポリマーの層順次堆積と区別する。以下に説明するように、ポリ(4-ビニルピリジン)(PVP)を選択した。

【0041】

以下に詳細に説明するように、ボロン酸グルコース受容体を含む官能性ポリカチオンを石英のナノチャンネル内に埋め込んだナノピペットデバイスを製造した。ナノチャンネル(すなわち、ナノポア)の壁部をボロン酸で直接修飾する従来の努力によれば、糖にほどほどに反応するが、イオン電流に対しより多く制御する必要があるボロン酸ベースの受容体の幾つかの態様がある。第1に、炭水化物に対するボロン酸の結合は、完全に可逆的であり、このことはナノチャンネルにおける場合もそうであるという証拠はない。より重要なこと
10
に、ボロン酸は、中性の炭水化物の存在下で静電電荷における変化を、すなわちナノポアにおける電流整流に劇的な影響を及ぼす変化を受けるおそれがある。これらの特性の利点を、改変したナノチャンネルに対し取り入れるためには、ポリ(4-ビニルピリジン)に基づくカチオン性ポリマーをボロン酸受容体マトリックスとして選択した(図26)。ポリマーをアルキル化することにより、それぞれの正電荷毎に正確に1つのボロン酸を生ぜしめる。カチオン性ポリマーは、静電相互作用、すなわち電流整流に基づいて監視しうる相互作用、に基づいて石英のナノピペットに固定させることができる。

【0042】

ここで用いるボロン酸は簡単な人工受容体であり、これらは糖を結合する能力を有することが認識されている。センサ及びアクチュエータを形成するのに利用しうるボロン酸には、幾つかの特性がある。1,2-ジオール(例えば、1,2-ジヒドロキシベンゼン、エチレングリコール)を結合すると、ボロン酸のルイス酸性度が増大する。例えば、フェニルボロン酸は、負に荷電されたボロン種と平衡状態にあるカテコール(1,2-ベンゼンジオール)との錯体を形成する(Vladimir M. Mirsky氏、Anatoly Yatsimirsky氏、Wiley-CH氏編集のArtificial Receptors for Chemical Sensors, Chapter 6 (2011)参照)。従って、 pK_a が緩衝媒体のpHよりも小さい値にシフトすると、炭水化物の結合によりボロン酸をアニオンボロナートエステルに変換するようになる。ボロン酸を用いている現在まで報告されているプローブ及びセンサの多くは蛍光ベースのものである。しかし、ボロン酸は多用
20
途性である為、この受容体は、炭水化物の分離、ポリマー材料の膨張に基づく光センサ及び電気化学センサに対しても用いられている。中性の糖の結合はボロン酸の荷電を変化させう
30
るという事実が、この受容体を、反応性の良いナノ流体のダイオードに対する優れた候補にする。

【0043】

ナノチャンネル内の修飾したナノポアは、ポリマーのカチオン電荷から得られる強い電流整流、すなわち中性の炭水化物の存在で反転しうる整流を呈した。ナノチャンネルはフルクトースのミリモル濃度に対する可逆性の反応を呈した。溶液中のポリマーを特徴づける能力は、ボロン酸と1,2-ジオールとの相互作用と、荷電との双方に依存する結合様式を呈した。修飾されたナノチャンネルは、アニオン性カテコールを含む染料、すなわちアリザリンレッドスルホン酸塩(ARS)に対し特に高い感応性を呈し、60 μm の染料のみを用いて電流整流を解除する。重要なことに、イオン透過性の変調は、イオン伝導率の遮断に依
40
存せず、静電電荷の結果としての電流整流の極性の変化に依存する。本発明によれば、ナノチャンネルを通るイオン流を変調させるのに電圧に依存しない新たな技術を可能にするものである。

【0044】

[定義]

定義されていない限り、ここで用いる全ての技術的な且つ化学的な用語は、本発明が属する当業者にとって一般に理解されるのと同じ意味を有するものである。ここに述べるのと類似する又は等価な如何なる方法や材料も、本発明の実行又は検査に用いられるものであるが、好適な方法及び材料を説明する。一般に、細胞及び分子の生物学や化学と関連して用いられる命名は、当該技術で周知であり、一般に用いられているものである。明確に規定
50

しないある実験的技術は一般的に、当該技術で周知であるとともに本明細書全体に亘り引用され且つ論じた特定の参考文献に記載された従来の方法に応じて実行されるものである。明瞭化のために、以下の用語を以下に規定する。

【 0 0 4 5 】

用語「イオン」は、電子の総数がプロトン（陽子）の総数に等しくなく、これに正味の正又は負の電荷を与えるようにする原子又は分子を意味する。この用語は特に、イオンが単一原子より成る原子イオン又は単原子イオンに且つ小分子の多原子イオンに関するものである。

【 0 0 4 6 】

用語「小分子」は、約 1,000 の原子質量単位 (amu) よりも少ない、ある実施例では 200 amu よりも少ない分子量を有する化合物を意味するものである。小分子は、サイズ制限よりも上のポリ核酸又はポリペプチドを含まないが、特に細胞内に見つけられる他の小分子を含むものである。例としては、アデニンは約 135 amu であり、グルコースは約 180 amu であり、尿素は約 60 amu であり、クレアチニンは約 113 amu である。

【 0 0 4 7 】

用語「ナノピペット」は、ナノスケールの円錐状先端部開口、すなわちナノポアを有する、中空の自己支持型で不活性の非生物学的な構造体であって、先端部開口を約 0.05 nm ~ 約 500 nm、好ましくは約 (+20% 又は -20%) 50 nm 又は約 80 nm 又は約 100 nm とした構造体を意味するものである。中空の構造体は、例えば、ガラス又は石英とすることができ、その内部には先端部開口を通過する流体を保持するのに適している。ナノピペットの内部は、検体の非特異的結合を最少にするように選択又は修飾されている。ナノピペットの内部は代表的に、石英又は他の生物学的に不活性な材料の単一層の壁厚を均一とした細長のコーンの形態とし、その寸法は、ナノピペット内の溶液に接触させる電極を挿入させうる寸法とする。ここで用いるナノピペットは代表的に、単一のポアを有するが、複数の同心的なポアを有するナノピペットを、二重ポアのキャピラリーをプリング処理することにより製造することができる。外径は代表的に、先端部領域において約 1 μm よりも小さくする。

【 0 0 4 8 】

用語「ナノポア」は、電気絶縁膜、好ましくは前述したナノピペットの先端部における小さな孔を意味する。ナノポアは、このナノポアに隣接するナノピペットのポアの最後の数mmである先端部領域内にある。以下に説明するナノポアは、小分子の錯体がナノポアを通るイオン及び分子の移動に影響を及ぼすような寸法とする。ナノポアは、膜にまたがって電圧厚肉を印加した際にナノポアを通過するイオン電流を監視するデバイスで官能化されるように設計されている。ナノポアは、ナノピペットの本体より成るチャンネル領域を有しており、好ましくは、先細構造、例えば、截頭円錐構造とする。以下に説明するように、石英キャピラリーをプリング処理することにより、再生可能な所定のナノポア形状を得ることができる。

【 0 0 4 9 】

用語「電流整流」は、荷電されたナノポアが、対称的な入力電圧に反応して非対称的な電流出力を得る際の効果を意味する。拡散電気二重層の厚さがポアの寸法に匹敵すると、ナノポアの表面上の固定荷電種と溶液内のイオン種との間の静電的な相互作用がナノピペットの選択透過性を変える。整流係数は、特定の正電圧で測定した電流と、これと同じであるが極性を逆とした電圧で測定した電流との間の比の対数として、すなわち

$$= \text{Log}_{10} I_{+} / I_{-}$$

として規定される。

【 0 0 5 0 】

この整流係数は、ナノピペットの整流特性、従って、センサ表面上の固定電荷を表す有効な指標である。負に荷電された石英のナノポアは負の電流整流 (< 0) を示す。ポリエルリジン、デンドリマー、アミノシラン及びキトサンのような荷電した官能化層でナノポアの表面を修飾させることにより整流を反転させる (> 0) ことができる。

10

20

30

40

50

【0051】

用語「ナノピペット装置」は、電流検出回路に動作的に接続されたナノピペットを意味するものであり、このナノピペットは、このナノピペット及び何らかの基準（参照）電極と接触する試料流体を収容するのに適しているようにしたものである。

【0052】

用語「電流検出回路」は、電流及び電圧の双方又は何れか一方を検出するデバイスを意味し、これを回路中に適用して例えば、ここで説明したようにナノピペット及び基準電極に接続する。この回路は、10～10000ピコアンペアのベースライン電流に基づいて1～100又は10～100又は1～10ピコアンペア程度の電流変化を検出する何らかの感応デバイスを有することができる。この用語は更に、時間に反応するとともに、温度に比較的依存しないか又は温度変化を補償する回路を言及するものである。回路は、既知の電圧が供給される入力端を有する必要がある。電圧クランプ増幅器及びトランスインピーダンス増幅器を有する感応検出回路は既知である。この場合、用語「電圧クランプ」は、1つの入力端を可変コマンド（指令）電圧の点に接続し、他の1つの入力端を測定電圧の点に接続した差動増幅器と、帰還回路とを用いた回路を言及するものである。電圧クランプは負帰還を用いてシステムをコマンド電圧に維持する。この場合、コマンド電圧は、信号発生器から得られる交流電圧信号のような所定の交流信号である。出力電流は入力電圧の変化を追従し、電流の僅かな変化を検出する。

【0053】

用語「石英」は、ナノピペット媒体が、結晶質の石英よりも廉価な溶融シリカ又は非晶質の石英であることを意味する。しかし、結晶質の石英を用いることができる。セラミックス及びガラスセラミックスや、ホウケイ酸ガラスも用いることができるが、精度は石英ほど良好ではない。用語「石英」は、特定の材料や、適用可能なセラミック、ガラスセラミック又はホウケイ酸ガラスを含むことを意図及び規定するものである。既存のナノピペットの製造には、種々のガラス又は石英を用いることができることに注意すべきである。主として考慮することは、直径が小さい開口に材料が引き込まれる能力である。好適なナノピペット材料は主として、種々のガラス及び石英の形態で含まれるような、二酸化ケイ素から成る。溶融石英及び溶融シリカは、主としてアモルファス（非結晶質）の形態のシリカを含む種類のガラスである。

【0054】

用語「電解質」は、固体電解質、すなわち自由イオンを含む材料を意味する。代表的なイオンには、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、塩化物、リン酸塩及び重炭酸塩が含まれる。他のイオン種も用いることができる。この材料は代表的に液体であり、この場合この液体は、検体及びイオンを溶液中に含む試料を有する。試料自体は、ヒト血漿又はその他の体液、試水等のような電解質とすることができる。電解質はイオン電流を伝える必要があり、この機能に対しては、約10～100mM、好ましくは約100mMの正及び負イオン種が必要となると考えられている。本発明のデバイスでは、ナノピペットの内部及び試料材料に同じ又は異なる電界質を採用する。

【0055】

用語「高分子電解質」は、ここではその従来の意味で用いられているものであり、すなわちその反復単位により電解質群をもたらすポリマーである。これらの群は水溶液（水）内で分離し、荷電ポリマーを形成する。従って、高分子電解質の特性は、電解質（塩類）及びポリマー（高分子化合物）の双方に類似しており、しばしばポリソルト（polysalt）と称されている。塩と同様に、これらの溶液は導電性である。ポリマーと同様に、これらの溶液はしばしば粘性である。一般にソフトマター（やわらかい物質）のシステムに用いられている荷電分子鎖は、種々の分子集合体の構造、安定性及び相互作用を決定する基本的な役割を奏するものである。高分子電解質は、荷電官能基及び合成ポリマーを含む生体ポリマーを有している。高分子電解質の例には、オリゴヌクレオチド、核酸、タンパク質、ペプチド、ペクチンのような多糖、カラギーナン、アルギン酸塩及びキトサンが含まれるが、これらに限定されるものではない。合成ポリマーの例には、ポリビニルピロリドン

10

20

30

40

50

、カルボキシメチルセルロース、ポリ（スチレンスルホン化ナトリウム）、ポリアクリル酸等含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0056】

高分子電解質上の電荷はモノマー単位から直接導出させるか、又はこれらを前駆体ポリマー上での化学反応により導入させることができる。例えば、ポリ（ジアリルジメチルアンモニウムクロライド）（“PDAD”）は、ジアリルジメチルアンモニウムクロライド、すなわち正に荷電された水溶性のビニルモノマーを重合させることにより形成する。正に荷電された共重合体PDAD-co-PAC（すなわち、ポリ（ジアリルジメチルアンモニウムクロライド）及びポリアクリルアミドの共重合体）は、ジアリルジメチルアンモニウムクロライド及びアクリルアミド（ポリマー中で中性に保たれる中性モノマー）の重合により形成される。ポリ（スチレンスルホン酸）は、中性のポリスチレンのスルホン化により形成しうる。このポリ（スチレンスルホン酸）は、負に荷電されたスチレンスルホン酸モノマーを重合させることにより形成することもできる。

10

【0057】

本発明においては、ポリアニオンを有する種々の高分子電解質を用いることができる。弱いポリアニオンは、代表的にカルボン酸基を有しており、一方強いポリアニオンは、代表的にスルホン酸基、ホスホン酸基又は硫酸基を有している。負に荷電された高分子電解質の例には、ポリ（スチレンスルホン酸）（“PSS”）、ポリ（2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸）（“PAMPS”）、スルホン酸化したポリ（エーテルエーテルケトン）（“SPEEK”）、スルホン酸化したリグニン、ポリ（エチレンスルホン酸）、ポリ（メタクリルオキシエチルスルホン酸）、これらの塩類及びその共重合体のようなスルホン酸基（ SO_3 ）や、ポリ（アクリル酸）（“PAA”）及びポリ（メタクリル酸）のようなポリカルボン酸塩や、カラゲニンのような硫酸塩、を有する高分子電解質が含まれる。他のポリアニオンには、HV アルギン酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム、ヘパリン硫酸、硫酸セルロース、カップカラギーナン、トリポリリン酸ナトリウム、低エステル化ペクチン（ポリガラクトロン酸）、ポリグルタミン酸、カルボキシメチルセルロース、コンドロイチン硫酸 6、コンドロイチン硫酸 4 及びコラーゲンが含まれる。ポリアニオンの分子量及び電荷密度は、化合物が適切なポリカチオンとで高分子電解質の錯体を形成するように選択される。

20

【0058】

ポリカチオンである種々の高分子電解質は、カチオン性ポリマーとして採用することもできる。典型的なポリカチオンには、ポリエチレンイミン（“PEI”）及びポリプロピレンイミンのようなポリアルキレンイミンが含まれる。他のポリカチオンには、ポリアミン、すなわちモノマー単位が、ポリエチレンポリアミン、ポリプロピレンポリアミン、ポリビニルアミン、ポリアリルアミン、ポリ（ビニルアルコール/ビニルアミン）、キトサン、ポリリシン、ポリミキシン、スペルミン塩酸塩、硫酸プロタミン、ポリ（メチレン-co-グアニジン）塩酸塩、エトキシ化ポリエチレンイミン、エピクロルヒドリンで修飾されたポリエチレンイミン、四級化ポリアミド、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド-co-アクリルアミド）のようなペンダントアミン基を有するようにしたポリマーが含まれる。当該技術分野で既知のように、キトサンは、ランダムに分布した β -(1-4)結合したD-グルコサミン（脱アセチル化単位）と、N-アセチル-D-グルコサミン（アセチル化単位）とより成る線状多糖類である。

30

40

【0059】

正に荷電された高分子電解質の他の例には、ポリ（ジアリルジメチルアンモニウムクロライド）（“PDAD”）、ポリ（ビニルベンジルトリメチルアンモニウム）（PVBT A）、イオネン、ポリ（アクリルオキシエチルトリメチルアンモニウムクロライド）、ポリ（メタクリルオキシ（2-ヒドロキシ）プロピルトリメチルアンモニウムクロライド）及びその共重合体のような第四級アンモニウム基や、ポリ（N-メチルビニルピリジン）（“PMVP”）、他のポリ（N-アルキルビニルピリジン）及びその共重合体のようなピリジニウム基を有する高分子電解質や、ポリ（アリルアミン塩酸塩）（“PAH”）のよ

50

うなプロトン化ポリアミンが含まれる。ポリカチオンの分子量及び電荷密度は、化合物が適切なポリアチオンとて高分子電解質の錯体を形成するように選択される。更に、ピリジルをベースとするカチオン性ポリマーの記述は、例えば、“Cationic Alkenyl Azabenzenes and Rubber Modified Asphalts”と題する米国特許US 4,384,075に見られる。以下に例示するポリ(4-ビニルピリジン)(Mw約60,000)のようなポリビニルピリミジンや、例えば、ポリ(4-ビニルピリジン-co-ブチルメタクリレート)もカチオン性ポリマーとして明確に規定されている。ピリジルをベースとするポリマーをアルキル化し、ポリカチオンを生ぜしめるのに幾つかのグループのうちの何れかを用いることができる。これらのグループには、ボロン酸、ピオチン及びキレート配位子のような受容体を含めることができる。従って、当該技術分野で理解されているように、現在の高分子電解質は、ポリアルキルピリジン、すなわちペンダントピリジル基を有するアルキル主鎖を持つポリマーとすることができる。ポリアルキルピリジンは代表的に、図16に示すように、分子量(例えば、1,000~10,000)に応じて“n”の繰り返し単位のアルキル(例えば、ビニル)主鎖を有しており、且つ全てのモノマー単位ではなく、ピリジル基がモノマーに直接結合されているか、リンカーを介して繰り返しモノマー単位に結合されている場合には、ある主鎖に取り付けられている。

10

【0060】

用語「塩」は、ここでは通常の意味で用いられており、酸及び塩基の中和反応から生じるイオン化合物を言及するものである。これらは、カチオン(正に荷電されたイオン)及びアニオン(負イオン)より成っており、生成物質は電氣的に中性である(正味の電荷が無い)。これらの成分イオンは、塩化物(Cl^-)のような無機としたり、アセテート(CH_3COO^-)のような有機にしたり、フッ化物(F^-)のような単原子イオンや、硫酸塩(SO_4^{2-})のような多原子イオンとすることができる。塩には幾つもの種類のものがある。水に溶解された際に水酸化物イオンを生じるように加水分解する塩は塩基性塩であり、水中でヒドロニウムイオンを生じるように加水分解する塩は酸性塩である。中性塩は、酸性塩でも塩基性塩でもない塩である。両性イオンは、同一分子内にアニオン中心及びカチオン中心を有するが、塩とはみなされない。これらの例には、アミノ酸、多くの代謝物、ペプチド及びタンパク質が含まれる。溶解塩(例えば、水中の塩化ナトリウム)を含む溶融塩及び溶液は、電気を通す為に電解質と称される。

20

【0061】

用語「ポリアクリル酸」(PAA)は、アクリル酸単位のポリマーを意味する。PAAの式は、 $(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n$ である。繰り返し単位の個数は、例えば、2,000~約24,000の分子量を有するポリマーが得られるように選択しうる。中性pHの水溶液では、PAAの側鎖の多くがこれらのプロトンを消失し、負電荷を獲得する。これにより、PAAを高分子電解質とし、弱酸性カチオンを形成する。

30

【0062】

用語「多糖」は、グリコシド結合により互いに結合された繰り返し単位(単糖類か又は二糖類かの何れか)により形成されたポリマー糖鎖構造体を意味する。これらの構造体はしばしば線形であるが、様々な度合の分岐を含むことができる。多糖はしばしば、僅かに変更された繰り返し単位を含む完全な異種となる。これらの巨大分子は、構造に応じてこれらの単糖構成単位とは異なる特性を有しうる。多糖における全ての単糖が同じ種類のものである場合、多糖はホモ多糖と称されるが、1種類よりも多い単糖が存在する場合には、多糖はヘテロ多糖と称されている。多糖は一般式 $\text{C}_x(\text{H}_2\text{O})_y$ を有する。ここで、xは通常200及び2500間の大きな数である。これらの例には、でんぷん及びグリコーゲンのような貯蔵多糖類や、セルロース、キチン及びアラビノキシランのような構造多糖類や、ペプチドグリカンのような細菌性多糖類が含まれるが、これらに限定されるものではない。他の例には、ペクチン、カラギーナン、アルギン酸塩、キトサン等が含まれる。

40

【0063】

イオン結合の多糖としては、キトサン、キサンタン、アルギン酸塩、キチン及びペクチンのような多糖が例示される。ここに述べたようなイオン結合の多糖類はキレート化によ

50

り機能する。

【0064】

用語「キレート化」は、その通常の意味において、キレート剤の活量を言及するものである。キレートは、金属イオン及びキレート剤より成る化合物である。キレート剤は、その分子が、単一の金属イオンに対する幾つかの結合を成し得る物質である。換言すると、キレート剤は、多座配位子である。キレート剤 (chelant) は、ASTM A 380によれば、「ある種の金属イオンを有する可用性の複合分子を形成する化学物質であり、イオンを不活性化して、これらが通常沈殿物又はスケールを生ぜしめる他の元素又はイオンと結合できないようにするもの」である。

【0065】

用語「キトサン」は、ここではその通常の意味において、ランダムに分布され、-(1-4)結合されたD グルコサミン(脱アセチル化単位)と、N アセチル D グウコサミン(アセチル化単位)とより成る線状多糖類であることを言及するものである。キトサンにおけるアミノ基は約6.5のpK_a値を有し、これにより、pH及び%DD(脱アセチル化度)に依存する電荷密度を有する、酸性から中性までの溶液中でプロトン化をもたらす。これにより、キトサンを水溶性にするとともに、粘膜のような負に荷電された表面に容易に結合する生体接着性を達成する。キトサンは、上皮表面に亘る極性ドラッグ(薬物)の移動を高めるとともに、生体適合性及び生分解性となる。キトサンは、甲殻類(カニ、エビ等)の外骨格及び菌類の細胞壁内の構造元素であるキチンの脱アセチル化により市販されるようになっている。脱アセチル化度(%DD)はNMR分光法により決定でき、市販のキトサンにおける%DDは60~100%の範囲内にある。市販のキトサンの分子量は、平均で3,800~20,000ダルトンの範囲内にある。キトサンは、金属イオンを収集するための適切な生体ポリマーとして記載した。その理由は、キトサン鎖上のアミノ基及びヒドロキシル基が金属イオンに対するキレート化位置として作用しうる為である。キトサンによる銅結合に関する更なる詳細は、文献“Food Chemistry 114 (2009) 962-969”で見ることができる。キトサンは、金属イオンを収集するための適切な生体ポリマーとして記載されている。その理由は、キトサン鎖上のアミノ基及びヒドロキシル基が金属イオンに対するキレート化位置として作用しうる為である。キトサンは、米国特許出願公開US2011/0136255に示された構造を有している。

【0066】

用語「カルモジュリン」(calmodulin(カルモジュリン)は、CALcium MODULated proteinの略語である)は、ここではその通常の意味で、全ての真核細胞で表されたカルシウム結合タンパク質を言及するものである。このカルモジュリンは、種々の異なるタンパク質標的に結合し、これらを調節し、これにより多くの異なる細胞機能に影響を及ぼすようにすることができる。カルモジュリンは、カルシウムに結合すると構造変化を受け、これによりこのカルモジュリンを特定の反応のために特定のタンパク質に結合させようようにする。又、カルモジュリンは、4つまでのカルシウムイオンを結合させることができ、又リン酸化反応、アセチル化、メチル化及びタンパク質分解的切断のような翻訳後修飾を受けることができる。これらの各々は、その作用を調整しうる可能性がある。カルモジュリンは、約148のアミノ酸の長さの小さな酸性タンパク質であり(16706ダルトン)、それ自体でタンパク質シミュレーションソフトウェアを検査するのに好ましいものである。カルモジュリンは、4つのEFハンド“モチーフ”を有しており、その各々はCa²⁺イオンを結合する。タンパク質は、可撓性のヒンジ領域により分離された2つのほぼ対称的なドメインを有している。カルシウムは、イオン配位用の電気陰性環境を提供するEFハンドモチーフの使用により結合される。カルシウムが結合した後、メチオニン残基からの疎水性のメチル基が、構造変化を介してタンパク質上で露出されるようになる。これにより疎水性表面を提示し、次にこれら表面を目標のタンパク質上の基本的な両親媒性らせん(BAAらせん)に結合しうる。これらのらせんは、相補的な疎水性領域を含んでいる。

【0067】

カルモジュリンは、カルシウムを結合している例示的なイオン結合タンパク質である。

他のカルシウム結合タンパク質はトロポニンC及びS100Bを有している。自然的な金属イオン結合タンパク質でない他のタンパク質は、小分子キレート剤に結合しうる。他の適切な結合タンパク質には、CopAや、(銅を結合する)メタロチオネイン、亜鉛フィンガータンパク質、シチジンデアミナーゼ及び(亜鉛を結合する)神経成長因子が含まれる。

【0068】

用語「ボロン酸」は、ここではその通常の意味で、オルガノボランのより大きな分類に属する炭素-ボロン結合を含むアリール基又はアリール基置換ボロン酸を言及するものである。ボロン酸はルイス酸として作用する。これらの独特な特性は、これらがシュガー、アミノ酸、ヒドロキサム酸等(近接の(1,2)又は場合により(1,3)置換ルイス塩基ドナー(アルコール、アミン、カルボキシレート)との可逆性の共有結合複合体を形成しうるということである。ボロン酸の pK_a は約9であるが、水溶液中でのコンプレクション時には、これらボロン酸は pK_a が約7の四面体のボロナート錯体を形成する。これらは、場合に応じ、分子認識領域において糖類に結合させるのに用いて、蛍光検出を達成するか、又は膜に亘って糖類を選択的に移動させるようにする。ボロナートエステルは、ボロン酸とアルコールとの間に形成されたエステルである。ボロン酸は式 $RB(OH)_2$ を有する。ここに、Rは如何なる基にもすることができ、例えば、アルキル基とすることができる。ボロナートエステルは式 $RB(OR)_2$ を有する。

【0069】

水溶液系におけるボロン酸と1,2-又は1,3-ジオールとの間の共有結合対相互作用は迅速で可逆的である。これ自体として、糖類上に存在するヒドロキシル基とボロン酸との間に確立される平衡状態を採用して糖類に対するセンサの範囲を広げることができる。この相互作用に対する可能な適用には、糖尿病の血糖値を監視するシステムが含まれる。

【0070】

ボロン酸及びボロン酸エステルは、単糖類、二糖類、オリゴ糖、多糖類を含むとともに単糖類であるグルコースをも含む糖類を検出するのに用いるために、ここに具体化するナノピペットを官能化するのに用いることができる。単糖類は、これらをより小さい炭水化物に加水分解できないという点で最も簡単な炭水化物である。これらは、2つ以上のヒドロキシル基を有するアルデヒド又はケトンである。修飾していない単糖類の一般の化学式は $(C \cdot H_2O)_n$ であり、文字通り“炭素・水化物”である。単糖類は、重要な燃料分子であるとともに、核酸に対する構成単位である。 $n=3$ の最小の単糖類は、ジヒドロキシアセトンや、D及びLグリセルアルデヒドである。2種類の結合された単糖類を二糖類と称し、これらは最も簡単な多糖類である。ボロン酸コーティングで検出しうる二糖類の例には、蔗糖及び乳糖が含まれる。オリゴ糖である検体の例には、二糖類、三糖ラフィノース及び四糖スタキオースが含まれる。多糖類の例には、でんぷん、グリコーゲン、キチン、セルロース、カロース又はラミナリン、クリソラミナリン(chrysolaminarin)、キシラン、アラビノキシラン、マンナン、フコイダン及びガラクトマンナンが含まれる。

【0071】

用語「糖結合タンパク質」は、特に炭水化物に結合するタンパク質を意味する。用語「糖類」は、「炭水化物」と同義に用いられる。糖結合タンパク質の一例はレクチン族である。その例には、コンカナバリン、マンノース結合タンパク質、ピーナッツアグルチニン、スノードロップレクチン、リシンが含まれる。

【0072】

(一般的な方法及び装置)

ここでは、電圧指令式イオン移動による水溶液中の沈殿を制御するとともに、ナノピペットの先端部を通るイオン電流に及ぼす沈殿の影響によりこの沈殿を研究する方法及び装置を記載する。ナノスケールでの沈殿の最も初期の段階を研究することは、技術的に課題となっているが、このような現象が結晶化及びバイオミネラル化のような重要な処理に反映する為に、かなりの価値があることである。石英のナノピペットをナノリアクタとして用いると、不溶性の塩の沈殿が誘起されて、発振電流遮断を生ぜしめる。可逆処理は、沈殿の反応速度及びその結果の相対寸法の双方を測定するのに用いることができる。

【0073】

図1は、イオン及び炭水化物の双方又は何れか一方の種々の種112を含む溶液106内に先端部を入れている石英のナノピペット102を通るイオン電流発振を測定する本発明による電気化学機構の一例を示す。電子機器は、ナノピペット内のイオン電流発振を測定するために設けられている。イオン電流は、ナノピペットの内部及び外部間の電圧差に反応してナノポアを通してナノピペット内に入る又はナノピペットから出るイオンの流れに起因するものである。電子機器には、ピペット内の溶液と接触させる電極104と、抵抗帰還パッチクランプ及び高速電流クランプ増幅器であるMolecular Devices（モレキュラーデバイス）社製のAxopatch増幅器であって、電極104に接続された負入力端を有する増幅器と、ナノピペットの外部の試料溶液106内の基準電極110とが含まれる。本例の機構は、石英のナノピペットを通るイオン電流を測定する。先端部におけるポア直径は代表的に40～60nmである。以下に例示しここに示すように、溶液は、KCl（0.1M）のような種々のイオンを含んでおり、且つバレル102内で10mMのリン酸カリウムにより及び浴104内で10mMのTris HClによりpH7でバッファリングされている。浴内には塩化亜鉛が2～20μMの濃度で入れられている。リン酸塩のない緩衝材を浴内に用いるのは、浴溶液中の沈殿を防止する為である。これにより、バレル内のリン酸塩が浴溶液の亜鉛イオンと混合される際に、沈殿がナノピペットの先端部に局所化される。更に、電圧クランプ回路に関する更なる詳細は、“Charge perturbation detection system for DNA and other molecules”と題している米国特許US7,785,785で見ることができる。

10

20

【0074】

例えば、図4及び9に示すように金属イオンを検出する手段として構造が異なるが同じデバイスを用いてイオン電流の整流を測定することができる。本例では、pH7のリン酸塩のような緩衝材をナノピペットのバレル及び浴の溶液の双方に対する電解質としてとしている。図1には、ナノピペットの先端部に隣接するポア内部上のコーティング108をも示してある。この領域を“ナノポア”と称し、その中で“ナノチャネル”を規定している。コーティング108は、以下に更に説明するように、先端部に亘ってメッシュ状の構造に延在させるか、又は内部表面上の単一コーティングとすることができ、且つ選択したイオン又は炭水化物を特異結合させるために用いることができる。以下に説明するように、ポリアクリル酸を108で示すように被着させる、すなわちナノピペットのケイ酸塩に被着させることができ、ポリアクリル酸の上部にキトサンを被着させる。Cuイオンはキトサンに結合するように示してあるが、pH3で釈放される。

30

【0075】

キレート剤を用いることによる金属イオンの検出は、ナノポアにおけるナノ沈殿による電流発振の変化を測定するのとは相違する。キレート剤がカチオンを結合すると、以下に説明するように負のイオン電流整流がこのような結合を表す。

【0076】

ポリマーは、カチオンとなるように合成されており、このポリマーは、ナノポア内に埋め込まれると正の電流整流を呈する。正の電荷は、糖類を結合すると、中性となり、イオン電流が負に整流されるようになる。ボロン酸がガラスに直接取り付けられている文献の他のシステムに対してはこのようにならない。これらのシステムは、シュガーの結合時に整流の僅かな変化（負の値から僅かに多い負の値への変化）を達成する。

40

【0077】

既知のように、I-V曲線（電流-電圧曲線）は、ナノポアを通る荷電イオンの流れ依存する種々の特性を呈する。整流が行われる個所では、I-V曲線は直線状とならずに、正の電圧（正の整流）に反応して、又は負の電圧（負の整流）に反応して電流の通過が多くなる。電圧の極性は、ナノピペット内の電極に関して与えられる。従って、動作中、本発明のデバイスは負の範囲で、次に正の範囲で多数の電圧レベルを順次に供給する。例えば、図4においては、-400mV～0V及び0V～+400mVの電圧が14個の別々のレベルで供給され、I-V曲線を生ぜしめるために各レベルで電流が測定される。この

50

範囲は、所定のシステムの特定のパラメータが決定する場合には狭くすることができる。

【0078】

図2は、イオン電流発振を生ぜしめる溶液及びナノピペット回路の構成を示す。ナノピペットパレル202内の負電位 ($0 < V$ として示す) が亜鉛カチオンを浴106 (図1) からポア、すなわちナノピペットの開口内に引き入れ、一方リン酸イオンはナノピペットのパレル102 (図1) から押し出される。イオンの混合 (カチオンとのアニオンの混合) がナノピペットの先端部の領域118内で生じる。十分な大きさの沈殿物が206で示すように形成されると、ポアが遮断され、イオン電流が減少する。

【0079】

以下に記載するように、不水溶性の高い塩のリン酸亜鉛に対する対イオンはナノピペットのポア及び印加電圧により分離されて、界面へのイオン移動を生ぜしめる。206での塊により示すポア遮断の反応速度を解析することにより、2つの異なる反応機構、すなわち、溶液からの沈殿による低速処理と、閉じ込められた沈殿物の電圧駆動による移動に起因する高速処理とが識別された。これらの技術は、沈殿運動を研究するとともに、図2に示すように“反応領域”と考えられるナノリアクタ内の捕捉粒子に関する測定を実行するのに用いることができる。本例では、粒子はリン酸亜鉛の塩類である。他の粒子はタンパク質、特に荷電されたタンパク質を含むことができ、結晶学で用いられるような結晶を取り除くための条件を検査するのにナノピペットを用いることができる。上述したデバイスは、対イオンを有するナノ沈殿に基づいてカチオン又はアニオンの何れかに対する電気センサとしても用いることができる。

【0080】

受容体で官能化したナノピペットを用いてイオンを可逆的に結合させる電気センサも開示する。ここに与えるセンサは、pH、カルシウム、銅及び炭水化物に対するセンサである。受容体は、酸性又は塩基性の官能性、金属キレート剤又はタンパク質を有する分子とすることができる。カルシウムバイオセンサに対する概念実証として、タンパク質カルモジュリンをナノピペットの先端部の内部に固定させた。センサは、中性のpHの電解質内の、マグネシウムを超えたカルシウムの選択性を呈し、単に新鮮な溶液内に浸漬させることによりカルシウムシグナリングを可逆的とした。このセンサは、再現可能で濃度に依存する信号を用いた20回を超える別々の測定に対して使用した。

【0081】

更に、ある高分子電解質で官能化したナノピペットが遷移金属を可逆的に結合させるということが立証された。概念実証として、外部層としてキトサンで修飾されたナノピペットと、石英の内部の上に層状に形成したポリアクリル酸 (PAA) とが銅を可逆的に結合させることを示した。この場合、キトサン/PAAを、以下に説明するように被着させる。ナノピペットの外側は例えば、シランで処理する。Cuイオンは、ナノピペットの内側表面上のポリアクリル酸と組み合わせたキトサンに結合する。pH3では、 Cu^{2+} イオンがキトサンから外れる。ナノピペットの外側の表面処理は、膜、例えば、脂質二重層、すなわち細胞膜を通るナノピペットの透過を容易にするために行うことができる。このナノピペットの外側の表面処理は、ナノピペットに対する受容体の結合を変えない。

【0082】

更に、以下に示すように、印加電圧を用いてナノピペットの結合特性を調整することができる。ある実施例では、ナノピペットを、炭水化物を含むイオンへの結合を行うようにするタンパク質により官能化する。他のある実施例では、ナノピペットを、炭水化物を検出するようにするボロン酸又はボロン酸エステルにより官能化する。更に、アミン又はカルボン酸基を含む高分子電解質、アミンを含む生体高分子キトサン又はアミノシランの何れかによりナノピペットを官能化することによりpHに対するセンサを準備した。pHセンサはpH3 ~ pH8の異なる緩衝材に対し急速に可逆反応することも示した。これらの種類のセンサは、水質の監視、生体内単細胞分析又は官能性イオンのマッピングのような、可逆的で連続性のセンサ又はセンサアレイを必要とする多くの異なる分野に対し用いることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 3 】

[例 1 : P L L 及び P A A 高分子層によるナノピペットバイオセンサの生成及び特性化]

Sutter(サッター)社(カリフォルニア州ノバート所在)製の、フィラメントを有する石英キャピラリー(型番:QF100-70-7.5)をそのまま使い、これを同社製の型番P-2000のレーザプラでプリング処理してナノピペットを形成した。使用したプラの設定値は、ヒート(heat)を620、フィラメント(filament)を60、ベロシティ(velocity)を60、ディレイ(delay)を170、プル(pull)を180とした。これらの設定値はプラ

に応じて変更することができ、必要に応じ所望のコンダクタンスで負のイオン電流の整流を呈するナノピペットを形成するように調整した。これらのピペットに、その他に示さない限り緩衝化した電解質(10mMのTris-HCl及び100mMのKCl)を裏込めした。上述した2つのセンサは、プリング形成した1つのキャピラリーから成るツインピペットである。センサCaM₁は高分子電解質を堆積する前に処理しておらず、センサCaM₂は蒸着を用いてトリメチルクロロシラン(TMCS)でシラン処理した。ナノピペットを、0.1ミリリットル(mL)のTMCSを入れた0.5リットルの容積の密閉室内に10分間挿入した。次に、双方のピペットに緩衝化した電解質を裏込めし、これらピペットを同じ緩衝材の浴内に浸漬させた。イオン電流は、ピペットバレル内のAg/AgCl電極と浴内の接地電極とを用いて型番700BのAxopatch増幅器で測定した。これに続く表面処理中にイオン電流を監視するのに+500mV~-500mV(5Hz)の正弦波電位を適用した。ピペットの先端部を3ppmの濃度のPLL及びPAAをそれぞれ入れた緩衝化電解質内に順次に挿入することにより高分子電解質ポリエリジン(PLL)及びポリアクリル酸(PAA)をナノピペットの表面上に堆積した。この場合、各高分子電解質の堆積後にこの先端部を緩衝材内に浸漬させて洗浄した。電流整流中に得られる変化(PLLの場合正、PAAの場合負)が緩衝材内での浸漬中に維持されていれば、高分子電解質の層は安定であるということが決定されたことになる。CaM₁及びCaM₂の双方は、4つの層、すなわちPLL、PAA、PLL及びPAAで官能化させた。続いて、これらピペットを、NH₄S及びEDCの各々を10mg/mLだけ入れた溶液(50mMのKClを有する100mM、pH6.1のMES緩衝材)内に1時間浸漬させた。最後に、ピペットの先端部を洗浄してカルモジュリン(50mMのKClを有するpH6.1のMES緩衝材(100mM)内の0.05mg/mLのウシ脳)の溶液内に浸漬させ、4で1

【 0 0 8 4 】

センサの電気特性及び金属塩に対する反応は上述した電気機構を用いて解析した。全ての測定は、0.3mLの緩衝材の浴に直接加えた塩化カルシウム又は塩化マグネシウムの何れかのアリコート(1~10μL)を有するpH7の緩衝化された電解質溶液内で実行した。データはpClamp(登録商標)ソフトウェアを用いて200Hzのレートでサンプリングし、OriginPro(登録商標)8.5を用いて処理した。連続的な測定データの場合、正弦波状の印加電圧により生ぜしめられる負のイオン電流ピークが時間の関数として検出され、プロットされた。線形平滑化は50%パーセントイルフィルタ及び10ポイントムービングウィンドウ(10-point moving window)を用いて行い、電流整流係数()は式

$$= \text{Log}_{10} I_{+} / I_{-}$$

を用いて計算した。この式で、I₊は500mVの電位でのイオン電流の大きさであり、I₋は-500mVの電位でのイオン電流の大きさである。イオン電流の誤差は、測定間において緩衝材中で洗浄した後同じナノピペットを用いるようにしたI₊及びI₋の3回の別々の測定間の標準偏差をもたらすものである。

【 0 0 8 5 】

[例 2 : ナノピペットに固定されたカルモジュリンによる選択的で可逆性のCa²⁺結合]
生物学的な受容体との可逆性で選択性のイオン結合を達成するために、カルモジュリン、すなわち高選択性のカルシウム(約10⁻⁶MのK_d)を可逆的にキレートするカルシウム結合タンパク質で修飾したナノピペットセンサを研究した。固定したカルモジュリンを

用いる電気センサは、文献：Science vol. 293: pages 1289-1292 (2001)の“Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species”でCui氏等により、カルシウム濃度を調査する場合と、文献：Bioelectrochem. Bioenerg. 1998, 45(1), 27-32の“An amperometric biosensor for real-time analysis of molecular recognition”でIvnitiski氏等及び文献：Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010, 107(3), 1047-1052の“Label-free detection of protein-protein interactions using a calmodulin-modified nanowire transistor”でLin氏等により、タンパク質-タンパク質の相互作用を調査する場合との双方の場合に対し従来報告されている。本発明の対策には、タンパク質をポアに固着させるのと、受容体をポア溶液の界面に局所化して急速で可逆性のイオン反応を達成する必要性との双方を考慮する。

10

【0086】

予備研究では、カチオンに対する最大反応が負の整流を表すポアにより観察され、表面の官能化に対する本発明の手段によれば、最終的なセンサがこのようなポアに基づくことを達成した。高分子電解質は荷電したポア表面との強い静電相互作用を有し、イオン電流整流はナノポアに対する高分子電解質結合の優れた指標である。このことを考慮して、イオン電流測定を用い、ナノピペットにおいて高分子電解質の層順次の堆積を監視し、所望のコンダクタンスを有する負に整流されたナノポアを生ぜしめる。タンパク質内のアミン基と際外側の高分子電解質上のカルボキシレート基との間にアミン結合を形成することにより、タンパク質を石英の表面に結合させた。バルク溶液とのより大きな相互作用があるポア-溶液の界面に受容体を局所化するために、ポアを浸漬のみにより官能化させ、ナノピペットの内部には緩衝材を充填させたままにする。このような手段は、ポアを直接囲む領域に加えて表面の比較的大きな領域を官能化する為、外側の表面が疎水性のシランで被覆されたナノピペットも検査した。

20

【0087】

ナノピペットの表面処理を実時間で監視して、幾つかの工程に対する界面化学の安定性を決定した。同じキャピラリーからプリング形成したツインのナノピペットを、表面処理の同じ工程中取り入れた。処理には、シリカの表面上のペンダント酸素基との反応を含めた。PAA及びPLL層を被着し、これによりペンダントカルボキシル基を得た。すなわちこれらの基にカルモジュリンが結合された。従って、高分子電解質層(ポリエルリジン)PLL、(ポリアクリル酸)PAAの堆積と、これに続くNHS/EDC結合を用いるCaM(カルモジュリン)へのアミド結合の形成とにより、石英上の表面の官能化を達成させた。実際に、石英-PLL-PAA-PLL-PAAのサンドイッチ構造体が形成される。

30

【0088】

センサCaM₁はプリング処理後に直接使い、センサCaM₂は最初にトリメチルクロロシラン(TMCS)の蒸気で処理して、外側のピペットの先端部をシラン処理した。カチオンのポリエルリジン(PLL)又はアニオンのポリアクリル酸(PAA)を入れた中性の緩衝材内にナノピペットを浸漬させた際に、イオン電流整流(ICR)を監視し、整流が純粋な緩衝材中で安定に保たれた後にのみ後続の層を加えた。図4に電流-電圧プロットで示すように、裸のナノピペットは負のICRを有し、ここで裸のピペットの電流-電圧反応を(図面中では黒で塗りつぶしてある)で示し、PLL及びPAAの2層の被着後のピペットの電流-電圧反応を で示し、CaMを結合した後のピペットの電流-電圧反応を で示した。PLL/PAAの2層の被着後、電流は依然として負に整流されるが、大きさが小さくなることにより堆積後のポアは小さくなることを示している。この反応はカルモジュリンタンパク質の固着後も継続され、このたんぱく質も中性のpH(pIは約4)で負に荷電される。整流係数は電流-電圧曲線に見られる反応に反映する。裸のピペットの場合整流係数 = -0.27 ± 0.03 、PLL/PAAの第2の層を被着したピペットの場合整流係数 = -0.71 ± 0.02 、CaMを結合したピペットの場合整流係数 = -0.533 ± 0.014 である。これらの測定における誤差が少ないことは、各工程における表面に安定性があることを表している。ナノピペットでの電流整流は、表

40

50

面コーティングに反映した（官能化が異なることにより異なる整流係数を示す図5 Aを参照）。PLL層の被着後には電流整流は正の値を有し、PAA層の被着後には整流は負となった。電流は、正弦波状の発振電位（5 Hzの - 500 ~ 500 mV）で測定した。エラーバーは、各測定間で且つ緩衝材内で洗浄して用いた同じナノピペットでの3回の別々の測定を反映しているものである。CaMで修飾したナノピペットも、カルボン酸塩含有残基から得られるタンパク質の全負電荷と一致する負の電流整流を呈した。図5 Bに示すように、- 500 mVの電位での電流はカルシウムイオンの存在により著しく影響を受ける。イオン電流は、0.1 mMの塩化マグネシウムが添加され0.1 mMの塩化カルシウムが存在するpH 7の緩衝材中での時間の関数として示してある。カルシウムに対する選択性は、マグネシウムイオンに対してカルシウムイオンが大きな信号変化を呈することにより示されている。結合の可逆性は、純粋な緩衝材内に浸漬させ、これに続いて塩化カルシウムを入れた緩衝材中に浸漬させることによる信号の復元により示されている。

【0089】

【例3：金属イオン結合ポリマー（Cu結合キトサン）で官能化されたpH感応性ナノピペットセンサ】

アミノシラン、すなわちアミン含有生体高分子キトサン（図6）か又はアミン或いはカルボン酸基含有高分子電解質でナノピペットを官能化することによりpHのセンサを形成した。これらのpHセンサは、pH 3 ~ pH 8の異なる緩衝材に対し急速な可逆反応を呈した。ナノピペットにはpH 7の電解質（10 mMのTris-HClを有する100 mMのKClの緩衝材）を充填し、pHを変化させる緩衝化した電解質（10 mMのリン酸塩/クエン酸塩緩衝材を有する100 mMのKCl）内に浸漬させた。イオン電流は、- 500 ~ 500 mVの正弦波状の電位を5 Hzで供給している間に測定した。測定は、10 mMのリン酸塩/クエン酸塩で所望のpHに緩衝化した0.1 MのKCl溶液で行った。エラーバーは同じセンサで少なくとも4回の異なるpH測定から計算した（図6）。図6は、pH値を異ならせた場合の、裸のナノピペット及びキトサン/PAA官能化ナノピペットに対する整流係数の比較を示している。整流係数は、プロトン化しうるカルボン酸塩及びアミン基のために、官能化されたナノピペットに対するpHに対しより一層感応性となる。中性のpHでは、官能化されたナノピペットは裸のナノピペットよりも著しくより一層負の整流を示し、コーティングがナノポアの表面における荷電基をより一層負にすることを示す。

【0090】

【例4：ナノピペット上への高分子電解質及びキトサンの静電的物理吸着】

以下の処理を用いてキトサン及びポリアクリル酸を物理吸着させた。ナノピペットをpH 3で緩衝化した350 μ Lの溶液内に浸漬し、10 μ Lのキトサン貯蔵溶液を容器内に加えた。キトサンの物理吸着は酸性のpHで生ぜしめる必要がある。その理由は、この高分子電解質は中性のpHでは溶解性でない為である。次に、ナノピペットを350 μ LのpH 7で緩衝化された溶液内に移し、10 μ LのPAA貯蔵溶液を容器内に加えた。次に、官能化されたナノピペットを、センサ上に所望数の層が得られるまで2種類の溶液間で循環させた。

【0091】

円錐形状でナノメートルの大きさのポアにより、固体のナノポア上に所望の電気化学的な反応を生ぜしめる。例えば、荷電されたナノポアは、対称的な入力電圧に反応して非対称的な電流出力、すなわち電流整流と称される効果を得る。ナノピペットにおけるこの効果の原点は、文献：Pourmand, N. *Bioanalytical Reviews* 2010, 1, 177（本発明者の2人であるActis P.及びMak A.氏著）に詳細に記載されている。簡潔に言えば、拡散電気二重層の厚さがポアの寸法に匹敵すると、ナノポアの表面上の固定荷電種と溶液内のイオン種との間の静電的な相互作用がイオン移動特性を変える。整流程度を定量化するために、整流係数として示す有用なパラメータを導入するか、或いは、ある場合には、特定の正の電圧で測定した電流と、これと同じであるが極性を逆とした電圧で測定した電流との間の比の対数として、すなわち

$$= \text{Log}_{10} I_{+} / I_{-}$$

10

20

30

40

50

として規定した整流度を導入した。

【0092】

負に荷電された石英のナノポアは、負の電流整流 (< 0) を呈する。ナノポアの表面を、ポリエリジン、デンドリマー、アミノシラン及びキトサンのような荷電した官能化層でナノポアの表面を修飾させることにより整流を反転させる (> 0) ことができる。

【0093】

高分子電解質の静電的物理吸着は、簡単な電気化学的な測定により監視しうる。キトサンの主鎖からの正に荷電されたアミノ基が、負に荷電されたナノピペットの表面上に高分子電解質を物理吸着させる。キトサンの物理吸着は酸性の pH でのみ生じる。その理由は、この多糖は中性の pH では不溶性である為である。同様に、ポリアクリル酸 (PAA) のカルボキシル基は中性の pH でポリマーに負電荷を与え、正に荷電されたキトサンのナノピペット上に物理吸着を行う。電気化学測定により、あらゆる高分子電解質層の堆積をも監視する。整流係数はナノピペットの表面電荷の指標となる。このパラメータを用いて、石英のナノピペット上の層順次のアセンブリ (集合) の効果を定量化した。興味深いことに、多層のアセンブリによりナノピペットの整流特性を増大させた。すなわち、pH 7 での整流係数は、裸のナノピペットに対する - 0.1 から、キトサン/PAA の 5 層を物理吸着させ、その後に安定状態にした後の - 0.8 まで増大した。同様に、pH 3 では、整流係数は 0 から 5 層の物理吸着後の 0.65 に増大した (図 7)。更に、5 層の物理吸着後の整流係数以外では、PAA 又はキトサンの更なる追加によっては全電流に変化はなかった。このことは、キトサンと PAA との混合層で既に完全に被覆されたセンサ表面上には高分子電解質は堆積されないことを表している。これらのことは、PET 膜内の単一の非対称なナノチャネルの表面電荷はナノチャネル内に組み合わせる層の個数に応じて著しく減少するというを示している文献: Journal of the American Chemical Society 2010, 132, 8338 (Ali M.; Yameen B.; Cervera J.; Ramirez P.; Neumann R.; Ensinger W.; Knoll W.; Azzaroni O. 氏著) で Ali 氏らが記載しているものとは対照をなすものである。この反応は、層のアセンブリによる完全な層よりもむしろ混合層をもたらす不完全な多層を形成することにより説明しうる。従って、この前提を裏付けるために、キトサン/PAA により修飾させたナノピペットの pH 反応を研究した。測定は、10 mM のリン酸塩/クエン酸塩で所望の pH に緩衝化した 0.1 M の KCl 溶液中で行った。エラーバーは同じセンサで少なくとも 4 回の異なる pH 測定から計算した (図 8)。キトサンは - 6.5 の pK_a 値を有し、PAA は 4.8 の pK_a 値を有する。完全な層順次のアセンブリお仮定し、PAA が最外側の層であるものとする、ナノピペットは $pH < 4.8$ で中性とし、 $pH > 4.8$ で負に荷電させる必要がある。同様に、キトサンが最外側の層であるものとする、ナノピペットは $pH < 6.5$ で正に荷電させ、この値よりも大きい pH で中性の荷電とする必要がある。しかし、キトサン/PAA ナノピペットの整流係数は $pH < 5$ で正であり、 $pH > 5$ で負である。このことは、 $pH < 5$ でナノピペットの選択透過性はキトサンのプロトン化したアミノ基により影響され、 $pH > 5$ ではナノピペットの選択透過性は PAA の負に荷電されたカルボキシル基により影響され、従って、混合層を形成する実証を表している。

【0094】

[例 5: キトサン及び PAA の多層で静電的に修飾させた石英のナノピペット上に結合する選択性及び可逆性の Cu^{2+}]

石英のナノピペット上へキトサン及び PAA 層を物理吸着させることにより、裸のセンサでは観察されない可逆性の金属結合特性をこのナノピペットに与える。キトサン及び PAA のキレート特性は周知であり、文献に詳細に説明されている。キトサンは複数の金属イオンを結合させるが、このキトサンは第二銅イオンに対しより強い親和力を呈する。従って、キトサン/PAA センサに対する銅の錯体形成を研究することをモデルシステムとして決定した。

【0095】

試薬: キトサンは CERMAY (サーメイ) 社から購入した。5 mg/ml のキトサンを pH 3 の

HCl溶液に入れた貯蔵溶液を準備（調製）し、ここに記載した全ての実験に使用した。ポリアクリル酸はSigma-Aldrich（シグマ アルドリッチ）社（ミズリー州セントルイス所在）から購入した。pH 7.4のPBS溶液は標準の方法を用いて準備した。水性試薬は、 $>18\text{ M}^{-1}$ の抵抗値とした超純水を用いて準備した。

【0096】

センサの製造：外径を1.0mmとし、内径を0.70mmとした、フィラメントを有する石英キャピラリー（Sutter Instrument社の型番：QF100-70-5）から、ナノピペットを製造した。この場合、このキャピラリーを、内径が50nmのナノピペットを製造するようにプログラミングした（Sutter Instrument社）の型番P-2000のレーザプラを用いてプリング処理した。使用したパラメータは、ヒート（Heat）を625、フィラメント（Fil）を4、ペロシティ（Vel）を60、ディレイ（Del）を150、プル（Pul）を192とした。得られたナノピペットの先端部は、37～82nmの範囲内の内径を有し、平均の径は56nmとした。

【0097】

測定機構：全ての測定を2電極機構で実行した。その理由は、ナノピペットを通して流れる電流は基準電極を分極させるにはあまりにも小さい為である。作用電極として機能するセンサにはpH 7で緩衝化した10mMのTris-HClを裏込めし、Ag/AgCl電極を挿入する。補助/基準電極として作用する他のAg/AgCl接地電極をバルク溶液内に配置する。これらの双方の電極を、DigiData 1322Aデジタイザを有するAxopatch 700B増幅器（Molecular Devices（モレキュラーデバイス）社製）と、pClamp 10ソフトウェア（モレキュラーデバイス社製）を具えるPCとに接続する。システムは測定期間の間攪拌することなく室温となるように保った。

【0098】

図9は、裸のナノピペットセンサと、PLL/PAAを被覆したナノピペットとに対する、-500及び+500mVの電位におけるイオン電流を示す。容器内に Cu^{2+} を添加することによりセンサの選択透過性に直ちに影響を及ぼし、-500mVの電位でイオン電流を減少せしめる。結合は完全に可逆的であり、センサは、如何なる性能の損失もなく5回まで再生される。再生は、センサをpH 3の緩衝材内に60秒間浸漬させることにより実行される。酸性のpHはキトサンアミノ基をプロトン化し、従って溶液中で第二銅イオンを釈放させる（図10）。中性のpH及び0.1%EDTAでクエン酸塩緩衝材内に浸漬させるような他の再生方法によっても同様な成功を呈した。銅の結合に対し双方の高分子電解質の複合効果を考慮することが重要である。バルク溶液内に銅を添加した際に出力電流に殆ど変化を呈しないキトサン及びPAAだけでナノピペットを官能化させた場合に実験を実行した。更に、高分子電解質と石英との間の界面は安定でなかった。その理由は、銅の結合特性が完全に失われる前にセンサが1回のみ再生されるにすぎない為である。キトサン及びPAAの混合層をナノピペット上に構成した場合、界面は複数の検出サイクルに亘って安定となった。-NH₂、-OH及びCOOH基の全てが銅吸着中にキトサン/PAAアタパルジャイト複合材料により取り込まれるということをFTIR測定中にWang氏及び共働者が立証した（文献：Journal of Hazardous Materials 2009, 168: 970（Wang X.氏、Zheng V.氏及びWang A.氏著）参照）。同様なキレート化がキトサン/PAAセンサで行われ、金属結合能力を高めることが考えられた。

【0099】

種々の濃度の銅イオンに対するセンサの応答を調査した（図11）。センサは Cu^{2+} の濃度が増大するのに直線的に反応した（図11、挿入図）。正規化電流対 Cu^{2+} の濃度の変化はラングミュア吸着等温線に類似している。電流は、

$$I_n = 1 - (I_s / I_b)$$

に応じて正規化した。ここで、 I_s は溶液中に銅イオンを添加した後の信号であり、 I_b は純粋な緩衝材中で測定したベースライン信号である。結合処理が平衡処理であるものとする、正規化電流の変化は、センサに結合された第二銅イオンの個数に比例し、結合部位は独立であり、錯体形成式は、

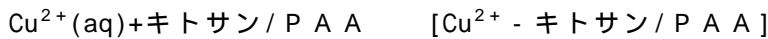
10

20

30

40

50



で与えられる。

【0100】

センサに結合される Cu^{2+} に対する熱力学的親和定数 K を、次式を用いて評価しうる。

【数1】

$$\frac{1}{I_n} = \frac{1}{I_{\max}} + \frac{1}{I_{\max} K c_{\text{Cu}^{2+}}}$$

ここで、 I_{\max} は最大の表面被覆率での I_n 値であり、 c は溶液中の第二銅イオンの濃度である。 $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ の K 値は図11の線形フィットから推定することができる。この値は、プラットホームが異なるキトサンに対するカチオンの吸着に対し計算した値と良好に一致している。

10

【0101】

[例6：印加電圧の波形、振幅及び周波数の影響]

印加電圧、すなわちナノピペットの内部の溶液を含む電極と、外部溶液内の電極との間の電圧は検出機構における重要な役割を奏している。分子は、ナノピペットの先端部に捕捉又は集中されるようにしうる。更に、印加電圧によりセンサの検出領域内の結合事象の可能性を高める。最初に、正弦波状の波形の振幅及び周波数が、銅イオンの結合時に如何にナノピペットの電気信号に影響を及ぼすかを研究した。印加電圧の振幅(a)及び周波数(b)の関数として Cu^{2+} ($20 \mu\text{M}$)の固定濃度に対するセンサの反応を、 0.1 M の KCl と 10 mM の Tris-HCl との双方の溶液($\text{pH} 7$)内で測定した。

20

【0102】

より高い電圧を印加すると、キトサン/PAAセンサによる第二銅イオンのキレート化時の出力電流の変化が大きくなる。銅濃度が等しい($20 \mu\text{M}$)場合、電流は 1 V の振幅時のその初期値の5%に減少したが、 50 mV を印加した場合には46%の減少が検出されただけである。興味深いことに、印加する正弦波状の電圧の周波数が高くなればなるほど、センサによる銅の結合時に測定される変化が小さくなった。パルク溶液中の Cu^{2+} の濃度が $20 \mu\text{M}$ である場合、電流は 1 kHz の周波数でその初期値の68%に減少したが、 0.5 Hz の周波数でその初期値の58%に減少した。

30

【0103】

AC電圧に対するセンサの反応を特性化した後、DC電圧の影響を調査した。センサ上の銅の結合は印加電圧により制御しうる。正の電圧を印加すると、電気泳動による流れによりナノピペットの先端部からカチオンが放出される。この効果を利用すれば、印加電圧を制御することにより、センサ上の銅の結合をもたらしすることができる。印加電圧を正にすると、結合が生じない。その理由は、第二銅イオンがナノピペットの先端部から放出される為である。電圧が正に切換ると直ちに、結合が生じ、イオンの流れの減少、すなわち次の正のステップに反映される変化を生ぜしめる(図13)。

【0104】

[例7：ナノピペットを具える沈殿検出用電圧依存ナノリアクタ]

40

本例では、イオン移動を制御するとともに、2種類の水媒体の界面に不溶性塩類を沈殿させるのに、ナノピペットの開口にまたがる電圧バイアスを如何にして用いるかを開示する。更に、ナノポアにおけるリン酸亜鉛の沈殿により必要とする発振電流発生条件や、沈殿物の特性にかかわる調査及びその後のポアからのこの沈殿物の排出を説明する。更に、沈殿により永続的に封鎖されるように見えるポアを電圧パルスにより簡単に清浄しうること及びポアを封鎖する反応速度を検査する方法を用いることを示している。

【0105】

(薬剤及び溶液)

金属塩の貯蔵溶液($100 \sim 500 \text{ mM}$)を、5%の HCl を入れたMilli-Q超純水で準備した。次に、これらを実験日に緩衝材中で希釈した。塩化カルシウム四水和物をフィッシャ

50

ー (Fisher) 社から購入した。塩化亜鉛、塩化鉄 (III) 及び塩化マグネシウム (1.0 M 溶液) は Sigma-Aldrich 社から購入した。緩衝材溶液は塩化カリウム (Baker 社)、リン酸ナトリウム、二塩基 (Sigma 社) 及び Tris-HCl (1 M の溶液、pH 7.00 (Sigma 社)) から形成し、これを HCl (1 M) 又は KOH (0.1 M) で調節した。分析のために用いた全ての緩衝材の溶液には、10 mM の緩衝材及び 100 mM の塩化カリウムを入れた。

【0106】

(石英のナノピペットの製造)

ナノピペットは、外径を 1.0 mm とし、内径を 0.70 mm とした、フィラメントを有する石英キャピラリー (Sutter Instrument 社の型番: QF100-70-5) から製造した。この場合、このキャピラリーを、内径が約 50 nm のナノピペットを製造するようにプログラミングした (Sutter Instrument 社) の型番 P-2000 のレーザブラを用いてプリング処理した。使用したパラメータは、ヒート (Heat) を 625、フィラメント (Filament) を 4、ベロシティ (Velocity) を 60、ディレイ (Delay) を 170、プル (Pull) を 180 とした。10 mM の緩衝材及び 100 mM の KCl の溶液中では、ピペットは、-0.5 V の電位で -2500 ~ -4000 pA の電流を生じた。

10

【0107】

(測定機構)

ナノピペットを通るイオン電流を測定するために、2電極の機構を用いた。ナノピペットには緩衝材溶液を裏込めし、Ag/AgCl 電極を挿入した。補助/基準電極として作用する他の Ag/AgCl 電極を 0.3 mL のバルク溶液内に配置した。これらの双方の電極を DigiData 1322A デジタイザを有する Axopatch 700B 増幅器 (Molecular Devices 社製) と、pClamp 10 ソフトウェア (Molecular Devices 社製) を具える PC とに接続した。正電位を、カウンター電極に対してピペットのバレル内の電極に印加するアノード電位と称する。実験は 24 で行った。

20

【0108】

(電圧駆動ナノ沈殿)

電圧駆動混合によりリン酸亜鉛の沈殿を生ぜしめるために、ナノピペットのバレルにリン酸緩衝電解質の溶液を裏込めし、ナノピペットの先端部をリン酸塩の無い Tris-HCl の緩衝材内に浸漬させた。塩化亜鉛溶液のアリコート浴に添加して、繰り返しのピペット操作により攪拌した。+500 ~ -800 mV の電圧を印加している状態でシステムを監視した。種々の pH での実験では、6、7、8 又は 10 の pH 値でバレル内のみのリン酸緩衝材を変えた。

30

【0109】

(電流発振の反応速度)

-500 mV の電位で電流値を -3500 ~ -4500 pA としたナノピペットを選択した。-350 ~ -500 mV の電位により電流発振を生じ、この場合高コンダクタンス状態及び低コンダクタンス状態に対するしきい値を設定した。高コンダクタンス状態から低コンダクタンス状態までの時間を測定することにより、ポアの封鎖スローブをミリ秒当りの pA で評価した。高コンダクタンス状態及び低コンダクタンス状態を次の通りに設定した。すなわち、-500 mV、-1700 及び -1200 pA と、-400 mV、-1200 及び -700 pA と、-350 mV、-900 及び -400 pA と、-300 mV、-1000 及び -500 pA とである。ポアを短時間に解放させるために、二相性波形を用い、印加電位を +500 及び -500 mV 間でそれぞれ 2.5 秒の期間の間発振させた。高コンダクタンス状態に対するしきい値を -3500 pA に設定し、低コンダクタンス状態に対するしきい値を -2000 pA に設定した。ポアの封鎖スローブは、低コンダクタンス状態に到達するまでに必要とする時間から計算した。

40

【0110】

(データ分析)

データは Clampex (クラムペックス) ソフトウェアを用いて 1 kHz のレートでサンプリ

50

ングした。データ処理は、Clampfit (クランプフィット) 及び OriginPro (オリジンプロ) 8.5 (マサチューセッツ州ノースハンプトン所在のOriginLab (オリジンラブ) 社) を用いて行った。高コンダクタンス状態対低コンダクタンス状態における相対時間の計算にはOriginPro のピーク検出関数を用い、負 (高コンダクタンス) 又は負 (低コンダクタンス) のピークを検出し、各状態における事象の回数を総事象のパーセントとして計算した。

【0111】

(結果)

ナノピペットをナノリアクタとして用いるために、イオン移動によるポアにおけるリン酸亜鉛の沈殿を制御する条件を確立した。代表的な機構では、ナノピペットのバレルを充填する電解質溶液 (10 mM の緩衝材を有する 100 mM の KCl) 内に Ag/AgCl 電極を挿入した。ピペットの先端部は、Ag/AgCl 接地電極をも収容する電解質浴内に浸漬させる (図1参照)。

10

【0112】

電位を印加すると、定常イオン電流が測定される。しかし、浴に塩化亜鉛をマイクロモル濃度に添加すると、システムが高コンダクタンス状態及び低コンダクタンス状態の発振周期を受けるようになる。これらのサイクルは、ナノピペットの先端部の内部に著しい不溶性のリン酸亜鉛の沈殿及びポアからのその排出に起因した。このようなピペットにおけるナノ沈殿により生ぜしめられた発振は図3に示すように秒の単位であり、低コンダクタンス性の変動状態や、高コンダクタンス状態に対する急速で短命な発振により示されている。-350 mV の電位におけるイオン電流の (図3の) 時間プロットは、ポアを完全に開放させて終了しない幾つかの沈殿事象を示しており、むしろ低コンダクタンス状態が -400 及び -700 pA 間で変動する多くの事象があることを示している。これらは、沈殿物がポアを完全に封鎖するのに十分な大きさに成長する前に排出される為であるものと思われる。しかし、高コンダクタンス状態に達すると、電流は確実にほぼ -1200 pA の極大値に到達し、これに続いて -400 pA まで急激に降下する。このことが、ポアの完全な清浄及びこれに続く急速な沈殿を表している。

20

【0113】

亜鉛及びリン酸塩イオンを電圧誘起によりイオン移動させることにより沈殿反応を制御し、2種類の溶液の界面であるナノポアにおける混合によりこの沈殿反応が簡単に生じないようにすることを示すために、亜鉛及びリン酸塩対イオンを2種類の溶液内に分離させた。すなわち、リン酸イオンをナノピペットの内部に閉じ込め、亜鉛イオンは浴 (図1) 内にあるようにする。このシステム内で発振電流の遮断を誘起させるのに必要とする最小電圧は -300 mV である。+500 mV ~ -200 mV の電位では、安定な電流が生じる。-300 mV では、電流が急速な変動を伴って直ちに遮断状態となる。ナノ沈殿に対し電圧のしきい値を存在させることは、2種類の溶液の界面で2の対イオン間に混合が殆ど生じないことを表す。正の電圧を印加すると電流整流により信号の大きさが小さくなるが、信号は亜鉛又はリン酸塩の存在により影響されない。この電圧依存効果は、イオンが逆の電荷の電極に向かい、リン酸塩及び亜鉛イオンをピペットの先端部で遭遇するようにする場合と一致する (図2)。塩化亜鉛がピペットバレル内にあり、リン酸塩が浴内にあるように溶液の配置を逆にすると、正の電位又は負の電位で遮断が生じない。この構造における正の電位は、亜鉛イオンがピペットから押し出されリン酸塩が浴からポア内に移動する為に、沈殿を生ぜしめるが、このことは観察されない。この構造での電流遮断の不足は、ピペットの内側先端部での (亜鉛のような) カチオンの排除、すなわち円錐状のナノポア内の電流整流の原因としてしばしば挙げられる現象によるものである。

30

40

【0114】

浴内のイオンの濃度及び組成や pH を変えることにより沈殿物の性質に関し更なる研究を行った。沈殿物は、リン酸亜鉛、すなわち 10^{-35} (モル/L) の K_{sp} を有する水溶液系で極めて不溶性である塩より成っているものと仮定した。pH 7 の溶液中の優勢種はリン酸二水素 ($H_2PO_4^-$) 及びリン酸水素 (HPO_4^{2-}) であるが、リン酸亜鉛は熱力

50

学的に安定であり、中性又は酸性の pH の溶液中に形成される。溶液はほぼ $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ のリン酸及び亜鉛イオンで飽和される。塩化亜鉛を 2 及び $40 \mu \text{ M}$ 間の濃度で浴に添加し、 $\text{pH } 6 \sim \text{pH } 10$ のリン酸塩の緩衝材を充填したピペット内で発振電流が見られた。カルシウム及びマグネシウムのような他の二価イオンをこれらの濃度で検査したが、塩化鉄(III) ($10 \mu \text{ M}$) でのみ匹敵しうる他の電流遮断が得られ、これによりポアを不可逆的に封鎖した。このことは、水酸化鉄(III) の沈殿物、すなわちリン酸亜鉛よりも更に不溶性である塩 ($K_{sp} \text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot 10^{-39}$) によるものと思われる。

【0115】

沈殿物におり封鎖されたナノピペットを自然的に清浄とする可能な機構が幾つかある。PET トラックエッチングされたナノポア内のカルシウム及びコバルトのリン酸塩で見られる電流発振の場合、沈殿は、非対称のナノポア内に塩類を電圧誘起により集中させ、塩の濃度を過飽和レベルに局部的に増大させたることに起因した。これにより、沈殿物がナノポア内のイオン枯渇により急激に溶解するという仮説をもたらした。コンピュータによる研究により、沈殿物内のリン酸水素により提供されるプロトンがポア表面における酸化物により受け取られ、これによりポア粒子の相互作用を弱め、粒子を移動により消失させるようにした第 2 の機構を裏付けた。ここに報告したポアの封鎖の場合、リン酸亜鉛に対する飽和レベルよりも充分高い 1 及び 100 間のマイクロモルの塩化亜鉛濃度でのみ効果が観察される。従って、後者の機構は、ここで観察された発振に対する説明を提供する。この機構を裏付けるために、リン酸塩の緩衝材が充填されたピペットであってリン酸亜鉛の飽和溶液内に浸漬されたピペット内に電流発振を誘起させた。このような場合の沈殿物は、溶解されるよりはむしろポアから放出されると思われる(図 14 参照)。 $V < 0$ として図 14 に示すように、ポア内が負電位であると、逆に荷電されたイオンがピペットの内部及び外部の溶液の界面に移動する。リン酸亜鉛がポアに沈殿し、イオン電流を減少させる。沈殿物が充分な大きさに成長すると、この沈殿物が電気泳動力によりポアから消失される。

【0116】

リン酸亜鉛の沈殿物が信じた通りポアから移動する場合でも、電流発振が負の電位に対してのみ見られる理由はまだ依然として解明されていない。沈殿物の正確な化学的組成がこの時点で分かっていないが、リン酸亜鉛のクラスターは、ゼータ電位により測定されたように中性の pH で正味の負電荷を有するということが分かった。沈殿及びポアの封鎖がポアにおける電界を増大させ、従って、負電位により沈殿物をポアから出るように且つ電気泳動力及び電気浸透力により浴内に移動させることができる。これらの実験では、印加電圧は低い ($-300 \sim -500 \text{ mV}$) が、封鎖されたポアのような最大インピーダンスの領域にまたがる電圧降下は最大になる。電気泳動力による粒子の排出は、何故水酸化鉄(III) がポアからの自然な消失を呈さないかの説明に役立つことができる。その理由は、粒子は正の電荷を有し、負に荷電された石英の表面との強い相互作用を有しているはずである為である。興味深いことに、ポリエルリジンの電解質層の堆積後に正の電流整流を呈するピペットは、電圧誘起によるリン酸亜鉛の混合からして封鎖状態にされるが、開放状態にするための如何なる発振も呈しない。おそらく、負に荷電された沈殿物は正に荷電されたポアに対し高い親和性を有し、容易には除去できないものと思われる。

【0117】

電圧制御式のナノリアクタによるナノ沈殿の処理を開始することに加え、沈殿物の大きさをも制御することができる。ポアがナノピペットの先端部における電気力により清浄とされると、ポアを完全に封鎖しない程度の小さい粒子を電位の増大により排出させることが期待される。このことは、2 つの別々の低コンダクタンス状態を示している(図 15) -600 mV の電位に到達させることに関して実験的に確認した。

【0118】

異なる電流レベルに対する計数値を示しているヒストグラムは、 -300 、 -400 、 -500 及び -600 mV に対する高及び低コンダクタンスの状態を示している。 -600 mV では、封鎖状態に比べて開放状態で多くの時間を要すること明らかであり、このこ

10

20

30

40

50

とは時間プロット(図15A)でも明らかである。例えば、 -300 mV におけるシステムは高コンダクタンス状態で41%の時間を要することを示しており、一方 -600 mV では、その値は73%である。このことは、電位が増大するにつれ、沈殿物はポアを封鎖することから回避されることを示している。測定する他の電圧と相違して、 -600 mV での時間プロットは3つの状態、すなわちまれに且つ中間状態($-3000 \sim -3500\text{ pA}$)よりも長い持続時間の間生じる低コンダクタンス状態(-800 pA)及び高コンダクタンス状態(-6000 pA)を示している。中間状態は、ポアを部分的にのみ封鎖した後に放出される沈殿物に対応するものと思われる。 -600 mV よりも小さい電圧では、沈殿物が、ポアを完全に封鎖するのに十分な大きさまで成長した後にのみ消失される。

10

【0119】

ある点では、沈殿物を排出できない程度に塩がポア内に蓄積されることが予期される。この沈殿段階もナノポアに対し研究し、予見できない現象が明らかになった。多くのナノピペットがナノ沈殿により3段階の封鎖を経験した。第1の段階は、一定の印加電位での自然の電流発振の段階であった。20分以上の期間後、ポアが封鎖状態となり、低コンダクタンスの定常状態を呈した。しかし、この段階では、正電位の急速パルスによりポアを短時間の間高コンダクタンス状態に強制できた。最終的に、ピペットは不可逆的に封鎖された。最初の2段階の間、ポアが清浄状態になりつつあり、その後封鎖されているので、ピペット内で何が生じていたかを理解することが目標となった。ポアの開放の反応速度は2つのシステムに対して比較することができない。その理由は、これらは正の極性の電位の下では生じない為である。上述した2段階でピペットに対して作用する異なる機構があるかどうかを見いだすために、ポアが封鎖される反応速度を調査した。

20

【0120】

負に荷電された粒子を、ナノポアを通してその外部に移動させる負電位により、ポアを清浄としうる場合には、沈殿物を反対方向でピペットの先端部のより広いシャフト部に向けて移動させるのに正の電位が予期される。封鎖されたポアの場合、 $+500\text{ mV}$ のパルスを短時間(0.2~2秒の間)供給し、これに続いて電圧を -500 mV に反転させる。この負の電圧で、その前に封鎖されていたポアから高コンダクタンス状態が見られ、このポアが再び急速に封鎖状態となる(データは示さず)。短時間の開放状態は、電流発振を受けているピペットにおける開放状態と同じ大きさとなり、従って、電圧の急速な変化による過渡電流によるよりも開放ポアに起因するものである。短時間の高コンダクタンス状態は、沈殿物がピペットの先端部から離れるように移動し、溶液からの沈殿に取って代わるということを示すか、又は電位が正から負に反転した場合に粒子がポアの方角に戻るように移動することを意味する。

30

【0121】

ポアを封鎖する反応速度は、2つの異なる機構、すなわち粒子のポア内への移動と、ナノ沈殿とに対し異なるであろう。発振の遮断の反応速度と、封鎖されたポアの封鎖の反応速度とを比較するために、双方の状態に対する -500 mV での個々の事象に対する電流遮断レートを定量化した。 $+500\text{ mV}$ のパルスで短時間開放させた封鎖ポアの場合、遮断事象にある電流は $74 \pm 13\text{ pA}$ /ミリ秒の勾配で減少するのに対し、電流発振を受けているポアの場合、 $4 \pm 2\text{ pA}$ /ミリ秒の勾配で減少する。著しく高速な電流遮断は溶液からのナノ沈殿とは異なる遮断機構を表す。このことはむしろ、ナノポアを通り抜けるには大きすぎる粒子を、ナノピペットの内部でその底部から先端部に向けて電圧駆動封鎖することを表すことができる。従って、この現象は、リン酸亜鉛の塩類に対してのみ観察されたものであり、水酸化鉄(III)のような他の沈殿物からの封鎖に対しては生じなかった。

40

【0122】

封鎖されたナノピペットにおける沈殿物が実際に正の電位のパルス中に先端部内で移動する場合には、粒子が交流電圧で捕捉されてポアの封鎖が解かれるようになりうる。十分に高い周波数の正弦波状の電位が印加されることにより、リン酸亜鉛により封鎖されるよ

50

うに思われるピペットから“開放”電流を生ぜしめることができる。測定に対し、pH 7のリン酸塩緩衝材(100 mMのKClに対し10 mM)を充填させたピペットを、2 μMの塩化亜鉛を含むpH 7のTris緩衝材(100 mMのKClに対し10 mM)の浴内に浸漬させた。ピペットは、数分間の-500 mVの低電圧後に封鎖状態となり、500 ~ -500 mVの正弦波状の電位は0.1、0.5、1及び15 Hzで印加した。0.1 Hzのような低周波数では、電位が負電圧に向けて発振する際に、ポアは封鎖状態になる前に短時間の間高コンダクタンス状態に近づくように見える。高周波数では、より高いコンダクタンス状態が達成され、ポアは封鎖される前に正電位により清浄化される。

【0123】

高周波の正弦波状の電圧で達成される高コンダクタンス状態は、発振電界を用いたナノ沈殿物のスペース内への捕捉を表し、且つ電流の大きさが印加電位の周波数で正確に制御されるようにする。

10

【0124】

[例8：炭水化物(糖)反応性官能化ポリマー被膜]

ナノポアチャンネルに適用されるボロン酸の化学的性質を用いて試料溶液内の糖を検出するためにナノピペットセンサを開発した。その原理は、糖類が(開口直径を例えば、10 ~ 40nmとしうる)ポアに比べて小さい間、ボロン酸への糖類の結合により、中性のボロン酸を負に荷電されたポロナートに変換させることである。ナノピペット及びその他の円錐状のナノポアは、電流整流を、或いは表面電荷に応答するイオン透過選択性を呈する。表面変調の既知の方法に基づいて可逆センサを形成する最初の試み(ボロン酸の共有結合(その概略図を図17に示す)を介するか、又は官能化した高分子電解質を堆積するか)によれば、十分に反応性が良くないか又は不可逆的に反応するセンサが得られた。図17に示すように共有結合的に修飾されたナノピペットでは、イオン電流は、pH 7の緩衝材中の3 mMのグルコースに反応した。認識要素がポアの壁部のみではなく、ポアの全断面を被覆する場合に、ナノポアの反応性が増大することが推論された(ナノポア内に又はナノポアにまたがって或いはこれらの双方で延在するように交差結合されたポリマーの線図表示に対する図18Cを参照されたい。この場合、ポリマーはナノポアを完全に封鎖せずに部分的に封鎖するようにメッシュ状になっており、メッシュは一般にナノポアの内部の最先端部にあることに注意すべきである)。このようなシステムの電位反応性は、共有結合されたpH反応性の“ポリマーブラシ”であって、ポリマー上のリン酸基のプロトン化の結果として薄膜のナノポアの整流作用を変化させたものに対し立証されている(Chem. Commun. 46, 1908-1910 (2010) (Yameen氏等著)参照)。しかし、このようなシステムは、反応を引き起こすために、荷電された検体(ヒドロニウムイオン)に頼っている。中性の検体の結合により、ナノポアの環境の電荷状態を変化させ、電流整流に影響を及ぼすようにしたナノポアセンサは従来知られていない。

20

30

【0125】

(方法)

試薬及び溶液：全ての貯蔵溶液をMilli-Q超純水で準備した。緩衝材の溶液は塩化カリウム(Baker社)、リン酸ナトリウム(二塩基性)、炭酸ナトリウム及び重炭酸ナトリウム(Sigma社)から準備し、これをHCl(1 M)又はKOH(0.1 M)で調節した。アリザリンレッドスルホン酸塩(ARS)、8-ヒドロキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸、三ナトリウム塩(HPTS)、エスクレチン、L形グルコース及びL形フルクトースは、Sigma社から購入した。全ての緩衝材溶液は、別段の指示がない限り、10 mMの緩衝材及び100 mMの塩化カリウムに対して用いた。

40

【0126】

ポリマーPVPPBAの合成：ポリ(4-ビニルピリジン)(MW 60,000)をSigma社から購入し、そのまま用いた。o-プロモメチルフェニルボロン酸の合成を、決められた手順を用いて実行した。磁気攪拌子を含む10 mLの丸底フラスコに、ポリ(4-ビニルピリジン)(0.100 g、0.00167ミリモル)及びm-プロモメチルフェニルボロン酸(0.206 g、0.954ミリモル)を加えた。次に、N,Nジメチルホルムアミド

50

(2 mL) 及びメタノール (2 mL) を加えて試薬を溶解させた。混合体を 23 時間攪拌させ、次にジクロロメタン (10 mL) を入れた 50 mL のビーカーに液滴状に添加して生成物を沈殿させた。このビーカーを氷の浴内に入れてこの生成物を完全に沈殿させた。次に、溶液を、上部が取り外し可能なツープースフリップフィルタ内に注ぎ、アルゴンガスを用いて不活性状態の下で真空フィルタ処理した。この生成物をジクロロメタンの 3×15 mL 部分で洗浄し、次いで真空デシケータ内に入れて一晩中乾燥させた。隔離された生成物は 0.257 g (90% の収率) であった。 $^1\text{H NMR}$ はポリマーの 82% アルキル化を呈した (データは示さない)。

【0127】

蛍光光度法による炭水化物反応の測定：メタノール/水 (1:1) 中の PVP-BA (0.006% w/v) 及び HPTS (1.5×10^{-6} M) より成るプローブ溶液を準備した。プローブ溶液の 1 mL のアリコートにキュベットに添加し、続いて 1 mL の炭酸塩緩衝材 (20 mM の炭酸塩、100 mM の塩化カリウム、pH 9.5) を添加した。460 nm (励起フィルタ) 及び 515 ~ 570 nm (発光フィルタ) のフィルタ対を用いて蛍光を読み取った。糖類溶液のアリコート (水中 500 mM) を添加し、1 分間ゆっくりピペット操作することによって溶液を混合し、各添加後に蛍光を測定した。添加した総量は 20 マイクロリットル (全量の 1%) を超えなかった。蛍光信号を蛍光増加分に変換した (F/F_0)。複数のブランク (空試験) 値を基準値の蛍光 F として取り入れた。各信号をこのブランク値で除算することにより蛍光増加分を与える。

【0128】

石英のナノピペット電極による電流測定：P-2000 レーザブラ (Sutter Instrument 社) を用いて、外径が 1.0 mm で内径が 0.70 mm の、フィラメントを有する石英キャピラリー (Sutter Instrument 社の型番：QF100-70-5) から、ナノピペットを製造した。使用したパラメータは、ヒート (Heat) を 625、フィラメント (Filament) を 4、ベロシティ (Velocity) を 60、ディレイ (Delay) を 170、プル (Pull) を 180 とした。イオン電流を測定するために、2 電極の機構を用いた。ナノピペットには緩衝材溶液 (リン酸塩 / KCl、pH 7) を裏込めし、Ag/AgCl 電極を挿入した。補助 / 基準電極として作用する他の Ag/AgCl 電極を 0.3 mL のバルク溶液内に配置した。これらの双方の電極を DigiData 1322A デジタイザを有する Axopatch 700B 増幅器 (Molecular Devices 社製) と、pClamp 10 ソフトウェア (Molecular Devices 社製) を具える PC とに接続した。ナノピペット電極を完全に湿潤させるために、ナノピペットの先端部を、緩衝材を裏込めた後に 5 ~ 10 分間の間 N,N-ジメチルホルムアミド内に浸漬させた。正電位を、カウンター電極に対してナノピペットのバレル内の電極に印加するアノード電位と称する。実験は 24 で行った。

【0129】

ナノピペット内への PVP-BA の埋め込み：ナノピペットのバレルにリン酸塩の緩衝材 (pH 7) を充填し、このナノピペットを、カウンター電極を収容した炭酸塩の緩衝材 (pH 9.5) 内に浸漬させた。ナノピペットが負の電流整流を表すことを検証した後、これらのナノピペット 0.03% (w/v) ポリマーを含むメタノール溶液内に短時間浸漬させ、その後炭酸塩の溶液に戻した。ポリマーが良好に固定された結果、電流整流が完全に反転された。

【0130】

ポリマーで修飾させたナノピペットに対する炭水化物の反応の測定：修飾されたナノピペットを、カウンター電極を収容した 0.30 mL の炭酸塩緩衝材の溶液 (pH 9.5) 内で分析した。この溶液に、純水中の濃縮検体溶液のアリコートを添加した。添加した総量は、量の変化を 5% に制限するために 15 μ L を超えないようにした。反応を実時間で測定するために、0.5 Hz の周波数で -500 ~ +500 mV の正弦波状の電位を用いて電流を解析した。アリコートの添加に続いて信号が安定した後に、0.5 mV / ミリ秒のレートで -500 ~ +500 mV の電圧を掃引させることにより電流を解析した。各測定

10

20

30

40

50

は5回の掃引で行った。

【0131】

電気化学データの分析：pClampソフトウェア（電圧掃引に対するサンプリング周波数を1000Hzとし、正弦状関数を200Hzとした）を用いて記録したイオン電流測定を、分析及びグラフ化のためにOriginPro 8.5（OriginLab社）に取り込んだ。各データポイントに対しI-V曲線を生ぜしめるために、500mV/秒の走査レートでの-800~+800mVの5回の電圧掃引を平均化し、各ポイントに対し標準偏差を計算した。結合等温線を生ぜしめるために、固定電位での電流を検体濃度の関数としてプロットした。

【0132】

[機能性高分子電解質の化学特性]

カチオン性の炭水化物反応性ポリマーを形成するために、m-プロモメチルフェニルボロン酸を用いて、分子量が60,000である市販のポリ(4-ビニルピリジン)(PVP)をアルキル化した。生成物PVA-BAは、N,N-ジメチルホルムアミド及びメタノールにおける反応混合物から沈殿した。この反応混合物は、メタノール(1%w/v以下)内で僅かに可用性であり、酸性のメタノール/水の溶液中では難溶性であり、他の水性の有機溶媒内では実際に不溶性である。ポリマーのベンジル化したもの(PVP-Bn)は臭化ベンジルでアルキル化され、より一層高い溶解度を呈した。ポリマーのアルキル化効果は¹H-NMRスペクトルの積分により決定された。ポリマーPVP-BAはほぼ85%のアルキル化を呈したのに対し、PVP-Bnの場合アルキル化効率は、90%であった。これらの値を用いて、ポリマーのモル質量をPVP-BAに対し170,000及びPVP-Bnに対し150,000として評価した。ポリ(ビニルピリジン)のような高分子電解質を滴定により分析して、タンパク質の取り込み及び見掛けのpK_a³²の特性を表す。

【0133】

ポリマーPVP-BAのpH依存性を評価するために、メタノール/水内の1%w/v溶液をpH2に酸性化した。水酸化物で滴定すると、ポリマーはほぼpH8で迅速に沈殿した。この沈殿化ポイントは高い再現性を呈し、溶液中のフェニルボロン酸のpK_aと一致する。このポイントでは、ボロン酸をボロネートに変換することにより、ピリジニウム基の電荷を有効に中性化し、極性の極めて少ない両性イオンポリマーを形成する。この沈殿ポイントは、20mMの単糖の存在中で調節される(図20の沈殿データにおけるpHを参照されたし)。このことは、2pH単位だけボロン酸のpK_aを低くすることで知られている。pH7.8±0.2でのPVP-BAの沈殿と比べると、グルコースはpH6.5±0.1で沈殿を生ぜしめ、フルクトースはpH5.58±0.08で沈殿を生ぜしめる。フルクトースは、殆どのボロン酸受容体との親和性が高いものとして知られている。この作用は、グルコースとフルクトースとの双方が、使用するPVP-BAに結合することを表している。この方法を用いて、例えば、負に荷電された基を加えるか、又は負に荷電された基の位置を変えることにより、種々の高分子電解質をナノピペット上の被膜として用いるとともに、ポリマーのpH反応性を調整するのに用いるようにするかどうかを決定するようにしうる。

【0134】

炭水化物とのカチオン性ポリマーの相互作用の特性を良好に表すために、PVP-BA及びPVP-Bnとそれぞれ相互作用しうる3種類の比色分析染料を選択した。これらの染料はグルコース検出用のサロゲートとして作用し、市販されており、その構造は公表されている。カテコール及び負電荷の双方を有するアリザリンレッドスルホン酸塩(ARS)と、カテコールのみを含むエスクレチンと、3つの負電荷を有する染料である8-ヒドロキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸、三ナトリウム塩(HPTS)とがある。各染料の溶液をポリマーで滴定し、吸光度スペクトルを記録した。代表的な吸光度スペクトルを、PVP-BA又はPVP-Bnと一緒にARS染料に対し図21に示す。ボロン酸を含まないPVP-Bnを存在させた場合、420nmでの吸光度の極大値が減少するとともに僅かに赤の方向で467nmまでシフトされている。PVP-BAを染料に添加すると、極

10

20

30

40

50

大吸光度が増大し、467nmにシフトした。これらの2つの別々の現象はボロン酸結合及び静電相互作用の双方による相互作用を示している。又、ARSはBAポリマーに結合したが、Bnポリマーには結合しなかった。

【0135】

λ_{\max} での吸光度の差を測定することにより、ポリマー濃度の関数としてAを示す曲線が得られた。ポリマーに対する各染料の反応性を、曲線の直線部分の傾斜を用いて測定し、これを表1に集約した。PVP-BA、すなわちボロン酸を付加したポリカチオンの場合、ARSに対する親和性はHPTSの親和性の2倍となり、静電気引力及び結合形成の双方の相乗効果を示す。これとは対照的に、PVP-BnはARSに比べHPTSに対しより強い親和性を呈し、これは全静電機構に一致する。重要なことに、エスクレチンに対する親和性は、PVP-BAよりもPVP-Bnに対し一桁低い大きさとなる。このことは、ボロン酸が存在しない場合、ポリカチオンと荷電されていないカテコールとの間の相互作用は殆どないことを表している。A対ポリマー濃度をプロットすると、検査した全ての染料に対する曲線が平滑となったが、標準の結合等温線に対し良好なフィットを何れも呈しなかった。このことは、複数の結合部位(ポリマー鎖当り約500)を有するとともに染料の存在で凝集するおそれがあるポリマーの特性が複雑であることによるものと思われる。

【0136】

【表1】

表1：比色分析染料に対するポリマーの相対親和性

	反応性 (μM^{-1})	
	PVP - BA	PVP - Bn
ARS	2.09 ± 0.04	0.70 ± 0.02
エスクレチン	1.53 ± 0.05	0.11 ± 0.01
HPTS	1.02 ± 0.05	1.53 ± 0.02

注：染料はポリマーの溶液で滴定させ、傾斜はポリマー濃度の関数としての λ_{\max} の変化として計算した。

【0137】

[官能化ポリマーが埋め込まれたナノピペット]

ボロン酸含入ポリカチオンPVP-BAで官能化されたナノチャンネルを形成するために、リン酸塩の緩衝材を充填した石英のナノピペット(ポアの直径は20~40nm)を用いた。この媒体では、ポリマーは不溶性である。ポリマーを添加する前は、これらはpH7で負に整流されたイオン電流をしめしている。すなわち、I-Vプロットは負電圧で高電流をしめしている。ポリマーでナノチャンネルを官能化するために、0.3%の濃度(w/v)でポリマーを含むメタノール溶液内にナノピペットを短時間浸漬させた。このナノピペットの先端部を中性の緩衝材溶液に戻すと、電流整流が反転され、正の電位で高い非線形コンダクタンスを示すようになる。PVP-BAのピペットは、+電圧で大きなイオン電流を示すとともに、負電位で極めて小さい電流を示した。

【0138】

反転された電流整流は、システムのインピーダンスが最大であるナノピペットのポアをポリマーが通過する証拠となる。このようなポリマーで修飾された幾つかのナノチャンネルが形成され、これらのナノピペットチャンネルでは正の整流が数時間以上に安定となった。ナノピペットの外側にはポリマーが認められなかった。おそらく、ナノチャンネル内に埋め込まれ、負に荷電された石英に対する静電気引力と緩衝材内での限定された溶解度との双方により適所に配置されたポリマーから、修飾されたイオン電流が生じるものと思われる

。ナノチャンネル内のポリマーの画像化は実用的でなく、システムを近似させるために、マイクロピペットに同様な処置を施した。ポリマーを可視化するために、ポア直径が20マイクロメートルのマイクロピペットに、1 mMのARSを含むリン酸塩の緩衝材を充填した。ポリマーがメタノール溶液内に浸漬されると、マイクロピペットの最先端部にすみれ色が生じる。20分後でも、極めて僅かなポリマーがピペット先端部のより広い開口内に拡散した。

【0139】

修飾されたナノピペットの電極のpH反応度は石英のナノピペットよりもかなり大きくなる。裸の石英のナノピペットの整流が負になると、反応度はpH3でほんの僅かだけ減少し、シラノキシ基のプロトン化に対応するようになる。これとは対照的に、PVP BAを埋め込んだナノピペットは実質的に、pH8~pH3での負の電位でコンダクタンスを呈しない(データは示さない)。正の電位でのコンダクタンスはpHが減少するにつれて増大し、pH5及びpH3間で最大の変化を呈する。ナノチャンネル/ポリマー材料の電気化学的反応は、pH7及び8間のプロトン化状態で最大の変化を受ける溶液中のポリマーの特性からは予測されない。

【0140】

アニオン性カテコールARSは、検査した染料の中で、溶液中のポリマーPVP BAに対し最大の親和性を呈した。この染料に対するイオン選択透過性の変調を検査するために、ポリマーで修飾したナノピペットをpH9.5の炭酸塩緩衝材内に浸漬させた。これらの基本的な状態の下では、アニオン性のポロナートエステル形成が達成された。図22に示すように、修飾されたナノチャンネル内のあらゆる正の整流を無効にするのに、たった60 μMのARSで充分である。360 μMのARSでは、電流が負に整流される。図22を参照するに、360を付した矢印は、負の電圧で増大した負の電流を示している。本例では、約-1 nAの負の電流が-500 mVで見られ、+500 mVでは、電流が約+0.6 nAとなる。本例では、ブランク(空試験)と、ARSの60 μM濃度と、ARSの360 μMの濃度とを如何に区別しうるかも示している。イオン電流整流は反転する為、染料の添加はナノポア又はナノチャンネルの封鎖を生ぜしめるとは思えない。むしろ、マトリックス内の静電荷の反転に基づいてチャンネルのイオン透過性が反転される。

【0141】

ARSが低濃度(<0.1 mM)にある場合、洗浄媒体を必要とすることなく、イオン電流の変調を完全に可逆性としうる。濃度が高くなることにより、システムが永続的に負に整流されるようにする。このことは、特に染料が、バルク溶液内に拡散しないようにポリマーマトリックス内に深く侵入する場合に、ポリマーと染料との間の強い相互作用によるものと思われる。

【0142】

ARSで示す修飾させたナノチャンネル内のイオン電流整流の反転は、染料の電荷と、ボロン酸含入マトリックス内での pK_a のシフトとの双方によるものと思われる。中性の炭水化物の場合、整流の変化はナノチャンネル内のボロン酸/ポロナートの平衡化に起因しているはずである。ポリマーが埋め込まれたナノチャンネルにフルクトース(10 mM)を添加することにより、正から負への電流整流の急速な反転が得られた(図23及び24)。図23における曲線は、ブランクのナノピペットでは殆ど整流が行われませんが、10 mMでフルクトースを存在させると負の整流(すなわち、負電圧で高電流)を示すI-V曲線が得られることを示している。図24は、ナノピペットの先端部をフルクトースに曝してこれを純粋な緩衝材に戻して、電流整流を完全に反転させる反応時間が3~5分である、結合の可逆性を示している。興味深いことに、初期に正に整流されたI-V曲線の一部のみがフルクトースに曝した後に回復される。図23に示すように、負電位でのコンダクタンスは、フルクトースに曝す繰り返しサイクルで完全な且つ再現可能な切換えを受ける。正の電位の場合、必ずしもこのようにならない。図23に示すように、PVP BAで修飾されたナノピペットに対する初期信号は、600 mVまでの正の電位で高度に開放状態となる。この開放状態は、フルクトースに曝した後に完全には回復しない。このことは、ナ

10

20

30

40

50

ノチャンネルにおけるマトリックスに炭水化物の結合の結果として何らかの調整が行われていることを表している。電流整流の大きさは種々の異なるポリマー埋め込みナノチャンネルの間で相違しているが、フルクトースが存在している場合の整流の反転は、検査した幾つかのシステムに対し完全で可逆的であった(図25)。代表的なスポット254及び255はそれぞれ異なる実験における正及び負の整流を示している。

【0143】

電流反応の完全な反転が負電位で達成される為、固定電位での電流を開放状態と閉成状態との間のフルクトース変調を示すのに用いることができる。図24に示すように、-500mVにおける電流は、フルクトースに曝す数回のサイクルで完全に可逆的となる。重要なことに、信号を回復させるのに洗浄条件は必要としない。又、I-V曲線の平滑さから注意すべきことは、ポリマーマトリックス電界により影響されるようには見えないことである。むしろ、ナノチャンネル内のイオン透過性を変調する中性の炭水化物が存在するだけである。

10

【0144】

フルクトースに対する、修飾されたナノチャンネルの反応は、ARSの場合のように、濃度に依存する(図26及び27)。-500mVの電位における電流をフルクトース濃度の関数としてプロットすることにより、結合親和性を所定のナノチャンネルに対し決定でき、次式で表すことができる。

$$S = (1 + S_{max} K_b [A]) / (1 + K_b [A])$$

【0145】

このモデルでは、Sを信号、この場合イオン電流として用い、 S_{max} を検体が飽和した際の計算信号として用い、[A]を検体の濃度として用い、 K_b を M^{-1} の単位での結合定数として用いている。曲線のフィッティングから決定した結合定数は、図示のナノチャンネルの場合 $360 \pm 110 M^{-1}$ であり、この定数は溶液中のモノフェニルボロン酸を用いて測定した結合定数と一致する。これらの親和性は広く変化しうるが、一般に $100 \sim 5000 M^{-1}$ の範囲内にある。ナノチャンネルに閉じ込めたポリマーの反応と、溶液相のポリマーの反応とを比較するために、蛍光ベースの分析を行い、この分析を、ナノチャンネル電極と同様に静電荷により変調させた。染料HPTSを用いた場合には、アロステリックな指標置換分析(AIDA)を用いてフルクトース反応を測定した。HPTSは、溶液内で、PVP-BAポリマーとの基底状態の錯体を形成し、蛍光を消滅させる。これら2種類の成分は互いに静電的に引き付けられる、すなわちカチオンの高分子電解質がアニオンの染料に引き付けられる。pH9.5では、フルクトースを添加することにより、ポリマー上のボロン酸基がアニオンのボロナートとなるようにし、ポリマー上の静電荷全体を中性化するとともに、蛍光染料を置換させる。このシステムによれば、見掛けの結合定数がフルクトースに対し $3200 \pm 400 M^{-1}$ として決定される(図26)。この親和性は、円錐状のナノチャンネルにおけるポリマーに対して測定した親和性よりも一桁大きい値のものとなるが、依然としてボロン酸-フルクトースの結合に対し報告された値の範囲内にある。ポリマーに対する環境は、双方のシステムに対し著しく相違しているが、双方の場合の相違は、信号を生じるポリマー電荷の変調にある。良好に特徴づけられた受容体マトリックスを用いて刺激応答性のナノ流体ダイオードを迅速に設計する能力により、ナノポア内のイオン透過性を制御する新たな方策を提供する。

20

30

40

【0146】

従って、図25及び26におけるデータは、受け入れられた分析で得られた蛍光値が、設定した負の電圧でフルクトースの濃度を変えて得られるイオン電流値に相当すること、及び本発明の電気化学法が蛍光法よりも高いダイナミックレンジを有するということを示している。

【0147】

PVP-BAを埋め込んだナノピペットを有するセンサはグルコースに反応し、pH9.5で負の整流が増大することも分かった。緩衝材内で1.42の負の整流比を呈するセンサを20mMのグルコースに曝すと、負の電流の増大により1.99の負の整流比が得

50

られた。負の電流比は、+ 5 0 0 m V の電位での電流に対する - 5 0 0 m V の電位での電流の比として規定される。

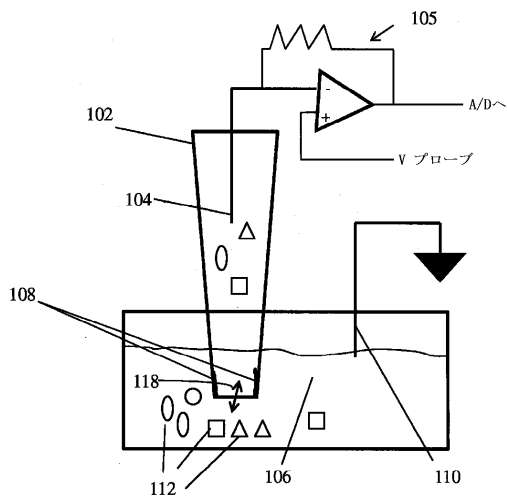
【 0 1 4 8 】

【結論】

上述した具体的な説明は、本発明を例示説明したものであり、本発明の範囲を制限するものとみなすべきではなく、本発明は、特許請求の範囲に記載した文字通りの及び等価の範囲により規定されるものである。ここに記載した特許文献及び非特許文献の何れも、明瞭に述べられていないが当業者により理解される本発明のある態様を実行するのに有効な方法及び材料の詳細を伝達するためのものである。必要に応じ参照した方法又は材料を記載するとともに可能化する目的のために、これらの文献の各々が明確に且つ単独に参考のために導入され且つここに含まれる場合と同程度にこれらの特許文献及び非特許文献を参考のためにここに導入するものである。

10

【 図 1 】



【 図 3 】

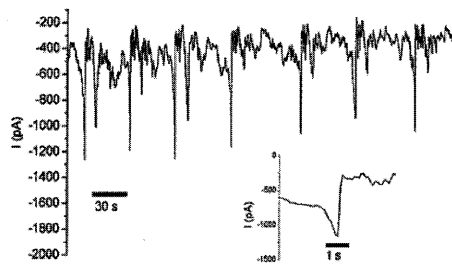
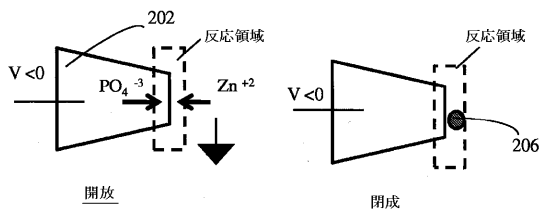
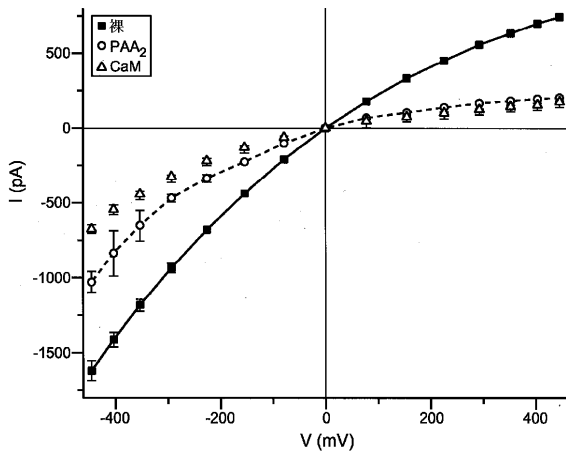


Fig. 3

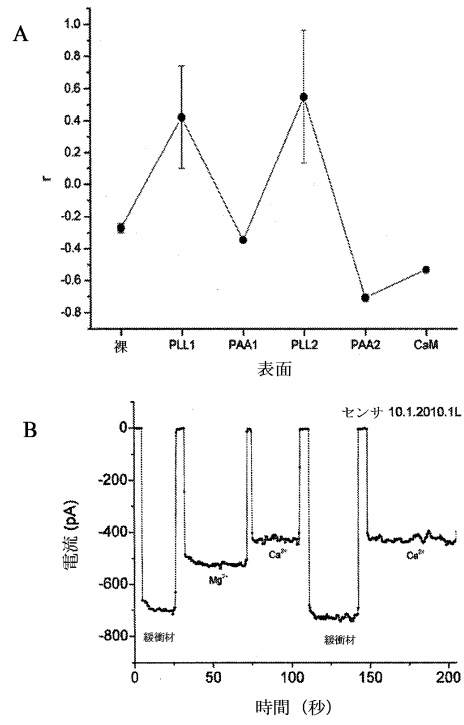
【 図 2 】



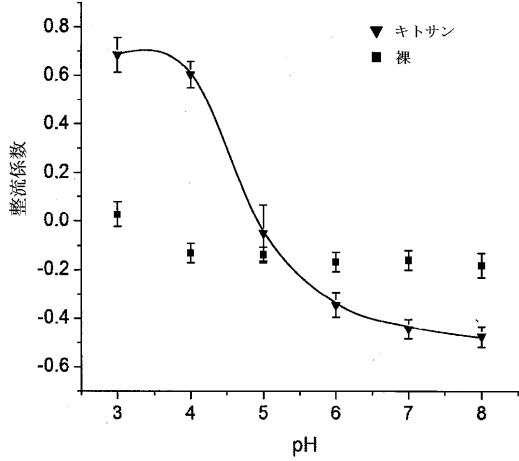
【 図 4 】



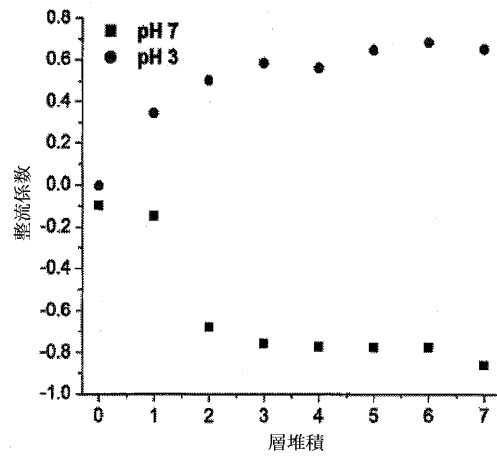
【 図 5 】



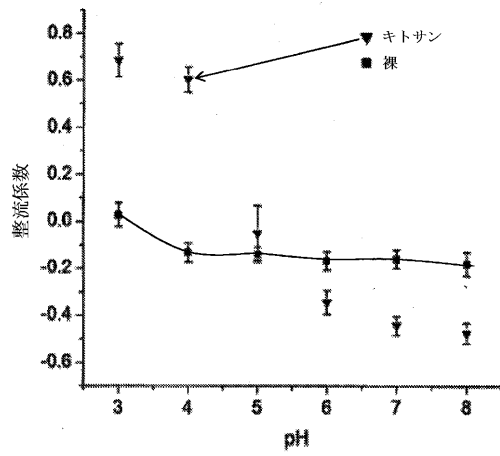
【 図 6 】



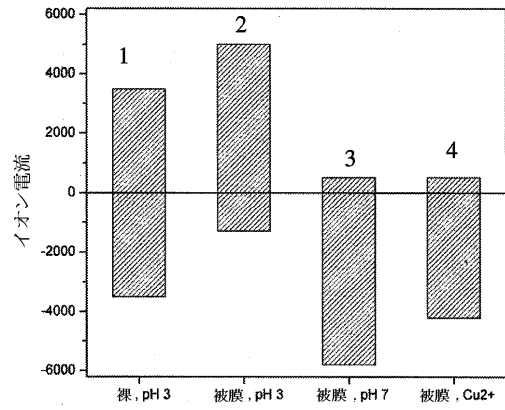
【 図 7 】



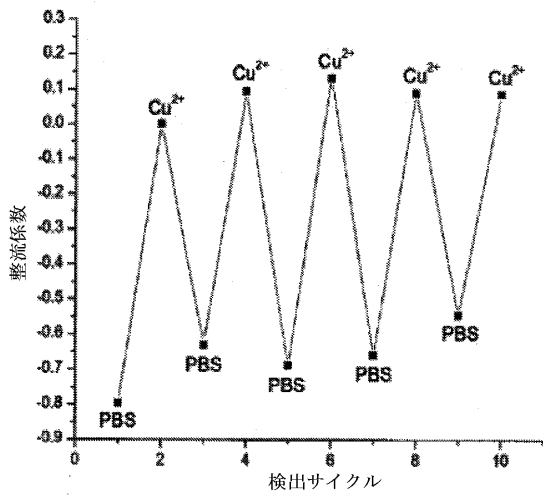
【 図 8 】



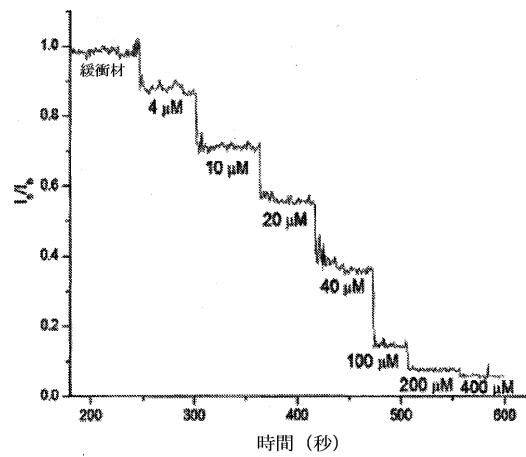
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 1 2 】

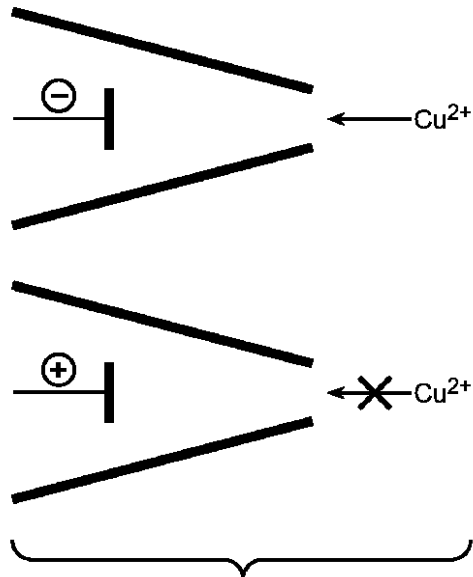
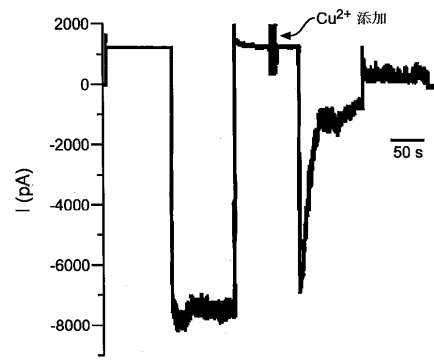
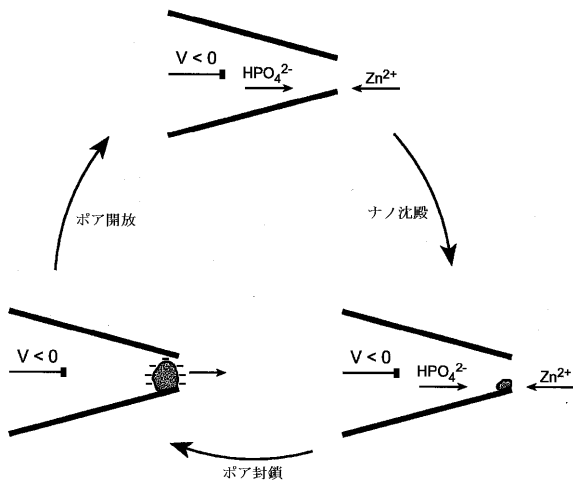


Fig. 12

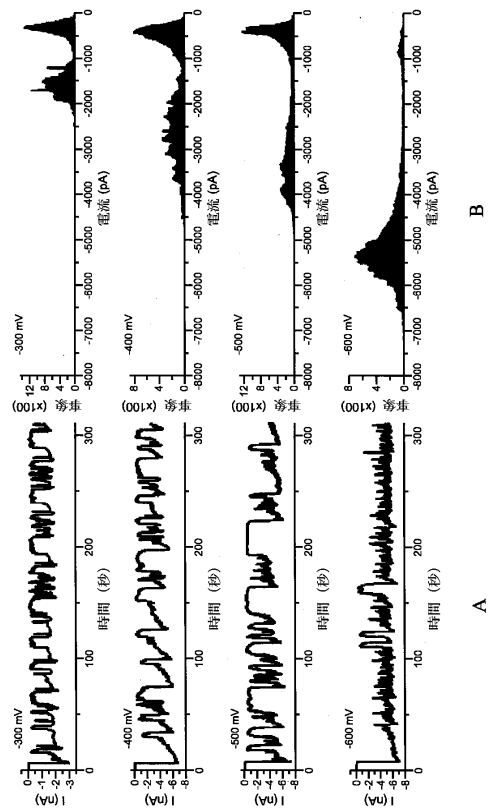
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

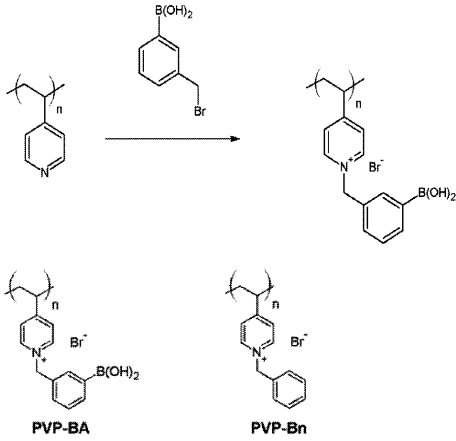


【 図 1 5 】

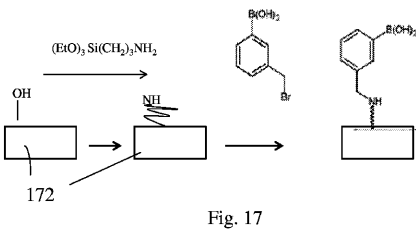


A B

【 図 16 】



【 図 17 】



【 図 18 C 】

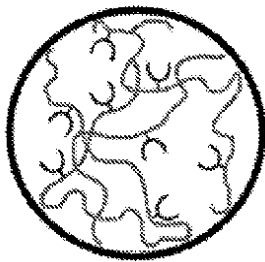


Fig. 18C

【 図 18 A 】

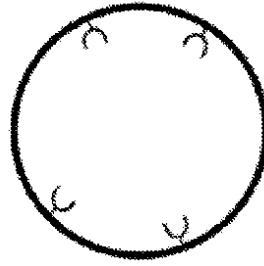


Fig. 18A

【 図 18 B 】

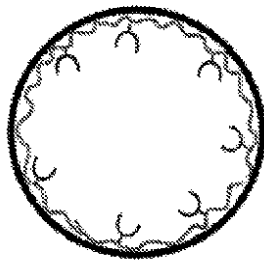
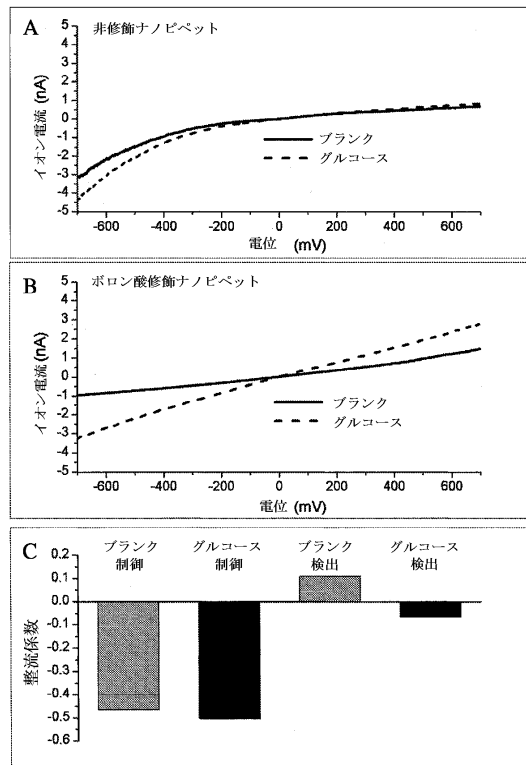
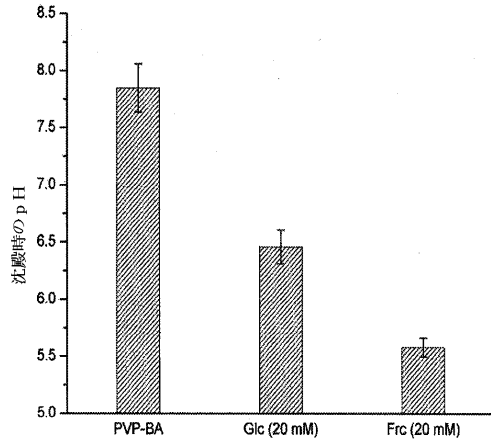


Fig. 18B

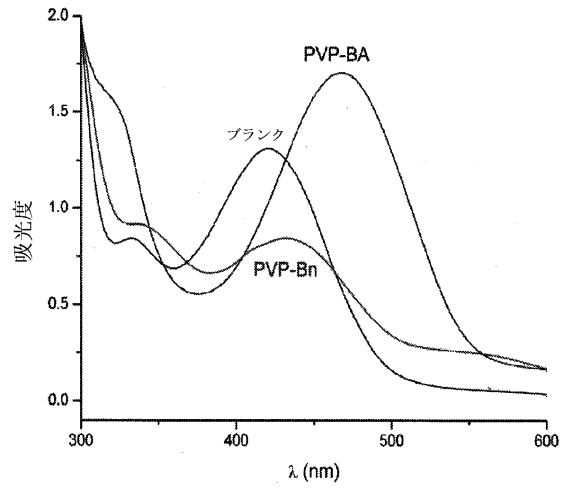
【 図 19 】



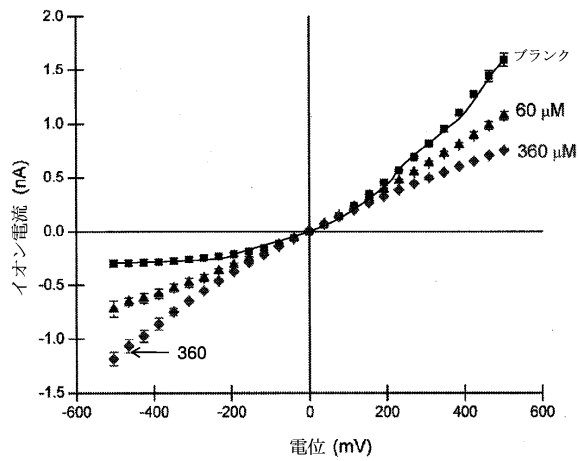
【 図 2 0 】



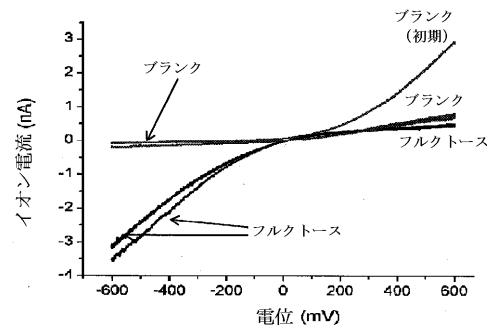
【 図 2 1 】



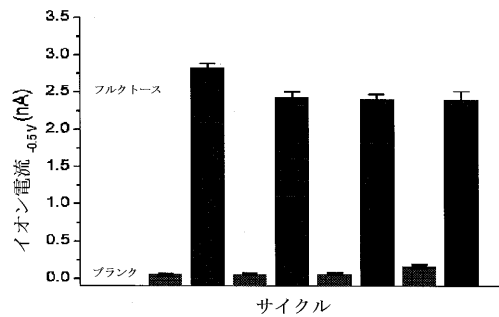
【 図 2 2 】



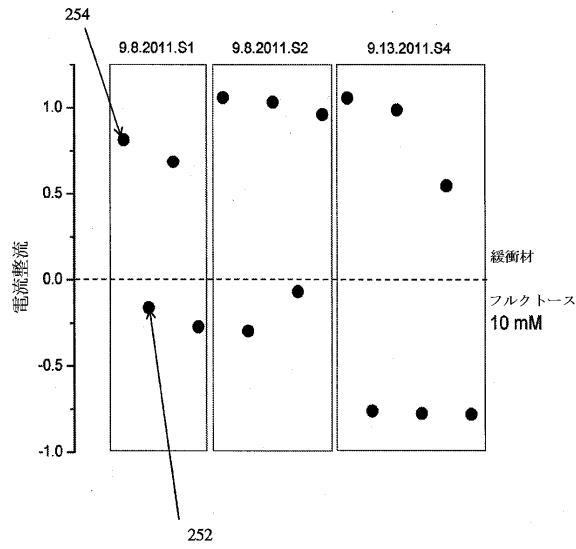
【 図 2 3 】



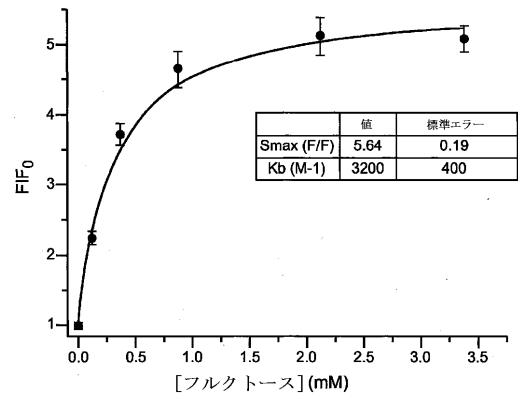
【 図 2 4 】



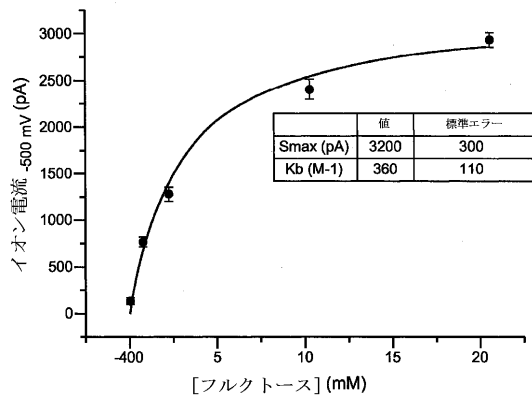
【 図 2 5 】



【 図 2 6 】



【 図 2 7 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ナダル ポウルマンド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 6 4 サンタクルーズ ハイ ストリート 1 1 5 6
エスオーイー 2
- (72)発明者 ボアズ ビロズニー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 6 2 サンタクルーズ ハルターマン アベニュー
2 0 5 0 ナンバーエイ
- (72)発明者 パオロ アクティス
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 6 4 サンタクルーズ ハイ ストリート 1 1 5 6
ビーイー 2 0 6
- (72)発明者 アール アダム セガール
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 6 4 サンタクルーズ ハイ ストリート 1 1 5 6
ビーイー 2 0 6
- (72)発明者 バクタン シンガラム
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 6 2 サンタクルーズ グレーストーン コート 1
8 3

審査官 蔵田 真彦

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0072080 (US, A1)
特表2009-536107 (JP, A)
特表平02-501860 (JP, A)
特開2005-345379 (JP, A)
特表2005-503269 (JP, A)
特表2010-502936 (JP, A)
国際公開第2008/078781 (WO, A1)
特開2008-249705 (JP, A)
特表2008-532246 (JP, A)
国際公開第95/020157 (WO, A1)
Niya Sa et al., Reversible Cobalt Ion Binding to Imidazole-Modified Nanopipettes, Analytical Chemistry, 2010年, 82, 9963-9966

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 2 7 / 0 0 - 2 7 / 1 0、2 7 / 1 4 - 2 7 / 3 0、
2 7 / 3 2 - 2 7 / 4 0 4、2 7 / 4 1 4 - 2 7 / 4 1 6、
2 7 / 4 2 - 2 7 / 4 4 7、2 7 / 4 8 - 2 7 / 4 9、
3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8