



(10) **DE 11 2016 005 149 T5** 2018.08.02

(12) **Veröffentlichung**

der internationalen Anmeldung mit der
(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2017/110226**
in der deutschen Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2
IntPatÜG)
(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2016 005 149.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP2016/081061**
(86) PCT-Anmeldetag: **20.10.2016**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **29.06.2017**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **02.08.2018**

(51) Int Cl.: **G01N 33/483** (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
G01N 15/12 (2006.01)
G01N 27/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
2015-251426 **24.12.2015** **JP**

(71) Anmelder:
HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION,
Tokyo, JP

(74) Vertreter:
MERH-IP Matias Erny Reichl Hoffmann
Patentanwälte PartG mbB, 80336 München, DE

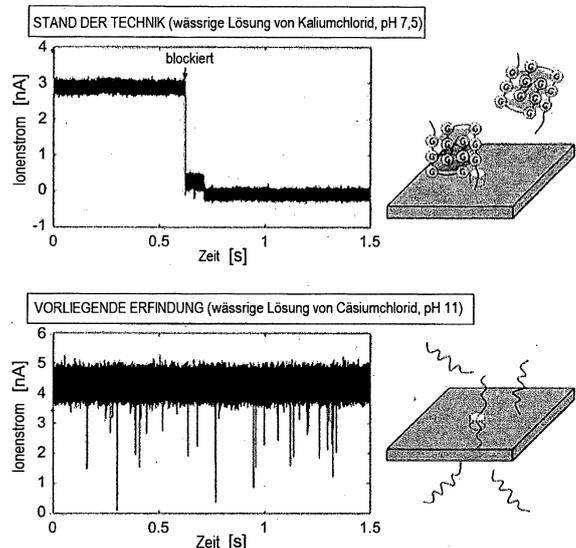
(72) Erfinder:
Goto, Yusuke, Tokyo, JP; Yokoi, Takahide, Tokyo,
JP

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Messreagens und Analyseeinrichtung zum Analysieren eines Biopolymers**

(57) Zusammenfassung: Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Behinderung einer Biopolymermessung in einer Nanopore zu lösen, die eine dreidimensionale Konformation eines eine Nukleinsäure enthaltenden Biopolymers beinhaltet. Die vorliegende Erfindung sieht eine Einrichtung zum Analysieren eines eine Nukleinsäure enthaltenden Biopolymers vor, wobei die Einrichtung umfasst: eine Array-Einrichtung umfassend eine Mehrzahl von Dünnschichtteilen mit einer Nanopore; einen einzigen gemeinschaftlichen Behälter und eine Mehrzahl von einzelnen Behältern, die in der Lage sind, eine Messlösung zu lagern, die mit den Dünnschichten in Kontakt gebracht wird; und einzelne Elektroden, die jeweils in der Mehrzahl der einzelnen Behälter vorgesehen sind, wobei die Messlösung in jeden der einzelnen Behälter und den gemeinschaftlichen Behälter so eingeführt wird, dass sie mit den Dünnschichten in Kontakt gebracht wird; und die Messlösung einen pH-Wert hat, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält.



Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Messreagens, eine Einrichtung und ein Verfahren zum Analysieren eines zu messenden Objekts, insbesondere eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure (DNA und dergleichen) enthält, mittels einer Pore, die in einer Dünnschicht eingebettet ist.

Stand der Technik

[0002] Wenn eine Lösung, die einen Elektrolyt enthält, mit einer Pore mit einem Durchmesser von etwa 0,9 nm bis mehreren Nanometern (nachfolgend als Nanopore bezeichnet) in Kontakt gebracht wird und in einer Dünnschicht mit einer Dicke von etwa einigen Angström bis mehreren zehn Nanometern eingebettet wird, und eine Potentialdifferenz an die Dünnschicht angelegt wird, kann die das Elektrolyt enthaltende Lösung durch die Nanopore hindurchgeführt werden. Wenn ein zu messendes Objekt durch die Nanopore hindurchgeführt wird, können sich zu dieser Zeit die elektrischen Merkmale, insbesondere der Widerstandswert, des Peripherieteils der Nanopore ändern, wodurch das zu messende Objekt erfasst werden kann und durch das Erfassen einer Änderung der elektrischen Merkmale analysiert werden kann. Wenn das zu messende Objekt ein Biopolymer ist, ändern sich die elektrischen Merkmale des Peripherieteils der Nanopore zu einer Musterform gemäß dem Monomersequenzmuster des Biopolymers. Ein Verfahren zum Analysieren der Monomersequenz des Biopolymers, das die Änderung auswertet, wurde in den letzten Jahren aktiv untersucht. Darunter wird ein System als realisierbar angesehen, das auf dem Prinzip beruht, dass der Änderungsbetrag im Ionenstrom, der beobachtet wird, wenn ein Biopolymer durch eine Nanopore hindurchgeführt wird, in Abhängigkeit von den Monomerarten variiert (Verfahren mit blockiertem Stromfluss). Da die Analysegenauigkeit der Monomersequenz durch den Änderungsbetrag im Ionenstrom bestimmt wird, ist in diesem Fall eine Differenz beim Ionenstrombetrag zwischen Monomeren wünschenswerterweise größer. Anders als bei einem herkömmlichen Verfahren kann das Verfahren mit dem blockierten Stromfluss ein Biopolymer direkt ablesen, ohne dass ein chemisches Verfahren, das eine Fragmentierung des Biopolymers beinhaltet, erforderlich ist. Wenn das Biopolymer eine DNA ist, ist das Verfahren mit dem blockierten Stromfluss ein DNA-Nukleotidsequenzanalyse-System der nächsten Generation. Wenn das Biopolymer ein Protein ist, ist das Verfahren mit dem blockierten Stromfluss ein Aminosäuresequenzanalyse-System. Bei diesen handelt es sich erwartungsgemäß um Systeme, die in der Lage sind, viel größere Sequenzlängen zu lesen, als diejenigen des herkömmlichen Verfahrens.

[0003] Es gibt zwei Arten von Nanoporeneinrichtungen: eine Bioporeneinrichtung, die ein Protein verwendet, das in eine Lipiddoppelschichtmembran eingebettet ist und eine Mittelpore aufweist; und eine Festporeneinrichtung mit einer Pore, die in einer isolierenden, durch ein Halbleiterbearbeitungsverfahren gebildeten Dünnschicht ausgebildet ist. Die Bioporeneinrichtung verwendet eine Pore (Durchmesser: 1,2 nm, Dicke: 0,6 nm) eines modifizierten Proteins (wie beispielsweise Mycobacterium smegmatis-Porin A (MspA)), das in einer Lipiddoppelschichtmembran als Biopolymererfassungsteil eingebettet ist, um den Änderungsbetrag im Ionenstrom zu messen. Demgegenüber wird in der Festporeneinrichtung eine Struktur verwendet, die eine Nanopore umfasst, die in einer Dünnschicht aus Siliziumnitrid ausgebildet ist, wobei es sich um ein Halbleitermaterial oder eine Dünnschicht handelt, das bzw. die aus einer einzelnen Molekülschicht aus Graphen oder Molybdänsulfid besteht.

[0004] Bei solchen Analyseeinrichtungen wird als Basiseinheit eine Einrichtung verwendet, die eine Nanoporeneinrichtung, eine Lösung, die ein zu messendes Objekt enthält, und ein Elektrolyt aufweist, sowie ein Elektrodenpaar, zwischen denen die Nanoporeneinrichtung eingelegt ist. Ein solcher Aufbau ist zum Beispiel in der Patentreliteratur 1 und der Nicht-Patentreliteratur 1 beschrieben. Ein Material, das eine Elektronentransferreaktion mit dem Elektrolyt in der Lösung ausführen kann (eine elektrochemische Oxidations-Reduktions-Reaktion ausführen kann), wird typischerweise für die Elektrode verwendet. Insbesondere wird aufgrund ihrer elektrochemischen Potentialstabilität und hohen Zuverlässigkeit oft eine Silber/Silberchlorid-Elektrode verwendet. Als Elektrolyt wird meist eine wässrige Kaliumchloridlösung unter pH-Neutralisation verwendet. Der Grund dafür ist, dass Chlorid-Ionen eine Elektronentransferreaktion mit der Silber/Silberchlorid-Elektrode ausführen können, und Kalium-Ionen eine elektrische Mobilität besitzen, die gleich der von Chlorid-Ionen ist, wodurch die elektrische Leitfähigkeit ausreichend sichergestellt werden kann. In Bezug auf die Festpore (Halbleiternanopore) gibt es Berichte, dass der Betrag des blockierten Stroms eines Homopolymers, das aus einer Adenin-Base, einer Cytosin-Base oder einer Thymin-Base besteht, mittels einer wässrigen Kaliumchloridlösung unter pH-Neutralisation gemessen wird (Nicht-Patentreliteratur 1 und Nicht-Patentreliteratur 2).

Literatur des Standes der Technik

Patentliteratur

[0005] Patentreliteratur 1: US 5,795,782 B

Nicht-Patentliteratur

Nicht-Patentliteratur 1: Venta, K. u.a., Differentiation of Short Single-Stranded DNA Homopolymers in Solid-State Nanopores, ACS Nano 7 (5), Seiten 4629-4636 (2013).

Nicht-Patentliteratur 2: Lee, M. u.a., A Low-Noise Solid-State Nanopore Platform Based on a Highly Insulating Substrate, Scientific Reports 4, 7448 (2014).

Zusammenfassung der Erfindung

Technisches Problem

[0006] Wenn die herkömmliche wässrige Kaliumchloridlösung unter pH-Neutralisation verwendet wird, bildet ein Biopolymer, das eine Nukleinsäure enthält, eine dreidimensionale Konformation aus, um die Nanopore zu blockieren, was in nachteilhafter Weise die Messung des Biopolymers in der Nanopore behindert. Insbesondere in Gegenwart von Kaliumionen wird durch eine Guanin (G)-Base ein Tetramer (G-Quadruplex) stark ausgebildet, um die Nanopore zu blockieren, wodurch die Messung des Biopolymers behindert wird. Dadurch wird es unmöglich, den Betrag am blockiertem Stromfluss, der von der Guanin-Base stammt, präzise zu messen. Ein solches Problem wird zum Beispiel auch in der Nicht-Patentliteratur 1 erwähnt. In der herkömmlichen wässrigen Kaliumchloridlösung unter pH-Neutralisation ist der Unterschied hinsichtlich des Ionenstrombetrags zwischen Monomeren in der Nanopore gering, so dass das Ausmaß der Basentrennung schlecht ist, was ein Problem dahingehend mit sich bringt, dass die Analysegenauigkeit der abschließenden Monomersequenzen abnimmt. Zum Beispiel offenbart die Nicht-Patentliteratur 2 Ergebnisse dahingehend, dass die Beträge an blockiertem Stromfluss einer Adenin-Base, Cytosin-Base und Thymin-Base in einem Homopolymer einander überlappen.

Mittel zum Lösen des Problems

[0007] Als Ergebnis intensiver Untersuchungen durch die vorliegenden Erfinder, um die obigen Probleme zu lösen, haben die Erfinder unerwartet festgestellt, dass es durch die Verwendung einer Messlösung, die einen pH-Wert über dem pKa-Wert einer Guanin-Base hat und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält, möglich wird, die Bildung eines G-Quadruplex zu verhindern und ein Biopolymer, das eine Nukleinsäure enthält, präzise zu messen. Die Erfinder sind weiterhin zu den folgenden Erkenntnis gelangt: Wenn die Messlösung verwendet wird, zeigt sich ein Unterschied hinsichtlich des Betrags an blockiertem Stromfluss, der abhängig von den Basenarten unterschieden werden kann. Das bedeutet, dass das Ausmaß der Basentrennung gut ist und die Sequenz eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure ent-

hält, mit hoher Genauigkeit analysiert werden kann. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse ist die vorliegende Erfindung abgeschlossen.

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft typischerweise ein Messreagens zum Analysieren eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure enthält, indem das Biopolymer durch eine Nanopore hindurchgeleitet wird, die in einer Dünnschicht ausgebildet ist, und das Biopolymer auf der Grundlage einer Änderung eines elektrischen Signals analysiert wird, wobei die Messlösung eine Messlösung enthält, die einen pH-Wert hat, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält.

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Einrichtung zum Analysieren eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure enthält, wobei die Einrichtung umfasst: eine Dünnschicht mit einer Nanopore; ein Paar Behälter, die in der Lage sind, eine Messlösung so zu lagern, dass sie mit der Dünnschicht in Kontakt gebracht wird; und ein Paar Elektroden, die in jedem der Behälter vorgesehen sind, wobei: die Messlösung in jeden der Behälter so eingeführt wird, dass sie mit der Dünnschicht in Kontakt gebracht wird; und die Messlösung einen pH-Wert hat, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält.

[0010] Die vorliegende Erfindung sieht auch eine Einrichtung zum Analysieren eines Biopolymers vor, das eine Nukleinsäure enthält, wobei die Einrichtung umfasst: eine Array-Einrichtung, die eine Mehrzahl von Dünnschichtteilen mit einer Nanopore aufweist; einen einzelnen üblichen Behälter und eine Mehrzahl von einzelnen Behältern, die in der Lage sind, eine Messlösung zu lagern, die mit den Dünnschichten in Kontakt gebracht wird; und einzelne Elektroden, die jeweils in der Mehrzahl der einzelnen Behälter vorgesehen sind, wobei: die Messlösung in jeden der einzelnen Behälter und den üblichen Behälter eingeführt wird, so dass sie mit den Dünnschichten in Kontakt gebracht wird; und die Messlösung einen pH-Wert hat, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält.

[0011] Weiter betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Analysieren eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure enthält, mittels der zuvor erwähnten Messlösung oder der Analyseeinrichtung.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Lösung mit einem pH-Wert, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält. Eine solche Lösung kann in einem Verfahren und einer Einrichtung zum Analysieren eines Biopolymers zum Beispiel unter

Verwendung einer Nanopore mit einem blockierten Stromfluss verwendet werden.

Vorteilhafte Wirkungen der Erfindung

[0013] Die vorliegende Erfindung macht es möglich, dass eine Biopolymermessung in der Nanopore reibungslos durchgeführt wird, indem die dreidimensionale Konformation des eine Nukleinsäure enthaltenden Biopolymers ausgeschaltet wird. Insbesondere kann ein Tetramer der Guanin-Base (G-Quadruplex) ausgeschaltet werden, wodurch es möglich wird, den Betrag an blockiertem Strom, der von der Guanin-Base stammt, korrekt zu messen. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine Ionenstromdifferenz zwischen Monomeren erhöht und das Ausmaß der Basentrennung kann verbessert werden, wodurch die Analysegenauigkeit einer abschließenden Monomersequenz verbessert wird. Daher sind das Messreagens, die Analyseeinrichtung und das Analyseverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung auf den Gebieten der Analyse von Biopolymeren, die eine Nukleinsäure enthalten, sowie von Test, Diagnose, Therapie, Arzneimittelforschung und Grundlagenforschung und dergleichen, die die Analyse verwenden, von Nutzen.

[0014] Die Probleme, Aufbauten und Wirkungen, die nicht die oben beschriebenen sind, sind aus den Beschreibungen der folgenden Ausführungsformen ersichtlich.

Figurenliste

Fig. 1 ist eine Darstellung, die eine Ausführungsform des Aufbaus einer Analyseeinrichtung der vorliegenden Erfindung zeigt.

Fig. 2 ist eine Darstellung, die einen Mechanismus zum Ausschalten eines Guanintetramers (G-Quadruplex) gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt.

Fig. 3 ist eine Darstellung, die Versuchsergebnisse, die eine Wirkung der vorliegenden Erfindung unterstützen, im Vergleich zum Stand der Technik zeigt.

Fig. 4 ist ein Schaubild, das Versuchsergebnisse von Verbesserungen hinsichtlich des Ausmaßes der Basentrennung gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt.

Fig. 5 ist eine Darstellung, die eine andere Ausführungsform des Aufbaus der Analyseeinrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt.

Fig. 6 ist eine Darstellung, die eine andere Ausführungsform des Aufbaus der Analyseeinrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt.

Fig. 7 ist eine Darstellung, die eine andere Ausführungsform des Aufbaus der Analyseeinrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt.

Beschreibung von Ausführungsformen

[0015] Nachfolgend werden Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung mit Bezug auf die Zeichnungen beschrieben. Gemäß der vorliegenden Erfindung enthält in einer Nanoporeinrichtung zum Analysieren eines Biopolymers gemäß einem so genannten Verfahren mit blockiertem Stromfluss eine Messlösung, die mit einer Dünnschicht mit einer Nanopore in Kontakt gebracht wird, Cäsium als Elektrolytkationen und hat einen pH-Wert, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base (N-1-Position) ist. Ein Guanintetramer (G-Quadruplex) bildet ein planares ringförmiges Aggregat über eine Wasserstoffbindung zwischen den Guanin-Basen als treibende Kraft, und ein Metall-Ion ordnet sich dann in einer Lücke in der Mitte des Aggregats an, so dass eine robuste Struktur höherer Ordnung mit einer Schicht aus dichten Aggregaten gebildet wird (Beispiel 1 und **Fig. 2(a)**). Kalium-Ionen mit einem Ionendurchmesser, der am nächsten zur Größe der Lücke ist, bilden bekanntermaßen den robustesten G-Quadruplex. Dann wird Wasserstoff, der in der N-1-Position der Guanin-Base vorliegt, deprotoniert (**Fig. 2 (b)**), indem der pH-Wert der Messlösung so eingestellt wird, dass er gleich oder höher als der pKa-Wert der Guanin-Base ist (N-1-Position). Dieses bewirkt, dass die Wasserstoffbindung zwischen den Guanin-Basen geschwächt wird, wodurch wiederum bewirkt wird, dass eine aggregatbildende Kraft geschwächt wird. Weiterhin ist es durch die Verwendung von Cäsium-Ionen mit einem Ionendurchmesser, der sich stark von dem von Kalium-Ionen als Elektrolytkationen unterscheidet, sind weniger wahrscheinlich, dass Metallionen in der Mitte des ringförmigen Aggregats angeordnet werden, und die Bildung des G-Quadruplex kann in einem Zustand gehemmt werden, in dem Kationen gleichzeitig zum Sicherstellen der elektrischen Leitfähigkeit vorhanden sind (**Fig. 2(c)**). Im Ergebnis, erlaubt es die Verwendung der Messlösung mit der obigen Komponente, dass blockierter Strom, der von der Guanin-Base stammt, über einen langen Zeitraum stabil gemessen wird, ohne dass die Nanopore blockiert wird, und zwar selbst im Fall eines Guanin-Basen-Homopolymers (Beispiel, **Fig. 3**), und erlaubt es, den Betrag des von jedem Basentyp stammenden Stroms zu trennen, um die Monomersequenz präzise zu analysieren (**Fig. 4**).

[0016] Gemäß einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Messreagens zum Analysieren eines eine Nukleinsäure enthaltenden Biopolymers, indem das Biopolymer durch eine Nanopore hindurchgelei-

tet wird, die in einer Dünnschicht ausgebildet ist, und indem das Biopolymer auf der Grundlage einer Änderung eines elektrischen Signals analysiert wird, wobei das Messreagens eine Messlösung enthält, die einen pH-Wert hat, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält.

[0017] Als Lösungsmittel für die Lösung kann ein Lösungsmittel verwendet werden, das das Biopolymer stabil dispergieren kann, eine Elektrode nicht löst und den Elektronentransfer mit der Elektrode nicht behindert. Beispiele hierfür sind Wasser, Alkohole (Methanol, Ethanol und Isopropanol und dergleichen), Essigsäure, Aceton, Acetonitril, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid. Wenn die Nukleinsäure als zu messendes Biopolymer verwendet wird, kann Wasser am meisten bevorzugt sein.

[0018] Gemäß der vorliegenden Erfindung enthält ein Elektrolyt der Lösung Cäsium-Ionen als Kationen. Kationen, bei denen es sich nicht um Cäsium-Ionen handelt, können zugesetzt werden, um die elektrische Leitfähigkeit sicherzustellen, aber Metall-Ionen, wie beispielsweise Kalium-Ionen, fördern die dreidimensionale Konformation des eine Nukleinsäure enthaltenden Biopolymers, so dass es bevorzugt sein kann, dass Metall-Ionen, bei denen es sich nicht um die Cäsium-Ionen handelt, so weit wie möglich nicht enthalten sind. Organische Kationen, die organische Substanzen enthalten, können als Ersatzkationen für Metall-Ionen verwendet werden, und ionisierende Kationen, die durch Ammonium-Ionen und dergleichen exemplifiziert werden, können beispielsweise verwendet werden. Als Anionen können ionisierende Anionen verwendet werden, und die Anionen können vorzugsweise gemäß ihrer Kompatibilität mit einem Elektrodenmaterial ausgewählt werden. Wenn zum Beispiel Silberhalogenid als Elektrodenmaterial verwendet wird, können vorzugsweise Halogenid-Ionen (Chlorid-Ionen, Bromid-Ionen, Iodid-Ionen) als Anionen verwendet werden. Alternativ können die Anionen organische Anionen sein, die durch Glutaminsäure-Ionen und dergleichen exemplifiziert werden.

[0019] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann der pH-Wert der Messlösung so eingestellt werden, dass er gleich oder größer als der pKa-Wert der Guanin-Base und gleich oder kleiner als pH 14 ist. Da der pKa-Wert der Guanin-Base (N-1-Position) dabei auch abhängig von den Arten der gelösten, gleichzeitig im Lösungsmittel vorhandenen Substanzen variiert, wird der pKa-Wert vorzugsweise gemäß den Messlösungsarten eingestellt. Typischerweise beträgt der pKa-Wert der Guanin-Base in der N1-Position in einer wässrigen Lösung 9,2 (zum Beispiel Fedor u.a., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6 (5): 399-412, 2005).

[0020] Die obere Grenze des pH-Werts der Messlösung kann mittels der Toleranzgrenze der Einrichtung bestimmt werden. Wenn Siliziumwafer, die üblicherweise in einer Halbleiternanopore verwendet werden, als Substrate verwendet werden und gleichzeitig Cäsium-Ionen vorhanden sind, kann die Toleranzgrenze der Einrichtung bei etwa pH 14 liegen, bei dem das Ätzen des Siliziums anfängt. Eine solche Ätzrate wurde bereits offenbart (Lloyd D. Clark u.a., Cesium Hydroxide (CsOH): A Useful Etchant for Micromachining Silicon, Technical Digest, Solid-State Sensor and Actuator Workshop, IEEE, 1988). In diesem Fall wird Siliziumnitrid, das oft als Dünnschichtmaterial verwendet wird, selbst bei einem pH-Wert im hohen alkalischen Bereich nicht geätzt, aber es wird Silizium oder Siliziumoxid als Base geätzt, so dass der obere Grenzwert des pH-Werts vorzugsweise auf 14 eingestellt werden kann. Ein anderes Halbleitermaterial wird in ähnlicher Weise durch die Einrichtungstoleranzgrenze des Materials beschränkt.

[0021] Beispiele für ein Mittel zum Einstellen des pH-Werts der Messlösung umfassen ein Verfahren zum Zugeben einer Hydroxidlösung oder Zugeben eines pH-Einstellmittels. Dabei bezieht sich das pH-Einstellmittel auf eine Verbindung, die von einem Lösungsmittel Wasserstoff-Ionen aufnimmt, die zu Kationen werden. In einer Ausführungsform kann es bevorzugt sein, den pH-Wert der Messlösung durch Zugabe von Cäsiumhydroxid als Hydroxidlösung einzustellen. Der Grund dafür ist, dass die Zugabe von Metall-Ionen, bei denen es sich nicht um Cäsium-Ionen handelt, die dreidimensionale Konformation des Biopolymers fördert. Das bedeutet, dass der pH-Wert der Messlösung durch Zugeben von Cäsiumhydroxid so eingestellt werden kann, dass er gleich oder größer als der pKa-Wert der Guanin-Base und gleich oder kleiner als pH 14 ist.

[0022] In einer anderen Ausführungsform kann der pH-Wert der Messlösung vorzugsweise eingestellt werden, indem eine Verbindung, die in der Lage ist, den pH-Wert der Messlösung so einzustellen, dass er gleich oder größer ist als der pKa-Wert der Guanin-Base (N-1-Position), als pH-Einstellmittel verwendet wird, und zwar gemäß der Gleichung von Henderson-Hasselbalch: $\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10}[\text{HX}^+]/[\text{X}]$, wobei sich X auf das pH-Einstellmittel bezieht. Insbesondere kann durch eine Verbindung, die einen pKa-Wert hat, der gleich oder größer als etwa pH 7,0 ist, der pH-Wert der Messlösung so eingestellt werden, dass sie gleich oder größer als der pKa-Wert der Guanin-Base (N-1-Position) ist. Da beispielsweise Tris-hydroxymethylaminomethan einen pKa-Wert von 8,2 hat und ein Ionisierungsgrad in einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration von 100 mM etwa 0,5 % ist, wird $\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10}[\text{HX}^+]/[\text{X}] = 8,2 + 2,3 = 10,5$ aus der Gleichung von Henderson-Hasselbalch bereitgestellt. Daher kann der pH-Wert so eingestellt werden, dass er gleich oder größer als der pKa-Wert

der Guanin-Base (N-1-Position) ist. Beispiele für andere Verbindungen umfassen Ammoniak, Kettentalamine und zyklische Alkylamine. Der pH-Wert der Messlösung kann mit dem pH-Einstellmittel so eingestellt werden, dass er gleich oder größer als der pKa-Wert der Guanin-Base (N-1-Position) und gleich oder kleiner als pH 14 ist, und zwar gemäß der Gleichung von Henderson-Hasselbalch $\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10}[\text{HX}^+]/[\text{X}]$, worin sich X auf das pH-Einstellmittel bezieht.

[0023] Wenn die Messlösung mit der Atmosphäre in Kontakt gebracht wird, tritt ein Phänomen auf, bei dem die Messlösung mit Kohlendioxid in der Atmosphäre reagiert und bewirkt wird, dass sich der pH-Wert der Lösung allmählich auf die saure Seite verlagert. Um den Einfluss des Kohlendioxids zu verringern, kann der pH-Wert vom anfänglichen Zustand auf eine stärker alkalische Seite eingestellt werden oder kann die Konzentration des pH-Einstellmittels erhöht werden. Wenn pH-Einstellmittel mit 10 mM und 100 mM verwendet werden, nimmt das pH-Einstellmittel mit 100 mM jeweils eine Zeitlang zu, bis von demselben pH-Wert ein pH-Wert erreicht wird, der gleich oder kleiner als der pKa-Wert der Guanin-Base ist, so dass die Konzentration des pH-Einstellmittels vorzugsweise höher, bevorzugt gleich oder größer als 50 mM und besonders bevorzugt gleich oder größer als 100 mM, ist.

[0024] Darüber hinaus kann die untere Grenze der Elektrolytkonzentration vorzugsweise von dem Gesichtspunkt des Signal-Rausch-Verhältnisses aus vorgesehen werden (Beispiel 1, **Fig. 4**). Gemäß der vorliegenden Erfindung muss daher die untere Grenze der Elektrolytkonzentration 10 mM betragen. Demgegenüber gibt es keine Notwendigkeit, die obere Grenze der Elektrolytkonzentration zu unterdrücken, wodurch es möglich ist, die Sättigungskonzentration anzunehmen. Das bedeutet, dass die Cäsium-Ionenkonzentration der Messlösung gleich oder größer als 10 mM und gleich oder kleiner als die Sättigungskonzentration sein kann.

[0025] Die Messlösung, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, kann gemäß einem bekannten Verfahren hergestellt werden. Zum Beispiel kann die Messlösung hergestellt werden, indem ein Elektrolyt in einem Lösungsmittel gelöst wird, um eine Lösung zu erhalten, und danach der pH-Wert der Lösung mit einem geeigneten Mittel eingestellt wird.

[0026] Das Messreagens zum Analysieren des Biopolymers gemäß der vorliegenden Erfindung enthält die oben beschriebene Messlösung als Komponente. Das Messreagens kann zusammen mit den Instruktionen vorgesehen werden, die ein Verfahren und eine Verwendungsmenge und dergleichen beschreiben. Die Messlösung kann in einem einsatzbereiten Zustand (Flüssigkeit) als konzentrierte Lösung zur Verdünnung mit einem geeigneten Lösungsmittel

bei Verwendung oder in einem festen Zustand (zum Beispiel Pulver und dergleichen) zur Rekonstitution mit einem geeigneten Lösungsmittel bei Verwendung vorliegen. Die Form und Herstellung eines solchen Messreagens wird vom Fachmann verstanden.

[0027] Die vorliegende Erfindung betrifft auch gemäß einem anderen Aspekt eine Einrichtung zum Analysieren eines Biopolymers. In einer Ausführungsform sieht die vorliegende Erfindung eine Einrichtung zum Analysieren eines Biopolymers vor, das eine Nukleinsäure enthält, wobei die Vorrichtung umfasst: eine Dünnschicht mit einer Nanopore; ein Paar Behälter, die in der Lage sind, eine Messlösung zu lagern, die mit der Dünnschicht in Kontakt gebracht wird; und ein Paar Elektroden, die in jedem der Behälter so vorgesehen sind, wobei: die Messlösung in jeden der Behälter so eingeführt wird, dass sie mit der Dünnschicht in Kontakt gebracht wird; und die Messlösung einen pH-Wert hat, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält.

[0028] In einer anderen Ausführungsform sieht die vorliegende Erfindung eine Einrichtung zum Analysieren eines Biopolymers vor, das eine Nukleinsäure enthält, wobei die Einrichtung umfasst: eine Array-Einrichtung, die eine Mehrzahl von Dünnschichtteilen mit einer Nanopore aufweist; einen einzigen gemeinschaftlichen Behälter und eine Mehrzahl von einzelnen Behältern, die in der Lage sind, eine Messlösung zu lagern, die mit den Dünnschichten in Kontakt gebracht wird; und einzelne Elektroden, die jeweils in der Mehrzahl der einzelnen Behälter vorgesehen sind, wobei: die Messlösung in jeden der einzelnen Behälter und den gemeinschaftlichen Behälter so eingeführt wird, dass sie mit den Dünnschichten in Kontakt gebracht wird; und die Messlösung einen pH-Wert hat, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält.

[0029] Eine Nanoporeneinrichtung zum Analysieren eines Biopolymers gemäß einem so genannten Verfahren mit blockiertem Stromfluss ist auf dem Fachgebiet bekannt, und seine Bestandteile sind dem Fachmann auch sofort verständlich. Zum Beispiel werden spezielle Einrichtungen in den Nicht-Patentliteraturen 1 und 2, US 5,795,782 B; Yanagi u.a., Scientific Reports 4, 5000, 2014; Akahori u.a., Nanotechnology 25 (27): 275501, 2014; Yanagi u.a., Scientific Reports, 65 14656, 2015; und Goto u.a., Scientific Reports 5, 16640, 2015 offenbart.

[0030] Eine Dünnschicht mit einer Nanopore kann eine Lipiddoppelschicht (Biopore), die aus amphipatischen Molekülschichten besteht, wobei ein Protein mit einer Pore in ihrer Mitte eingebettet ist, oder eine Dünnschicht (Festpore) sein, die aus einem Material besteht, das mittels einer Halbleiternikrofabrika-

tionstechnik gebildet werden kann. Beispiele für das Material, das mittels der Halbleitermikrofabrikationstechnik gebildet werden kann, umfassen Siliziumnitrid (SiN), Siliziumoxid (SiO₂), Siliziumoxynitrid (SiON), Hafniumoxid (HfO₂), Molybdändisulfid (MoS₂) und Graphen. Die Dicke der Dünnschicht kann 1 Å bis 200 nm; vorzugsweise 1 Å bis 100 nm, besonders bevorzugt 1 Å bis 50 und zum Beispiel etwa 5 nm betragen.

[0031] Die passende Größe der Nanopore (Pore) kann gemäß den zu analysierenden Biopolymerarten ausgewählt werden und ist zum Beispiel 0,9 nm bis 100 nm, vorzugsweise 0,9 nm bis 50 nm und insbesondere gleich oder größer als etwa 0,9 nm und gleich oder kleiner als 10 nm. Der Durchmesser der ssDNA (einzelsträngige DNA) beträgt etwa 1,5 nm und der geeignete Bereich des Porendurchmessers zum Analysieren von ssDNA kann etwa 1,5 nm bis 10 nm, vorzugsweise etwa 1,5 nm bis 2,5 nm, und zum Beispiel etwa 2 nm, betragen. Der Durchmesser von dsDNA (doppelsträngige DNA) beträgt etwa 2,6 nm, und der geeignete Bereich des Porendurchmessers zum Analysieren von dsDNA kann etwa 3 nm bis 10 nm und vorzugsweise etwa 3 nm bis 5 nm betragen. Die Tiefe der Nanopore kann eingestellt werden, indem die Dicke der Dünnschicht eingestellt wird. Die Tiefe der Nanopore kann das Zweifache oder mehr, vorzugsweise das Dreifache oder mehr und besonders bevorzugt das Fünffache oder mehr der Größe einer Monomereinheit betragen, die das Biopolymer bildet. Wenn zum Beispiel das Biopolymer die Nukleinsäure enthält, kann die Tiefe der Nanopore vorzugsweise die Größe von beispielsweise drei oder mehr Basen haben, die gleich oder größer als etwa 1 nm sind. Dadurch wird es für das Biopolymer möglich, in die Nanopore zu gelangen, während seine Form und die Bewegungsgeschwindigkeit gesteuert wird, wodurch eine Analyse mit hoher Empfindlichkeit und hoher Genauigkeit ermöglicht wird. Die Form der Pore ist grundsätzlich ein Kreis, aber die Pore kann auch eine ovale Form oder eine polygonale Form haben. Wenn die Array-Einrichtung verwendet wird, die eine Mehrzahl von Dünnschichtteilen mit einer Nanopore aufweist, kann es bevorzugt sein, dass die Dünnschichtteile mit einer Nanopore regelmäßig angeordnet sind. Abstände, bei denen die Mehrzahl der Dünnschichtteile angeordnet sind, können auf 0,1 µm bis 10 µm und vorzugsweise 0,5 µm bis 4 µm, eingestellt werden, je nach der zu verwendenden Elektrode und der Fähigkeit eines elektrischen Messsystems.

[0032] Das Verfahren zum Bilden einer Nanopore (Pore) in der Dünnschicht ist nicht besonders beschränkt, und die Bestrahlung mit einem Elektronenstrahl von einem Transmissionselektronenmikroskop und dergleichen und ein Isolationsdurchschlag von der Spannungsanlegung und dergleichen können beispielsweise verwendet werden.

[0033] Der Behälter (einschließlich der einzelne Behälter und der gemeinschaftliche Behälter), der in der Lage ist, die Messlösung zu lagern, die mit der Dünnschicht in Kontakt gebracht wird, kann in geeigneter Weise vorgesehen werden, so dass er ein Material, eine Form und eine Größe aufweist, die die Messung des blockierten Stroms nicht beeinflussen. Die Messlösung wird in den Behälter so eingeführt, dass sie mit der Dünnschicht in Kontakt gebracht wird.

[0034] Es kann bevorzugt sein, dass die Elektrode aus einem Material hergestellt ist, das in der Lage ist, eine Elektronentransferreaktion (Faraday-Reaktion) mit dem Elektrolyt in der Messlösung durchzuführen, und typischerweise wird die Elektrode aus einem Silberhalogenid oder Alkalisilberhalogenid hergestellt. Aus der Sicht der Potential-Stabilität und Zuverlässigkeit kann Silber/Silberchlorid vorzugsweise als Elektrode verwendet werden. Die Elektrode kann aus einem Material hergestellt werden, das als polarisierende Elektrode dient, und kann zum Beispiel aus Gold oder Platin und dergleichen gefertigt werden. In dem Fall ist es bevorzugt, eine Substanz, die eine Elektronentransferreaktion unterstützen kann, wie beispielsweise Ferricyanid oder Kaliumferrocyanid, zur Messlösung hinzuzufügen, um einen stabilen Ionenstrom sicherzustellen. Alternativ werden Substanzen, die eine Elektronentransferreaktion durchführen können, wie beispielsweise Ferrocene, vorzugsweise an der Oberfläche einer polarisierenden Elektrode befestigt. Hinsichtlich der Struktur der Elektrode kann die Elektrode vollständig aus dem oben erwähnten Material hergestellt sein, oder das Material kann an der Oberfläche mit einem Basenmaterial (wie beispielsweise Kupfer oder Aluminium) überzogen sein. Die Form der Elektrode ist nicht besonders beschränkt, sondern die Form der Elektrode kann vorzugsweise so sein, dass die Oberfläche der Elektrode, die mit der Messlösung in Kontakt gebracht wird, größer ist. Die Elektrode ist mit Drähten verbunden, die bewirken, dass elektrische Signale an eine Messschaltung geschickt werden.

[0035] Die Analyseeinrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung kann weiter einen Einlass zum Einführen der Messlösung in jeden der Behälter aufweisen.

[0036] In einer bevorzugten Ausführungsform kann der gemeinschaftliche Behälter eine gemeinsame Elektrode aufweisen, und die einzelnen Elektroden können über einen Draht mit einem Datenverarbeitungssubstrat verbunden sein. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform hat der gemeinschaftliche Behälter eine Öffnung, und die Analyseeinrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung weist weiter ein Haltesubstrat mit einer Oberfläche, an der das Biopolymer befestigt ist, und einen Mechanismus zum Führen des Haltesubstrats auf.

[0037] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zum Analysieren eines eine Nukleinsäure enthaltenden Biopolymers. Das Biopolymer, das mittels des Messreagens oder der Analyseeinrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung oder in dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung zu analysieren ist, kann jedes Objekt sein, das bei einem Hindurchtreten durch die Nanopore die elektrischen Merkmale, insbesondere einen Widerstandswert, ändert und umfasst eine Nukleinsäure. Spezielle Beispiele umfassen RNA (einzelsträngige RNA oder doppelsträngige RNA), DNA (einzelsträngige DNA oder doppelsträngige DNA), PNA (Peptidnukleinsäure), Oligonukleotid, Aptamer und eine Kombination davon (Hybridnukleinsäure). Das Biopolymer kann in einem lebenden Körper vorliegen oder kann von einem im lebenden Körper vorliegenden stammen. Beispiele hierfür umfassen Polymere, die Sequenzen und Bestandteile enthalten, die nicht natürlich vorkommen, wie beispielsweise Sequenzen von poly(A) und poly(T) und dergleichen, künstlich synthetisierte Polymermoleküle, Nukleinsäuren, die mittels einer Nukleinsäureamplifikationstechnik (zum Beispiel PCR) hergestellt werden, und Nukleinsäuren, die in Vektoren kloniert werden. Die Verfahren zum Herstellen der Biopolymere sind auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt, und der Fachmann kann in geeigneter Weise ein Herstellungsverfahren gemäß den Biopolymerarten auswählen.

[0038] Gemäß der vorliegenden Erfindung bezieht sich die „Analyse“ des Biopolymers auf eine Merkmalsanalyse der Nukleinsäure und das Festlegen des Biopolymers. Zum Beispiel bezieht sich die „Analyse“ auf eine Analyse der Sequenzreihenfolge (Sequenzierung) der Monomere der Nukleinsäure, die das Biopolymer bildet, die Bestimmung der Länge der Nukleinsäure, die Erfassung eines Einzelbasenpolymorphismus, die Bestimmung der Anzahl von Biopolymeren und die Erfassung des Strukturpolymorphismus im Biopolymer (Kopienzahlpolymorphismus, Einfügung und Deletion und dergleichen).

[0039] In einer Ausführungsform weist das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung die folgenden Schritte auf: Hindurchführen eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure enthält, durch eine Nanopore, die in einer Dünnschicht in einer Messlösung mit einem pH-Wert gebildet ist, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält; und Analysieren des Biopolymers auf der Grundlage einer Änderung in einem elektrischen Signal.

[0040] In einer anderen Ausführungsform kann das Verfahren gemäß der Erfindung durchgeführt werden, indem die oben beschriebene Analyseeinrichtung verwendet wird, und umfasst die folgenden Schritte: Hindurchführen des eine Nukleinsäure enthaltenden Biopolymers durch eine Nanopore unter

einer Bedingung, unter der die oben beschriebene Messlösung mit der Dünnschicht der Analyseeinrichtung in Kontakt gebracht wird; Messen eines elektrischen Signals mittels einer Elektrode; und Analysieren des Biopolymers auf der Grundlage einer Änderung im elektrischen Signal.

[0041] Das Analyseverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann durchgeführt werden, indem dieselben Vorrichtungen, Prozesse und Bedingungen, wie diejenigen des herkömmlichen Verfahrens, verwendet werden, mit der Ausnahme, dass die Messlösung verwendet wird, die einen pH-Wert hat, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält. Durch die Verwendung einer solchen Messlösung kann die dreidimensionale Konformation (insbesondere das Tetramer der Guanin-Base, G-Quadruplex) des eine Nukleinsäure enthaltenden Biopolymers ausgeschaltet werden, wodurch es möglich ist, den blockierten Strom in der Nanopore präzise und korrekt zu messen. Eine Ionenstromdifferenz zwischen Monomeren nimmt zu, wodurch der Grad der Basentrennung verbessert wird und es möglich ist, das Biopolymer mit hoher Präzision zu analysieren.

Beispiele

[0042] Nachstehend wird die vorliegende Erfindung ausführlicher mittels Beispielen beschrieben, wobei aber die vorliegende Erfindung nicht auf diese Beispiele beschränkt ist.

(Beispiel 1)

[0043] **Fig. 1** zeigt ein Beispiel für eine Aufbaudarstellung einer Analyseeinrichtung, die eine einzelne Nanopore gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet.

[0044] Die Einrichtung umfasst zwei Behälter **102**, die in der Lage sind, eine Lösung **101** zu lagern, eine Dünnschicht **104** mit einer Nanopore **103** und zwei Elektroden **105** und **106**. Jeder der beiden Elektroden ist in jedem der Behälter angebracht, so dass die Elektroden einander gegenüberliegen, wobei die Nanopore dazwischen eingelegt ist. Die in jeder der beiden Behälter enthaltene Lösung enthält ein Elektrolyt, und es ist nur notwendig, dass die Lösung, die in mindestens einem der Behälter enthalten ist, ein Biopolymer **107** aufweist, das eine zu messende Nukleinsäure enthält. Ionenstrom, der durch die Nanopore hindurchgeleitet wird, wird mit einem Messsystem **109** über einen Draht **108**, der mit den beiden Elektroden verbunden ist, gemessen. Die Lösung wird durch einen Einlass **110** gefüllt. Typischerweise weist das Messsystem eine Ionenstrommesseinrichtung, eine Analog/Digital-Ausgangswandler, eine Datenverarbeitungseinrichtung, eine Datenanzeigeeinrichtung

einrichtung und eine Eingangs/Ausgangs-Hilfseinrichtung auf. Die Ionenstrommesseinrichtung ist mit einer Hochgeschwindigkeits-Verstärkungsschaltung vom Strom-Spannungs-Wandlertyp ausgerüstet, und der Datenverarbeitungseinrichtung ist mit einer Recheneinrichtung, einer Temporärspeichereinrichtung und einer nicht-flüchtigen Speichereinrichtung ausgestattet. Um die äußeren Geräusche zu reduzieren, kann die Analyseeinrichtung vorzugsweise mit einem Faraday'schen Käfig bedeckt sein.

[0045] Ein Biopolymer, das eine Nukleinsäure enthält, kann jedes Objekt sein, das elektrische Merkmale ändert, insbesondere einen Widerstandswert, wenn es durch die Nanopore hindurchgeleitet wird. Typische Beispiele hierfür sind doppelsträngige DNA, doppelsträngige DNA, RNA, PNA (Peptidnukleinsäure), Oligonukleotid und eine Kombination davon (zum Beispiel Hybridnukleinsäure). Wenn eine Monomersequenz in der Einrichtung analysiert werden soll, muss das Biopolymer die Form eines linearen Polymeren mit einer ausgeschalteten Struktur höherer Ordnung annehmen. Ein Mittel zum Hindurchleiten eines zu messenden Objekts durch die Nanopore kann vorzugsweise ein Transport gemäß der Elektrophorese sein, es kann aber auch ein Lösungsmittelstrom sein, der mittels einer Druckpotentialdifferenz erzeugt wird, und dergleichen.

[0046] Die Nanopore **103** kann eine Öffnung sein, die die minimale Größe aufweist, die es ermöglicht, dass das zu messende Objekt hindurchgelangt. Wenn eine einzelsträngige DNA ein als Biopolymer zu messendes Objekt ist, kann die Nanopore eine Öffnung mit einem Durchmesser von etwa 0,9 nm bis 10 nm sein, die es ermöglicht, dass die einzelsträngige DNA hindurchgelangt, und die Dicke der Dünnschicht kann einige Angström bis mehrere zehn Nanometer betragen. Die Nanopore kann eine Biopore oder eine Festpore sein. Im Fall der Biopore ist ein Protein mit einer Mittelpore bevorzugt, die in einer amphipathischen Molekülschicht eingebettet ist, die in der Lage ist, eine Lipiddoppelschicht als Dünnschicht zu bilden. Im Fall der Festpore kann das Material der Dünnschicht jedes Material sein, das mit einer Halbleitermikrofabrikationstechnik gebildet wird. Typischerweise kann das Material Siliziumnitrid, Siliziumoxid, Hafniumoxid, Molybdädisulfid und Graphen und dergleichen sein. In diesem Fall umfassen Beispiele für das Verfahren zum Bilden einer Pore in der Dünnschicht eine Bestrahlung mittels Elektronenstrahl von einem Transmissionselektronenmikroskop und dergleichen und einen Isolationsdurchschlag von einer Spannungsanlegung.

[0047] Die Elektrode kann vorzugsweise aus einem Material hergestellt sein, das in der Lage ist, eine Elektronentransferreaktion (Faraday-Reaktion) mit einem Elektrolyt in einer Messlösung durchzuführen, und typischerweise kann die Elektrode aus ei-

nem Silberhalogenid oder Alkalisilberhalogenid hergestellt sein. Unter diesen ist das Silber/Silberchlorid vom Gesichtspunkt der Potentialstabilität und Zuverlässigkeit wünschenswert. Allerdings kann ein anderes Material ein Material sein, das als polarisierende Elektrode dient, und kann zum Beispiel Gold oder Platin und dergleichen sein. In dem Fall ist es bevorzugt, eine Substanz, die eine Elektronentransferreaktion unterstützen kann, wie beispielsweise Kaliumferrocyanid oder Kaliumferrocyanid, der Messlösung hinzuzufügen, um einen stabilen Ionenstrom sicherzustellen. Alternativ werden Substanzen, die eine Elektronentransferreaktion durchführen können, wie beispielsweise Ferrocene, vorzugsweise an der Oberfläche der polarisierenden Elektrode fixiert.

[0048] In der Struktur der Elektrode kann die Elektrode vollständig aus dem oben erwähnten Material hergestellt sein, oder das Material kann an der Oberfläche mit einem Basenmaterial (wie beispielsweise Kupfer oder Aluminium) überzogen sein.

[0049] Die Elektrode kann mit einem Draht verbunden sein, der bewirkt, dass elektrische Signale an eine Messschaltung geschickt werden. Die Form der Elektrode kann beliebig sein, aber die Form der Elektrode kann vorzugsweise so sein, dass die Oberfläche der Elektrode, die mit der Lösung in Kontakt gebracht wird, größer ist.

[0050] Das Lösungsmittel für die Lösung kann jedes Lösungsmittel sein, das das Biopolymer stabil dispergieren kann, die Elektrode nicht löst und den Elektronentransfer mit der Elektrode nicht behindert. Beispiel hierfür sind Wasser, Alkohole (Methanol, Ethanol und Isopropanol und dergleichen), Essigsäure, Aceton, Acetonitril, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid. Wenn die Nukleinsäure als zu messendes Biopolymer verwendet wird, kann Wasser am meisten bevorzugt sein.

[0051] Es ist nur notwendig, dass das Lösungsmittel Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen enthält. Kationen, bei denen es sich nicht um Cäsium-Ionen handelt, können zugesetzt werden, um die elektrische Leitfähigkeit sicherzustellen, aber Metall-Ionen, wie beispielsweise Kalium-Ionen, fördern die dreidimensionale Konformation des eine Nukleinsäure enthaltenden Biopolymers, so dass es bevorzugt sein kann, dass Metall-Ionen, bei denen es sich nicht um Cäsium-Ionen handelt, so weit wie möglich nicht enthalten sind. Ersatzkationen für Metall-Ionen sind vorzugsweise organische Kationen, die organische Substanzen enthalten. Zum Beispiel können die Kationen ionisierende Kationen sein, die durch Ammonium-Ionen und dergleichen exemplifiziert sind. Anionen können ionisierende Anionen sein, und die Anionen können vorzugsweise gemäß ihrer Kompatibilität mit einem Elektrodenmaterial ausgewählt werden. Wenn zum Beispiel Silberhalogenid als Elektroden-

material verwendet wird, können vorzugsweise Halogenid-Ionen (Chlorid-Ionen, Bromid-Ionen, Iodid-Ionen) als Anionen verwendet werden. Alternativ können die Anionen organische Anionen sein, die durch Glutaminsäure-Ionen und dergleichen exemplifiziert sind.

[0052] Der pH-Wert der Lösung muss gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base (N-1-Position) sein. Wie in **Fig. 2(a)** gezeigt ist, bildet ein Guanin-Tetramer (G-Quadruplex) ein planares ringförmiges Aggregat über eine Wasserstoffbindung zwischen den Guanin-Basen als treibende Kraft, und ein Metall-Ion ordnet sich dann in einer Lücke in der Mitte des Aggregats an, so dass eine robuste Struktur höherer Ordnung mit einer Schicht aus dichten Aggregaten gebildet wird. Kalium-Ionen mit einem Ionendurchmesser, der am nächsten zur Größe der Lücke ist, bilden bekanntermaßen den robustesten G-Quadruplex. Dann wird Wasserstoff, der in der N-1-Position der Guanin-Base vorliegt, deprotoniert, wie in **Fig. 2(b)** gezeigt, indem der pH-Wert der Messlösung so eingestellt wird, dass er gleich oder größer als der pKa-Wert der Guanin-Base (N-1-Position) ist. Dies bewirkt, dass die Wasserstoffbindung zwischen den Guanin-Basen geschwächt wird, wodurch wiederum bewirkt wird, dass eine aggregatbildende Kraft geschwächt wird. Weiterhin ist es durch die Verwendung von Cäsium-Ionen mit einem Ionendurchmesser, der sich stark von dem von Kalium-Ionen unterscheidet, weniger wahrscheinlich, dass ein Metallion in der Mitte des ringförmigen Aggregats angeordnet wird, und die Bildung des G-Quadruplex kann in einem Zustand gehemmt werden, in dem Kationen gleichzeitig zum Sicherstellen der elektrischen Leitfähigkeit vorhanden sind, wie in **Fig. 2(c)** gezeigt ist. Da der pKa-Wert der Guanin-Base (N-1-Position) auch abhängig von den Arten der gelösten Substanzen, die gleichzeitig im Lösungsmittel vorhanden sind, variiert, kann der pKa-Wert vorzugsweise gemäß den Arten der Messlösungen eingestellt werden. Typischerweise offenbart die Literatur (Fedor u.a., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6 (5): 399-412, 2005), dass der pKa-Wert einer Guanin-Base in der N1-Position in einer wässrigen Lösung 9,2 beträgt.

[0053] Die obere Grenze des pH-Werts der Messlösung kann mittels der Toleranzgrenze der Einrichtung bestimmt werden. Üblicherweise werden Siliziumwafer als Substrate in einer Halbleiternanopore verwendet. Wenn gleichzeitig Cäsium-Ionen vorhanden sind, kann die Toleranzgrenze der Einrichtung bei etwa pH14 liegen, bei dem das Ätzen von Silizium anfängt. Eine solche Ätzrate ist in der Literatur (Lloyd D. Clark u.a., *Cesium Hydroxide (CsOH): A Useful Etchant for Micromachining Silicon*, Technical Digest, Solid-State Sensor and Actuator Workshop, IEEE, 1988) offenbart. In diesem Fall wird Siliziumnitrid, das oft als Dünnschichtmaterial verwendet wird, selbst bei einem pH-Wert im hohen alkalischen Be-

reich nicht geätzt, aber es wird Silizium oder Siliziumoxid als Base geätzt, so dass der obere Grenzwert des pH-Werts vorzugsweise auf 14 eingestellt werden kann. Ein anderes Halbleitermaterial wird in ähnlicher Weise durch die Einrichtungstoleranzgrenze des Materials beschränkt.

[0054] Beispiele für ein Mittel zum Einstellen des pH-Werts der Messlösung umfassen ein Verfahren zum Zugeben einer Hydroxidlösung oder Zugeben eines pH-Einstellmittels. Dabei bezieht sich das pH-Einstellmittel auf eine Verbindung, die von einem Lösungsmittel Wasserstoff-Ionen aufnimmt, die zu Kationen werden.

[0055] Da die Zugabe von Metall-Ionen, bei denen es sich nicht um Cäsium-Ionen handelt, die dreidimensionale Konformation des Biopolymers fördert, ist es notwendig, den pH-Wert der Lösung durch Zugabe von Cäsiumhydroxid als Hydroxidlösung einzustellen.

[0056] Das pH-Einstellmittel kann eine Verbindung sein, die in der Lage ist, den pH-Wert der Messlösung so einzustellen, dass er gleich oder größer ist als der pKa-Wert der Guanin-Base (N-1-Position), und zwar gemäß der Gleichung von Henderson-Hasselbalch: $\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10}[\text{HX}^+]/[\text{X}]$, wobei sich X auf das pH-Einstellmittel bezieht. Insbesondere kann durch eine Verbindung, die einen pKa-Wert hat, der gleich oder größer als etwa pH 7,0 ist, der pH-Wert der Messlösung so eingestellt werden, dass sie gleich oder größer als der pKa-Wert der Guanin-Base (N-1-Position) ist. Da Trishydroxymethylaminomethan einen pKa-Wert von 8,2 hat, und ein Ionisierungsgrad in einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration von 100 mM etwa 0,5 % ist, wird $\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10}[\text{HX}^+]/[\text{X}] = 8,2 + 2,3 = 10,5$ aus der Gleichung von Henderson-Hasselbalch bereitgestellt. Daher kann der pH-Wert so eingestellt werden, dass er gleich oder größer als der pKa-Wert der Guanin-Base (N-1-Position) ist. Beispiele für andere Verbindungen umfassen Ammoniak, Kettenalkylamine und zyklische Alkylamine.

[0057] Wenn die Lösung mit der Atmosphäre in Kontakt gebracht wird, tritt ein Phänomen auf, bei dem die Lösung mit Kohlendioxid in der Atmosphäre reagiert, so dass bewirkt wird, dass der pH-Wert der Lösung sich allmählich auf die saure Seite verlagert. Um den Einfluss des Kohlendioxids zu verringern, kann der pH-Wert vom anfänglichen Zustand auf eine stärker alkalische Seite eingestellt werden, oder die Konzentration des pH-Einstellmittels kann erhöht werden. Wenn pH-Einstellmittel mit 10 mM und 100 mM verwendet werden, nimmt insbesondere das pH-Einstellmittel mit 100 mM ein Zeitlang zu, bis von demselben pH-Wert ein pH-Wert erreicht wird, der gleich oder kleiner als der pKa-Wert der Guanin-Base ist, so dass die Konzentration des pH-Einstellmittels vorzugsweise höher ist.

[0058] Darüber hinaus kann die untere Grenze der Elektrolytkonzentration vorzugsweise von dem Standpunkt des Signal-Rausch-Verhältnisses aus vorgesehen werden. Wie nachfolgend beschrieben ist, wird gemäß der vorliegenden Erfindung gezeigt, dass in einer Lösung, die 1 M Cäsium-Ionen enthält, eine Differenz hinsichtlich des blockierten Strombetrags zwischen Basen etwa 500 pA beträgt, wie in **Fig. 4** gezeigt ist. Die Differenz hinsichtlich des blockierten Strombetrags hängt ohne Zweifel von der elektrischen Leitfähigkeit der Nanopore ab. Es ist bekannt, dass, wenn Wasser als Lösungsmittel verwendet wird, die elektrische Leitfähigkeit ungefähr linear auf eine Elektrolytkonzentration von bis zu etwa 1 mM anspricht, wie in der Literatur (Ralph M. M. Smeets u.a., Salt Dependence of Ion Transport and DNA Translocation through Solid-State Nanopores, *Nano Lett* 6, 89, 2006) offenbart. Wenn daher die Elektrolytkonzentration um eine Größenordnung gesenkt wird, wird auch die Differenz hinsichtlich des blockierten Strombetrags um eine Größenordnung gesenkt. Daher sinkt die Differenz hinsichtlich des blockierten Strombetrags zwischen Basen auf 50 pA in 100 mM Cäsium-Ionen, 5 pA in 10 mM und 0,5 pA in 1 mM. Mittlerweise kann ein Stromrauschen, das während der Messung auftritt, grob in zwei Arten unterteilt werden, nämlich in ein Rauschen, das von der Einrichtung stammt, und in ein Rauschen, das von einem Verstärker stammt. Selbst wenn das Rauschen, das von der Einrichtung stammt, durch Maßnahmen, wie beispielsweise Verringerung der Kapazität, reduziert wird, ist es schwierig, das Stromrauschen so zu reduzieren, dass es gleich oder kleiner als das Rauschen ist, das vom Verstärker stammt. Daher wird die untere Grenze der Elektrolytkonzentration durch das Rauschen definiert, das vom Verstärker stammt, allerdings beträgt, wie in der Literatur (Adrian Balan u.a., Improving Signal-to-Noise Performance for DNA Translocation in Solid-State Nanopores at MHz Bandwidths, *Nano Lett.* 14, 7215, 2014) offenbart, in einem häufig zu verwendenden Frequenzbereich (5 bis 10 kHz) das vom Verstärker stammende Rauschen etwa 1 pA. Da fünf oft als statistisch signifikantes Signal-Rausch-Verhältnis definiert wird, muss daher die untere Grenze der Elektrolytkonzentration gemäß der vorliegenden Erfindung 10 mM sein. Demgegenüber gibt es kein Erfordernis, die obere Grenze der Elektrolytkonzentration zu unterdrücken, so dass es möglich ist, die Sättigungskonzentration zu akzeptieren.

[0059] Der Aufbau der vorliegenden Erfindung macht es möglich, die dreidimensionale Konformation des eine Nukleinsäure enthaltenden Biopolymers auszuschalten und den Unterschied hinsichtlich des blockierten Strombetrags zwischen den Monomeren zu verbessern. **Fig. 3** zeigt Versuchsergebnisse, die ein herkömmliches Verfahren mit einem Verfahren vergleichen, das ein Messreagens oder eine Analyseeinrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung

verwendet. Es werden eine Einrichtung mit einer 5 nm dicken Dünnschicht mit einer Nanopore von 2 nm (zum Beispiel eine in Yanagi I.u.a. Fabrication of 3-nm-thick Si_3N_4 membranes for solid-state nanopores using the poly-Si sacrificial layer process, *Scientific Reports*, 5, 14656, 2015 offenbarte Struktur) und ein Paar Silber/Silberchlorid-Elektroden und ein Hochgeschwindigkeitsstrommessverstärker kombiniert. Als Messlösung wurden eine herkömmliche 1 M wässrige Kaliumchloridlösung mit einem pH-Wert von 7 und eine 1 M wässrige Cäsiumchloridlösung, die auf einen pH-Wert von 11 eingestellt war, durch 100 mM Trishydroxymethylaminomethan gemäß der vorliegenden Erfindung miteinander verglichen. Messproben, die 30-mer poly(dA), poly(dC), poly(dT) und poly(dG) verwendeten, wurden zur Verifizierung verwendet. Zuerst wurde als Ergebnis einer Anfangsmessung des 30-mer poly(dG) in der herkömmlichen Messlösung bei einer angelegten Spannung von 300 mV, wie in **Fig. 3(a)** gezeigt, offenbart, dass der Ionenstrom sofort auf null fällt. Dies bedeutet, dass die Nanopore durch das Guanin (G)-Tetramer blockiert wird, was bedeutet, dass die blockierte Strommenge der Guanin-Base nicht präzise gemessen werden kann. In der Zwischenzeit wurde als Ergebnis der Anfangsmessung des 30-mer poly(dG) in der Messlösung der vorliegenden Erfindung bei einer angelegten Spannung von 300 mV, wie in **Fig. 3(b)** gezeigt, bestätigt, dass die Nanopore nicht blockiert ist, und der blockierte Strom, der von der Guanin-Base stammt, stabil über einen langen Zeitraum gemessen werden kann. Darüber hinaus wurde der blockierte Strombetrag in ähnlicher Weise für andere Basenarten, das 30-mer poly(dA), poly(dC) und poly(dT), gemessen. Wie in **Fig. 4** gezeigt, wurde bestätigt, dass der blockierte Strombetrag, der von jeder Basenart stammt, getrennt ist, wodurch es möglich ist, die Analysegenauigkeit der Monomersequenz zu verbessern.

[0060] Um weiterhin die Wirkung von Cäsium-Ionen gemäß der vorliegenden Erfindung mit der von anderen kationischen Arten zu vergleichen, haben die vorliegenden Erfinder besondere Aufmerksamkeit den Kationen von Alkalimetallen gewidmet und verifiziert, ob die dreidimensionale Konformation des 30-mer poly(dG) ausgeschaltet werden kann. Insbesondere wurde durch die Verwendung einer 1 M wässrigen Lithiumchloridlösung, einer 1 M wässrigen Kaliumchloridlösung und einer 1 M wässrigen Rubidiumchloridlösung, die auf einen pH-Wert von 11 mittels 100 mM Trishydroxymethylaminomethan eingestellt waren, ein Hindurchleiten von 30-mer poly(dG) durch eine Nanopore in einer Einrichtung mit einer 5 nm dicken Dünnschicht mit einer Nanopore von 2 nm gemessen. Im Ergebnis wurde bestätigt, dass bei allen Lösungen mit Ausnahme der 1 M wässrigen Cäsiumchloridlösung mit einem pH-Wert von 11 der Ionenstrom sofort null wird, wie bei **Fig. 3(a)**, und die Nanopore durch den G-Quadruplex blockiert ist. Da-

her wurde gezeigt, dass die dreidimensionale Konformation nicht einfach dadurch ausgeschaltet werden kann, dass der pH-Wert dahingehend geändert wird, dass er gleich oder größer als der pKa-Wert der Guanin-Base (N-1-Position) ist, und das Vorliegen der Cäsium-Ionen zum Zeigen der Wirkung wichtig ist.

(Beispiel 2)

[0061] Fig. 5 zeigt ein Beispiel für eine Aufbaudarstellung einer anderen Ausführungsform der Analyseeinrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung. In Fig. 1 wurde ein Beispiel in dem Fall gezeigt, in dem eine einzelne Nanopore vorlag, aber in Fig. 5 wurde ein Beispiel in dem Fall gezeigt, in dem parallelisierende Nanoporen vorlagen. Es wird eine Mehrzahl von einzelnen Behältern 511 hergestellt, die in der Lage sind, eine Lösung zu lagern, und eine Array-Einrichtung wird vorgesehen, bei der eine Mehrzahl von Dünnschichten 104, die jeweils eine Nanopore 103 haben, parallelisiert sind. Ein einziger gemeinschaftlicher Behälter 512 wird über die Dünnschichten auf der gegenüberliegenden Seite der Mehrzahl von einzelnen Behältern vorgesehen. Eine einzelne Elektrode 513 ist in jedem der mehreren einzelnen Behältern vorgesehen. Es ist bevorzugt, dass die Nanoporen und die Mehrzahl der einzelnen Schichten einander eins zu eins entsprechen und zahlenmäßig parallelisiert sind. Eine übliche Elektrode 514 ist im gemeinschaftlichen Behälter in einer Position angeordnet, die der Nanopore gegenüberliegt. Jede einzelne Elektrode ist in ein Elektrodensubstrat 515 eingebettet und festgesetzt. Die einzelne Elektrode ist mit einem Datenverarbeitungssubstrat 518 über einen unabhängigen Draht 517 verbunden, der auf einem Drahtsubstrat 516 vorgesehen ist, und Ionenstrom wird unabhängig für jede einzelne Elektrode beobachtet. Um die Messgenauigkeit zu verbessern, sind die Nanoporen voneinander durch ein Septum 519 isoliert, um eine Stromüberlagerung zwischen den Nanoporen zu unterdrücken. Die das zu messende Objekt enthaltende Lösung wird typischerweise in einen Behälter, der sich auf einer üblichen Elektrodenseite befindet, über einen Einlass 110 eingeführt.

[0062] Dieselben Gehalte, wie in Beispiel 1 erwähnt, können für die Lösung verwendet werden. Wie bei dem in Beispiel 1 beschriebenen Fall werden Wirkungen zum Ausschalten der dreidimensionalen Konformation des Biopolymers, das eine Nukleinsäure enthält, und zum Verbessern des Grads an Basentrennung gemäß dem vorliegenden Beispiel gezeigt. Das vorliegende Beispiel erlaubt es, dass Messungen parallel durchgeführt werden, so dass die Monomersequenz des Biopolymers mit sehr hohem Durchsatz analysiert werden kann, während eine hohe Analysegenauigkeit erhalten wird.

(Beispiel 3)

[0063] Fig. 6 zeigt ein Beispiel für eine Aufbaudarstellung einer anderen Ausführungsform der Analyseeinrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0064] Eine Dünnschicht für die Biopolymermessung ist für eine Potentialdifferenz zwischen Lösungen empfänglich, die sich auf beiden Seiten der Dünnschicht befinden, wodurch bewirkt werden kann, dass die Dünnschicht durch die Potentialdifferenz bricht. Insbesondere wenn die elektrostatische Kapazität der Analyseeinrichtung gesenkt wird, um den Rauschstrom zu reduzieren, neigt die Dünnschicht dazu zu brechen. Wenn eine Lösung in jeden der Lösungsbehälter, die sich auf beiden Seiten der Dünnschicht befinden, angeordnet wird, tritt notwendigerweise eine anfängliche Ladungsdifferenz ΔQ zwischen den Lösungen auf, so dass die Potentialdifferenz $\Delta V (= \Delta Q/C)$, die an die Dünnschicht durch Reduzieren der elektrostatischen Kapazität C der Analyseeinrichtung angelegt wird, amplifiziert wird, wodurch bewirkt wird, dass der Isolationsdurchschlag der Dünnschicht auftritt, was zum Dünnschichtdurchschlagphänomen führt. Um das Durchschlagphänomen zu vermeiden, werden dann ein Paar Elektroden neu zusätzlich zu den Ionenstrommeselektroden auf beiden Seiten der Dünnschicht angeordnet, wodurch die Ladungsdifferenz reduziert werden kann, um den Dünnschichtdurchschlag zu verhindern. Fig. 6 zeigt eine Aufbaudarstellung, bei der zwei Elektroden 620 zum Reduzieren der Ladungsdifferenz dem Aufbau der Fig. 1 hinzugefügt werden. Die beiden Elektroden 620 sind elektrisch über einen Draht 608 verbunden. Der Aufbau ist ausführlich zum Beispiel in Matsui, K. u.a., Scientific Reports 5, 17819, 2015 beschrieben.

[0065] Dieselben Gehalte wie die in Beispiel 1 genannten können für die Lösung verwendet werden. Wie bei dem in Beispiel 1 beschriebenen Fall, werden auch Wirkungen des Ausschaltens der dreidimensionalen Konformation eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure enthält, und zum Verbessern des Grads an Basentrennung gemäß dem vorliegenden Beispiel gezeigt.

(Beispiel 4)

[0066] Fig. 7 zeigt ein Beispiel für eine Aufbaudarstellung einer anderen Ausführungsform der Analyseeinrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0067] Fig. 7 zeigt einen Aufbau, bei dem eine Öffnung 721 eines gemeinschaftlichen Behälters, ein Substrat 722 und ein Antriebsmechanismus 723 zum Verlagern einer Substratposition dem Aufbau der Fig. 5 hinzugefügt werden. Ein Biopolymer ist auf dem Substrat 722 fixiert, und die relative Position eines mit Bezug auf eine Nanopore 103 zu messenden Objekts kann wahlweise und präzise durch den

Antriebsmechanismus **723** über ein externes Steuersystem gesteuert werden. Der Antriebsmechanismus kann vorzugsweise ein piezoelektrisches Element und ein Motor sein. Alternativ kann das zu messende Objekt an einen Träger fixiert sein und wie in einem Atomkraftmikroskop angetrieben werden. Ein solcher Aufbau ist zum Beispiel in der Literatur (E.M. Nelson u.a., ACS Nano, 8(6), 5484, 2014) beschrieben. Wenn das zu messende Objekt ein Biopolymer ist, das eine Nukleinsäure enthält, ist es bevorzugt, das Biopolymer für jedes Monomer präzise zu bewegen, um die Monomersequenz zu analysieren. Für die Lösung können dieselben Gehalte wie die in Beispiel 1 beschriebenen verwendet werden. Wie bei dem in Beispiel 1 beschriebenen Fall werden die Wirkungen zum Ausschalten der dreidimensionalen Konformation eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure enthält, und zum Verbessern des Ausmaßes an Basentrennung auch gemäß dem vorliegenden Beispiel gezeigt. Der Aufbau des vorliegenden Beispiels macht es möglich, das zu messende Objekt präzise zu steuern, wodurch die Messgenauigkeit verbessert wird.

(Beispiel 5)

[0068] Ein Beispiel für ein Verfahren zum Analysieren eines Biopolymers mittels eines Messreagens oder einer Analyseeinrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung wird nachstehend beschrieben. Dabei ist die Analysemethode der vorliegenden Erfindung eine Methode zum Analysieren eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure enthält, und umfasst die folgenden Schritte: Hindurchleiten eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure enthält, durch eine Nanopore, die in einer Dünnschicht in einer Messlösung gebildet wird, die einen pH-Wert hat, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsiumionen als Elektrolytkationen enthält; und Analysieren des Biopolymers auf der Grundlage einer Änderung eines elektrischen Signals.

[0069] Durch die Verwendung der Analysemethode können Nukleinsäuremonomere im Biopolymer, das eine Nukleinsäure enthält, sequenziert werden. Wenn das Biopolymer durch die Nanopore hindurchgeleitet wird, ändert sich das elektrische Signal gemäß den Basenarten, so dass die Sequenz gemäß dem Muster des elektrischen Signals bestimmt werden kann. Eine solche Methode ist zum Beispiel ausführlich in der Literatur (A.H. Laszlo u.a., Nat. Biotechnol. 32, 829, 2015) offenbart.

[0070] Durch die Verwendung der Analysemethode kann die Länge des Biopolymers auf der Grundlage der Gesamtsignaländerungszahl des elektrischen Signalmusters bestimmt werden. Als andere Anwendung kann die Anzahl der in der Lösung enthaltenen Biopolymere auch durch die Gesamtzahl der Biopoly-

mere bestimmt werden, die durch die Nanopore hindurchgeleitet werden.

[0071] Die vorliegende Erfindung ist nicht auf die vorstehend beschriebenen Beispiele beschränkt und umfasst verschiedene Modifikationen. Zum Beispiel werden die oben beschriebenen Beispiele zum besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung ausführlich beschrieben, und sind nicht notwendigerweise auf solche beschränkt, die alle Aufbauten der Beschreibung aufweisen. Darüber hinaus ist es möglich, einen Teil der Konfiguration eines bestimmten Beispiels durch die Konfiguration eines anderen Beispiels zu ersetzen, und es ist auch möglich, die Konfiguration eines bestimmten Beispiels der Konfiguration eines anderen Beispiels hinzuzufügen. Weiter können mit Bezug auf einen Teil der Konfiguration jedes Beispiels eine Hinzufügung einer anderen Konfiguration, seine Deletion und seinen Austausch mit einer anderen Konfiguration durchgeführt werden.

[0072] Alle hier angeführten Publikationen, Patente und Patentanmeldungen werden hier durch Bezugnahme, so wie sie sind, aufgenommen.

Bezugszeichenliste

101	Lösung
102	Behälter
103	Nanopore
104	Dünnschicht
105,106	Elektrode
107	Biopolymer
108	Draht
109	Messsystem
110	Einlass
511	einzelner Behälter
512	gemeinschaftlicher Behälter
513	einzelne Elektrode
514	gemeinschaftliche Elektrode
515	Elektrodensubstrat
516	Drahtsubstrat
517	unabhängiger Draht
518	Datenverarbeitungssubstrat
519	Septum
608	Draht
620	Elektrode

- 721 Öffnung
- 722 Substrat
- 723 Antriebsmechanismus

ZITATE ENHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- US 5795782 [0005, 0029]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Akahori u.a., Nanotechnology 25 (27): 275501, 2014 [0029]
- Yanagi u.a., Scientific Reports, 65 14656, 2015 [0029]
- Goto u.a., Scientific Reports 5, 16640, 2015 [0029]
- Fedor u.a., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6 (5): 399-412, 2005 [0052]
- A.H. Laszlo u.a., Nat. Biotechnol. 32, 829, 2015 [0069]

Patentansprüche

1. Messreagens zum Analysieren eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure umfasst, indem das Biopolymer durch eine in einer Dünnschicht gebildete Nanopore hindurchgeleitet wird und das Biopolymer auf der Grundlage einer Änderung eines elektrischen Signals analysiert wird, umfassend eine Messlösung, die einen pH-Wert aufweist, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen umfasst.

2. Messreagens nach Anspruch 1, umfassend Halogenid-Ionen als Elektrolytanionen.

3. Messreagens nach Anspruch 1, wobei die Lösung einen pH-Wert hat, der gleich oder größer als der pKa-Wert der Guanin-Base und gleich oder kleiner als pH 14 ist.

4. Messreagens nach Anspruch 1, wobei die Lösung einen pH-Wert hat, der durch Zugabe von Cäsiumhydroxid so eingestellt wird, dass er gleich oder größer als der pKa-Wert der Guanin-Base und gleich oder kleiner als pH 14 ist.

5. Messreagens nach Anspruch 1, wobei die Lösung einen pH-Wert hat, der durch ein pH-Einstellmittel so eingestellt wird, dass er gleich oder größer als der pKa-Wert der Guanin-Base (N-1-Position) und gleich oder kleiner als pH 14 ist, und zwar gemäß der Gleichung von Henderson-Hasselbalch $\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10}[\text{HX}^+]/[\text{X}]$, wobei sich X auf das pH-Einstellmittel bezieht.

6. Messreagens nach Anspruch 5, wobei das pH-Einstellmittel eine Konzentration hat, die gleich oder größer als 100 mM ist.

7. Messreagens nach Anspruch 1, wobei die Lösung eine Cäsium-Ionen-Konzentration hat, die gleich oder größer als 10 mM und gleich oder kleiner als eine gesättigte Konzentration ist.

8. Einrichtung zum Analysieren eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure aufweist, umfassend: eine Dünnschicht mit einer Nanopore; ein Paar Behälter, die in der Lage sind, eine Messlösung zu lagern, die mit der Dünnschicht in Kontakt gebracht wird; und ein Paar Elektroden, die in jedem der Behälter vorgesehen sind, wobei die Messlösung in jeden der Behälter so eingeführt wird, dass sie mit der Dünnschicht in Kontakt gebracht wird, und die Messlösung einen pH-Wert hat, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen umfasst.

9. Einrichtung zum Analysieren eines Biopolymers, das eine Nukleinsäure aufweist, umfassend: eine Array-Einrichtung, die eine Mehrzahl von Dünnschichtteilen mit einer Nanopore umfasst; einen einzigen gemeinschaftlichen Behälter und eine Mehrzahl von einzelnen Behältern, die in der Lage sind, eine Messlösung zu lagern, die mit den Dünnschichten in Kontakt gebracht wird; und einzelne Elektroden, die jeweils in der Mehrzahl der einzelnen Behälter vorgesehen sind, wobei die Messlösung in jeden der einzelnen Behälter und den gemeinschaftlichen Behälter so eingeführt wird, dass sie mit den Dünnschichten in Kontakt gebracht wird, und die Messlösung einen pH-Wert aufweist, der gleich oder größer als der pKa-Wert einer Guanin-Base ist, und Cäsium-Ionen als Elektrolytkationen umfasst.

10. Einrichtung nach Anspruch 8 oder 9, weiter umfassend einen Einlass zum Einführen der Messlösung in jeden der Behälter.

11. Einrichtung nach Anspruch 9, wobei der gemeinschaftliche Behälter eine gemeinschaftliche Elektrode umfasst, und die einzelnen Elektroden mit dem Datenverarbeitungssubstrat über einen Draht verbunden sind.

12. Einrichtung nach Anspruch 9, wobei der gemeinschaftliche Behälter eine Öffnung aufweist und die Einrichtung umfasst: ein Haltesubstrat mit einer Oberfläche, auf der das Biopolymer fixiert ist, und einen Mechanismus zum Antreiben des Haltesubstrats.

13. Einrichtung nach Anspruch 8 oder 9, wobei das Biopolymer RNA, DNA oder PNA oder eine Kombination davon ist.

Es folgen 7 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

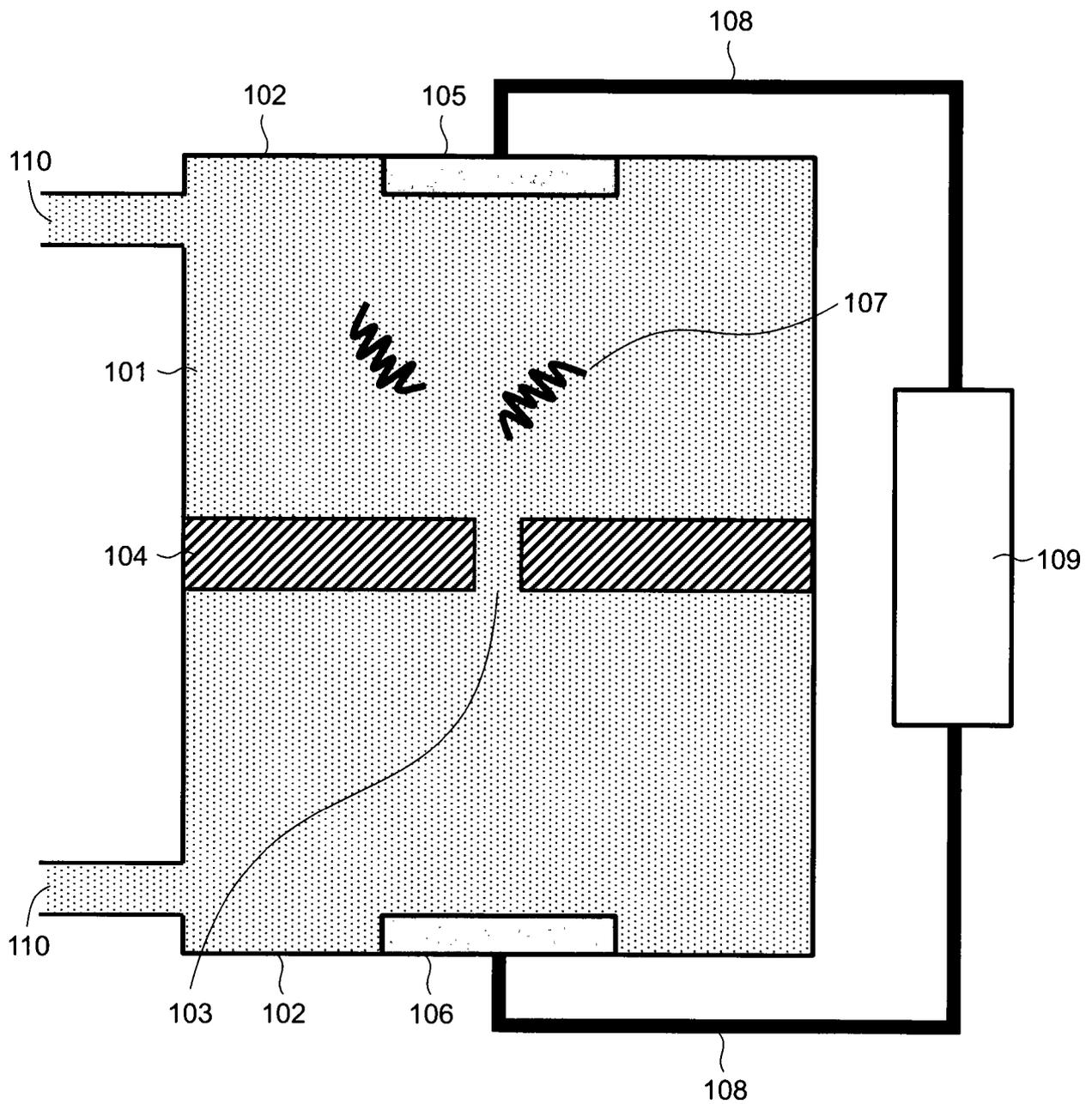
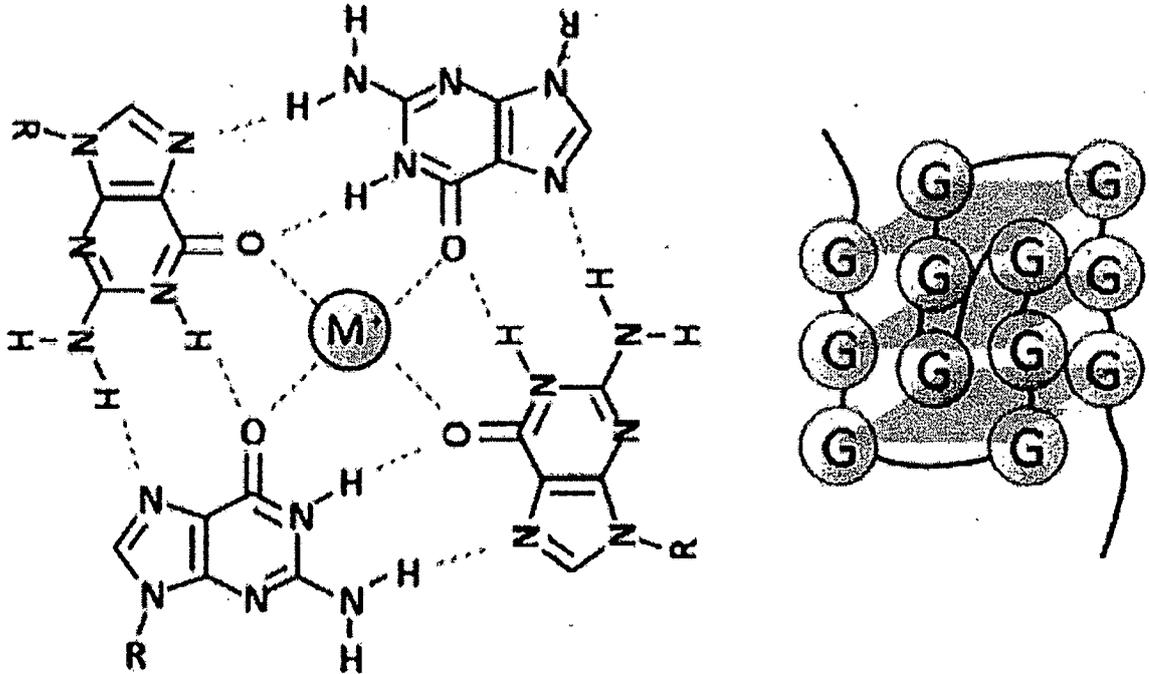


FIG. 2

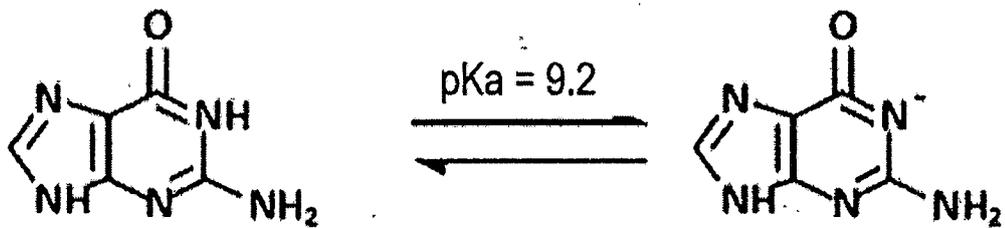
(a)

GUANIN QUADRUPLEX



(b)

DEPROTONIERT



(c)

GUANIN QUADRUPLEX

EINZELSTRÄNGIG

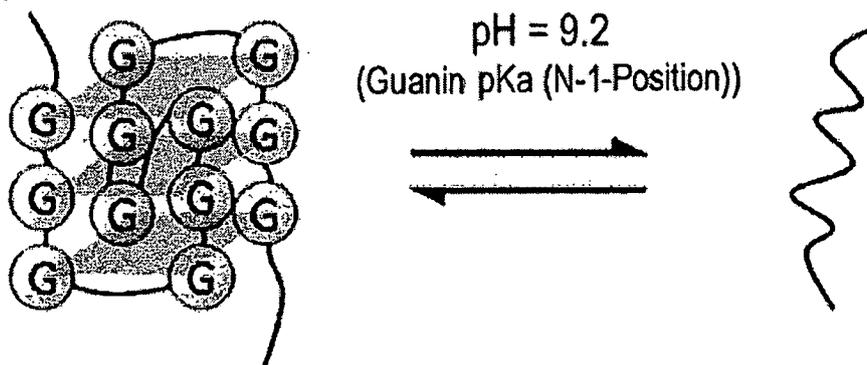
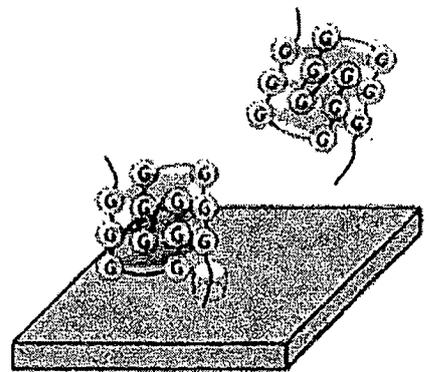
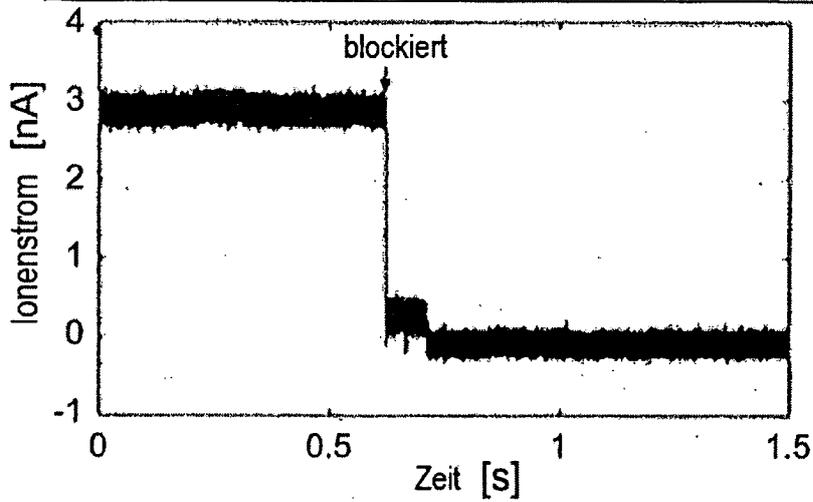


FIG. 3

(a)

STAND DER TECHNIK (wässrige Lösung von Kaliumchlorid, pH 7,5)



(b)

VORLIEGENDE ERFINDUNG (wässrige Lösung von Cäsiumchlorid, pH 11)

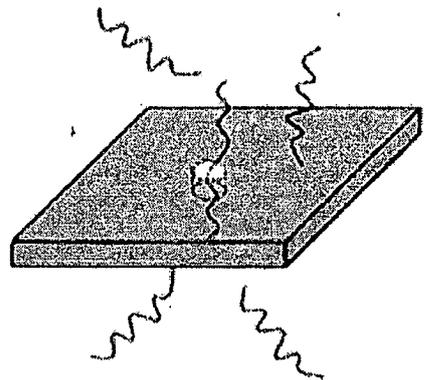
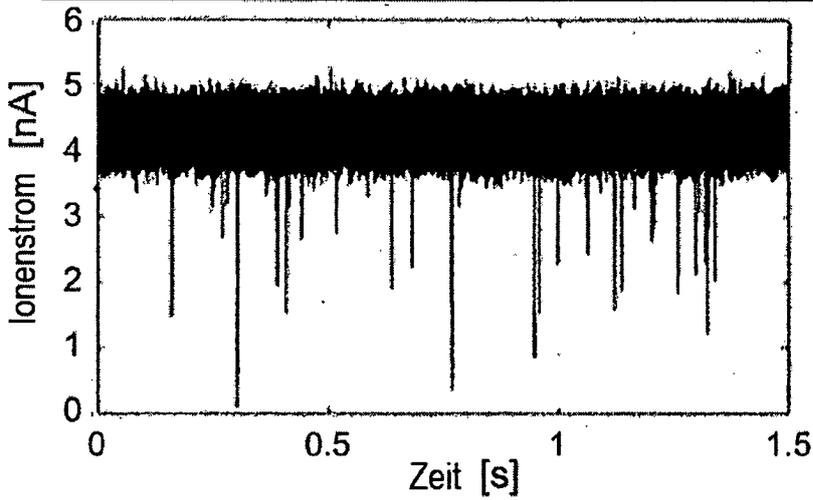


FIG. 4

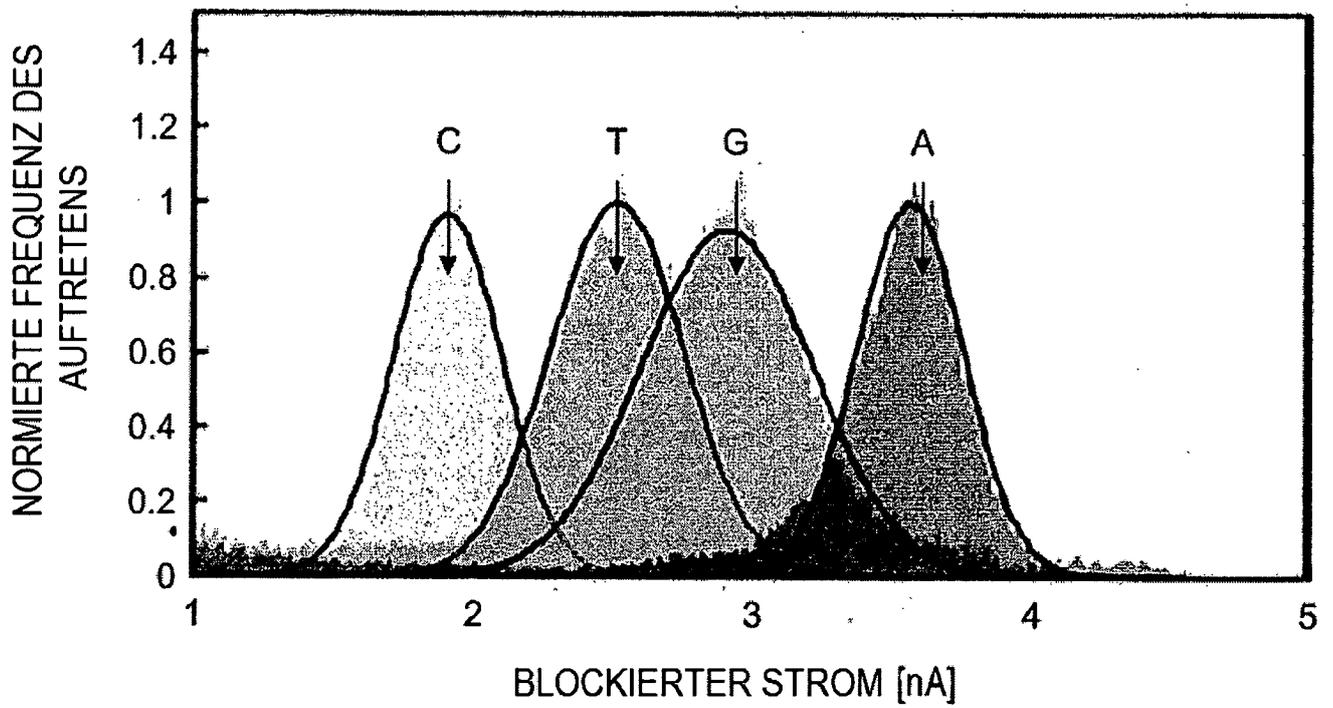


FIG. 5

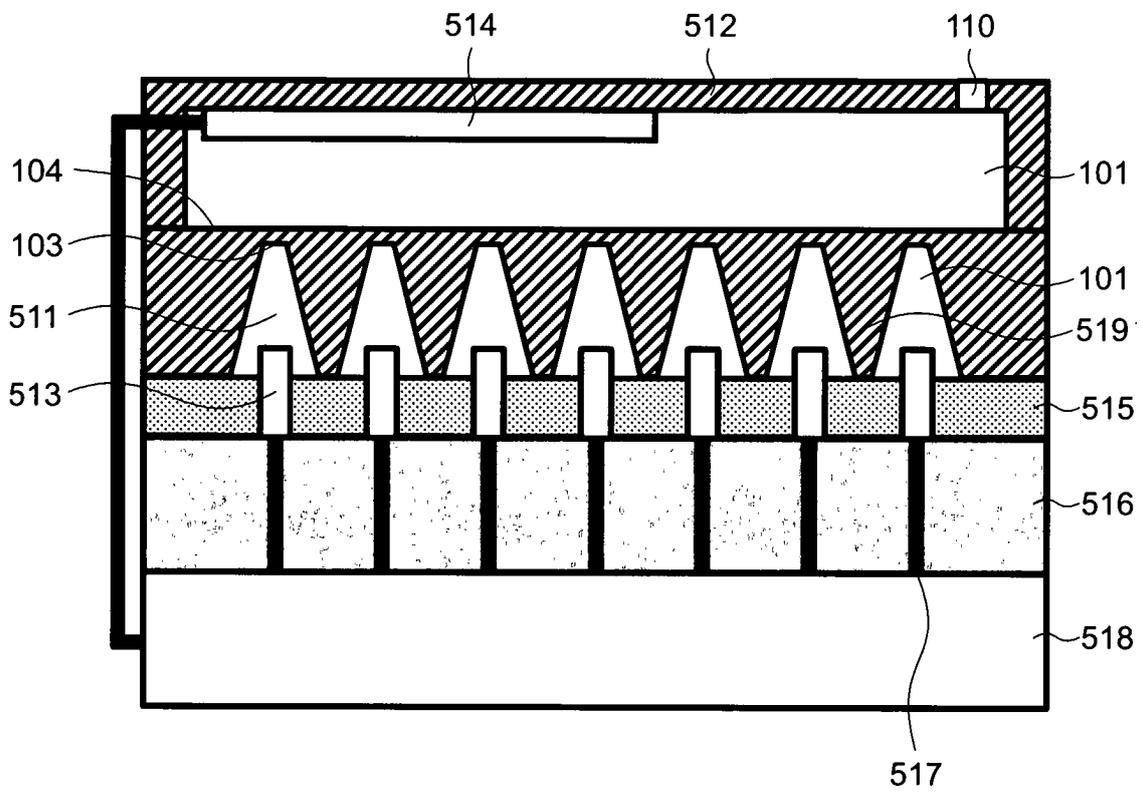


FIG. 6

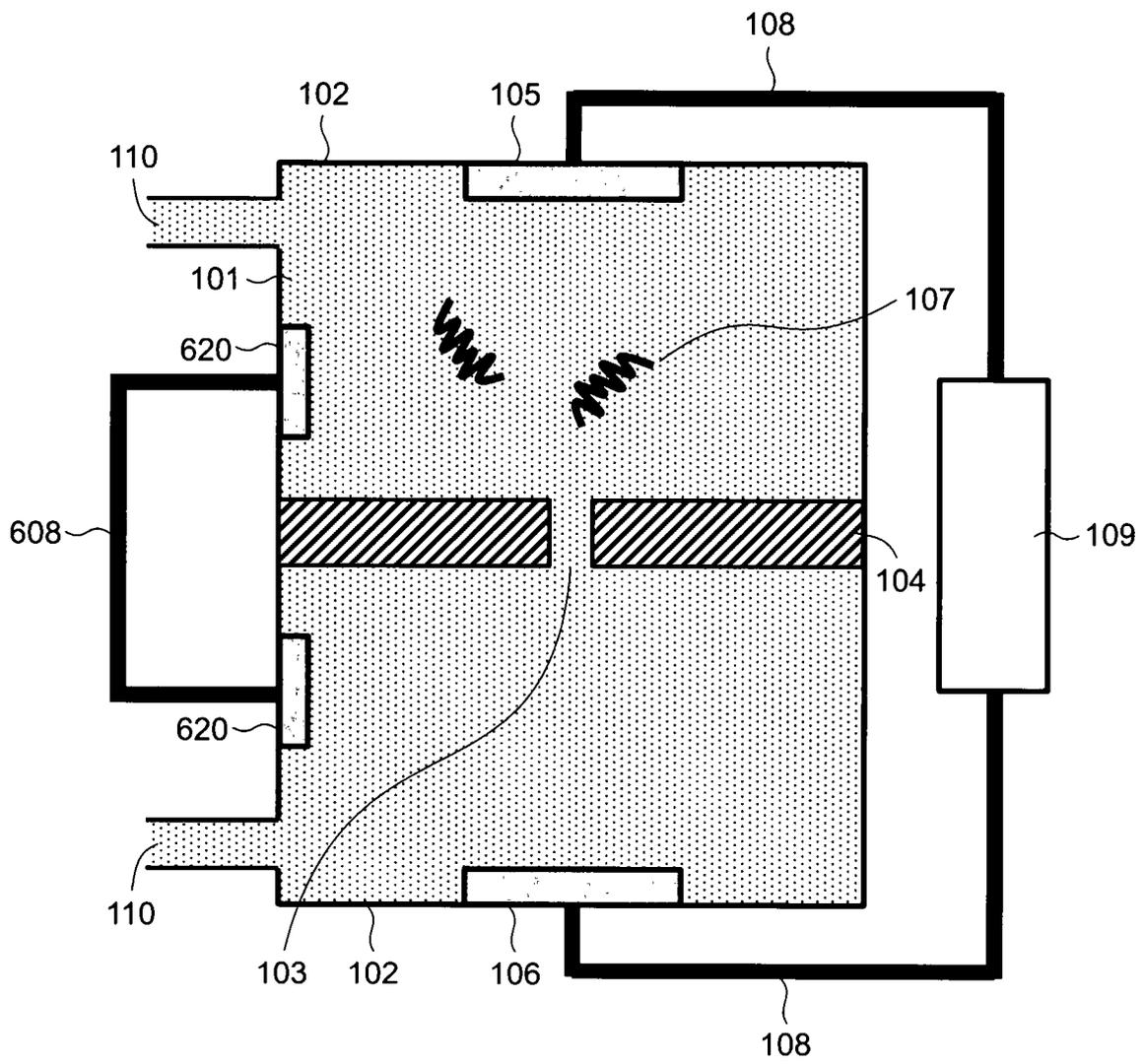


FIG. 7

