

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6579948号  
(P6579948)

(45) 発行日 令和1年9月25日(2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日(2019.9.6)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 33/483 (2006.01)** GO 1 N 33/483 F  
**GO 1 N 37/00 (2006.01)** GO 1 N 37/00 I O I

請求項の数 14 (全 18 頁)

|           |                               |           |                        |
|-----------|-------------------------------|-----------|------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2015-251426 (P2015-251426)  | (73) 特許権者 | 501387839              |
| (22) 出願日  | 平成27年12月24日 (2015.12.24)      |           | 株式会社日立ハイテクノロジーズ        |
| (65) 公開番号 | 特開2017-116379 (P2017-116379A) |           | 東京都港区西新橋一丁目2 4 番 1 4 号 |
| (43) 公開日  | 平成29年6月29日 (2017.6.29)        | (74) 代理人  | 100091096              |
| 審査請求日     | 平成30年2月23日 (2018.2.23)        |           | 弁理士 平木 祐輔              |
|           |                               | (74) 代理人  | 100118773              |
|           |                               |           | 弁理士 藤田 節               |
|           |                               | (72) 発明者  | 後藤 佑介                  |
|           |                               |           | 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株    |
|           |                               |           | 式会社日立製作所内              |
|           |                               | (72) 発明者  | 横井 崇秀                  |
|           |                               |           | 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株    |
|           |                               |           | 式会社日立製作所内              |
|           |                               | 審査官       | 赤坂 祐樹                  |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体ポリマを分析するための測定試薬及び分析デバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸から構成される生体ポリマを薄膜に開孔したナノポアに通過させ、電気的信号の変化から前記生体ポリマを分析するための測定試薬であって、

pHがグアニン塩基のpKa以上であり、電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含む測定溶液

を含むことを特徴とする測定試薬。

【請求項 2】

前記電解質のうち、アニオンとしてハロゲン化物イオンを含むことを特徴とする、請求項1に記載の測定試薬。

【請求項 3】

前記溶液のpHが、グアニン塩基のpKa以上pH14以下であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の測定試薬。

【請求項 4】

前記溶液のpHが、水酸化セシウムの添加によってグアニン塩基のpKa以上pH14以下に調整されたことを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の測定試薬。

【請求項 5】

前記溶液のpHが、ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式 $pH = pKa + \log_{10} [HX^+] / [X]$ （ここで、XはpH調整剤を指す）に従うpH調整剤によって、グアニン塩基（N-1位）のpKa以上pH14以下に調整されたことを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の測定試薬。

## 【請求項 6】

前記pH調整剤の濃度が100 mM以上であることを特徴とする、請求項5に記載の測定試薬。

## 【請求項 7】

前記溶液のセシウムイオン濃度が10 mM以上、飽和濃度以下であることを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載の測定試薬。

## 【請求項 8】

核酸から構成される生体ポリマを分析するためのデバイスであって、  
 ナノポアを有する薄膜と、  
 前記薄膜に対して接する測定溶液を収納できる1対の槽と、  
 前記各槽に備えられた1対の電極と  
 を備え、  
 前記各槽には前記薄膜に接液して前記測定溶液が注入され、前記測定溶液はpHがグアニン塩基のpKa以上であり、かつ電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含むことを特徴とする分析デバイス。

## 【請求項 9】

前記各槽に前記測定溶液を注入するための導入口をさらに備えることを特徴とする、請求項8に記載の分析デバイス。

## 【請求項 10】

核酸から構成される生体ポリマを分析するためのデバイスであって、  
 ナノポアを有する薄膜部を複数備えたアレイデバイスと、  
 前記薄膜部に対して接する測定溶液を収納できる複数の個別槽、及び単一の共通槽と、  
 前記複数の個別槽に各々備えられた複数の個別電極と  
 を備え、  
 前記個別槽及び共通槽の各々には前記薄膜部に接液して前記測定溶液が注入され、前記測定溶液はpHがグアニン塩基のpKa以上であり、かつ電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含むことを特徴とする分析デバイス。

## 【請求項 11】

前記共通槽に前記測定溶液を注入するための導入口をさらに備えることを特徴とする、請求項10に記載の分析デバイス。

## 【請求項 12】

前記共通槽には共通電極が備えられ、  
 前記個別電極は配線を介してデータ処理基板に接続されることを特徴とする、請求項10に記載の分析デバイス。

## 【請求項 13】

前記共通槽には開口部が備えられ、  
 前記生体ポリマが表面に固定された保持基板と、  
 前記保持基板を駆動する機構を有することを特徴とする、請求項10に記載の分析デバイス。

## 【請求項 14】

前記生体ポリマが、RNA、DNA、若しくはPNA、又はそれらの組み合わせであることを特徴とする、請求項8～13のいずれか1項に記載の分析デバイス。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、薄膜に埋め込まれた細孔を用いた、測定対象物、特に核酸から構成される生体ポリマ（DNAなど）を分析するための測定試薬、デバイス及び方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

厚み数 ~ 数十nm程度の薄膜に埋め込まれた直径0.9 nm ~ 数nm程度の細孔（以下、ナノ

ポアと呼ぶ)に電解質を含んだ溶液を接液し、この薄膜の両端間に電位差を発生させるとナノポアに電解質を含んだ溶液を通過させることができる。この時、測定対象物がナノポアを通過すると、ナノポア周辺部の電気的特性、特に抵抗値が変化するため、その電気的特性の変化を検出することによって測定対象物を検出及び分析することが可能である。測定対象物が生体ポリマの場合、生体ポリマのモノマ配列パターンに応じて、ナノポア周辺部の電気的特性がパターン状に変化する。これを利用して、生体ポリマのモノマ配列解析を行う方法が近年盛んに研究されている。中でも、生体ポリマがナノポアを通過した時に観測されるイオン電流の変化量がモノマ種によって異なることを原理とした方式(封鎖電流方式)が有望視されている。この際、モノマ配列の解析精度は上記イオン電流の変化量によって決定されるため、モノマ間のイオン電流量差は大きいほど望ましい。上記封鎖電流方式は、従来法とは異なり生体ポリマの断片化を伴う化学操作を必要とせず、生体ポリマを直接読取することが可能である。生体ポリマがDNAの場合は次世代DNA塩基配列解析システムであり、生体ポリマがタンパク質の場合はアミノ酸配列解析システムであり、それぞれ従来法よりも遥かに長い配列長を解読可能なシステムとして期待されている。

10

#### 【0003】

ナノポアデバイスとしては、脂質二重膜に埋め込まれた中心に細孔を有するタンパク質を用いたバイオポアと半導体加工プロセスにて形成した絶縁薄膜に細孔を加工したソリッドポアの2種類が存在する。バイオポアでは脂質二重膜に埋め込まれた改変タンパク質(*Mycobacterium smegmatis* porin A (MspA)等)の細孔(直径1.2 nm、厚さ0.6 nm)を生体ポリマ検出部としてイオン電流の変化量を測定する。一方、ソリッドポアでは半導体材料である窒化シリコンの薄膜や、グラフェン若しくは二硫化モリブデンのような単分子層からなる薄膜にナノポアを形成した構造体をデバイスとして用いる。

20

#### 【0004】

このような分析デバイスは、ナノポアデバイス、測定対象物及び電解質を含んだ溶液、ナノポアデバイスを挟んだ1対の電極、から構成されるデバイスが基本単位として用いられる。このような構成は例えば特許文献1や非特許文献1に記載されている。電極には溶液中の電解質と電子授受反応を行うことができる(電気化学的に酸化還元反応を行うことができる)材質が典型的に採用される。具体的にはその電気化学的な電位安定性と信頼性の高さからしばしば銀/銀塩化銀電極が用いられる。電解質にはpH中性下での塩化カリウム水溶液が最も典型的に使用される。その理由は、塩化物イオンが銀/銀塩化銀電極と電子授受反応が可能であり、カリウムイオンが塩化物イオンと電気移動度が等しいために電気伝導度が十分確保できるからである。ソリッドポア(半導体ナノポア)においては、これまでにpH中性下での塩化カリウム水溶液を用いてアデニン塩基、シトシン塩基又はチミン塩基からなるホモポリマの封鎖電流量を測定した報告がなされている(非特許文献1及び非特許文献2)。

30

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0005】

【特許文献1】米国特許第5795782号明細書

#### 【非特許文献】

40

#### 【0006】

【非特許文献1】Venta, K., et al., Differentiation of Short Single-Stranded DNA Homopolymers in Solid-State Nanopores, ACS Nano 7(5), p. 4629-4636 (2013).

【非特許文献2】Lee, M., et al., A Low-Noise Solid-State Nanopore Platform Based on a Highly Insulating Substrate, Scientific Reports 4, 7448 (2014).

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

従来のpH中性下の塩化カリウム水溶液を用いると核酸から構成される生体ポリマが立体構造を形成してナノポアを閉塞し、ナノポアでの生体ポリマ測定を阻害してしまうという

50

課題が存在する。特にカリウムイオン存在下ではグアニン(G)塩基が4量体を強固に形成してナノポアを閉塞し、生体ポリマ測定を妨害してしまう。そのため、グアニン塩基由来の封鎖電流量を正確に測定することができない。このような課題は例えば非特許文献1でも言及されている。また、従来のpH中性下の塩化カリウム水溶液ではナノポアでのモノマ間のイオン電流量差が小さいために塩基分離度が悪く、最終的なモノマ配列の解析精度が低下してしまうという課題が存在する。例えば非特許文献2にはホモポリマでのアデニン塩基、シトシン塩基、チミン塩基の封鎖電流量が重複している結果が開示されている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題を解決するため本発明者が鋭意検討を行った結果、予想外にも、電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含み、かつグアニン塩基のpKaよりも高いpHを有する測定溶液を用いた場合には、G塩基の4量体形成を防ぐことができ、核酸から構成される生体ポリマを正確に測定できることを見出した。また、上記測定溶液を用いた場合には、塩基の種類によって区別可能な封鎖電流量の差を示し、すなわち塩基分離度が良好であり、核酸から構成される生体ポリマ配列を高精度に解析できるという知見も得た。これらの知見から本発明を完成するに至った。

10

【0009】

本発明は、代表的には、核酸から構成される生体ポリマを薄膜に開孔したナノポアに通過させ、電気的信号の変化から前記生体ポリマを分析するための測定試薬であって、pHがグアニン塩基のpKa以上であり、電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含む測定溶液

20

【0010】

本発明はまた、核酸から構成される生体ポリマを分析するためのデバイスであって、ナノポアを有する薄膜と、前記薄膜に対して接する測定溶液を収納できる1対の槽と、前記各槽に備えられた1対の電極とを備え、

前記各槽には前記薄膜に接液して前記測定溶液が注入され、前記測定溶液はpHがグアニン塩基のpKa以上であり、かつ電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含む、分析デバイスに関する。

30

【0011】

また本発明は、核酸から構成される生体ポリマを分析するためのデバイスであって、ナノポアを有する薄膜部を複数備えたアレイデバイスと、前記薄膜に対して接する測定溶液を収納できる複数の個別槽、及び単一の共通槽と、前記複数の個別槽に各々備えられた複数の個別電極とを備え、

前記個別槽及び共通槽の各々には前記薄膜に接液して前記測定溶液が注入され、前記測定溶液はpHがグアニン塩基のpKa以上であり、かつ電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含む、分析デバイスに関する。

40

【0012】

さらに本発明は、上記測定溶液又は上記分析デバイスを用いて、核酸から構成される生体ポリマを分析する方法に関する。

【0013】

本発明は、pHがグアニン塩基のpKa以上であり、電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含む溶液にも関する。かかる溶液は、例えば封鎖電流形式のナノポアを使用して生体ポリマを分析するための方法及びデバイスにおいて用いることができる。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、核酸から構成される生体ポリマの立体構造が解消され、ナノポアでの生体ポリマ測定を円滑に行うことが可能となる。特にグアニン塩基の4量体が解消され、グ

50

アニン塩基由来の封鎖電流量を正しく測定することが可能となる。また本発明により、モノマ間のイオン電流差が増大して塩基分離度が向上し、最終的なモノマ配列の解析精度が向上する。したがって、本発明に係る測定試薬、分析デバイス及び分析方法は、核酸から構成される生体ポリマの分析、並びにその分析を利用する試験、診断、治療、創薬、基礎研究などの分野に有用である。

上記以外の課題、構成及び効果は、以下の実施形態の説明により明らかにされる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明に係る分析デバイスの構成の一実施形態を示す図である。

【図2】本発明によるグアニン4量体解消の機序を示す図である。

【図3】本発明の効果を従来技術と比較した実験結果を示す図である。

【図4】本発明による塩基分離度向上の実験結果を示すグラフである。

【図5】本発明に係る分析デバイスの構成の別の実施形態を示す図である。

【図6】本発明に係る分析デバイスの構成の別の実施形態を示す図である。

【図7】本発明に係る分析デバイスの構成の別の実施形態を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。

本発明では、いわゆる封鎖電流方式で生体ポリマを分析するためのナノポアデバイスにおいて、ナノポアを有する薄膜に対して接液する測定溶液が、電解質のカチオンとしてセシウムを含み、pHがグアニン塩基(N-1位)のpKa以上となるようにする。グアニン4量体は、グアニン塩基同士の水素結合を駆動力として、平面状の円環状の会合体を形成した後、会合体中心の空隙に金属イオンが配位することによって会合体が何層にも重なった立体的に強固な高次構造を形成する(実施例1及び図2(a))。この空隙のサイズにイオン直径が最も近いカリウムイオンが、最も強固なグアニン4量体を形成することで知られる。そこで、測定溶液のpHを、グアニン塩基(N-1位)のpKa以上とすることにより、グアニン塩基のN-1位にある水素が脱プロトン化される(図2(b))。するとグアニン塩基間の水素結合が弱まり、会合体形成力が弱まる。さらに、電解質のカチオンとして、カリウムイオンとはイオン直径が大きく異なるセシウムイオンを用いることにより、円環状の会合体中心に金属イオンが配位されにくくなり、電気伝導度を確保するためのカチオンが共存したまま、グアニン4量体形成を阻害することが可能となる(図2(c))。その結果、上記構成の測定溶液を使用することにより、グアニン塩基のホモポリマであっても、ナノポアが閉塞することなく、安定して長時間にわたってグアニン塩基由来の封鎖電流を測定でき(実施例1、図3)、また各塩基種由来の封鎖電流量が分離してモノマ配列を精度よく解析することができる(図4)。

【0017】

本発明は、一態様において、pHがグアニン塩基のpKa以上であり、電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含む測定溶液を含む、核酸から構成される生体ポリマを薄膜に開孔したナノポアに通過させ、電気的信号の変化から生体ポリマを分析するための測定試薬に関する。

【0018】

溶液の溶媒としては、生体ポリマを安定に分散可能であり、かつ電極が溶媒に溶解せず、電極との電子授受を阻害しない溶媒を用いることができる。例えば、水、アルコール類(メタノール、エタノール、イソプロパノールなど)、酢酸、アセトン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどが挙げられる。生体ポリマとして核酸を測定対象とする場合、最も好ましくは水である。

【0019】

本発明では、溶液の電解質として、カチオンとしてセシウムイオンを含む。電気伝導度を確保するためにセシウムイオン以外のカチオンを添加してもよいが、例えばカリウムイオン等の金属イオン類は核酸から構成される生体ポリマの立体構造形成を促進してしまう

10

20

30

40

50

ため、可能な限りセシウムイオン以外の金属イオン類は含まない方が好ましい。金属イオン類の代替カチオンとして、有機物から構成される有機カチオン類を用いることができ、例えばアンモニウムイオンなどに代表される電離するカチオンを用いることができる。アニオンとしては、電離するアニオン類を用いることができ、電極材質との相性によって選定することが好ましい。例えば電極材質としてハロゲン化銀を用いた場合、ハロゲン化物イオン（塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン）をアニオンとして用いることが好ましい。あるいは、アニオンは、グルタミン酸イオン等に代表される有機アニオン類であってもよい。

#### 【0020】

また本発明では、測定溶液のpHは、グアニン塩基のpKa以上pH14以下となるようにする。ここで、グアニン塩基（N-1位）のpKaは、溶媒の共存する溶質種によっても変化するため、測定溶液の種類に応じて調整することが好ましい。典型的には、水溶液中におけるグアニン塩基N1位のpKaは9.2である（例えば、Fedor, et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6(5):399-412, 2005）。

#### 【0021】

また、測定溶液のpH上限はデバイスの耐性限界によって決定される。半導体ナノポアにおいて典型的に用いられるシリコンウェハーを基板として用い、セシウムイオンが共存する場合、シリコンのエッチングが開始されるpH14付近がデバイス耐性限界である。このようなエッチングレートは既に関示されている（Lloyd D. Clark, et al. Cesium Hydroxide (CsOH): A Useful Etchant for Micromachining Silicon, Technical Digest, Solid-State Sensor and Actuator Workshop, IEEE, 1988.）。尚、この場合、しばしば薄膜材質として採用される窒化ケイ素は高アルカリ領域のpHにおいてもエッチングされることはないが、土台としてのシリコン又は酸化ケイ素がエッチングされていくため、pH上限値としては14を設定することが好ましい。他の半導体材質ではその材質のデバイス耐性限界によって同様に律速される。

#### 【0022】

測定溶液のpH調整手段としては、水酸化物溶液を添加するか、又はpH調整剤を添加する方法がある。ここでpH調整剤は、溶媒より水素イオンを受け取ってカチオンとなる化合物のことを指す。一実施形態において、水酸化物溶液として、水酸化セシウムの添加によってpHを調整することが好ましい。なぜなら、セシウムイオン以外の金属イオンを添加すると生体ポリマの立体構造形成を促進してしまうためである。すなわち測定溶液のpHは、水酸化セシウムの添加によってグアニン塩基のpKa以上pH14以下に調整される。

#### 【0023】

別の実施形態において、pH調整剤として、ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式： $pH = pKa + \log_{10} [HX^+] / [X]$ （ここで、XはpH調整剤を指す）に従って、グアニン塩基（N-1位）のpKa以上に調整できる化合物を用いて測定溶液のpHを調整することが好ましい。より具体的には、pKaが約7.0以上の化合物であればグアニン塩基（N-1位）のpKa以上のpHに設定することが可能である。例えばトリスヒドロキシメチルアミノメタンはpKaが8.2であり、100 mM濃度の水溶液における電離度が約0.5%程度であることから、ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式より、

$$pH = pKa + \log_{10} [HX^+] / [X] = 8.2 + 2.3 = 10.5$$

となる。したがって、グアニン塩基（N-1位）のpKa以上のpHに調整することができる。他の化合物としては、アンモニア、鎖状アルキルアミン類、環状アルキルアミン類などが挙げられる。このようなヘンダーソン・ハッセルバルヒの式 $pH = pKa + \log_{10} [HX^+] / [X]$ （ここで、XはpH調整剤を指す）に従うpH調整剤によって、測定溶液のpHが、グアニン塩基（N-1位）のpKa以上pH14以下に調整される。

#### 【0024】

また、測定溶液のpHは大気中に触れていると大気中の二酸化炭素と反応して徐々にpHが酸性側へと移行してしまう現象が発生する。この二酸化炭素の影響を少なくするためにはpHを初期状態からより高いアルカリ側へと設定しておくか、又はpH調整剤の濃度を高濃度

10

20

30

40

50

にすればよい。具体的には10 mMと100 mMのpH調整剤では100 mMの方が同一pHからグアニン塩基のpKa以下のpHに到達するまでの時間が延びるため、pH調整剤の濃度は高いほど好ましく、好ましくは50 mM以上、より好ましくは100 mM以上である。

【0025】

加えて、信号対ノイズ比の観点から電解質濃度の下限を設けることが好ましい(実施例1、図4)。そのため、本発明において電解質濃度の下限は10 mMである必要がある。一方、電解質濃度の上限を妨げる要件はなく、飽和濃度まで許容することができる。すなわち、測定溶液のセシウムイオン濃度は、10 mM以上、飽和濃度以下となる。

【0026】

本発明において使用する測定溶液は、公知の方法にしたがって調製することができる。例えば、溶媒に電解質を溶解した後、適当な手段を用いてpHを調整することによって調製することができる。

【0027】

本発明に係る生体ポリマを分析するための測定試薬は、上述した測定溶液を構成要素として含む。測定試薬は、使用手順や使用量などを記載した説明書と共に提供されうる。測定溶液は、即時使用可能な状態(液体)で提供されてもよいし、使用時に適当な溶媒で希釈するための濃縮液として提供されてもよいし、あるいは使用時に適当な溶媒で再構成するための固形状態(例えば粉末など)であってもよい。そのような測定試薬の形態及び調製は、当業者であれば理解することができる。

【0028】

本発明はまた、別の態様において、生体ポリマを分析するためのデバイスに関する。一実施形態では、本発明は、核酸から構成される生体ポリマを分析するためのデバイスであって、

ナノポアを有する薄膜と、

前記薄膜に対して接する測定溶液を収納できる1対の槽と、

前記各槽に備えられた1対の電極と

を備え、

前記各槽には前記薄膜に接液して前記測定溶液が注入され、前記測定溶液はpHがグアニン塩基のpKa以上であり、かつ電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含む、分析デバイスを提供する。

【0029】

また別の実施形態において、本発明は、核酸から構成される生体ポリマを分析するためのデバイスであって、

ナノポアを有する薄膜部を複数備えたアレイデバイスと、

前記薄膜に対して接する測定溶液を収納できる複数の個別槽、及び単一の共通槽と、

前記複数の個別槽に各々備えられた複数の個別電極と

を備え、

前記個別槽及び共通槽の各々には前記薄膜に接液して前記測定溶液が注入され、前記測定溶液はpHがグアニン塩基のpKa以上であり、かつ電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含む、分析デバイスを提供する。

【0030】

いわゆる封鎖電流方式で生体ポリマを分析するためのナノポアデバイスは、当技術分野で公知であり、その構成要素も当業者であれば容易に理解することができる。例えば、非特許文献1及び2、米国特許第5795782号、Yanagi, et al., Scientific Reports 4, 5000, 2014、Akahori, et al., Nanotechnology 25(27):275501, 2014、Yanagi, et al., Scientific Reports, 5, 14656, 2015、Goto, et al., Scientific Reports 5, 16640, 2015に具体的なデバイスが開示されている。

【0031】

ナノポアを有する薄膜は、中心に細孔を有するタンパク質が埋め込まれた両親媒性分子層からなる脂質二重層(バイオポア)であってもよいし、半導体微細加工技術で形成でき

10

20

30

40

50

る材質からなる薄膜（ソリッドポア）であってもよい。半導体微細加工技術で形成できる材質としては、例えば窒化ケイ素（SiN）、酸化ケイ素（SiO<sub>2</sub>）、酸窒化ケイ素（SiON）、酸化ハフニウム（HfO<sub>2</sub>）、二硫化モリブデン（MoS<sub>2</sub>）、グラフェンなどがある。薄膜の厚さは、1 ~ 200 nm、好ましくは1 ~ 100 nm、より好ましくは1 ~ 50 nm、例として約5 nmである。

#### 【0032】

ナノポア（細孔）は、分析対象の生体ポリマの種類に応じて適切なサイズを選択することができ、例えば0.9 nm~100 nm、好ましくは0.9 nm~50 nmであり、具体的にはおよそ0.9 nm以上10 nm以下などである。ssDNA（1本鎖DNA）の直径は約1.5nmであり、ssDNAを分析するためのポア径の適切な範囲は1.5nm~10nm程度、好ましくは1.5nm~2.5nm程度、例えば約2nmである。dsDNA（2本鎖DNA）の直径は約2.6nmであり、dsDNAを分析するためのポアの径の適切な範囲は3nm~10nm程度、好ましくは3nm~5nm程度である。ナノポアの深さは、薄膜の厚さを調整することにより調整することができる。ナノポアの深さは、生体ポリマを構成するモノマー単位の2倍以上、好ましくは3倍以上、より好ましくは5倍以上の大きさとする。例えば生体ポリマが核酸から構成されている場合には、ナノポアの深さは、塩基3個以上の大きさ、例えば約1nm以上とすることが好ましい。これにより、生体ポリマをその形状と移動速度を制御しながらナノポアに進入させることができ、高感度及び高精度な解析が可能となる。またポアの形状は、基本的には円形であるが、楕円形や多角形とすることも可能である。なお、ナノポアを有する薄膜部を複数備えるアレイデバイスを使用する場合には、ナノポアを有する薄膜部を規則的に配列することが好ましい。複数の薄膜部を配置する間隔は、使用する電極、電気測定系の能力に応じて、0.1 μm~10 μm、好ましくは0.5 μm~4 μmとすることができる。

#### 【0033】

薄膜中にナノポア（細孔）を形成する方法は、特に限定されるものではなく、例えば透過型電子顕微鏡などによる電子ビーム照射や電圧印加による絶縁破壊などを用いることができる。

#### 【0034】

前記薄膜に対して接する測定溶液を収納できる槽（個別槽、共通槽を含む）は、封鎖電流の測定に影響を及ぼさない材質、形状及び大きさで、適宜設けることができる。この槽に、薄膜に接液して測定溶液が注入される。

#### 【0035】

電極は、測定溶液中の電解質と電子授受反応（ファラデー反応）を行うことが可能な材質で作製されることが好ましく、典型的にはハロゲン化銀又はハロゲン化アルカリ銀で作製されたものである。電位安定性及び信頼性の観点からは、銀/銀塩化銀を電極に使用することが好ましい。電極は、分極電極となる材質で作製されてもよく、例えば金や白金などで作製されてもよい。その場合は、安定的なイオン電流を確保するために測定溶液に電子授受反応を補助することができる物質、例えばフェリシアン化カリウム又はフェロシアン化カリウムなどを添加することが好ましい。あるいは、電子授受反応を行うことが可能な物質、例えばフェロセン類をその分極電極表面に固定化することが好ましい。電極の構造は、電極全てが前記材質で構成されていてもよく、あるいは前記材質が下地材（銅、アルミニウムなど）の表面に被覆されていてもよい。電極の形状は特に限定されるものではないが、測定溶液と接液する表面積が大きくなる形状が好ましい。電極は配線と接合されて、測定回路へと電氣的信号が送られる。

#### 【0036】

本発明に係る分析デバイスは、前記各槽に前記測定溶液を注入するための導入口をさらに備えていてもよい。

#### 【0037】

また、好ましい実施形態では、前記共通槽には共通電極が備えられ、前記個別電極は配線を介してデータ処理基板に接続されていてもよい。別の好ましい実施形態では、前記共通槽には開口部が備えられ、本発明に係る分析デバイスは、前記生体ポリマが表面に固定

10

20

30

40

50

された保持基板と、前記保持基板を駆動する機構とをさらに有する。

【0038】

さらに本発明は、核酸から構成される生体ポリマを分析する方法にも関する。本発明に係る測定試薬若しくは分析デバイスを用いて、又は本発明に係る方法において、分析する対象となる生体ポリマは、ナノポア通過時に電気的特性、特に抵抗値を変化させる対象物であればよく、核酸から構成されるものである。具体的には、RNA（一本鎖RNA若しくは二本鎖RNA）、DNA（一本鎖DNA若しくは二本鎖DNA）、PNA（ペプチド核酸）、オリゴヌクレオチド、アプタマー、並びにそれらの組み合わせ（例えば、ハイブリッド核酸）である。生体ポリマは、生体に存在するものであってもよいし、又は生体に存在するものから誘導されるものであってもよい。例えば、自然には存在しない配列や構成要素を含むポリマ、例えばpoly(A)、poly(T)などの配列、人為的に合成されたポリマ分子、核酸増幅技術（例えばPCR）によって調製された核酸、ベクターにクローニングされている核酸なども含まれる。これらの生体ポリマの調製方法は、当技術分野で周知であり、当業者であれば、生体ポリマの種類に応じて適宜調製方法を選択することができる。

10

【0039】

本発明において、生体ポリマの「分析」とは、生体ポリマを構成する核酸の特性解析を指す。例えば、生体ポリマを構成する核酸のモノマの配列順序の分析（配列決定）、核酸の長さの決定、一塩基多型の検出、生体ポリマ数の決定、生体ポリマ中の構造多型（コピー数多型、挿入、欠失など）の検出などを指す。

【0040】

本発明に係る方法は、一実施形態において、以下の工程を含む：  
pHがグアニン塩基のpKa以上であり、電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含む測定溶液中で、核酸から構成される生体ポリマを薄膜に開孔したナノポアに通過させる工程、

20

電氣的信号の変化から前記生体ポリマを分析する工程。

【0041】

また別の実施形態において、本発明に係る方法は、上述した分析デバイスを用いて行い、以下の工程を含む：

上述した測定溶液が分析デバイスの薄膜に接液した条件下で核酸から構成される生体ポリマをナノポアに通過させる工程、

30

電極により電氣的信号を測定する工程、

電氣的信号の変化から前記生体ポリマを分析する工程。

【0042】

本発明に係る分析方法は、測定溶液として、pHがグアニン塩基のpKa以上であり、電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含む測定溶液を使用する以外は、従来法と同じ装置、工程及び条件を使用して実施することができる。かかる測定溶液を使用することによって、核酸から構成される生体ポリマの立体構造（特にグアニン塩基の4量体）が解消され、ナノポアでの封鎖電流を円滑に正しく測定することが可能となる。また、モノマ間のイオン電流差が増大して塩基分離度が向上し、生体ポリマを高精度に分析することが可能となる。

40

【実施例】

【0043】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0044】

（実施例1）

図1は、本発明に係る単一ナノポアを用いた分析デバイスの構成図の一例を示す。

本デバイスは、溶液101を収納することができる2つの槽102と、ナノポア103を備えた薄膜104と、2つの電極105、106から構成されている。2つの電極はナノポアを挟んで対向するように各槽に1つずつ設置されている。2つの槽に収納された溶

50

液は電解質を含んでおり、少なくともどちらか一方の槽の溶液に測定対象物である核酸から構成される生体ポリマ107が含まれていればよい。ナノポアを通過するイオン電流は2つの電極に接合された配線108を介して測定システム109にて測定される。溶液は導入口110を介して充填する。測定システムは典型的には、イオン電流計測装置、アナログデジタル出力変換装置、データ処理装置、データ表示出力装置、入出力補助装置から構成される。イオン電流計測装置には電流電圧変換型の高速増幅回路が搭載され、データ処理装置には演算装置、一時記憶装置、不揮発性記憶装置が搭載されている。外部ノイズを低減するため、分析デバイスはファラデーケージで覆われていることが好ましい

#### 【0045】

核酸から構成される生体ポリマは、ナノポア通過時に電気的特性、特に抵抗値を変化させる対象物であれば良く、典型的には一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、PNA（ペプチド核酸）、オリゴヌクレオチド、並びにこれらの組み合わせ（例えば、ハイブリッド核酸）などが対象である。本デバイスにおいて、モノマ配列を解析する際には、生体ポリマはその高次構造が解消された直鎖状高分子の形態をとる必要がある。測定対象物をナノポア通過させる手段としては、電気泳動による搬送が好ましいが、圧力ポテンシャル差などで発生させた溶媒流であってもよい。

#### 【0046】

ナノポア103は、測定対象物が通過できる最小サイズを有する孔であればよく、生体ポリマとして一本鎖DNAを測定対象とする場合には、一本鎖DNAが通過可能な直径0.9 nmから10 nm程度の孔であればよく、薄膜の厚みは数 から数十nm程度であればよい。ナノポアは、バイオポアでもソリッドポアであってもよい。バイオポアの場合、薄膜として脂質二重層を形成できる両親媒性分子層中に埋め込まれた中心に細孔を有するタンパク質が好ましい。ソリッドポアの場合、薄膜の材質は半導体微細加工技術で形成できる材質であればよく、典型的には窒化ケイ素、酸化ケイ素、酸化ハフニウム、二硫化モリブデン、グラフェンなどであればよい。この場合、薄膜中に細孔を形成する方法としては透過型電子顕微鏡などによる電子ビーム照射や電圧印加による絶縁破壊などが挙げられる。

#### 【0047】

電極の材質は、測定溶液中の電解質と電子授受反応（ファラデー反応）を行うことが可能な材質が好ましく、典型的にはハロゲン化銀又はハロゲン化アルカリ銀が良い。中でも銀/銀塩化銀が電位安定性及び信頼性の観点から望ましい。ただし、その他の材質としては分極電極となる材質であってもよく、例えば金や白金などであってもよい。その場合は、安定的なイオン電流を確保するために測定溶液に電子授受反応を補助することができる物質、例えばフェリシアン化カリウム又はフェロシアン化カリウムなどを添加することが好ましい。あるいは、電子授受反応を行うことが可能な物質、例えばフェロセン類を前記分極電極表面に固定化することが好ましい。

#### 【0048】

電極の構造は、電極全てが前記材質で構成されていてもよく、あるいは前記材質が下地材（銅、アルミニウムなど）の表面に被覆されていてもよい。

#### 【0049】

電極は配線と接合されており、測定回路へと電気的信号が送られる。電極の形状はどのような形状であってもよいが、溶液と接液する表面積が大きくなる形状が好ましい。

#### 【0050】

溶液の溶媒としては、生体ポリマを安定に分散可能であり、かつ電極が溶媒に溶解せず、電極との電子授受を阻害しない溶媒であればよい。例えば、水、アルコール類（メタノール、エタノール、イソプロパノールなど）、酢酸、アセトン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどが挙げられる。生体ポリマとして核酸を測定対象とする場合、最も好ましくは水である。

#### 【0051】

前記溶媒に含まれる電解質としては、カチオンとしてセシウムイオンが含まれていればよい。電気伝導度を確保するためにセシウムイオン以外のカチオンを添加してもよいが、

10

20

30

40

50

例えばカリウムイオン等の金属イオン類は核酸から構成される生体ポリマの立体構造形成を促進してしまうため、可能な限りセシウムイオン以外の金属イオン類は含まない方が好ましい。金属イオン類の代替カチオンとしては有機物から構成される有機カチオン類が良く、例えばアンモニウムイオンなどに代表される電離するカチオンであればよい。アニオンとしては、電離するアニオン類であれば良いが、電極材質との相性によって選定することが好ましい。例えば電極材質としてハロゲン化銀を用いた場合、ハロゲン化物イオン（塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン）をアニオンとして用いることが好ましい。又はグルタミン酸イオン等に代表される有機アニオン類であってもよい。

#### 【0052】

前記溶液のpHはグアニン塩基（N-1位）のpKa以上となっている必要がある。図2(a)に示したように、グアニン4量体はグアニン塩基同士の水素結合を駆動力として、平面状の円環状の会合体を形成した後、会合体中心の空隙に金属イオンが配位することによって会合体が何層にも重なった立体的に強固な高次構造を形成する。この空隙のサイズにイオン直径が最も近いカリウムイオンが、最も強固なグアニン4量体を形成することで知られる。そこで、測定溶液のpHを、グアニン塩基（N-1位）のpKa以上とすることにより、図2(b)に示したようにグアニン塩基のN-1位にある水素が脱プロトン化される。するとグアニン塩基間の水素結合が弱まり、会合体形成力が弱まる。さらにカリウムイオンとはイオン直径が大きく異なるセシウムイオンを用いることにより、円環状の会合体中心に金属イオンが配位されにくくなり、電気伝導度を確保するためのカチオンが共存したまま、図2(c)に示したようにグアニン4量体形成を阻害することが可能となる。グアニン塩基（N-1位）のpKaは、前記溶媒の共存する溶質種によっても変化するため、測定溶液の種類に応じて調整することが好ましい。典型的には、水溶液中におけるグアニン塩基N1位のpKaは9.2であることが文献（Fedor, et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6(5):399-412, 2005）に開示されている。

#### 【0053】

また、前記溶液のpH上限はデバイスの耐性限界によって決定される。半導体ナノポアにおいては、典型的にはシリコンウェハーを基板として用いる。セシウムイオンが共存する場合、シリコンのエッチングが開始されるpH14付近がデバイス耐性限界である。このようなエッチングレートは文献（Lloyd D. Clark, et al. Cesium Hydroxide (CsOH): A Useful Etchant for Micromachining Silicon, Technical Digest, Solid-State Sensor and Actuator Workshop, IEEE, 1988.）に開示されている。尚、この場合、しばしば薄膜材質として採用される窒化ケイ素は高アルカリ領域のpHにおいてもエッチングされることはないが、土台としてのシリコン又は酸化ケイ素がエッチングされていくため、pH上限値としては14を設定することが好ましい。他の半導体材質ではその材質のデバイス耐性限界によって同様に律速される。

#### 【0054】

前記溶液のpH調整手段としては、水酸化物溶液を添加するか、又はpH調整剤を添加する方法がある。ここでpH調整剤は、溶媒より水素イオンを受け取ってカチオンとなる化合物のことを指す。

#### 【0055】

水酸化物溶液としては、セシウムイオン以外の金属イオンを添加すると生体ポリマの立体構造形成を促進してしまうため、水酸化セシウムの添加によってpHを調整する必要がある。

#### 【0056】

pH調整剤としては、ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式： $pH = pKa + \log_{10} [HX^+] / [X]$ （ここで、XはpH調整剤を指す）に従って、グアニン塩基（N-1位）のpKa以上に調整できる化合物であればよい。より具体的には、pKaが約7.0以上の化合物であればグアニン塩基（N-1位）のpKa以上のpHに設定することが可能である。例えばトリスヒドロキシメチルアミノメタンはpKaが8.2であり、100 mM濃度の水溶液中における電離度が約0.5%程度であることからヘンダーソン・ハッセルバルヒの式より、

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} [\text{HX}^+] / [\text{X}] = 8.2 + 2.3 = 10.5$$

となる。したがって、グアニン塩基（N-1位）のpKa以上のpHに調整することができる。他の化合物としては、アンモニア、鎖状アルキルアミン類、環状アルキルアミン類などが挙げられる。

#### 【0057】

また、前記溶液のpHは大気中に触れていると大気中の二酸化炭素と反応して徐々にpHが酸性側へと移行してしまう現象が発生する。この二酸化炭素の影響を少なくするためにはpHを初期状態からより高いアルカリ側へと設定しておくか、又はpH調整剤の濃度を高濃度にすればよい。具体的には10 mMと100 mMのpH調整剤では100 mMの方が同一pHからグアニン塩基のpKa以下のpHに到達するまでの時間が延びるため、pH調整剤の濃度は高いほど好ましい。

10

#### 【0058】

加えて、信号対ノイズ比の観点から電解質濃度の下限を設けることが好ましい。後述するように、1 M セシウムイオンを含んだ溶液下では図4に示すように塩基間の封鎖電流量差が500 pA程度であることが我々の発明によって明らかとなった。この封鎖電流量差はナノポアの電気伝導度に正に依存し、溶媒として水を用いた場合、文献(Ralph M. M. Smets, et al. Salt Dependence of Ion Transport and DNA Translocation through Solid-State Nanopores, Nano Lett. 6, 89, 2006.)に開示されているように電気伝導度は1 mM程度までは電解質濃度に概ね線形にตอบสนองすることが知られる。したがって、電解質濃度を1桁減少すると封鎖電流量差も1桁減少する。そのため、塩基間の封鎖電流量差は、セシウムイオン100 mMでは50 pA、10 mMでは5 pA、1 mMでは0.5 pAと減少していく。一方で、計測時に発生する電流ノイズとしてはデバイス由来のノイズとアンプ由来のノイズの2種類に大別することができるが、容量を低減する等の対策によってデバイス由来のノイズを低減してもアンプ由来のノイズ以下にまで低減することは困難である。したがって、アンプ由来ノイズによって電解質濃度の下限は定義されるが、文献(Adrian Balan, et al. Improving Signal-to-Noise Performance for DNA Translocation in Solid-State Nanopores at MHz Bandwidths, Nano Lett. 14, 7215, 2014)に開示されているようにしばしば用いられる周波数域(5~10kHz)において、アンプ由来ノイズは約1 pAである。よって、統計的に有意な信号対ノイズ比として5がしばしば定義されることから、本発明における電解質濃度の下限は10 mMである必要がある。一方、電解質濃度の上限を妨げる要件はなく、飽和濃度まで許容することができる。

20

30

#### 【0059】

本発明の構成により、核酸から構成される生体ポリマの立体構造を解消するとともにモノマ間の封鎖電流量差を向上させることができる。図3は、従来法と本発明に係る測定試薬又は分析デバイスを用いた方法を比較する実験結果を示す。2 nmのナノポアを備えた厚み5 nmの薄膜を有するデバイス(例えば、Yanagi, I. et al. Fabrication of 3-nm-thick Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> membranes for solid-state nanopores using the poly-Si sacrificial layer process, Scientific Reports, 5, 14656, 2015に開示されているような構造)と、1対の銀/銀塩化銀電極と高速電流計測アンプとを組み合わせ、測定溶液としては従来のpH7の1 M 塩化カリウム水溶液と、本発明の100 mMのトリスヒドロキシメチルアミノメタンでpHを11に調整した1 M 塩化セシウム水溶液を用いて比較を行った。測定サンプルとして、30-merのpoly(dA)、poly(dC)、poly(dT)、poly(dG)を使用して検証した。まず30-merのpoly(dG)を従来の測定溶液で印加電圧300 mVにて計測を開始した結果、図3(a)に示したようにイオン電流がすぐに降下してゼロとなってしまうことが判明した。これはグアニン(G)4量体によってナノポアが閉塞してしまうことを意味しており、グアニン塩基の封鎖電流量を正確に測定できないことを表している。一方、30-merのpoly(dG)を本発明の測定溶液で印加電圧300 mVにて計測を開始した結果、図3(b)に示したようにナノポアが閉塞することなく、安定して長時間にわたってグアニン塩基由来の封鎖電流を測定できることを確認した。加えて、他塩基種の30-merのpoly(dA)、poly(dC)、poly(dT)に対しても同様に封鎖電流量を測定した結果、図4に示したように各塩基種由来の封鎖電流量が分離してモ

40

50

ノマ配列解析精度が向上できていることを確認した。

【0060】

さらに、本発明におけるセシウムイオンの効果を他のカチオン種と比較するため、特にアルカリ金属類のカチオンに着目して30-merのpoly(dG)立体構造解消可否について検証した。具体的には100 mMのトリスヒドロキシメチルアミノメタンでpHを11にそれぞれ調整した、1 M塩化リチウム水溶液、1 M塩化カリウム水溶液、1 M塩化ルビジウム水溶液を用いて、2 nmのナノポアを備えた厚み5 nmの薄膜を有するデバイスでナノポアでの30-merのpoly(dG)通過計測を行った。その結果、pH11の1 M塩化セシウム水溶液以外の全ての溶液は図3(a)と同様にイオン電流がすぐにゼロとなってしまう、G4量体によってナノポアが閉塞してしまうことが判明した。したがって、pHをグアニン塩基(N-1位)のpKa以上に変更しただけでは立体構造を解消することができず、セシウムイオンの存在が効果を発揮するために重要であることが示された。

10

【0061】

(実施例2)

図5は、本発明に係る分析デバイスの別の実施形態の構成図の一例を示す。

図1では、単一のナノポアを有する場合の実施例を示したが、図5では、ナノポアを並列化した場合の実施例を示した。溶液を収納できる複数の個別槽511が用意されており、ナノポア103を有する薄膜104が複数個に並列化されたアレイデバイスが備えられている。薄膜を介した複数の個別槽の対向側に単一の共通槽512が備えられている。複数の個別槽には個別電極513が1つずつ備えられている。ナノポアと複数の個別層は1対1で対応してその個数分並列化されていることが好ましい。ナノポアに対向する位置における共通槽には共通電極514が配置されている。各個別電極は電極基板515上に埋め込まれて設置されており、配線基板516に設けられた独立配線517によってデータ処理基板518へと接続され、それぞれ独立にイオン電流が観測される。測定精度を高める目的で各ナノポア間での電流クロストークを抑制するために各ナノポアは隔壁519によってお互いに絶縁される。測定対象物を含む溶液は典型的には導入口110を介して共通電極側の槽に充填される。

20

【0062】

溶液は実施例1にて言及したものと同一の内容を用いればよい。本実施例では実施例1に記載した場合と同様に核酸から構成される生体ポリマの立体構造解消と塩基分離度の向上において効果が発揮される。本実施例では並列して計測を行うことができるため、高い解析精度を保持したまま、非常に高いスループットで生体ポリマのモノマ配列解析を行うことが可能となる。

30

【0063】

(実施例3)

図6は、本発明に係る分析デバイスの別の実施形態の構成図の一例を示す。

生体ポリマ計測用の薄膜は、薄膜両側の溶液間の電位差に影響を受けやすく、電位差により壊れてしまう可能性がある。特に、ノイズ電流を低減するために分析デバイスの静電容量を下げるようにした場合、薄膜が壊れやすくなってしまふ。この薄膜破壊現象は薄膜両側の溶液槽に個別に溶液を入れると、必ず溶液間に初期電荷差Qが生じるため、分析デバイスの静電容量Cの低減に伴って薄膜にかかる電位差 $V(=Q/C)$ が増幅し、薄膜を絶縁破壊することによって生じる。そこで、この破壊現象を回避するために、薄膜両側にイオン電流測定用の電極とは別に2つの電極を新たに1対配置することによって、上記電荷差を低減して薄膜破壊を防ぐことが可能になる。図6では図1の構成に上記電荷差低減用の2つの電極620を追加した構成図を示した。2つの電極620は配線608によって電氣的に接続されている。この構成の詳細は、例えばMatsui, K., et al., Scientific Reports 5, 17819, 2015に記載されている。

40

【0064】

溶液は実施例1にて言及したものと同一の内容を用いればよい。本実施例でも実施例1に記載した場合と同様に核酸から構成される生体ポリマの立体構造解消と塩基分離度の向

50

上において効果が発揮される。

【0065】

(実施例4)

図7は、本発明に係る分析デバイスの別の実施形態の構成図の一例を示す。

図7は、図5の構成に共通槽の開口部721と基板722、及び基板位置の駆動機構723が追加された構成を示している。生体ポリマは基板722に固定化され、外部制御システムを介して駆動機構723によってナノポア103に対する測定対象物の相対位置を任意かつ精密に制御することができる。駆動機構としては piezo素子やモーターが好ましい。又は原子間力顕微鏡のようにカンチレバーに測定対象物を固定化して駆動してもよい。上記のような構成はたとえば文献(E.M. Nelson, et al., ACS Nano, 8(6), 5484, 2014)に記載されている。測定対象物が核酸から構成される生体ポリマである場合、モノマ配列解析を行うためには1モノマごとに精密に生体ポリマを動かすことが好ましい。溶液は実施例1にて言及したものと同一の内容を用いればよい。本実施例でも実施例1に記載した場合と同様に核酸から構成される生体ポリマの立体構造解消と塩基分離度の向上において効果が発揮される。本実施例の構成により精密な測定対象物の制御が可能となり、測定精度が向上する。

10

【0066】

(実施例5)

本発明に係る測定試薬又は分析デバイスを用いて生体ポリマを分析する手順の一例について以下記載する。ここで、本発明の分析方法は、核酸から構成される生体ポリマを分析する方法であって、pHがグアニン塩基のpKa以上であり、電解質のカチオンとしてセシウムイオンを含む測定溶液中で、核酸から構成される生体ポリマを薄膜に開孔したナノポアに通過させる工程、電気的信号の変化から前記生体ポリマを分析する工程を含むことを特徴とする分析方法である。

20

【0067】

前記分析方法を用いることによって、核酸から構成される生体ポリマ中の核酸モノマを配列決定することが出来る。生体ポリマがナノポアを通過する際に塩基種別によって電気的信号が変化するため、その電気的信号のパターンによって配列決定を行うことが可能となる。このような方法の詳細は、例えば文献(A.H. Laszlo, et al., Nat. Biotechnol. 32, 829, 2015)に開示されている。

30

【0068】

また前記分析方法を用いることによって電気的信号パターンの信号変化総数から生体ポリマの長さを決定することができる。別の用途としては、生体ポリマがナノポアを通過した総数によって溶液中に含まれる生体ポリマの数を決定することも可能である。

【0069】

なお、本発明は上記した実施例に限定されるものではなく、様々な変形例が含まれる。例えば、上記した実施例は本発明のより良い理解のために詳細に説明したのであり、必ずしも説明の全ての構成を備えるものに限定されものではない。また、ある実施例の構成の一部を他の実施例の構成に置き換えることが可能であり、また、ある実施例の構成に他の実施例の構成を加えることが可能である。また、各実施例の構成の一部について、他の構成の追加・削除・置換をすることが可能である。

40

【0070】

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

【符号の説明】

【0071】

101 溶液

102 槽

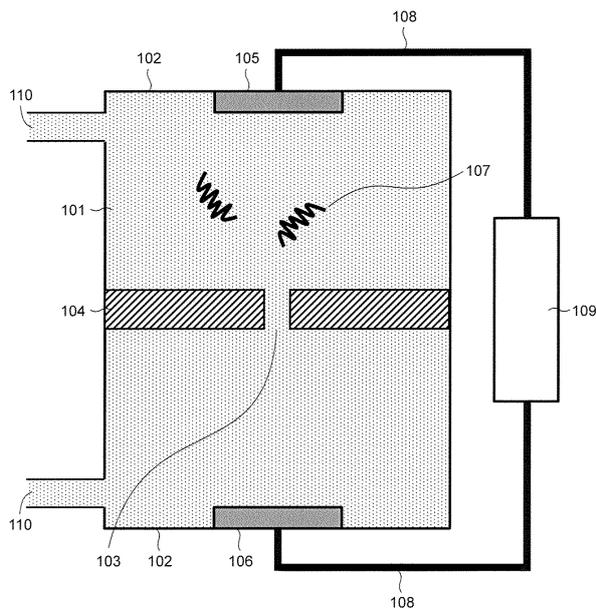
103 ナノポア

104 薄膜

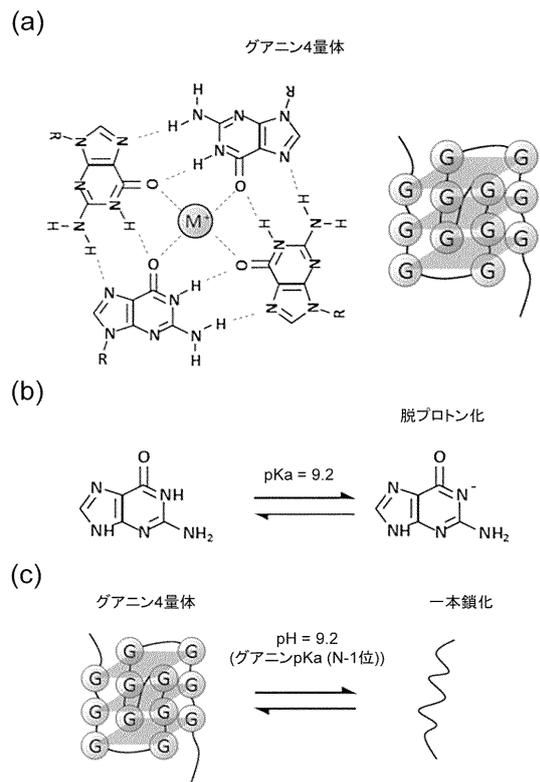
50

- 105, 106 電極
- 107 生体ポリマ
- 108 配線
- 109 測定システム
- 110 導入口
- 511 個別槽
- 512 共通槽
- 513 個別電極
- 514 共通電極
- 515 電極基板
- 516 配線基板
- 517 独立配線
- 518 データ処理基板
- 519 隔壁
- 608 配線
- 620 電極
- 721 開口部
- 722 基板
- 723 駆動機構

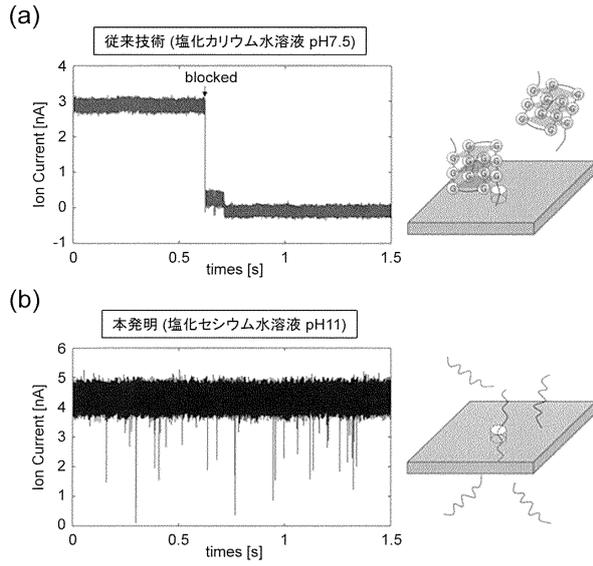
【図1】



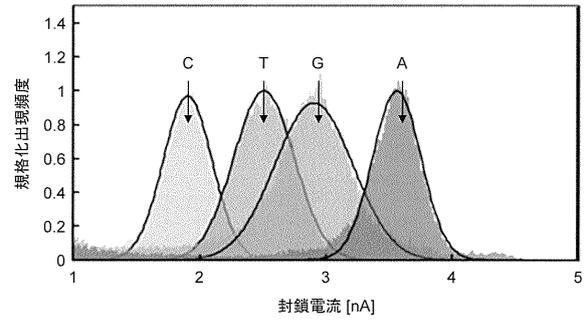
【図2】



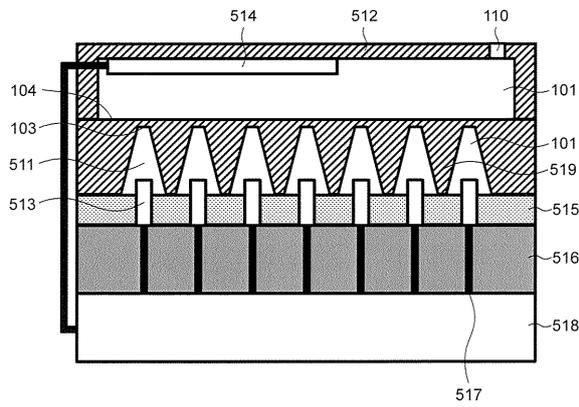
【 図 3 】



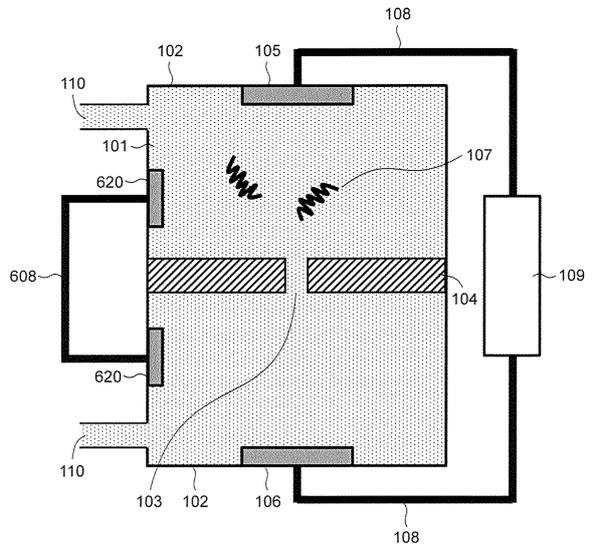
【 図 4 】



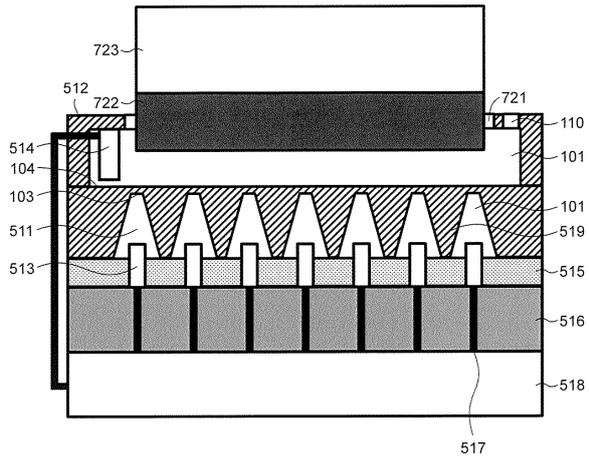
【 図 5 】



【 図 6 】



【図 7】



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2006-113057(JP,A)  
米国特許出願公開第2005/0095599(US,A1)  
特表2015-514128(JP,A)  
国際公開第2015/068673(WO,A1)  
VENTA K ET AL. , Differentiation of short, single-stranded DNA homopolymers in solid-state nanopores , ACS NANO , 2013年 5月28日 , Vol. 7, No. 5 , pages 4629 - 4636

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/48 - 33/98  
G01N 37/00