(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7079092号
(P7079092)

(45)発行日　令和4年6月1日(2022.6.1)

(24)登録日　令和4年5月24日(2022.5.24)

(51)国際特許分類		FI		
G01N 33/543 (2006.01)		G01N	33/543	501A
G01N 33/53 (2006.01)		G01N	33/543	525U
G01N 37/00 (2006.01)		G01N	33/53	U
G01N 33/483 (2006.01)		G01N	37/00	101
G01N 27/00 (2006.01)		G01N	33/483	E

請求項の数　12　（全179頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-551602(P2017-551602)
(86)(22)出願日　平成28年4月2日(2016.4.2)
(65)公表番号　特表2018-511805(P2018-511805A)
(43)公表日　平成30年4月26日(2018.4.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/025787
(87)国際公開番号　WO2016/161402
(87)国際公開日　平成28年10月6日(2016.10.6)
審査請求日　平成31年4月2日(2019.4.2)
(31)優先権主張番号　62/142,872
(32)優先日　平成27年4月3日(2015.4.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/278,303
(32)優先日　平成28年1月13日(2016.1.13)
最終頁に続く

(73)特許権者　391008788
アボット・ラボラトリーズ
ＡＢＢＯＴＴ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＩＥＳ
アメリカ合衆国 イリノイ州 アボツト パーク アボツト パーク ロード １００
(74)代理人　100094569
弁理士　田中 伸一郎
(74)代理人　100088694
弁理士　弟子丸 健
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田 和彦
(74)代理人　100084663
箱田 篤
(74)代理人　100093300
弁理士　浅井 賢治
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　サンプル分析のためのデバイスおよび方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって、

マイクロ流体モジュール、ここで、前記マイクロ流体モジュールは、その上に配置された液滴上に電気アクチュエーション力を生成するための電極のアレイを含む第１の基板を含む；および

マイクロ流体モジュールと流体的に連通され、層中の少なくとも１つのナノポアを含むナノポアモジュール、ここで、前記ナノポアモジュールは単一分子をカウントするように構成される；

を含み、

マイクロ流体モジュールが少なくとも１つのナノポアに液滴を導入するように構成される、該デバイス。

【請求項２】

前記ナノポアが固体ナノポアまたは生体ナノポアである、請求項１に記載のデバイス。

【請求項３】

前記マイクロ流体モジュールが、電気力、エレクトロウェッティング、誘電泳動、電極媒介性、オプト－エレクトロウェッティング、電界媒介性、静電アクチュエーション、圧力、および弾性表面波からなる群から選択される流体操作力により前記液滴を動かすように構成される、請求項１に記載のデバイス。

【請求項４】

前記マイクロ流体モジュールが、
第１の基板から離れて置かれた第２の基板
を更に含み、
アレイ中の第１の電極がアノードを形成し、アレイ中の第２の電極がカソードを形成して、ナノポアを介して電流を駆動する、
請求項１に記載のデバイス。
【請求項５】
前記ナノポアが、第１の基板および第２の基板の少なくとも１つに添付されたナノポア層中に配置され、かつ、前記第１の電極および第２の電極が前記ナノポア層に接する、請求項４に記載のデバイス。
【請求項６】
前記第１の基板および第２の基板の少なくとも１つが実質的に透明である、請求項４に記載のデバイス。
【請求項７】
前記アレイ中の電極がグリッドパターンで配置される、請求項４に記載のデバイス。
【請求項８】
前記アレイ中の電極が　　型である、請求項４に記載のデバイス。
【請求項９】
前記マイクロ流体モジュールが、弾性表面波（ＳＡＷ）生成材料の層を含む、請求項１に記載のデバイス。
【請求項１０】
前記マイクロ流体モジュール上に配置され、かつ、前記液滴により保有されるように構成される少なくとも１つの試薬を更に含む、請求項１に記載のデバイス。
【請求項１１】
前記試薬が、結合メンバー、切断可能なタグ、およびその組み合わせからなる群から選択される、請求項１０に記載のデバイス。
【請求項１２】
前記切断可能なタグが、陰イオン性ポリマー、陽イオン性ポリマー、デンドリマー、またはナノ粒子を含み、前記結合メンバーが、抗体または受容体を含む、請求項１１に記載のデバイス。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の相互参照）
本出願は、２０１５年４月３日に出願された米国特許仮出願第６２／１４２，８７２号、２０１６年１月１３日に出願された第６２／２７８，３０３号、および２０１６年１月１５日に出願された第６２／２７９，４８８号の利益を主張し、それらの出願はそれら全体の参照によって本明細書に援用される。
【０００２】
（技術分野）
本開示は、例えばマイクロ流体デバイスと作動可能にカップリングされたナノポアデバイスを使用する検体分析のための方法、デバイス、およびシステムに関する。
【背景技術】
【０００３】
サンプル中で対象となる検体（複数可）を正確に分析することができる方法およびデバイスは、診断、予後、環境アセスメント、食品安全性、化学兵器または生物兵器の検出、および同種のものにとって不可欠である。かかる方法およびデバイスは、微小のサンプルが迅速且つ最小の装置類により分析される場合に、正確、精密、および高感度である必要があるだけではなく、有利でもある。それゆえ、改善されたサンプル分析能力を備えた方法およびデバイスに対する関心がある。

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】
本開示の実施形態は、サンプル中の検体（複数可）の分析のための方法、システム、およびデバイスに関する。ある特定の実施形態において、サンプルは生物学的サンプルとすることができる。
【０００５】
サンプル中の検体の分析のための方法は、第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがそれへ添付された切断可能なタグを含むところで、固体支持体を第２の結合メンバーと接触させること；第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されない第２の結合メンバーを除去すること；第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されている第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；切断されたタグを層中のナノポアを介してまたは横切って移動させること；層を介して移動するタグの数を決定すること；層を介して移動するタグの数に基づいてサンプル中の検体の濃度を決定することを包含し得る。ある特定の実施形態において、検体の濃度は、単位時間あたりの層を介して移動するタグの数のカウントによって決定され得る。他の実施形態において、検体の濃度は、層を介して移動するタグの数が閾値に到達する時間を決定することによって、または時間の期間を設定し、設定された時間の期間でのカウントの累積数をカウントすることによって、決定され得る。
【０００６】
別の実施形態において、本方法は、標的検体を含有するサンプルを既知の量の標的検体または競合分子と組み合わせることを包含することができ、そこで標的検体（サンプルと組み合わせられた）または競合分子が切断可能なリンカー経由でタグへ添付されて、それぞれタグ付けされた検体またはタグ付けされた競合分子を産生し、タグ付けされた検体またはタグ付けされた競合分子が標的検体と第１の結合メンバーへの結合を競合する。本方法は、第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが標的検体へ（およびタグ付けされた検体またはタグ付けされた競合分子へ）特異的に結合するところで、組み合わせられたサンプルを第１の結合メンバーと接触させること；随意の洗浄ステップのために固体支持体をバッファーと接触させること；固体支持体上で固定化される第１の結合メンバーへ結合されているタグ付けされた検体またはタグ付けされた競合物へ添付されたタグを切断すること；切断されたタグを層中のナノポアを介してまたは横切って移動させること；層を介して移動するタグの数を決定すること；層を介して移動するタグの数に基づいてサンプル中の検体の濃度を決定することを更に包含することができる。ある特定の実施形態において、検体の濃度は、単位時間あたりの層を介して移動するタグの数のカウントによって決定され得る。他の実施形態において、検体の濃度は、層を介して移動するタグの数が閾値に到達する時間を決定することによって、または時間の期間を設定し、設定された時間の期間でのカウントの累積数をカウントすることによって、決定され得る。この実施形態において、ナノポアを介して移動するタグの数、または層を介して移動するタグの数が閾値に到達する時間は、サンプル中の検体の濃度に逆相関し得る。例えば、カウントが低いほど、または閾値への到達のための時間的な期間が長いほど、サンプル中の標的検体の濃度は高い。
【０００７】
一態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法に関する。本発明は、第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがそれへ添付された切断可能なタグを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること；第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されない第２の結合メンバーを除去すること

；第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されている第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；切断されたタグを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの測定は査定され、そこで層を介して移動するタグの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの検出は査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【０００８】

一態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法に関する。本方法は、第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがアプタマーを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること；固体基板へ結合されている検体へ結合されないアプタマーを除去すること；検体へ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含む。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの測定は査定され、そこで層を介して移動するアプタマーの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの検出は査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【０００９】

一態様において、本発明は、電極のアレイを含む底部基板；底部基板から離れて置かれた上部基板；および底部基板と上部基板との間に配置されたナノポア層を含む、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスに関する。デバイスは近位部分および遠位部分を含み、ナノポア層は遠位部分中に配置される。近位部分中の電極のアレイは小滴を生成するように構成される。電極のアレイは小滴をナノポア層を横切って位置させるように構成され、その結果、小滴はナノポア層によって第１の部分および第２の部分へと分割され、そこで電極のアレイのうちの少なくとも２つの電極がナノポア層を横切って位置し、２つの電極がアノードおよびカソードを形成し、そして液滴がナノポア層を横切って位置する場合にナノポア層中のナノポアを介する電流を駆動するように作動する。

【００１０】

一態様において、本発明は、電極のアレイを含む底部基板；底部基板から離れて置かれ、電極を含む上部基板；および底部基板と上部基板との間に配置されたナノポア層を含む、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスに関する。デバイスは近位部分および遠位部分を含み、ナノポア層は遠位部分中に配置される。近位部分中の電極のアレイおよび電極は、小滴を生成するように構成される。電極のアレイおよび電極はナノポア層を横切って小滴を位置させるように構成され、その結果、ナノポア層は小滴を第１の部分および第２の部分へと分割し、そこで電極のアレイのうちの少なくとも１つの電極がナノポア層を横切って位置する小滴の第１の部分と接触し、上部基板中の電極がナノポア層を横切って位置する小滴の第２の部分に接触するように位置し、２つの電極がアノードおよびカソードを形成し、そして液滴がナノポア層を横切って位置する場合にナノポア層中のナノポアを介する電流を駆動するように作動する。

【００１１】

一態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法に関する。本方法は、結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；標識検体が切

断可能なタグにより標識されるところで、サンプル（それは結合メンバーへ結合されている検体を含有し得る）を標識検体と接触させること；結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること；切断されたタグを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの測定は査定され、そこで層を介して移動するタグの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの検出は査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【００１２】

一態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法に関する。本方法は、結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；標識検体がアプタマーを含むところで、サンプル（それは結合メンバーへ結合されている検体を含有し得る）を標識検体と接触させること；結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；結合メンバーへ結合されている標識検体へ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含む。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの測定は査定され、そこで層を介して移動するアプタマーの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの検出は査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【００１３】

一態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法に関する。本方法は、結合メンバーが検体へ特異的に結合し、結合メンバーが切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプル（それは結合メンバーへ結合されている検体を含有し得る）を固定化検体と接触させること；固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること；固定化検体へ結合されている結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；切断されたタグを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの測定は査定され、そこで層を介して移動するタグの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグは査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【００１４】

一態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法に関する。本方法は、結合メンバーが検体に特異的に結合し、結合メンバーがアプタマーを含むところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプル（それは結合メンバーへ結合されている検体を含有し得る）を固定化検体と接触させること；固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること；固定化検体へ結合されている結合メンバーへ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検

体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含む。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの測定は査定され、そこで層を介して移動するアプタマーの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの検出は査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【００１５】

ある特定の態様において、タグは、陰イオン性ポリマー、陽イオン性ポリマー、またはナノ粒子であり得る。ある特定の事例において、タグは陰イオン性ポリマー（オリゴヌクレオチドポリマー等）を含み得る。ある特定の事例において、オリゴヌクレオチドポリマーはデオキシリボ核酸またはリボ核酸であり得る。ある特定の事例において、オリゴヌクレオチドポリマーはＤＮＡアプタマーまたはＲＮＡアプタマーであり得、そこでアプタマーは検体に結合しない。例示的な事例において、タグは、正に荷電されたナノ粒子または負に荷電されたナノ粒子であり得るナノ粒子を含み得る。

【００１６】

ある特定の実施形態において、タグは、球状タグ（デンドリマー、ビーズ、ナノ粒子、例えばナノビーズ、および同種のもの等）であり得る。ある特定の実施形態において、タグは、直線状もしくは実質的に直線状または細長い形状（リボース単位またはデオキシリボース単位、オリゴヌクレオチド、および核酸のポリマー、例えばＤＮＡまたはＲＮＡ等）でなくてもよい。

【００１７】

ある特定の事例において、第１の結合メンバーおよび第２の結合メンバーは、アプタマー、抗体または受容体であり得る。例えば、第１の結合メンバーは受容体であり、第２の結合メンバーは抗体であり得るか、または第１の結合メンバーは抗体であり、第２の結合メンバーは受容体であり得る。ある特定の実例において、第１の結合メンバーは第１の抗体であり得、第２の結合メンバーは第２の抗体であり得る。

【００１８】

ある特定の実例において、タグは負に荷電され、移動は、層を横切る正電位を適用すること、および、それによって、層を横切ってタグを移動させることを包含することができる。

【００１９】

ある特定の実例において、タグは正に荷電され、移動は、層を横切る負電位を適用すること、および、それによって、層を横切ってタグを移動させることを包含することができる。

【００２０】

他の実施形態において、タグは核酸であり、タグは、移動の前にタグの配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドへハイブリダイズされ得る。

【００２１】

別の実施形態において、第２の結合メンバーとしてアプタマーを使用することによって生物学的サンプル中に存在する検体を測定する方法が提供される。例えば、本方法は、第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがアプタマーを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること；固体基板へ結合されている検体へ結合されないアプタマーを除去すること；アプタマーを固体基板へ結合されている検体から解離し、解離されたアプタマーを層中のナノポア（複数可）を介して移動させること；層を介して移動するアプタマーの数を決定すること；層を介して移動するアプタマーの数に基づいてサンプル中の検体を測定することを包含することができる。この実施形態において、第２の結合メンバーがナノポア（複数可）によって直接検出されるので、第２の結合メンバーはタグへ添付されていない。

【００２２】

アプタマーはＤＮＡアプタマーまたはＲＮＡアプタマーであり得る。第１の結合メンバー

は抗体であり得る。ある特定の実例において、検体はリガンドであり、第１の結合メンバーは受容体であり得る。

【００２３】

サンプル中の複数の異なる検体を同時に分析する方法も本明細書において開示され、例えば、本方法は、第１の検体および第２の検体；第１の検体、第２の献体、および第３の検体；などの分析を包含することができる。ある特定の事例において、サンプル中の複数の異なる検体の分析のための方法は、サンプルを複数の異なる第１の結合メンバーと接触させることを包含することができ、そこで異なる第１の結合メンバー（複数）のうちの第１の結合メンバー（単数）が複数の異なる検体のうちの第１の検体（単数）へ特異的に結合する、異なる第１の結合メンバー（複数）のうちの第２の結合メンバー（単数）が複数の異なる検体のうちの第２の検体（単数）へ特異的に結合する、などである。本方法は、異なる検体を複数の第２の結合メンバーと接触させることを更に包含することができ、そこで複数の第２の結合メンバーのうちの第１の結合メンバー（単数）が第１の検体へ結合する、複数の第２の結合メンバーのうちの第２の結合メンバー（単数）が第２の検体へ結合する、などである。ある特定の実例において、複数の異なる第２の結合メンバーの各々は、互いに別個のまたは識別可能なタグを含み得る（例えば、異なる第２の結合メンバーの各々は異なるタグを有する）。例えば、複数の第２の結合メンバーのうちの第１の結合メンバー（単数）は第１のタグを含み得る、複数の第２の結合メンバーのうちの第２の結合メンバー（単数）は第２のタグを含み得る、などであり、そこで第１のタグおよび第２のタグが互いに識別可能である。タグの識別は、例えばタグの性質または特徴的特性に基づく任意の好適な方法を使用して行うことができる。

【００２４】

本方法は、未結合の第２の結合メンバーを除去すること；検体へ結合されている複数の第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；タグを層中のナノポアを介して移動させること；層を介して移動する各々のタグの数を決定すること；層を介して移動する各々のタグの数に基づいてサンプル中の複数の異なる検体を測定することを更に包含することができる。ある特定の実施形態において、検体の濃度は、単位時間あたりの層を介して移動するタグの数のカウントによって決定され得る。他の実施形態において、検体の濃度は、層を介して移動するタグの数が閾値に到達する時間の決定によって決定され得る。本明細書において指摘されるように、ある特定の事例において、第２の結合メンバーは複数のアプタマーであり得、アプタマーがカウントされるので、これらのアプタマーはタグへ添付されていない。これらの実施形態において、アプタマーはナノポア（複数可）を介してまたは横切って移動する前に検体から解離され得る。

【００２５】

ある特定の事例において、異なるタグ（異なるアプタマー等）は、ナノポア力分光法（ｎａｎｏｐｏｒｅ　ｆｏｒｃｅ　ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ）、光学的手段もしくは電気的手段またはその組み合わせによって互いに識別可能であり得る。

【００２６】

開示される方法を実行するためのキット、システムおよびデバイスも本明細書において提供される。キット、システムおよびデバイスを使用して自動化または半自動化された様式で検体分析を実行することができ、それらは検体分析のために利用される使い捨ての／消費可能な構成要素を随意に含むことができる。自動化および半自動化されたデバイスはマイクロ流体を利用することができる。例示的なマイクロ流体には、デジタルマイクロ流体（ＤＭＦ）、弾性表面波（ＳＡＷ）マイクロ流体、小滴ベースのマイクロ流体デバイス、および同種のものが含まれる。例示的なマイクロ流体には、完全集積ＤＭＦおよびナノポアデバイス、または完全集積ＳＡＷおよびナノポアデバイスも含まれる。ある特定の事例において、開示される方法を実行するためのデバイスは、ナノポアデバイスと併用して使用されるデジタルマイクロ流体デバイスであり得る。他の実施形態において、開示される方法を実行するためのデバイスは、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであり得る。これらのデバイスは一回のみ使用のデバイスであり得るかまたは再使用可能（検体分

析のために複数回使用される）であり得る。本明細書において記載されるデジタルマイクロ流体およびナノポアデバイスは小型化された低費用の検体分析を提供し、低費用の技術を使用して製作することができる。

【００２７】

マイクロ流体モジュールおよびナノポアモジュールを含む、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって；マイクロ流体モジュールが少なくとも電極のアレイの一部分とオーバーラップするようにサイズ合わせされた単一電極から離れて置かれた電極のアレイを含み、そこで電極のアレイおよび単一電極が少なくとも１つの流体の小滴を電極のアレイ中の転送電極へ輸送し、転送電極がマイクロ流体モジュールおよびナノポアモジュールを作動可能にカップリングするインターフェースに位置し；ナノポアモジュールが第１の基板の第１の表面上に位置する第１のマイクロチャンネル；第２の基板の第１の表面上に位置する第２のマイクロチャンネルを含み；そこで第１の基板の第１の表面が第２の基板の第１の表面と接触し、それによって、第１のマイクロチャンネルおよび第２のマイクロチャンネルを囲んで、それぞれ第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルを提供し、少なくとも第１のキャピラリーチャンネルがマイクロ流体モジュールとナノポアモジュールとの間のインターフェースへ延長し、転送電極に隣接し、転送電極上に位置する流体小滴を受け取るように位置し；そこで第１のキャピラリーチャンネルが第２のキャピラリーチャンネルと交差し、ナノポア層が、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルが交差する場所で第１の基板と第２の基板との間に位置する、該デバイスも本明細書において開示される。

【００２８】

ある特定の実施形態において、電極のアレイは第１の転送電極および第２の転送電極を含むことができ、その各々の転送電極は転送電極の表面の上にわたって流体小滴を位置させるように構成され、そこで第１のキャピラリーチャンネルがマイクロ流体モジュールとナノポアモジュールとの間のインターフェースへ延長し、第１の転送電極に隣接し、第１の転送電極上に所在する流体小滴を受け取るように位置し、第２のキャピラリーがマイクロ流体モジュールとナノポアモジュールとの間のインターフェースへ延長し、第２の転送電極に隣接し、第２の転送電極上に所在する流体小滴を受け取るように位置する。

【００２９】

ある特定の実施形態において、第２のキャピラリーチャンネルはインターフェースへ延長せず、マイクロ流体モジュールの電極へ接続されず、第２のキャピラリーの１つまたは両方の端部上でベントまたはリザーバーへ接続され得る。ある特定の事例において、第２のキャピラリーは１つの端部で第１のリザーバーおよび他の端部で第２のリザーバーへ接続される。

【００３０】

ある特定の実施形態において、第１のリザーバーおよび／または第２のリザーバーは、交差で第１のキャピラリーチャンネルに向かいあって位置する流体を含み、その流体はナノポア層のナノポアを介する電流を駆動するようにナノポア層の作動を促進する。ある特定の実施形態において、第１のキャピラリーチャンネルおよび／または第２のキャピラリーチャンネルは、交差のいずれかの側面での幅と比較して、幅が交差で減少するように、キャピラリーの長さを横切る横断面の幅で変動する。

【００３１】

いくつかの実施形態において、第１のキャピラリーは第１のペアの電極を含み、第２のキャピラリーは第２のペアの電極を含み、そこで第１のペアの電極が第１のキャピラリーチャンネル中に位置し、ナノポア層中のナノポアに接し、第２のペアの電極が第２のキャピラリーチャンネル中に位置し、ナノポア層中のナノポアに接する。小滴は、ナノポア層中のナノポアを介して輸送されることによって検出および／またはカウントされる分子を含む小滴であり得る。

【００３２】

ある特定の実施形態において、流体小滴は異なる組成物を有し、それらは第１の小滴およ

び第２の小滴であり、第１の小滴はナノポアを介してナノポア層を横切って輸送することによって検出および／またはカウントされる分子を含み、第２の小滴は分子を欠損する伝導性流体を含み、そこで伝導性流体がナノポア経由でナノポア層を横切る分子の輸送を促進する。

【００３３】

ある特定の実施形態において、第１のキャピラリーチャンネルはナノポア層に近位に位置する第１の電極を含み、第２のキャピラリーチャンネルはナノポア層に近位に位置する第２の電極を含み、そこでそれらがキャピラリーチャンネル中に存在する流体と接触するように、第１の電極および第２の電極の各々はキャピラリーチャンネル中で曝露され、第１の電極および第２の電極が、液体が第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネル中のナノポア層を横切って位置する場合に、ナノポア層中のナノポアを介する電流を駆動するように作動する。

【００３４】

ある特定の実施形態において、転送電極および第１のキャピラリーチャンネルは実質的に同じ平面上にあり、そこで流体小滴が第１のキャピラリーチャンネルの開口部と整列される。

【００３５】

いくつかの実施形態において、転送電極は第１のキャピラリーチャンネルよりも高い平面にあり、そこでデバイスが、第１のキャピラリーチャンネルの開口部まで流体小滴を転送するための垂直ポートを備えて構成される。

【００３６】

特定の実施形態において、第１の基板の第１の表面は、電極のアレイが配置される第１の領域および第１のマイクロチャンネルが形成される第２の領域を含み、そこで電極のアレイが、第１のマイクロチャンネルが形成される平面よりも高い平面上にある。

【００３７】

いくつかの実施形態において、第２の基板はインターフェースに所在する側面端部でノッチを含み、そこでノッチが第１のキャピラリーチャンネルの上にわたって整列し、転送電極に所在する小滴を第１のキャピラリーチャンネルの開口部へ輸送するための垂直ポートを提供する。

【００３８】

いくつかの事例において、単一電極は転送電極の上にわたって延長し、転送電極と２平面の立体配置であり、そこで単一電極および転送電極が転送電極へ流体小滴を動かすように作動する。

【００３９】

他の事例において、単一電極は転送電極（複数）の上にわたって延長し、転送電極（複数）と２平面の立体配置であり、そこで単一電極および転送電極（複数）が転送電極へ流体小滴（複数）を動かすように作動する。

【００４０】

ある特定の実施形態において、単一電極は転送電極の上にわたって延長せず、転送電極と２平面の立体配置でなく、そこで流体小滴が共面電極の使用によって転送電極へ動く。

【００４１】

ある特定の実施形態において、単一電極は転送電極（複数）の上にわたって延長せず、転送電極（複数）と２平面の立体配置でなく、そこで流体小滴（複数）が共面電極の使用によって転送電極（複数）へ動く。

【００４２】

したがって、本明細書において記載されるようなデバイス、キット、システムおよび方法を使用して、生物学的サンプル中に存在する検体を測定することができ、患者を診断することができる。

【００４３】

別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する

方法であって、（ａ）第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること、（ｂ）第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがそれへ添付された切断可能なタグを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること、（ｃ）第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されない第２の結合メンバーを除去すること、（ｄ）第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されている第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること、（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｆ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法に関する。

【００４４】

別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出する方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、第１の特異的な結合メンバーが固定化剤のためのリガンドを含み、第１の特異的な結合メンバーが対象となる検体を特異的に結合し、第２の特異的な結合メンバーが切断可能なタグを含み、第２の特異的な結合メンバーが対象となる検体を特異的に結合し、固体支持体／第１の特異的な結合メンバー／対象となる検体／第２の特異的な結合メンバーの複合体が形成されるところで、サンプルを固体支持体、第１の特異的な結合メンバーおよび第２の特異的な結合メンバーと接触させること、（ｂ）固体支持体／第１の特異的な結合メンバー／検体／第２の特異的な結合メンバーの複合体へ結合されない第２の特異的な結合メンバーを除去すること、（ｃ）固体支持体／第１の特異的な結合メンバー／対象となる検体／第２の特異的な結合メンバーの複合体中の第２の特異的な結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること、（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｅ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法に関する。

【００４５】

別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法であって、（ａ）第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること、（ｂ）第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがアプタマーを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること、（ｃ）固体基板へ結合されている検体へ結合されないアプタマーを除去すること、（ｄ）検体へ結合されているアプタマーを解離すること、（ｅ）解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｆ）層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含む、該方法に関する。

【００４６】

一態様において、本発明は、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって、電極のアレイを含む第１の基板；第１の基板から離れて置かれた第２の基板；および第１の基板と第２の基板との間に配置されたナノポア層を含み、そこで電極のアレイが小滴をナノポア層を横切って位置させるように構成され、その結果、小滴がナノポア層によって第１の部分および第２の部分へと分割され、電極のアレイのうちの少なくとも２つの電極がナノポア層を横切って位置し、２つの電極がアノードおよびカソードを形成し、そして液滴がナノポア層を横切って位置する場合にナノポア層中のナノポアを介する電流を駆動するように作動する、該デバイスに関する。

【００４７】

なお別の態様において、本発明は、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって

、電極のアレイを含む第１の基板；第１の基板から離れて置かれた第２の基板；および第１の基板と第２の基板との間に配置されたナノポア層を含み、そこで電極のアレイが小滴をナノポア層を横切って位置させるように構成され、その結果、ナノポア層が小滴を第１の部分および第２の部分へと分割し、電極のアレイのうちの少なくとも１つの電極がナノポア層を横切って位置する小滴の第１の部分と接触し、第２の基板中の電極がナノポア層を横切って位置する小滴の第２の部分に接触するように位置し、２つの電極がアノードおよびカソードを形成し、そして液滴がナノポア層を横切って位置する場合にナノポア層中のナノポアを介する電流を駆動するように作動する、該デバイスに関する。

【００４８】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出するための方法であって、（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること、（ｂ）標識検体が切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを標識検体と接触させること、（ｃ）結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること、（ｄ）結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること、（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｆ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法に関する。

【００４９】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法であって、（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること、（ｂ）標識検体がアプタマーを含むところで、サンプルを標識検体と接触させること；（ｃ）結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること、（ｄ）標識検体へ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｅ）層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含む、該方法に関する。

【００５０】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出するための方法であって、（ａ）結合メンバーが検体へ特異的に結合し、結合メンバーが切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを結合メンバーと接触させること、（ｂ）固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプルを固定化検体と接触させること、（ｃ）固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること、（ｄ）固定化検体へ結合されている結合メンバーへ添付されたタグを切断すること、（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｆ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法に関する。

【００５１】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出するための方法であって、（ａ）結合メンバーが検体に特異的に結合し、結合メンバーがアプタマーを含むところで、サンプルを結合メンバーと接触させること、（ｂ）固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプルを固定化検体と接触させること、（ｃ）固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること、（ｄ）固定化検体へ結合されている結合メンバーへ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｅ）層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して

移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含む、該方法に関する。

【００５２】

なお別の態様において、本発明は、マイクロ流体モジュールおよびナノポアモジュールを含む、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって；マイクロ流体モジュールが電極のアレイを含み、そこで電極のアレイが少なくとも１つの流体の小滴を電極のアレイ中の第１の転送位置へ輸送し、第１の転送位置がマイクロ流体モジュールとナノポアモジュールとの間のインターフェースにあり；ナノポアモジュールが以下の：第１のキャピラリーチャンネル；および第２のキャピラリーチャンネルを含み；そこで少なくとも第１のキャピラリーチャンネルがインターフェースへ延長し、第１の転送位置へ隣接し、第１の転送位置に位置する流体小滴を受け取るように位置し；そこで第１のキャピラリーチャンネルが第２のキャピラリーチャンネルと交差し、ナノポア層が、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルが交差する場所で第１のキャピラリーチャンネルと第２のキャピラリーチャンネルとの間に位置する、該デバイスに関する。

【００５３】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定するための方法であって、（ａ）第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること、（ｂ）第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがそれへ添付された切断可能なタグを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること、（ｃ）第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されない第２の結合メンバーを除去すること、（ｄ）第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されている第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること、（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｆ）層を介する各々のタグの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するタグを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法に関する。

【００５４】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定するための方法であって、（ａ）第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること、（ｂ）第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがアプタマーを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること、（ｃ）固体基板へ結合されている検体へ結合されないアプタマーを除去すること、（ｄ）検体へ結合されているアプタマーを解離すること、および（ｅ）解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｆ）各々のアプタマーの層を介する移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照

へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法に関する。

【００５５】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定するための方法であって、（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること、（ｂ）標識検体が切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを標識検体と接触させること、（ｃ）結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること、（ｄ）結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること、（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｆ）層を介する各々のタグの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するタグを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法に関する。

【００５６】

別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定するための方法であって、（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること、（ｂ）標識検体がアプタマーを含むところで、サンプルを標識検体と接触させること、（ｃ）結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること、（ｄ）標識検体へ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｅ）各々のアプタマーの層を介する移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法に関する。

【００５７】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定するための

方法であって、（ａ）結合メンバーが検体へ特異的に結合し、結合メンバーが切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを結合メンバーと接触させること、（ｂ）固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプルを固定化検体と接触させること、（ｃ）固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること、（ｄ）固定化検体へ結合されている結合メンバーへ添付されたタグを切断すること、（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｆ）層を介する各々のタグの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するタグを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法に関する。

【００５８】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定するための方法であって、（ａ）結合メンバーが検体に特異的に結合し、結合メンバーがアプタマーを含むところで、サンプルを結合メンバーと接触させること、（ｂ）固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプルを固定化検体と接触させること、（ｃ）固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること、（ｄ）固定化検体へ結合されている結合メンバーへ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｅ）各々のアプタマーの層を介する移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法に関する。

【００５９】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出するための方法であって、（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーがそれへ添付された切断可能なタグを含み、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること、（ｂ）検体へ結合されない結合メンバーを除去すること、（ｃ）検体へ結合されている結合メンバーへ添付されたタグを切断すること、（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること、および（ｅ）層を介する各々のタグの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するタグを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の

数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照である、該方法に関する。

【００６０】

なお別の態様において、本発明は、マイクロ流体モジュールおよびナノポア使用可能（ｎａｎｏｐｏｒｅ－ｅｎａｂｌｅｄ）モジュールを含む、集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイスであって；マイクロ流体モジュールが少なくとも電極のアレイの一部分とオーバーラップするようにサイズ合わせされた単一電極から離れて置かれた電極のアレイを含み、そこで電極のアレイおよび単一電極が少なくとも１つの流体の小滴を電極のアレイ中の転送電極へ輸送し、転送電極がマイクロ流体モジュールとナノポア使用可能モジュールとの間のインターフェースに位置し；ナノポア使用可能モジュールが以下の：第１の基板の第１の表面上に位置する第１のマイクロチャンネル；第２の基板の第１の表面上に位置する第２のマイクロチャンネルを含み；そこで第１の基板の第１の表面が第２の基板の第１の表面と接触し、それによって、第１のマイクロチャンネルおよび第２のマイクロチャンネルを囲んで、それぞれ第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルを提供し、少なくとも第１のキャピラリーチャンネルがマイクロ流体モジュールとナノポア使用可能モジュールとの間のインターフェースへ延長し、転送電極に隣接し、転送電極上に位置する流体小滴を受け取るように位置し；そこで第１のキャピラリーチャンネルが第２のキャピラリーチャンネルと交差し、層が、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルが交差する場所で第１の基板と第２の基板との間に位置し、層がナノポアを欠損し、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネル中に存在するイオン性液体を分離し、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルが、第１のキャピラリーチャンネルから第２のキャピラリーチャンネルへ（またはその逆）電圧を駆動するために電極と電気的に接続し、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルの交差で層中にナノポアを生ずる、該デバイスに関する。

【００６１】

なお別の態様において、本発明は、集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイス中でナノポアを生成する方法であって、これまでに本明細書において記載されるような集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイスを提供すること；層を介する電流を駆動するように第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネル中に電圧を適用すること；層を横切るコンダクタンスを測定すること；層中のナノポアの生成を表すコンダクタンスの検出に際して、電圧の適用を終了することを含む、該方法に関する。

【００６２】

なお別の態様において、本発明は、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって、電極のアレイを含む第１の基板；第１の基板から離れて置かれた第２の基板；ナノポアを含むナノポア層と流体的に連通される第１の基板または第２の基板中の開口部；およびナノポアを介して電界を適用するように構成されたペアの電極を含み、そこで電極のアレイが少なくとも１つの流体の小滴を開口部へ輸送するように構成される、該デバイスに関する。

【００６３】

なお別の態様において、本発明は、ペアの集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって、単一電極が第１の単一電極でありキャピラリーチャンネルが第１のキャピラリーチャンネルである、これまでに本明細書において記載される第１の集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイス；および第２の集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスを、該ペアのデバイスが含み、第２の集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスが、以下の：第５の側面および第５の側面の反対側の第６の側面を含んで第５の側面が電極のアレイを含む、第３の基板；第３の基板から離れて置かれた、第４の基板を含み、そこで第４の基

板が、第３の基板の第５の側面に直面する第７の側面および第７の側面の反対側の第８の側面を含み、第７の側面が第２の単一電極を含み、ナノポア層が第８の側面上に配置され、第４の基板が、第４の基板の第７の側面から第８の側面へ延長する第２のキャピラリーチャンネルを含み、ナノポア層がキャピラリーチャンネルの開口部にわたって位置し、ナノポアが第１のキャピラリーチャンネルと第２のキャピラリーチャンネルとの間の電気浸透導管を提供するように、ナノポア層が第２の基板と第４の基板との間にはさまれ、ペアの検出電極が、第２の単一電極である第２の検出電極を含む、該ペアのデバイスに関する。

【００６４】

なお別の態様において、本発明は、集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイスであって、以下の：第１の側面および第１の側面の反対側の第２の側面を含み、そこで第１の側面が電極のアレイを含む、第１の基板；第１の基板から離れて置かれ、そこで第２の基板が第１の基板の第１の側面に直面する第３の側面および第３の側面の反対側の第４の側面を含む、第２の基板；ナノポアを欠損しデバイスの外部側面上に配置され、そこで外部側面が第２の側面または第４の側面から選択され、外部側面を含む第１の基板または第２の基板のうちの１つが、第１の基板の第１の側面から第２の側面へまたは第２の基板の第３の側面から第４の側面へ延長するキャピラリーチャンネルを含み、ナノポア使用可能層がキャピラリーチャンネルの開口部にわたって位置する、ナノポア使用可能層；およびナノポア使用可能層を横切って電界を適用するように構成され、そこで電極のアレイが少なくとも１つの流体の小滴をキャピラリーチャンネルへ輸送するように構成される、ペアの電極を含む、該デバイスに関する。

【００６５】

なお別の態様において、本発明は、集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイス中でナノポアを生成する方法であって、これまでに本明細書において記載される集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイスを提供すること；層の各々の側面上のイオン性液体がペアの検出電極のうちのいずれか１つと電気的に接触するように、イオン性液体中にナノポア使用可能層の両方の側面を沈めること；層を介する電流を駆動するようにペアの検出電極の間に電圧を適用すること；層を横切るコンダクタンスを測定すること；層中のナノポアの生成を表すコンダクタンスの検出に際して、電圧の適用を終了することを含む、該方法に関する

【００６６】

別の態様において、本発明は、結合メンバー、タグおよびスペーサーを含む組成物に関する。

【００６７】

なお別の態様において、本発明は、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって、電極のアレイを含む第１の基板；第１の基板から離れて置かれた第２の基板；ならびに第１の基板と第２の基板との間に配置された第１の表面および第２の表面を有するナノポア層を含み、そこで電極のアレイが第１の小滴をナノポア層の第１の表面に位置させるように構成され、電極のアレイのうちの少なくとも２つの電極がナノポア層を横切って位置し、２つの電極がアノードおよびカソードを形成し、そして液滴がナノポア層の第１の表面にある場合にナノポア層中のナノポアを介する電流を駆動するように作動する、該デバイスに関する。

【００６８】

なお別の態様において、本発明は、マイクロ流体モジュールおよびナノポアモジュールを含む、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって；マイクロ流体モジュールが電極のアレイを含み、そこで電極のアレイが少なくとも１つの流体の小滴を電極のアレイ中の転送位置へ輸送し、転送位置がマイクロ流体モジュールとナノポアモジュールとの間のインターフェースにあり；ナノポアモジュールが以下の：転送位置からナノポア層へ延長する第１のキャピラリーチャンネルを含む、該デバイスに関する。

【００６９】

なお別の態様において、本発明は、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって

、電極のアレイを含む第１の基板；第１の基板から離れて置かれた第２の基板；１又は２以上のナノポアをその中に有する第１のナノポア層；１又は２以上のナノポアをその中に有する第２のナノポア層；ならびに第１のナノポア層および第２のナノポア層中のナノポアを介してタグを駆動する電界を生ずるための少なくとも２つの電極を含む、該デバイスに関する。

【００７０】

なお別の態様において、本発明は、任意の前述の方法における使用のための任意の前述のデバイスを含むキットに関する。

【００７１】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出するために、または患者を診断もしくは血液供給をスクリーニングするために、任意の前述のデバイスを使用する方法に関する。

【００７２】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出するための方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、結合メンバーが固定化剤のためのリガンドを含み、結合メンバーが対象となる検体を特異的に結合して、固体支持体／結合メンバー／対象となる検体の複合体または固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体のいずれかを形成するところで、サンプルを固体支持体、結合メンバー、および切断可能なタグにより標識される標識検体と接触させること；（ｂ）固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体中の結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；（ｃ）固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体中の結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること；（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法に関する。

【００７３】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出するための方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、外来性検体が固定化剤のためのリガンドを含み、固体支持体／固定化検体の複合体を形成するように固体支持体を結合し、結合メンバーが切断可能なタグを含み、対象となる検体を特異的に結合して、固体支持体／対象となる検体／結合メンバーの複合体または固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体のいずれかを形成するところで、サンプルを固体支持体、結合メンバー、および外来性検体と接触させること；（ｂ）固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体または固体支持体／対象となる検体／結合メンバーの複合体のいずれか中の結合されない結合メンバーを除去すること；（ｃ）固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体中の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法に関する。

【００７４】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出するための方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、結合メンバーが固定化剤のためのリガンドを含み、固体支持体／結合メンバー／対象となる検体の複合体または固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体のいずれかを形成するように、結合メンバーが対象となる検体を特異的に結合するところで、サンプルを固体支持体、結合メンバー、および切断可能なタグにより標識される標識検体と接触させること；（ｂ）固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体中の結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；（ｃ）固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体中の結合メンバーへ

結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること；（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法に関する。

【００７５】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出するための方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、外来性検体が固定化剤のためのリガンドを含み、固体支持体／固定化検体の複合体を形成するように固体支持体を結合し、結合メンバーが切断可能なタグを含み、固体支持体／対象となる検体／結合メンバーの複合体または固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体のいずれかを形成するように、対象となる検体を特異的に結合するところで、サンプルを固体支持体、結合メンバー、および外来性検体と接触させること；（ｂ）固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体または固体支持体／対象となる検体／結合メンバーの複合体のいずれか中の結合されない結合メンバーを除去すること；（ｃ）固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体中の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法に関する。

【００７６】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出するための方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、結合メンバーが固定化剤のためのリガンドを含み、固体支持体／結合メンバー／対象となる検体の複合体または固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体のいずれかを形成するように、結合メンバーが対象となる検体を特異的に結合するところで、サンプルを固体支持体、結合メンバー、およびアプタマーにより標識される標識検体と接触させること；（ｂ）固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体中の結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；（ｃ）固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体中の結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたアプタマーを解離すること；（ｄ）解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含む、該方法に関する。

【００７７】

なお別の態様において、本発明は、生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出するための方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、外来性検体が固定化剤のためのリガンドを含み、固体支持体／固定化検体の複合体を形成するように固体支持体を結合し、結合メンバーがアプタマーを含み、固体支持体／対象となる検体／結合メンバーの複合体または固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体のいずれかを形成するように、対象となる検体を特異的に結合するところで、サンプルを固体支持体、結合メンバー、および外来性検体と接触させること；（ｂ）固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体または固体支持体／対象となる検体／結合メンバーの複合体のいずれか中の結合されない結合メンバーを除去すること；（ｃ）固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体中の結合メンバーへ結合されているアプタマーを解離すること；（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法に関する。

【００７８】

本明細書において説明される対象物の詳細は、その構造および作動の両方に関して、添付の図の検討によって明らかになり、そこでは同様の参照番号は同様のパーツを指す。図中の構成要素は必ずしも一定の比率で縮小されておらず、その代わりに対象物の原理を図示することに重点が置かれている。更に、すべての図示は概念を伝えることを意図し、そこで相対的なサイズ、形および他の詳細な属性が、文字通りにまたは正確にではなく、概略として図示され得る。

【図面の簡単な説明】

【００７９】

【図１Ａ】ナノポアデバイス１５と併用して使用されるマイクロ流体デバイス１０を描写する。

【図１Ｂ】ナノポアデバイス１５と併用して使用されるマイクロ流体デバイス１０を描写する。

【図２Ａ】チャンネル４０経由でナノポアモジュール３０とマイクロ流体モジュール２０を組み合わせた可逆的集積デバイスの概略図を描写する。

【図２Ｂ】チャンネル４０経由でナノポアモジュール３０とマイクロ流体モジュール２０を組み合わせた可逆的集積デバイスの概略図を描写する。

【図２Ｃ】例示的な集積デバイスの概略図を描写し、そこではマイクロ流体モジュールはナノポアモジュールへ流体的に接続される。

【図２Ｄ】例示的な集積デバイスの概略図を描写し、そこではマイクロ流体モジュールはナノポアモジュールへ流体的に接続される。

【図２Ｅ】例示的な集積デバイスの概略図を描写し、そこではマイクロ流体モジュールはナノポアモジュールへ流体的に接続される。

【図２Ｆ】例示的な集積デバイスの概略図を描写し、そこではマイクロ流体モジュールはナノポアモジュールへ流体的に接続される。

【図２Ｇ】例示的な集積デバイスの概略図を描写し、そこではマイクロ流体モジュールはナノポアモジュールへ流体的に接続される。

【図２Ｈ】例示的な集積デバイスの概略図を描写し、そこではマイクロ流体モジュールはナノポアモジュールへ流体的に接続される。

【図２Ｉ－１】例示的な集積デバイスの概略図を描写し、そこではマイクロ流体モジュールはナノポアモジュールへ流体的に接続される。

【図２Ｉ－２】例示的な集積デバイスの、モジュール間のインターフェースでの横断面の正面図を描写する。

【図２Ｊ】例示的な集積デバイスの概略図を描写し、そこではマイクロ流体モジュールはナノポアモジュールへ流体的に接続される。

【図２Ｋ】例示的な集積デバイスの概略図を描写し、そこではマイクロ流体モジュールはナノポアモジュールへ流体的に接続される。

【図２Ｌ】例示的な集積デバイスの概略図を描写し、そこではマイクロ流体モジュールはナノポアモジュールへ流体的に接続される。ナノポアモジュールは、２つのマイクロ流体チャンネルが交差する場所で２つのマイクロ流体チャンネルを物理的に分離する層中でナノポアを含む。

【図３】マイクロ流体モジュール３００およびナノポアモジュール３２５を含む、例示的な集積デバイスを図示する。

【図４】集積デバイス４００を提供し、そこではデジタルマイクロ流体モジュールは内蔵のナノポアモジュールを含む。

【図５Ａ】集積デバイスの上面図を示す。

【図５Ｂ】図５Ａの集積デバイスの側面図を示す。

【図６】本開示の例示的なデバイスおよび方法を描写する。

【図７】本開示の例示的なデバイスおよび方法を描写する。

【図７Ｂ】本開示の例示的なデバイスおよび方法を描写する。

【図８】本開示の例示的な集積デバイスの側面図を描写する。

【図９】本開示の例示的なシステムを描写する。
【図１０】低コストのＤＭＦチップの製作過程の概略図を描写する。
【図１１】図１０中の概略図に従って製作された単一の可撓性ＤＭＦチップを描写する。
【図１２】本開示の実施形態に記載の、ＤＭＦチップ中の小滴のアクチュエーションを描写する。
【図１３Ａ】本開示の実施形態に記載の、ＤＭＦチップにおける免疫アッセイの遂行を描写する。
【図１３Ｂ】本開示の実施形態に記載の、ＤＭＦチップにおける免疫アッセイの遂行を描写する。
【図１３Ｃ】本開示の実施形態に記載の、ＤＭＦチップにおける免疫アッセイの遂行を描写する。
【図１３Ｄ】本開示の実施形態に記載の、ＤＭＦチップにおける免疫アッセイの遂行を描写する。
【図１３Ｅ】本開示の実施形態に記載の、ＤＭＦチップにおける免疫アッセイの遂行を描写する。
【図１４Ａ】本開示の実施形態に記載の、ナノポアモジュールの製作およびデザインを描写する。
【図１４Ｂ】本開示の実施形態に記載の、ナノポアモジュールの製作およびデザインを描写する。
【図１４Ｃ】本開示の実施形態に記載の、ナノポアモジュールの製作およびデザインを描写する。
【図１５Ａ】リアルタイムで測定された漏洩電流のプロットを示す。
【図１５Ｂ】ナノポアについての電流－電圧（Ｉ－Ｖ）カーブを描写する。
【図１６Ａ】本開示の実施形態に記載の、集積ＤＭＦナノポアモジュールデバイスにおけるキャピラリーチャンネルの充填を示す。
【図１６Ｂ】本開示の実施形態に記載の、集積ＤＭＦナノポアモジュールデバイスにおけるキャピラリーチャンネルの充填を示す。
【図１６Ｃ】本開示の実施形態に記載の、集積ＤＭＦナノポアモジュールデバイスにおけるキャピラリーチャンネルの充填を示す。
【図１７】本開示の実施形態に記載の、集積ＤＭＦナノポアモジュールデバイスにおけるモジュール間の小滴転送のための概略図を示す。
【図１８】本開示の実施形態に記載の、ナノポアモジュールのデザインの概略図を示す。
【図１９】本開示の実施形態に記載の、受動輸送によるモジュール間の小滴転送を実行するのに適合した集積ＤＭＦナノポアモジュールデバイスの概略図を示す。
【図２０】本開示の実施形態に記載の、受動輸送によるモジュール間の小滴転送を実行するのに適合した集積ＤＭＦナノポアモジュールデバイスの概略図を示す。
【図２１】本開示の実施形態に記載の、受動輸送による液滴の受動的な動きを可能にする、シリコンマイクロチャンネルを含有するシリコンマイクロ流体デバイスの概略図である。
【図２２】本開示の実施形態に記載の、受動輸送による液滴の受動的な動きを可能にする、シリコンマイクロ流体デバイスのシリコンマイクロチャンネルの像である。
【図２３Ａ】本開示の実施形態に記載の、集積ナノポアセンサーについての製作方法の概略図を示す。
【図２３Ｂ】本開示の実施形態に記載の、集積ナノポアセンサーについての製作方法の概略図を示す。
【図２４Ａ】通常の二本鎖ＤＮＡ（「ｄｓＤＮＡ」）からなる、ナノポアを介して示される移動事象を使用して得られるプロットについてのスキャッタープロット（レベルの継続時間ｖｓ遮断のレベル）を提示する。
【図２４Ｂ】ＤＢＣＯ修飾ｄｓＤＮＡからなる、ナノポアを介して示される移動事象を使用して得られるプロットについてのスキャッタープロット（レベルの継続時間ｖｓ遮断のレベル）を提示する。

【図２４Ｃ】ｄｓＤＮＡスターからなる、ナノポアを介して示される移動事象を使用して得られるプロットについてのスキャッタープロット（レベルの継続時間ｖｓ遮断のレベル）を提示する。
【図２５】チオール媒介性化学切断の概略図を示す。
【図２６Ａ】磁性マイクロ粒子上で実行される光切断実験の概略図を示す。示される配列はいずれも配列番号：６～７である。
【図２６Ｂ】磁性マイクロ粒子上で実行される光切断実験の概略図を示す。示される配列は、上から順に、配列番号：６、配列番号：６～７、配列番号：６、配列番号：８、配列番号：６～７である。
【図２７】ＤＭＦチップ上の試薬設置の概略図を示す。
【図２８】秒$^{-1}$での、サンプルｖｓナノポア流動（ＤＭＦ切断）の棒グラフを提示する。
【図２９】デジタルシグナルのカウントについての閾値が決定される手段を提示する。
【図３０Ａ】９４ｎＭのスタンダードについての異なる時間的な期間にわたる電流遮断を示す。
【図３０Ｂ】１８２ｎＭのスタンダードについての異なる時間的な期間にわたる電流遮断を示す。
【図３０Ｃ】２６６ｎＭのスタンダードについての異なる時間的な期間にわたる電流遮断を示す。
【図３１】固定された量の時間（５分間）にわたる事象の数の用量－応答カーブを示す。
【図３２】事象の固定された数に要求される時間の用量－応答カーブを示す。
【図３３】単位時間あたりの事象の用量－応答カーブを示す。
【図３４】Ｓｅｑ３１－ＳＳ－ビオチンを使用する、単位時間あたりの事象の用量－応答カーブを示す。
【図３５】本開示の実施形態に記載の、シリコンナノポアモジュールにおけるナノポアチャンバーのデザインの概略図を示す。
【図３６】本開示の実施形態に記載の、シリコンナノポアモジュールのナノポアチャンバーにおけるＣＯＭＳＯＬ電界シミュレーションのために使用される物理的パラメーターを表のリストに示す。
【図３７】本開示の実施形態に記載の、シリコンナノポアモジュール中のナノポアの近くのカウンターイオン濃度勾配についてのシミュレーション結果を示す像のコレクションである。
【図３８】本開示の実施形態に記載の、ナノポアを介する電気浸透流に対する、ナノポアを備えたナノポア膜にわたって作製されたSiO_2ビアの直径の効果を示すグラフである。
【図３９】本開示の実施形態に記載の、ナノポアを介するコンダクタンスに対する、ナノポアを備えたナノポア膜にわたって作製されたSiO_2ビアの直径の効果を示すグラフである。
【図４０】本開示の実施形態に記載の、ＤＭＦモジュールの１つの側面上に位置するナノポアモジュールを備えた、集積ＤＭＦナノポアモジュールデバイスの概略図を示す。
【図４１】本開示の実施形態に記載の、ＤＭＦモジュール基板中のＤＭＦモジュールから孔を介する液体の毛細管力による動きを示す像のコレクションである。
【図４２】本開示の実施形態に記載の、ＤＭＦモジュールの１つの側面上に位置するナノポアモジュールおよびナノポア製作のために構成された電極を備えた、集積ＤＭＦナノポアモジュールデバイスを示す像のコレクションである。
【図４３】本開示の実施形態に記載の、ＤＭＦモジュールの１つの側面上に位置するナノポアモジュールを備えた、集積ＤＭＦナノポアモジュールデバイスの概略図である。
【図４４】本開示の実施形態に記載の、２つのＤＭＦモジュールの間に位置するナノポアモジュールを備えた、集積ＤＭＦナノポアモジュールデバイスの概略図である。
【図４５】本開示の実施形態に記載の、ナノポア膜を横切って電圧を適用することによって、および誘電破壊によって証明されるように、ナノポア膜（透過電子顕微鏡（ＴＥＭ）ウィンドウ）におけるナノポアの製作を示すグラフである。

【図４６Ａ】本開示の実施形態に記載の、条件付けプロセスの前の膜において形成されたナノポアの電流－電圧（Ｉ－Ｖ）カーブを示すグラフのコレクションである。
【図４６Ｂ】本開示の実施形態に記載の、条件付けプロセスの後の膜において形成されたナノポアの電流－電圧（Ｉ－Ｖ）カーブを示すグラフのコレクションである。
【図４７】ＳＮＲ（シグナル対ノイズ比）に対する、カウントされる標識の平均直径とナノポアサイズとの間でプロットされた比の平均のスキャッタープロットを示す。
【発明を実施するための形態】
【００８０】
本開示の実施形態は、サンプル中の検体（複数可）の分析のための方法、システム、およびデバイスに関する。ある特定の実施形態において、サンプルは生物学的サンプルであり得る。
【００８１】
１．定義
本開示の実施形態を記載する前に、記載される特定の実施形態は当然変動し得るので、本発明はかかるものに限定されないことを理解すべきである。本明細書において使用される用語は特定の実施形態を記載するのみの目的のためのものであり、限定するとは意図されないことも理解すべきである。
【００８２】
本明細書において使用される時、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ（ｓ））」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ（ｓ））」、「有すること（ｈａｖｉｎｇ）」、「有る（ｈａｓ）」「できる（ｃａｎ）」「含有する（ｃｏｎｔａｉｎ（ｓ））」、およびその変形は、追加の動作または構造の可能性を除外しないオープンエンドの移行句、用語、または単語であることを意図する。単数形「１つの（ａ）」および「１つの（ａｎ）」には、文脈が明確に指示しない限り複数の参照が含まれる。本開示は、明瞭に説明されているか否かに関わらず、本明細書において提示される実施形態または要素を、「含む」、「からなる」、および「から本質的になる」、他の実施形態も企図する。
【００８３】
本明細書における数値範囲の列挙のために、同程度の精度でその間に介在する各々の数が明示的に企図される。例えば、６～９の範囲については、数７および８が、６および９に加えて企図され、６．０～７．０の範囲については、数６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９および７．０が明示的に企図される。
【００８４】
「親和性」および「結合親和性」は、本明細書において互換的に使用される時、検体への結合メンバーの結合の傾向または強度を指す。例えば、結合親和性は、平衡解離定数（K_D）、解離速度（k_d）、または会合速度（k_a）によって表わされ得る。
【００８５】
「類似体」は、本明細書において使用される時、対象となる分子に類似する構造を有する分子（例えばヌクレオシド類似体、ヌクレオチド類似体、糖リン酸塩類似体、検体類似体など）を指す。検体類似体は、検体に構造的に類似する分子であるが、それについては、結合メンバーは異なる親和性を有する。
【００８６】
「アプタマー」は、本明細書において使用される時、前選択された標的へ結合することができるオリゴヌクレオチドまたはペプチド分子を指し、それらには、高親和性および特異性を備えた他のものの中でも、小分子、タンパク質およびペプチドが含まれる。アプタマーは、ヘリックスおよび一本鎖ループを形成するそれらの傾向に起因して、様々な形を想定することができる。オリゴヌクレオチドまたは核酸のアプタマーは、一本鎖のＤＮＡまたはＲＮＡ（ｓｓＤＮＡまたはｓｓＲＮＡ）分子であり得る。ペプチドアプタマーは、タンパク質スキャフォールドへ両方の端部で添付される、短い可変ペプチドドメインを含むことができる。
【００８７】

「ビーズ」および「粒子」は、本明細書において互換的に使用され、実質的に球状の固体支持体を指す。

【００８８】

「構成要素」、「構成要素（複数）」、または「少なくとも１つの構成要素」は、捕捉抗体、検出試薬またはコンジュゲート、キャリブレーター、対照、感受性パネル、容器、バッファー、希釈液、塩、酵素、酵素のためのコファクター、検出試薬／溶液、基質（例えば溶液として）、停止溶液、および同種のものを一般的には指し、それらは、本明細書において記載される方法および当技術分野において公知の他の方法に従って、試験サンプル（患者の尿、血清、全血、組織吸引物、または血漿サンプル等）をアッセイするためのキット中に含まれ得る。いくつかの構成要素は、溶液中にあるか、またはアッセイにおける使用のための再構成のために凍結乾燥され得る。

【００８９】

「対照」は、本明細書において使用される時、当該技術分野において公知もしくは許容されるような、または共通して用いられるような許容される手段を経験的に使用して決定されるような、検体のための参照スタンダードを指す。「参照スタンダード」は、類似物質のための測定ベースとして使用される、標準化された物質である。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａｌ Ｃｏｎｖｅｎｔｉｏｎ（ＵＳＰ－ＮＦ）、Ｆｏｏｄ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｃｏｄｅｘ、およびＤｉｅｔａｒｙ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔｓ Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ（そのすべてはｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｓｐ．ｏｒｇで利用可能である）中で公表された文書化された参照スタンダード、ならびに他の周知の源がある。参照を標準化する方法は文献中で記載されている。さらに周知のものは、検体のためのキャリブレーションカーブの使用によって、または代替の参照スタンダードへの比較によって、存在する検体の量を定量化するための手段である。スタンダードカーブは、質量分光法、重量法、および当技術分野において公知の他の技法によって、検体の公知の濃度の連続希釈物または溶液を使用して生成することができる。文献中で記載される代替の参照スタンダードには、スタンダード添加（スタンダード添加法としても公知）、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応が含まれる。

【００９０】

「デジタルマイクロ流体（ＤＭＦ）」、「デジタルマイクロ流体モジュール（ＤＭＦモジュール）」、または「デジタルマイクロ流体デバイス（ＤＭＦデバイス）」は、本明細書において互換的に使用される時、デジタルマイクロ流体または小滴ベースのマイクロ流体技法を利用して、小滴の形状における液体の離散的且つ小さな体積の操作を提供する、モジュールまたはデバイスを指す。デジタルマイクロ流体は、チャンネルの中への流体－流体分散を生ずる、エマルション科学（主に油中水滴型エマルション）の原則を使用する。それは、単分散性または非常に低い多分散性を備えた滴／バブルの産生を可能にする。デジタルマイクロ流体は、再構成可能なネットワーク内の不連続性流体小滴の顕微操作に基づく。複雑な命令を、小滴形成、移動、分割、および合併の基本的な作動を組み合わせることによってプログラムすることができる。

【００９１】

デジタルマイクロ流体は、二成分の電気信号によって操作することができる流体の離散的体積上で作動する。離散的単位体積の小滴の使用によって、マイクロ流体の作動は、反復される基本的作動のセット（すなわち１単位の距離にわたって１単位の流体が動くこと）として定義され得る。小滴は液体の表面張力特性を使用して形成され得る。小滴のアクチュエーションは、小滴が所在する底部表面の下に設置された電極によって生成される静電力の存在に基づく。異なるタイプの静電力を使用して、小滴の形および動きを制御することができる。前述の静電力を生ずるのに使用することができる１つの技法は、小滴と周囲媒質との間の電気誘電率の差に頼る誘電泳動に基づき、高周波ＡＣ電界を利用することができる。前述の静電力を生ずるのに使用することができる別の技法は、エレクトロウェッティング（それは表面上に存在する液滴と表面へ適用される電界上の表面との間の表面張力の依存性に頼る）に基づく。

【００９２】
「牽引タグ（ｄｒａｇ－ｔａｇ）」は移動度修飾物質を指す。牽引タグは、大きく、水溶性且つ完全に単分散であるようにデザインされる、遺伝的に操作された高反復性のポリペプチド（「タンパク質ポリマー」）であり得る。正に荷電したアルギニンを一定間隔でアミノ酸配列の中へ意識的に導入して、牽引タグの長さを増加せずに流体力学的牽引を増加させることができる。牽引タグは米国特許第２０１２０１４１９９７号（参照により本明細書に援用される）中で記載される。
【００９３】
「酵素切断可能な配列」は、本明細書において使用される時、酵素によって切断することができる任意の核酸配列を指す。例えば、酵素は、プロテアーゼまたは制限エンドヌクレアーゼ等のエンドヌクレアーゼ（制限酵素とも呼ばれる）であり得る。制限エンドヌクレアーゼは、所定のヌクレオチド間の特異的なＤＮＡ切断部位でＤＮＡ分子を認識し切断することができる。いくつかのエンドヌクレアーゼ（例えばＦｏｋＩ等）は、ＤＮＡを特定の位置で、この位置に存在するヌクレオチドにかかわらず、非特異的に切断する切断ドメインを含む。いくつかの実施形態において、特異的なＤＮＡ切断部位および制限エンドヌクレアーゼのＤＮＡ認識部位は同一である。
【００９４】
「球形タンパク質」は、大まかに球状の形を有する水溶性タンパク質を指す。球形タンパク質の例には、オボアルブミン、β－グロブリン、Ｃ反応性タンパク質、フィブリン、ヘモグロビン、ＩｇＧおよびＩｇＭ、およびトロンビンが含まれるが、これらに限定されない。
【００９５】
「標識」または「検出可能な標識」は、本明細書において互換的に使用される時、切断可能なリンカーによって特異的な結合メンバーまたは検体へ添付されたタグを指す。
【００９６】
「ナノ粒子（複数可）」および「ナノビーズ（複数可）」は互換的に本明細書において使用され、ナノポアを介して横断するナノビーズ／ナノ粒子の数のカウントのための使用されるナノポアを介してまたは横切って移動する、サイズ合わせされたナノビーズまたはナノ粒子を指す。
【００９７】
「核酸塩基」または「塩基」は、ポリマーの生成ための、核酸もしくはポリヌクレオチド技術またはペプチド核酸技術の技術分野において共通して公知である、それらの天然に存在する複素環部分および合成の複素環部分を意味する。好適な核酸塩基の非限定例には、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシル、５－プロピニル－ウラシル、２－チオ－５－プロピニル－ウラシル、５－メチルシトシン、シュードイソシトシン、２－チオウラシル、２－チオチミン、２－アミノプリン、Ｎ９－（２－アミノ－６－クロロプリン）、Ｎ９－（２，６－ジアミノプリン）、ヒポキサンチン、Ｎ９－（７－デアザ－グアニン）、Ｎ９－（７－デアザ－８－アザ－グアニン）およびＮ８－（７－デアザ－８－アザ－アデニン）が含まれる。核酸塩基を他の部分へ連結して、ヌクレオシド、ヌクレオチド、およびヌクレオシド／ヌクレオチド類似体を形成することができる。
【００９８】
「ヌクレオシド」は、ペントース糖（リボース、２’－デオキシリボース、または２’，３’－ジ－デオキシリボース等）のアノマー炭素へ１’位で連結される、プリン核酸塩基、デアザプリン核酸塩基、またはピリミジン核酸塩基（例えばアデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミン、７－デアザアデニン、７－デアザグアノシン）からなる化合物を指す。
【００９９】
「ヌクレオチド」は、本明細書において使用される時、エステル化の最も一般的な部位がペントースのＣ－５位へ添付されたヒドロキシル基である、ヌクレオシドのリン酸エステル（例えば一リン酸エステル、二リン酸エステル、または三リン酸エステル）を指す。
【０１００】

「核酸塩基ポリマー」または「核酸塩基オリゴマー」は、リンケージによって接続されてオリゴマーを形成する２つ以上の核酸塩基を指す。核酸塩基のポリマーまたはオリゴマーには、ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド（例えばＤＮＡポリマーおよびＲＮＡオリゴマーならびにＲＮＡポリマーおよびＲＮＡオリゴマー）、ポリヌクレオチド類似体およびオリゴヌクレオチド類似体、ならびにポリヌクレオチド模倣体およびオリゴヌクレオチド模倣体（ポリアミドまたはペプチド核酸）が含まれるが、これらに限定されない。核酸塩基ポリマーまたは核酸塩基オリゴマーは、２、３の核酸塩基～数百の核酸塩基または数千の核酸塩基のサイズで変動することができる。核酸塩基ポリマーまたは核酸塩基オリゴマーは、約２～１００の核酸塩基または約８０００～１００００の核酸塩基を含み得る。例えば、核酸塩基のポリマーまたはオリゴマーは、少なくとも約２つの核酸塩基、少なくとも約５つの核酸塩基、少なくとも約１０の核酸塩基、少なくとも約２０の核酸塩基、少なくとも約３０の核酸塩基、少なくとも約４０の核酸塩基、少なくとも約５０の核酸塩基、少なくとも約６０の核酸塩基、少なくとも約７０の核酸塩基、少なくとも約８０の核酸塩基、少なくとも約９０の核酸塩基、少なくとも約１００の核酸塩基、少なくとも約２００の核酸塩基、少なくとも約３００の核酸塩基、少なくとも約４００の核酸塩基、少なくとも約５００の核酸塩基、少なくとも約６００の核酸塩基、少なくとも約７００の核酸塩基、少なくとも約８００の核酸塩基、少なくとも約９００の核酸塩基、少なくとも約１０００の核酸塩基、少なくとも約２０００の核酸塩基、少なくとも約３０００の核酸塩基、少なくとも約４０００の核酸塩基、少なくとも約５０００の核酸塩基、少なくとも約６０００の核酸塩基、少なくとも約７０００の核酸塩基、少なくとも約８０００の核酸塩基、少なくとも約９０００の核酸塩基、または少なくとも約１００００の核酸塩基を有することができる。

【０１０１】

「層中の１又は２以上のナノポア」は、単一の膜構造または複数の膜構造中に、１つのナノポアがあること、または複数のナノポア（例えば２つ以上）が互いの隣りに（例えば並んで）あることのいずれかを意味する。１又は２以上のナノポアが存在する（例えば１、２、３、４、５、６、または技術的に実現可能なナノポアの他の数）場合に、随意に、それらは、並んで（例えば互いの隣りに）もしくは連続で（例えば、１つの層中の１つのナノポアが、別の層中の別のナノポアと分離してまたはその上に積み重ねられて（例えばその上方にまたはその上部に）存在する、など）、または当業者に明らかであるような代替の構造で、存在する。随意に、かかるナノポアは、例えば各々が自身の分離したコンパートメント内にある（例えば他のナノポアから壁で仕切られる）ことによって独立してアドレス可能であるか、またはあるいは独立した検出回路によってアドレスすることができる。

【０１０２】

「ポリマーブラシ」は、１つの端部で表面へ添付されたポリマーの層を指す。ポリマーは一緒に接近し、自身の環境を形成する層またはコーティングを形成する。ダングリング鎖が溶媒の中に沈められる場合にブラシは溶媒状態であるか、またはダングリング鎖が利用可能な空間を完全に充填する場合に溶融状態であるかのいずれかであり得る。加えて、ポリマー鎖それ自体が静電荷を保有する場合に、別のクラスの高分子電解質ブラシがある。ブラシは、高密度のグラフト鎖によって特徴づけられ得る。次いで、限定空間は、鎖の強い伸長およびシステムの独特の特性を引き起こす。ブラシを使用して、コロイドを安定化し、表面間の摩擦を低減させ、人工ジョイントにおける潤滑を提供することができる。

【０１０３】

「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」は、核酸塩基が糖リン酸リンケージ（糖－リン酸主鎖）によって接続される、核酸塩基ポリマーまたは核酸塩基オリゴマーを指す。例示的なポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドには、２’－デオキシリボヌクレオチドのポリマー（ＤＮＡ）およびリボヌクレオチドのポリマー（ＲＮＡ）が含まれる。ポリヌクレオチドは、全体がリボヌクレオチド、全体が２’－デオキシリボヌクレオチド、またはその組み合わせから構成され得る。「核酸」は、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」を包含し、ヌクレオチドモノマーの一本鎖ポリマーおよび二本鎖ポ

リマーを含む。
【０１０４】
「ポリヌクレオチド類似体」または「オリゴヌクレオチド類似体」は、１又は２以上の糖リン酸類似体を含む糖リン酸主鎖によって核酸塩基が接続される、核酸塩基ポリマーまたは核酸塩基オリゴマーを指す。典型的な糖リン酸類似体には、糖アルキルホスホネート、糖ホスホロアミダイト、糖アルキル－または置換されたアルキルホスホトリエステル、糖ホスホロチオエート、糖ホスホロジチオエート、糖が２’－デオキシリボースまたはリボース以外である糖リン酸および糖リン酸類似体、正に荷電した糖グアニジルインターリンケージを有する核酸塩基ポリマー（米国特許第６，０１３，７８５号および米国特許第５，６９６，２５３号中で記載されるもの等）が含まれるが、これらに限定されない。
【０１０５】
本明細書において使用される時、「ポア」（あるいは「ナノポア」と本明細書において称される）または「チャンネル」（あるいは「ナノポア」または「ナノチャンネル」と本明細書において称される）は、膜／層中のオリフィス、ギャップ、導管、または溝を指し、そこでポアまたはチャンネルは、一度に（例えば、一つずつ、連続として）単一の分子（例えばタグ）の通過または分析を可能にするのに十分な寸法である。
【０１０６】
「受容体」は、本明細書において使用される時、内在性化学シグナルを認識しそれに応答する、タンパク質分子を指す。かかる内在性化学シグナルが受容体へ結合する場合に、それらは、細胞応答／組織応答のいくつかの形状を引き起こす。受容体の例には、神経受容体、ホルモン受容体、栄養受容体、および細胞表面受容体が含まれるが、これらに限定されない。
【０１０７】
本明細書において使用される時、「スペーサー」は、特異的な結合メンバーから切断可能な基を延長する化学的部分、または結合メンバーと支持体との間のリンケージを提供する化学的部分、または光切断可能な部分から標識／タグを延長する化学的部分を指す。いくつかの実施形態において、１又は２以上のスペーサーは、特異的な結合メンバーから配列を至適に引き離すために、ポリペプチドまたはヌクレオチドに基づくタグまたは標識のＮ末端またはＣ末端で含まれ得る。スペーサーには、６－アミノカプロン酸、６－アミノヘキサン酸；１，３－ジアミノプロパン；１，３－ジアミノエタン；ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）ポリマー基、１～５のアミノ酸の短いアミノ酸配列、およびポリグリシン配列等が含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、スペーサーは、ニトロベンジル基、ジチオエチルアミノ、６炭素スペーサー、１２炭素スペーサー、または３－（９－（（３－カルボキシプロピル）（トシル）カルバモイル）アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネートである。
【０１０８】
「特異的な結合パートナー」または「特異的な結合メンバー」は、本明細書において互換的に使用される時、他の分子の実質的により少ない認識と比較して、他の分子を特異的に認識する、２つ以上の異なる分子のうちの１つを指す。２つの異なる分子のうちの１つは、特異的に結合し、その結果として、他の分子の特定の空間的および極性構成と相補的であると定義される領域を表面上にまたは空洞中に有する。分子は特異的な結合ペアのメンバーであり得る。例えば、特異的な結合メンバーには、タンパク質（受容体、酵素、および抗体等）が含まれ得るが、これらに限定されない。
【０１０９】
本明細書において使用される時、「タグ」または「タグ分子」の両方は、ナノポアを介してまたは横切って移動し、サンプル中の検体のレベルの指標を提供する分子（例えば、第２の結合メンバーから切断されたもの、または標的検体から解離されたアプタマー）を指す。これらの用語は、単一のタグ分子または複数の同じタグ分子を指す。同様に、「タグ（複数）」は、特別の定めのない限り、１つのタグまたは１つもしくは複数のタグを指す。
【０１１０】

「閾値」は、本明細書において使用される時、それより上の捕捉されたデータが「シグナル」と判断され、それ未満の捕捉されたデータが「ノイズ」と判断される、経験的に決定され且つ主観的であるカットオフレベルを指す。デジタルシグナルカウントのための閾値の使用は図２９中で描写される。ＣＵＳＵＭ（累積和アルゴリズム）に基づくコンピュータープログラムを用いて、捕捉されたデータをプロセシングし、ユーザーからの閾値インプットに基づいて事象を検出する。ユーザー間の変動は、任意の多くの事象を検出し、続いて具体的な目的のためにデータをその後フィルタリングすることによって可能な限り回避される。例えば、この図から理解できるように、設定された閾値より上の検出された事象は、シグナルとしてカウントされる事象の集団に影響を与える。「緩い」閾値により、より少ない数の事象がシグナルとしてカウントされるだろう。「厳しい」閾値により、より多い数の事象がシグナルとしてカウントされるだろう。緩い閾値または厳しい閾値の設定は、アッセイのために所望される感受性または特異性、および所与の査定において偽陽性または偽陰性が好ましいかどうかに基づく、主観的な選択である。ＤＮＡ移動からの電流遮断シグネチャは１．２ｎＡであると計算され、それは、電流変化をＤＮＡの直径およびナノポア膜の厚さへ関係づける経験式に基づいていた（Ｈ．Ｋｗｏｋ，ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　ＯＮＥ，９（３），３９２８８０，２０１４）。

【０１１１】

本明細書において使用される時、ナノポアを「介するかまたは横切る」動き（例えばナノ粒子、タグ、タグ分子または他のものの）への参照は、換言すれば、ナノポアの１つの側面からもう一つの側面（例えばシス側面からトランス側面、またはその逆）を介するかまたは横切ることを、あるいは意味する。

【０１１２】

「トレーサー」は、本明細書において使用される時、タグまたは標識へコンジュゲートされた検体または検体断片を指し、そこでタグまたは標識へコンジュゲートされた検体は、検体について特異的な抗体上の部位を検体と効果的に競合することができる。例えば、トレーサーは、検体または検体の類似体（シクロスポリンまたはその類似体ＩＳＡ２４７、ビタミンＤおよびその類似体、性ホルモン類およびそれらの類似体等など）であり得る。

【０１１３】

「移動事象」は、本明細書において使用される時、タグが層またはナノポアを介してまたは横切って（例えばシス側面からトランス側面、またはその逆）移動する事象を指す。

【０１１４】

特別に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、当業者によって共通して理解されるものと同じ意味を有する。矛盾する事例において、定義を含む本文書が優先されるだろう。本発明の実践または試験において、本明細書において記載されるものに類似または等価の方法および材料を使用することができるが、好ましい方法および材料が後述される。本明細書において言及されるすべての出版物、特許出願、特許および他の参照は、引用された出版物に関連した方法および／または材料を開示および記載するために、それらの全体を参照することによって援用される。本明細書において開示される材料、方法、および実施例は、単に説明的なものであり、限定を意図したものではない。

【０１１５】

２．検体分析のための方法

検体分析のための方法が本明細書において提供される。本方法は単一の分子カウントを包含し得る。ある特定の実施形態において、検体分析のための方法は、サンプル中に存在する検体を査定することを包含し得る。ある特定の実施形態において、査定は、サンプル中の検体の存在および／または濃度の決定のために使用され得る。ある特定の実施形態において、本方法は、サンプル中に存在する複数の異なる検体の存在および／または濃度の決定のためにも使用され得る。

【０１１６】

生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法が、本明細書において提供

される。本方法は、第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがそれへ添付された切断可能なタグを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること；第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されない第２の結合メンバーを除去すること；第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されている第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；切断されたタグを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；層を介して移動するタグを検出または測定すること；および層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定すること包含する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの測定は査定され、そこで層を介して移動するタグの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの検出は査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【０１１７】

生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法が、本明細書において提供される。本方法は、第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがアプタマーを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること；固体基板へ結合されている検体へ結合されないアプタマーを除去すること；検体へ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定すること包含する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの測定は査定され、そこで層を介して移動するアプタマーの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの検出は査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【０１１８】

いくつかの実施形態において、層を介する各々のタグ（アプタマー等）の移動は移動事象である。移動事象の数の測定は、サンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、サンプル中に存在する検体の量は、設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させるによって決定することができる。スタンダードカーブは、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定することができる。いくつかの実施形態において、サンプル中に存在する検体の量は、設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させることによって決定することができる。スタンダードカーブは、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定することができる。いくつかの実施形態において、サンプル中に存在する検体の量は、移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定することができる。スタンダードカーブは、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定することができる。いくつかの実施形態において、対照は、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり得る。

【０１１９】

例示的な事例において、本方法は、第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを、第１の結合メンバー（「結合メンバー」あるいは「特異的な結合メンバー」と称され、以下のセクションｃ）

中で記載されるような）と接触させること；検体を第２の結合メンバーと接触させ、その第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、その第２の結合メンバーがそれへ添付された切断可能なタグ（本明細書において定義され、以下のセクションｄ）中で記載されるような「タグ」）を含むこと；第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されない第２の結合メンバーを除去すること；第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されている第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；タグを層中のナノポアを介して移動させること；層を介して移動するタグの数を決定すること；層を介して移動するタグの数に基づいてサンプル中の検体の濃度を決定することを包含することができる。ある特定の実施形態において、検体の濃度は、単位時間あたりの層を介して移動するタグの数のカウントによって決定され得る。他の実施形態において、検体の濃度は、層を介して移動するタグの数が閾値に到達する時間の決定によって決定され得る。

【０１２０】

サンプルは、対象となる検体を含有するかまたは含有する疑いのある任意の試験サンプルであり得る。本明細書において使用される時、「検体」、「標的検体」、「対象となる検体」は互換的に使用され、検体が本明細書において開示される方法およびデバイスにおいて測定されることを指す。対象となる検体は、更に後述される。

【０１２１】

「接触させること」および文法的なその等価物は、本明細書において使用される時、結合メンバーについて特異的な対象となる検体がサンプル中に存在すれば結合相互作用が発生するように、結合メンバーをサンプルにおいて対象となる検体と十分な接近へと導く、任意のタイプの組み合わせる動作を指す。接触させることは、結合メンバーとサンプルを組み合わせること、結合メンバーを検体に接近させて導入することによって標的検体を結合メンバーへ曝露すること、および同種のものを包含する、様々な異なる手法において達成することができる。

【０１２２】

ある特定の事例において、第１の結合メンバーは固体支持体上で固定化され得る。本明細書において使用される時、「固定化される」は、固体支持体の表面と第１の結合メンバーの安定的な会合を指す。「安定的な会合」によって、会合の平均半減期が例えば生理学的条件下で１日以上の２つの実体の間の物理的会合が意味される。ある特定の態様において、２つの実体の間の物理的会合は、４℃のＰＢＳ中で、２日以上、１週間以上、１か月以上（６か月以上、例えば１年以上が含まれる）の平均半減期を有する。特定の実施形態によれば、安定的な会合は、２つの実体の間の共有結合、２つの実体の間の非共有結合（例えばイオン結合または金属結合）、または化学的誘引の他の形状（水素結合、ファンデルワールス力、および同種のもの等）から生じる。

【０１２３】

結合試薬が固定化される表面を有する固体支持体は、平面または非平面の立体配座における任意の好都合な表面（マイクロ流体チップの表面、チャンバーの内表面、ビーズの外表面（本明細書において定義されるような）、または多孔性ビーズの内表面および／もしくは外表面等）であり得る。例えば、第１の結合メンバーは、ビーズ（例えばラテックス、アガロース、セファロース、ストレプトアビジン、トシル活性化、エポキシ、ポリスチレン、アミノビーズ、アミンビーズ、カルボキシルビーズまたは同種のもの）へ、共有結合または非共有結合で添付され得る。ある特定の実施形態において、ビーズは粒子（例えばマイクロ粒子）であり得る。いくつかの実施形態において、マイクロ粒子は、約０．１ｎｍ～約１０ミクロンの間、約５０ｎｍ～約５ミクロンの間、約１００ｎｍ～約１ミクロンの間、約０．１ｎｍ～約７００ｎｍとの間、約５００ｎｍ～約１０ミクロンの間、約５００ｎｍ～約５ミクロンの間、約５００ｎｍ～約３ミクロンの間、約１００ｎｍ～７００ｎｍの間、または約５００ｎｍ～７００ｎｍの間であり得る。例えば、マイクロ粒子は、約４～６ミクロン、約２～３ミクロン、または約０．５～１．５ミクロンであり得る。約５００ｎｍ未満の粒子は、時にはナノ粒子と判断される。したがって、マイクロ粒子は、随意に、約０．１ｎｍ～約５００ｎｍの間、約１０ｎｍ～約５００ｎｍの間、約５０ｎｍ～

約５００ｎｍの間、約１００ｎｍ～約５００ｎｍの間、約１００ｎｍ、約１５０ｎｍ、約２００ｎｍ、約２５０ｎｍ、約３００ｎｍ、約３５０ｎｍ、約４００ｎｍ、約４５０ｎｍ、または約５００ｎｍのナノ粒子であり得る。

【０１２４】

ある特定の実施形態において、ビーズは磁性ビーズまたは磁性粒子であり得る。磁性ビーズ／粒子は、強磁性、フェリ磁性、常磁性、超常磁性、または磁性流体性であり得る。例示的な強磁性材には、Ｆｅ、Ｃｏ、Ｎｉ、Ｇｄ、Ｄｙ、CrO_2、ＭｎＡｓ、ＭｎＢｉ、ＥｕＯ、ＮｉＯ／Ｆｅが含まれる。フェリ磁性体の例には、$NiFe_2O_4$、$CoFe_2O_4$、Fe_3O_4（または$FeO \cdot Fe_2O_3$）が含まれる。ビーズは磁性の固体コア部分を有することができ、１又は２以上の非磁性層によって囲まれる。あるいは、磁性部分は、非磁性コアのまわりの層であり得る。第１の結合メンバーが固定化される固体支持体は、乾燥形状でまたは液体中で保存され得る。磁性ビーズは、第１の結合メンバーが固定化される磁性ビーズとサンプルを接触させる前または後に、磁界へさらされ得る。

【０１２５】

接触ステップ後に、サンプルおよび第１の結合メンバーは、結合メンバーと検体との間の結合相互作用が発生することを可能にする十分な時間の期間でインキュベーションされ得る。加えて、インキュベーションは、特異的な結合相互作用を促進する結合バッファー中であり得る。第１の結合メンバーおよび／または第２の結合メンバーの結合親和性および／または特異性は、結合バッファーを変動させることによって、アッセイにおいて操作または改変され得る。いくつかの実施形態において、結合親和性および／または特異性は、結合バッファーを変動させることによって増加され得る。いくつかの実施形態において、結合親和性および／または特異性は、結合バッファーを変動させることによって減少され得る。

【０１２６】

第１の結合メンバーおよび／または第２の結合メンバーの結合親和性および／または特異性は、後述の開示される方法およびデバイスを使用して測定され得る。いくつかの実施形態において、サンプルの１つのアリコートは１セットの条件を使用してアッセイされ、条件の異なるセットを使用してアッセイされたサンプルの別のアリコートと比較され、それによって、結合親和性および／または特異性に対する条件の効果を決定する。例えば、条件を変化または改変することは、サンプルから標的検体を除去すること、標的検体または結合のためのリガンドと競合する分子を添加すること、およびｐＨ、塩濃度、または温度を変化させること、のうちの１又は２以上であり得る。追加でまたはあるいは、時間的な継続は変動的であり、条件の変化には、検出方法を再び実行する前に時間的な継続の間の待機が含まれ得る。

【０１２７】

いくつかの実施形態において、タグまたはアプタマーがナノポアデバイスのポアを介して通過した後に、デバイスは、タグまたはアプタマーの動きの方向を逆転するように再構成することができ、その結果、タグまたはアプタマーは再びポアを介して通過し、例えば感染性疾患アッセイに関する確認アッセイにおいて再測定または再検出して、測定された結果を確認することができる。

【０１２８】

結合バッファーは、抗原－抗体結合バッファーのための分子スタンダード（アルブミン（例えばＢＳＡ）、非イオン性界面活性剤（ツイーン－２０、トリトンＸ－１００）、および／またはプロテアーゼ阻害因子（例えばＰＭＳＦ）等）を含み得る。ある特定の事例において、結合バッファーは、サンプルの添加の前または後で、マイクロ流体チップ、チャンバーなどへ添加され得る。ある特定の事例において、第１の結合メンバーは、サンプルと接触させる前に、結合バッファー中に存在し得る。結合メンバーと検体との間の結合相互作用が発生するための時間の長さは、経験的に決定され、結合メンバーと検体との間の結合親和性および結合能に依存し得る。ある特定の実施形態において、接触またはインキュベーションは、５秒～１時間（１０秒～３０分間、１分間～１５分間、または５分間～

１０分間、例えば１０秒、１５秒、３０秒、１分間、５分間、１０分間、１５分間、３０分間、４５分間、１時間、または２時間等）の期間であり得る。結合相互作用のための他の条件（温度、塩濃度等）も、経験的に決定されるかまたは製造者の説明書に基づき得る。例えば、接触は、室温（２１℃～２８℃、例えば２３℃～２５℃）、３７℃、または４℃で実行され得る。ある特定の実施形態において、第１の結合メンバーとサンプルの随意の混合は、接触ステップの間に実行され得る。

【０１２９】

固定化された第１の結合メンバーと検体との間での複合体形成に続いて、第１の結合メンバーおよび検体の複合体は固体支持体との会合に起因して保持され得る一方で、任意の未結合の検体はサンプルと一緒に第１の結合メンバーの周辺から除去され得る。随意に、固体支持体を洗浄バッファーと接触させて、固体支持体へ非特異的に結合されている任意の分子を除去することができる。

【０１３０】

第１の接触ステップ、ならびに随意のサンプルの除去および／または随意の洗浄ステップ後に、第１の結合メンバーおよび検体の複合体は、第２の結合メンバーと接触し、それによって、検体が２つの結合メンバーによって結合されるサンドイッチ複合体の形成を引き起こす。第１の結合メンバー－検体の複合体と第２のメンバーの随意の混合は、第２の接触ステップの間に実行され得る。いくつかの実施形態において、表面に関しての検体分子の固定化は、表面から検体分子を追い出す懸念なしに、溶液からの任意の過剰な第２の結合メンバーの除去を援助することができる。いくつかの実施形態において、第２の結合メンバーは、それへ添付されたタグ（切断可能なタグ等）を含み得る。

【０１３１】

前述のように、第２の接触ステップは、検体と第２の結合メンバーとの間の結合相互作用のために十分な条件において実行され得る。第２の接触ステップに続いて、任意の未結合の第２の結合メンバーは除去され、続いて随意の洗浄ステップが行われ得る。任意の未結合の第２の結合メンバーは、好適な手段（小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェッティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電界媒介性、電極媒介性、毛細管力、クロマトグラフィー、遠心分離、または吸引等）によって、第１の結合メンバー－検体－第２の結合メンバーの複合体から分離され得る。第１の結合メンバー－検体－第２の結合メンバーの複合体の周辺からの任意の未結合の第２の結合メンバーの除去に際して、第１の結合メンバー－検体－第２の結合メンバーの複合体中に存在する第２の結合メンバーへ添付されたタグは、好適な手段によって分離され得る。いくつかの実施形態において、タグは、未結合試薬の除去後に残存する複合体から切断または解離される。例えば、タグは、切断可能なリンカー（以下のセクションｆ）中で記載されるような「切断可能なリンカー」）経由で第２の結合メンバーへ添付され得る。第１の結合メンバー－検体－第２の結合メンバーの複合体は、切断可能なリンカーの切断を媒介する切断剤へ曝露され得る。

【０１３２】

ある特定の実施形態において、第１の結合メンバー－検体－第２の結合メンバーの複合体からのタグの分離は、複合体の破壊をもたらさない条件下で実行され、複合体からのタグのみの放出をもたらす。他の事例において、第１の結合メンバー－検体－第２の結合メンバーの複合体からのタグの分離は、複合体の破壊をもたらし得る条件下で実行され、タグに加えて、複合体から第２の結合メンバー、検体、の第１の結合メンバーのうちの１又は２以上の放出をもたらす。ある特定の実施形態において、タグのカウントのために使用されたナノポアのサイズは、第２の結合メンバー、検体、第１の結合メンバーがナノポアを介して移動するのを阻止し得る。他の実施形態において、第２の結合メンバー、検体、第１の結合メンバーの複合体が固体支持体上で保持される場合は、ナノポアは、第２の結合メンバー、検体および第１の結合メンバーを除外するようにサイズ合わせされなくてもよい。

【０１３３】

分離ステップは、電界の影響下でナノポアまたはナノポア層（以下のセクションｆ）中で記載されるような）を介してまたは横切って移動することができる、遊離タグの生成をもたらす。ある特定の事例において、切断ステップは、第１の結合メンバー－検体－第２の結合メンバーの複合体中の第２の結合メンバーの各々へ添付された実質的に全てのタグ分子（複数可）の分離をもたらし得る。タグ分子の数は、サンプル中の検体の濃度に比例する複合体中の検体分子の数へ相関させることができる。ある特定の実施形態において、カウントされたタグと検体濃度との間の相関は直接的であり得る（タグ分子のより高い数はより高い検体濃度に関係する）。タグ付けされた競合物またはタグ付けされた検体（トレーサー等（本明細書において定義されるような））がサンプルと組み合わせられ、そのタグ付けされた競合物またはタグ付けされた検体がサンプル中で第１の結合メンバーへ結合することを検体と競合する、実施形態において、カウントされたタグと検体濃度との間の相関は逆であり得る（タグ分子のより低い数はより高い検体濃度に関係する）。タグ分子の数と検体濃度との間の相関は、直接的または逆であるかにかかわらず、直線状または対数であり得る。したがって、ナノポアを介して移動するタグ分子の数を使用して、サンプル中の検体濃度を決定することができる。ある特定の実施形態において、検体の濃度は、単位時間あたりの層を介して移動するタグの数のカウントによって決定され得る。他の実施形態において、検体の濃度は、層を介して移動するタグの数が閾値に到達する時間の決定によって決定され得る。ある特定の実施形態において、ナノポアを介してまたは横切って移動するタグ分子の数は、単位時間あたりのナノポアでの電流遮断の頻度によって決定され得る。シグナル検出は、以下のセクションｇ）中で更に記載される。以下のセクションｄ）中で記載されるように、タグ分子は、ナノ粒子またはナノビーズ（本明細書において定義されるような「ナノ粒子」および「ナノビーズ」）であり得る。

【０１３４】

第２の結合メンバー中に取り込まれたタグの数（すなわちタグ／第２の結合メンバーのコンジュゲート中のタグの数）は、検体により定義されたストイキオメトリーを提供する。ある特定の実施形態において、タグは、各々の第２の結合メンバーへ添付された一貫した数のタグ（複数可）を産する手順を使用して、第２の結合メンバーへ添付され得る。タグの数はカウントのスピードに基づいて最適化され得る。より速いリード速度は、カウント速度が濃度に依存するので結合メンバー上に多くのタグを含むことによって得ることができる。タグの数は、タグ取り込みのストイキオメトリー（例えば１：１または１：４の取り込み率）に基づいて最適化することができる。いくつかの実施形態において、１：５の取り込み率がある。例えば、１つの第２の結合メンバーは、それへ添付された１つのタグ分子、２つのタグ分子、３つのタグ分子、４つのタグ分子、または１０までのタグ分子を有し得る。いくつかの実施形態において、１つの第２の結合メンバーは、それへ添付された５つのタグ分子を有し得る。第２の結合メンバー（例えばペプチド、ポリペプチド、核酸）へタグをコンジュゲートするための多くのコンジュゲーション法は公知であり、そのうちの任意のものを使用して、本方法およびデバイスにおける使用のためのタグ付けされた第２の結合メンバーを調製することができる。例えば、検体特異的抗体へのタグの部位特異的コンジュゲーションは、チオール－マレイミド化学、アミン－スクシンイミジル化学、ＴＨＩＯＢＲＩＤＧＥ（商標）技術を使用して、Ｃ末端またはＮ末端のヘキサヒスチジンタグ（配列番号：１２）を備えた抗体、アルデヒドタグを備えた抗体、銅不含有クリック反応、および同種のものを使用して、実行され得る。

【０１３５】

いくつかの実施形態において、本方法は、移動事象の数の決定によって検体の量を測定することができる。いくつかの実施形態において、１又は２以上の移動事象（複数可）は、特異的な結合メンバーの中へのタグ取り込みのストイキオメトリーに依存して、結合メンバーと検体との間の結合事象へ対応させることができる。例えば、１つのタグが１つの結合メンバーにつき取り込まれるならば、そのとき、１つの移動事象が検体への結合メンバーの結合を表わし；２つのタグが１つの結合メンバーにつき取り込まれるならば、そのとき、２つの移動事象が検体への結合メンバーの結合を表わし；３つのタグが１つの結合メ

ンバーにつき取り込まれるならば、そのとき、３つの移動事象が検体への結合メンバーの結合を表わす、などである。

【０１３６】

別の実施形態において、第２の結合メンバーは、検体へ特異的に結合するアプタマーであり得る。この実施形態において、タグはアプタマーへ添付されなくてもよい。むしろ、それがナノポアを介してまたは横切って移動するにつれて、アプタマーがカウントされ、すなわち、アプタマーは、第２の結合メンバーであることおよびタグであることという二重機能を供する。これらの実施形態において、第１の結合メンバー－検体－アプタマーの複合体の複合体中のアプタマーは、任意の好適な方法によって複合体から解離され得る。例えば、ナノポアを介するまたは横切る移動の前に、第１の結合メンバー検体の複合体へ結合されているアプタマーは、変性ステップ経由で解離され得る。変性ステップは、カオトロピック試薬、高塩溶液、酸性試薬、塩基性試薬、溶媒、または加熱ステップへの曝露を包含し得る。次いで、アプタマーはナノポアを介してまたは横切って移動することができ、ナノポアを介してまたは横切って移動するアプタマー分子の数を使用して、サンプル中の検体の濃度を決定することができる。

【０１３７】

本明細書において指摘されるように、タグまたはアプタマーは核酸を包含し得る。ある特定の実施形態において、ナノポアを使用するカウントステップは、タグ／アプタマー中に存在する核酸配列の少なくとも一部分の同一性の決定によってタグまたはアプタマーの同一性を決定することを包含しない。例えば、カウントステップはタグ／アプタマーの配列を決定することを包含しなくてもよい。他の実施形態において、タグ／アプタマーはシークエンスされなくてもよいが、タグ／アプタマーの同一性は、そのサイズ、立体配座、チャージ、チャージの量、および同種のものに起因するタグ／アプタマーと関連する区別可能なシグナルに基づいて、１つのタグ／アプタマーが、別のタグ／アプタマーと識別され得る程度まで決定することができる。タグ／アプタマーの同定は、サンプル中の複数の異なる検体（例えばサンプル中の２、３、４、またはそれ以上の異なる検体）の同時分析を包含する方法において有用であり得る。

【０１３８】

ある特定の実施形態において、単一のサンプル中の複数の検体の同時分析は、複数の異なる第１の結合メンバーおよび第２の結合メンバーの使用によって実行することができ、そこでペアの第１の結合メンバーおよび第２の結合メンバーはサンプル中の単一の検体へ特異的である。これらの実施形態において、単一の検体へ特異的な第１のペアの第１の結合メンバーおよび第２の結合メンバーのうちの第２の結合メンバーと会合するタグは、異なる検体へ特異的な第２のペアの第１の結合メンバーおよび第２の結合メンバーのうちの第２の結合メンバーと会合するタグから識別可能であり得る。前述のように、第１のタグは寸法、チャージなどの差に基づいて、第２のタグから識別可能であり得る。

【０１３９】

いくつかの実施形態において、実質的に正確に決定され得る流体サンプル中の検体の濃度は、約５０００ｆＭ（フェムトモーラー）未満、約３０００ｆＭ未満、約２０００ｆＭ未満、約１０００ｆＭ未満、約５００ｆＭ未満、約３００ｆＭ未満、約２００ｆＭ未満、約１００ｆＭ未満、約５０ｆＭ未満、約２５ｆＭ未満、約１０ｆＭ未満、約５ｆＭ未満、約２ｆＭ未満、約１ｆＭ未満、約５００ａＭ（アトモーラー）未満、約１００ａＭ未満、約１０ａＭ未満、約５ａＭ未満、約１ａＭ未満、約０．１ａＭ未満、約５００ｚＭ（ゼプトモーラー）未満、約１００ｚＭ未満、約１０ｚＭ未満、約５ｚＭ未満、約１ｚＭ未満、約０．１ｚＭ未満、またはそれ未満である。

【０１４０】

いくつかの事例において、検出限界（例えば溶液中で決定され得る検体の最低濃度）は、約１００ｆＭ、約５０ｆＭ、約２５ｆＭ、約１０ｆＭ、約５ｆＭ、約２ｆＭ、約１ｆＭ、約５００ａＭ（アトモーラー）、約１００ａＭ、約５０ａＭ、約１０ａＭ、約５ａＭ、約１ａＭ、約０．１ａＭ、約５００ｚＭ（ゼプトモーラー）、約１００ｚＭ、約５０ｚＭ、

約１０ｚＭ、約５ｚＭ、約１ｚＭ、約０．１ｚＭ、またはそれ未満である。いくつかの実施形態において、実質的に正確に決定され得る流体サンプル中の検体の濃度は、約５００００ｆＭ～約０．１　ｆＭの間、約３０００ｆＭ～約０．１ｆＭの間、約１０００ｆＭ～約０．１ｆＭの間、約１０００ｆＭ～約０．１ｚＭの間、約１００ｆＭ～約１ｚＭの間、約１００ａＭ～約０．１ｚＭの間、またはそれ未満である。

【０１４１】

検出の上限（例えば溶液中で決定され得る検体の上限濃度）は、少なくとも約１００ｆＭ、少なくとも約１０００ｆＭ、少なくとも約１０ｐＭ（ピコモーラー）、少なくとも約１００ｐＭ、少なくとも約１００ｐＭ、少なくとも約１０ｎＭ（ナノモーラー）、少なくとも約１００ｎＭ、少なくとも約１０００ｎＭ、少なくとも約１０μＭ、少なくとも約１００μＭ、少なくとも約１０００μＭ、少なくとも約１０ｍＭ、少なくとも約１００ｍＭ、少なくとも約１０００ｍＭ、またはそれより大きい。

【０１４２】

いくつかの事例において、サンプル中の検体の存在および／または濃度は、通常約１時間未満（例えば４５分間、３０分間、１５分間、１０分間、５分間、１分間、または３０秒）で、迅速に検出され得る。

【０１４３】

ある特定の実施形態において、少なくとも本明細書において記載される方法のいくつかのステップは、デジタルマイクロ流体デバイス（セクション３中で記載されるデバイス等）上で実行され得る。ある特定の実施形態において、本開示の方法は、ナノポアデバイスと併用してデジタルマイクロ流体デバイスを使用して実行される。例えば、デジタルマイクロ流体デバイスおよびナノポアデバイスは分離したデバイスであり得、切断されたタグ（複数可）または解離されたアプタマー（複数可）を含有する小滴は、マイクロ流体デバイス中で生成され、ナノポアデバイスへ輸送され得る。ある特定の実施形態において、切断されたタグ（複数可）または解離されたアプタマー（複数可）を含有する小滴は、マイクロ流体デバイスから吸引され、ユーザーまたはロボットによって作動されるピペットを使用して、ナノポアデバイスへ輸送され得る。

【０１４４】

ある特定の実施形態において、本開示の方法は、デジタルマイクロ流体モジュールがナノポアモジュール（後述されるデバイス等）と共に集積化されるデバイスを使用して実行される。ある特定の実施形態において、デジタルマイクロ流体モジュールおよびナノポアモジュールは可逆的に集積化され得る。例えば、２つのモジュールは物理的に組み合わせられて集積デバイスを形成し、次いでそのデバイスは個別モジュールへと分離することができるだろう。ある特定の実施形態において、本開示の方法は、内蔵のナノポアモジュールと共にマイクロ流体モジュールを包含する使い捨てのカートリッジを使用して実行される。本明細書において提供される方法の実行のために使用されるデバイスの例示的な実施形態は、次のセクション中で更に記載される。

【０１４５】

ある特定の事例において、マイクロ流体デバイス、またはナノポアモジュールと共に集積化された（可逆的にまたは完全に）デバイスのマイクロ流体モジュールは、離れて置かれる様式でアレンジされた第１の基板および第２の基板を含むことができ、そこで第１の基板がギャップ／空間によって第２の基板から分離され、少なくとも、サンプルを第１の結合メンバーと接触させるステップ、検体を第２の結合メンバーと接触させるステップ、第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されない第２の結合メンバーを除去するステップ、および第２の結合メンバー（それは第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されたままである）へ添付されたタグを切断するステップは、第１の基板と第２の基板との間の空間／ギャップ中で実行される。

【０１４６】

本方法の例示的な実施形態は、サンプルの小滴を生成すること、およびサンプルの小滴を第１の結合メンバーを含有する小滴と組み合わせて単一の小滴を生成することを包含する

。第１の結合メンバーは、ビーズ（例えば磁性ビーズ）等の固体基板上で固定化され得る。単一の小滴は、サンプル小滴中に存在する検体への第１の結合メンバーの結合を可能にするのに十分な時間でインキュベーションされ得る。随意に、単一の小滴を撹拌して、第１の結合メンバーとサンプルを混合することを促進できる。混合は、単一の小滴を前後に動かすこと、単一の小滴を複数の電極にわたって動かすこと、小滴を分割し、次いで小滴を合併すること、またはＳＡＷを使用すること、および同種のものによって達成され得る。次に、単一の小滴は、デバイス中の場所でビーズを保持する磁力へさらすことができ、その一方で、その小滴を遠ざけ、第２の結合メンバーを含有する小滴と置き換えることができる。随意の洗浄ステップは、洗浄バッファーの小滴をビーズが磁力を使用して保持される場所へ動かすことによって、第２の結合メンバーの添加の前に、実行することができる。第２の結合メンバーが第１の結合メンバーへ結合されている検体を結合するのに十分な時間の期間の後に、第２の結合メンバーを含有している小滴を遠ざけることができ、その一方で、ビーズは第１の場所で保持される。ビーズを洗浄バッファーの小滴を使用して洗浄し、続いてビーズを切断試薬を含有する小滴と接触させて第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断することができる。タグが光切断可能なリンカー経由で第２の結合メンバーへ添付されている実施形態において、ビーズはリンカーを切断するのに適切な波長の光へ曝露され得る。ある特定の事例において、ビーズは光切断可能なリンカーの切断前にバッファーの小滴へ曝露されてもよい。随意に、任意の未結合の第２の結合メンバーを除去する洗浄ステップの後に、小滴を含有するバッファーはビーズをカバーしたままにしておくことができ、第１の場所でビーズを保持する磁力を除去することができ、ビーズを含有するバッファー小滴を、光切断が実行され得る第２の場所へ動かすことができる。次いで切断されたタグを含有する小滴を、ナノポアデバイスまたは集積デバイスのナノポアモジュール部分へ動かすことができる。第２の結合メンバーとしてアプタマーを使用する実施形態において、任意の未結合のアプタマーを除去する洗浄ステップの後に、小滴を含有するバッファーはビーズをカバーしたままにしておくことができ、第１の場所でビーズを保持する磁力を除去することができ、ビーズを含有するバッファー小滴を、アプタマーの解離が実行され得る第２の場所へ動かすことができる。他の実施形態において、洗浄ステップの後に、ビーズは、検体へ結合されているアプタマーの解離のために試薬の小滴へ曝露され得る。解離されたアプタマーを含有する小滴をナノポアへ動かすことができ、一方で、ビーズは磁石を使用してその場に保持することができる。解離されたアプタマーを含有する小滴を、ナノポアデバイスまたは集積デバイスのナノポアモジュール部分へ動かすことができる。

【０１４７】

代替の実施形態において、第１の結合メンバーは、ギャップ／空間中の場所で第１の基板または第２の基板の表面上に固定化することができる。サンプルを第１の結合メンバーと接触させるステップは、サンプルの小滴を第１の結合メンバーが固定化されたギャップ／空間中の場所へ動かすことを包含し得る。後続のステップは、磁性ビーズ上で固定化された第１の結合メンバーについて上記されたものに実質的に類似し得る。

【０１４８】

切断ステップ／解離ステップの後に、切断されたタグ（複数可）／解離されたアプタマー（複数可）を含有する小滴は、ナノポアデバイスまたは集積デバイスのナノポアモジュールへ動かすことができる。前述のように、小滴（複数可）は、液体転送システム（ピペット等）を使用して動かすことができる。ある特定の事例において、マイクロ流体モジュールは、ナノポアモジュールへ流体的に接続され得る。流体接続は、マイクロ流体モジュールをチャンネル経由でナノポアモジュールへ接続することによって、またはナノポアモジュールをマイクロ流体モジュール内に設置することによって、可逆的にまたは集積デバイスの製造プロセスの間に、のいずれかで、達成することができる。かかるデバイスは、以下のセクション中で更に記載される。

【０１４９】

上記の実施形態において、随意に、組み合わせ後に、小滴を操作して（例えば、前後に動

かす、環状の方向で動かす、振動させる、分割／合併する、ＳＡＷへ曝露する、など）、アッセイ試薬（第１の結合メンバーおよび第２の結合メンバー、など等）とのサンプルの混合を促進することができる。

【０１５０】

集積マイクロ流体ナノポアデバイス中の小滴を動かすことを、電気力（例えばエレクトロウェッティング、誘電泳動、電極媒介性、オプト－エレクトロウェッティング、電界媒介性、および静電アクチュエーション）、圧力、弾性表面波、および同種のものを使用して、実行することができる。小滴を動かすのに使用される力は、デバイスの詳細（以下のセクションａ）～ｇ）中で以下の記載される）に、およびセクション３中で記載される特定のデバイスに基づいて決定することができる。

【０１５１】

ａ）マルチプレックス化

本方法は、マルチプレックス化アッセイにおけるサンプル中の１又は２以上の（またはあるいは２つ以上の）標的検体を検出する１又は２以上の（またはあるいは２つ以上の）特異的な結合メンバーを包含し得る。１又は２以上の（またはあるいは２つ以上の）特異的な結合メンバーの各々は、異なる標的検体へ結合し、各々の特異的な結合メンバーは異なるタグおよび／またはアプタマーにより標識される。例えば、第１の特異的な結合メンバーは第１の標的検体へ結合する、第２の特異的な結合メンバーは第２の標的検体へ結合する、第３の特異的な結合メンバーは第３の標的検体へ結合する、などであり、第１の特異的な結合メンバーは第１のタグおよび／またはアプタマーにより標識される、第２の特異的な結合メンバーは第２のタグおよび／またはアプタマーにより標識される、第３の特異的な結合メンバーは第３のタグおよび／またはアプタマーにより標識される、などである。いくつかの実施形態において、第１の条件は、第１の特異的な結合メンバーがタグにより標識されるならば、第１のタグの切断もしくは放出、または第１の特異的な結合メンバーがアプタマーにより標識されるならば、第１のアプタマーの解離もしくは放出を引き起こす、第２の条件は、第２の特異的な結合メンバーがタグにより標識されるならば、第２のタグの切断もしくは放出、または第２の特異的な結合メンバーがアプタマーにより標識されるならば、第２のアプタマーの解離もしくは放出を引き起こす、第３の条件は、第３の特異的な結合メンバーがタグにより標識されるならば、第３のタグの切断もしくは放出、または第３の特異的な結合メンバーがアプタマーにより標識されるならば、第３のアプタマーの解離もしくは放出を引き起こす、などである。いくつかの実施形態において、サンプルの条件はアッセイの間に様々な時間で変化させ第１のタグまたはアプタマー、第２のタグまたはアプタマー、第３のタグまたはアプタマーなどの検出を可能にし、それによって、１又は２以上の（またはあるいは２つ以上の）標的検体を検出することができる。いくつかの実施形態において、１又は２以上の（またはあるいは２つ以上の）切断されたタグおよび／または解離されたアプタマーは、ナノポア中の滞留継続期間、電流インピーダンスの大きさ、またはその組み合わせに基づいて、ポアを介して同時に検出される。

【０１５２】

ｂ）例示的な標的検体

当業者によって認識されるように、第１の結合メンバーおよび第２の結合メンバーによって特異的に結合できる任意の検体は、本開示の方法およびデバイスを使用して、検出され、随意に定量化され得る。

【０１５３】

いくつかの実施形態において、検体は生体分子であり得る。生体分子の非限定例に、マクロ分子（タンパク質、脂質および炭水化物等）が含まれる。ある特定の実例において、検体は、ホルモン、抗体、増殖因子、サイトカイン、酵素、受容体（例えば神経受容体、ホルモン受容体、栄養受容体、および細胞表面受容体）またはそれらのリガンド、癌マーカー（例えばＰＳＡ、ＴＮＦ－α）、心筋梗塞のマーカー（例えばトロポニン、クレアチンキナーゼ、および同種のもの）、毒素、薬物（例えば中毒の薬物）、代謝薬剤（例えばビタミンが含まれる）、および同種のものであり得る。タンパク質検体の非限定的実施形態

には、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質断片、タンパク質複合体、融合タンパク質、組換えタンパク質、リンタンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、または同種のものが含まれる。

【０１５４】

ある特定の実施形態において、検体は、翻訳後に修飾されたタンパク質（例えばリン酸化タンパク質、メチル化タンパク質、糖鎖が付加したタンパク質）であり得、第１の結合メンバーまたは第２の結合メンバーは翻訳後修飾に特異的な抗体であり得る。修飾タンパク質は固体支持体上で固定化された第１の結合メンバーへ結合することができ、そこで第１の結合メンバーは非修飾タンパク質ではなく修飾タンパク質へ結合する。他の実施形態において、第１の結合メンバーは非修飾タンパク質および修飾タンパク質の両方へ結合することができ、第２の結合メンバーは翻訳後に修飾されたタンパク質へ特異的であり得る。

【０１５５】

いくつかの実施形態において、検体は、細胞（循環腫瘍細胞等）、病原細菌、ウイルス（レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、フィロウイルス（エボラ）、肝炎ウイルス（例えばＡ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＥ）；ＨＰＶなどが含まれる）；胞子などであり得る。

【０１５６】

本明細書において提示される方法によって分析され得る検体の非限定的リストには、Ａβ４２アミロイドベータタンパク質、フェチュイン－Ａ、タウ、セクレトグラニンＩＩ、プリオンタンパク質、α－シヌクレイン、タウタンパク質、ニューロフィラメント軽鎖、パーキン、ＰＴＥＮ誘導性推定キナーゼ１、ＤＪ－１、ロイシンリッチリピートキナーゼ、変異ＡＴＰ１３Ａ２、アポＨ、セルロプラスミン２、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体γコアクチベーター－１α（ＰＧＣ－１α）、トランスサイレチン、ビタミンＤ結合タンパク質、アポトーシス促進キナーゼＲ（ＰＫＲ）およびそのリン酸化ＰＫＲ（ｐＰＫＲ）、ＣＸＣＬ１３、ＩＬ－１２ｐ４０、ＣＸＣＬ１３、ＩＬ－８、Ｄｋｋ－３（精液）、ｐ１４エンドカン断片、血清、ＡＣＥ２、ＣＤ２５への自己抗体、ｈＴＥＲＴ、ＣＡＩ２５（ＭＵＣ　１６）、ＶＥＧＦ、ｓＩＬ－２、オステオポンチン、ヒト精巣上体タンパク質４（ＨＥ４）、αフェトプロテイン、アルブミン、アルブミン尿、微量アルブミン尿、好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン（ＮＧＡＬ）、インターロイキン１８（ＩＬ－１８）、腎臓損傷分子－１（ＫＩＭ－１）、肝臓脂肪酸結合タンパク質（Ｌ－ＦＡＢＰ）、ＬＭＰ１、ＢＡＲＦ１、ＩＬ－８、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、ＢＲＡＦ、ＣＣＮＩ、ＥＧＲＦ、ＦＧＦ１９、ＦＲＳ２、ＧＲＥＢ１、およびＬＺＴＳ１、α－アミラーゼ癌胎児性抗原、ＣＡ　１２５、ＩＬ８、チオレドキシン、β２－ミクログロブリンレベル（ウイルスの活性をモニタリングする）、腫瘍壊死因子－α受容体（ウイルスの活性をモニタリングする）、ＣＡ１５－３、卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、黄体形成ホルモン（ＬＨ）、Ｔ細胞性リンパ腫の侵襲および転移（ＴＩＡＭ１）、Ｎ－カドヘリン、ＥＣ３９、アンフィレグリン　１、ｄＵＴＰアーゼ、分泌ゲルゾリン（ｐＧＳＮ）、ＰＳＡ（前立腺特異抗原）、チモシンβ１５、インスリン、血漿Ｃペプチド、グリコヘモグロビン（ＨＢＡ１ｃ）、Ｃ反応性タンパク質（ＣＲＰ）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、ＡＲＨＧＤＩＢ（Ｒｈｏ　ＧＤＰ解離阻害因子２）、ＣＦＬ１（コフィリン－１）、ＰＦＮ１（プロフィリン－１）、ＧＳＴＰ１（グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼＰ）、Ｓ１００Ａ１１（タンパク質Ｓ１００－Ａ１１）、ＰＲＤＸ６（ペルオキシレドキシン－６）、ＨＳＰＥ１（１０ｋＤａ熱ショックタンパク質、ミトコンドリアの）、ＬＹＺ（リゾチームＣ前駆体）、ＧＰＩ（グルコース－６－リン酸イソメラーゼ）、ＨＩＳＴ２Ｈ２ＡＡ（ヒストンＨ２Ａタイプ２－Ａ）、ＧＡＰＤＨ（グリセルアルデヒド－３－リン酸脱水素酵素）、ＨＳＰＧ２（基底膜特異的ヘパラン硫酸プロテオグリカンコアタンパク質前駆体）、ＬＧＡＬＳ３ＢＰ（ガレクチン－３－結合タンパク質前駆体）、ＣＴＳＤ（カテプシンＤ前駆体）、ＡＰＯＥ（アポリポタンパク質Ｅ前駆体）、ＩＱＧＡＰ１（Ｒａｓ　ＧＴＰアーゼ活性化様タンパク質ＩＱＧＡＰ１）、ＣＰ（セルロプラスミン前駆体）、およびＩＧＬＣ２（ＩＧＬＣ１タンパク質）、ＰＣＤＧＦ／ＧＰ８８、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、ＭＵＣ４、ＩＧＦ

－ＩＲ、ｐ２７（ｋｉｐ１）、Ａｋｔ、ＨＥＲ３、ＨＥＲ４、ＰＴＥＮ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＳＨＩＰ、Ｇｒｂ２、Ｇａｂ２、ＰＤＫ－１（３－ホスホイノシチド依存性タンパク質キナーゼ－１）、ＴＳＣ１、ＴＳＣ２、ｍＴＯＲ、ＭＩＧ－６（ＥＲＢＢ受容体フィードバック阻害因子１）、Ｓ６Ｋ、ｓｒｃ、ＫＲＡＳ、ＭＥＫマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ１、ｃＭＹＣ、ＴＯＰＯ ＩＩトポイソメラーゼ（ＤＮＡ）ＩＩα１７０ ｋＤａ、ＦＲＡＰ１、ＮＲＧ１、ＥＳＲ１、ＥＳＲ２、ＰＧＲ、ＣＤＫＮ１Ｂ、ＭＡＰ２Ｋ１、ＮＥＤＤ４－１、ＦＯＸＯ３Ａ、ＰＰＰ１Ｒ１Ｂ、ＰＸＮ、ＥＬＡ２、ＣＴＮＮＢ１、ＡＲ、ＥＰＨＢ２、ＫＬＦ６、ＡＮＸＡ７、ＮＫＸ３－１、ＰＩＴＸ２、ＭＫＩ６７、ＰＨＬＰＰ、アディポネクチン（ＡＤＩＰＯＱ）、フィブリノーゲンα鎖（ＦＧＡ）、レプチン（ＬＥＰ）（終末糖化産物特異的受容体（ＡＧＥＲ別名ＲＡＧＥ））、α－２－ＨＳ－糖タンパク質（ＡＨＳＧ）、アンジオジェニン（ＡＮＧ）、ＣＤ１４分子（ＣＤ１４）、フェリチン（ＦＴＨ１）、インスリン様増殖因子結合タンパク質１（ＩＧＦＢＰ１）、インターロイキン２受容体α（ＩＬ２ＲＡ）、血管細胞接着分子－１（ＶＣＡＭ１）およびフォンウィルブランド因子（フォン－ウィルブランド因子）、ミエロペルオキシダーゼ（ＭＰＯ）、ＩＬ１α、ＴＮＦα、核周囲型抗好中球細胞質抗体（ｐ－ＡＮＣＡ）、ラクトフェリン、カルプロテクチン、ウィルムス腫瘍－１タンパク質、アクアポリン－１、ＭＬＬ３、ＡＭＢＰ、ＶＤＡＣ１、大腸菌腸管毒素（易熱性外毒素、耐熱性腸管毒素）、インフルエンザＨＡ抗原、破傷風毒素、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、志賀毒素、志賀様毒素Ｉ、志賀様毒素ＩＩ、クロストリジウム－ディフィシーレ毒素ＡおよびＢなどが含まれる。

【０１５７】

サンプル（環境サンプル、対象の方法およびデバイスを使用することを必要とする患者または被験体から得られる生物学的サンプル等）中の測定され得る、核酸アプタマーの例示的な標的には、乱用の薬物（例えばコカイン）、タンパク質バイオマーカー（ヌクレオリン、核因子－κＢ必須モジュレーター（ＮＥＭＯ）、ＣＤ－３０、タンパク質チロシンキナーゼ７（ＰＴＫ７）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、ＭＵＣ１グリコフォーム、免疫グロブリンμ重鎖（ＩＧＨＭ）、免疫グロブリンＥ、αｖβ３インテグリン、α－トロンビン、ＨＩＶ ｇｐ１２０、ＮＦ－κＢ、Ｅ２Ｆ転写因子、ＨＥＲ３、プラスミノーゲン活性化阻害因子、テネイシンＣ、ＣＸＣＬ１２／ＳＤＦ－１、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）、胃癌細胞、ＨＧＣ－２７が含まれるが、これらに限定されない）；細胞（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、結腸直腸癌細胞（ＤＬＤ－１）、Ｈ２３肺腺癌細胞、Ｒａｍｏｓ細胞、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）細胞、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ急性骨髄白血病（ＡＭＬ）細胞（ＨＬ６０）、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）細胞、ＮＣＩＨ６９、ヒト神経膠芽腫細胞、Ｕ１１８－ＭＧ、ＰＣ－３細胞、ＨＥＲ－２－過剰発現ヒト乳癌細胞、ＳＫ－ＢＲ－３、膵癌細胞株（Ｍｉａ－ＰａＣａ－２）が含まれるが、これらに限定されない）；および感染性病原体（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｏ１５７：Ｈ７、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ属Ｏ８、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓが含まれるが、これらに限定されない）が含まれる。

【０１５８】

対象の方法およびデバイスを使用することを必要とする患者または被験体から得られる生物学的サンプル等）中の測定され得る、タンパク質またはペプチドのアプタマーの例示的な標的には、ＨＢＶコアカプシドタンパク質、ＣＤＫ２、Ｅ２Ｆ転写因子、チミジル酸シンターゼ、Ｒａｓ、ＥＢ１、および終末糖化産物受容体（ＲＡＧＥ）が含まれるが、これらに限定されない。アプタマー、ならびにその使用および産生の方法は、例えばＳｈｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ．２０１３４：８７２；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ．２０１１；１８：４１８５；Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍ Ｃｏｍｍｕｎ（Ｃａｍｂ）．２０１２ ４８：１０４７２；Ｃｒａｗｆｏｒｄ

ｅｔ ａｌ．，Ｂｒｉｅｆ Ｆｕｎｃｔ Ｇｅｎｏｍｉｃ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃ．２００３２：７２；Ｒｅｖｅｒｄａｔｔｏ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．２０１３ ８：ｅ６５１８０中で概説される。

【０１５９】

ｃ）サンプル

本明細書において使用される時、「サンプル」、「試験サンプル」、「生物学的サンプル」は、対象となる検体を含有するかまたは含有する疑いのある流体サンプルを指す。サンプルは任意の好適な源に由来し得る。いくつかの事例において、サンプルは、液体、流動性の微粒子固体、または固体粒子の流体懸濁物を含み得る。いくつかの事例において、サンプルは本明細書において記載される分析前に加工され得る。例えば、サンプルは分析前にその源から分離または精製され得るが、特定の実施形態において、検体を含有する未加工サンプルは直接アッセイされ得る。検体分子の源は、合成（例えば、実験室中で産生された）、環境（例えば空気、土壌、流体サンプル、例えば水道設備など）、動物（例えば哺乳類）、植物、またはその任意の組み合わせであり得る。特定の例示において、検体の源は、ヒトの身体の物質（例えば、体液、血液、血清、血漿、尿、唾液、汗、喀痰、精液、粘液、涙液、リンパ液、羊水、間質液、肺洗浄、脳脊髄液、糞便、組織、器官、または同種のもの）である。組織には、骨格筋組織、肝臓組織、肺組織、腎臓組織、心筋組織、脳組織、骨髄、子宮頸部組織、皮膚などが含まれ得るが、これらに限定されない。サンプルは、液体サンプルまたは固体サンプルの液体抽出物であり得る。ある特定の事例において、サンプルの源は器官または組織（生検サンプル等）であり得、それは組織崩壊／細胞溶解によって可溶化され得る。

【０１６０】

広範囲の流体サンプルの体積が分析され得る。いくつかの例示的な実施形態において、サンプル体積は、約０．５ｎＬ、約１ｎＬ、約３ｎＬ、約０．０１μＬ、約０．１μＬ、約１μＬ、約５μＬ、約１０μＬ、約１００μＬ、約１ｍＬ、約５ｍＬ、約１０ｍＬ、または同種のものであり得る。いくつかの事例において、流体サンプルの体積は、約０．０１μＬ～約１０ｍＬの間、約０．０１μＬ～約１ｍＬの間、約０．０１μＬ～約１００μＬの間、または約０．１μＬ～約１０μＬの間である。

【０１６１】

いくつかの事例において、流体サンプルはアッセイにおける使用前に希釈され得る。例えば、検体分子の源がヒト体液（例えば血液、血清）である複数の実施形態において、流体は、適切な溶媒（例えばＰＢＳバッファー等のバッファー）により希釈され得る。流体サンプルは、使用の前に、約１倍、約２倍、約３倍、約４倍、約５倍、約６倍、約１０倍、約１００倍、またはそれを超えて希釈され得る。

【０１６２】

いくつかの事例において、サンプルに分析前加工を行うことができる。分析前加工は、追加の機能性（非特異的タンパク質の除去および／または効果的であるが安く実装することができる混合の機能性等）を提供し得る。分析前加工の一般的な方法には、動電トラッピング、ＡＣ動電、弾性表面波、等速電気泳動、誘電泳動、電気泳動、または当技術分野において公知の他の前濃縮技術の使用が含まれ得る。いくつかの事例において、流体サンプルはアッセイにおける使用の前に濃縮され得る。例えば、検体分子の源がヒト体液（例えば血液、血清）である複数の実施形態において、流体は、沈殿、蒸発、濾過、遠心分離、またはその組み合わせによって濃縮され得る。流体サンプルは、使用の前に、約１倍、約２倍、約３倍、約４倍、約５倍、約６倍、約１０倍、約１００倍、またはそれを超えて濃縮され得る。

【０１６３】

ある特定の実施形態において、検体は、検体の測定の前に増幅されない（すなわち検体のコピー数は増加されない）。例えば、検体がＤＮＡまたはＲＮＡである事例において、検体は、検体のコピー数を増加させるように複製されない。ある特定の事例において、検体はタンパク質または小分子である。

【０１６４】

ｄ）特異的な結合メンバー

当業者によって認識されるように、結合メンバーは、分析される予定の検体によって決定されるだろう。様々な標的分子のための結合メンバーは公知であるか、または公知の技法を使用して容易に見出されるかもしくは開発することができる。例えば、標的検体がタンパク質である場合に、結合メンバーには、タンパク質、特に抗体またはその断片（例えば抗原結合断片（Ｆａｂ）、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）2断片、組換え抗体、キメラ抗体、一本鎖Ｆｖ（「ｓｃＦｖ」）、単一鎖抗体、ラクダ科の動物に由来する可変重鎖ドメイン（「ＶＨＨ」；「ＶＨＨ断片」としても公知）等の単一ドメイン抗体（ＶＨＨ、およびそれらを作製する方法は、Ｇｏｔｔｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ，１４：７７－８５（２００９）中で記載される）、組換えＶＨＨ単一ドメイン抗体、およびＶＮＡＲ断片、ジスルフィド結合Ｆｖ（「ｓｄＦｖ」）、および抗イディオタイプ（「抗Ｉｄ」）抗体、ならびに上記のうちのいずれかの機能的に活性のあるエピトープ結合断片、全長のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、抗体様断片、など）、他のタンパク質（受容体タンパク質、プロテインＡ、プロテインＣ、または同種のもの等）が含まれ得る。検体が小分子（ステロイド、ビリン、レチノイド、および脂質等）である事例において、第１の結合メンバーおよび／または第２の結合メンバーは、スキャフォールドタンパク質（例えばリポカリン）または受容体であり得る。いくつかの事例において、タンパク質検体についての結合メンバーはペプチドであり得る。例えば、標的検体が酵素である場合に、好適な結合メンバーには、ペプチド、小分子、および同種のものであり得る、酵素基質および／または酵素阻害因子が含まれ得る。いくつかの事例において、標的検体がリン酸化種である場合に、結合メンバーはリン酸結合剤を含み得る。例えば、リン酸結合剤には、金属イオン親和性媒質（米国特許第７，０７０，９２１号および米国特許出願第２００６０１２１５４４号中で記載されるようなもの）が含まれ得る。

【０１６５】

ある特定の事例において、結合メンバーのうちの少なくとも１つは、アプタマー（米国特許第５，２７０，１６３号、第５，４７５，０９６号、第５，５６７，５８８号、第５，５９５，８７７号、第５，６３７，４５９号、第５，６８３，８６７号、第５，７０５，３３７号中で記載されるもの等）であり得る。核酸アプタマー（例えば一本鎖ＤＮＡ分子または一本鎖ＲＮＡ分子）は、実質的には任意の標的分子の捕捉のために開発され得る。アプタマーは、高度に特異的な立体配座依存性様式で、典型的には非常に高親和性で、標的分子を結合するが、より低い結合親和性を備えたアプタマーを選択することができる。アプタマーは、非常に小さな構造的な差異（メチル基またはヒドロキシル基の存在または非存在等）に基づいて、標的検体分子を識別することができ、ある特定のアプタマーは、Ｄ－鏡像異性体およびＬ－鏡像異性体ならびにジアステレオ異性体を識別することができる。アプタマーは、小さな分子標的（薬物、金属イオンおよび有機色素が含まれる）、ペプチド、ビオチン、およびタンパク質を結合し得る。ビオチン化、フルオレセイン標識後に、ならびにガラス表面およびマイクロスフェアへ添付された時に、アプタマーは機能的活性を保持することができる。

【０１６６】

核酸アプタマーは、一本鎖のオリゴデオキシヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、または修飾されたオリゴデオキシヌクレオチドもしくはオリゴリボヌクレオチドであり得るオリゴヌクレオチドである。「修飾された」は、共有結合で修飾された塩基および／または糖を備えたヌクレオチドを包含する。例えば、修飾ヌクレオチドには、３’位でのヒドロキシル基および５’位でのリン酸基以外の低分子量の有機基へ、共有結合で添付される糖を有するヌクレオチドが含まれる。したがって、修飾ヌクレオチドには、２’置換糖（２’－Ｏ－メチル－；２－Ｏ－アルキル；２－Ｏ－アリル；２’－Ｓ－アルキル；２’－Ｓ－アリル；２’－フルオロ－；２’－ハロまたは２－アジド－リボース等）、炭素環式糖類似体、ａ－アノマー糖；エピマー糖（アラビノース、キシロースまたはリキソース等）、ピラノ

ース糖、フラノース糖、およびセドヘプツロースも含まれ得る。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、配列番号：１～１１のうちの任意の１つにおいて示されるヌクレオチド配列を含む、核酸を含む。

【０１６７】

ペプチドアプタマーは、タンパク質相互作用を妨害するようにデザインされ得る。ペプチドアプタマーは、可変的なペプチドループが添付され、それによって、アプタマーの立体配座を拘束する、タンパク質スキャフォールドに基づく。いくつかの事例において、ペプチドアプタマーのスキャフォールド部分は細菌性チオレドキシンＡ（ＴｒｘＡ）に由来する。

【０１６８】

標的分子が炭水化物である場合に、好適である可能性な捕捉構成要素（本明細書において定義されるような）には、例えば抗体、レクチンおよびセレクチンが含まれる。当業者によって認識されるように、対象となる標的分子と特異的に会合できる任意の分子は、結合メンバーとして使用される可能性がある。

【０１６９】

ある特定の実施形態のために、好適な標的検体／結合メンバーの複合体には、抗体／抗原、抗原／抗体、受容体／リガンド、リガンド／受容体、タンパク質／核酸、酵素／基質および／または阻害因子、炭水化物（糖タンパク質および糖脂質が含まれる）／レクチンおよび／またはセレクチン、タンパク質／タンパク質、タンパク質／小分子などが含まれ得るが、これらに限定されない。

【０１７０】

特定の実施形態において、第１の結合メンバーをリンケージ経由で固体支持体へ添付することができ、それは、支持体への結合メンバーの添付を促進する、支持体および／または結合メンバーの任意の部分、官能基、または修飾を含み得る。結合メンバーと支持体との間のリンケージには、１又は２以上の化学的または物理的（例えばファンデルワールス力経由の非特異的添付、水素結合、静電的相互作用、疎水性／親水性相互作用；など）結合、および／またはかかる結合（複数可）を提供する化学的スペーサーが含まれ得る。

【０１７１】

ある特定の実施形態において、固体支持体は、アッセイの間の結合表面への非捕捉構成要素（例えば検体分子、結合メンバー）の非特異的付着（検出の間の偽陽性シグナルまたはシグナル損失を引き起こし得る）を消失または最小限にすることができる、保護層、ブロッキング層、または不動態化層も含み得る。ある特定の実施形態において、不動態化層の形成に利用され得る材料の例には、ポリマー（タンパク質の非特異的結合を反発するポリ（エチレングリコール）等）；この特性を備えた天然に存在するタンパク質（血清アルブミンおよびカゼイン等）；界面活性剤、例えば両性イオン性界面活性剤（スルホベタイン等）；天然に存在する長鎖脂質；ポリマーブラシ、および核酸（サケ精子ＤＮＡ等）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１７２】

ある特定の実施形態は、タンパク質またはポリペプチドである結合メンバーを利用する。当技術分野において公知であるように、任意の数の技法は様々な固体支持体へのポリペプチドの添付に使用され得る。タンパク質へ反応性部分を添加する様々な技法（例えば米国特許第５，６２０，８５０号中で略述される方法）が公知である。さらに、表面へのタンパク質の添付のための方法が公知であり、例えばＨｅｌｌｅｒ，Ａｃｃ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．２３：１２８（１９９０）を参照されたい。

【０１７３】

本明細書において説明されるように、結合メンバーと検体との間の結合は、例えば結合メンバーおよび検体が結合ペアの相補的パーツである場合に、特異的である。ある特定の実施形態において、結合メンバーは検体へ特異的に結合する。「特異的に結合する」または「結合特異性」によって、結合メンバーが、検体分子と他の構成要素または試験サンプルの混入物とを区別するのに十分な特異性で、検体分子を結合することが意味される。例え

ば、一実施形態に記載の結合メンバーは、検体上のエピトープへ特異的に結合する抗体であり得る。一実施形態に記載の抗体は、対象となる検体へ特異的に結合することができる任意の抗体であり得る。例えば、適切な抗体には、モノクローナル抗体および二重特異性抗体、ミニボディ、ドメイン抗体（ｄＡｂ）（例えばＨｏｌｔ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２１：４８４－４９０中で記載されるもの等）が含まれるが、これらに限定されず、天然に存在する（例えば軟骨魚類およびラクダ科の動物でのように）または合成（例えばナノボディ、ＶＨＨ、または他のドメイン構造）の単一ドメイン抗体ｓｄＡｂ、合成抗体（時には抗体模倣物と称される）、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗体融合物（時には「抗体コンジュゲート」と称される）、およびそれぞれの各々の断片が含まれる。別の実施例として、検体分子は抗体であり得、第１の結合メンバーは抗原であり得、第２の結合メンバーは標的抗体へ特異的に結合する二次抗体であり得るか、または第１の結合メンバーは標的抗体へ特異的に結合する二次抗体であり得、第２の結合メンバーは抗原であり得る。

【０１７４】

いくつかの実施形態において、結合メンバーは、化学的にプログラムされた抗体（ｃｐＡｂ）（Ｒａｄｅｒ（２０１４）Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３２：１８６－１９７中で記載される）、二重特異性ｃｐＡｂ、抗体動員分子（ＡＲＭ）（ＭｃＥｎａｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）ＡＣＳ　Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．７：１１３９－１１５１中で記載される）、トリリガンド捕捉剤等の分岐状捕捉剤（Ｍｉｌｌｗａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１３３：１８２８０－１８２８８中で記載される）、モノボディ等の、非抗体スキャフォールドに由来する操作された結合タンパク質（ヒトフィブロネクチンの第１０のフィブロネクチンタイプＩＩＩドメインに由来する）、アフィボディ（免疫グロブリン結合タンパク質Ａに由来する）、ＤＡＲＰｉｎ（アンキリン反復モジュールに基づく）、アンチカリン（リポカリンのビリン結合タンパク質およびヒトリポカリン２に由来する）、およびシステインノットペプチド（ノッチン）（Ｇｉｌｂｒｅｔｈ　ａｎｄ　Ｋｏｉｄｅ，（２０１２）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　２２：１－８；Ｂａｎｔａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１５：９３－１１３中で記載される）、ＷＷドメイン（Ｐａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ＆Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　２６（４）：３０７－３１４中で記載される）、別の目的で使われる受容体リガンド、アフィチン（Ｂｅｈａｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）２６：２６７－２７５中で記載される）、ならびに／またはアドヒロン（Ａｄｈｉｒｏｎ）（Ｔｉｅｄｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ＆Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　２７：１４５－１５５中で記載される）であり得る。

【０１７５】

検体が生物細胞（例えば、哺乳類、鳥類、爬虫類、他の脊椎動物、昆虫、酵母、細菌、細胞など）である一実施形態によれば、結合メンバーは、細胞表面抗原（例えば細胞表面受容体）について特異的な親和性を有するリガンドであり得る。一実施形態において、結合メンバーは接着分子受容体またはその一部分であり得、それは標的細胞タイプの表面上で発現される細胞接着分子についての結合特異性を有する。使用に際して、接着分子受容体は、標的細胞の細胞外表面上の接着分子と結合し、それによって、細胞を固定化または捕捉し、次いで結合されている細胞は、第１の結合メンバーと同じであり得るかまたは細胞の表面上で発現される異なる分子と結合し得る、第２の結合メンバーの使用によって検出することができる。

【０１７６】

いくつかの実施形態において、検体分子と結合メンバーとの間の結合親和性は、アッセイ（非特異的に結合されている分子または粒子を除去する洗浄ステップが含まれる）の条件下で結合されたままであるのに十分であるべきである。いくつかの事例において、例えば、ある特定の生体分子の検出において、検体分子のその相補的な結合メンバーへの結合定

数は、少なくとも約10^4～約10^6M^{-1}、少なくとも約10^5～約10^9M^{-1}、少なくとも約10^7～約10^9M^{-1}の間、約10^9M^{-1}より高い、またはそれ以上であり得る。

【０１７７】

ｅ）タグまたは標識

本明細書において記載される方法は、インピーダンスによって検体を分析するためにタグ（標識等）へ結合されている特異的な結合メンバーを包含し得る。取り込まれたタグまたは標識は、反応スキームの遂行を実質的に妨害しない。例えば、取り込まれたタグまたは標識は、検体とその相補的な結合メンバーの結合定数またはそれらの間の相互作用を妨害しない。取り込まれたタグまたは標識のサイズおよび数は、捕捉のスピードおよびリード速度に関係し得る。捕捉のスピードおよびリード速度は、取り込まれたタグまたは標識のサイズおよび／または番号を増加させることによって増加され得る。例えば、取り込まれたタグまたは標識のサイズおよび数は、電荷を増加させ、ナノポアの捕捉ゾーンを増加させ得る。取り込まれたタグまたは標識は、結合メンバーの反応速度論（例えば抗体の反応速度論）または反応スキームを改変しない。例示的なタグには、ポリマーが約５～１０００残基の長さである、陰イオン性ポリマーまたは陽イオン性ポリマー等のポリマー（例えばポリヒスチジンまたはポリリジン等の、正味の正電荷を備えたポリペプチド）；結合メンバーと交差反応しないおよび／またはアッセイを妨害しないタンパク質（例えば球形タンパク質）、デンドリマー（例えばＤＮＡデンドリマー）；ならびに荷電したナノ粒子（例えばナノビーズ）が含まれる。ポリマータグには、核酸（デオキシリボ核酸またはリボ核酸等）が含まれ得る。ポリマータグには核酸塩基ポリマーが含まれ得る。ある特定の事例において、タグはＤＮＡまたはＲＮＡアプタマーであり得、そこではアプタマーは検体へ結合しない。いくつかの事例において、タグがアプタマーである場合に、それはナノポアを介する移動の前に随意に変性させることができる。ポリマータグまたはナノ粒子（例えばナノビーズ）は、それがナノポアを介してまたは横切って移動するにつれて再現性のあるシグナルを生成するのに十分に大きいだろう。アプタマーは、２０～２２０塩基長（例えば２０～６０塩基長）であり得る。ナノ粒子（例えばナノビーズまたはデンドリマー）のサイズは、直径で約１ｎｍ～約９５０ｎｍ、例えば、直径で１０ｎｍ～９００ｎｍ、２０ｎｍ～８００ｎｍ、３０ｎｍ～７００ｎｍ、５０ｎｍ～６００ｎｍ、８０ｎｍ～５００ｎｍ、１００ｎｍ～５００ｎｍ、２００ｎｍ～５００ｎｍ、３００ｎｍ～５００ｎｍ、または４００ｎｍ～５００ｎｍ、例えば１０ｎｍ、２０ｎｍ、３０ｎｍ、５０ｎｍ、１００ｎｍ、２００ｎｍ、３００ｎｍ、４００ｎｍ、５００ｎｍ、６００ｎｍ、７００ｎｍ、８００ｎｍ、または９００ｎｍの範囲であり得る。タグとして使用される時に、ナノ粒子のための好ましいサイズは、ナノポア（更に本明細書において記載されるような）を介してまたは横切って通過することができるものである。ある特定の事例において、ナノビーズ／ナノ粒子は、正味の負電荷もしくは正電荷を有する材料から作製することができるか、または正味の負電荷もしくは正電荷を有するように処理することができる。例示的なナノビーズ／ナノ粒子には、有機ポリマーまたは無機ポリマーから作製されたものが含まれる。有機ポリマーには、ポリマー（ポリスチレン、炭素、ポリアクリルアミドなど等）が含まれる。無機ポリマーには、シリコンまたは金属ナノビーズ／ナノ粒子が含まれる。ある特定の事例において、ナノビーズ／ナノ粒子は磁性でなくてもよい。

【０１７８】

ある特定の事例において、タグは一本鎖のＤＮＡまたはＲＮＡであり得る。一本鎖のＤＮＡまたはＲＮＡは、ナノポアを介するまたは横切る移動の前にプローブ分子へハイブリダイズされ得る。ある特定の事例において、方法は、単一サンプル中の複数の検体の分析を含み得る。サンプル中の異なる検体へ結合する第２の結合メンバーは、タグとしてそれへ添付される異なる一本鎖のＤＮＡまたはＲＮＡを含むことができ、異なる一本鎖のＤＮＡまたはＲＮＡは、それらがナノポアを介して横断するとき、異なる一本鎖のＤＮＡまたはＲＮＡを互いに更に識別する異なるプローブへハイブリダイズされ得る。他の実施形態において、異なる第２の結合メンバーへ添付されたタグは、タグがナノポアを介してまたは横切って通過する場合に、識別可能な異なるヘアピン構造（例えばヘアピン構造の長さ）

を有し得る。さらに別の実施形態において、異なる第２の結合メンバーへ添付されたタグは、タグがナノポアを介してまたは横切って横断する場合、識別可能な異なる長さを有することができ、例えば、タグは、異なる長さ（例えば２５ｂｐ、５０ｂｐ、７５ｂｐ、１００ｂｐ、１５０ｂｐ、２００ｂｐ、またはそれ以上）の二本鎖ＤＮＡであり得る。ある特定の事例において、異なる第２の結合メンバーへ添付されたタグは、異なる長さのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を有することができるか、またはＰＥＧにより差異的に修飾されるＤＮＡもしくはＲＮＡであり得る。

【０１７９】

タグまたはタグ分子への参照は、単一タグまたは単一タグ分子に加えて、複数のタグ（それはすべて同一であり得る）を包含することが指摘される。ナノポアは、単一ナノポアに加えて、単一層（基板、膜、および同種のもの等）中に存在する複数のナノポアを包含することが更に指摘される。それゆえ、層／シート／膜中のナノポアを介してまたは横切って移動するタグの数のカウントは、層／シート／膜中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動する複数のタグをカウントすることを指す。ナノポアは単一層（基板または膜等）中に存在することができ、層は電気的に絶縁しているかまたは高い電気抵抗を有する任意の好適な材料から作製することができ、それらは脂質二分子膜、誘電材料（例えば窒化ケイ素およびシリカ）、原子薄膜（グラフェン、シリコン、シリセン、二硫化モリブデン（MoS_2）など等）、またはその組み合わせ等である。

【０１８０】

タグは任意のサイズまたは形であり得る。いくつかの実施形態において、タグは、直径で約１０～９５０ｎｍ（例えば直径で２０～９００ｎｍ、３０～８００ｎｍ、４０～７００ｎｍ、５０～６００ｎｍ、６０～５００ｎｍ、７０～４００ｎｍ、８０～３００ｎｍ、９０～２００ｎｍ、１００～１５０ｎｍ、２００～６００ｎｍ、４００～５００ｎｍ、２～１０ｎｍ、２～４ｎｍ、または３～４ｎｍ）のナノ粒子またはナノビーズであり得る。タグは、実質的に球状（例えば球状のビーズもしくはナノビーズ、または半球状）であり得る。タグは、約０．５ｋＤａ～約５０ｋＤａ（例えば、約０．５ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約０．８ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約１．０ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約１．５ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約２．０ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約５ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約１０ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約５０ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約１００ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約１５０ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約２００ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約２５０ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約３００ｋＤａ～約４００ｋＤａ、約０．５ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約０．８ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約１．０ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約１．５ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約２．０ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約５ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約１０ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約５０ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約１００ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約１５０ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約２００ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約２５０ｋＤａ～約３００ｋＤａ、約０．５ｋＤａ～約２５０ｋＤａ、約０．８ｋＤａ～約２５０ｋＤａ、約１．０ｋＤａ～約２５０ｋＤａ、約１．５ｋＤａ～約２５０ｋＤａ、約２．０ｋＤａ～約２５０ｋＤａのサイズ、約５ｋＤａ～約２５０ｋＤａ、約１０ｋＤａ～約２５０ｋＤａ、約５０ｋＤａ～約２５０ｋＤａ、約１００ｋＤａ～約２５０ｋＤａ、約１５０ｋＤａ～約２５０ｋＤａ、約２００ｋＤａ～約２５０ｋＤａ、約０．５ｋＤａ～約２００ｋＤａ、約０．８ｋＤａ～約２００ｋＤａ、約１．０ｋＤａ～約２００ｋＤａ、約１．５ｋＤａ～約２００ｋＤａ、約２．０ｋＤａ～約２００ｋＤａのサイズ、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａ、約１０ｋＤａ～約２００ｋＤａ、約５０ｋＤａ～約２００ｋＤａ、約１００ｋＤａ～約２００ｋＤａ、約１５０ｋＤａ～約２００ｋＤａ、約０．５ｋＤａ～約１００ｋＤａ、約０．８ｋＤａ～約１００ｋＤａ、約１．０ｋＤａ～約１００ｋＤａ、約１．５ｋＤａ～約１００ｋＤａ、約２．０ｋＤａ～約１００ｋＤａ、約５ｋＤａ～約１００ｋＤａ、約１０ｋＤａ～約１００ｋＤａ、約５０ｋＤａ～約１００ｋＤａ、約０．５ｋＤａ～約５０ｋＤａ、約０．８ｋＤａ～約５０ｋＤａ、約１．０ｋＤａ～約５０ｋＤａ、約１．５ｋＤａ～約５０ｋＤａ、約２．０ｋＤａ～約５０ｋＤａ、約５ｋＤａ～約５０ｋＤａ、約１０ｋＤａ～約５０ｋＤａ、約１０ｋＤａ～約９０ｋＤａ、約１０ｋＤａ～

約８０ｋＤａ、約１０ｋＤａ～約７０ｋＤａ、約１０ｋＤａ～約６０ｋＤａ、約２０ｋＤａ～約９０ｋＤａ、約２０ｋＤａ～約８０ｋＤａ、約２０ｋＤａ～約７０ｋＤａ、約２０ｋＤａ～約６０ｋＤａ、約４０ｋＤａ～約９０ｋＤａ、約４０ｋＤａ～約８０ｋＤａ、約４０ｋＤａ～約７０ｋＤａ、または約４０ｋＤａ～約６０ｋＤａ）のサイズのタンパク質であり得る。

【０１８１】

ある特定の実施形態において、タグはナノ粒子であり得る。本明細書において指摘されるように、ナノ粒子は、第２の結合メンバーへ可逆的に（例えば切断可能に）添付され得る。ある特定の態様において、ナノ粒子は定義された直径のナノビーズであり得、それはナノポア層によって測定されるナノビーズの特性であり得る。ある特定の事例において、本開示の方法、システム、およびデバイスを使用して、サンプル中の複数の異なる検体を同時に分析することができる。かかる分析のために、各々が同族の検体へ特異的に結合する、複数の第２の結合メンバーを使用することができる。異なる第２の結合メンバーの各々は、第２の結合メンバーを同定するために使用され得る異なるサイズにされたナノビーズへ添付することができる。例えば、異なるナノビーズタグは、異なる直径（１ｎｍ、２ｎｍ、４ｎｍ、６ｎｍ、８ｎｍ、１０ｎｍ、１２ｎｍ、１４ｎｍ等、またはより大きなもの（２０ｎｍ、３０ｎｍ、５０ｎｍ、１００ｎｍ、２００ｎｍ、３００ｎｍ、４００ｎｍ、５００ｎｍ、６００ｎｍ、７００ｎｍ、８００ｎｍ、９００ｎｍ、９５０ｎｍ、または９９０ｎｍまで等））を有し得る。

【０１８２】

ある特定の実施形態において、異なる直径のナノビーズはすべて、単一直径のナノポアを有するナノポア層を介して移動させることができ、そこでナノポア中での滞留継続期間、電流インピーダンスの大きさ、またはその組み合わせに基づいて、異なるサイズにされたナノビーズが同定され得る。ある特定の事例において、複数のナノポア層を含有する積層ナノポア層デバイス（そこで、第１の層は第１の直径のナノポアを有し、第２の層は第２の直径のナノポアを有し得る）を使用して、ナノポアを介するまたは横切るナノビーズの移動を検出およびカウントすることができる。複数のナノポア層は、より大きな直径のナノポアを備えた層がより小さな直径のナノポアを有する層の上流に設置されるような様式でアレンジされ得る。例示的な積層ナノポア層はＵＳ２０１２００８０３６１中で開示される。

【０１８３】

本方法においてタグとして使用されて得る例示的なナノ粒子には、直径で５ｎｍ～９５０ｎｍの範囲の金ナノ粒子またはポリスチレンナノ粒子が含まれる。

【０１８４】

ある特定の事例において、タグはポリマー（核酸等）であり得る。タグの存在は、タグのシグナル特徴（ポリマータグのサイズまたは長さと関係するシグナル等）の検出によって決定され得る。ポリマータグのサイズまたは長さは、ポアまたはチャンネル中でのその滞留時間を測定することによって（例えば電流の一時的な遮断の継続時間を測定することによって）決定することができる。

【０１８５】

タグまたは標識の一部であるか、それらのすべてであるか、それらと会合するか、またはそれらへ添付され得る要素には、ナノ粒子；金粒子；銀粒子；銀、銅、亜鉛、または他の金属のコーティングまたは析出物；ポリマー；牽引タグ（本明細書において定義されるような）；磁性粒子；浮遊性粒子；金属粒子；荷電部分；誘電泳動タグ、不純物（例えばクオーツ、ガラスなど）の有無による二酸化ケイ素；ポリ（メタクリル酸メチル）（ＰＭＭＡ）；ポリイミド；窒化ケイ素；金；銀；量子ドット（硫化カドミウム量子ドットが含まれる）；炭素ドット；フルオロフォア；クエンチャー；ポリマー；ポリスチレン；ヤヌス粒子；散乱粒子；蛍光粒子；燐光粒子；球体；立方体；絶縁体；コンダクタ；バーコードを付けるかまたは標識された粒子；多孔質粒子；固体粒子；ナノシェル；ナノロッド；マイクロスフェア；検体（ウイルス、細胞、寄生生物および生物体等）；核酸；タンパク質

；分子認識要素；スペーサー；ＰＥＧ；デンドリマー；電荷修飾物質；磁性材料；酵素；アプタマー配列を含むＤＮＡ；増幅可能なＤＮＡ；ＤＮＡの反復配列；分子認識要素（例えば操作された結合メンバー）により検出可能な要素の融合物またはコンジュゲート；抗抗体アプタマー；抗体結合タンパク質へ指向性のあるアプタマー；吸収または吸着される検出可能な化合物；ヘム；ルシフェリン；発光体；アジドもしくはアルキン（例えば末端アルキンまたは非末端アルキン）または他のクリックケミストリー参加物が含まれる。

【０１８６】

ある特定の実施形態において、タグは、サンプルの迅速な分析を可能にするのに十分に高い捕捉の速度を提供するように選択され得る。ある特定の実施形態において、タグの捕捉速度は、１０秒あたり約１つの事象、５秒あたり１つの事象、１秒あたり１つの事象、またはよりそれ高いものであり得る。ある特定の実施形態において、直線状ポリマータグ（リボースポリマー、デオキシリボースポリマー、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡ、またはＲＮＡ等）を使用することができる。典型的にはＤＮＡの１ｎＭ溶液について、捕捉速度は、塩勾配なしで、２００～８００ｍＶの電圧および１Ｍの塩（ＫＣｌ）濃度により、固体ナノポア（Si_3N_4）を使用して、およそ１事象／秒である。

【０１８７】

ある特定の事例において、直線状ポリマータグ（リボースポリマー、デオキシリボースポリマー、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡ、またはＲＮＡ等）は、これらのタグについての捕捉速度はある特定の適用についてはあまりにも低いかもしれないので、使用しなくてもよい。半球状、球状、または実質的に球状の形であり、ナノポアを介して迅速に移動し、したがってアッセイ継続時間を短縮するタグは、より速いタグのカウントを要求する適用において使用することができる。ある特定の事例において、球状または半球状のタグのサイズは、アッセイのために必要とされる捕捉速度に基づいて選択され得る。例えば、より高い捕捉速度のために、より大きなサイズの球状または半球状のタグが選択され得る。ある特定の事例において、タグは、同じ測定条件下で、直線状タグ（ＤＮＡタグ等）についての捕捉速度よりも約１０倍、３０倍、５０倍、１００倍、３００倍、５００倍、または１０００倍速い捕捉速度を有する、球状のタグ（ナノ粒子／ナノビーズ等）であり得る。

【０１８８】

いくつかの実施形態において、タグは、抗体へコンジュゲートされ得る（例えばＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート）。いくつかの実施形態において、タグは、スペーサーにより抗体へコンジュゲートされ得る（例えばスペーサーを備えたＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート）。いくつかの実施形態において、タグは、オリゴヌクレオチドおよび抗体へコンジュゲートされ得る（例えばＣＰＳＰオリゴヌクレオチド－抗体のコンジュゲート）。いくつかの実施形態において、タグは、スペーサーによりオリゴヌクレオチドおよび抗体へコンジュゲートされ得る（例えばスペーサーを備えたＣＰＳＰオリゴヌクレオチド－抗体のコンジュゲート）。いくつかの実施形態において、タグは、オリゴヌクレオチドへコンジュゲートされ得る（例えばＣＰＳＰオリゴヌクレオチドのコンジュゲート）。いくつかの実施形態において、スペーサーには、ニトロベンジル基、ジチオエチルアミノ、６炭素スペーサー、１２炭素スペーサー、または３－（９－（（３－カルボキシプロピル）（トシル）カルバモイル）アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネートが含まれる。いくつかの実施形態において、スペーサーはニトロベンジル基を含み、タグはＤＮＡ分子である。いくつかの実施形態において、スペーサーはジチオエチルアミノであり、タグはカルボキシル化ナノ粒子である。いくつかの実施形態において、スペーサーは３－（９－（（３－カルボキシプロピル）（トシル）カルバモイル）アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネートであり、タグはオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、スペーサーは６炭素スペーサーまたは１２炭素スペーサーを含み、タグはビオチンである。

【０１８９】

ｆ）切断可能なリンカー

本明細書において記載される方法において使用されるタグは、ジェネリックリンカーによ

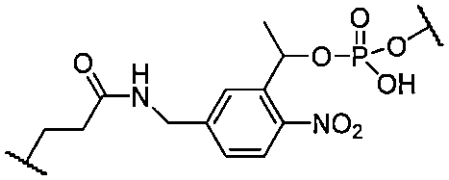
って特異的な結合メンバーへ添付され得る。切断可能なリンカーは、タグを除去できることを保証する。ジェネリックリンカーは切断可能なリンカーであり得る。例えば、タグは切断可能なリンカー経由で第２の結合メンバーへ添付され得る。第１の結合メンバー－検体－第２の結合メンバーの複合体は、切断可能なリンカーの切断を媒介する切断剤へ曝露され得る。リンカーは、任意の好適な方法（酸、塩基、求核剤、親電子性物質、ラジカル、金属、還元剤または酸化剤、光、温度、酵素などへの曝露が含まれる）によって切断することができる。Ｇｒｅｅｎｅ＆Ｗｕｔｓ，Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ中で開示されるように、好適なリンカーは標準的な化学的ブロック基から適合させることができる。固相合成において使用される更に好適な切断可能なリンカーが、Ｇｕｉｌｌｉｅｒ ｅｔ ａｌ．（Ｃｈｅｍ．Ｒｅｖ．１００：２０９２－２１５７，２０００）中で開示される。リンカーは、酸切断可能、塩基切断可能、または光切断可能であり得る。レドックス反応は切断スキームの一部であり得る。切断可能なリンカーは荷電したポリマーであり得る。

【０１９０】

リンカーは、光切断可能なリンカー、化学切断可能なリンカー、または熱切断可能なリンカーであり得る。複数の実施形態において、リンカーは熱感受性切断可能なリンカーであり得る。リンカーが光切断可能な基である場合に、切断剤は光切断可能な基を破壊または切断する、適切な波長の光であり得る。多くの実施形態において、光切断可能な連結基を切断するのに使用される光の波長は、約１８０ｎｍ～４００ｎｍ（例えば約２５０ｎｍ～４００ｎｍ、または約３００ｎｍ～４００ｎｍ）の範囲である。切断を活性化するのに要求される光は、検体の他の構成要素に影響しないことが好ましい。好適なリンカーには、Ｏニトロベンジル化合物およびニトロベラトリル化合物に基づくものが含まれる。ベンゾインケミストリーに基づくリンカーも使用することができる（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６４：３４５４－３４６０，１９９９）。いくつかの実施形態において、光切断可能なリンカーは以下の部分：

【０１９１】

【化１】



に由来し得る。

【０１９２】

あるいは、切断リンカーが化学切断可能な基である場合に、切断剤は基を切断することができる化学薬剤であり得る。化学切断可能なリンカーは、酸化／還元ベースの切断、酸触媒性切断、塩基触媒性切断、または求核置換によって切断され得る。例えば、連結基がジスルフィドである場合、ジチオスレイトールまたはβ－メルカプトエタノールによるチオール媒介性切断を使用してタグを放出することができる。連結基が制限部位であるさらに他の実施形態において、薬剤は、触媒剤（加水分解酵素、制限酵素または連結基を切断する別の酵素であり得る酵素等）である。例えば、制限酵素は、Ｉ型、ＩＩ型およびＩＩＳ型およびＩＩＩ型およびＩＶ型の制限酵素であり得る。

【０１９３】

いくつかの実施形態において、切断リンカーは酵素切断可能な配列である。本明細書における実施形態の任意の一態様において、酵素切断可能な配列は、２、３、４、５、６、７、８、９または１０ヌクレオチド長の核酸配列である。一実施形態において、酵素切断可能な配列は、少なくとも１０ヌクレオチドの配列を含む。一実施形態において、酵素切断可能な配列は、２～２０の間のヌクレオチドの配列を含む。一実施形態において、酵素切断可能な配列は、２～１５の間のヌクレオチドの配列を含む。一実施形態において、酵素

切断可能な配列は、４～１０の間のヌクレオチドの配列を含む。一実施形態において、酵素切断可能な配列は、４～１５の間のヌクレオチドの配列を含む。

【０１９４】

例えば、切断可能なリンカーは、アクリジニウム、酸性条件または穏やかな還元条件（例えばアクリドンおよびスルホンアミドを産生する過酸化水素）によって切断することができる、置換されたベンジルエーテルまたはその誘導体等のエーテル（例えばベンジルヒドリルエーテルおよびインダニルエーテルなど）、穏やかな塩基が産物を放出する役目を果たすことができる場合の、Ｐ－脱離を使用して生成された荷電したポリマー、離脱が特に捕捉カルボニル化合物の存在下において穏やかな酸によって達成される場合の、アセタール（そのチオ類似体が含まれる）、感光性リンケージ（例えばＯ－ニトロベンゾイル、７－ニトロインダニル、２－ニトロベンズヒドリルエーテルまたはエステルなど）、または特に酵素が特異的な配列（第Ｘａ因子またはエンテロキナーゼについてのペプチド等）を認識する場合の、酵素加水分解を受けるペプチドリンカー（例えば酵素切断可能なリンカー）であり得る。リンカーの例には、ジスルフィドリンカー、酸不安定性リンカー（ジアルコキシベンジルリンカーが含まれる）、Ｓｉｅｂｅｒリンカー、インドールリンカー、ｔ－ブチルＳｉｅｂｅｒリンカー、求電子的に切断可能なリンカー、求核的に切断可能なリンカー、光切断可能なリンカー、還元条件、酸化条件下で切断、安全装置付きリンカーの使用による切断、および脱離メカニズムによる切断が含まれるが、これらに限定されない。

【０１９５】

求電子的に切断されるリンカーは、典型的にはプロトンによって切断され、酸へ感受性の切断を包含する。好適なリンカーには、修飾されたベンジル系（トリチル、ｐ－アルコキシベンジルエステルおよびｐ－アルコキシベンジルアミド等）が含まれる。他の好適なリンカーには、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル（Ｂｏｃ）基およびアセタール系が含まれる。チオアセタールまたは他の硫黄含有保護基の切断におけるチオフィリック金属（ニッケル、銀または水銀等）の使用も、好適なリンカー分子の調製のために考慮され得る。

【０１９６】

求核性の切断のために、水中で不安定なエステル等の基（すなわち塩基性ｐＨで単純に切断することができる）および非水性の求核剤に不安定な基を使用することができる。弗化物イオンを使用して、トリイソプロピルシラン（ＴＩＰＳ）またはｔ－ブチルジメチルシラン（ＴＢＤＭＳ）等の基中のシリコン－酸素結合を切断することができる。

【０１９７】

還元切断に感受性のあるリンカーはジスルフィド結合の還元等により使用することができる。パラジウムベースの触媒を使用する触媒的水素添加を使用して、ベンジル基およびベンジルオキシカルボニル基を切断する。

【０１９８】

酸化ベースのアプローチは当技術分野において周知である。これらは、ｐ－アルコキシベンジル基の酸化ならびに硫黄リンカーおよびセレンリンカーの酸化を包含する。二硫化物および他の硫黄またはセレンベースのリンカーを切断するヨウ素水溶液も使用することができる。

【０１９９】

安全装置付きリンカーは、２ステップにおいて切断するものである。好ましい系において、第１のステップは反応性求核中心の生成であり、後続する第２のステップは切断をもたらす分子内環化を含む。例えば、レブリン酸エステルリンケージをヒドラジンまたは光化学により処理して活性アミンを放出することができ、次いでそれを環化して分子中のどこかのエステル切断することができる（Ｂｕｒｇｅｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６２：５１６５－５１６８，１９９７）。

【０２００】

脱離反応も使用することができる。例えば、Ｆｍｏｃおよびシアノエチル等の基の塩基触媒性の脱離ならびにアリル系のパラジウム触媒性の還元的脱離が使用され得る。

【０２０１】
リンカーが熱切断可能なリンカーまたは熱感受性リンカーである場合、切断剤は、熱切断可能な基を破壊または切断する閾値より上への局所的な温度上昇であり得る。いくつかの実施形態において、マイクロ波照射を使用して局所領域において温度を上昇させて、粒子ハイパーサーミアを誘導することができる。粒子ハイパーサーミア方法を使用することができ、それらは、Ｄｕｔｚ　ａｎｄ　Ｈｅｒｇｔ（Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２５：４５２００１（２０１４））中で概説されるもの、ならびに米国特許第７，７１８，４４５号、米国特許第２００３００８２６３３号、国際特許第ＷＯ２００２０２９０７６号および米国特許第２００２０１９７６４５号（それらは各々参照により本明細書に援用される）中で記載されるもの等である。いくつかの実施形態において、温度上昇は、エネルギーを光から吸収標的（色素、顔料、または水等）へ転送することによって光と熱で達成することができる。一態様において、光源はレーザーである。いくつかの実施形態において、高温は、二本鎖ＤＮＡの熱分離を引き起こし得る。

【０２０２】
ｇ）ナノポア層

本開示において、タグ（例えばポリマー、アプタマー、ナノ粒子）の検出および／またはカウントは、ナノポアまたはナノチャンネルを介してまたは横切ってタグを移動させることによって実行され得る。いくつかの実施形態において、タグ（例えばポリマー、アプタマー、ナノ粒子）の検出および／またはカウントは、少なくとも１又は２以上のナノポアまたはナノチャンネルを介してまたは横切ってタグを移動させることによって実行され得る。いくつかの実施形態において、少なくとも２つ（ｔｏ）以上のナノポアまたはナノチャンネルが並んでまたは連続して提示される。いくつかの実施形態において、ナノポアまたはナノチャンネルは、一度に１つ以下のタグ移動のための寸法にされる。したがって、いくつかの実施形態におけるナノポアの寸法は、典型的には検査されるタグの寸法に依存するだろう。二本鎖領域を備えたタグは、全体的に一本鎖のタグの移動のために十分なものよりも大きいナノポア寸法を要求し得る。加えて、ナノ粒子タグ（ナノビーズタグ等）はオリゴマータグよりも大きなポアまたはチャンネルを要求し得る。典型的には、約１ｎｍの直径のポアは一本鎖のポリマーの通過を可能にすることができ、その一方で２ｎｍの直径またはより大きいポア寸法は二本鎖核酸分子の通過を可能にするだろう。いくつかの実施形態において、ナノポアまたはナノチャンネルは、一本鎖のタグについて選択的であり（例えば約１ｎｍ～２ｎｍ未満の直径）、その一方で他の実施形態において、ナノポアまたはナノチャンネルは二本鎖ポリヌクレオチドの通過を可能にするのに十分な直径である（例えば２ｎｍ以上）。選択されたポアサイズは、対象となる検体に至適なシグナル対ノイズ比を提供する。

【０２０３】
いくつかの実施形態において、ポアは、直径約０．１ｎｍ～約１０００ｎｍの間、約５０ｎｍ～約１０００ｎｍの間、約１００ｎｍ～１０００ｎｍの間、約０．１ｎｍ～約７００ｎｍの間、約５０ｎｍ～約７００ｎｍの間、約１００ｎｍ～７００ｎｍの間、約０．１ｎｍ～約５００ｎｍの間、約５０ｎｍ～約５００ｎｍの間、または約１００ｎｍ～５００ｎｍの間であり得る。例えば、ポアは、直径で約０．１ｎｍ、約０．２ｎｍ、約０．３ｎｍ、約０．４ｎｍ、約０．５ｎｍ、約０．６ｎｍ、約０．７ｎｍ、約０．８ｎｍ、約０．９ｎｍ、約１．０ｎｍ、約１．５ｎｍ、約２．０ｎｍ、約２．５ｎｍ、約３．０ｎｍ、約３．５ｎｍ、約４．０ｎｍ、約４．５ｎｍ、約５．０ｎｍ、約７．５ｎｍ、約１０ｎｍ、約１５ｎｍ、約２０ｎｍ、約２５ｎｍ、約３０ｎｍ、約３５ｎｍ、約４０ｎｍ、約４５ｎｍ、約５０ｎｍ、約５５ｎｍ、約６０ｎｍ、約６５ｎｍ、約７０ｎｍ、約７５ｎｍ、約８０ｎｍ、約８５ｎｍ、約９０ｎｍ、約９５ｎｍ、約１００ｎｍ、約１５０ｎｍ、約２００ｎｍ、約２５０ｎｍ、約３００ｎｍ、約３５００ｎｍ、約４００ｎｍ、約４５０ｎｍ、約５００ｎｍ、約５５０ｎｍ、約６００ｎｍ、約６５０ｎｍ、約７００ｎｍ、約７５０ｎｍ、約８００ｎｍ、約８５０ｎｍ、約９００ｎｍ、約９５０ｎｍ、または約１０００ｎｍであり得る。

【０２０４】
一般に、ナノポアはナノチャンネルよりも長さがより短い。ナノチャンネルはナノポアよりも実質的に長く、分子がナノチャンネルを介して移動するのに要する時間を増加させる（同じ直径のナノポアを介してまたは横切って移動する時間と比較して）ことが所望される適用において有用であり得る。ナノポアの長さは、約０．１ｎｍ～約２００ｎｍ未満の範囲であり得る。ナノチャンネルの長さは、約５００ｎｍ～約１００μｍ、またはより長い範囲であり得る。ナノポアおよびナノチャンネルの直径は類似し得る。
【０２０５】
様々なタイプのナノポアはタグ／アプタマーの分析のために使用され得る。これらには、とりわけ、膜中に包埋された生体ポアまたは生体チャンネルを用いる生体ナノポアが含まれる。別のタイプのナノポア層は、チャンネルまたはポアが、製作または彫刻された固体構成要素（シリコン等）から全体的または部分的に作製される、固体ナノポアである。いくつかの実施形態において、ナノポアは、制御された誘電破壊を使用して産生された固体ナノポアである。いくつかの実施形態において、ナノポアは、制御された誘電破壊以外の方法によって産生された固体ナノポアである。
【０２０６】
ある特定の実施形態において、ナノポアの長さは約２００ｎｍまで、例えば約０．１ｎｍ～約３０ｎｍ、約１０～約８０ｎｍ、約１～約５０ｎｍ、約０．１ｎｍ～約０．５ｎｍ、約０．３ｎｍ～約１ｎｍ、約１ｎｍ～約２ｎｍ、約０．３ｎｍ～約１０ｎｍ、または約１０～約３０ｎｍであり得る。ナノポア層中のナノポアの数は、約１、２、３、４、５、１０、３０、１００、３００、１０００、３０００、１００００、３００００、１０００００、３０００００、またはそれ以上であり得る。中心から中心の間の層中のナノポア間の距離は、約１００ｎｍ～約３００ｎｍ、約３００ｎｍ～約５００ｎｍ、約５００ｎｍ～約１０００ｎｍ、例えば１００ｎｍ、１５０ｎｍ、２００ｎｍ、または３００ｎｍであり得る。
【０２０７】
ある特定の実施形態において、タグ（例えばポリマー、アプタマー、ナノ粒子）の検出および／またはカウントのために、複数のナノポア層（各々は１又は２以上のナノポアを含有する）を、互いに連続してアレンジすることができる。この事例において、タグの検出および／またはカウントは、各々のナノポア層を介してまたは横切ってタグを移動させることによって実行され得る。それゆえ、層／シート／膜中のナノポアを介してまたは横切って移動するタグの数のカウントは、１又は２以上の層／シート／膜中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動する複数のタグをカウントすることを指す。ある特定の実施形態において、２つ以上のナノポア層が存在する（例えば１、２、３、４、５、６、または技術的に実現可能なナノポア層の他の数）場合に、随意に、それらは、連続（そこで、１つの層中の少なくとも１つのナノポアが、別の層中の別のナノポアと分離してまたはその上に積み重ねられて（例えばその上方にまたはその上部に）ある、など）で存在する。ナノポア層が連続である場合に、少なくとも２つの電極を使用して、ポアを介してタグを駆動する電界を生ずることができ、随意に、ナノポア層の間に位置させた追加の電極は駆動電流を更に提供することができる。
【０２０８】
ｉ）生体ポア
タグ／アプタマーの検出および随意にカウントのために、タグの移動を可能にするチャンネル寸法を備えた任意の生体ポアを使用することができる。２つの広いカテゴリーの生体チャンネルが、本明細書において開示される方法に好適である。非電圧ゲート型チャンネルは、チャンネルを活性化または開口する膜電位の変化を要求せずに、ポアを介する分子の通過を可能にする。その一方で、電圧ゲート型チャンネルは、チャンネル開口を活性化する特定の範囲の膜電位を要求する。生体ナノポアによる大部分の研究は、α－溶血素（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓにおいて見出された、約１０ｎｍの長さのマッシュルーム型のホモオリゴマー七量体のチャンネル）を使用している。各々のサブユ

ニットは２つのβストランドに寄与して、１４ストランドの逆平行のβバレルを形成する。βバレル構造によって形成されるポアはおよそ２．６ｎｍの直径を備えた入口を有し、その入口はリジン残基のリングを含有し、約３．６ｎｍの直径の内部空洞の中へ開口する。溶血素ポアのステム（それは脂質二分子膜を貫通する）は約２．０ｎｍの平均内径を有し、前庭とステムとの間に１．５ｎｍの狭窄がある。ステムの寸法は、二本鎖核酸ではなく一本鎖の核酸の通過に十分である。したがって、α－溶血素のポアは、一本鎖のポリヌクレオチドおよび類似する寸法の他のポリマーについての選択的ナノポアとして使用することができる。

【０２０９】

他の実施形態において、生体ナノポアは、一本鎖の核酸よりも大きなポリマーの通過について十分な寸法である。例示的なポアは、ミトコンドリアのポリンタンパク質（ミトコンドリア外膜中に局在化した電位依存陰イオンチャンネル（ＶＤＡＣ））である。ポリンタンパク質は精製形状で利用可能であり、人工脂質二重層へと再構成される場合に、二本鎖核酸の通過を可能にすることができる機能的チャンネルを生成する（Ｓｚａｂｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８，ＦＡＳＥＢ　Ｊ．１２：４９５－５０２）。構造研究により、ポリンが１３または１６のストランドを備えたβバレルタイプ構造も有することが示唆される（Ｒａｕｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍ　２００：９０８－９１５）。ポリンは、α－溶血素、マルトポリン（ＬａｍＢ）、およびグラミシジンによって形成されたポアのコンダクタンスと比較して、より大きなコンダクタンスを提示する。ポリンのより大きなコンダクタンス特性は、ポリンチャンネルが二本鎖核酸の通過のために十分な寸法であることを示す研究を支持する。ポリン分子のポア直径は４ｎｍと推定される。非コイル性二本鎖核酸の直径は約２ｎｍであることが推定される。

【０２１０】

二本鎖ポリヌクレオチドのスキャンに好適であり得る別の生体チャンネルはＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓにおいて見出されたチャンネルである（Ｓｚａｂｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：２５２７５－２５２８２）。Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓから作製され人工膜の中へ取り込まれた原形質膜小胞は、膜を横切る二本鎖ＤＮＡの通過を可能にする。Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ膜調製物によって形成されたチャンネルのコンダクタンスは、ミトコンドリアのポリンのコンダクタンスに類似する。これらのチャンネルの特性評価（例えば精製形状）は不完全であるが、本明細書において目的のために精製形状を有することは必要ではない。原形質膜調製物の希釈（適切な界面活性剤中で可溶化することまたは十分な表面面積の人工脂質膜の中へ組み入れることのいずれかによって）は、検出装置中で単一チャンネルを単離することができる。適切に時間を計った洗浄によって人工膜と膜調製物（またはタンパク質調製物）の接触の継続期間を限定することは、人工脂質二重層の中へ単一チャンネルを取り込む別の方法を提供する。コンダクタンス特性を使用して、二重層の中へ取り込まれたチャンネルを特徴づけることができる。

【０２１１】

ある特定の事例において、ナノポアはハイブリッドナノポアであり得、そこで生体ポアは固体ナノポア（例えば非生体材料で製作されたナノポア）中に導入される。例えば、α－溶血素ポアは固体ナノポアの中へ挿入され得る。ある特定の事例において、ナノポアは、Ｈａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２８　Ｎｏｖｅｍｂｅｒ　２０１０，ｖｏｌ．５，ｐｇ．８７４－８７７中で記載されるハイブリッドナノポアであり得る。

【０２１２】

ｉｉ）固体ポア

他の実施形態において、タグの分析は、非生体材料から製作されたナノポアまたはナノチャンネルを介してまたは横切ってタグを移動させることによって実行される。ナノポアまたはナノチャンネルは、多くの異なる技法（とりわけ、化学析出、電気化学析出、電気めっき、電子ビーム彫刻、イオンビーム彫刻、ナノリソグラフィー、化学エッチング、レー

ザーアブレーション、集束イオンビーム、原子層堆積、および当技術分野において周知の他の方法が含まれる）を使用して、様々な固体材料から作製することができる（例えばＬｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，Ｎａｔｕｒｅ　４１２：１６６－１６９；およびＷＯ２００４／０８５６０９を参照）。

【０２１３】

特定の実施形態において、ナノポアは、ＷＯ１３１６７９５２Ａ１またはＷＯ１３１６７９５５Ａ１中で記載されるナノポアであり得る。ＷＯ１３１６７９５２Ａ１またはＷＯ１３１６７９５５Ａ１中で記載されるように、正確で一様なポアサイズを有するナノポアは、膜中で形成されるナノポアを正確に拡大させることによって形成され得る。本方法は、ナノポアを横切る高電位を適用すること；ナノポアを介する電流の流れを測定すること；測定された電流に部分的に基づいてナノポアのサイズを決定すること；およびナノポアのサイズが所望されるサイズに対応する時に、ナノポアへ適用された電位を除去することによって、ナノポアを拡大させることを包含し得る。ある特定の事例において、適用される電位は高値と低値との間で振動するパルス波形を有することができ、電位が低値でナノポアへ適用されている間に、ナノポアを介する電流の流れを測定することができる。

【０２１４】

固体材料には、任意の公知の半導体材料、絶縁材料、および絶縁材料によりコートされた金属が含まれ、これらは例示のためであり限定するものではない。したがって、少なくともナノポア（複数可）の一部は、シリコン、シリカ、シリセン、酸化ケイ素、グラフェン、窒化ケイ素、ゲルマニウム、砒化ガリウム、または金属、金属酸化物、および絶縁材料によりコートされた金属コロイドを、限定されずに含み得る。

【０２１５】

ナノメートル寸法のポアを作製するために、様々なフィードバック手順を製作プロセスにおいて用いることができる。イオンが孔を介して通過する複数の実施形態において、固体材料を介するイオン流の検出は、製作の間に生成されたポアサイズを測定する手法を提供する（例えば米国特許出願第２００５／０１２６９０５号を参照）。他の実施形態において、電極がポアのサイズを定義する場合に、電極間の電子トンネル電流は、電極間のギャップに関する情報を与える。トンネル電流の増加は、電極間のギャップ空間の減少を指摘する。他のフィードバック技法は当業者へ明らかである。

【０２１６】

いくつかの実施形態において、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００３，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　２：６１１－６１５中で記載されるように、ナノポアはイオンビーム彫刻を使用して製作される。いくつかの実施形態において、ＷＯ１３１６７９５２Ａ１またはＷＯ１３１６７９５５Ａ１中で記載されるように、ナノポアは高電流を使用して製作される。他の実施形態において、ナノポアは、電子ビームリソグラフィーおよび高エネルギー電子ビーム彫刻の組み合わせによって作製され得る（例えばＳｔｏｒｍ　ｅｔ　ａｌ．，２００３，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　２：５３７－５４０を参照）。イオンビームスパッタリング技法によって好適なナノポアを生成するための類似のアプローチは、Ｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００４，Ｂｉｏｐｈｙ　Ｊ　８７：２９０５－２９１１中で記載される。ナノポアは、極薄フィルムの産生のための一般的技法と組み合わせた金属酸化膜半導体（ＣＭＯＳ）上での集束高エネルギー電子ビームによるリソグラフィーを使用して形成される。他の実施形態において、ナノポアは、窒化ケイ素の彫刻によって、米国特許第６，６２７，０６７号；第６，４６４，８４２号；第６，７８３，６４３号；および米国公報第２００５／０００６２２４号中で提供されるように構築される。

【０２１７】

いくつかの実施形態において、ナノチャンネルは金または銀のナノチューブとして構築することができる。これらのナノチャンネルは、多孔質材料の鋳型（トラックエッチング法を使用して調製されたポリカーボネートフィルター等）を使用し、多孔質材料の表面上に金または他の好適な金属を堆積させて、形成される。トラックエッチングされたポリカーボネート膜は、高エネルギー核子（それは膜材料中にトラックを生ずる）への固体膜材料

の曝露によって典型的には形成される。次いで、化学エッチングはエッチングされたトラックをポアへ変換するために用いられる。形成されたポアの直径は約１０ｎｍ以上である。核子の強度の調整は、膜中に形成されたポアの密度を制御する。ナノチューブは、無電解めっき方法によってトラックエッチングされたポアの中へ金属（典型的には金または銀）を堆積させることによって、エッチングされた膜上に形成される（Ｍｅｎｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５，Ａｎａｌ　Ｃｈｅｍ　６７：１９２０－１９２８）。この金属堆積方法は、ポア材料の表面上に堆積させた触媒を使用し、次いでそれをＡｕ（Ｉ）および還元剤を含有する溶液の中へ浸漬する。Ａｕ（Ｉ）の金属Ａｕへの還元が触媒を含有する表面上で発生する。インキュベーション時間を増加させることがフィルター材中のポアの内径を減少させるように、堆積した金の量はインキュベーション時間に依存する。したがって、ポアサイズはポア上に堆積した金属の量の調整によって制御され得る。もたらされたポア寸法は、様々な技法（例えば、単純拡散を使用する気体輸送特性、またはポアを介するパッチクランプタイプの系を使用してイオン流を測定することによって）を使用して測定される。支持材料は、インタクトのままにしておくか、または金のナノチューブを残すように除去されるかのいずれかである。無電解めっき技法は、直径で約１ｎｍ未満～約５ｎｍ、または必要に応じてより大きなポアサイズを形成することができる。約０．６ｎｍのポア直径を有する金のナノチューブは、Ｒｕ（ｂｐｙ）２＋２およびメチルビオローゲンを識別するようであり、金のナノポアの選択性を実証する（Ｊｉｒａｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７８：６５５－６５８）。金のナノチューブ表面の修飾は、チオール含有化合物を金表面へ添付することによって、または他の官能基による金表面の誘導体化によって容易に達成される。この特色は、ポア修飾化合物に加えて、本明細書において議論されるような検知標識の添付を可能にする。デバイス（本明細書において記載される生体ポアのために使用されるシス／トランス装置等）を金のナノポアと共に使用して、単一コードの分子を分析することができる。

【０２１８】

タグを検出する様式が、タグを介する電流の流れ（例えば電子トンネル電流）を包含する場合、固体膜は様々な技法によって金属化され得る。伝導層を膜の両側上に堆積させて、鎖の長さに沿ってタグを問い合わせるために好適な電極（例えば縦向きの電子トンネル電流）を生成することができる。他の実施形態において、伝導層を膜の１つの表面上に堆積させて、ポアを横切ってタグを問い合わせるために好適な電極（例えば横断したトンネル電流）を形成することができる。伝導性材料を堆積させる様々な方法が公知であり、それらには、スパッタ堆積（すなわち物理蒸着）、非電解析出（例えばコロイド懸濁）および電解析出が含まれる。他の金属堆積技法は、フィラメント蒸着、金属層蒸着、電子ビーム蒸着、フラッシュ蒸着、および誘導蒸着であり、当業者に明らかである。

【０２１９】

いくつかの実施形態において、イオンビームが金属のブロックに衝突し、金属原子を蒸発させ、次いでそれが薄フィルムの形状でウエハ材料上に堆積するところで、検出電極はスパッタ堆積によって形成される。使用されるリソグラフィー方法に依存して、次いで、金属フィルムは反応性イオンエッチングを用いてエッチングされるか、または化学機械研磨を使用して研磨される。金属フィルムは前形成されたナノポア上に堆積されるか、またはポアの製作の前に堆積され得る。

【０２２０】

いくつかの実施形態において、検出電極は電着によって製作される（例えばＸｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００５，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．４４：１２６５－１２６８；Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｐｈｙｓｉｃｓ　Ｌｅｔｔ．７７（２４）：３９９５－３９９７；および米国特許出願第２００３／０１４１１８９号を参照）。この製作プロセスは、固体フィルムの１つの面上に位置するナノポアおよび対応する検出電極の生成のために（横断した電子トンネル現象の検出等のために）好適である。最初に、従来のリソグラフィープロセスを使用して、二酸化ケイ素層（それはシリコンウエハ上で支持される）上でペアの直面する電極を形成する。電解質溶液は電極をカバーし、金属イオ

ンは電極ペアを介して電流を流すことによって電極のうちの１つの上に堆積する。電極上での金属の堆積は電極間のギャップ距離を経時的に減少させ、検出電極だけでなく、コード分子の移動のためにナノメートルの寸法であるギャップも生ずる。電極間のギャップ距離は多くのフィードバックプロセスによって制御され得る。

【０２２１】

検出が電荷誘導性電界効果の画像化に基づく場合、米国特許第６，４１３，７９２号および米国特許第２００３／０２１１５０２号中で記載されるように、半導体を製作することができる。これらのナノポアデバイスを製作する方法は、他の固体ナノポアを製作するために用いられるものに類似する技法を使用することができる。

【０２２２】

更に後述されるように、タグ（ポリヌクレオチド等）の検出が実行される。タグの分析のために、ナノポアは様々なフォーマットで構成され得る。いくつかの実施形態において、デバイスは、２つのリザーバー（シスチャンバーおよびトランスチャンバーとも称される）の間で保持される、ナノポアを含有する膜（生体または固体のいずれか）を含む（例えば米国特許第６，６２７，０６７号を参照）。２つのチャンバーの間での電子移動のための導管は２つのチャンバーの電気的接触を可能にし、２つのチャンバーの間の電圧バイアスはナノポアを介するタグの移動を駆動する。米国特許第６，０１５，７１４号および第６，４２８，９５９号；ならびにＫａｓｉａｎｏｗｉｓｃｚ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９３：１３７７０－１３７７３（それらの開示は参照により本明細書に援用される）中で記載されているように、この立体配置の変形はナノポアを介する電流の流れの分析において使用される。

【０２２３】

上記のデバイスの変形が米国出願第２００３／０１４１１８９号中で開示される。電着によって製作されたペアのナノ電極は基板表面上に位置する。これらの電極は直面し、単一核酸の通過のために十分なギャップ距離を有する。絶縁材料はナノ電極を保護し、核酸の検出のためにナノ電極のチップのみを露出する。絶縁材料およびナノ電極は、チャンバーを、サンプルリザーバーおよびポリマーが移動によって送達されるチャンバーとして分離する。カソード電極およびアノード電極は、サンプルチャンバーから送達チャンバーへタグを駆動するための電気泳動電界を提供する。

【０２２４】

ナノポアを介してタグを駆動するのに使用される電流バイアスは、ナノポアを介して方向付けられた電界の適用によって生成することができる。いくつかの実施形態において、電界は定電圧または定電流のバイアスである。他の実施形態において、タグの動きは電気泳動電界パラメーターのパルス作動を介して制御される（例えば米国特許第２００３／１４１１８９号および米国特許第６，６２７，０６７号を参照）。電流のパルスは、定義された時間的な期間で、１塩基またはわずか数塩基のオリゴヌクレオチドタグをポアを介して正確に移動させ、タグをポア内で短時間保持する方法を提供することができ、それによって、タグの電気的特性のより高い分解能を提供する。

【０２２５】

ナノポアデバイスは、ナノポアを介して通過するように、オリゴヌクレオチドタグの方向性を制限するための電界または電磁界を更に含むことができる。この保持界を使用して、ポア内でのオリゴヌクレオチドタグの動きを減少させることができる。いくつかの実施形態において、移動の方向に直交性の電界は、ナノポア内でのタグ分子の動きを制限するために提供される。これは、サンプルプレートより上および下の２つの平行な伝導板の使用によって、米国出願第２００３／０１４１１８９号中で図示される。これらの電極はタグ分子の移動の方向に直交性であり、したがってサンプルプレートのうちの１つにタグ分子を保持している電界を生成する。負に荷電したＤＮＡの主鎖、または１つのストランド上に負電荷を有するように修飾された核酸を、陽極のプレートの上へ配向させ、それによって、タグ分子の動きを限定する。

【０２２６】

さらに他の実施形態において、タグの位置の制御は、米国出願第２００４／０１４９５８０号中で記載される方法によって実行され、それは、ナノポアの近くまたは上の電極のシリーズの位置を経由してポア中で生じた電磁界を用いる。これらの実施形態において、電極の１つのセットは直流電圧および高周波電位を適用し、その一方で第２のセットの電極は反対の直流電圧および高周波電位（電極の第１のセットによって生成される高周波電位に関して１８０度シフトした相である）を適用する。この高周波四端子は、この電磁界の中心（すなわちポアの中心）中に荷電粒子（例えば核酸）を保持する。

【０２２７】

例示的な実施形態において、ナノポア膜は伝導層および誘電体層の多層のスタックであり得、そこでは、包埋された伝導層または伝導層ゲートは、タグが移動するナノポア中およびその周囲に、適切にコントロールされ測定可能な電界を提供する。一態様において、伝導層はグラフェンであり得る。例えば、積層ナノポア膜の実施例は、ＵＳ２００８０１８７９１５およびＵＳ２０１４０１７４９２７中で見出される。

【０２２８】

ナノポアが、膜、層、または他の基板（これらの用語は、ナノポアを含む２次元基板を記載するのに互換的に使用される）中に所在し得ることは理解される。

【０２２９】

ある特定の実施形態において、ナノポアは、ナノポアを使用して、検体を検出および／またはその濃度を決定するためのアッセイプロセスの一部として形成され得る。具体的には、ナノポアを使用して、検体を検出および／またはその濃度を決定するためのデバイスは、膜または層中で形成されたナノポアなしに最初に提供され得る。デバイスは、膜の反対の側面上の２つのチャンバー（シスチャンバーおよびトランスチャンバー）を分離する膜を含むことができる。シスチャンバーおよびトランスチャンバーは塩溶液を含み、電源へ接続され得る。ナノポアを膜中で生じる場合に、電圧はシスチャンバーおよびトランスチャンバー中の塩溶液へ適用され、膜を介するコンダクタンスが測定される。ナノポアを生じる前に、膜を横切って測定される電流はないかまたは最小である。ナノポアを生じた後に、膜を横切って測定される電流は増加する。電圧は、所望される直径のナノポアを生ずるのに十分な時間の量で適用され得る。ナノポアを生じた後に、検体またはタグはナノポアを介して移動し、移動事象は検出され得る。ある特定の実施形態において、ナノポア生成に加えて、ナノポアを介する検体またはタグの移動の検出のために、同じ塩溶液を使用することができる。任意の好適な塩溶液は、ナノポアを生ずるおよび／またはナノポアを介して検体またはタグを移動させるために利用され得る。標識のカウントを損なわない任意の塩溶液を使用することができる。例示的な塩溶液には、塩化リチウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、および同種のものが含まれる。塩溶液の所望される伝導率に基づいて、塩溶液の濃度を選択することができる。ある特定の実施形態において、塩溶液は、１ｍＭ～１０Ｍ（例えば１０ｍＭ～１０Ｍ、３０ｍＭ～１０Ｍ、１００ｍＭ～１０Ｍ、１Ｍ～１０Ｍ、１０ｍＭ～５Ｍ、１０ｍＭ～３Ｍ、１０ｍＭ～１Ｍ、３０ｍＭ～５Ｍ、３０ｍＭ～３Ｍ、３０ｍＭ～１Ｍ、１００ｍＭ～５Ｍ、１００ｍＭ～３Ｍ、１００ｍＭ～１Ｍ、５００ｍＭ～５Ｍ、５００ｍＭ～３Ｍ、または５００ｍＭ～１Ｍ、１０ｍＭ、３０ｍＭ、１００ｍＭ、５００ｍＭ、１Ｍ、３Ｍ、５Ｍ、または１０Ｍ等）の範囲の濃度を有することができる。

【０２３０】

いくつかの実施形態において、ナノポアはブロックされるようになり得、ブロックされたナノポアは、ナノポアの層または膜を横切って電極によって適用された電圧のパターンの修飾によって消去される。いくつかの事例において、ブロックされたナノポアは、ナノポアの層または膜を横切る電圧の極性を逆にすることによって消去される。いくつかの事例において、ブロックされたナノポアは、ナノポアの層または膜を横切って適用された電圧の大きさを増加させることによって消去される。電圧の増加は一時的な増加であり得、１０秒（ｓ）以下（例えば８ｓ以下、６ｓ以下、５ｓ以下、４ｓ以下、３ｓ以下、２ｓ以下、１ｓ以下、０．５ｓ以下、０．４ｓ以下、０．３ｓ以下、０．２ｓ以下、０．１ｓ以下

が含まれる）続く。
【０２３１】
ｈ）シグナル検出
ナノポアを介するまたは横切る移動によってタグ／アプタマーを問い合わせることおよび検出可能な特性を検出することは、シグナルを生成し、そのシグナルは、タグ／アプタマーをカウントする（すなわち量または濃度を決定する）ことおよび／または同定する（すなわちその存在を決定する）ことに使用することができる。用いられた検出方法のタイプは、タグについて検出されている特性へ対応し得る。
【０２３２】
いくつかの実施形態において、検出可能な特性は、タグがポアを介して移動するときのナノポアの電気的特性についてのタグの効果である。ナノポアの電気的特性には、とりわけ、電流振幅、インピーダンス、継続時間、および周波数が含まれる。ある特定の事例において、タグはナノポア力分光法の使用によって同定することができる（例えばＴｒｏｐｉｎｉ Ｃ．ａｎｄ Ｍａｒｚｉａｌｉ Ａ．，Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ，２００７，Ｖｏｌ．９２，１６３２－１６３７を参照）。ポアの電気的特性の検出のためのデバイスは、薄フィルムまたは膜等の層の中へ取り込まれたナノポアを含むことができ、そこでフィルムまたは膜は、伝導性ブリッジによって接続されたシスチャンバーおよびトランスチャンバーを分離する。分析されるタグは、典型的には１又は２以上の溶解された塩（塩化カリウム等）を含む水溶液中のナノポアのシス側面上に存在し得る。ナノポアのシス側面およびトランス側面中に位置する電極を使用するポアを横切る電界の適用は、ナノポアを介するタグの移動を引き起こし、それはポアを介するイオンの移動に影響し、それによって、ポアの電気的特性を改変する。電流を好適な時間周波数で測定して、電流シグナルパターンを検出するのに十分なデータポイントを得ることができる。次いで生成されたシグナルパターンは、参照パターンのセットと比較することができ、そこで各々の参照パターンは、既知の検体濃度を備えたサンプル中の検体へ結合されている既知のタグの単一集団の検査から得られる。これまでに指摘されたように、ナノポア（複数可）を介して移動する同じタイプのタグの数は、単位時間あたりでカウントすることができる（１５分間、１３分間、１０分間、８分間、６分間、４分間、２分間、１分間、３０秒あたり、２０秒あたり、１５秒あたり、１０秒あたり、５秒あたり、１秒あたり、１００ミリ秒、１０ミリ秒あたり、または１ミリ秒あたりのナノポア（複数可）を介してまたは横切って移動する同じタイプのタグの数等）。いくつかの事例において、ナノポア(複数可）を介して移動する同じタイプのタグの数を、ある特定の時間の期間についてカウントして、閾値カウントに到達する時間の量を決定する。電流振幅、電流継続時間、電流周波数、および電流の大きさにおけるシフトは、タグについてのシグナルパターンを定義し、異なるタグを互いに識別するために使用することができる。ナノポアの電流特性の測定（パッチクランプ技法によって等）は、上で議論された出版物および様々な参照研究（例えばＨｉｌｌｅ，Ｂ，２００１，Ｉｏｎ Ｃｈａｎｎｅｌｓ ｏｆ Ｅｘｃｉｔａｂｌｅ Ｍｅｍｂｒａｎｅｓ，３ｒｄ Ｅｄ．，Ｓｉｎａｕｅｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，Ｍａｓｓ）中に記載される。時間的な期間にわたって測定されたカウントの数（カウント／時間）は、ナノポアを介してまたは横切って移動する分子（例えばタグ）の濃度へ比例する。タグの濃度はスタンダードカーブの生成によって決定することができる。例えば、異なる濃度のスタンダード分子のシリーズをナノポアを介して移動させ、カウント／時間を測定して各々の濃度についてのカウント率を計算することができる。測定されているタグのカウント率をスタンダードカーブと比較して、タグの濃度を計算する。
【０２３３】
いくつかの実施形態において、タグの検出可能な特性は電子の量子トンネル現象であり得る。量子トンネル現象は、粒子の量子波特性による古典的な禁制エネルギー状態を介して移行する量子機械的効果である。電位障壁がドナーとアクセプターとの間の電子の動きについて存在するところで、電子トンネル現象が発生する。電子トンネル現象を検出するために、微細加工電極チップは試料から約２ナノメートルで位置し得る。適切な分離距離で

、電子はチップとサンプルとの間の領域を介してトンネル現象を起こし、電圧がチップとサンプルとの間に適用されるならば、電子の正味電流（すなわちトンネル現象電流）は電圧バイアスの方向でギャップを介して流れる。ナノデバイスがトンネル現象電流の測定のために検出電極を使用する場合に、検出電極とタグとの間に電子トンネル現象が存在するように、電極は移動するタグに近接して位置する。以下で更に議論されるように、移動するタグに関する電極のアレンジは、タグを介して発生する電子伝達のタイプを規定し得る。

【０２３４】

いくつかの実施形態において、タグの分析は、核酸鎖を介して発生する電流の流れ（すなわち核酸鎖に長手方向に沿って）を検出することを包含し得る（Ｍｕｒｐｈｙ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９１（１２）：５３１５－９）。電子トンネル現象はＤＮＡの輸送特性についての１つの説明として与えられるが、電子転送の正確なメカニズムは未知である。しかしながら、二本鎖核酸を介する電子伝達の根底にある物理学は、本明細書における目的を限定しておらず、核酸を介して流れる電流の検出は、１つのポリマータグと別のポリマータグを識別する役目を果たす。タグ分子鎖を介して長手方向に発生する電子流の検出のために、延長するタグ分子の鎖に平行な電極間にギャップがあるように、検出電極は、タグ分子の移動の方向に長手方向に位置させることができる。様々な実施形態において、検出電極は、ナノポアの２つの側面を分離する層（複数可）（例えば膜）の反対の側面上に設置させることができ、その一方で、他の実施形態において、検出電極は、ナノポアの２つの側面を分離する層（複数可）内に位置させることができる。

【０２３５】

核酸中の電子流の別のモードは、核酸を横切って、例えば延長する核酸鎖を横断する方向で（例えば二本鎖核酸の直径を横切って）、発生するものである。二本鎖核酸中で、電子伝達が対合塩基を介して発生し、その一方で、一本鎖核酸中で、電子伝達が単一非対合塩基を介して発生し得る。さらに、化学組成物、水和構造、荷電したイオンとの相互作用、各々の塩基の空間的方向性、および異なる塩基対合の組み合わせにおける差は、電子伝達の横断の特徴を改変することができ、したがって配列および／またはポリマー骨格中の異なるタグ分子を識別する根拠を提供する。タグ分子を横切る（すなわち延長する核酸鎖を横断する）電子流の検出のために、検出電極はナノポアの側面上に位置してナノポアを介してではなくタグ分子を横切って問い合わせる。

【０２３６】

長手方向の検出または横断した検出の実施形態において、電極の厚みにより、電極によって問い合わせられた塩基の総数を決定することができる。横断した検出のために、検出電極のチップは、単一核酸塩基（本明細書において定義されるような）を問い合わせて、それによって、単一塩基分解能を得るような寸法にすることができる。他の実施形態において、検出電極の寸法は２つ以上の核酸塩基を問い合わせるようにアレンジされる。したがって、いくつかの実施形態において、どの時点においても問い合わせられる核酸塩基の数は、タグ分子の様々なポリマー配列における差を検出するのに要求される分解能に依存して、約２以上、約５以上、約１０以上、または約２０以上であり得る。

【０２３７】

他の実施形態において、タグの構造における差は静電容量における差として検出することができる。このタイプの測定はＵＳ２００３／０１４１１８９において例証される。静電容量は、定義された適用される周波数およびインピーダンスで、適用されるａｃ電圧における位相シフトを引き起こす。各々の核酸塩基についての位相シフトの特徴は、既知の配列および構造の核酸について決定され、個々の塩基の特徴の同定のための参照スタンダードとして使用される。最近傍分析により、単一核酸塩基を越えて延長する静電容量測定が可能になる。

【０２３８】

他の実施形態において、米国特許第６，４１３，７９２号および米国特許出願第２００３／０２１１５０２号（それらの開示は参照により本明細書に援用される）中で記載されて

いるように、検出技法は電荷誘導電界の画像化に基づき得る。電荷誘導電界に基づくタグの検出のために、上記の半導体デバイスが使用される。電流の流れのためのチャンネルが半導体中に形成されるならば、源領域と排水領域との間への電圧の適用は、源から排水への電流の流れをもたらす。各々の核酸塩基は関連する電荷を有するので、半導体ポアを介するタグ分子の通過は、ポアを裏打ちする半導体材料の伝導率の変化を誘導し、それによって、規定された大きさおよび波形の電流を誘導する。異なる大きさおよび波形の電流は、塩基の電荷、電荷分布、およびサイズにおける差に起因して、異なる塩基によって産生される。米国特許第６，４１３，７９２号中で開示される実施形態において、ポリマーはｐ型のシリコン層から形成されたポアを介して通過する。タグ分子の移動は、上記のように、他のタイプのチャンネルを介してポリマーを動かすのに使用されるものに類似する方法によって達成される。電流の大きさがミクロアンペアの範囲のオーダーであると予想され、それは電子トンネル現象によって検出される予想のピコアンペアの電流よりもはるかに高い。タグ分子中のポリマーブロック領域が単一核酸塩基を越えるものを含むので、これらのブロックポリマー領域は、ブロックポリマー領域の電荷および電荷分布を反映する際立ったシグナルを産生するに違いない。

【０２３９】

上の記載は個々の検出技法に関係するが、いくつかの実施形態において、単一タグ分子を検査するのに複数の異なる技法が使用され得ることが理解される（例えばＫａｓｓｉｅｓｅｔ　ａｌ．，２００５，Ｊ　Ｍｉｃｒｏｓｃ　２１７：１０９－１６を参照）。複数の検出モードの例には、とりわけ、電子トンネル電流と組み合わせた電流遮断、および電荷誘導電界の画像化と組み合わせた電流遮断が含まれる。異なる検出モードによる同時の検出は、異なる検出モード間でもたらされたシグナルの検出時間を相関させることによって、タグ分子の同定に使用することができる。

【０２４０】

いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの数を測定すること、または層を介するタグの移動を検出することは、ナノポア上でのタグの電流遮断効果を観察することを包含する。いくつかの実施形態において、電流遮断効果が閾値より上である場合に、検体はサンプル中に存在する。

【０２４１】

３．検体分析のためのデバイス

本開示は、ナノポアデバイスと併用して使用されるマイクロ流体デバイスおよび集積マイクロ流体ナノポアデバイスを記載する。ナノポアデバイスと併用して使用される開示されるマイクロ流体デバイスおよび集積マイクロ流体ナノポアデバイスは、上記のように、検体分析の方法において使用され得る。しかしながら、ある特定の事例において、本明細書において記載されるデバイスは、他の適用のために使用され得る。同様に、ある特定の事例において、本明細書において記載される方法は他のデバイスにより使用され得る。

【０２４２】

ナノポアデバイスと併用して使用されるマイクロ流体デバイスは、図１Ａおよび１Ｂ中で描写される。マイクロ流体デバイス１０は、ナノポアデバイス１５中で分析される流体小滴１１と共に描写される。流体小滴は、ナノポアデバイスを使用してカウントされるタグ（例えば切断されたタグまたはアプタマー）を含むことができる。ナノポアデバイス１５は、第１のチャンバー１６、ナノポア１８を備えた層１７、および第２のチャンバー１９を含む。図１Ａおよび１Ｂは、流体小滴１１がマイクロ流体デバイス１０から除去され、ナノポアデバイス１５の中へ配置される液体転送ステップ１を描写する。図１Ａ中で描写されるように、流体小滴１１は、層１７を横切って離れて分割され、ナノポア１８で位置する小滴をもたらす様式で、層１７にわたって堆積する。流体小滴は、エントリーポート経由でナノポアデバイス１５の中へ導入することができる（図示せず）。エントリーポートは、層１７のセクションにわたって位置させることができる。例えば、エントリーポートは、ナノポアを含有する層が位置するチャンバーの壁中の開口部において所在し得る。図１Ｂ中で、液体小滴１１は第１のチャンバー１６中で堆積する。バッファー添加ステッ

プ２は、第２のチャンバー１９中にバッファーを導入する。他の実施形態において、バッファーは、第１のチャンバー１６の中への液体小滴１１の導入の前に、第２のチャンバー１９に添加することができる。さらに他の実施形態において、バッファーが第１のチャンバー１６に添加される前または後に、液体小滴１１は第２のチャンバー１９中に堆積させることができる。図１Ａ中で、いずれかのチャンバーへのバッファーの添加のステップは必要ではない。

【０２４３】

別の実施形態において、デバイスは集積デバイスであり得る。集積デバイスはマイクロ流体モジュールおよびナノポアモジュールを含むことができ、それらを独立して構築し、次いで組み合わせて集積デバイスを形成できるか、またはマイクロ流体モジュールおよびナノポアモジュールを単一のデバイス中に一緒に内蔵することができる。

【０２４４】

図２Ａおよび２Ｂは、ナノポアモジュールとマイクロ流体モジュールを組み合わせた、集積デバイスの概略図を描写し、２つのモジュールはチャンネルを使用して、それらを接続することによって集積化される。図２Ａおよび２Ｂは集積デバイスを生成するように組み合わせられる個々のモジュールを含むデバイスを描写するが、２つのモジュールが接続される一体型デバイスとして図２Ａおよび２Ｂのデバイスを製造することができることが理解される。

【０２４５】

図２Ａおよび２Ｂ（上部パネル）中で、マイクロ流体モジュール２０は、ナノポアデバイス３０中で分析される流体小滴２５と共に描写される。ナノポアモジュール３０は、第１のチャンバー３１、ナノポア３３を備えた層３２、および第２のチャンバー３４を含む。マイクロ流体モジュール２０はチャンネル４０経由でナノポアモジュール３０と共に集積化される。チャンネルは２つのモジュールを流体的に接続し、マイクロ流体モジュール２０からナノポアモジュール３０への小滴２５の動きを促進する。中央のパネルは、チャンネル４０経由でマイクロ流体モジュール２０からナノポアモジュール３０への小滴２５の動きを図示する。図２Ａ中で示されるように、チャンネルは、マイクロ流体モジュール２０をナノポアモジュール３０中のエントリーポートへ接続することができる。流体小滴２５が層３２を横切って離れて分割され、ナノポア３３で位置する小滴をもたらす様式で、層３２にわたって堆積するように、エントリーポート（図示せず）は位置することができる。転送プロセスの終わりで、流体小滴はナノポア３３を横切って位置する（図２Ａ、下部パネル）。他の実施形態において、チャンネル４０は、マイクロ流体モジュール２０をナノポアモジュール３０の第１のチャンバーまたは第２のチャンバー中のエントリーポートへ接続することができる。かかる実施形態は図２Ｂ中で示され、そこでチャンネル４０は、マイクロ流体モジュール２０をナノポアモジュール３０の第１のチャンバー３１中のエントリーポートへ接続する。第１のチャンバー３１の中への液体小滴２５の転送の後または前に、バッファーは第２のチャンバーへ添加され得る。図２Ｂのステップ２中で、バッファーは、第１のチャンバー３１への小滴２５の転送に後続して、第２のチャンバー３４へ添加される。随意に、転送が完了した後に、チャンネル４０を除去し、２つのモジュールを分離することができる。図１Ａ、１Ｂ、２Ａおよび２Ｂ中でそれぞれ示される、マイクロ流体およびナノポアのデバイスおよびモジュールは、各々個別に機能的である。

【０２４６】

図２Ｃ～２Ｈは、デジタルマイクロ流体モジュール５０およびナノポアモジュール６０を含む、集積デバイスの実施形態を描写する。デジタルマイクロ流体モジュールは、ナノポアモジュールへ輸送される小滴の生成のために使用される複数の試薬リザーバー５１へ作動可能に接続される電極のアレイ４９を備えて描写される。リザーバー５１のうちの１又は２以上は試薬またはサンプルを含有し得る。異なる試薬が異なるリザーバー中に存在し得る。電極のアレイ４９を電力源（図示せず）へ接続する接触パッド５３もマイクロ流体モジュール５０中に描写される。電極のアレイ４９を接触パッドへ接続するトレースラインは描写されない。電極のアレイ４９は、１又は２以上の小滴（バッファー小滴またはバ

ッファーおよび／もしくはタグ（例えば切断されたタグまたは解離されたアプタマー）を含有する小滴等）を、デジタルマイクロ流体モジュール５０とナノポアモジュール６０との間のインターフェース１００に所在する転送電極７１および７２のうちの１つまたは両方へ、輸送する。デジタルマイクロ流体モジュール５０およびナノポアモジュール６０は、インターフェース１００で作動可能に接続される。ナノポアモジュール６０は、ナノポア層７０が配置される場所で互いに交差する少なくとも２つのマイクロ流体キャピラリーチャンネル６１および６２を含む。２つのマイクロ流体キャピラリーチャンネル６１および６２は、ナノポアモジュール中の２つの異なる基板中に所在する（図２Ｄ中で描写される）。したがって、ナノポアモジュールは、第１の基板６３の上部表面中にマイクロ流体キャピラリーチャンネル６１を含む、第１の基板６３（例えば底部基板）を含み、第２の基板の第１の表面中にマイクロ流体キャピラリーチャンネル６２を備えた、第２の基板６４（例えば上部基板）を更に含む。第２の基板６４をマイクロ流体キャピラリーチャンネル６１の上に重層し、第１の基板６３をマイクロ流体キャピラリーチャンネル６２の下層に置く。キャピラリーチャンネル６２は、ナノポア層７０の場所での２つのチャンネルの交差の点でキャピラリーチャンネル６１の上に重層する（図２Ｄ、下部パネルも参照）。２つのキャピラリーチャンネルは、交差に設置されたナノポア層７０によって交差で物理的に分離される。ナノポア層７０は、キャピラリーチャンネルの交差に位置しナノポアを介して１つキャピラリーチャンネルから他のキャピラリーチャンネルへの分子の輸送を可能にする、少なくとも１つのナノポア（図示せず）を含む。キャピラリーチャンネル６１および６２は、キャピラリーチャンネルの第１の端部でのインターフェース１００で開口し、キャピラリーチャンネルの第２の端部でのリザーバー／ベント（８４および８５、図２Ｃ中で理解されるように）へ開口する。電極のアレイ４９の上にわたって位置するカバー基板１０１も図２Ｃ中で描写される。カバー基板１０１は、小滴が操作されるマイクロ流体モジュール中のギャップを画成する。カバー基板１０１は、カバー基板１０１の底部表面上に配置された電極５５（例えば参照電極）を随意に含み、マイクロ流体モジュール５０中での小滴の操作のための２平面の電極立体配置を提供することができる。２平面の電極立体配置の非存在下において、小滴は、共面電極アクチュエーションを使用すること（例えば電極のアレイ４９または別の共面電極立体配置を使用すること）によって、マイクロ流体モジュール５０中で操作することができる。例えば、ＵＳ６９１１１３２中で記載される共面電極は、マイクロ流体モジュール５０中での小滴の操作のために使用することができる。

【０２４７】

図２Ｄ（上部パネル）は、デジタルマイクロ流体モジュール５０およびナノポアモジュール６０が作動可能に接続される、インターフェース１００の横断面の正面図の概略図を示す。転送電極７２でのデバイスの横断面の側面図の概略図は、図２Ｄの下部パネル中で描写される。図２Ｄ（上部パネル）は、マイクロ流体モジュール５０とナノポアモジュール６０との間のインターフェース１００に所在する２つの転送電極７１および７２上に位置する２つの小滴（６５ａおよび６５ｂ）を示す。図２Ｄ（上部パネル）中で図示されるように、電極７１に位置する小滴６５ａはキャピラリーチャンネル６１中の開口部と整列し、その一方で、電極７２に位置する小滴６５ｂはキャピラリーチャンネル６２中の開口部と整列する。図２Ｄ（下部パネル）は、転送電極７２上の小滴６５ｂの設置を示す、集積デバイスの横断面の側面図を図示する。小滴６５ｂはキャピラリーチャンネル６２の中へ動くように配置される。キャピラリーチャンネル６１も示されるが、このキャピラリーチャンネルは転送電極７２から距離があり、転送電極７１（図示せず）と整列する。カバー基板１０１の底部表面上に配置された電極５５を備えたカバー基板１０１も描写される。図２Ｄ～２Ｈ中で描写される集積デバイスの実施形態において、ナノポアモジュールはマイクロ流体モジュールの電極アレイと同じ基板上に配置される。

【０２４８】

転送電極の上部表面とキャピラリーチャンネルへの入口との間の垂直距離は、マイクロ流体モジュールおよびナノポアモジュールの下方パーツを形成する基板の厚みによって決定

され得る。垂直距離は、ナノポアモジュールへ転送される小滴の体積に基づいて設定され得る。垂直距離は基板の厚みの変動によって調整され得る。例えば、ナノポアモジュールの基板（例えば基板６３）は比較的薄く維持され得るか、または転送電極が配置される基板の厚みは、小滴がキャピラリーチャンネルの入口と整列することを保証するように増加させることができる（例えばより厚い基板の使用によって）。より厚い底部基板を有するマイクロ流体モジュールの使用によって、小滴がキャピラリーチャンネルに入口と整列するように導かれる、例示的なデバイスは、図２Ｅ中で描写される。図２Ｅ中で示されるデバイスは、図２Ｃ～２Ｄについて記載されるものと同じ立体配置を有する。しかしながら、電極アレイが位置する基板５９ａの厚みは、ナノポアモジュールが配置される基板のパーツの厚みと比べて増加する。図２Ｅ（上部パネル）は、マイクロ流体モジュールとナノポアモジュールとの間のインターフェース１００での横断面の正面図を描写する。図２Ｅ（下部パネル）は、転送電極７２およびキャピラリーチャンネル６２の位置での横断面の側面図を描写する。図２Ｅ中で図示されるように、電極アレイ４９ならびに転送電極７１および７２が配置される基板５９ａは、ナノポアモジュールが配置される基板５９ｂよりも厚い。図２Ｅ（下部パネル）中で示されるように、基板５９ａは第１の高さＨ１を有し、その一方で、基板５９ｂは第２の高さＨ２を有し、そこでＨ１はＨ２より大きい。基板５９ａと５９ｂとの間の高さの差は、電極７１および７２上に位置する小滴を備えたナノポアモジュール中のキャピラリーチャンネル６１および６２の整列をそれぞれもたらす。チャンネル６１は図２Ｅの下部パネル中でも描写される。図２Ｃから明らかなように、キャピラリーチャンネル６２は、ナノポア層７０の場所でキャピラリーチャンネル６１へ垂直である。チャンネル６１は転送電極７１と整列し、転送電極７１上に位置する小滴６５ａを受け取るように構成される。２つのキャピラリーチャンネルが交差の点で互いに垂直であるように描写されるが、２つのチャンネルが９０度以外の角度で交差する他の立体配置も想定される。

【０２４９】

キャピラリーチャンネルとの接触に際して、小滴は任意の好適な手段（毛細管作用等）経由でキャピラリーチャンネルの中へ動く。キャピラリーチャンネルの中への小滴の動きは追加の方法／材料によって促進され得る。例えば、小滴は、拡散、ブラウン運動、対流、ポンピング、圧力の適用、重力駆動流、密度勾配、温度勾配、化学勾配、圧力勾配（陽性または陰性）、空気圧、気体産生化学反応、遠心流、毛細管圧、ウィッキング、電界媒介性、電極媒介性、電気泳動、誘電泳動、磁気泳動、磁界、磁気駆動流、光学力、走化性、走光性、表面張力勾配駆動流、Ｍａｒａｎｇｏｎｉ応力、熱キャピラリー対流、表面エネルギー勾配、音響泳動、弾性表面波、電気浸透流、熱泳動、エレクトロウェッティング、オプト－エレクトロウェッティング、またはその組み合わせによってキャピラリーチャンネルの中へ動き得る。加えてまたはあるいは、キャピラリーチャンネルの中への小滴の動きは、例えばアクチュエーション力（本明細書において開示されるもの等）を使用すること；キャピラリー中で親水性コーティングを使用すること；キャピラリーチャンネルのサイズ（例えば幅および／または高さおよび／または直径および／または長さ）を変動させることによって促進され得る。

【０２５０】

図２Ｃ～２Ｈ中で描写される実施形態において、キャピラリーチャンネル６１および６２を横切る流体の流れは、キャピラリーの横断面を変化させることによって少なくとも部分的に制御され、流体は、キャピラリーのより狭い部分に入るまで最初は比較的迅速に動く。１つまたは両方の小滴は、検出またはカウントされる検体（または切断されたタグもしくは解離されたアプタマー）を含有する小滴、またはナノポア経由の分析のための伝導性溶液（例えば検体を含有しないバッファー）であり得る。ある特定の事例において、１つの小滴６５ａは検体／タグ／アプタマーを含有する小滴であり得、その一方で、他の小滴６５ｂはバッファー小滴であり得る。単一小滴が実践における各々のチャンネルについて描写されるが、複数の小滴をナノポアモジュールへ輸送することができる。例えば、複数の小滴は連続的な様式でナノポアモジュールへ輸送され得る。いくつかの事例において、

複数の小滴を１つまたは両方の転送電極で収集して、ナノポアモジュールへ輸送されるより大きな小滴を生成することができる。

【０２５１】

図２Ｆは、集積デバイスにおいて使用される様々な電極の例示的な立体配置を図示する。前述のように、単一の連続的な電極５５（図２Ｆ中で図示されない）は、マイクロ流体モジュール６０中の電極のアレイ４９から離れて置かれる様式で位置する。電極のアレイは、個別に制御可能な電極のシリーズを含む。電極５５は、カバー基板１０１の下方表面上に配置される。電極５５および電極のアレイは、小滴を転送電極の上へ動かす。電極５５は転送電極７１および７２をカバーしないことが描写されるが、ある特定の例示的なデバイスにおいて、カバー基板１０１および電極５５は転送電極の上にわたって延長し得る。電極５５が転送電極をカバーしない複数の実施形態において、共面電極を使用して小滴を転送電極へ動かすことができる（例えばＵＳ６９１１１３２中で記載されるような共面アクチュエーション）。本明細書において記載されるように、単一電極５５は参照電極または接地極として働くことができ、その一方で、電極のアレイ４９は個別に制御可能であり得る（例えば、電極のアレイは独立して動作するアクチュエーション電極であり得る）。電極ペア：ペア８０ａおよび８０ｂならびにペア９０ａおよび９０ｂは、ナノポアモジュール中に位置する。電極ペア８０ａ、８０ｂおよび９０ａ、９０ｂを使用して、ナノポア層７０中のナノポア（複数可）を介して荷電分子を駆動するためにナノポア層７０を横切る異極性が確立される。いくつかの実施形態において、電極ペア８０ａおよび８０ｂは陽極であり得、電極ペア９０ａおよび９０ｂは陰極であり得る。図２Ｇは、２つの電極８０および９０（４ではなく）がナノポア層７０を横切って極性差を確立するために使用される場合の、ナノポアモジュールについての代替の電極立体配置を図示する。これらの例示は、対称的（４電極）または非対称（２電極）である電極立体配置の使用を実証し、これらの電極立体配置は、ナノポアを介して荷電分子を移動させるためにナノポア層を横切る電位勾配を生成する。

【０２５２】

図２Ｈは、１つのチャンネル６１のみがインターフェース１００でマイクロ流体モジュールへ接続されるキャピラリーチャンネルの代替の立体配置を図示する。他のチャンネル６２は伝導性液体により充填され得る２つのリザーバーへ接続されて、ナノポアを横切る荷電分子の移行を促進する。

【０２５３】

ある特定の事例において、本明細書において提供される集積デバイスは、第１の基板の上部表面の第１の領域上でデジタルマイクロ流体モジュール部分のためのリザーバーおよび電極のアレイを形成することによって、製作され得る。第２の基板は、第２の基板の底部表面上で単一電極（例えば電極５５）を配置することによって調製され、離れて置かれる様式で個別に制御可能な電極の上アレイにわたって位置させて、２平面の小滴アクチュエーションのために、単一電極と電極のアレイとの間に直面する方向性を提供することができる。本明細書において使用される時、「小滴アクチュエーション」は、本明細書において開示されるようなマイクロ流体デバイスを使用するか、またはＵＳ６，９１１，１３２、ＵＳ６，７７３，５６６、またはＵＳ６，５６５，７２７（それらの開示は参照により本明細書に援用される）中で開示されるような小滴アクチュエーターを使用する、小滴の操作を指す。したがって、本明細書において開示されるデバイスの２平面の電極または電極のアレイの立体配置は、ＵＳ６，９１１，１３２、ＵＳ６，７７３，５６６、またはＵＳ６，５６５，７２７中で開示されるものに類似し得る。第２の基板上の電極５５は参照電極とも称され得る。マイクロ流体モジュール中の電極は、誘電材料により随意にコーティングされ得る。疎水性コーティングも誘電体上で提供され得る。

【０２５４】

ある特定の実施形態において、マイクロチャンネルは、電極のアレイ４９が配置される第１の基板の第２の領域上に配置され得る第３の基板上で形成することができる。例えば、第３の基板は、マイクロ流体電極アレイが第１の領域において配置される第１の基板上の

第２の領域の上へ接合され得る。基板は前形成されたマイクロチャンネルを有することができるか、またはマイクロチャンネルは接合ステップの後に形成することができる。第２のマイクロチャンネルを備えた第４の基板をマイクロチャンネルを含有する基板の上部に配置して、図２Ｃ～２Ｈ中で描写されるような集積デバイスを提供することができる。ナノポア層は、２つのマイクロチャンネルの交差の場所で、いずれかのマイクロチャンネル上に配置され得る。したがって、ナノポアモジュールを形成する基板は、いずれかの端部でおよび１つの側面上での開口であるマイクロチャンネルを含むことができる。第３の基板の上にわたる第４の基板の設置はマイクロチャンネルを閉鎖し、それによって、キャピラリーチャンネル（例えば６１および６２）を形成する。

【０２５５】

ある特定の実施形態において、マイクロチャンネルは、マイクロ流体の電極のアレイが配置される第１の基板へ配置され得る分離した基板上で、形成することができる。例えば、別の基板は、マイクロ流体の電極アレイが第１の領域において配置される第１の基板上の第２の領域の上へ接合され得る。基板は前形成されたマイクロチャンネルを有することができるか、またはマイクロチャンネルは接合ステップの後に形成することができる。第２のマイクロチャンネルを備えた別の基板をマイクロチャンネルを含有する基板の上部に配置して、図２Ｃ～２Ｈ中で描写されるような集積デバイスを提供することができる。ナノポア層は、２つのマイクロチャンネル６１および６２の交差の場所で、いずれかのマイクロチャンネル上に配置され得る。

【０２５６】

いくつかの実施形態において、マイクロチャンネルは、マイクロ流体電極のアレイが配置される第１の基板上の第１の領域に隣接する第２の領域中に導入され得る。例えば、マイクロチャンネルは第２の領域中の上部表面上にエッチングされ得る。ナノポア層はマイクロチャンネル上の場所に設置され得る。ナノポア層は前形成されたナノポア（複数可）を含むことができる。代替の実施形態において、ナノポア（複数可）は、マイクロチャンネル上の場所に層を位置させた後に形成され得る。第３の基板は、第３の基板の底部表面上のマイクロチャンネルの導入によって調製され得る。第１の基板の第２の領域の上部表面が、その上部表面に跨って、第３の基板の底部表面と接触し、それによって、閉鎖されたキャピラリーチャンネル６１および６２を生ずるように、第３の基板は、第１の基板上の第２の領域の上にわたって位置させることができる。

【０２５７】

図２Ｉ～２Ｋは、デジタルマイクロ流体モジュール２５０およびナノポアモジュール２６０が共通の底部（第１の）基板２１０を共有するデバイスを描写し、その基盤上で、マイクロ流体モジュールのための電極のアレイ２４９（個別に制御可能な電極のシリーズ）は第１の領域上に配置され、マイクロ流体チャンネル２６１は第２の領域中に形成される。第１の基板中のマイクロ流体チャンネル２６１は転送電極２７１と整列される。単一の連続的な電極２５５（例えば参照電極）を有する第２の基板２２０は、デジタルマイクロ流体モジュール２５０中の電極のアレイ２４９から離れて置かれる様式で配置される。第３の基板の下方表面中で形成されたマイクロ流体チャンネル２６２を含む第３の基板２３０は、第１の表面２１０の第２の領域の上にわたって設置され、それによって、マイクロ流体チャンネル２６１が形成される第１の基板の上部表面をカバーする。ナノポアモジュール中の第１の基板および第３の基板は、マイクロ流体チャンネル２６１および２６２を封入し、それによって、キャピラリーチャンネル２６１および２６２を提供する。「マイクロ流体チャンネル（複数可）」および「マイクロチャンネル（複数可）」は、基板の表面中の流路または切り欠きを指すように、本明細書において互換的に使用されることが理解される。流路の上にわたる基板の設置に際して、流路は封入され、キャピラリーチャンネルを形成する。図２Ｃに類似して、キャピラリーチャンネルは、マイクロ流体モジュール２５０とナノポアモジュール２６０との間のインターフェース１００での１つの端部でマイクロ流体モジュールへ、および他の端部でリザーバーまたはベントと、流体的に接続され得る。他の実施形態において、第２のキャピラリーチャンネル２６２は、図２Ｈ中のキ

ャピラリーチャンネル６２に類似して構成され得る（すなわち、第２のキャピラリーチャンネル２６２はいずれかの端部でマイクロ流体モジュールへ接続され、両方の端部でリザーバー／ベントへ接続され得る）。デバイスの上面図は図２Ｉ中で描写され、モジュール間のインターフェースでのデバイスの横断面の正面図は図２Ｉ（続き）中で描写される。正面図から明らかなように、小滴２６５ａは、キャピラリーチャンネル２６１への入口よりも高い平面上にある。小滴２６５ａがキャピラリーチャンネル２６１の中へ流れることを可能にするために、ノッチ２８０を第３の基板２３０の側面端部において生じて、マイクロチャンネル２６１の中へ下る小滴の動きのための空間を提供する。したがって、マイクロ流体モジュールとナノポアモジュールとの間に流体接続は、ノッチ２８０によって形成された垂直ポートによって提供され、第１のキャピラリーチャンネル２６１の上部パーツ中の開口部を、インターフェース１００での第１のキャピラリーチャンネル２６１の１つの端部で提供する。図２Ｉ中のノッチ２８０がサイズ通りに描かれず、インターフェース１００での転送電極２７１と第１のキャピラリーチャンネル２６１との間の流体連通を可能にする任意の好適なサイズであり得ることが理解される。さらに、ノッチのサイズは変動し得る。例えば、ノッチは、インターフェース１００で第３の基板２３０の側面端部の長さに沿って延長する切り欠きであり得、転送電極２７１の幅もしくはキャピラリーチャンネル２６１の幅またはその間の長さに一致するように釣り合わせることができる。キャピラリーチャンネル２６１の比較的マイナーな領域がカバーされないように、切り欠きは、第３の基板２３０の幅に沿って名目上延長され得る。他の実施形態において、切り欠きは、キャピラリーチャンネル２６１の実質的な長さにわたって延長し得る。ナノポアを含有する層２７０は、２つのキャピラリーチャンネルが交差する位置で第１のキャピラリーチャンネル２６１を横切って位置する。層２７０は支持基板２７５中で位置する。ある特定の事例において、第１の基板２１０はガラス基板であり得、支持基板２７５はＰＤＭＳガスケットであり得る。

【０２５８】

図２Ｉ中で示されるデバイスの横断面の側面図は、図２Ｊ中で描写される。横断面はデバイスの領域にあり、そこで第１のキャピラリーチャンネル２６１は第１の転送電極２７１と整列される。電極のアレイ２４９を備えたマイクロ流体モジュール２５０の一部分、電極のアレイ２４９から離れて置かれる様式で位置する単一電極２５５（例えば参照電極）を備えた第２の基板２２０も描写される。図２Ｊ中で示されるように、単一電極２５５は転送電極をカバーしない。これらの図中で図示されないが、第２の基板２２０および単一電極２５５（それは参照電極であり得る）は、転送電極２７１および２７２をカバーすることができ、２平面の電極立体配置を提供する。この実施形態において、小滴は、２平面の電極を使用して転送電極２７１および２７２へ動かされ得る。第１のキャピラリー２６１は、第１の基板２１０中に所在し、小滴２６５ａが存在する平面よりも低い平面中に所在する。第２のマイクロチャンネル（それは第１の基板２１０の上部表面によって封入されて、キャピラリーチャンネル２６２を提供する）を含む第３の基板２３０は、第１の基板の上にわたって配置される。第３の基板２３０は、インターフェース１００でのマイクロ流体モジュールに隣接する側面端部で、ノッチ２８０（または切り欠き）を含む。ノッチ２８０は、キャピラリーチャンネル２６１の端部での上部の部分でキャピラリー２６１を開口し、キャピラリーチャンネル２６１への入口のための垂直ポートを提供する。矢印の方向によって示されるように、小滴はキャピラリー２６１へ下って進み、次いで、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルの交差に向かって流れ始める。第２のキャピラリーチャンネル２６２は、ナノポア層２７０の場所で第１のキャピラリー２６１と交差する。第１のキャピラリーチャンネル２６１の上にわたって（および第２のキャピラリーチャンネル２６２の下で）位置する支持基板２７５が描写される。支持基板２７５はナノポア層２７０を含む。挿入図で示されるナノポア層の上面図中で示されるように、支持基板２７５はナノポア層を囲む。いくつかの実施形態において、支持基板は、中心に切り欠きを備えた第１の層および中心に切り欠きを備えた第２の層であり得る。ナノポア層は、第１の層と第２の層との間の切り欠きに配置され得る。支持基板中の

ナノポア層は、底部基板２１０がガラスから作製されるデバイス中で使用され得る。

【０２５９】

図２Ｋは、図２Ｉ中で示されるデバイスの横断面の追加の側面図を示す。図２Ｊ中で、横断面は第１の転送電極２７１の場所である。図２Ｋ中で、横断面は第２の転送電極２７２の場所である。図２Ｋ中で示されるように、第２のキャピラリーチャンネル２６２への入口は、第２の転送電極２７２上に存在する小滴２６５ｂの位置と整列される。ナノポア層２７０の場所で第２のキャピラリーチャンネル２６２と交差する、第１のキャピラリーチャンネル２６１も図２Ｋ中で描写される。

【０２６０】

別の実施形態において、図２Ｌ中で示されるように、第１の基板２１０は、電極のアレイ２４９ならびに転送電極２７１および２７２が配置される第１の部分２１０ａ、ならびにキャピラリーチャンネル２６１ａを含有する基板２９０が配置される第２の部分２１０ｂを含むことができる。図２Ｉ～２Ｋ中で示されるデバイスに類似して、キャピラリーチャンネル２６１ａは、転送電極が所在する平面より下である。キャピラリーチャンネル２６２は基板２３０中に所在し、そこでキャピラリーチャンネル２６２への入口は、マイクロ流体モジュール２５０中の転送電極と同じ平面である。さらに、図２Ｉ～２Ｋに類似して、キャピラリーチャンネル２６２への入口は転送電極２７２と整列される。したがって、電極２７２上に位置する小滴は、キャピラリーチャンネル２６２へ実質的に水平に進むことができる。図２Ｉ～２Ｋ中で示されるデバイスに類似して、基板２３０は基板２３０の側面端部中にノッチ２８０を含んで、転送電極２７１上に位置する小滴が基板２９０中に所在するキャピラリー２６１ａへ下って移動する空間を提供する。ナノポア層２７０は図２Ｌ中でも描写される。この実施形態において、ナノポア層は、支持層２７５の非存在下において基板２９０上に直接配置される。例えば、チャンネルを含有する両方の基板がＰＤＭＳから形成される複数の実施形態において、ナノポア層は、支持基板の非存在下において基板の間に直接配置され得る。図２Ｌ（上部パネル）は、転送電極２７１およびキャピラリーチャンネル２６１ａが所在する場所でのデバイスを介する横断面の側面図を描写する。図２Ｌ（下部パネル）は、転送電極２７２およびキャピラリーチャンネル２６２が所在する場所でのデバイスを介する横断面の側面図を描写する。上部からは、このデバイスは図２Ｉ中で示されるデバイスと同じに見える。したがって、図２Ｉ中で示されるデバイス中の転送電極７１および７２と同じように、転送電極２７１および２７２は離れて置かれる。

【０２６１】

ナノポア（複数可）経由でナノポア層を横切る分子の輸送のためのナノポアモジュール中の電極は、デバイス中のナノポア層の位置決めの後に製作され得る。例えば、電極は基板の中へ導入され、それらがキャピラリーチャンネル中で露出され、キャピラリーチャンネル中に存在する流体と接触するように、キャピラリーチャンネル中に位置する開口部中に配置され得る。ナノポアから電極の距離は、キャピラリーチャンネル（複数可）の抵抗値、幅、直径、および／または長さに基づいて経験的に決定され得る。

【０２６２】

ナノポア層はいずれかのチャンネル上に配置することができる。ナノポア層は、プラズマ接合によって、または圧縮可能な要素（ガスケット等）経由で、マイクロチャンネルを含有する基板の表面へ接着することができる。ある特定の事例において、第１のチャンネルを含有する基板はガラス基板であり得る。この実施形態において、支持基板（ＰＤＭＳ層等）はナノポア層を位置させるために使用することができる。例えば、ナノポア層はＰＤＭＳガスケットと共に提供され得る。

【０２６３】

任意の好適な方法を使用して基板上にチャンネルを形成することができる。ある特定の事例において、リソグラフィーまたはエンボシングを使用して、ナノポアモジュールのためのチャンネルを生ずることができる。他の実施形態において、チャンネルは基板の中へエッチングすることができる。ある特定の実施形態において、好適な方法の組み合わせを使

用して、基板中のチャンネルを形成することができる。例えば、チャンネルはエッチングプロセスを使用してガラス基板中で形成することができ、別のチャンネルは、適切な方法（ソフトリソグラフィー、ナノインプリントリソグラフィー、レーザーアブレーション、またはエンボシング（例えばソフトエンボシング）等）を使用して、ＰＤＭＳ基板中で形成することができる。マイクロチャンネルの高さ／幅／直径は経験的に決定することができる。マイクロチャンネルの高さ／幅／直径は、０．５μｍ～約５０μｍ、例えば０．５μｍ～４０μｍ、１μｍ～３０μｍ、２μｍ～２０μｍ、３μｍ～１０μｍ、５μｍ～１０μｍの範囲中（０．５μｍ、１μｍ、２μｍ、３μｍ、４μｍ、５μｍ、６μｍ、７μｍ、８μｍ、９μｍ、１０μｍ、１５μｍ、２０μｍ、３０μｍ、４０μｍ、または５０μｍ等）であり得る。本明細書において指摘されるように、チャンネルの高さ／幅／直径はチャンネルの長さに沿って変動し得る。

【０２６４】

ある特定の実施形態において、ナノポア層（例えば７０または２７０）は、ナノポア層のうちの１つまたは両方の側面上で絶縁材料のコーティングを含み得る。絶縁材料は接触静電容量を低減させ、ナノポア層中のナノポア（複数可）を介する分子の移動の検出と関連するノイズを減少させることができる。別の実施形態において、ナノポア層と流体的に接触するキャピラリーチャンネル（例えばキャピラリーチャンネル６１および６２または２６１および２６２）中の流体へ曝露されるナノポア層の表面領域は、低減させることができる。ナノポア（複数可）によって検出またはカウントされる分子を含有している流体と接触するナノポア層の表面領域を低減させることは、接触静電容量を最小限にし、バックグラウンドノイズを低減させることができる。キャピラリーチャンネル中の流体と接触するナノポア層の表面領域は、ナノポア層の場所でのキャピラリーチャンネルのサイズを低減させることによって低減させることができる。例えば、ナノポア層の場所でのキャピラリーチャンネルの高さもしくは幅または両方（例えば直径）を低減させることができる。別の実施形態において、ナノポア層の表面領域を低減させることができる。ある特定のデバイスにおいて、接触静電容量を低減させるためのこれらの実施形態の組み合わせが包含され得る。例えば、特定の実施形態において、本明細書において開示されるような集積デバイスは、ナノポア層の場所で減少した寸法を有するキャピラリーチャンネルを含むことができる、および／またはナノポア層のうちの１つまたは両方の側面上に絶縁材料（例えばＰＤＭＳ）によりコーティングされるナノポア層を含むことができる、および／または最小の表面領域を有するナノポア層を含むことができる。

【０２６５】

図３は、マイクロ流体モジュール３００およびナノポアモジュール３２５を含む、別の例示的な集積デバイスを図示する。図１Ａ、１Ｂ、２Ａおよび２Ｂ中のナノポアモジュールとは対照的に、ナノポアモジュール３２５はスタンドアロン型のデバイスとして機能的ではないが、マイクロ流体モジュール３００と共に一旦集積されたナノポアとして機能する。マイクロ流体モジュール３００は、ナノポアモジュール３２５の挿入を可能にするようにサイズ合わせされた開口する３０２を含む。図３中で描写されるように、マイクロ流体モジュールは、ナノポアモジュール３２５（それはナノポア３０５を備えた層３１１を含有する）を使用して分析される流体小滴３０１を含む。マイクロ流体モジュール３００の中へのナノポアモジュール３２５の挿入に際して、層３１１によって分離された第１のチャンバー３０６および第２のチャンバー３０７が生じる。層３１１は、ナノポア３０５を横切る流体小滴３０１も分割する。

【０２６６】

図４は、デジタルマイクロ流体モジュールが内蔵のナノポアモジュールを含む、集積デバイス４００を提供する。図４中で、ナノポアモジュールは、流体小滴４０１が生成されるマイクロ流体モジュール中の領域から下流に位置する。小滴４０１が層４０２を横切って分割され、ナノポア４０３で位置するように、マイクロ流体モジュールは、ナノポアモジュールへ小滴４０１を動かす。図４は、デバイスの上面図を示す。上部基板は明確にするために示されない。上面図からナノポア４０３は目視可能ではないが、ナノポア層４０２

中のナノポア４０３が描写された。ナノポア層４０２は底部基板または上部基板のいずれかへ添付され得る。

【０２６７】

図１Ａ、１Ｂ、２Ａ、２Ｂ、３および４中で、単一ナノポアが示されるが、層は１又は２以上のナノポアを含み得ることが理解される。加えて、２つ以上の小滴はナノポアモジュールまたはデバイス中で位置することができる。小滴（複数可）はナノポア（複数可）を横切って電圧を適用することによって分析され得る。電圧の適用はナノポア（複数可）を横切る荷電分子の動きをもたらし得る。タグがナノポア（複数可）を介して移動する場合に、ナノポアを横切る電流の減少は移動の指標を提供する。ある特定の実施形態において、ナノポアモジュールのチャンバーは伝導性溶液（例えばバッファー）により充填されなくてもよく、一旦流体小滴がナノポア層を横切って位置すれば、伝導性溶液は流体小滴によって提供され得る。ある特定の事例において、第１のチャンバーおよび第２のチャンバー（それらを横切る電圧は、流体小滴中に存在するタグ／アプタマーの移動の測定のために適用される）は、ナノポアデバイスおよびナノポア層の壁によって画成され得る（例えば、図１Ｂおよび２Ｂを参照）。第１のチャンバーおよび第２のチャンバーは、流体小滴の導入の前に空であり得るか、または伝導性流体を含有し得る。他の事例において、第１のチャンバーおよび第２のチャンバーはマイクロ流体モジュールおよびナノポア層の画成された壁であり得る（例えば図３を参照）。他の事例において、第１のチャンバーおよび第２のチャンバーはナノポア層を横切って分割された流体小滴によって画成され得る（例えば図１Ａ、２Ａおよび４を参照）。ある特定の事例において、例えば伝導性溶液がチャンバー中に存在しない実施形態において、ナノポア（複数可）を横切って荷電分子を伝導するための電圧を流体小滴へ適用することができる。電圧は、流体小滴と直接的または間接的な接触をする電極経由で流体小滴へ適用され得る。小滴が層を横切って分割され、ナノポア（複数可）経由でのみ接続されるように、ナノポア層の寸法は小滴よりも大きいことが理解される。

【０２６８】

図５Ａ、５Ｂ、６および７は、デジタルマイクロ流体モジュールおよびナノポア層を有するデバイス中の小滴の動きを図示する。図５Ａ中で、集積デジタルマイクロ流体／ナノポアデバイス４５０の構成要素が描写される。上面図は、ナノポア層４０２中のナノポア４０３を使用して分析される小滴４０１がナノポア層４０２を横切って位置することを示す。上面図からナノポアは目視可能ではないが、ナノポア４０３は図示の目的のために本明細書において示される。デバイス４５０は、電極のアレイ４０５が配置される基板４１１を含む。電極のアレイは、ナノポア層４０２を横切って小滴を分割することによって小滴４０１を位置させるように使用される。矢印４５１および４５２は、小滴４０１が電極のアレイを横切ってナノポア層４０２へ動かされ得る方向を描写する。ナノポア層４０２を横切る小滴４０１の位置決めに際して、小滴４０１の下に位置する電極４０４および４０６が活性化されてナノポア層４０２を横切る差動電圧を提供し、それによって、ナノポア４０３を横切る小滴４０１中の分子（例えば、タグまたはアプタマーを切断した）の動きを促進することができる。電極４０４および４０６は二重機能電極であり、それらは小滴をナノポア層へ動かし、ナノポア４０３を横切ってタグ／アプタマーを駆動する役目を果たす。

【０２６９】

図５Ｂはデバイス４５０の側面図を描写し、図５Ａ中で示される上面図において省かれた上部基板４１２はここで描写される。上部基板４１２は電極４１４を含むことが示される。電極４１４は単一電極または電極アレイであり得る。ナノポア層は上部基板から底部基板へ延長する。小滴４０１はナノポア層４０２を横切って分割される。２平面の電極が図５Ｂ中で描写されるが、デバイスは両方の基板中で電極を含まなくてもよく、むしろ上部基板または底部基板は共面電極を含むことができる。小滴４０１の付近の電極４０４および４０６は、異極性を有し、タグ／アプタマーをナノポア４０３を横切って駆動する。

【０２７０】

図６は、ナノポア４０３を有するナノポア層４０２を横切る小滴４０１の分割を示す。１ａは、ナノポア層４０２に向けた矢印によって指摘される方向で電極４０５によって動かされている小滴を描写する。２ａ中で、小滴４０１は、ナノポア層４０２によって分割され、小滴がナノポア４０３経由で接続されるように位置する。３ａ中で、小滴４０１より下のナノポア層４０２を横切って位置する電極が活性化されて、アノード（－）およびカソード（＋）を提供する。活性化された電極は、ナノポア４０３を介する小滴４０１中に存在する負に荷電した分子（カウントされているタグ／アプタマーが含まれる）を駆動する。タグ／アプタマーがナノポア４０３を介して移動するにつれて、本明細書において説明されるように、タグ／アプタマーの数をカウントすることができる。ステップ３ａは、小滴が分割された場合に、ナノポア層を横切って分割されたすべてのタグ／アプタマーを、小滴の１つの側面中に収集する役目を果たす。

【０２７１】

一旦実質的にすべてのタグ／アプタマーがナノポア膜の１つの側面へ移動されたならば、４ａ中で示されるように、電極の極性を逆転させ、タグ／アプタマーはナノポア層４０２の他の側面へ移動させ、カウントすることができる。ステップ３ａ中でカウントされたタグの数は、ステップ４ａ中で得られたカウントのおよそ半分であるべきである。電極の極性を逆転させ、タグ／アプタマーをカウントするステップを任意の回数反復して、小滴中のタグ／アプタマーの数の複数のリーディングを得ることができる。

【０２７２】

図７（１ｂおよび２ｂ）は、矢印によって指摘される方向でナノポア層６０４へ動かされている２つの小滴６００ａおよび６００ｂを示す。一旦ナノポア層６０４にあれば、小滴はナノポア層を湿らせ、ナノポア６０５経由で流体的に接続される（３ｂ）。ステップ４ｂにおいて、小滴６００ａの下に位置する電極はカソードとして働くように活性化され、小滴６００ｂの下に位置する電極はアノードとして働くように活性化され、負に荷電した切断されたタグ／解離されたアプタマーは、小滴６００ａへ駆動され、カウントされる。ステップ５ｂにおいて、電極の極性が逆転され、小滴６００ａ中に存在する負に荷電した切断されたタグ／解離されたアプタマーは、小滴６００ｂへ駆動され、カウントされる。電極の極性を逆転させ、切断されたタグ／解離されたアプタマーをカウントするステップを任意の回数反復して、小滴中の切断されたタグ／解離されたアプタマーの数の複数のリーディングを得ることができる。２つの小滴６００ａおよび６００ｂは、サンプル小滴（例えばカウントされる分子を含有する小滴）または、バッファー小滴（例えばナノポアでサンプル小滴（複数可）を位置させる前に、ナノ層を湿らせるための）の両方であり得る。いくつかの実施形態において、小滴の１つはバッファー小滴であり得、その一方で他の小滴はサンプル小滴であり得る。タグ／アプタマーは１回または複数回カウントすることができる。

【０２７３】

図８は、側面視からの集積デジタルマイクロ流体およびナノポアデバイスを図示する。基板９１および９２は離れて置かれる様式で位置する。基板９２は電極９７を含み、基板９１は電極アレイ９５を含む。支持構造９８はナノポア層９４を基板９２へ添付する。他の実施形態において、支持構造９８は底部基板９１へ添付され得る。電極アレイ９５はナノポア層９４へ小滴９９を動かすために使用され、そこでナノポア層は小滴を分割し、ナノポア９３経由で小滴の２つの側面を流体的に接続する。電極９６および９７は、ナノポア９３を介して小滴９９中のタグ／アプタマーを駆動する役目を果たす。前述のように、電極９６および９７の極性を逆転させて、ナノポアを介してタグ／アプタマーを何回も移動させることができる。

【０２７４】

図は単一ナノポアを描写するが、２つ以上のナノポアがナノポア層中に存在し得ることが理解される。ナノポア層に接し、ナノポア層を横切る電圧差の提供に使用される電極は、ナノポア層に位置する小滴と直接的に接触してもしなくてもよい。

【０２７５】

マイクロ流体およびナノポアのデバイス、モジュールおよび集積デバイス中の流体小滴の動きは、任意の好適な手段によって実行することができる。異なるデバイス／モジュールおよびチャンネル中の流体小滴を動かすための手段は、適用可能なならば、同じかまたは異なり得る。例えば、流体小滴は、流体操作力（エレクトロウェッティング、誘電泳動、オプト－エレクトロウェッティング、電極媒介性、電界媒介性、静電アクチュエーション、および同種のもの、またはその組み合わせ等）を使用して、マイクロ流体のデバイスまたはモジュール中で動かすことができる。流体接続（チャンネル等）を介するマイクロ流体モジュールからナノポアモジュールへの流体小滴の動きは、拡散、ブラウン運動、対流、ポンピング、圧力の適用、重力駆動流、密度勾配、温度勾配、化学勾配、圧力勾配（陽性または陰性）、空気圧、気体産生化学反応、遠心流、毛細管圧、ウィッキング、電界媒介性、電極媒介性、電気泳動、誘電泳動、磁気泳動、磁界、磁気駆動流、光学力、走化性、走光性、表面張力勾配駆動流、Ｍａｒａｎｇｏｎｉ応力、熱キャピラリー対流、表面エネルギー勾配、音響泳動、弾性表面波、電気浸透流、熱泳動、エレクトロウェッティング、オプト－エレクトロウェッティング、またはその組み合わせ経由であり得る。流体小滴は、流体操作力（エレクトロウェッティング、誘電泳動、オプト－エレクトロウェッティング、電極媒介性、電界媒介性、静電アクチュエーション、および同種のもの、またはその組み合わせ等）により、ナノポアモジュール中で動かされ、ナノポア層を横切って位置させることができる。小滴中のタグ／アプタマーは、電位、静電位、動電学流、電気浸透圧流、圧力誘導流、電気泳動、電気泳動輸送、電気浸透圧輸送、拡散輸送、電界媒介性流、タグ／アプタマーの誘電泳動媒介性輸送、および当業者に公知の他の方法、またはその組み合わせを使用して、ナノポア（複数可）を介して移動させることができる。

【０２７６】

本開示の例示的な実施形態は、最初に実質的に全てのタグをナノポア層の同じ側面へ移動させてシスチャンバーまたはトランスチャンバー中のすべてのタグを収集すること、続いてナノポア層の他の側面へタグを移動させ、ナノポア層中のナノポア（複数可）を介して横断するタグの数をカウントすることによって、ナノポア層を横切って位置する小滴中に存在するタグの数をカウントすることを包含する。本明細書において使用される時、ナノポア層の文脈中の「シス」および「トランス」は、ナノポア層の反対の側面を指す。これらの用語は、ナノポア層の側面の文脈中でおよびナノポア層の側面上のチャンバーの文脈中でも使用される。デバイスの記載から理解されるように、シスチャンバーおよびトランスチャンバーは、壁、基板などによって画成された物理的構造によって画成され得る。いくつかの事例において、シスチャンバーおよびトランスチャンバーはナノポア層を横切って設置された小滴によって画成され得る。小滴は、小滴の１又は２以上の側面上で壁または基板と接触し得る。ある特定の事例において、シスチャンバーおよびトランスチャンバーは小滴によって画成することができ、シスチャンバーは、ナノポア層のシス側面からシス側面上の小滴の一部分の周辺部へ延長することができ、トランスチャンバーは、ナノポア層のトランス側面からトランス側面上の小滴の一部分の周辺部へ延長することができる。各々のシス側面およびトランス側面上の小滴の一部分は、基板と接触することができる。したがって、シスチャンバーおよびトランスチャンバーは、小滴の周辺部、基板の一部分およびナノポア層の組み合わせによって画成され得る。

【０２７７】

ある特定の事例において、マイクロ流体デバイスおよび／またはマイクロ流体モジュールは、サンプル小滴および試薬小滴と不混和性の不活性流体を含み得る。例えば、不活性流体は、水よりも高密度の重い流体（マイクロ流体モジュール中で生成および加工される流体小滴と不混和性の油等）であり得る。不活性流体は、流体小滴の形成を促進することに加えて、流体小滴の形の安定性を増加することができ、互いから空間的に分離された異なる小滴の維持のために更に有用であり得る。例示的な不活性流体には、極性液体、シリコーンオイル、フルオロシリコーンオイル、炭化水素、アルカン、鉱物油、およびパラフィン油が含まれる。ある特定の事例において、マイクロ流体のデバイスまたはモジュールおよび不活性流体は、ＵＳ２００７０２４２１０５（その全体は参照により本明細書に援用

される）中で開示される通りであり得る。他の実施形態において、不混和性の流体はデバイス中に含まれない。これらの実施形態において、周囲空気がデバイス中の空間を充填する。

【０２７８】

本明細書において使用される時、「小滴（複数可）」および「流体小滴（複数可）」は、大まかに球状の形であり、マイクロ流体デバイス、ナノポアデバイス、マイクロ流体モジュール、またはナノポアモジュールの壁または基板によって少なくとも２つの側面上で境界のある、離散的な体積の液体を指すように互換的に使用される。小滴の文脈中で大まかに球状とは、球状の部分的に平らになった球体（例えば、円盤型、ナメクジ型、短縮された球体、楕円状、半球状、または卵形）等の形を指す。本明細書において開示されるマイクロ流体およびナノポアのモジュールおよびデバイス中の小滴の体積は、約１０μＬから約５ｐＬ（１０μＬ～１ｐＬ、７．５μＬ～１０ｐＬ、５μＬ～１ｎＬ、２．５μＬ～１０ｎＬ、または１μＬ～１００ｎＬ等、例えば、１０μＬ、１μＬ、８００ｎＬ、４００ｎＬ、１００ｎＬ、１０ｎＬ、またはそれ未満）の範囲であり得る。

【０２７９】

ある特定の実施形態において、集積デバイスは、内蔵のナノポアモジュールを備えたマイクロ流体モジュールを包含し得る。集積デバイスは、第１の基板および第２の基板を分離するギャップを備えた第１の基板および第２の基板を含むことができ、ギャップ（それは空気または不混和性の液体により充填され得る）は、サンプル小滴を第１の結合メンバー（磁性ビーズまたは２つの基板のうちの１つ上のいずれかに固定化される）と接触させ；随意に洗浄ステップを実行し；続いて第１の結合メンバーへ結合されている検体を第２の結合メンバーと接触させ；随意の混合ステップおよび洗浄ステップを実行することができ；第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断して切断されたタグを含有する小滴を生成する、空間を提供する。次いで、切断されたタグを含有する小滴は、第１の基板と第２の基板との間のギャップ中に所在するナノポア層を横切って位置することができる。

【０２８０】

本明細書において指摘されるように、小滴は、多数の手法（プログラム可能な流体操作力（例えばエレクトロウェッティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電界媒介性力、電極媒介性力（ＳＡＷ）など）の使用等）を経由して集積デバイス中で動かすことができる。ある特定の事例において、マイクロ流体のデバイスおよびモジュールは、電極の使用による検体分析を遂行するために、サンプルおよび試薬の小滴を動かすことができる。電極は、共面（すなわち同じ基板上で存在する）であり得るか、または直面する方向性（２平面）（すなわち第１の基板および第２の基板中に存在する）であり得る。ある特定の事例において、マイクロ流体のデバイスまたはモジュールは、米国特許第６，９１１，１３２号（その全体は参照により本明細書に援用される）中で記載されるような電極立体配置を有することができる。ある特定の事例において、デバイスは、第２の基板からギャップによって分離される第１の基板を含むことができ；第１の基板は、上方表面上に位置する電極のシリーズを含むことができ；誘電体層は第１の基板の上方表面上に配置され、電極のシリーズをカバーして、小滴の動きのために実質的に平面を提供することができる。随意に、疎水性材料の層を誘電体層の上方表面上に設置して、実質的に平面を提供することができる。ある特定の事例において、第１の基板は、共面電極（例えば単一基板上に存在する駆動／制御電極および参照電極）を含み得る。他の事例において、第１の基板の上にわたって位置する第２の基板は、第２の基板の下方表面上で電極を含むことができ、そこで第２の基板の下方表面は第１の基板の上方表面に直面する。第２の基板上の電極は絶縁材料によりカバーされ得る。電極のシリーズは、マイクロ流体モジュールの長さに沿った長手方向もしくはマイクロ流体モジュールの幅に沿った横方向または両方（例えば二次元配列または格子）で、アレンジすることができる。ある特定の事例において、電極のアレイは、プログラム可能な様式で小滴を動かすためにデバイスへ作動可能にカップリングされたコンピューターのプロセッサーによって、活性化（例えばオンおよびオフ）することができる。マイクロ流体デバイス中で小滴を動作させるためのデバイスおよび方法は公

知である。例示的な事例において、マイクロ流体モジュールは当分野において公知の小滴アクチュエーターに類似し得る。例えば、第１の（底部）基板は、個別に制御可能な電極のパターニングされたアレイを含有することができ、第２の（上部）基板は連続的な接地電極を含むことができる。疎水性物質によりコーティングされた誘電絶縁体は、電極の上にわたってコーティングされて、表面の湿潤性を減少させ、小滴と制御電極（パターニングされた電極のアレイ）との間に静電容量を加えることができる。小滴を動かすために、制御電圧を小滴に隣接する電極（電極のアレイ中の）へ適用することができ、同時に、小滴直下の電極は非活性化される。直線状電極のアレイに沿った電位の変動によって、エレクトロウェッティングを使用して電極のこのラインに沿って小滴を動かすことができる。

【０２８１】

第１の基板および第２の基板は任意の好適な材料から作製することができる。好適な材料は、ペーパー、薄フィルムポリマー、シリカ、シリコン、加工されたシリコン、ガラス（剛性または可撓性）、ポリマー（剛性、可撓性、不透明、または透明）（例えばポリメチルメタクリレート（ＰＭＭＡ）および環式オレフィンコポリマー（ＣＯＣ））、ポリスチレン（ＰＳ）、ポリカーボネート（ＰＣ）、プリント回路基盤、およびポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）を限定されずに含む。ある特定の事例において、少なくとも第１の基板または第２の基板は実質的に透明であり得る。実質的に透明な基板は、第２の結合メンバーへ添付されたタグの光切断が実行されるデバイス中で使用され得る。共面電極が基板のうちの１つ中に存在する複数の実施形態において、電極は透明であってもなくてもよい。電極が直面する方向性である（両方の基板中に存在する）等の他の実施形態において、基板のうちの少なくとも１つ上の電極は実質的に透明であり得、例えば電極はインジウムスズ酸化物から作製することができる。電極は任意の好適な材料から作製することができる。電極は、任意の伝導性材料（純金属もしくは合金、または他の伝導性材料等）から作製することができる。例には、アルミニウム、炭素（グラファイト等）、クロム、コバルト、銅、ガリウム、金、インジウム、イリジウム、鉄、鉛、マグネシウム、水銀（アマルガムとして）、ニッケル、ニオブ、オスミウム、パラジウム、白金、レニウム、ロジウム、セレン、ケイ素（高ドープ多結晶シリコン等）、銀、タンタル、錫、チタン、タングステン、バナジウム、亜鉛、ジルコニウム、その混合物、およびこれらの元素の合金または金属化合物が含まれる。ある特定の実施形態において、伝導性材料は炭素、金、白金、パラジウム、イリジウム、またはこれらの金属の合金を含むが、それは、かかる貴金属およびそれらの合金は水性環境において反応しないからである。

【０２８２】

ある特定の事例において、第１の基板または第２の基板は、ギャップにおいて第１の結合メンバーをその上に固定化することができる。例えば、第２の基板の表面へ直面する関係性である第１の基板の表面は、第１の結合メンバーが配置される領域を含むことができる。本明細書において指摘されるように、固体基板の表面上の第１の結合メンバー（例えばポリペプチド、例えば受容体、抗体またはその機能的断片）は、任意の従来の方法を使用して固定化することができる。ある特定の事例において、ギャップ中の第１の基板または第２の基板の表面上の第１の位置は、１つのタイプの結合メンバー（例えば単一タイプの抗体）のみを含むことができる。他の実施形態において、ギャップ中の第１の基板または第２の基板の表面上の第１の位置は、複数の検体の分析のために、複数の異なる結合メンバーのみを含むことができる。あるいは、デバイスは第１の基板または第２の基板の表面上の複数の場所を含むことができ、そこで各々の場所は、その上に固定化された異なる第１の結合メンバーを含むことができる。

【０２８３】

ギャップ中の第１の基板または第２の基板の表面が、異なる第１の結合メンバーが固定化された複数の場所を有する実施形態において、その場所はデバイスの長さに沿って直線的にアレンジされ得る。サンプル小滴を直線的に動かして、複数の場所の各々に連続して接触させることができる。別の実施形態において、サンプルを複数の小滴へと分割することができ、小滴の各々は、複数の場所の各々に独立して接触させることができる。本明細書

において指摘されるように、第１の結合メンバーは、第１の基板または第２の基板へ添付されなくてもよく、例えば小滴としてマイクロ流体デバイス中に導入され得るビーズへ添付され得る。

【０２８４】

本明細書において指摘されるように、サンプルおよびサンプルのアッセイのための任意の試薬は、離散的な体積の流体として操作することができ、この流体は、プログラム可能な流体操作力（例えばエレクトロウェッティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電界媒介性、電極媒介性の力など）を使用して、第１の基板と第２の基板との間で動かすことができる。例えば、第１の基板および第２の基板のうちの少なくとも１つは、離散的な体積の流体を操作する（例えば、小滴を第１の基板と第２の基板との間で１つの場所から別の場所へ動かす、混合する、合併する、分割する、希釈するなど）ための電極のアレイを含むことができる。別の実施例において、弾性表面波を使用して、検体分析法のために小滴を動かすことができる。

【０２８５】

別の実施形態において、マイクロ流体モジュールは、弾性表面波の使用によって、検体分析を遂行するためにサンプルおよび試薬の小滴を動かすことができる。これらの実施形態において、第１の基板は、弾性表面波の伝播を促す薄い平面の材料であり得る。第１の基板は、圧電性結晶層（ニオブ酸リチウム（ＬｉＮｂＯ$_3$）、クオーツ、ＬｉＴａＯ$_3$ウエハ等）であり得る。ある特定の事例において、圧電ウエハは、超基板へ除去可能にカップリングすることができ、そこでトランスデューサーから生成された弾性表面波（ＳＡＷ）は、圧電性結晶層と超基板との間に配置されるカップリング媒質経由で超基板へ伝達される。超基板の上方表面は第２の基板によって重層され、小滴は、圧電性結晶層へ接続された　型トランスデューサーによって生成されたＳＡＷによって、第２の基板と超基板の上方表面との間の空間中で動かされ得る。ある特定の事例において、マイクロ流体モジュールは、ＷＯ２０１１／０２３９４９（参照により本明細書に援用される）中に記載されるＳＡＷマイクロ流体デバイスであり得る。

【０２８６】

代替の実施形態において、マイクロ流体モジュールは、第１の表面と第２の表面との間の空間を備えて、第２の表面から分離された第１の表面を含むことができ、ここでサンプルおよび試薬の小滴は本明細書において開示されるサンプル分析の実行のために操作される。マイクロ流体デバイスは、第１の表面へカップリングされた弾性表面波（ＳＡＷ）生成材料の層；および第１の表面上の小滴への伝達のために第１の表面で弾性表面波（ＳＡＷ）を提供するようにＳＡＷ生成材料層でアレンジされたトランスデューサー電極構造を更に含むことができ、そこで第１の表面は、第１の表面でのＳＡＷの伝達、分布および／または挙動への影響のために少なくとも１つのＳＡＷ散乱素子を有し、ＳＡＷ生成材料は、多結晶材料、配向多結晶材料、二軸配向多結晶材料、微結晶材料、ナノ結晶材料、非晶質材料および複合材料からなる群から選択される。ある特定の事例において、ＳＡＷ生成材料は、強誘電材料、焦電材料、圧電材料、または磁気歪み材料であり得る。ＳＡＷ散乱素子のアレンジは、実際には、第１の表面で音場と相互作用するかまたは音場に影響するフォノニック結晶構造を提供して、第１の表面上の小滴の動きに影響する。ある特定の事例において、マイクロ流体モジュールは、ＵＳ２０１３０３３０２４７（参照により本明細書に援用される）中に記載されるＳＡＷマイクロ流体デバイスであり得る。ＳＡＷマイクロ流体デバイスは、ナノポアデバイスと併用して使用することができるか、またはナノポアモジュールをそれと共に集積することができる。

【０２８７】

本明細書において記載されるデバイスは、別のデバイス（複数可）（電力源、音響波発生機、および同種のもの等）と併用して使用することができる。

【０２８８】

本明細書において記載される方法ステップの実行のために使用され得るデバイスは、試薬の供給および廃棄材料の収集のための手段も含むことができる。かかる手段には、チャン

バー、吸収パッド、リザーバーなどが含まれ得る。これらの手段はデバイスへ流体的に接続することができる。

【０２８９】

マイクロ流体モジュールは、サンプル分析試薬（第１の結合メンバー、第２の結合メンバー、洗浄バッファー、切断誘導試薬、および同種のもの等）の供給のためにリザーバーへ流体的に接続することができる。ナノポアモジュールは、廃棄材料の収集のためのリザーバー、シスチャンバーおよびトランスチャンバーへの伝導性溶液の供給のためのリザーバー、ならびに同種のものへ流体的に接続することができる。

【０２９０】

集積デバイスは、自動式または半自動式であり得、電極への電圧の供給のための電源および命令の保存のためのランダムアクセスメモリを含むハウジングへ除去可能にカップリングすることができ、この命令は、第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがそれへ添付された切断可能なタグを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること；第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されない第２の結合メンバーを除去すること；第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されている第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；タグを層中のナノポアを介してまたは横切って移動させること；層を介して移動するタグの数を決定すること；固定した時間の間隔について層を介して移動するタグの数または既知の数のタグが移動する時間に基づいてサンプル中の検体を測定することのためのものである。本明細書において指摘されるように、検体分析方法はデバイスを制御するプロセッサーを使用して実施することができる。例えば、デバイスは、本明細書において開示されるように検体分析（本明細書において開示されるように、任意の随意の混合ステップ、インキュベーションステップ、および洗浄ステップが含まれる）を実行するようにプログラムすることができる。ハウジングは、メモリ中に保存された命令の実施のためのプロセッサーを更に含むことができる。本明細書において記載されるデバイスは、ナノポアのデバイスまたはモジュールからの電気信号のプロセシングのためのデータ捕捉モジュール（ＤＡＱ）を含むことができる。ある特定の事例において、電気信号のプロセシングおよび至適の信号対雑音比の達成のためのパッチクランプ増幅器も含むことができる。

【０２９１】

ある特定の事例において、本明細書において記載されるデバイスは、少なくとも検体分析方法のいくつかのステップを自動的に実行するためのシステムと関連させることができる。かかるシステムの例は図９中で示される。例示的なシステムは、プロセッサーおよびメモリを有し、ディスプレイ６１および送信器／受信器ユニット６２（本開示のデバイス６８の受信器／送信器ユニット６９と通信６４する）へ作動可能に接続される、データプロセシングユニット６３を含む、処理構成要素６０を包含する。デバイス６８は、本明細書において開示される検体分析方法のいくつかのステップを少なくとも実行する命令（プログラムのステップ）を実施する処理構成要素６０によって制御される。ある特定の事例において、処理構成要素６０は、コンピューター、集積デバイスの挿入のための開口部を備えた計測器（開口部は、デバイスを収容し作動可能にデバイスへ接続するように、サイズ合わせまたは成形されたスロットであり得る）、またはその組み合わせであり得る。処理構成要素６０とデバイス６８との間の通信６４は有線または無線であり得る。デバイス６８は、マイクロ流体６６およびナノポア６７の機能性を備えた本明細書において記載される任意のデバイスであり得る。ある特定の事例において、米国特許第６，２９４，０６３号（その全体は参照により本明細書に援用される）中で開示されるように、本明細書において開示されるデバイスにおける小滴の動きはプログラムすることができる。

【０２９２】

実施形態に関して本明細書において記載される様々な例示的なプロセスは、汎用プロセッサー、デジタルシグナルプロセッサー（ＤＳＰ）、特定用途向け集積回路（ＡＳＩＣ）、

フィールドプログラマブルゲートアレイ（ＦＰＧＡ）もしくは他のプログラマブルロジックデバイス、離散的ゲートもしくはトランジスタロジック、離散的ハードウェア構成要素、または本明細書において記載される機能を実行するようにデザインされるその任意の組み合わせにより実装または実行することができる。汎用プロセッサーはマイクロプロセッサーであり得るが、代替的に、プロセッサーは任意の従来のプロセッサー、コントローラー、マイクロコントローラー、または状態機械であり得る。プロセッサーはコンピューティングシステムの一部であり得、このコンピューティングシステムは、ユーザーインタフェースと通信しユーザーによって入力されたコマンドを受け取る、ユーザーインタフェースポートも有し、電子情報（プロセッサーの制御下でおよびユーザーインタフェースポート経由の通信により作動するプログラムが含まれる）を保存する、少なくとも１つのメモリ（例えばハードドライブ、他の同等のストレージ、およびランダムアクセスメモリ）、および任意の種類のビデオ出力フォーマット（例えばＶＧＡ、ＤＶＩ、ＨＤＭＩ（登録商標）、ＤｉｓｐｌａｙＰｏｒｔ、または他の形状）によってその出力を生成する、ビデオ出力を有する。

【０２９３】

プロセッサーは、コンピューティングデバイスの組み合わせ（例えばＤＳＰおよびマイクロプロセッサーの組み合わせ、複数のマイクロプロセッサー、ＤＳＰコアと併用した１又は２以上のマイクロプロセッサー、または他のかかる機器構成）としても実装することができる。これらのデバイスを使用して、本明細書において記載されるようなデバイスのための値を選択することもできる。カメラは、光電管、光ダイオード、アクティブピクセルセンサー（ＣＭＯＳ）、ＣＣＤ、光依存性抵抗器、光起電力電池、または他のデジタル画像捕捉技術に基づくカメラであり得る。

【０２９４】

本明細書において開示される実施形態に関して記載される方法またはアルゴリズムのステップは、ハードウェアで、プロセッサーによって履行されたソフトウェアモジュールで、またはその２つの組み合わせで、直接実施することができる。ソフトウェアモジュールは、ランダムアクセスメモリ（ＲＡＭ）、フラッシュメモリー、読み出し専用メモリ（ＲＯＭ）、電気的プログラマブルＲＯＭ（ＥＰＲＯＭ）、電気的消去可能プログラマブルＲＯＭ（ＥＥＰＲＯＭ）、レジスター、ハードディスク、リムーバブルディスク、ＣＤ－ＲＯＭ、クラウド、または当技術分野において公知のストレージメディアの他の形状で存在し得る。例示的なストレージメディアは、プロセッサーがストレージメディアからの情報を読み取り、ストレージメディアへ情報を書き込むことができるように、プロセッサーへカップリングされる。代替のものにおいて、ストレージメディアはプロセッサーへ組み込むことができる。プロセッサーおよびストレージメディアはＡＳＩＣ中に存在し得る。ＡＳＩＣはユーザー端末中に存在し得る。代替のものにおいて、プロセッサーおよびストレージメディアはユーザー端末中で離散的構成要素として存在し得る。

【０２９５】

１又は２以上の例示的実施形態において、記載される機能は、ハードウェア、ソフトウェア、ファームウェア、またはその任意の組み合わせで実装することができる。ソフトウェア中に実装されれば、この機能は、コンピューター読み取り可能なメディア上の１又は２以上の命令、コードまたは他の情報として、分析／計算データアウトプット上に保存され得るか、それらのアウトプットを介して伝達され得るか、またはそれらのアウトプットを生じ得る。コンピューター読み取り可能なメディアはコンピューターストレージメディアおよび通信メディアの両方を含み、それらには、１つの場所から別の場所へコンピュータープログラムの移行を促進する任意のメディアが含まれる。ストレージメディアは、コンピューターによってアクセスできる任意の利用可能な非一時的なメディアであり得る。一例として、かかるコンピューター読み取り可能なメディアには、ＲＡＭ、ＲＯＭ、ＥＥＰＲＯＭ、ＣＤ－ＲＯＭもしくは他の光ディスクストレージ、磁気ディスクストレージもしくは他の磁気ストレージデバイス、または所望されるプログラムコードを命令もしくはデータ構造の形状で保有もしくは保存するために使用することができ、コンピューターがア

クセスできる、他のメディアが含まれ得る。記憶装置は、回転磁気ハードディスクドライブ、光ディスクドライブもしくはフラッシュメモリーベースのストレージドライブ、または他のソリッドステートデバイス、磁気デバイスもしくは光学ストレージデバイス等でもあり得る。ディスク（ｄｉｓｋ）およびディスク（ｄｉｓｃ）には、本明細書において使用される時、コンパクトディスク（ＣＤ）、レーザーディスク（登録商標）、光ディスク、デジタル多用途ディスク（ＤＶＤ）、フロッピーディスクおよびブルーレイディスクが含まれ、そこでディスク（ｄｉｓｋ）は通常磁気的にデータを複製し、その一方で、ディスク（ｄｉｓｃ）がデータをレーザーにより光学的に複製する。上記のものの組み合わせも、コンピューター読み取り可能なメディアの範囲内に含まれるべきである。

【０２９６】

本明細書において開示される実施形態が、メモリ、ストレージ、および／またはコンピューター読み取り可能なメディアを含むか、またはそれらと関連して作動する限りでは、そのメモリ、ストレージ、および／またはコンピューター読み取り可能なメディアは非一時的である。したがって、メモリ、ストレージ、および／またはコンピューター読み取り可能なメディアが１又は２以上の請求項によってカバーされる限りでは、そのメモリ、ストレージ、および／またはコンピューター読み取り可能なメディアは非一時的のみである。

【０２９７】

ある特定の事例において、デバイスは、マイクロ流体デバイス（ラボ・オン・チップデバイス、連続流マイクロ流体デバイス、または小滴ベースのマイクロ流体デバイス等）であり得、そこで検体分析は、検体を含有するかまたは含有する疑いのあるサンプルの小滴において実行することができる。本方法において使用できる例示的なマイクロ流体デバイスには、ＷＯ２００７１３６３８６、ＵＳ８２８７８０８、ＷＯ２００９１１１４３１、ＷＯ２０１００４０２２７、ＷＯ２０１１１３７５３３、ＷＯ２０１３０６６４４１、ＷＯ２０１４０６２５５１、またはＷＯ２０１４０６６７０４中で記載されるものが含まれる。ある特定の事例において、デバイスは、デジタルマイクロ流体デバイス（ＤＭＦ）、弾性表面波ベースのマイクロ流体デバイス（ＳＡＷ）、完全に集積されたＤＭＦおよびナノポアデバイス、または完全に集積されたＳＡＷおよびナノポアデバイスであり得る。いくつかの実施形態において、ＤＭＦ素子およびナノポア素子は、完全に集積されたＤＭＦおよびナノポアデバイスにおいて作動可能にカップリングされるか、またはＳＡＷ素子およびナノポア素子は、完全に集積されたＳＡＷおよびナノポアデバイスにおいて作動可能にカップリングされる。いくつかの実施形態において、ＤＭＦデバイスまたはＳＡＷデバイスは、ロール・ツー・ロールベースのプリンテッドエレクトロニクス方法によって製作される。いくつかの実施形態において、ＤＭＦ素子またはＳＡＷ素子は、ロール・ツー・ロールベースのプリンテッドエレクトロニクス方法によって製作される。いくつかの実施形態において、完全に集積されたＤＭＦおよびナノポアデバイスまたは完全に集積されたＳＡＷおよびナノポアデバイスは、マイクロ流体導管を含む。いくつかの実施形態において、マイクロ流体導管は、ＤＭＦ素子をナノポア素子へカップリングし、マイクロ流体導管は受動的な力または能動的な力によって誘導される流体の流れを含む。

【０２９８】

例示的なエレクトロウェッティング技法はＵＳ８６３７２４２中で見出すことができる。マイクロスケールでの電気泳動（ＷＯ２０１１０５７１９７中で記載されるもの等）も利用することができる。例示的な誘電泳動技法はＵＳ６２９４０６３中で記載される。

【０２９９】

本開示のデバイスは一般的には外部のポンプおよび弁がなく、したがって製造および使用するのに経済的である。本明細書において開示されるデバイスおよび関連するシステムに加えて、本明細書において開示されるすべての方法は、サンプルの供給源で（ケアの現場等で（例えばクリニック、病院、診療所、中核実験所施設、家庭、および同種のもので））のサンプルの分析のため等の当分野における適用のために有用である。いくつかの事例において、本開示のデバイスまたはシステム（例えば本明細書において開示される方法において使用されるようなものも）は、熱源または光源が活性化される場合に、本明細書に

おいて記載されるような検体へタグを連結する熱切断可能なまたは光切断可能なリンカーの切断を誘導するように構成される熱源または光源を含む。

【０３００】

本開示は、ナノポア使用可能デバイスと併用して使用されるマイクロ流体デバイスおよび集積マイクロ流体ナノポア使用可能デバイスも記載する。ナノポア使用可能デバイスは、ナノポアが生じ得る層または膜を含むデバイスを指す。本開示のナノポア使用可能デバイスは層または膜によって分離される２つのチャンバーを含み、そこで２つのチャンバーは電流の伝導のためのイオン性液体（例えば対象となる検体ありまたはなしの塩溶液）を含む。ナノポアは、チャンバー中のイオン性液体（例えば対象となる検体ありまたはなしの塩溶液）を使用して、層を横切る電圧を適用することによって、ナノポア使用可能デバイスの層中で生じることができる。当然のことながら、本明細書において記載される任意のナノポアデバイス（マイクロ流体デバイスと併用して使用されるか、またはマイクロ流体モジュールと共に集積される）は、ナノポアが形成され得るがナノポアを欠損する層を含む、ナノポア使用可能デバイスとして、最初に提供され得る。ナノポアは、使用の間に（タグの移動の検出のためにナノポアを使用する前に等）ナノポア使用可能デバイスにおいて生じることができる。ある特定の実施形態において、ナノポアによって検出されるタグを含有するイオン性液体（例えば塩溶液）は、ナノポアを生ずることおよび生じられたナノポアを横切ってタグを移動させることのための両方に使用することができる。

【０３０１】

いくつかの実施形態において、上記のように層を横切って電圧を適用することによって生じられるナノポアの質は、ベースライン電圧がナノポアの層または膜を横切って適用される場合に測定される電流におけるノイズのレベルによって査定される。

【０３０２】

いくつかの事例において、上記のように層を横切って電圧を適用することによって生じたナノポアを条件付けて、物理的にナノポアを改変すること、および所望される電気浸透の特性を得る（例えばポアサイズを増加する）こと、および／または電圧がナノポアの層もしくは膜を横切って適用される場合にナノポアを横切って測定された電流におけるノイズを低減することができる。したがって、いくつかの実施形態において、集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイスにおいてナノポアを生成する方法は、ナノポアの条件付けを包含し得る。条件付けは、第１の極性を有する第１の電圧および第１の極性の反対の第２の極性を有する第２の電圧をナノポアの層または膜を横切って交互に適用し、そこで第１の電圧および第２の電圧が各々少なくとも１回適用されること；ならびにナノポアのサイズと関係する電気浸透特性を測定することを包含し得る。いくつかの事例において、ナノポアのサイズに関係する電気浸透特性を条件付けの前に測定して、ナノポアのサイズの最初の推定値を得る。

【０３０３】

電気浸透特性は、ナノポアのサイズについての推定値を提供する任意の好適な特性であり得る。いくつかの事例において、電気浸透特性は、ある範囲の電圧（－１Ｖ～１Ｖ、例えば－５００ｍＶ～５００ｍＶ、－２５０ｍＶ～２５０ｍＶ、－２００ｍＶ～２００ｍＶ、１０ｍＶ～５００ｍＶ、１０ｍＶ～２５０ｍＶ、１０ｍＶ～２００ｍＶの範囲、１５ｍＶ～２００ｍＶが含まれる）にわたって得られた電流－電圧カーブによって表わされる。いくつかの事例において、電気浸透特性は、ナノポアの層または膜を横切って測定されたコンダクタンスまたは抵抗値である。

【０３０４】

第１の電圧および第２の電圧は、ナノポアの修飾のためおよび所望される電気浸透特性を得るために、任意の好適な大きさを有することができる。いくつかの事例において、第１の電圧および第２の電圧は、１００ｍＶ以上（例えば２００ｍＶ以上、５００ｍＶ以上、７５０ｍＶ以上、１．０Ｖ以上、２．０Ｖ以上、３．０Ｖ以上（４．０Ｖ以上が含まれる））の大きさを有し、いくつかの事例において、１０Ｖ以下（例えば、９．０Ｖ以下、８．０Ｖ以下、６．０Ｖ以下（４．０Ｖ以下が含まれる））の大きさを有する。いくつかの

実施形態において、第１の電圧および第２の電圧は、１００ｍＶ～１０Ｖの範囲（例えば２００ｍＶ～９．０Ｖ、２５０ｍＶ～９．０Ｖ、５００ｍＶ～９．０Ｖ、１．０Ｖ～８．０Ｖ（２．０Ｖ～６．０Ｖが含まれる））中の大きさを有する。

【０３０５】

第１の電圧および第２の電圧は各々、任意のナノポアの修飾のためおよび所望される電気浸透特性を得るために、好適な時間の長さで適用することができる。いくつかの事例において、第１の電圧および第２の電圧は各々、１０ミリ秒（ｍｓ）以上（例えば、１００ｍｓ以上、２００ｍｓ以上、５００ｍｓ以上、１秒（ｓ）以上、２ｓ以上（３ｓ以上が含まれる））で適用され、いくつかの事例において、１０ｓ以下（例えば５ｓ以下、４ｓ以下、３ｓ以下、２ｓ以下、１ｓ以下、５００ｍｓ以下、２００ｍｓ以下（１００ｍｓ以下が含まれる））で適用される。いくつかの事例において、第１の電圧および第２の電圧は各々、１０ｍｓ～１００ｍｓ、１００ｍｓ～２００ｍｓ、２００ｍｓ～５００ｍｓ、５００ｍｓ～１ｓ、１ｓ～２ｓ、２ｓ～３ｓ、３ｓ～４ｓ、３ｓ～５ｓ、または３ｓ～１０ｓの範囲の継続時間で適用される。

【０３０６】

第１の電圧および第２の電圧は各々、任意のナノポアの修飾のためおよび所望される電気浸透特性を得るために、好適な回数で適用することができる。いくつかの事例において、第１の電圧および第２の電圧は各々、２回以上、３回以上、４回以上、５回以上、７回以上、１０回以上、２０回以上、３０回以上、５０回以上、１００回以上、２００回以上（５００回以上が含まれる）で適用され、いくつかの実施形態において、１０，０００回以下（例えば５，０００回以下、１，０００回以下、５００回以下、４００回以下、２００回以下、１００回以下（５０回以下が含まれる））で適用される。いくつかの実施形態において、第１の電圧および第２の電圧は各々、２～５０回、１０～５０回、３０～５０回、５０～１００回、１００～２００回、１００～５００回、５００～１０００回、５００～１０００回、または５００～１０，０００回で適用される。

４．ＤＭＦモジュールの１つの側面上へのナノポアモジュールの集積

【０３０７】

本開示の態様は、デジタルマイクロ流体（ＤＭＦ）モジュール、およびＤＭＦモジュールの外部側面上に位置するナノポア層を含む、集積デバイスを含む（図４０）。ナノポア層のナノポアは、ＤＭＦモジュールの第１の基板（例えば上部）もしくは第２の基板（例えば底部）中に存在する孔（「開口部」とも称される）を介して、または第１の基板と第２の基板との間のＤＭＦモジュールの側面を介して、ＤＭＦモジュールの内部空間中の小滴によってアクセスされ得る。上述のように、ナノポア層はナノポアの膜または基板を含むことができ、それは、いくつかの事例において、透過電子顕微鏡（ＴＥＭ）ウィンドウ中の商業的に入手可能な窒化ケイ素（SiN_X）膜であり得る。ナノポア層は孔にわたってシールを形成し、その結果、ナノポアの非存在下において（すなわち、本明細書において記載されるようなナノポアの製作の前に）、ＤＭＦモジュール中の液体体積は、ナノポア層の外側側面上のまたはその周囲の任意の液体体積から物理的に単離される。いくつかの事例において、ナノポア層はナノポアモジュールの一部であり、そこでナノポア層は、ＤＭＦモジュール中の液体体積（例えば上記のような基板の孔中の液体小滴）からナノポアモジュール内のコンパートメントを分離する。液体体積（例えば基板の孔中の液体小滴）が外部環境から物理的に単離されるように、ナノポア層またはモジュールは基板の外側表面にシールされる。

【０３０８】

ＤＭＦ中の液体小滴がナノポア層へアクセスする基板中の孔は、液体小滴が毛細管作用によって孔を介して動くのに好適な寸法にすることができる。したがって、基板中の孔はキャピラリーチャンネルであり得る。孔は、孔を介する液体小滴の動きを、例えば毛細管作用によって受動的に支持するように、任意の好適な横断面の形状および寸法を有することができる。いくつかの事例において、孔の直径は、外部側面（すなわちナノポア層に直面する側面）上の孔の直径よりも、ＤＭＦの側面上で、より幅広い。いくつかの事例におい

て、基板の底部表面と孔の壁との間の角度は、直角または鈍角（例えば９０°以上、例えば９５°以上（１００°以上が含まれる））である。

【０３０９】

集積ＤＭＦナノポアモジュールデバイスはペアの電極を含むことができ、本明細書において別記されるように、それらはナノポア層中でのナノポアの製作における使用および／またはＤＭＦモジュールによって加工された対象となる検体の検出のための使用を見出すことができる。ペアの電極は、任意の好適な材料（インジウムスズ酸化物（ＩＴＯ）が含まれるがこれらに限定されない）から作製され得る。ペアの電極は任意の好適な様式で構成され得る。いくつかの実施形態において、１つの電極はナノポアモジュール中のコンパートメント中に位置し、第２の電極は、ナノポア層の他の側面上の液体体積にアクセスするように基板を物理的に貫通することによって、ＤＭＦモジュール中に位置する（図４０）。

【０３１０】

いくつかの実施形態において、第１の電極は、ＤＭＦモジュールにおいて使用される単一の連続的な電極（例えば参照電極）と同じ電極であり得、第２の電極は、第１の電極が位置する底部表面の反対側の、基板の上部表面（すなわち外側表面）上に配置することができる（図４３）。かかる事例において、上部表面は、底部表面と類似する様式で処理することができる（例えばインジウムスズ酸化物等の電極材料およびポリテトラフルオロエチレン（テフロン（登録商標）が含まれる）等のポリマーによるコーティング）。したがって、第２の電極が、ナノポア層／モジュールが添付された基板の上部表面上の電極である、いくつかの事例において、ＤＭＦモジュールと比較してナノポア層の外側の表面上の液体体積は、第２の電極と電気的に接触する。ナノポア製作のために電気的経路は、第２の電極→液体（外部）→ナノポア膜（ナノポアなし）→液体（ＤＭＦモジュールに対して内部）→第１の電極（ＤＭＦの単一の連続的な電極と同じ）として表わすことができる。第２の電極は、ナノポア膜の外側上の液体の中へ電流を流すようにナノポア層／モジュールが添付された領域にも、存在しなくてもよく、それは、いくつかの事例において、ナノポアモジュール内に含有され得る。

【０３１１】

いくつかの実施形態において、図４４中で示されるように、第１の電極は、第１のＤＭＦモジュール（例えば図４４中の「底部ＤＭＦチップ」）において使用される、単一連続的な電極（例えば参照電極）と同じ電極であり、第２の電極は、第２のＤＭＦモジュールの単一の連続的な電極と関連する対応する上部基板中に孔を有する、第２のＤＭＦモジュール（例えば図４４中の「上部ＤＭＦチップ」）によって提供され得、ナノポア層は、それぞれの基板中の孔の間の２つのＤＭＦモジュールの間に置かれる。したがって、第１のＤＭＦモジュールおよび第２のＤＭＦモジュールは互いと比較して逆転した方向性であり得、その結果、第１のＤＭＦモジュールの単一の連続的な電極と関連する上部基板は、第２のＤＭＦモジュールの単一の連続的な電極と関連する上部基板へ近位であり直面する。２つのＤＭＦモジュールは、ナノポア層中にナノポアがある場合に、２つのＤＭＦモジュールがナノポア膜を介して一緒に流体的且つ電気的にカップリングされるように、互いと比べて位置させることができる。ナノポアの形成の前に、２つのＤＭＦモジュール中の２つの流体体積は互いから単離され得る。いくつかの事例において、構造層を２つのＤＭＦモジュール間に置いて、構造的な支持体を提供し湾曲を低減させる。

【０３１２】

上記のような集積ＤＭＦ－ナノポアモジュールデバイスにおいて、ナノポア使用可能層中でナノポアを作製する方法が本明細書において提供される。本方法の実装は、本明細書において記載されるように、任意の好適な方法を使用して、イオン性液体、例えば塩溶液（例えばＬｉＣｌ、ＫＣｌなど）をＤＭＦモジュール中の孔へ位置させ、毛細管作用が孔を介して液体を動かすことを可能にすることを包含することができる（例えば図４０を参照）。イオン性液体（例えば塩溶液）は、ナノポア使用可能層（すなわちナノポアの作製前のナノポア膜）の他の側面上に位置させることができる。ナノポアモジュールは、任意の好適な方法（ＰＤＭＳ、圧力、ワックス、接着剤など等であるが、これらに限定されない

）を使用して、ＤＭＦモジュールからシールされ、その結果、孔中の液体体積は、ナノポア膜の他の側面上の液体体積から単離される。電界の適用（ナノポア使用可能層を横切る電圧がナノポアの最終的な形成をもたらす等）は、例えば電流トレースにおける誘電破壊として容易に検出することができる。

【０３１３】

ナノポア層中でのナノポアの生成の後に、いくつかの事例において、条件付けプロセスを実行して、ナノポアを物理的に修飾しシグナルをクリーンにすることができる。いくつかの事例において、条件付けはナノポアを横切って経時的に適用された電圧を変動することを包含する。

【０３１４】

ナノポア製作の後に、ＤＭＦモジュールを再活性化して、移動のための任意の液体前処理ステップ（例えばＤＭＦ中の溶液を置換する（ＬｉＣｌによるＫＣｌの置換等））を完了することができる。前処理の後に、ＤＭＦの液体体積（例えば対象となる検体を含有する液体サンプル）は、孔中に位置させることができる。次いでＤＭＦシステムを非活性化させることができ、ナノポアモジュールは移動事象を可能にし、検出することができる。

【０３１５】

５．方法およびデバイスの使用についての変形例

対象となるサンプル中に存在する検体の存在または量を決定する開示される方法、およびマイクロ流体デバイスの使用は、上述の通りであり得る。本方法および開示されるマイクロ流体デバイスの使用は、検体を分析する他の方法を考慮して適合させることもできる。周知の変形の例には、サンドイッチ免疫アッセイ（例えば酵素検出を含むモノクローナル－ポリクローナルサンドイッチ免疫アッセイ（酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ））、競合阻害免疫アッセイ（例えばフォワードおよびリバース）、酵素増幅免疫アッセイ技法（ＥＭＩＴ）、競合結合アッセイ、生物発光共鳴エネルギー移動（ＢＲＥＴ）、１ステップ抗体検出アッセイ、ホモジニアスアッセイ、ヘテロジニアスアッセイ、オンザフライ捕捉アッセイなど等の免疫アッセイが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実例において、以下の記載は上記の方法に重複し得る。他には、以下の記載が代替物を提供し得る。

【０３１６】

ａ）免疫アッセイ

対象となる検体および／またはペプチドまたはその断片は、免疫アッセイを使用して分析することができる。対象となる検体の存在または量は、本明細書において記載される抗体を使用し、対象となる検体への特異的結合を検出して決定することができる。任意の免疫アッセイを利用することができる。例えば免疫アッセイは、酵素結合免疫アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、競合阻害アッセイ（フォワード競合阻害アッセイまたはリバース競合阻害アッセイ等）、または競合結合アッセイであり得る。いくつかの実施形態において、１つのタグは捕捉抗体および検出抗体へ添付される。あるいは、捕捉のために用いられるマイクロ粒子またはナノ粒子も検出のために機能することができる（例えばそれが切断可能なリンカーへいくつかの手段によって添付または会合される場合）。

【０３１７】

ヘテロジニアスフォーマットを使用することができる。例えば、試験サンプルが被験体から得られた後に、第１の混合物が調製される。混合物は、対象となる検体について査定されている試験サンプルおよび第１の特異的な結合パートナーを含有し、そこで第１の特異的な結合パートナーおよび試験サンプル中に含有される任意の対象となる検体は、第１の特異的な結合パートナー－対象となる検体の複合体を形成する。好ましくは、第１の特異的な結合パートナーは、抗対象となる検体抗体またはその断片である。試験サンプルおよび第１の特異的な結合パートナーが混合物を形成するのに、添加される順序は重要ではない。好ましくは、第１の特異的な結合パートナーは固相上に固定化される。免疫アッセイにおいて使用される固相（第１の特異的な結合パートナーおよび随意に第２の特異的な結合パートナーのための）は、当技術分野において公知の任意の固相（磁性粒子、ビーズ、

ナノビーズ、マイクロビーズ、ナノ粒子、マイクロ粒子、膜、スキャフォールド分子、フィルム、フィルターペーパー、ディスク、またはチップ（例えばマイクロ流体チップ）等であるがこれらに限定されない）であり得る。

【０３１８】

第１の特異的な結合パートナー－対象となる検体の複合体を含有する混合物が形成された後に、任意の未結合の対象となる検体は、当技術分野において公知の任意の技法を使用して、複合体から除去される。例えば、未結合の対象となる検体は洗浄によって除去することができる。望ましくは、しかしながら、第１の特異的な結合パートナーは、試験サンプル中に存在する任意の対象となる検体について過剰量であり、その結果、試験サンプル中に存在するすべての対象となる検体は第１の特異的な結合パートナーによって結合される。

【０３１９】

任意の対象となる未結合の検体が除去された後に、第２の特異的な結合パートナーを混合物へ添加して、第１の特異的な結合パートナー－対象となる検体－第２の特異的な結合パートナーの複合体を形成する。第２の特異的な結合パートナーは、第１の特異的な結合パートナーによって結合されている対象となる検体上のエピトープとは異なる対象となる検体上のエピトープへ結合する、抗対象となる検体の抗体である。更に、同様に好ましくは、第２の特異的な結合パートナーは、検出可能な標識（例えば上記のように切断可能なリンカーによって添付されたタグ）により標識されるか、またはそれを含有する。

【０３２０】

固定化された抗体またはその断片の使用は、免疫アッセイの中へ取り込まれ得る。抗体は、様々な支持体（磁性マトリックス粒子またはクロマトグラフィーマトリックス粒子、ラテックス粒子または修飾表面ラテックス粒子、ポリマーまたはポリマーフィルム、プラスチックまたはプラスチックフィルム、平面の基板、マイクロ流体表面、固体基板材料片、および同種のもの等）の上へ固定化することができる。

【０３２１】

ｂ）サンドイッチ免疫アッセイ

サンドイッチ免疫アッセイは、抗体の２つの層（すなわち捕捉抗体（すなわち少なくとも１つの捕捉抗体）および検出抗体（すなわち少なくとも１つの検出抗体））の間の抗原の量を測定する。捕捉抗体および検出抗体は、抗原（例えば対象となる検体）上の異なるエピトープへ結合する。望ましくは、捕捉抗体のエピトープへの結合は、検出抗体のエピトープへの結合を妨害しない。モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかを、サンドイッチ免疫アッセイにおける捕捉抗体および検出抗体として使用することができる。

【０３２２】

一般的に、少なくとも２つの抗体が、試験サンプル中の対象となる検体を分離および定量化するために用いられる。より具体的には、少なくとも２つの抗体は対象となる検体または対象となる検体断片の特定のエピトープへ結合し、「サンドイッチ」と称される免疫複合体を形成する。１又は２以上の抗体を使用して、試験サンプル中の対象となる検体を捕捉することができ（これらの抗体は多くの場合「捕捉」抗体（複数可）と称される）、そして検出可能な標識（例えば切断可能なリンカーによって添付されたタグ）を備え対象となる検体も結合する１又は２以上の抗体を使用して、サンドイッチを完成することができる（これらの抗体は多くの場合「検出」抗体（複数可）と称される）。いくつかの実施形態において、アプタマーを第２の結合メンバーとして使用することができ、検出可能なタグとして働くことができる。サンドイッチアッセイにおいて、抗体のそのエピトープへの結合は、アッセイにおける他の抗体のそのそれぞれのエピトープへの結合によって望ましくは減じられない。換言すれば、対象となる検体を含有する疑いのある試験サンプルと接触するように導かれる１又は２以上の第１の抗体は、第２の抗体または後続の抗体によって認識されるエピトープのすべてまたは一部へ結合せず、その結果として、１又は２以上の第２の検出抗体が対象となる検体へ結合する能力を妨害しないように、抗体は選択される。

【０３２３】
好ましい実施形態において、対象となる検体を含有する疑いのある試験サンプルは、少なくとも１つの捕捉抗体（複数可）および少なくとも１つの検出抗体と同時にまたは連続して接触させることができる。サンドイッチアッセイフォーマットにおいて、対象となる検体（膜会合性の対象となる検体、可溶性の対象となる検体、膜会合性の対象となる検体の断片、可溶性の対象となる検体の断片、対象となる検体（膜会合性または可溶性の対象となる検体）のバリアント、または任意のその組み合わせ）を含有する疑いのある試験サンプルは、最初に、抗体－対象となる検体の複合体の形成を可能にする条件下で、特定のエピトープへ特異的に結合する少なくとも１つの捕捉抗体と接触するように導かれる。２つ以上の捕捉抗体が使用されるならば、多重の捕捉抗体－対象となる検体の複合体が形成される。サンドイッチアッセイにおいて、抗体（好ましくは少なくとも１つの捕捉抗体）は、試験サンプル中の予想される対象となる検体または対象となる検体断片について、最大量のモル過剰量で使用される。
【０３２４】
随意に、少なくとも１つの第１の捕捉抗体と試験サンプルを接触させる前に、少なくとも１つの捕捉抗体は固体支持体へ結合することができ、それは試験サンプルから抗体－対象となる検体の複合体の分離を促進する。当技術分野において公知の任意の固体支持体を使用することができ、平面の基板またはビーズの形状でポリマー材料から作られる固体支持体、および同種のものが含まれるが、これらに限定されない。抗体（複数可）は、吸着によって、化学的カップリング剤を使用する共有結合によって、または当技術分野において公知の他の手段によって、固体支持体へ結合することができ、但し、かかる結合は、抗体が対象となる検体または対象となる検体断片を結合する能力を妨害しない。更に、必要であるならば、固体支持体は、抗体上の様々な官能基との反応性を可能にするように誘導体化され得る。かかる誘導体化は、特定のカップリング剤（マレイン酸無水物、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、アジド、アルキニル、および１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド等であるが、これらに限定されない）の使用を要求する。
【０３２５】
対象となる検体を含有する疑いのある試験サンプルが、少なくとも１つの捕捉抗体と接触するように導かれた後に、試験サンプルは、捕捉抗体（複数可）－対象となる検体の複合体の形成を可能にするようにインキュベーションされる。インキュベーションは、約４．５～約１０．０のｐＨで、約２℃～約４５℃の温度で、および少なくとも約１分間～約１８時間、約２～６分間、または約３～４分間の期間の間で、実行することができる。
【０３２６】
捕捉抗体（複数可）－対象となる検体の複合体の形成の後に、次いで複合体は少なくとも１つの検出抗体と接触させられる（捕捉抗体（複数可）－対象となる検体－検出抗体（複数可）の複合体の形成を可能にする条件下で）。捕捉抗体－対象となる検体の複合体が２つ以上の検出抗体と接触されるならば、次いで捕捉抗体（複数可）－対象となる検体－検出抗体（複数可）の検出複合体が形成される。捕捉抗体でのように、少なくとも１つの検出（および後続の）抗体が、捕捉抗体－対象となる検体の複合体と接触するように導かれる場合に、上記のものに類似する条件下でのインキュベーションの期間は、捕捉抗体（複数可）－対象となる検体－検出抗体（複数可）の複合体の形成のために要求される。好ましくは、少なくとも１つの検出抗体は検出可能な標識（例えば切断可能なリンカーによって添付されたタグ）を含有する。検出可能な標識は、捕捉抗体（複数可）－対象となる検体－検出抗体（複数可）の複合体の形成の前に、それと同時に、またはその後で、少なくとも１つの検出抗体へ結合され得る。当技術分野において公知の任意の検出可能な標識を使用することができる（例えば本明細書において議論されるような切断可能なリンカー、および当技術分野において公知の他のもの）。
【０３２７】
試験サンプルおよび特異的な結合パートナー（複数可）がアッセイのための混合物を形成するのに、添加される順序は重要ではない。第１の特異的な結合パートナーが検出可能に

標識されるならば（例えば切断可能なリンカーにより添付されたタグ）、次いで検出可能に標識された第１の特異的な結合パートナー－対象となる検体の複合体を形成する。あるいは、第２の特異的な結合パートナーが使用され、第２の特異的な結合パートナーが検出可能に標識されるならば（例えば切断可能なリンカーにより添付されたタグ）、次いで第１の特異的な結合パートナー－対象となる検体－第２の特異的な結合パートナーの検出可能に標識された複合体を形成する。任意の未結合の特異的な結合パートナーは、標識または未標識であるかにかかわらず、当技術分野において公知の（洗浄等）任意の技法を使用して、混合物から除去することができる。

【０３２８】

次に、シグナル（対象となる検体またはその断片の存在を表す）が生成される。生成されたシグナルのパラメーターに基づいて、サンプル中の対象となる検体の量を定量化することができる。随意に、スタンダードカーブは、質量分光法、重量法、および当技術分野において公知の他の技法によって、対象となる検体の連続希釈物または既知の濃度の溶液を使用して生成することができる。

【０３２９】

ｃ）フォワード競合阻害

フォワード競合フォーマットにおいて、既知の濃度の対象となる標識検体（例えば切断可能なリンカーにより添付されたタグを有する検体）のアリコートを使用して、対象となる検体抗体への結合を、試験サンプル中の対象となる検体と競合する。

【０３３０】

フォワード競合アッセイにおいて、固定化された特異的な結合パートナー（抗体等）は、連続してまたは同時に、試験サンプル、および標識された対象となる検体、標識された対象となる検体断片、または標識されたその対象となる検体バリアントと接触させることができる。対象となる検体ペプチド、対象となる検体断片、または対象となる検体バリアントは、任意の検出可能な標識（切断可能なリンカーにより添付されたタグからなる検出可能な標識が含まれる）により標識することができる。このアッセイにおいて、抗体は固体支持体の上へ固定化することができる。あるいは、抗体は、固体支持体（マイクロ粒子または平面の基板等）上に固定化された抗体（抗動物種抗体等）へカップリングすることができる。

【０３３１】

生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法が、本明細書において提供される。本方法は、結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；標識検体が切断可能なタグにより標識されるところで、サンプル（それは結合メンバーへ結合されている検体を含有し得る）を標識検体と接触させること；結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること；切断されたタグを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを包含する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの測定は査定され、そこで層を介して移動するタグの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの検出は査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【０３３２】

生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法が、本明細書において提供される。本方法は、結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；標識検体がアプタマーを含むところで、サンプル（それは結合メンバーへ結合されている検体を含有し得る）を標識検体と接触させること；結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；

結合メンバーへ結合されている標識検体へ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを包含する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの測定は査定され、そこで層を介して移動するアプタマーの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの検出は査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【０３３３】

対象となる標識検体、試験サンプル、および抗体は、サンドイッチアッセイフォーマットに関して上で記載されるものに類似する条件下で、インキュベーションされる。次いで抗体－対象となる検体の複合体の異なる２つの種が生成され得る。具体的には、生成された抗体－対象となる検体の複合体のうちの１つは検出可能な標識（例えばタグ）を含有し、その一方で、他の抗体－対象となる検体の複合体は検出可能な標識を含有しない。抗体－対象となる検体の複合体は、検出可能な標識の定量化の前に試験サンプルの残りから分離することができるが、分離しなくてはならないわけではない。抗体－対象となる検体の複合体が試験サンプルの残りから分離されるかどうかにかかわらず、次いで抗体－対象となる検体の複合体中の検出可能な標識の量が定量化される。次いで、試験サンプル中の対象となる検体（膜会合性の対象となる検体、可溶性の対象となる検体、可溶性の対象となる検体の断片、対象となる検体（膜会合性または可溶性の対象となる検体）のバリアント、または任意のその組み合わせ等）の濃度は、例えば上記のように決定することができる。有用であるならば、決定は、抗体－対象となる検体の複合体中の検出可能な標識の量をスタンダードカーブへ比較することによって行うことができる。濃度が、質量分光法、重量法、および当技術分野において公知の他の技法によって決定される場合、スタンダードカーブは、既知の濃度の対象となる検体（膜会合性の対象となる検体、可溶性の対象となる検体、可溶性の対象となる検体の断片、対象となる検体（膜会合性または可溶性の対象となる検体）のバリアント、または任意のその組み合わせ等）の連続希釈を使用して、生成することができる。

【０３３４】

随意に、抗体－対象となる検体の複合体は、固体支持体（サンドイッチアッセイフォーマットに関して上で議論された固体支持体等）へ抗体を結合すること、および次いで固体支持体との接触から試験サンプルの残りを除去することによって、試験サンプルから分離することができる。

【０３３５】

ｄ）リバース競合アッセイ

リバース競合アッセイにおいて、対象となる固定化検体は、試験サンプルおよび少なくとも１つの標識抗体と連続してまたは同時に接触させることができる。

【０３３６】

生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法が、本明細書において提供される。本方法は、結合メンバーが検体へ特異的に結合し、結合メンバーが切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプル（それは結合メンバーへ結合されている検体を含有し得る）を固定化検体と接触させること；固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること；固定化検体へ結合されている結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；切断されたタグを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを包含する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの測定は査定され、そこで層を介して移動する

タグの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するタグの検出は査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【０３３７】

生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法が、本明細書において提供される。本方法は、結合メンバーが検体に特異的に結合し、結合メンバーがアプタマーを含むところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプル（それは結合メンバーへ結合されている検体を含有し得る）を固定化検体と接触させること；固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること；固定化検体へ結合されている結合メンバーへ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを包含する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの測定は査定され、そこで層を介して移動するアプタマーの数がサンプル中に存在する検体の量を測定する。いくつかの実施形態において、層を介して移動するアプタマーの検出は査定され、そこで層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出する。

【０３３８】

対象となる検体は、固体支持体（サンドイッチアッセイフォーマットに関して上で議論される固体支持体等）へ結合され得る。

【０３３９】

対象となる固定化検体、試験サンプル、および少なくとも１つの標識抗体は、サンドイッチアッセイフォーマットに関して上記のものに類似する条件下でインキュベーションされる。次いで２つの異なる種の対象となる検体－抗体の複合体が生成される。具体的には、生成された対象となる検体－抗体の複合体のうちの１つは、固定化され、検出可能な標識（例えば切断可能なリンカーにより添付されたタグ）を含有し、その一方で、他の対象となる検体－抗体の複合体は固定化されず、検出可能な標識を含有する。固定化されない対象となる検体－抗体の複合体および試験サンプルの残りは、当技術分野において公知の技法（洗浄等）を介して、固定化された対象となる検体－抗体の複合体の存在から除去される。一旦固定化されない対象となる検体－抗体の複合体が除去されたならば、次いで固定化された対象となる検体－抗体の複合体中の検出可能な標識の量は、タグの切断に後続して定量化される。次いで試験サンプル中の対象となる検体の濃度は、上記のように検出可能な標識の量を比較することによって決定することができる。有用であるならば、これはスタンダードカーブの使用により行う。濃度が、質量分光法、重量法、当技術分野において公知の他の技法によって決定される場合に、スタンダードカーブは、既知の濃度の対象となる検体または対象となる検体断片の連続希釈物を使用して、生成することができる。

【０３４０】

ｅ）１ステップ免疫アッセイまたはオンザフライ捕捉アッセイ

１ステップ免疫アッセイまたはオンザフライ捕捉アッセイにおいて、固体基板は固定化剤により前コーティングされる。捕捉剤、検体および検出剤を固体基板へ一緒に添加し、続いて検出の前に洗浄ステップを行う。捕捉剤は検体を結合することができ、固定化剤のためのリガンドを含む。捕捉剤および検出剤は、本明細書において記載されるようなまたは当技術分野において公知の、捕捉または検出の可能な抗体または任意の他の部分であり得る。リガンドはペプチドタグを含むことができ、固定化剤は抗ペプチドのタグ抗体を含むことができる。あるいは、リガンドおよび固定化剤は、オンザフライ捕捉アッセイ（例えば特異的な結合ペアおよび当技術分野において公知の他のもの等）のために用いられるように、一緒に結合できる任意のペアの薬剤であり得る。２つ以上の検体を測定することができる。いくつかの実施形態において、固体基板は抗原によりコーティングすることができ、分析される検体は抗体である。

【０３４１】
いくつかの実施形態において、固定化剤（ビオチン、ストレプトアビジンなど等）によりあらかじめコーティングされた固体支持体（マイクロ粒子等）ならびに少なくとも第１の特異的な結合メンバーおよび第２の特異的な結合メンバー（それらは捕捉試薬および検出試薬としてそれぞれ機能する）が使用される。第１の特異的な結合メンバーは、固定化剤についてのリガンドを含み（例えば、固体支持体上の固定化剤がストレプトアビジンであるならば、第１の特異的な結合メンバー上のリガンドはビオチンであり得る）、対象となる検体へも結合する。第２の特異的な結合メンバーは検出可能な標識を含み、対象となる検体へ結合する。固体支持体ならびに第１の特異的な結合メンバーおよび第２の特異的な結合メンバーは、試験サンプルへ添加され得る（連続してまたは同時に）。第１の特異的な結合メンバー上のリガンドは固体支持体上の固定化剤へ結合して、固体支持体／第１の特異的な結合メンバーの複合体を形成する。サンプル中に存在する任意の対象となる検体は固体支持体／第１の特異的な結合メンバーの複合体へ結合して、固体支持体／第１の特異的な結合メンバー／検体の複合体を形成する。第２の特異的な結合メンバーは固体支持体／第１の特異的な結合メンバー／検体の複合体へ結合し、検出可能な標識が検出される。随意の洗浄ステップを検出の前に用いることができる。ある特定の実施形態において、１ステップアッセイにおいて、２つ以上の検体を測定することができる。ある特定の他の実施形態において、３つ以上の特異的な結合メンバーを用いることができる。ある特定の他の実施形態において、複数の検出可能な標識を追加することができる。ある特定の他の実施形態において、複数の対象となる検体を検出することができる。
【０３４２】
１ステップの免疫アッセイまたはオンザフライ捕捉アッセイの使用は、本明細書において記載されるような、および当技術分野において公知の様々なフォーマットにおいて行うことができる。例えば、フォーマットは、上記のもの等のサンドイッチアッセイであり得るが、あるいは競合アッセイであり得るか、単一の特異的な結合メンバーを用いることができるか、または公知のもの等の他の変形を使用することができる。
【０３４３】
ｆ）組み合わせアッセイ（Ａｇ／Ａｂによるマイクロ粒子の共コーティング）
組み合わせアッセイにおいて、固体基板（マイクロ粒子等）は抗原および抗体により共コーティングされて、サンプルから抗体および抗原をそれぞれ捕捉する。固体支持体を２つ以上の異なる抗原により共コーティングして、サンプルから２つ以上の異なる抗体を捕捉することができる。固体支持体を２つ以上の異なる抗体により共コーティングして、サンプルから２つ以上の異なる抗原を捕捉することができる。
【０３４４】
加えて、本明細書において記載される方法は、アッセイ化合物の中での特異的または非特異的な結合反応（例えばＨＡＭＡ問題）を阻止するブロッキング剤を使用することができる。一旦薬剤（随意に任意の対照）が支持体上に固定化されたならば、薬剤の残りの結合部位は支持体上でブロックされ得る。当業者に公知の任意の好適なブロッキング試薬を使用することができる。例えば、ウシ血清アルブミン（「ＢＳＡ」）、ＰＢＳ中のカゼインのリン酸緩衝食塩水（「ＰＢＳ」）溶液、Ｔｗｅｅｎ ２０（商標）（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、Ｍｏ．）、または他の好適な界面活性剤に加えて、他のブロッキング試薬を、用いることができる。
【０３４５】
本開示から明らかなように、本明細書において開示される方法およびデバイス（変形が含まれる）は、疾患、障害または病態を有する疑いのある被験体における疾患、障害または病態を診断するために使用することができる。例えば、サンプル分析は、疾患マーカー（癌マーカー、心臓の病態についてのマーカー等）、毒素、病原体（ウイルス、細菌、またはその一部分等）の検出に有用であり得る。方法およびデバイスは、生物学的サンプル中に存在する検体の測定のために使用することもできる。方法およびデバイスは、標的検体を検出するために血液検査アッセイにおいて使用することもできる。血液検査アッセイは

、血液供給をスクリーニングするために使用することができる。

【０３４６】

６．カウントおよびデータ分析

移動事象の数は、当技術分野において公知の任意のルーチンの技法を定性的または定量的に使用して決定することができる。いくつかの実施形態において、移動事象の数は、方程式

【数１】

$$\Delta G = \frac{\sigma \pi d_{DNA}^2}{4L} \quad (S1)$$

を使用して、実験試験条件下の二本鎖ＤＮＡ移動事象において見出される予想された電流変化を最初に計算することによって、決定することができ、この方程式は、Ｋｗｏｋ ｅｔａｌ．、「Ｎａｎｏｐｏｒｅ Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ ｂｙ ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｉｅｌｅｃｔｒｉｃ Ｂｒｅａｋｄｏｗｎ」Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｓｅｃｔｉｏｎ ８およびＫｗｏｋ，Ｈ．；Ｂｒｉｇｇｓ，Ｋ．；ａｎｄ Ｔａｂａｒｄ－Ｃｏｓｓａ，Ｖ．；「Ｎａｎｏｐｏｒｅ Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ ｂｙ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｉｅｌｅｃｔｒｉｃ Ｂｒｅａｋｄｏｗｎ」－ＰＬｏＳ ＯＮＥ ９（３）：ｅ９２８８０（２０１４）中で参照される通りである。この予想された電流遮断値を使用して、実験的なナノポアアウトプットのバイナリーファイルデータは、視覚または手動により許容される予想された電流遮断事象についてスキャンすることができる。これらの事象を使用して、ＣＵＳＵＭナノポアソフトウェアのために要求される閾値およびヒステリシスパラメーターを適用および履行することができる。このソフトウェアからのアウトプットを、ｃｕｓｕｍｔｏｏｌｓ ｒｅａｄｅｖｅｎｔｓ．ｐｙソフトウェアを使用し、１０００ｐＡより大きい遮断事象（第１の計算から決定されるように）をフィルタリングして、更に分析することができる。流動事象、事象の間の時間、および他の計算を、ｒｅａｄｅｖｅｎｔｓ．ｐｙ分析ツールから決定することができる。追加の計算を、ＪＭＰソフトウェア（ＳＡＳ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、Ｃａｒｙ、Ｎｏｒｔｈ Ｃａｒｏｌｉｎａ）を使用して、ＣＵＳＵＭ生成データに対して行うことができる。当技術分野において公知のデータ分析のための閾値設定の他の方法を使用することができる。

【０３４７】

７．定性分析

定性分析は、本明細書において記載されるようなステップの方法およびプロセスを使用して遂行することができる。図２５中で示され、実施例１７中で記載されるように、チオールベースの切断ステップにより、切断可能なリンカーコンジュゲートを使用して、直接分析を遂行することができる。本明細書において記載されるような様々なタグのカウントを可能にするように、かかるアッセイの遂行への他の切断可能なリンカーアプローチは、リンカーの切断の様々な他の方法も包含し得るが、これらに限定されないことが理解される。加えて、アプタマーを用いることができる。例えば、実施例１７中で記載される方法に加えて他のかかる代替の切断方法および／または試薬は、実施例１６、実施例１８、実施例１９、実施例２０および実施例２１中で記載されるものに加えて、本明細書において記載されるおよび当業者に公知の他の切断方法を包含することができる。この実施例（実施例２４）において実証されたアッセイフォーマットが、直接分析を表わしている一方で、他のフォーマット（サンドイッチ免疫アッセイフォーマットおよび／または様々な競合アッセイフォーマット等、および当業者に公知のオンザフライ捕捉フォーマット等が含まれる）は、記載される方法を使用して、アッセイを実装、また遂行できることも理解される。

【０３４８】

例えば、ＴＳＨ（甲状腺刺激ホルモン）の検出のためのサンドイッチ免疫アッセイフォー

マットは、実施例９中で記載されるように、低費用のＤＭＦチップ上でかかるアッセイを遂行する能力を実証した。加えて、切断可能なリンカーを有する免疫コンジュゲートまたは他の活性のある特異的な結合メンバーの生成のために有用な多くの様々なバイオコンジュゲーション試薬は、様々なヘテロ二官能性の切断可能なリンカー（実施例１、実施例２、実施例３、実施例４、実施例５および実施例６中で記載されるもの等）に加えて、それ以外に当業者に公知の他の切断可能なリンカーを使用して、合成することができる。本発明の実践のために有用な免疫コンジュゲートは、実施例３、実施例４、実施例５および実施例６中で記載されるもの等の方法に加えて、当業者に公知の他の方法によって、合成することができる。加えて、実施例８は、様々なアッセイフォーマット（サンドイッチおよび競合アッセイのフォーマットが含まれ、オンザフライ捕捉フォーマットが含まれ、それらに加えて、当業者に公知の他のその変形）を実行するのに必要とされる様々なステップを促進することができる、低費用のチップ上での様々な流体小滴操作の機能性を示す。実施例１１は、アッセイにおける切断可能な標識をカウントするのに使用できるナノポアの製作を示すが、当業者に公知のナノポア製作のための他の方法を、この目的のために使用できることが理解される。実施例１６もアッセイの遂行のために有用な別のコンストラクトを表わし、そこでは、切断が達成され、したがって、この実施例内で記載されるようなナノポアカウント方法を使用してカウント可能であるように、放出されているカウント可能な標識を導く。このコンストラクトおよび当業者へ明らかな他のものは、本明細書において記載されるようなアッセイにおいて使用することができる。

【０３４９】

実施例２２は、カウントが、一般的にはどのようにナノポアを横断する様々な標識の存在に関係する移動事象を測定できるようにするのかを示す。図２９は、カウントアッセイにおけるデータの質を操作できるようにシグナルを閾値化する概念を示す。図２８は、この実施例内で記載されるようなかかるアッセイ方法を使用して検体の存在を決定するのに使用できるタイプのデータの代表である定性アッセイデータを示す。ｄｓＤＮＡはこの特定の実施例において標識として使用されたが、他の標識（実施例５および／または実施例２２中で記載される標識等）を利用することができ、ナノビーズおよびデンドリマーおよび同種のものが含まれるが、これらに限定されないことも理解される。更に、他の公知の標識も用いることができる。適切な試薬を生成するのに必要なコンストラクトは、本出願中で記載される様々な実施例を介して、またはそうでなければ当業者に公知の方法によって合成することができる。

【０３５０】

８．定量分析

定量的アッセイは、本明細書において記載されるような方法およびステップのプロセスを使用して遂行することができる。図２５中で示され、実施例１７中で記載されるように、チオールベースの切断ステップにより、切断可能なリンカーコンジュゲートを使用して、直接分析を遂行することができる。本明細書において記載されるような様々なタグをナノポアを使用してカウントすることを可能にするように、かかるアッセイの遂行への他の切断可能なリンカーアプローチは、リンカーの切断の様々な他の方法も包含し得るが、これらに限定されないことが理解される。加えて、アプタマーを用いることができる。例えば、実施例１７中で記載される方法に加えて他のかかる切断方法は、実施例１８、実施例１９、実施例２０および実施例２１中で記載されるものに加えて、本明細書において記載されるおよび当業者に公知の他の方法を包含することができるが、これらに限定されない。この実施例（実施例２５）において実証されたアッセイフォーマットが、直接分析を表わしている一方で、他のフォーマット（サンドイッチ免疫アッセイフォーマットおよび／または様々な競合アッセイフォーマット等、および当業者に公知のオンザフライ捕捉フォーマット等が含まれる）は、アッセイを実装、また遂行することができることも理解される。

【０３５１】

例えば、ＴＳＨ（甲状腺刺激ホルモン）の検出のためのサンドイッチ免疫アッセイフォーマットは、実施例９中で記載されるように、低費用のＤＭＦチップ上でかかるアッセイを

遂行する能力を実証した。加えて、切断可能なリンカーを有する免疫コンジュゲートまたは他の活性のある特異的な結合メンバーの生成のために有用な多くの様々なバイオコンジュゲーション試薬は、方法（実施例１、実施例２、実施例３、実施例４、実施例５および実施例６中で記載されるもの等）によって合成された様々なヘテロ二官能性の切断可能なリンカーおよびコンジュゲートに加えて、当業者に公知の方法によって合成することができる他の切断可能なリンカーまたはコンジュゲートを使用して、当業者によって合成することができる。加えて、実施例８は、様々なアッセイフォーマット（サンドイッチおよび競合アッセイのフォーマットが含まれ、オンザフライ捕捉フォーマットが含まれ、それらに加えて、当業者に公知の他のその変形）を実行するのに必要とされる様々なステップを促進することができる、低費用のチップ上での様々な流体小滴操作の機能性を示す。実施例１６もアッセイの遂行のために有用な別のコンストラクトを表わし、そこでは、切断が達成され、したがって、この実施例内で記載されるようなナノポアカウント方法を使用してカウント可能であるように、放出されているカウント可能な標識を導く。このコンストラクトに加えて当業者へ明らかな他のものは、本明細書において記載されるようなアッセイにおいて使用することができる。

【０３５２】

実施例２２は、カウントが、一般的にはどのようにナノポアを横断する標識の存在に関係する移動事象を測定できるようにするのかを示す。図２９は、カウントアッセイにおけるデータの質を操作できるようにシグナルを閾値化する概念を示す。図３１、３２および３３は、この実施例内で記載されるようなかかるアッセイ方法を使用して検体の量を決定するのに使用できるタイプのデータの代表である定量アッセイデータアウトプットを示す。図３４は、化学的方法を使用して切断されたコンストラクトから生成されたスタンダードカーブを示す。ｄｓＤＮＡはこの特定の実施例において標識として使用されたが、他の標識（実施例５中で記載される標識等）を利用することができ、ナノビーズおよびデンドリマーおよび同種のものが含まれるが、これらに限定されないことも理解される。更に、他の公知の標識も用いることができる。適切な試薬を生成するのに必要なコンストラクトは、本明細書において記載されるように、または当業者に公知の方法によって合成することができる。

【０３５３】

９．キットおよびカートリッジ

開示されるデバイスありまたはなしで上述の方法の実行における使用のためのキットも本明細書において提供される。キットは、開示されるデバイスによる検体の分析のための指示を含むことができる。キット中に含まれる指示は、パッケージ材料へ添付され得るか、またはパッケージ挿入物として含まれ得る。指示は書面または印刷材料であり得るが、これらに限定されない。かかる指示を保存することができ、エンドユーザーへそれらを伝える任意のメディアは、本開示によって企図される。かかるメディアには、電子ストレージメディア（例えば磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学メディア（例えばＣＤ　ＲＯＭ）、および同種のものが含まれるが、これらに限定されない。本明細書において使用される時、「指示」は、指示を提供するインターネットサイトのアドレスを包含することができる。

【０３５４】

キットは、上記のような、内蔵のナノポアモジュールと共にマイクロ流体モジュールを含むカートリッジを含むことができる。いくつかの実施形態において、マイクロ流体モジュールおよびナノポアモジュールは、ともに可逆的な集積のための分離した構成要素であり得るか、またはカートリッジに完全にもしくは不可逆的に集積され得る。カートリッジは使い捨てであり得る。カートリッジは、上で開示される方法の実践のために有用な１又は２以上の試薬を含むことができる。試薬の適合性があるところで、カートリッジは、１又は２以上の分離した組成物として、または随意に混和物として、試薬を保持する１又は２以上の容器を含むことができる。カートリッジは、ユーザーの観点から所望され得る他の材料（複数可）（バッファー（複数可）、希釈液（複数可）、スタンダード（複数可）（

例えばキャリブレーターおよび対照）、および／またはサンプルの加工、洗浄、もしくはアッセイの任意の他のステップの遂行において有用な、他の材料等）も含むことができる。カートリッジは、上記の特異的な結合メンバーのうちの１又は２以上を含むことができる。

【０３５５】

代替的または追加的に、キットは、キャリブレーターもしくは対照（例えばカートリッジ上でもしくは独立して、精製され、随意に凍結乾燥されるか、または液体、ゲルもしくは他の形状での対象となる検体）、ならびに／または上記のデバイスおよび方法による使用のための少なくとも１つ容器（例えばチューブ、マイクロタイタープレートまたはストリップ）、ならびに／またはバッファー（アッセイバッファーまたは洗浄バッファー等）を含むことができ、そのうちのいずれか１つは濃縮された溶液として提供することができる。いくつかの実施形態において、キットは、アッセイを実行するのに必要なすべての構成要素（すなわち試薬、スタンダード、バッファー、希釈液など）を含む。指示は、スタンダードカーブの生成のための指示も含むことができる。

【０３５６】

キットは、対象となる検体の定量化のための参照スタンダードを更に含むことができる。参照スタンダードを用いて、対象となる検体濃度の内挿および／または外挿のためにスタンダードカーブを確立することができる。キットは、濃度レベルに関して変動する参照スタンダードを含むことができる。例えば、キットは、高濃度レベル、中間濃度レベル、または低濃度レベルのいずれかを備えた１又は２以上の参照スタンダードを含むことができる。参照スタンダードのための濃度の範囲に関して、アッセイごとに最適化することができる。参照スタンダードのための例示的な濃度範囲には、例えば約１０ｆｇ／ｍＬ、約２０ｆｇ／ｍＬ、約５０ｆｇ／ｍＬ、約７５ｆｇ／ｍＬ、約１００ｆｇ／ｍＬ、約１５０ｆｇ／ｍＬ、約２００ｆｇ／ｍＬ、約２５０ｆｇ／ｍＬ、約５００ｆｇ／ｍＬ、約７５０ｆｇ／ｍＬ、約１０００ｆｇ／ｍＬ、約１０ｐｇ／ｍＬ、約２０ｐｇ／ｍＬ、約５０ｐｇ／ｍＬ、約７５ｐｇ／ｍＬ、約１００ｐｇ／ｍＬ、約１５０ｐｇ／ｍＬ、約２００ｐｇ／ｍＬ、約２５０ｐｇ／ｍＬ、約５００ｐｇ／ｍＬ、約７５０ｐｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１２．５ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約４５ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７５ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約８５ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約９５ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１２５ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、約１６５ｎｇ／ｍＬ、約１７５ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約２２５ｎｇ／ｍＬ、約２５０ｎｇ／ｍＬ、約２７５ｎｇ／ｍＬ、約３００ｎｇ／ｍＬ、約４００ｎｇ／ｍＬ、約４２５ｎｇ／ｍＬ、約４５０ｎｇ／ｍＬ、約４６５ｎｇ／ｍＬ、約４７５ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、約５２５ｎｇ／ｍＬ、約５５０ｎｇ／ｍＬ、約５７５ｎｇ／ｍＬ、約６００ｎｇ／ｍＬ、約７００ｎｇ／ｍＬ、約７２５ｎｇ／ｍＬ、約７５０ｎｇ／ｍＬ、約７６５ｎｇ／ｍＬ、約７７５ｎｇ／ｍＬ、約８００ｎｇ／ｍＬ、約８２５ｎｇ／ｍＬ、約８５０ｎｇ／ｍＬ、約８７５ｎｇ／ｍＬ、約９００ｎｇ／ｍＬ、約９２５ｎｇ／ｍＬ、約９５０ｎｇ／ｍＬ、約９７５ｎｇ／ｍＬ、約１０００ｎｇ／ｍＬ、約２μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ、約４μｇ／ｍＬ、約５μｇ／ｍＬ、約６μｇ／ｍＬ、約７μｇ／ｍＬ、約８μｇ／ｍＬ、約９μｇ／ｍＬ、約１０μｇ／ｍＬ、約２０μｇ／ｍＬ、約３０μｇ／ｍＬ、約４０μｇｍＬ、約５０μｇ／ｍＬ、約６０μｇ／ｍＬ、約７０μｇ／ｍＬ、約８０μｇ／ｍＬ、約９０μｇ／ｍＬ、約１００μｇｍＬ、約２００μｇｍＬ、約３００μｇｍＬ、約４００μｇｍＬ、約５００μｇｍＬ、約６００μｇｍＬ、約７００μｇ／ｍＬ、約８００μｇ／ｍＬ、約９００μｇ／ｍＬ、約１０００μｇ／ｍＬ、約２０００μｇ／ｍＬ、約３０００μｇ／ｍＬ、約４０００μｇ／ｍＬ、約５０００μｇ／ｍＬ、約６０００μｇ／ｍＬ、約７０００μｇ／ｍＬ、約８０００μｇ／ｍＬ、約９０００μｇ／ｍＬ、または約１００００μｇ／ｍＬ、が含まれるが、これらに限定されない。

【０３５７】

キット中で提供される任意の特異的な結合メンバーは、タグもしくは標識（フルオロフォア、酵素、アプタマー、デンドリマー、ビーズ、ナノ粒子、マイクロ粒子、ポリマー、タンパク質、ビオチン／アビジン標識、または同種のもの等）を取り込むことができるか、または、キットは特異的な結合メンバーの標識のための試薬または特異的な結合メンバーの検出のためおよび／もしくは検体の標識のための試薬または検体の検出のための試薬を含むことができる。所望されるならば、キットは１又は２以上の異なるタグまたは標識を含有することができる。キットは、切断を惹起する構成要素（切断媒介試薬等）も含むことができる。例えば、切断媒介試薬は還元剤（ジチオスレイトール（ＤＴＴ）またはトリ（２－カルボキシエチル）ホスフィン）ＴＣＥＰ等を含むことができる。特異的な結合メンバー、キャリブレーター、および／または対照は、分離した容器中で提供されるか、または適切なアッセイフォーマットもしくはカートリッジの中へ前分注され得る。タグは開示されるデバイスを使用して検出することができる。

【０３５８】

例えば、キットは１又は２以上の特異的な結合メンバーを含んで、マルチプレックス化アッセイにおけるサンプル中の１又は２以上の標的検体を検出することができる。キット中の異なるタイプの特異的な結合メンバーの数は、キットの意図される使用に広く依存する範囲であり得る。キット中の特異的な結合メンバーの数は、１～約１０、またはより高い範囲であり得る。例えば、キットは、１～１０の特異的な結合メンバー、１～９の特異的な結合メンバー、１～８の特異的な結合メンバー、１～７の特異的な結合メンバー、１～６の特異的な結合メンバー、１～５の特異的な結合メンバー、１～４の特異的な結合メンバー、１～３の特異的な結合メンバー、１～２の特異的な結合メンバー、２～１０の特異的な結合メンバー、２～９の特異的な結合メンバー、２～８の特異的な結合メンバー、２～７の特異的な結合メンバー、２～６の特異的な結合メンバー、２～５の特異的な結合メンバー、２～４の特異的な結合メンバー、３～１０の特異的な結合メンバー、３～９の特異的な結合メンバー、３～８の特異的な結合メンバー、３～７の特異的な結合メンバー、３～６の特異的な結合メンバー、３～５の特異的な結合メンバー、３～４の特異的な結合メンバー、４～１０の特異的な結合メンバー、４～９の特異的な結合メンバー、４～８の特異的な結合メンバー、４～７の特異的な結合メンバー、４～６の特異的な結合メンバー、５～１０の特異的な結合メンバー、５～９の特異的な結合メンバー、５～８の特異的な結合メンバー、５～７の特異的な結合メンバー、５～６の特異的な結合メンバー、６～１０の特異的な結合メンバー、６～９の特異的な結合メンバー、６～８の特異的な結合メンバー、６～７の特異的な結合メンバー、７～１０の特異的な結合メンバー、７～９の特異的な結合メンバー、７～８の特異的な結合メンバー、８～１０の特異的な結合メンバー、８～９の特異的な結合メンバー、または９～１０の特異的な結合メンバーを含むことができる。１又は２以上の特異的な結合メンバーの各々は異なる標的検体へ結合することができ、各々の特異的な結合メンバーは異なるタグおよび／またはアプタマーにより標識され得る。例えば、キットは、第１の標的検体へ結合する第１の特異的な結合メンバー、第２の標的検体へ結合する第２の特異的な結合メンバー、第３の標的検体へ結合する第３の特異的な結合メンバー、などを含むことができ、第１の特異的な結合メンバーは第１のタグおよび／またはアプタマーにより標識される、第２の特異的な結合メンバーは第２のタグおよび／またはアプタマーにより標識される、第３の特異的な結合メンバーは第３のタグおよび／またはアプタマーにより標識される、などである。１又は２以上の特異的な結合メンバーに加えて、キットは、１又は２以上の追加のアッセイ構成要素（好適なバッファー媒質、および同種のもの等）を更に含むことができる。キットは、タグおよび／またはアプタマー（上で記載されるもの等）の検出および測定のためのデバイスも含むことができる。最終的に、キットは、本発明に記載の検体検出の方法において特異的な結合メンバーを使用するための指示を含むことができ、そこでは、使用のためのこれらの指示は、キットのパッケージングおよび／またはパッケージ挿入物上に存在し得る。

【０３５９】

随意に、キットは、品質管理構成要素（例えば感受性パネル、キャリブレーター、および

陽性対照）を含む。品質管理試薬の調製は当技術分野において周知であり、様々な免疫診断製品のための挿入シート上に記載される。感受性パネルメンバーはアッセイ遂行の特徴を確立するために随意に使用され、更に随意にキット試薬の完全性の指標およびアッセイの標準化として有用である。

【０３６０】

キットは、診断的アッセイを遂行するかまたは品質管理評価を促進するのに要求される他の試薬（バッファー、塩、酵素、酵素コファクター、基質、検出試薬、および同種のもの等）も随意に含むことができる。他の構成要素（試験サンプルの単離および／または処理のためのバッファーおよび溶液（例えば前処理試薬）等）も、キット中に含むことができる。キットは、１又は２以上の他の対照を追加で含むことができる。キットの構成要素のうちの１又は２以上は凍結乾燥することができ、その事例において、キットは凍結乾燥された構成要素の再構成のために好適な試薬を更に含むことができる。構成要素のうちの１又は２以上は液体の形状であり得る。

【０３６１】

キットの様々な構成要素は、随意に好適な容器中で必要に応じて提供される。キットは、サンプルの保持または保存のための容器（例えば尿、唾液、血漿、脳脊髄液、もしくは血清のサンプルのための容器もしくはカートリッジ、または組織吸引物を生ずるように組織を保存、輸送、もしくは加工するために適切な容器）を更に含むことができる。適切な場合には、キットは、随意に反応容器、混合容器、および試薬または試験サンプルの調製を促進する他の構成要素も含有することができる。キットは、試験サンプルの獲得（様々な血液採取等）を支援する１又は２以上のサンプル採取／取得装置／転送デバイス（マイクロサンプリングデバイス、マイクロニードル、または他の最小侵襲性の無痛血液採取方法；血液採取チューブ（複数可）；ランセット；キャピラリー血液採取チューブ；他の単一の指先穿刺血液採取方法；頬腔スワブ、鼻／咽頭スワブ；１６ゲージまたは他のサイズの針、パンチ生検のための環状ブレード（例えば１～８ｍｍ、または他の適切なサイズ）、メスまたはレーザー（例えば特に手持ち式）、シリンジ、滅菌容器、または組織サンプルを獲得、保存、もしくは吸引するためのカニューレ；または同種のもの等）も含むことができる。キットは、関節吸引、錐体生検、パンチ生検、細針吸引生検、画像誘導経皮的針吸引生検、気管支肺胞洗浄、内視鏡下生検、および腹腔鏡下生検を支援する１又は２以上の装置を含むことができる。

【０３６２】

タグまたは検出可能な標識が少なくとも１つのアクリジニウム化合物であるかまたはそれを含むならば、キットは、少なくとも１つのアクリジニウム－９－カルボキサミド、少なくとも１つのアクリジニウム－９－カルボキシレートアリールエステル、またはその任意の組み合わせを含むことができる。タグまたは検出可能な標識が少なくとも１つのアクリジニウム化合物であるかまたはそれを含むならば、キットは、過酸化水素の源（バッファー、溶液、および／または少なくとも１つの塩基性溶液等）も含むことができる。所望されるならば、キットは、固相（磁性粒子、ビーズ、膜、スキャフォールド分子、フィルム、フィルターペーパー、ディスク、またはチップ等）を含有することができる。

【０３６３】

所望されるならば、キットは、別の検体についての試験サンプルのアッセイのために、単独でまたは指示と更に組み合わせて、１又は２以上の構成要素を更に含むことができ、それは、バイオマーカー（感染性疾患、心臓疾患、代謝疾患、甲状腺疾患など等の疾患状態または障害のバイオマーカー等）であり得る。

本発明は、以下の非限定的実施例によって例証される複数の態様を有する。

【実施例】

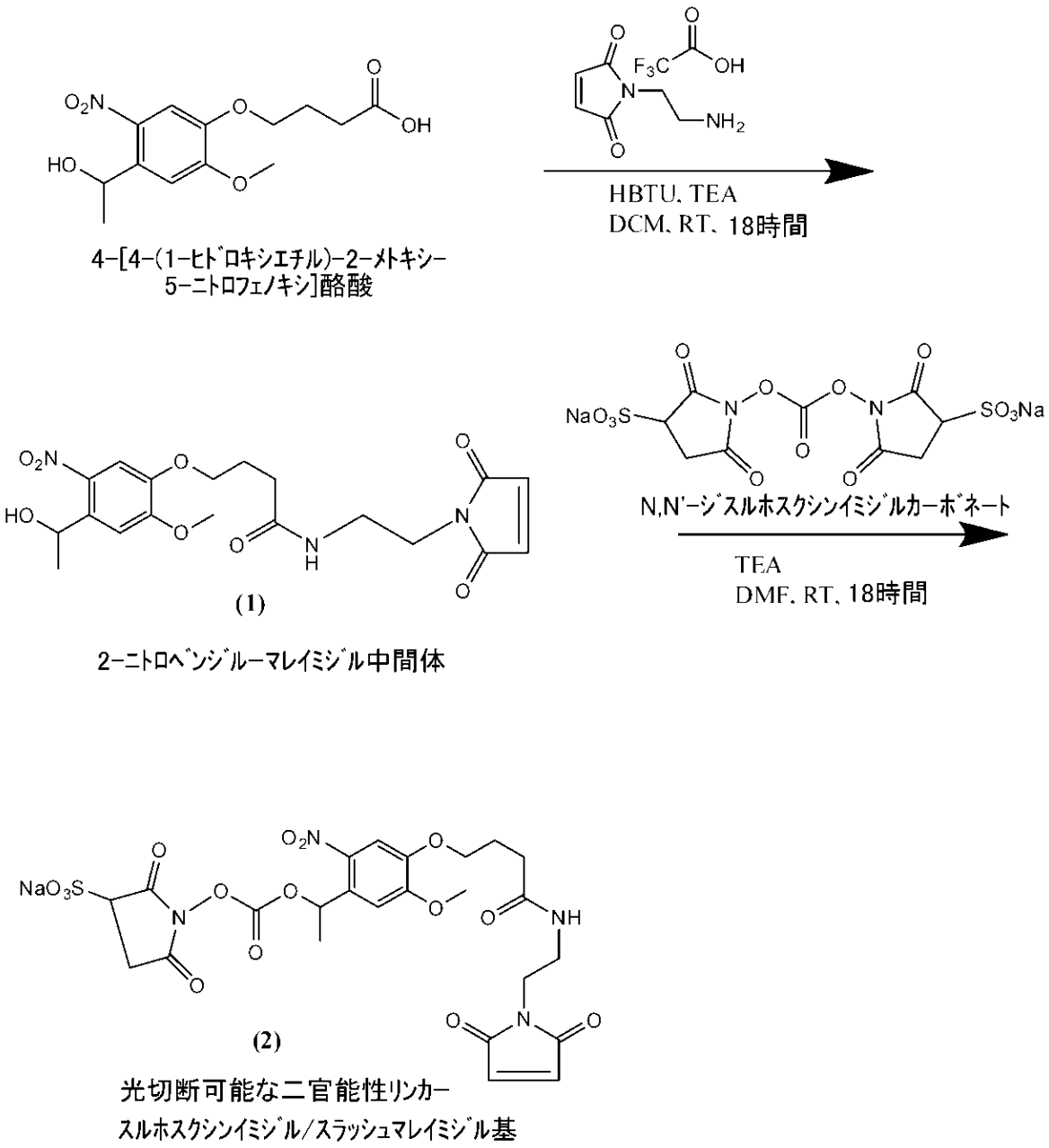
【０３６４】

１０．実施例

（実施例１）

光切断可能な２－ニトロベンジルスクシンイミジル／マレイミジル二官能性リンカーの合成

【化２】



＊上記の合成において、ＤＭＦはジメチルホルムアミドである。

【０３６５】

化合物２の合成

光切断可能なスルホスクシンイミジル／マレイミジルリンカーの合成は、Ａｇａｓｔｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１３４（４５），１８４９９－１８５０２，２０１２に由来する。簡潔には、出発物質４－［４－（１－ヒドロキシエチル）－２－メトキシ－５－ニトロフェノキシ］酪酸（０．３３４ｍｍｏｌ）を、アルゴン雰囲気下で無水ジクロロメタン（ＤＣＭ）中で溶解する。フラスコを氷浴中に設置することによって０℃へ冷却する。化合物２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート（ＨＢＴＵ）（０．３６８ｍｍｏｌ）およびトリメチルアミン（ＴＥＡ）（０．８３５ｍｍｏｌ）を、溶液へ添加する。反応混合物を０℃で５分間撹拌し、続いてＮ－（２－アミノエチル）マレイミドトリフルオロアセテート塩（０．３６８ｍｍｏｌ）を添加する。０℃で１５分間撹拌した後に、反応混合物を室温（ＲＴ）へ上昇させ、１８時間更に撹拌する。ＤＣＭ（４５ｍｌ）による

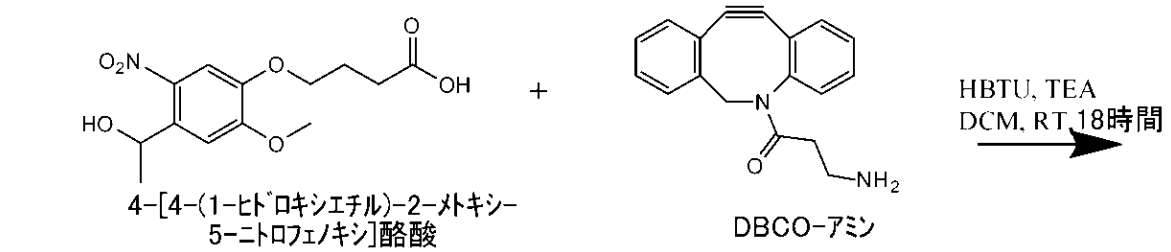
反応混合物の希釈の後に、有機相を水（２×）、飽和ＮａＣｌ溶液（１×）により洗浄し、硫酸ナトリウムの上で乾燥する。有機層を減圧下で濃縮し、SiO_2カラムを使用するフラッシュクロマトグラフィーによって精製する（溶出液：１００％のＤＣＭからＤＣＭ中の３％のメタノールへ、ｖ／ｖ）。化合物１（０．０２４ｍｍｏｌ）を無水ジメチルホルムアミド（１ｍｌ）中で溶解する。Ｎ，Ｎ’－ジスルホスクシンイミジルカーボネート（ＤＳＣ）（０．０７１ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（０．０９６ｍｍｏｌ）を、溶液へ連続的に添加する。反応混合物をＲＴで１８時間撹拌する。反応混合物をＣ１８逆相カラムの上へ直接ロードすることによって精製する（溶出液：水中の５％のアセトニトリルから水中の９５％のアセトニトリルへ、ｖ／ｖ）。合成のために使用される出発物質および他の化学物質は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入することができる。

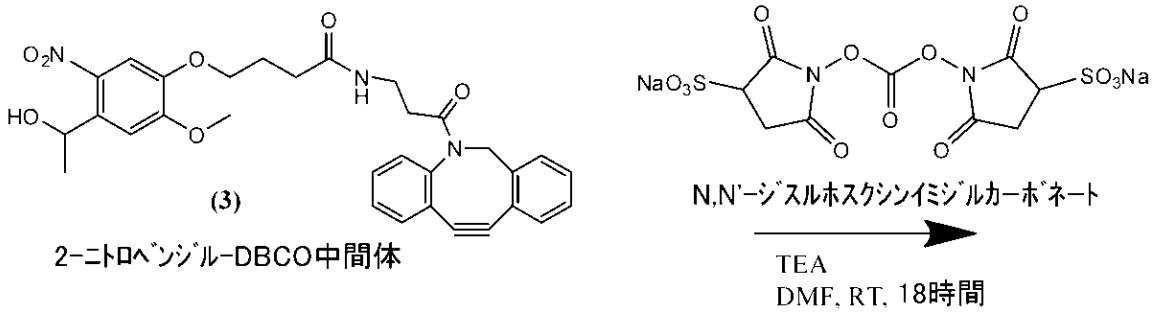
【０３６６】

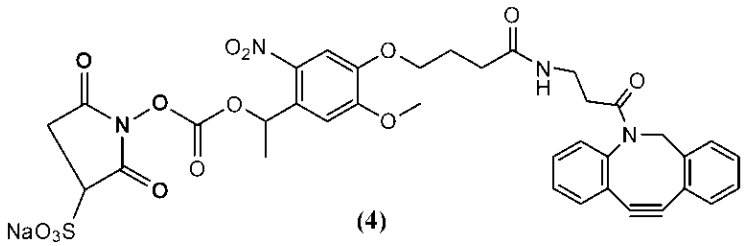
（実施例２）

光切断可能なスルホスクシンイミジル／ＤＢＣＯ　２－ニトロベンジル二官能性リンカーの合成

【化３】







二官能性リンカー:

内部の2-ニトロベンジル光切断可能基を備えたスルホスクシンイミジル/DBCO末端基

＊上記の合成において、ＤＭＦはジメチルホルムアミドである。

【０３６７】

化合物４の合成

光切断可能なスルホスクシンイミジル／ジベンゾシクロオクチル（ＤＢＣＯ）アルキニル

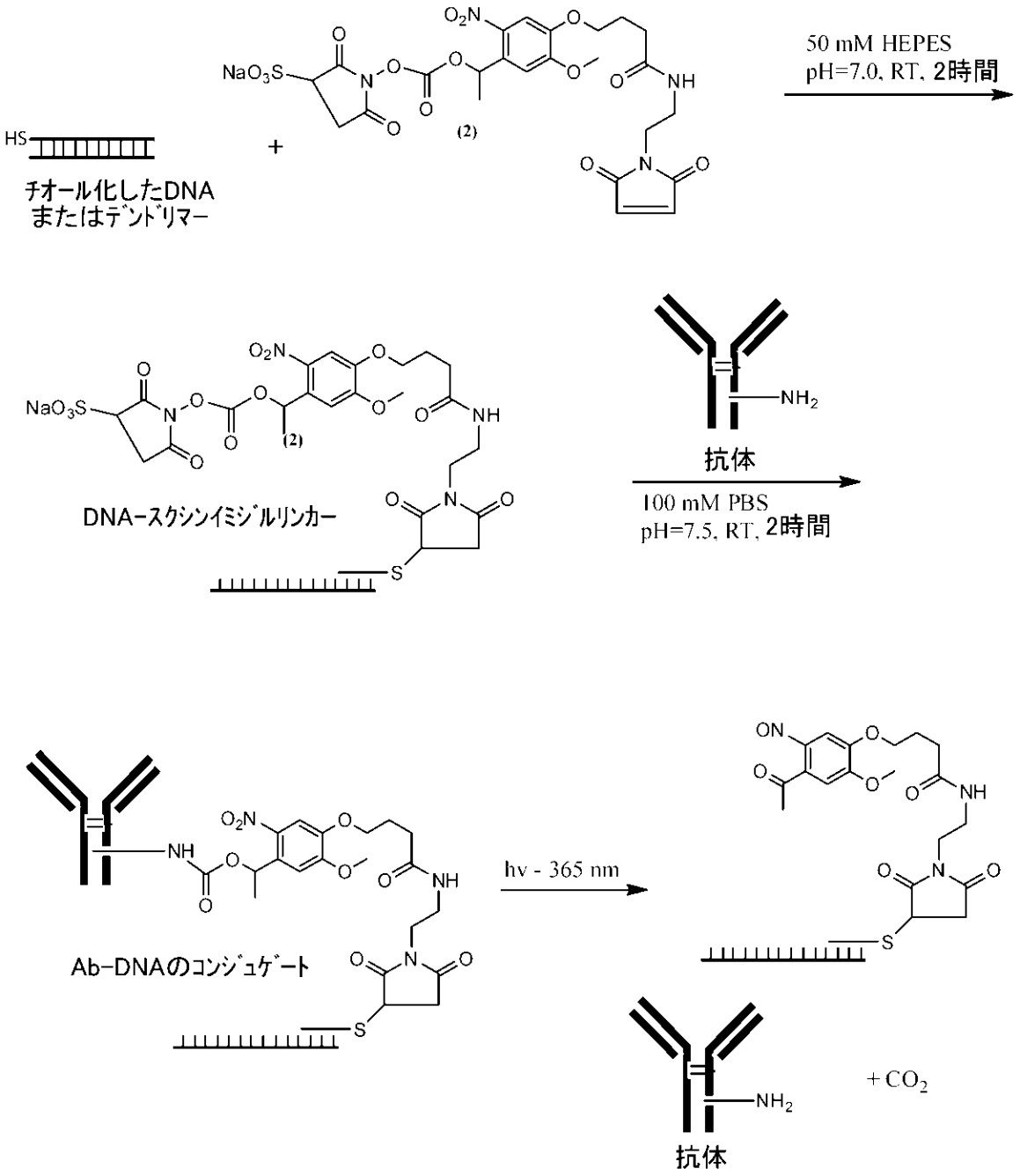
リンカーの合成は、Ａｇａｓｔｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１３４（４５），１８４９９－１８５０２，２０１２中で記載される類似する手順に由来する。簡潔には、出発物質４－［４－（１－ヒドロキシエチル）－２－メトキシ－５－ニトロフェノキシ］酪酸（０．３３４ｍｍｏｌ）を、アルゴン雰囲気下で無水ジクロロメタン（ＤＣＭ）中で溶解する。フラスコを氷浴中に設置することによって０℃へ冷却する。化合物２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート（ＨＢＴＵ）（０．３６８ｍｍｏｌ）およびトリメチルアミン（ＴＥＡ）（０．８３５ｍｍｏｌ）を、溶液へ添加する。反応混合物を０℃で５分間撹拌し、続いてＤＢＣＯ－アミン（０．３６８ｍｍｏｌ）を添加する。０℃で１５分間撹拌した後に、反応混合物をＲＴへ上昇させ、１８時間更に撹拌する。ＤＣＭ（４５ｍｌ）による反応混合物の希釈の後に、有機相を水（２×）、飽和ＮａＣｌ溶液（１×）により洗浄し、硫酸ナトリウムの上で乾燥する。有機層を減圧下で濃縮し、SiO_2カラムを使用するフラッシュクロマトグラフィーによって精製する（溶出液：１００％のＤＣＭからＤＣＭ中の３％のメタノールへ、ｖ／ｖ）。化合物３（０．０２４ｍｍｏｌ）を無水ジメチルホルムアミド（１ｍｌ）中で溶解する。Ｎ，Ｎ’－ジスルホスクシンイミジルカーボネート（ＤＳＣ）（０．０７１ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（０．０９６ｍｍｏｌ）を、溶液へ連続的に添加する。反応混合物をＲＴで１８時間撹拌する。反応混合物をＣ１８逆相カラムの上へ直接ロードすることによって精製する（溶出液：水中の５％のアセトニトリルから水中の９５％のアセトニトリルへ、ｖ／ｖ）。合成のために使用される出発物質および他の化学物質は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入することができる。

【０３６８】

（実施例３）

スルホスクシンイミジル／マレイミジル２－ニトロベンジル二官能性リンカーを使用する、カップリングおよび抗体－ＤＮＡのコンジュゲートの光化学切断

【化４】



【０３６９】

抗体およびＤＮＡのバイオコンジュゲーションおよび切断

以下のスキームを使用して、ＤＮＡ分子を抗体へコンジュゲートすることができる。ＤＮＡは、１つまたは両方のプライマーが５’チオール基により標識される２つのＰＣＲプライマーを使用してＰＣＲ反応においてＤＮＡ配列を複製することによって、５’末端でチオール化することができる。標識されたＤＮＡ（１００μＭの最終的な濃度）を、５０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ＝７．０）中で撹拌しながら溶解する。化合物２（２ｍＭ）を添加し、ＲＴで２時間反応を進ませる。カップリング後に、過剰な未反応マレイミド基を過剰なジチオスレイトール（ＤＴＴ）によりクエンチングする。ゲル濾過カラム（セファデックスＧ－２５）上で、または適切なコンジュゲート保管バッファー中での４℃の大規模な透析によって、コンジュゲートを精製する。精製されたＤＮＡ－スクシンイミジルリンカー（５０μＭの最終濃度）を、１００ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ＝７．５）中で撹拌しながら溶解す

る。生来の抗体（５０μＭの最終濃度）を添加し、ＲＴで２時間反応を進ませる。１００ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ７．５）により作動するセファデックスカラム（セファデックスＧ２５）、またはＢｉｏＧｅｌ　Ｐ－３０ゲル濾過媒質を使用して、Ａｂ－ＤＮＡのコンジュゲートを精製する。

【０３７０】

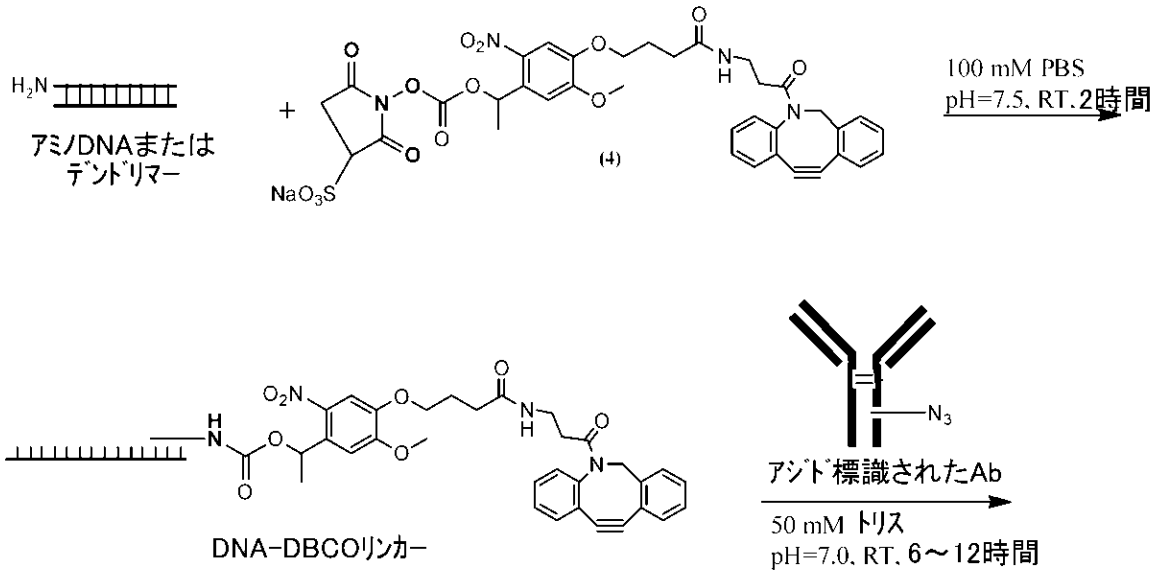
ナノポア検出の前に、ＵＶランプにより３６５ｎｍで照明することによって、コンジュゲートを切断することができる。この実施例は、同じバイオコンジュゲーションケミストリーを使用するＤＮＡデンドリマー上でも使用することができる。

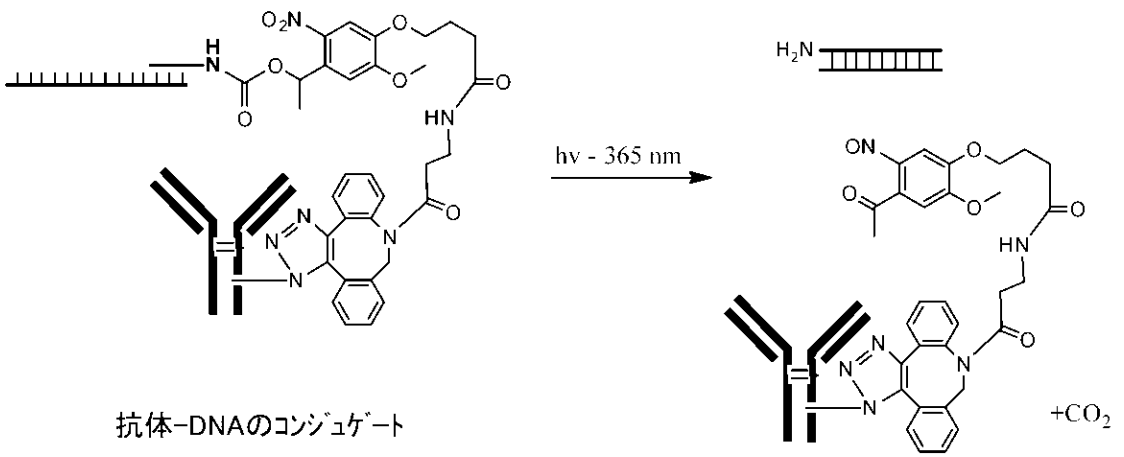
【０３７１】

（実施例４）

スルホスクシンイミジル／ＤＢＣＯ　２－ニトロベンジル二官能性リンカーを使用する、カップリングおよび抗体－ＤＮＡのコンジュゲートの光化学切断

【化５】





【０３７２】

抗体およびＤＮＡのバイオコンジュゲーションおよび切断

以下のスキームを使用して、ＤＮＡ分子を抗体へコンジュゲートすることができる。ＤＮ

Ａは、１つまたは両方のプライマーが５’アミン基により標識される２つのＰＣＲプライマーを使用してＰＣＲ反応においてＤＮＡ配列を複製することによって、５’末端でアミノ化することができる。標識されたＤＮＡ（１００μＭの最終的な濃度）を、１００ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ＝７．５）中で撹拌しながら溶解する。化合物４（２ｍＭの最終濃度）を添加し、ＲＴで２時間反応を進ませる。ゲル濾過カラム（セファデックスＧ－２５）上で、または適切なコンジュゲート保管バッファー中での４℃の大規模な透析によって、ＤＮＡ－ＤＢＣＯリンカーを精製する。精製されたＤＮＡ－ＤＢＣＯリンカー（５０μＭの最終濃度）を、５０ｍＭのトリス（ｐＨ＝７．０）中で撹拌しながら溶解する。銅不含有クリックケミストリーを使用して、ＤＮＡ－ＤＢＣＯリンカーを抗体へカップリングする。アジド標識抗体（Ｋａｚａｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，１０９（１０），３７３１－３７３６，２０１２）（２５μＭの最終濃度）を添加し、ＲＴで６～１２時間反応を進ませる。１００ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ７．５）により作動するセファデックスカラム（セファデックスＧ２５）、またはＢｉｏＧｅｌ　Ｐ－３０ゲル濾過媒質を使用して、Ａｂ－ＤＮＡのコンジュゲートを精製する。

【０３７３】

ナノポア検出の前に、ＵＶランプにより３６５ｎｍで照明することによって、コンジュゲートを切断することができる。この実施例は、同じバイオコンジュゲーションケミストリーを使用するＤＮＡデンドリマー上でも使用することができる。

【０３７４】

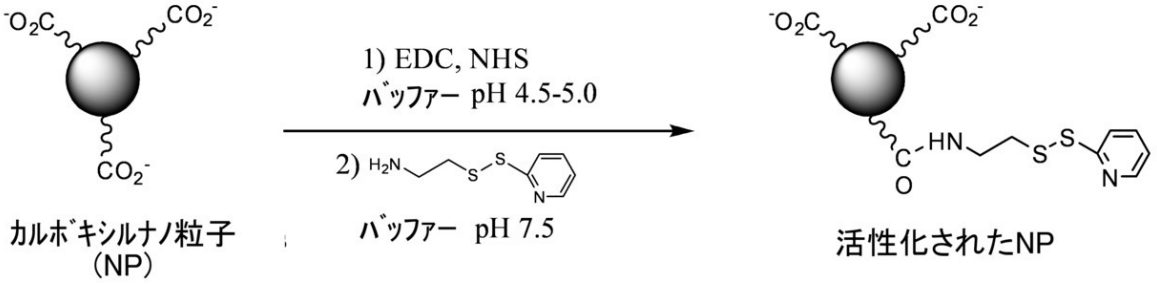
（実施例５）

<u>デジタル免疫アッセイ（ナノポアカウント）のためのナノ粒子－抗体のコンジュゲート</u>

本実施例は、２６ｎｍのカルボキシル化ポリスチレンナノ粒子（ＮＰ、ＰＣ０２Ｎ）（Ｂａｎｇｓ　Ｌａｂｓ（Ｆｉｓｈｅｒｓ、ＩＮ、米国）から得ることができるもの等）への抗体の共有結合性コンジュゲーションを記載する。２６ｎｍのＮＰは、５２８．７μ当量／ｇの表面電荷および６８．４平方Å／基のパーキングエリアを有する（製造業者情報によって）。

【０３７５】

【化６】



【０３７６】

<u>カルボキシル－ポリスチレンナノ粒子の活性化</u>

１．０ｍＬ（１００ｍｇ／ｍＬ）の２６ｎｍのカルボキシル化ＮＰを、１０ｍＬの０．１ＭのＭＥＳ（２－［Ｎ－モルホリノ］エタンスルホン酸（ｐＨ４．５～５．０）により洗浄する。洗浄の後に、ペレットを、１．０ｍｇ／ｍＬのＮＰ濃度（０．１％固体）で１００ｍＬの０．１ＭのＭＥＳ（ｐＨ４．５～５．０）の中で再懸濁する。１０．０ｍＬのナノ粒子懸濁物（１０ｍｇのＮＰ、５．２８μ当量カルボキシル）をバイアルへ移し、新たに調製された１０μＬの１０ｍｇ／ｍＬのＥＤＣ水溶液（１－エチル－３－［３－ジメチルアミノプロピル］カルボジイミドヒドロクロリド）（５．２８μモル、１．０当量／CO_2H当量）、および１７μＬの１０ｍｇ／ｍＬのスルホ－ＮＨＳ水溶液（Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミド、Ｓｉｇｍａ、カタログ番号５６４８５）の溶液（７．９３μモル、１．５当量／１当量ＥＤＣ）と、連続的に混合しながら室温で１５分間反応させる。反応させた懸濁物を６，５００ｇで遠心分離し、溶液を廃棄する。ペレットを２０ｍＬの

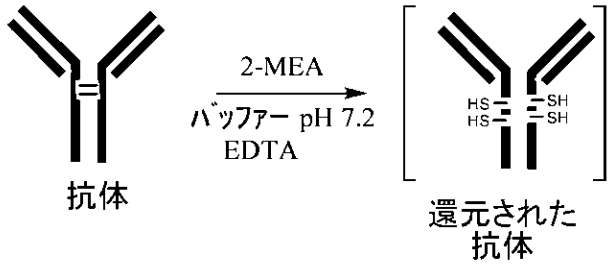
２０ｍＭのＰＢＳ／５ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ７．５）により洗浄し、６，５００ｇでの遠心分離によって遠心沈殿させる。上清を除去する。スクシンイミド活性化カルボキシル－ＮＰペレットを５０ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ７．５）中で再懸濁し、９．８μＬの１．０ｍｇ／ｍＬのピリジンジチオエチルアミン水溶液（５２．８ナノモル、０．０１当量／１　CO_2H当量）を直ちに添加し、室温で２～４時間連続的に撹拌しながら反応させる。ピリジル誘導体化カルボキシル－ＮＰを１０ｍＬの２０ｍＭのＰＢＳ／５ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ７．５）により洗浄し、１０．０ｍＬの同じバッファー中で再懸濁する。ナノ粒子濃度を、カルボキシル－ＮＰのキャリブレーションカーブを使用する紫外線－可視光線分光法（６００ｎｍ、散乱）を使用して決定する。ＮＰ上にロードするピリジル－リガンドは、１０ｍＭのＴＣＥＰまたはＤＴＴにより定義された量のＮＰを還元すること、遠心分離によって還元剤を除去すること、ＰＢＳ／ＥＤＴＡ（ｐＨ７．２）中でピリジル活性化ＮＰペレットを再懸濁すること、およびエルマン試薬と反応させること（上清のＡ４１２を測定する）によって決定する。活性化されたＮＰは、同じ日に抗体のコンジュゲーションのために使用しないならば、４℃で保存する。

【０３７７】

ＥＤＣ／ＮＨＳおよびピリジンジチオエチルアミンのモルインプットの範囲を評価して、別個の抗体－ナノ粒子のコンジュゲートの調製のために所望されるストイキオメトリーを決定する。反応パラメータ（ｐＨ、温度、時間）を査定して、所望されるＮＰ活性化アウトカムを達成する。

【０３７８】

【化７】



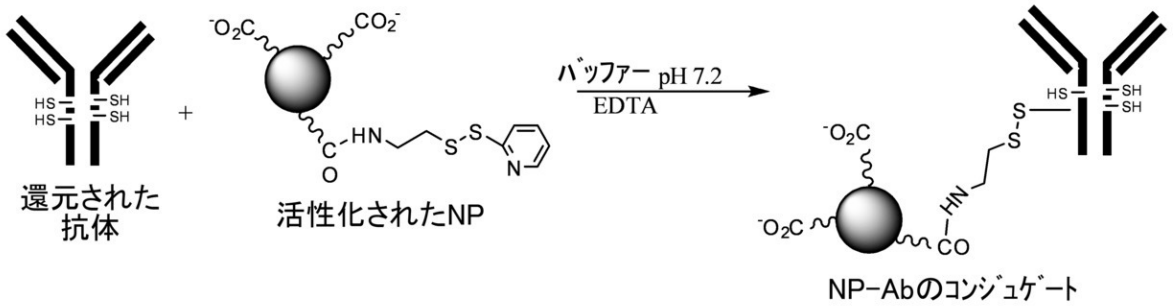
【０３７９】

抗体の還元

１．０ｍＬの１０ｍｇ／ｍＬの抗体溶液（１０ｍｇ）を、新たに調製された３８μＬの３０ｍｇ／ｍＬの２－ＭＥＡ溶液（１０ｍＭの反応濃度）（２－メルカプトエチルアミンヒドロクロリド）と十分に混合し、次いでキャップをし、３７℃で９０分間置く。溶液を室温へ導き、過剰な２－ＭＥＡを、２０ｍＭのＰＢＳ／５ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ７．５）中で前平衡化された脱塩カラムにより除去する。還元された抗体の濃度を、Ａ２８０（タンパク質吸光度）およびＡ３２０（散乱補正）で紫外線－可視光線吸光度を使用して決定する。遊離チオールの数をエルマン試験を使用して決定する。２つまたは４つの遊離チオール（抗体ヒンジ領域中のＣｙｓ）を生成するのに必要なように、条件を最適化する。還元された抗体を、ピリジル誘導体化カルボキシル－ＮＰへのカップリングのために直ちに使用する。

【０３８０】

【化８】



【０３８１】

活性化されたナノ粒子への還元された抗体のカップリング

（１）抗体のパーキングエリアは４５ｎｍ^{2}である；（２）２６ｎｍのナノ粒子表面領域は２，１２０ｎｍ^{2}である；（３）４７の抗体分子が２６ｎｍのＮＰの表面上に理論的にフィットする、という仮定が立てられる。

【０３８２】

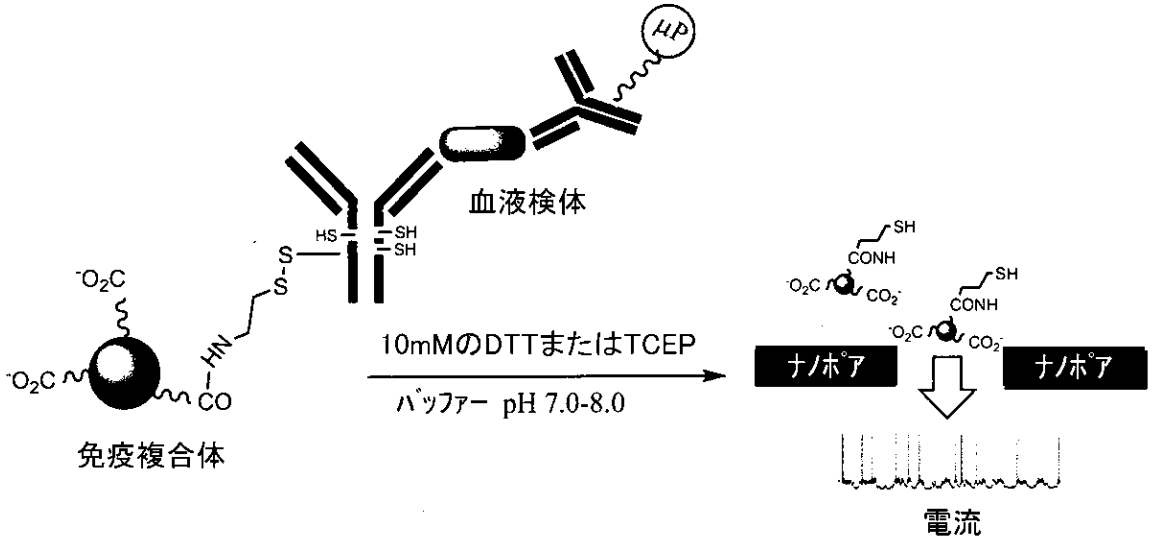
手順

２０ｍＭのＰＢＳ／５ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ７．５）中の１０ｍＬの０．１％のピリジル活性化カルボキシナノ粒子の溶液（１０ｍｇ）へ、０．１０ｍｇの還元された抗体（０．６６ナノモル、０．１０ｍＬ）を、同じＥＤＴＡ含有バッファー中で１．０ｍｇ／ｍＬで添加する。混合物を室温で２時間混合することにより反応させ、遠心分離して未結合の分子を除去し、吸引する。ペレットを１０ｍＬのＰＢＳ（ｐＨ７．２）により洗浄し、遠心分離し、吸引する。抗体－ＮＰのコンジュゲートを１０．０ｍＬのＰＢＳ（ｐＨ７．２）中で懸濁する。コンジュゲートのＮＰ濃度（％固体）を、紫外線－可視光線分光法（６００ｎｍ）を使用して決定する。粒子コンジュゲートを走査電子顕微鏡によって検査し、サイズ／電荷分布をＺｅｔａＳｉｚｅｒを使用して決定する。サイズ排除クロマトグラフィーは、コンジュゲート集団の電位分布から別個のコンジュゲートを単離するのに使用することができる。抗体対ＮＰの取り込み比は、蛍光標識された抗原コンジュゲートを使用するフローサイトメトリーによって、またはマイクロＢＣＡ（ｕＢＣＡ）アッセイを使用して、決定することができる。抗体対ＮＰのモルインプットの範囲をコンジュゲーションの温度およびｐＨと共に評価して、別個のコンジュゲート（すなわち２または４のＮＰの取り込み比）の均質な集団を生成することができる。

【０３８３】

ナノポアカウント免疫アッセイ

【化９】



【０３８４】

上記のスキームは、還元された抗体－活性化されたナノ粒子のコンジュゲートを利用する、ナノポアカウントアッセイを図示し、その調製は上で記載される。免疫アッセイの過程で形成された免疫複合体をジスルフィド結合リンカーの還元によって切断して、遊離抗体－検体－抗体の複合体および遊離ナノ粒子タグを形成することができ、それは、ナノ粒子タグがナノポアを介する流路上でカウントされることを可能にする。

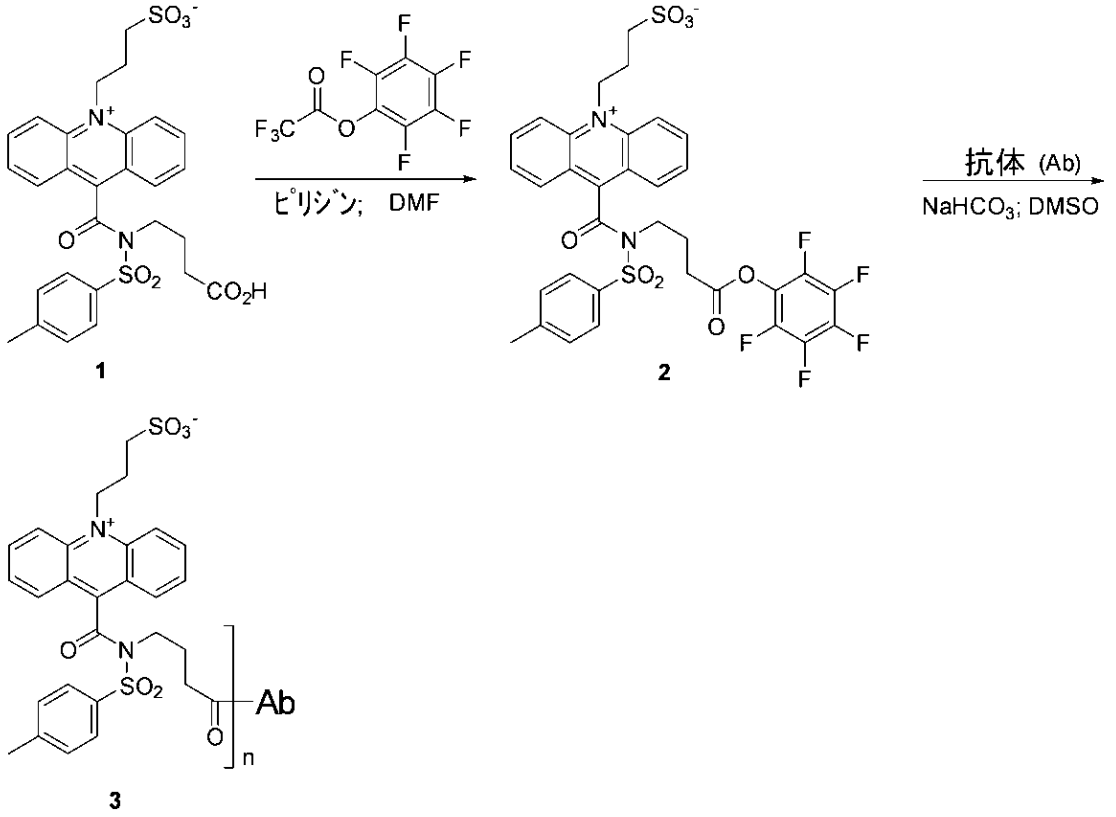
【０３８５】

（実施例６）

ＣＰＳＰコンジュゲートの合成

Ａ．ＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート。

【化１０】



＊上記の合成において、ＤＭＦはジメチルホルムアミドである。

【０３８６】

３－（９－（（４－オキソ－４－（ペルフルオロフェノキシ）ブチル）（トシル）カルバモイル）アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネート（２）

磁性撹拌機および窒素注入口を装備した２５ｍＬの丸底フラスコに、３－（９－（（３－カルボキシプロピル）（トシル）カルバモイル）アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネート（ＣＰＳＰ）（１）（１ｍｍｏｌ）、ピリジン（５ｍｍｏｌ）、およびジメチルホルムアミド（１０ｍＬ）をチャージした。溶液を氷浴中で冷却し、ペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート（１．３ｍｍｏｌ）を滴加した。氷浴を除去し、反応物を室温で３時間撹拌した。揮発性構成要素を真空下で反応物から除去し、残留物をメタノール中で取り上げ、逆相ＨＰＬＣによって精製して表題化合物を得た。

【０３８７】

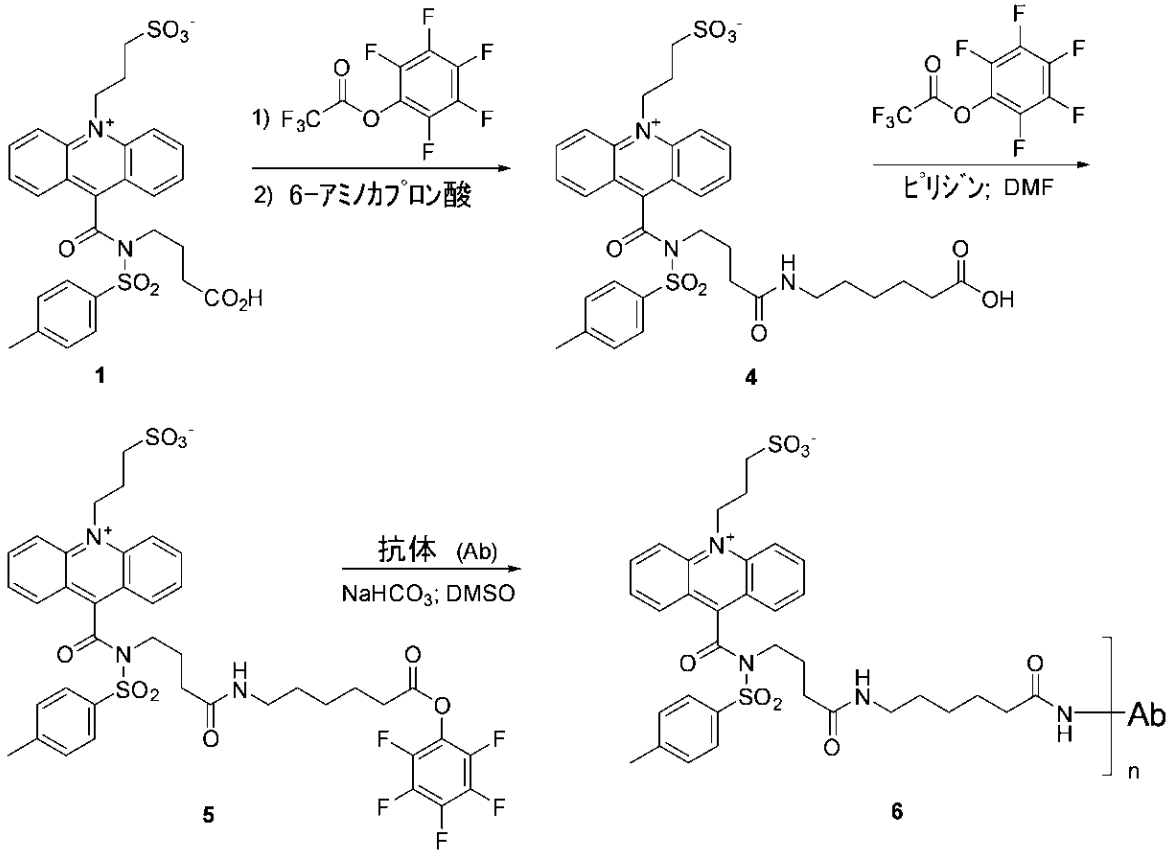
ＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート（３）

２の溶液（ＤＭＳＯ中の１μＬの１０ｍＭの溶液）を、抗体溶液（１００μＬの１０μＭの水溶液）および重炭酸ナトリウム水溶液（１０μＬの１Ｍの溶液）へ添加した。もたらされた混合物を室温で４時間撹拌した。産物の精製をスピンカラム上で達成して、ＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート３を得た。「ｎ」の値は抗体依存性様式で変動する。取り込みは、活性エステル濃度を上昇もしくは低下させることによって（すなわち化合物２、５、９および１３）、および／または反応の間にｐＨを上昇もしくは低下させることによって、ある程度制御することができるが、常に取り込み値の分布をもたらす。平均取り込み定量（「Ｉ．Ｒ．」）は、反応後に実験的に決定される。典型的には、「ｎ」は１～１０の間の任意の値である。

【０３８８】

Ｂ．スペーサーを備えたＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート

【化１１】



＊上記の合成において、ＤＭＦはジメチルホルムアミドである。

【０３８９】

３－（９－（（４－（（５－カルボキシペンチル）アミノ）－４－オキソブチル）（トシル）カルバモイル）アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネート（４）

磁性撹拌機および窒素注入口を装備した２５ｍＬの丸底フラスコに、３－（９－（（３－カルボキシプロピル）（トシル）カルバモイル）アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネートＣＰＳＰ（１）（１ｍｍｏｌ）、ピリジン（５ｍｍｏｌ）、およびジメチルホルムアミド（１０ｍＬ）をチャージした。溶液を氷浴中で冷却し、ペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート（１．３ｍｍｏｌ）を滴加した。氷浴を除去し、反応物を室温で３時間撹拌した。次いで６－アミノカプロン酸（１．３ｍｍｏｌ）、続いてＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（５ｍｍｏｌ）を小分けで反応物へ添加し、反応物を室温で１時間撹拌した。この後に、揮発性構成要素を真空下で反応物から除去し、逆相ＨＰＬＣによって精製して表題化合物を得た。

【０３９０】

３－（９－（（４－オキソ－４－（（６－オキソ－６－（ペルフルオロフェノキシ）ヘキシル）アミノ）ブチル）（トシル）カルバモイル（アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネート）（５）

磁性撹拌機および窒素注入口を装備した２５ｍＬの丸底フラスコに、４（１ｍｍｏｌ）、ピリジン（５ｍｍｏｌ）およびジメチルホルムアミド（１０ｍＬ）をチャージした。溶液を氷浴中で冷却し、ペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート（１．３ｍｍｏｌ）を滴加した。氷浴を除去し、反応物を室温で３時間撹拌した。この後に、揮発性構成要素を窒素気流下で反応物から除去し、逆相ＨＰＬＣによって精製して表題化合物を得た。

【０３９１】

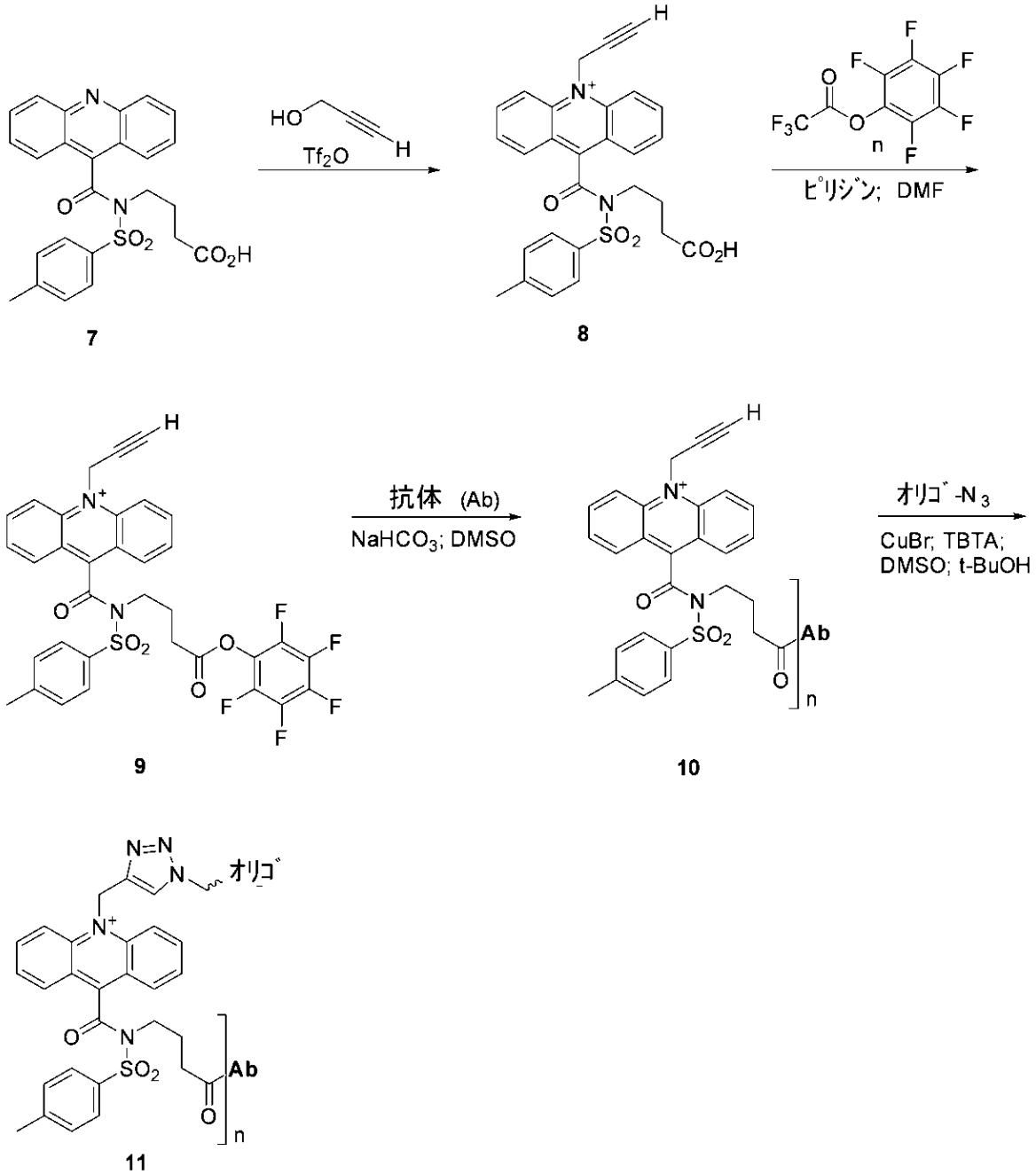
スペーサーを備えたＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート（６）

５の溶液（ＤＭＳＯ中の１μＬの１０ｍＭの溶液）を、抗体溶液（１００μＬの１０μＭの水溶液）および重炭酸ナトリウム水溶液（１０μＬの１Ｍの溶液）へ添加した。もたらされた混合物を室温で４時間撹拌した。産物の精製をスピンカラム上で達成して、スペーサーを備えたＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート６を得た。典型的には、「ｎ」は１～１０の間の任意の値である。

【０３９２】

Ｃ．ＣＰＳＰオリゴヌクレオチド－抗体のコンジュゲート

【化１２】



＊上記の合成において、ＤＭＦはジメチルホルムアミドである。

【０３９３】

９－（（３－カルボキシプロピル）（トシル）カルバモイル）－１０－（プロプ－２－イン－１－イル）アクリジン－１０－イウム（８）

磁性撹拌機および窒素注入口を装備した１００ｍＬの丸底フラスコに、プロパルギルアルコール（１０ｍｍｏｌ）、２，６－ジ－ｔｅｒｔ－ブチルピリジン（１０ｍｍｏｌ）およ

び塩化メチレン（５０ｍＬ）をチャージし、－２０℃へ冷却した。次いでトリフルオロメタンスルホン酸無水物を溶液へ滴加し、反応物を－２０℃で２時間撹拌した。ペンタン（２５ｍＬ）を反応物へ添加し、もたらされた沈殿した塩を濾過によって分離した。揮発性構成要素を真空下で蒸発させ、残留物を１００ｍＬの丸底フラスコ中の塩化メチレン（２５ｍＬ）中で再溶解した。４－（Ｎ－トシルアクリジン－９－カルボキサミド）ブタン酸（ＣＰアクリジン）（７）（１ｍｍｏｌ）を小分けで添加し、反応物を室温で１８時間撹拌した。揮発性構成要素を真空下で蒸発させ、残留物をメタノール（５ｍＬ）中で取り上げ、逆相ＨＰＬＣによって精製して表題化合物を得た。

【０３９４】

９－（（４－オキソ－４－（ペルフルオロフェノキシ）ブチル）（トシル）カルバモイル）－１０－（プロプ－２－イン－１－イル）アクリジン－１０－イウム（９）

磁性撹拌機および窒素注入口を装備した２５ｍＬの丸底フラスコに、８（１ｍｍｏｌ）、ピリジン（５ｍｍｏｌ）およびジメチルホルムアミド（１０ｍＬ）をチャージした。溶液を氷浴中で冷却し、ペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート（１．３ｍｍｏｌ）を滴加した。氷浴を除去し、反応物を室温で３時間撹拌した。揮発性構成要素を真空下で反応物から除去し、残留物をメタノール中で取り上げ、逆相ＨＰＬＣによって精製して表題化合物を得た。

【０３９５】

ＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート（１０）

９の溶液（ＤＭＳＯ中の１μＬの１０ｍＭの溶液）を、抗体溶液（１００μＬの１０μＭの水溶液）および重炭酸ナトリウム水溶液（１０μＬの１Ｍの溶液）へ添加した。もたらされた混合物を室温で４時間撹拌した。産物の精製をスピンカラム上で達成して、ＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート１０を得た。典型的には、「ｎ」は１～１０の間の任意の値である。

【０３９６】

ＣＰＳＰオリゴヌクレオチド－抗体のコンジュゲート（１１）

オリゴアジド（５μＬの水中で１０ｎｍｏｌ）、ＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート１０（１０μＬの水中で１０ｎｍｏｌ）および新たに調製された０．１Ｍの「クリック溶液」（３μＬ、以下を参照）の混合物を、室温で４時間振盪した。反応物を０．３Ｍの酢酸ナトリウム（１００μＬ）により希釈し、ＤＮＡコンジュゲートをＥｔＯＨ（１ｍＬ）の添加によって沈殿させた。上清を除去し、残留物を冷ＥｔＯＨ（２×１ｍＬ）により２回洗浄した。残留物を水（２０μＬ）中で取り上げ、ＣＰＳＰオリゴヌクレオチド－抗体のコンジュゲート１１の溶液を更なる精製なしに使用した。典型的には、「ｎ」は１～１０の間の任意の値である。

【０３９７】

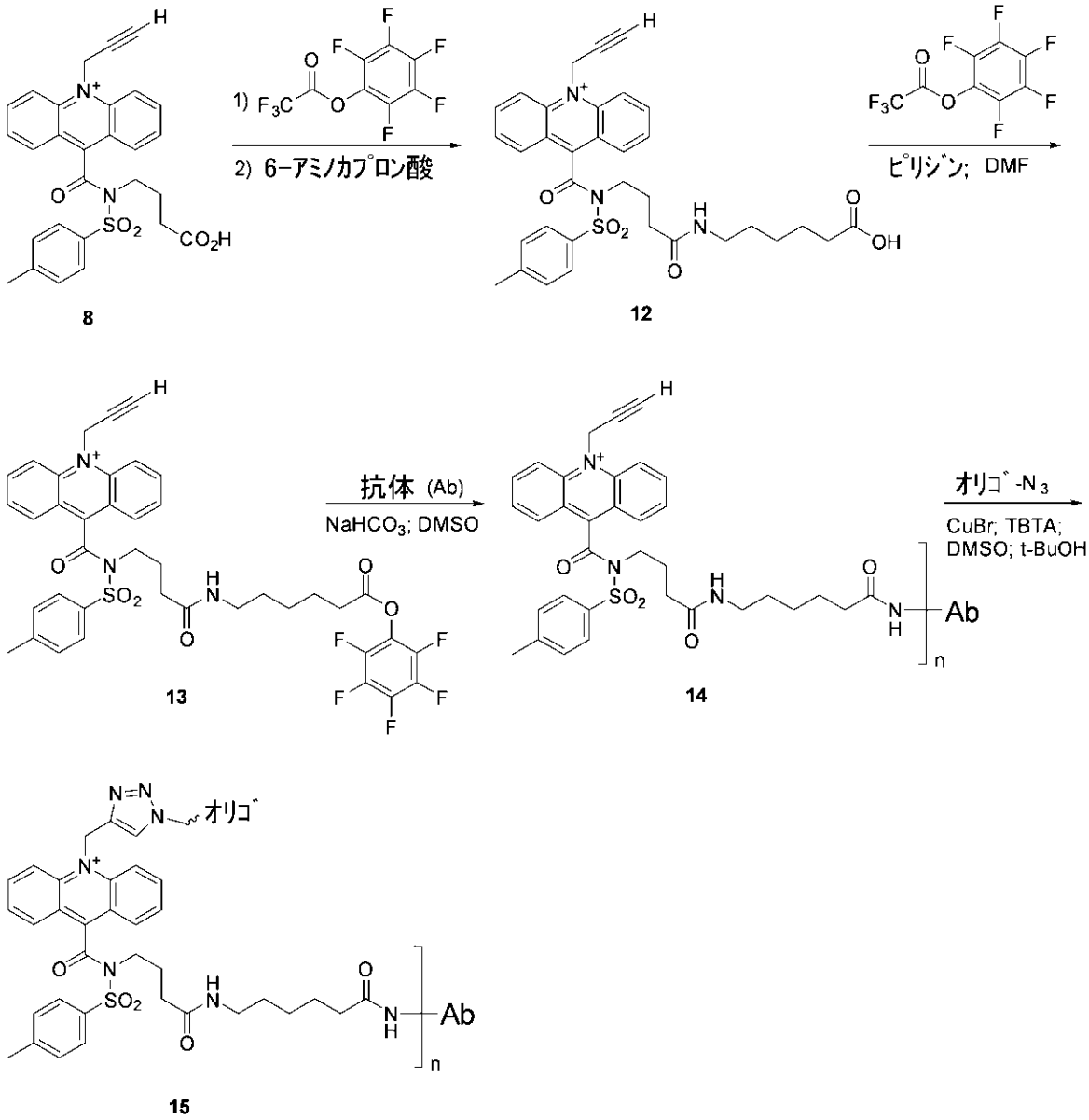
「クリック溶液」

ＣｕＢｒ（１ｍｇ）を７０μＬのＤＭＳＯ／ｔ－ＢｕＯＨ（３：１）中で溶解して、０．１Ｍの溶液を形成した（この溶液は必ず新たに調製すべきであり、保存することはできない）。トリス（ベンジルトリアゾリルメチル）アミン（ＴＢＴＡ）（５４ｍｇ）を１ｍＬのＤＭＳＯ／ｔ－ＢｕＯＨ（３：１）中で溶解して、０．１Ｍの溶液を形成した（この溶液は－２０℃で保存することができる）。１体積の０．１ＭのＣｕＢｒ溶液を２体積の０．１ＭのＴＢＴＡ溶液へ添加して、「クリック溶液」を提供した。

【０３９８】

Ｄ．スペーサーを備えたＣＰＳＰオリゴヌクレオチド－抗体のコンジュゲート

【化１３】



＊上記の合成において、ＤＭＦはジメチルホルムアミドである。

【０３９９】

９－（（４－（（５－カルボキシペンチル）アミノ）－４－オキソブチル）（トシル）カルバモイル）－１０－（プロプ－２－イン－１－イル）アクリジン－１０－イウム（１２）

磁性撹拌機および窒素注入口を装備した２５ｍＬの丸底フラスコに、８（１ｍｍｏｌ）、ピリジン（５ｍｍｏｌ）およびジメチルホルムアミド（１０ｍＬ）をチャージした。溶液を氷浴中で冷却し、ペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート（１．３ｍｍｏｌ）を滴加した。氷浴を除去し、反応物を室温で３時間撹拌した。次いで６－アミノカプロン酸（１．３ｍｍｏｌ）、続いてＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（５ｍｍｏｌ）を小分けで反応物へ添加し、反応物を室温で１時間撹拌した。この後に、揮発性構成要素を真空下で反応物から除去し、逆相ＨＰＬＣによって精製して表題化合物を得た。

【０４００】

９－（（４－オキソ－４－（（６－オキソ－６－（ペルフルオロフェノキシ）ヘキシル）アミノ）ブチル）（トシル）カルバモイル）－１０－（プロプ－２－イン－１－イル）アクリジン－１０－イウム（１３）

磁性撹拌機および窒素注入口を装備した２５ｍＬの丸底フラスコに、１２（１ｍｍｏｌ）

、ピリジン（５ｍｍｏｌ）およびジメチルホルムアミド（１０ｍＬ）をチャージした。溶液を氷浴中で冷却し、ペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート（１．３ｍｍｏｌ）を滴加した。氷浴を除去し、反応物を室温で３時間撹拌した。この後に、揮発性構成要素を窒素気流下で反応物から除去し、逆相ＨＰＬＣによって精製して表題化合物を得た。

【０４０１】

スペーサーを備えたＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート（１４）

１３の溶液（ＤＭＳＯ中の１μＬの１０ｍＭの溶液）を、抗体溶液（１００μＬの１０μＭの水溶液）および重炭酸ナトリウム水溶液（１０μＬの１Ｍの溶液）へ添加した。これを室温で４時間撹拌した。産物の精製をスピンカラム上で達成して、スペーサーを備えたＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート１４を得た。典型的には、「ｎ」は１～１０の間の任意の値である。

【０４０２】

ＣＰＳＰオリゴヌクレオチド－抗体のコンジュゲート（１５）

オリゴアジド（例えば商業的に入手可能なもの等）（５μＬの水中で１０ｎｍｏｌ）、スペーサーを備えたＣＰＳＰ抗体のコンジュゲート１４（１０μＬの水中で１０ｎｍｏｌ）および新たに調製された０．１Ｍの「クリック溶液」（３μＬ、実施例６．Ｃを参照）の混合物を、室温で４時間振盪した。典型的には、「ｎ」は１～１０の間の任意の値である。反応物を０．３Ｍの酢酸ナトリウム（１００μＬ）により希釈し、ＤＮＡコンジュゲートをＥｔＯＨ（１ｍＬ）の添加によって沈殿させた。上清を除去し、残留物を冷ＥｔＯＨ（２×１ｍＬ）により２回洗浄した。残留物を水（２０μＬ）中で取り上げ、スペーサーを備えたＣＰＳＰオリゴヌクレオチド－抗体のコンジュゲート１５の溶液を更なる精製なしに使用した。

【０４０３】

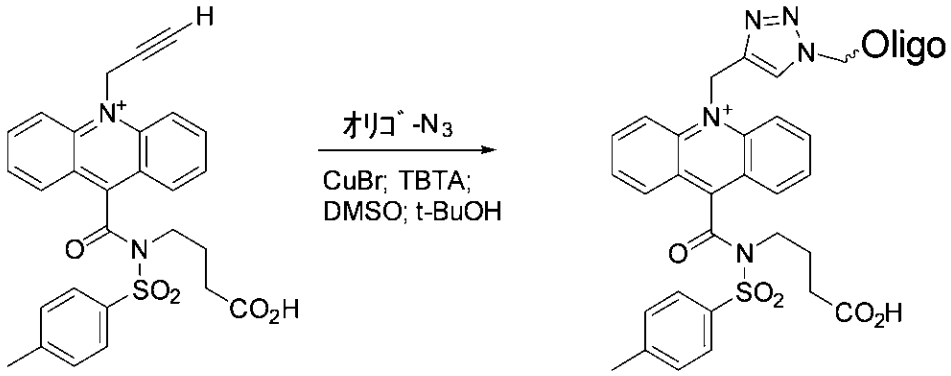
スペーサーを備えたまたは備えていないＣＰＳＰ抗体のコンジュゲートおよびスペーサーを備えたまたは備えていないＣＰＳＰオリゴヌクレオチド－抗体のコンジュゲートの切断

記載されるような、スペーサーを備えたまたは備えていないＣＰＳＰ抗体のコンジュゲートおよびスペーサーを備えたまたは備えていないＣＰＳＰオリゴヌクレオチド－抗体のコンジュゲートは、塩基性過酸化水素水を使用して、切断されるかまたは「トリガー」される。ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（登録商標）システムにおいて、励起状態のアクリドン中間体は光子を産生し、それを測定する。加えて、分解産物はアクリドンおよびスルホンアミドである。実施例６．Ａ～Ｄのコンジュゲートは、アクリドン分子および／またはスルホンアミド分子のカウントによって、開示されるデバイスにより使用される。

【０４０４】

Ｅ．抗体のないＣＰＳＰオリゴヌクレオチドのコンジュゲート

【化１４】



8 16

【０４０５】

抗体のないＣＰＳＰオリゴヌクレオチドのコンジュゲート（１６）

オリゴアジド（例えば商業的に入手可能なもの等）（５μＬの水中で１０ｎｍｏｌ）、プロパルギル－ＣＰＳＰ　８（１０μＬの水中で１０ｎｍｏｌ）および新たに調製された０．１Ｍの「クリック溶液」（３μＬ、実施例６．Ｃを参照）の混合物を、室温で４時間振盪することができる。反応物を０．３Ｍの酢酸ナトリウム（１００μＬ）により希釈し、ＤＮＡコンジュゲートをＥｔＯＨ（１ｍＬ）の添加によって沈殿させることができる。上清を除去し、残留物を冷ＥｔＯＨ（２×１ｍＬ）により２回洗浄することができる。残留物を水（２０μＬ）中で取り上げ、スペーサーを備えたＣＰＳＰオリゴヌクレオチド－抗体のコンジュゲート１６の溶液を更なる精製なしに使用することができる。

【０４０６】

（実施例７）

低コストのＤＭＦ底部チップの製作

低コストの可撓性ＤＭＦチップは、いくつかの修飾による、Ｌｏ　Ｃ－Ｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　８６（２００９）９７９－９８３中で記載されるプロセスの使用によって、電極パターニングのためのウェットリフトオフプロセスと組み合わせたロール・ツー・ロール（Ｒ２Ｒ）フレキソ印刷を使用して、製作された。製作プロセスの概略図は図１０中で描写される。ＭＥＬＩＮＥＸ（登録商標）ＳＴ５０６ポリエチレンテレフタレート（ＰＥＴ）の５．０ミルの基板（１）のロールを、ＤＭＦ電極印刷のための出発物質として使用した。黄インク（Ｓｕｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ）の層を、Ａｎｉｌｏｘローラーアセンブリー上で３．８ｍｌ／m^2のインク転送体積を使用して１０ｍ／分間の速度で、１．１４ｍｍ厚の印刷プレート（Ｆｌｉｎｔ　ＭＣＯ３）を使用して、ＰＥＴ基板上でフレキソ印刷した（２）。ＤＭＦ電極パターンのネガティブイメージがフレキソ印刷ステップから生じる（３）。金属堆積の前に、インクをホットエアオーブン中で２回乾燥した（２×１００℃）。ＥＶＡ　Ｒ２Ｒ金属エバポレーターを使用して、印刷されたＰＥＴ基板の上へ銀金属の層を堆積させて８０ｎｍの厚みで銀の一様なコーティングを形成させた（４）。金属化されたインク－フィルム基板（５）に、１ｍ／分間のスピードで、超音波処理槽中で超音波とアセトンの組み合わせを使用して、ウェットリフトオフプロセスを行った（６）。この化学的／物理的処理は銀－インク層の溶解を可能にし、その一方で、銀のみの層をインタクトで維持する。インク－銀層の除去は、５０または１４０μｍのいずれかの電極ギャップの間隔を備えた８０のアクチュエーション電極（２．２５×２．２５ｍｍ）からなる、ＤＭＦ印刷の電極パターンをもたらした（７）。品質管理チェックとして、単一のロールからの合計８０～９０のランダムなチップは、電極ギャップの間隔およびコネクターリード幅のバラツキについて視覚的に調査された。許容されるギャップ規格を有すると決定されたチップの典型的な収率は１００％近くであった。単一の製作された可撓性チップを、図１１中で描写する。製作された可撓性チップは３インチ×２インチの測定値であり、電極、リザーバー、接触パッドおよびリードを含む。

【０４０７】

誘電体コーティングを、回転式スクリーン印刷またはグラビア印刷のいずれかの使用によって電極およびリザーバーへ適用した。回転式スクリーン印刷のために、Ｈｅｎｋｅｌ　ＥＤＡＣ　ＰＦ－４５５Ｂを、２ｍ／分間の印刷スピードおよび５０％の紫外線硬化率で、Ｇａｌｌｕｓ　ＮＦ（４００Ｌ）スクリーンにより印刷することによって、誘電体コーティングとして使用した。典型的な誘電体の厚みは１０～１５μｍであった。グラビア印刷のために、シリンダーは、５０ｍｌ／m^2のインク体積を使用して、２ｍ／分間のスピードで、高粘度誘電体インク（ＩＰＤ－３５０（Ｉｎｋｒｏｎ）等）を印刷するようにデザインされた。グラビア印刷のための典型的な誘電体の厚みは７～８μｍであった。最終的な疎水性層は、グラビアシリンダー（１４０～１８０Ｌ）および８ｍ／分間の印刷スピードにより、Ｍｉｌｌｉｄｙｎｅ　Ａｖａｌｏｎ　８７またはＣｙｔｏｎｉｘ　Ｆｌｕｏｒｏｐｅｌ　ＰＦＣ　８０４　ＵＣのいずれかのコーティングを使用して印刷され、４回の連続したオーブン乾燥ステップ（４×１４０℃）が後続した。典型的な疎水性の厚みは４０～１００ｎｍであった。

【０４０８】
あるいは、個々のチップの小さなバッチについて、誘電体コーティングおよび疎水性コーティングは、それぞれ化学気相堆積（ＣＶＤ）およびスピンコーティングを使用して適用することができる。
【０４０９】
（実施例８）
低コストのＤＭＦチップの機能的試験
上記の実施例７で略述されるように製造された３インチ×２インチのＰＥＴベースＤＭＦ底部チップを、アクチュエーション能力について試験した。図１２は、３インチ×２インチのＰＥＴベースのＤＭＦチップ（１）、その上にわたって位置する０．７mm厚のガラス基板（３）を描写する。ガラス基板（３）は、ガラス基板の下方表面上で、透明なインジウムスズ酸化物（ＩＴＯ）電極およびＩＴＯの電極の上ににわたるテフロンコーティングを含む。ＤＭＦチップは、直線状縁部電極デザインおよび電極の間の５０μmギャップを備えた８０の銀のアクチュエーション電極を、８つのバッファーリザーバーと共に含む（上記の実施例７を参照）。
【０４１０】
底部電極を、誘電体パリレン－Ｃの層（６～７μmの厚み）およびテフロンの最終コーティング（５０ｎmの厚み）で、それぞれＣＶＤコーティングおよびスピンコーティングによってコーティングした。およそ５０μＬの０．１％の界面活性剤を含有するＰＢＳバッファー（２）を、底部ＤＭＦチップ上の４つの隣接するリザーバーの中へピペットで移した。小滴サイズは７００～１，５００ｎＬ（１つまたは２つの小滴）の範囲であり、垂直および水平な側方の動き（４）に加えて、混合のために必要な円形掃引パターンについてチェックした。チップ上のアクチュエーション電極のおよそ９０％を試験し、完全に機能的であることが見出された。
【０４１１】
（実施例９）
低コストのＤＭＦチップ上でのＴＳＨ免疫アッセイ
上記の実施例８中で記載されるような、ガラス基板により重層された３インチ×２インチのＰＥＴベースのＤＭＦチップを、化学発光検出を使用して、甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）免疫アッセイを実行する能力について試験した。モックサンプルは、ブロッキング剤および界面活性剤を含有するトリス緩衝食塩水（ＴＢＳ）バッファーの中へ少量添加されたＴＳＨキャリブレーター材料を含んでいた。３つのサンプルを試験した（０、４、４０μＩＵ／ｍｌ）。２μＬの、５μmの磁性マイクロ粒子（３×10^8粒子／ｍｌ）上にコーティングされた抗βＴＳＨ捕捉抗体を、中央のＤＭＦ電極アレイの中へマイクロ粒子リザーバーから分注した。ＤＭＦチップ下で、ネオジム磁石バー（３インチ×１／２インチ×１／４インチ厚、相対的透磁率μ_r＝１．０５、残留磁界の強さB_r＝１．３２Ｔ）を係合させることによって、磁性マイクロ粒子をバッファーから分離した（図１３Ａ）。５μＬのサンプルをマイクロ粒子スラグへ動かし、続いて４つの電極の正方形の立体配置にわたるマイクロ粒子懸濁物を５分間混合した（図１３Ｂ）。マイクロ粒子を磁石によってサンプルから分離し、上清を廃液リザーバーへ動かした（図１３Ｃおよび１３Ｄ）。２μＬの、ホースラディシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）へコンジュゲートされた１μｇ／ｍＬの抗ＴＳＨ検出抗体をマイクロ粒子スラグへ動かし、２分間混合した。マイクロ粒子を磁石によって分離し、上清を廃液リザーバーへ動かした。免疫アッセイサンドイッチ複合体を含有するマイクロ粒子を、４×２μＬの０．１％の界面活性剤を含有するＰＢＳの洗浄バッファーにより合計４回洗浄した。ステップが完了した後に、各々の洗浄ステップからの洗浄バッファーを廃液へ動かした。化学発光基質は１μＬのＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　H_2O_2および１μＬのルミノール（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）からなり、それをマイクロ粒子スラグへ動かし、続いて６分間混合した。化学発光シグナルを、５Ｖの直流電源を備えた集積Ｈａｍａｍａｔｓｕ　Ｈ１０６８２－１１０　ＰＭＴを使用して、４２７ｎmの発光（３４７ｎmの励起）で測定した。用量－応答カーブを、相対

的発光に対してプロットした（図１３Ｅを参照）。
【０４１２】
（実施例１０）
ナノポアモジュール製作
ナノポアモジュールを、ＴＥＭウィンドウ（Ｎｏｒｃａｄａ）中に包埋された商業的に入手可能な窒化ケイ素（SiN_X）膜の組み込みとカップリングさせた標準的なソフトリソグラフィー製作方法を使用して製作した。モジュールは、ＰＤＭＳの４つの分離した層（転送マイクロチャンネルを含有する上部ＰＤＭＳ基板および底部ＰＤＭＳ基板、ならびにＴＥＭウィンドウをシールする２つの随意の中間ＰＤＭＳ層）からなっていた。
【０４１３】
ＳＵ８マスターモールドの製作
清浄で乾いたガラス基板を、フォトレジスト（ＳＵ８－５０）で、所望される厚みへスピンコーティングした。次いでコーティングした基板の領域を、フォトマスクを使用して近紫外線光へ選択的に曝露した。マスクは、転送マイクロチャンネルおよびリザーバーの形が残るべき領域においてのみ、フォトレジストを紫外線へ曝露する。曝露に続いてベークして、曝露されたフォトレジストの領域を架橋した。次いでＳＵ８現像液を使用して、残存している曝露されないフォトレジストを基板から除去する。最終産物は、マスターモールド（ハードフォトレジストのパターニングされた転送マイクロチャンネルおよびリザーバーを備えたガラス基板）である。
【０４１４】
中間ＰＤＭＳ層の製作
中間ＰＤＭＳ層の製作のために、７：１（ＰＤＭＳモノマー：硬化剤）の比でＰＤＭＳモノマーおよびその硬化剤（Ｓｙｌｇａｒｄ　１８４シリコンエラストマー）を含有する溶液を、スライドグラス上にスピンコーティングし、続いて７０℃で３０分間ホットプレート上で加熱した。ＰＤＭＳ層をガラス基板から剥離し、１．２５ｍｍの切り欠きをＰＤＭＳ層を介して穿孔して、ＴＥＭウィンドウへのアクセスを可能にする開口部を提供した。ＰＤＭＳ層の表面を、コロナ処理機を８ｍｍの距離で使用して３０秒間プラズマ処理することによって親水性にした。第２のプラズマ処理（５秒）を、２つの中間ＰＤＭＳ層の間にSiN_XＴＥＭウィンドウを接合する前に使用して、ＰＤＭＳ層およびＴＥＭウィンドウの表面を処理した。
【０４１５】
上部ＰＤＭＳおよび底部ＰＤＭＳの製作
７：１（ＰＤＭＳモノマー：硬化剤）の比でＰＤＭＳモノマーおよび硬化剤を混合することならびに転送マイクロチャンネルおよびリザーバーをパターニングしたＳＵ８パターニングモールド（６）を含有するガラスの上にわたって注ぐことによって、図１４Ｂ中で示されるように、マイクロチャンネルを含有する上部ＰＤＭＳ基板および底部ＰＤＭＳ基板を製作した（上記のＳＵ８マスターモールド製作を参照）。マイクロチャンネルはおよそ１１０～１３５μｍの幅および５０μｍの深さの測定値であった。１５分間脱気した後に、ＳＵ８モールドを７０℃で６０分間ホットプレート上で加熱した（７）。硬化後に、ＰＤＭＳ基板をＳＵ８モールド（８）から剥離し、切断して、３０ｍｍの長さ×２０ｍｍの幅×３ｍｍの深さの近似的寸法を有する矩形のＰＤＭＳ基板を得た。アクセス孔（直径１．２５ｍｍ）をＰＤＭＳ基板を介して穿孔して、マイクロチャンネルの中へ電極の後続する挿入を可能にした。最終的なアセンブリーを図１４Ａ中で示し、底部から上部へ、１つのマイクロチャンネル（１）を含有する底部ＰＤＭＳ基板、マイクロチャンネルの上にわたって位置する切り欠きを含有する第１の中間ＰＤＭＳ層（２）、ＴＥＭウィンドウ中のSiN_X膜（３）、切り欠きも含有する第２の中間ＰＤＭＳ層（４）、および第２のマイクロチャンネルを含有する上部ＰＤＭＳ基板（５）を含む。
【０４１６】
上部ＰＤＭＳ基板および底部ＰＤＭＳ基板の整列
ＰＤＭＳ底部基板（上記の「上部ＰＤＭＳおよび底部ＰＤＭＳの製作」中で略述されるよ

うに調製される）を３０秒間プラズマ処理し、続いて、ＰＤＭＳ底部基板の上へ第１の中間ＰＤＭＳ層（「中間ＰＤＭＳ層の製作」中で略述されるように調製される）を接合した。同様に、ＰＤＭＳ上部基板を３０秒間プラズマ処理し、続いて、ＰＤＭＳ上部基板の上へ第２の中間ＰＤＭＳ層を接合した。中間層中の切り欠きをマイクロチャンネルと整列させた。上部ＰＤＭＳ片および底部ＰＤＭＳ片の両方を３０秒間酸素プラズマ処理し、続いて、上部片と底部片との間にＳｉＮｘ膜ウィンドウを設置し、中間ＰＤＭＳ層中の切り欠きと整列させた。底部片と整列させたＳｉＮｘ膜と整列させた上部片を、すべての気泡が放出されるまで、一緒にプレスした。最終的なナノポアＰＤＭＳアセンブリーを、１００℃で３０分間ホットプレート上で加熱し、５分間プラズマ処理した。図１４Ｃ中で示される最終的なモジュールアセンブリー（９ａ）は２つのチャンネル（１つの直線状チャンネルおよび１つの「Ｌ型」チャンネル）を含有し、各々は溶液（例えばバッファー）のためのリザーバー中で終結した。ＳｉＮｘ膜を含有するＴＥＭウィンドウは、２つの垂直なマイクロチャンネルの交差で位置する（図１４Ｃ、９ｂ）。

【０４１７】

（実施例１１）

ナノポア製作

誘電破壊が発生するまでＳｉN_XＴＥＭウィンドウ（２つのＰＤＭＳ層の間に収容された）を電位バイアスへさらし、それによって、膜中で小さな直径の孔を開口させることによって、ナノポア製作を達成した。これは、検体の検出の前に、マイクロ流体デバイス内のポアのインシトゥーの形成を可能にする。誘電破壊によるナノポア形成は、固相誘電体膜中の小さな直径ポアの迅速製作のために有用であることがこれまでに示された（Ｈ．Ｋｗｏｋ，Ｋ．Ｂｒｉｇｇｓ，Ｖ．Ｔａｂａｒｄ－Ｃｏｓｓａ，ＰＬｏＳ－Ｏｎｅ，９（３），２０１４）。

【０４１８】

透過電子顕微鏡（ＴＥＭ）ウィンドウ（Ｎｏｒｃａｄａ）として商業的に入手可能なＳｉN_X膜を、アセンブルされたＰＤＭＳモジュール（上記の実施例１０中で略述されたように）中に包埋し、これを使用してナノポアを生成した。垂直なマイクロチャンネルジャンクションにより、ＳｉN_XＴＥＭウィンドウの横断面領域（５０μｍ×５０μｍ）は、膜の反対の側面（シスおよびトランス）上に配置された塩溶液（１ＭのＫＣｌ）へ曝露された。Ａｇ／ＡｇＣｌ電極を、ＰＤＭＳ基板を介して穿孔された孔の中のＳｉN_XＴＥＭウィンドウの中心からおよそ３ｍｍで各々のマイクロチャンネルの中へ配置した。鈍針を含有するシリンジを使用して、液体がモジュール端部上のチャンネル開口部から出現することが観察されるまで、エタノールを２つのリザーバーへ添加することによって、シスマイクロチャンネルおよびトランスマイクロチャンネルの両方を充填する。抵抗値を測定して、適切なシーリングをチェックし、ＴＥＭ－ＳｉN_X膜がインタクトであることを確実にした。ＭΩのオーダーの抵抗値は、インタクトで損傷されていない良好なシーリングおよび膜を示した。エタノールを脱イオン水によりマイクロチャンネルから外へフラッシングし、２つのリザーバーの中へ注入することによって溶液を１ＭのＫＣｌで置き換えた。抵抗値を再び測定して、適切なシーリングについてチェックした。

【０４１９】

４．４Ｖの定電圧を膜アセンブリーへ適用し、漏洩電流をリアルタイムでモニターした。リアルタイムで測定された漏洩電流を、図１５Ａ中でプロットする。図１５Ａはナノポア生成の前の漏洩電流（１）を示す。＞５ｎＡの閾値をカットオフ値（すなわち、ポア生成を表わす）として使用した。およそ１０分後に、漏洩電流中の増加が観察された（２）。漏洩電流の増加の検出の直後に電圧をオフにした。以下の関係性

【数２】

$$G = \sigma\left(\frac{4L}{\pi d^2} + \frac{1}{d}\right)^{-1}$$

（式中、Ｇ＝コンダクタンス、σ＝バルク伝導率（ＫＣｌについて１２．３５Ｓ／ｍと測定された）、Ｌ＝膜の厚み（１０ｎｍ）、ｄ＝ポア直径（Ｓ．Ｋｏｗａｌｃｚｙｋ，Ａ．Ｇｒｏｓｂｅｒｇ，Ｙ．Ｒａｂｉｎ，Ｃ．Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎａｎｏｔｅｃｈ．，２２，２０１１））によって決定されるように、生じたポアの直径は６．９ｎｍであった。

【０４２０】

ポア生成後に、電流－電圧（Ｉ－Ｖ）カーブ（図１５Ｂを参照）を使用して、ナノポアがオーム性挙動を提示することを確認し、ナノポアは対称的な形であり、抵抗値は適用された電圧または電流に非依存性であったことを指摘した。同じ１ＭのＫＣｌ溶液を、ポア製作およびＩ－Ｖカーブの両方について使用した。

【０４２１】

（実施例１２）

乾いたマイクロチャンネルの充填

アセンブルされたＰＤＭＳモジュール（すなわちＤＭＦモジュールおよびナノポアモジュールを含む集積デバイス）中で含有されるキャピラリー導管を、ＤＭＦ電極アセンブリーからの高塩溶液を自発的に充填する能力について試験した（図１６Ａ～１６Ｃ）。充填は自発的キャピラリー流（ＳＣＦ）経由で達成された。マイクロチャンネルのより良好な可視化を可能にするために、ナノポア膜は含まれなかった。図１６Ａを参照して、８０のアクチュエーション電極（１）（２．２５ｍｍ×２．２５ｍｍ、Ｃｒ－２００ｎｍの厚み）を含有するガラスＤＭＦチップ（３インチ×２インチ×０．０２７６インチ）を使用して、３．６ＭのＬｉＣｌ、０．０５％のブリジ３５および青色色素（可視化を支援する）の小滴（２）を動かした。ＰＤＭＳモジュール（３）は、ＤＭＦ電極アレイに直面する２つの開口部（４）、２つのリザーバー（５）、および２つのマイクロチャンネル（１つの直線状チャンネル（６）および１つのＬ型チャンネル（７））を含有していた。２つのチャンネル開口部がＤＭＦ電極アレイの内部に直面するように、モジュールアセンブリーをＤＭＦガラス表面上に設置した。上部接地電極チップが使用されなかったので、小滴の動きは、駆動電位を生成するために共面の底部電極を使用することによって達成された。

【０４２２】

１０μＬの青色をつけたＬｉＣｌ塩溶液の小滴を、ＤＭＦ電極アレイの真中の電極上に設置した。１００V_{rms}（１０ｋＨｚ）の電圧を使用して、直線状マイクロチャンネル開口部へ隣接する転送電極へ小滴を動かす。図１６Ｂ中で示されるように、小滴がＰＤＭＳ表面に接触した後に（８）、１３０μｍの直径の直線状チャンネル（９）を充填するのにおよびリザーバーに到着するのに要求される時間を測定した。図１６Ｃ中で示されるように、およそ３０秒後に、小滴の体積は目に見えてより小さく（１０）、チャンネルは半分充填された（１１）。５３秒の合計時間が、乾いたマイクロチャンネル全体（１３０μｍの直径）を充填するのに要求された。

【０４２３】

湿らせたマイクロチャンネルの充填

１０μＬの青色をつけたＬｉＣｌ塩溶液の小滴を、ＤＭＦ電極アレイの真中の電極上に設置した。１００V_{rms}（１０ｋＨｚ）の電圧を使用して、直線状マイクロチャンネル開口部へ隣接する転送電極へ小滴を動かす。チャンネルをエタノールにより前填済して、前もって湿らせたチャンネルを模倣した。小滴がＰＤＭＳ表面に接触した後に、＜１秒の時間が、リザーバーまでのチャンネルを充填するのに要求された。これは乾いたチャンネルよりも有意に速く、親水性溶液により前もって湿らせることはマイクロチャンネル充填速度を促進することを示唆した。

【０４２４】

（実施例１３）

集積シリコンＮＰデバイス中でのＤＭＦ小滴の転送

可撓性基板（ＰＤＭＳ等）に加えて、硬質基板（例えばシリコン）を使用して、ナノポアモジュールを製作することができる。図１７は、アクチュエーション電極（４）を含有するデジタルマイクロ流体（ＤＭＦ）チップ（１）を示し、そこから、小滴は、ナノポアセ

ンサーを含有するシリコンマイクロ流体チップ（２）へ転送される。小滴は、ナノポアセンサーを含有するマイクロ流体チップの上部表面中のアクセスポート（３）によって２つの構成要素チップの間に転送される。アクセスポートはマイクロ流体チャンネル（６）によってナノポアセンサー（５）へ接続される。小滴は毛細管力によってアクセスポートからマイクロ流体チャンネルを介して動かされ、動きはマイクロピラーのアレイから製作された受動的ペーパーポンプ（７）によって支援され得る（図１８）。受動的ポンプはマイクロチャンネルから流体を除去することもでき、異なる流体溶液が混入なしに連続して使用されることを可能にする（例えばナノポア形成およびナノポアセンシングのための溶液の間で）。

【０４２５】

シリコンナノポアモジュールの製作は、標準的なＣＭＯＳフォトリソグラフィーおよびエッチングプロセスを使用することを包含し得る。図１８は、シリコンナノポアモジュールのデザインの実施例を示し、そこでおよそのダイサイズは１０ｍｍ×１０ｍｍであり、ナノポアバッファー（複数可）を充填するために前側チャンネル（シス）および裏側チャンネル（トランス）を備える。前側チャンネルは、３０μｍの幅および深さを有し、長さ１１ｍｍである。裏側チャンネルは、５０μｍの幅、２００μｍの深さを有し、長さ１１ｍｍである。マイクロピラー寸法は、３０μｍのピラー直径、３０μｍの間隔および２００μｍの深さである。

【０４２６】

ＤＭＦおよびナノポアモジュールは、成型プラスチックから製作されたインターフェースを使用して、または直接接合によって、連結することができる（図１９および２０）。アクセスポートと整列させたＤＭＦチップ内の電極（４）上に位置する小滴は、インターポーザー（７）によって促進される毛細管力によって転送される。あるいは、ＤＭＦチップの上部電極（８）は、アクチュエーション電極（４）をインターポーザー（８）と接続する孔の導入によって、このプロセスを更に促進するように修飾することができる（図２０）。

【０４２７】

（実施例１４）

<u>毛細管力によるＤＭＦとナノポアのモジュールとの間の小滴転送</u>

ＤＭＦチップから好適なナノポア膜を含有するモジュールへ、高塩の移動バッファーを動かす能力は、シリコンマイクロ流体チップ中で試験された。曲がりくねったマイクロチャンネルは、唯一の駆動力として自発的キャピラリー流（ＳＣＦ）を使用して、１ＭのＫＣｌ（ｐＨ＝８）の小滴を受動的に動かす能力について試験された。全体のマイクロチャンネルをシリコン中で製作し、ＣＭＯＳベースのシリコン環境中で流体転送のためのモデルとして供した。曲がりくねったマイクロチャンネルは、２つのアクセスポート（流体ローディングのための）を有するようにデザインされた。チャンネル寸法は、１６０μｍの直径で２．５ｃｍのおよその長さと測定された。誘電破壊によるナノポアの形成のための好適な溶液の小滴は、受動的毛細管力を使用して、シリコンマイクロ流体構造を満たすことが実証された。

【０４２８】

図２１を参照して、１ＭのＫＣｌ溶液（ｐＨ＝８．０）の個々の小滴は、輸送マイクロ流体チャンネル（２）へ接続する注入口ポート（１）のうちの１つ中に設置され、長さ中の２．５ｃｍの曲がりくねったチャンネル（３）へ導かれる。チャンネルは大気圧へ曝露されたポート（図示せず）で終了した（４）。曲がりくねったチャンネルの拡大画像を図２２中で示す。キャピラリーの充填は光学顕微鏡へ適合させたｓＣＭＯＳカメラを使用してモニターした。注入口ポートの中への塩溶液の堆積は、数ｍｍ／秒の速度での受動的毛細管力によってマイクロチャンネルの自発的充填をもたらし、それによって、ナノポア膜へのマイクロチャンネル中の流体を転送する能力を実証した。

【０４２９】

転送速度の更なる試験として、ＫＣｌ溶液を出してチャンネルを空にし、窒素気流下で乾

燥させた。１ＭのＫＣｌ溶液（ｐＨ＝８．０）の更なる小滴を乾燥させたマイクロチャンネルの注入口ポート中に設置し、キャピラリーの充填を光学顕微鏡使用してモニターした。「乾いた」チャンネルに比較して（すなわちＫＣｌ溶液がはじめてチャンネルの中へ導入された時に比較して）、より速い充填速度が観察され、それによって、親水性溶液によるシリコンマイクロチャンネルの前充填が後続の流体充填を促進したことが示された。

【０４３０】

（実施例１５）

流体マイクロチャンネルによる集積ナノポアセンサーの製作

流体マイクロチャンネル内の集積ナノポアセンサーを、フォトリソグラフィーおよびエッチングプロセスを使用して製作して、シリコン・オン・オキサイド（ＳＯＩ）ウエハを修飾する（図２３Ａ～２３Ｂ）。

【０４３１】

ＳＯＩウエハ（１）にフォトリソグラフィーおよびエッチングを行って（２）、３０μｍの幅および１０～３０μｍのチャンネルの深さの寸法を備えた、小さな流体体積の動きに好適な構造（３）を産生する。

【０４３２】

窒化ケイ素（ＳｉＮ）材料（５）を蒸発（４）によってパターニングされたＳＯＩウエハの上へ堆積させる。

【０４３３】

酸化物材料（７）の層を蒸発（６）によって窒化ケイ素（５）の上にわたって堆積させる。下層にあるシリコン（１）は、フォトリソグラフィーおよびエッチングの組み合わせを使用して、微細構造のうちの１つをカバーする重層された酸化物および窒化物材料を選択的に除去することによって露出される（６）。この構造は、小さな体積の流体の動作させるためのマイクロチャンネルを形成するだろう。

【０４３４】

第２の微細構造内の下層にある窒化ケイ素は、フォトリソグラフィーおよびエッチングの組み合わせを使用して、重層された酸化層のみを除去することによって選択的に露出される（８）。

【０４３５】

曝露された微細構造はキャリアウエハへ恒久的に接合され（９）、この構造は更なる加工のために反転される（１０）。ＳＯＩウエハの反対の側面上の酸化物材料は、フォトリソグラフィーおよびエッチングの組み合わせを使用して、選択的にパターニングされて、各々の微細構造の裏側を露出する（１１）。

【０４３６】

（実施例１６）

切断可能なＤＮＡ－ビオチンコンストラクトの合成

非ビオチン化二本鎖ＤＮＡ（ＮＰ１）の合成

２つの一本鎖の５０ｍｅｒを標準的なホスホロアミダイトケミストリー（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して合成した。オリゴＮＰ１－１Ｓは、Ｃ－１２炭素スペーサーによってＤＮＡから分離された５’末端上にアミノ基を含有する５０ヌクレオチドのＤＮＡ配列（配列番号：１）（１、ＭＷ＝１５，５２２．３ｇ／モル、ε＝５０２，１００$M^{-1}cm^{-1}$）からなっていた。オリゴＮＰ１－２ＡＳは、ＮＰ１－１Ｓに相補的な５０ヌクレオチドのＤＮＡ配列（配列番号：２）（２、ＭＷ＝１５，５０７．１ｇ／モル、ε＝４８７，９００$M^{-1}cm^{-1}$）からなっていた。両方のオリゴヌクレオチドを後続の操作の前に定量および凍結乾燥した。示される配列は、上から順に、配列番号：１、配列番号：２、配列番号：１～２である。

【０４３７】

【化１５】

NP1-1S: 1

H_2N-AGTCATACGAGTCACAAGTCATCCTAAGATACCATACACATACCAAGTTC

NP1-2AS: 2

GAACTTGGTATGTGTATGGTATCTTAGGATGACTTGTGACTCGTATGACT

最終的なds-DNAデザインNP1: 3

H_2N-AGTCATACGAGTCACAAGTCATCCTAAGATACCATACACATACCAAGTTC

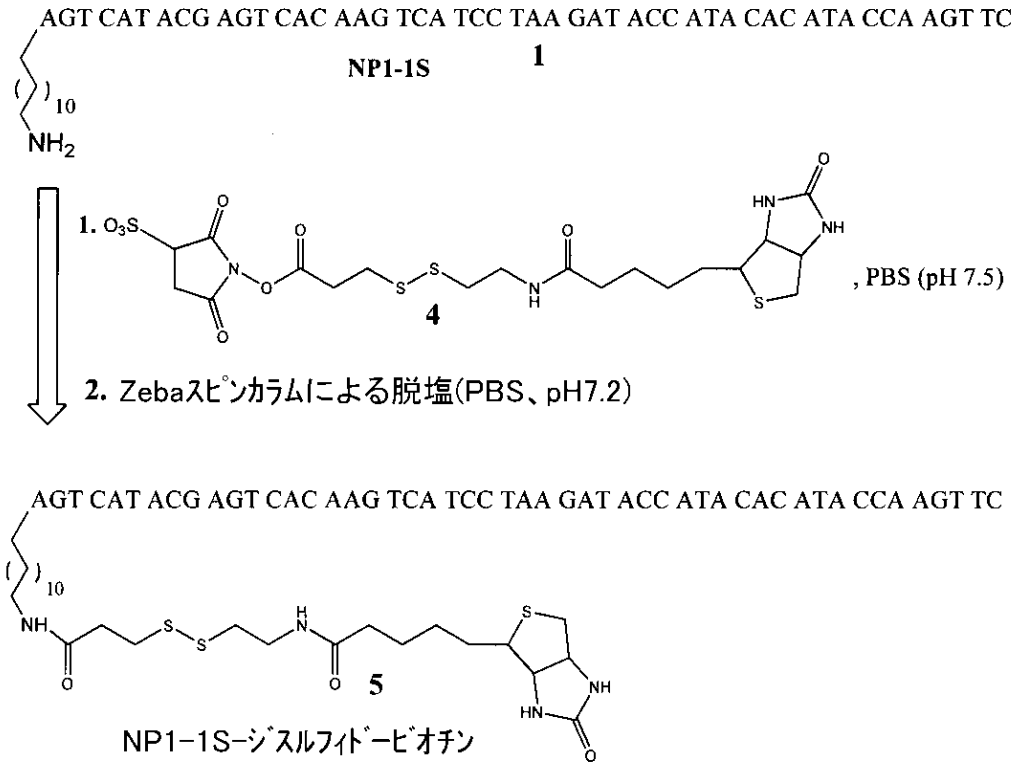
TCAGTATGCTCAGTGTTCAGTAGGATTCTATGGTATGTGTATGGTTCAAG

【０４３８】

非ビオチン化二本鎖５０ｂｐのＤＮＡコンストラクトの合成：ＮＰ１－２ＡＳ（１．４４ｍｇ、９３．４ナノモル）を０．５ｍＬの蒸留水中で再構成して、１８７μＭの溶液を得た。ＮＰ１－１Ｓ（１．３２ｍｇ、８５．３ナノモル）を、０．５ｍＬの５０ｍＭのリン酸塩、７５ｍＭの塩化ナトリウムバッファー（ｐＨ７．５）中で再構成して、１７１μＭの溶液を得た。二本鎖コンストラクト（３）（配列番号：１、フォワードストランド（上部）；　配列番号：２、リバースストランド（下部））を、４０μＬのＮＰ１－２ＡＳ溶液（７．４７μモル）と６０μＬのＮＰ１－１Ｓ溶液（１０．２μモル）をアニールすることによって作製した。混合物を８５℃で３０分間加熱ブロック中に設置し、続いて、２時間にわたって室温へ徐冷した。１０ｍＭのＰＢＳバッファー（ｐＨ７．２）により平衡化されたＴｏｓｏＨ　Ｇ３０００ＳＷカラム（７．８ｍｍ×３００ｍｍ）に全アニーリング体積（１００μＬ）を注入することによって、二本鎖材料を精製した。カラム溶出液を２６０および２８０ｎｍでモニターした。二本鎖材料（３）は７．９分で溶出された（およそ２０分間）。ＤＮＡを、０．５ｍＬのＡｍｉｃｏｎフィルター濃縮器（ＭＷカットオフ１０，０００Ｄａ）を使用して、１５０μＬへ濃縮した。最終的なＤＮＡ濃度は、A_{260}の吸光度によって決定されるように、４０．５μＭであると計算された。示される配列は、上から順に、配列番号：１、配列番号：１、配列番号：２、配列番号：１～２である。

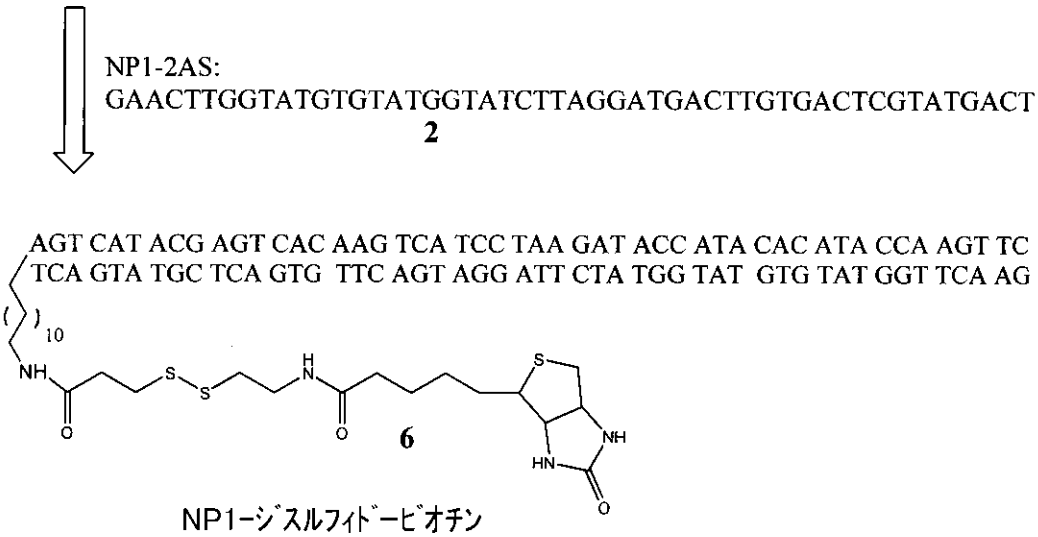
【０４３９】

【化１６】



【０４４０】

【化１７】



【０４４１】

一本鎖の５’アミノオリゴのビオチン化

１００ｍＭのスルホ－ＮＨＳ－ＳＳビオチン（４、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の溶液を、０．０９９ｍＬの無水ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）中での６ｍｇの粉末の溶解によって作製した。溶液をボルテックスで撹拌し、５’アミノ－ＤＮＡのビオチン化のために直ちに使用した。およそ１００μＬの５０ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ７．５）中のｓｓＤＮＡ（１、１７１μＭ、１７．１μモル、０．２６５ｍｇ）（配列番号：１）溶液を、３．４μＬのＤＭＳＯ中の０．１ｍＭのビオチン化試薬（３４．１μモル、ｓｓＤＮＡの２０倍のモルの過剰量）と混合した。混合物を混合し、室温で２時

間反応させた。２つの０．５ｍＬのＺｅｂａスピン脱塩カラム（ＭＷカットオフ７，０００Ｄａ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、１０ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ７．２）中で平衡化した。粗製のビオチン化ｓｓＤＮＡ溶液を１つのＺｅｂａカラムへ添加し、１．３分間４，６００ｒｐｍで溶出させた。記載されるように、溶出液を第２のＺｅｂａカラムへ移し溶出させた。精製されたＮＰ１－１Ｓ－ＳＳ－ビオチン（５）（配列番号：１）の濃度を、A_{260}の吸光度の測定によって決定した（２．０３ｍｇ／ｍｌ、１３１μＭ）。

【０４４２】

ビオチン化二本鎖ＤＮＡの形成

およそ６０μＬのＮＰ１－１Ｓ－ＳＳ－ビオチン溶液（５、７．８５μモル、１３１μＭ、２．０３ｍｇ／ｍＬ）を、４２μＬのＮＰ１－２ＡＳ溶液（２、７．８５μモル、１８７μｍｏｌ／Ｌ）（配列番号：２）と混合した。溶液を８５℃で３０分間加熱ブロック中に設置し、続いて、２時間にわたって室温へ徐冷した。１０ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ７．２）を使用するＴｏｓｏＨ　Ｇ３０００ＳＷカラム（７．８ｍｍ×３００ｍｍ）に全アニーリング体積（およそ１００μＬ）を注入することによって、二本鎖産物を精製した。A_{260}の吸光度によってモニターされるように、二本鎖ビオチン化材料は７．９分（２０分間のランタイム）で溶出された。溶出体積を、０．５ｍＬのＡｍｉｃｏｎフィルター濃縮器（ＭＷカットオフ１０，０００Ｄａ）を使用して、４８０μＬへ低減した。最終的なＮＰ１－ジチオ－ビオチン（６）（配列番号：１、フォワードストランド（上部）；配列番号：２、リバースストランド（下部））濃度は、A_{260}の吸光度によって決定されるように、１６．３μＭであると計算された。

【０４４３】

（実施例１７）

切断可能なＤＮＡ－ビオチンコンストラクトの代替合成

相補的ＤＮＡ配列（ＮＰ－３１ａおよびＮＰ－３１ｂ）：２つの一本鎖の６０ｍｅｒを標準的なホスホロアミダイトケミストリー（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して合成した。オリゴＮＰ－３１ａは、Ｃ－６炭素スペーサーによってＤＮＡから分離された５’末端上にアミノ基を含有する６０ヌクレオチドのＤＮＡ配列（配列番号：３）（１、ＭＷ＝１８，８４１．２ｇ／モル、１．７μＭ／ＯＤ）からなっていた。オリゴＮＰ－３１ｂは、ＮＰ－３１ａに相補的な６０ヌクレオチドのＤＮＡ配列（配列番号：４）（２、ＭＷ＝１８２９２．８ｇ／モル、１．８μＭ／ＯＤ）からなっていた。両方のオリゴヌクレオチドを後続の操作の前に定量および凍結乾燥した。示される配列は、上から順に、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：３～４である。

【０４４４】

【化１８】

1

NP-31a:
H_2N-5'GCC CAG TGT CTT TGT AGG AGG AGC AGC GCG TCA ATG TGG CTG ACG GAC CAT GGC AGA TAG3'

2

NP-31b:
5'CTA TCT GCC ATG GTC CGT CAG CCA CAT TGA CGC GCT GCT CCT CCT ACA AAG ACA CTG GGC3'

3

ds-DNAデザインNP-31:
H_2N-5'GCC CAG TGT CTT TGT AGG AGG AGC AGC GCG TCA ATG TGG CTG ACG GAC CAT GGC AGA TAG3'
3'CGG GTC ACA GAA ACA TCC TCC TCG TCG CGC AGT TAC ACC GAC TGC CTG GTA CCG TCT ATC5'

【０４４５】

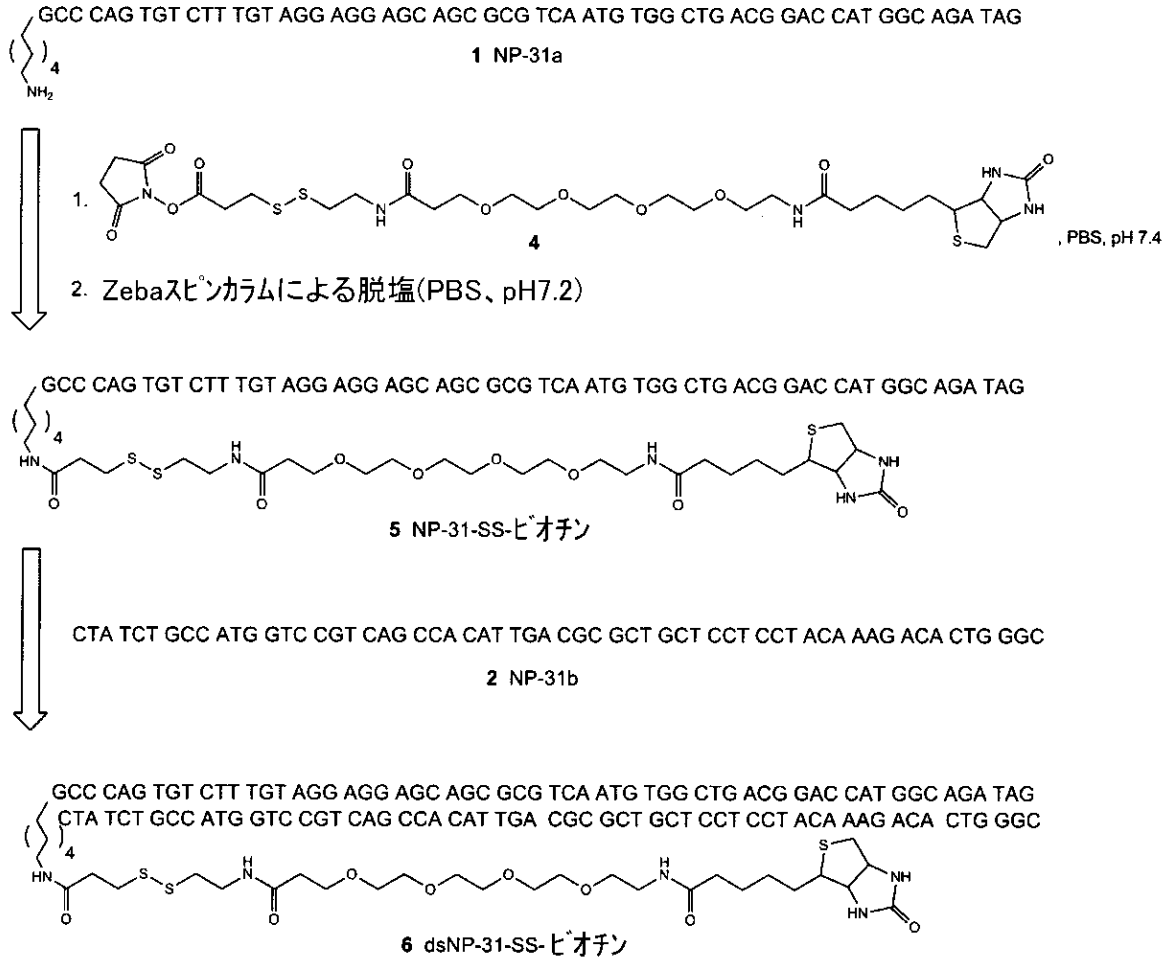
一本鎖の５’アミノオリゴＮＰ－３１ａのビオチン化

１０ｍＭのＮＨＳ－Ｓ－Ｓ－ｄＰＥＧ４－ビオチン（４、ＭＷ＝７５１．９４ｇ／モル、Ｑｕａｎｔａ　ＢｉｏＤｅｓｉｇｎ，Ｌｔｄ）の溶液を、２．０ｍＬのジメチルホルムアミド（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）中での１５．０４ｍｇの粉末の溶解によって調製し

た。溶液をボルテックスで撹拌し、５’アミノ－ＤＮＡのビオチン化のために直ちに使用した。およそ１００μＬの１０ｍＭのリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）（ｐＨ７．４）中のｓｓＤＮＡ（１、１００μＭ、０．０１μモル、０．１８８ｍｇ）（配列番号：３）溶液を、１０μＬのＤＭＦ中の１０ｍＭのビオチン化試薬（０．１μモル、ｓｓＤＮＡに対して１０倍のモルの過剰量）と混合した。混合物を混合し、室温で２時間反応させた。２つの０．５ｍＬのＺｅｂａスピン脱塩カラム（ＭＷカットオフ７，０００Ｄａ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、１０ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ７．２）中で平衡化した。粗製のビオチン化ｓｓＤＮＡ溶液を１つのＺｅｂａカラムへ添加し、２分間４，６００ｒｐｍで溶出させた。記載されるように、溶出液を第２のＺｅｂａカラムへ移し溶出させた。精製されたＮＰ－３１－ＳＳ－ビオチン（５）（配列番号：３）の濃度を、A_{260}の吸光度の測定によって決定した（１．４５ｍｇ／ｍｌ、７７μＭ）。示される配列は、上から順に、配列番号：３、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：３～４である。

【０４４６】

【化１９】



【０４４７】

ビオチン化二本鎖ＤＮＡの形成

およそ６０μＬのＮＰ－３１－ＳＳビオチン溶液（５、７７μＭ）（配列番号：３）を、５０μＬのＮＰ－３１ｂ溶液（２、１００μＭ）と混合した。溶液を８５℃で３０分間加熱ブロック中に設置し、続いて、２時間にわたって室温へ徐冷した。１０ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ７．２）を使用するＴｏｓｏＨ　Ｇ３０００ＳＷカラム（７．８ｍｍ×３００ｍｍ）に全アニーリング体積（およそ１００μＬ）を注入することによって、二本鎖産物（配列番号：３、フォワードストランド（上部）；配列番号：４、リバースストランド（下部））を精製した。A_{260}の吸光度によってモニターされるように、二本鎖ビオチン化材料は

７．５７分で溶出された。溶出体積を、０．５ｍＬのＡｍｉｃｏｎフィルター濃縮器（ＭＷカットオフ１０，０００Ｄａ）を使用して低減した。最終的なｄｓＮＰ－３１－ＳＳ－ビオチン（６）（配列番号：３、フォワードストランド（上部）；配列番号：４、リバースストランド（下部））濃度は、A_{260}の吸光度によって決定されるように、１１μＭであると計算された。

【０４４８】

（実施例１８）

切断可能なＤＮＡ－ビオチン（チオール媒介性切断コンストラクト）の合成

ストレプトアビジンコーティング磁性マイクロ粒子（ＳＡ－ＭＰ）へのｓｓＮＰ－３１－ＳＳビオチンの結合および化学切断（ＴＣＥＰまたはＤＴＴ）

化学切断実験を以下の方法によって磁性マイクロ粒子上で実行した（図２５を参照）。１００μＬの７７μＭのＰＢＳ（ｐＨ７．２）中で修飾オリゴヌクレオチドｓｓＮＰ－３１－ＳＳビオチン溶液を、１μＬの０．１％のストレプトアビジン常磁性マイクロ粒子と共に室温で３０分間インキュベーションした。磁石へ粒子を誘引することおよびＰＢＳＴバッファー（ｐＨ７．４）により１０回洗浄することによって、過剰なオリゴを除去した。オリゴ結合粒子を、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中の変動濃度のＤＴＴまたはＴＣＥＰのいずれかにより１５分間インキュベーションした。マイクロ粒子をＰＢＳＴバッファー（ｐＨ７．４）により１０回洗浄して、任意の切断されたオリゴヌクレオチドを除去した。フルオロフォアを含有する相補的配列ＮＰ－３１ｃ（配列番号：５）（７、ＭＷ＝７４９４．６ｇ／モル、５．２μＭ／ＯＤ）を、マイクロ粒子と共にＰＢＳ（ｐＨ７．４）中で３０分間インキュベーションして、粒子上でインタクトなままの任意の未切断のｓｓＮＰ－３１－ＳＳビオチンと結合させた。マイクロ粒子を磁石へ誘引し、ＰＢＳＴバッファー（ｐＨ７．４）により１０回洗浄して、任意の過剰なＮＰ－３１ｃセグメントを除去した。上記のように調製されたコーティングマイクロ粒子を洗浄したが、化学切断を行わず、対照として供した。粒子上の蛍光シグナルを蛍光顕微鏡法によって測定した。表１中に示されるように、最大切断効率はＤＴＴおよびＴＣＥＰについてそれぞれ７９％および９３％と測定された。以下に示される配列は配列番号：５である。

【０４４９】

【化２０】

7

NP-31c:
AlexaFluor® 546-5'CTA TCT GCC ATG GTC CGT CAG3'

【０４５０】

【表１】

DTT（mM）	マイクロ粒子上の蛍光シグナル（相対発光単位）	切断効率
50	3579	79%
25	7417	57%
12.5	11642	32%
0.78125	17052	0%
0	17059	（対照）
TCEP（mM）	マイクロ粒子上の蛍光シグナル（相対発光単位）	切断効率
250	460	93%
222	448	94%
187	474	93%
142	512	92%
83	477	93%
45	453	93%
19	452	93%
0	5023	（対照）

【０４５１】

（実施例１９）

切断可能なＤＮＡ－ビオチン（光切断コンストラクト）の合成

光切断可能なＤＮＡ配列およびマイクロ粒子上での切断の効率の評価

一本鎖ＤＮＡの光切断可能な配列を、標準的なホスホロアミダイトケミストリー（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して合成した。オリゴヌクレオチドは、２つの光切断可能な部分によって分離される２つのオリゴセグメント（オリゴ８－１（配列番号：６）およびオリゴ８－２（配列番号：７））を構成する、４８ヌクレオチド（８、ＭＷ＝１５，４３０．１ｇ／モル、４４１８００Ｌｍｏｌ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$）からなっていた。５’末端は、Ｃ－６炭素スペーサーによってＤＮＡから分離されたアミノ基を含有していた。オリゴ８－２に相補的なストランドを、蛍光性タグを含有して合成した（９、ＭＷ＝７７３８．８ｇ／モル、２１２７００Ｌｍｏｌ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$）（配列番号：８）。両方のオリゴヌクレオチドを後続の操作の前に定量および凍結乾燥した。

オリゴ８－１（配列番号：６）：５’ＡＡＡ　ＡＡＡ　ＧＧＴ　ＣＣＧ　ＣＡＴ　ＣＧＡ　ＣＴＧ　ＣＡＴ　ＴＣＡ３’

オリゴ８－２（配列番号：７）：５’ＣＣＣ　ＴＣＧ　ＴＣＣ　ＣＣＡ　ＧＣＴ　ＡＣＧ　ＣＣＴ３’

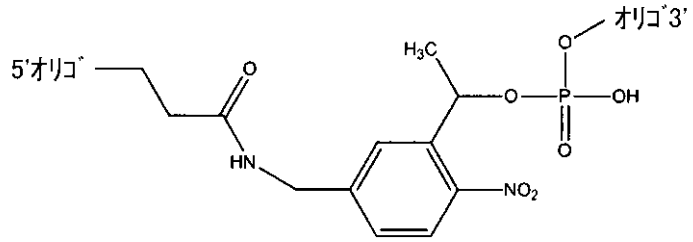
ＮＰ－８（８）（２つの光切断可能な部分（「ＰＣ」）によって連結されたオリゴ８－１（配列番号：６）およびオリゴ８－２（配列番号：７））：

H_2N－５’ＡＡＡＡＡＡＧＧＴＣＣＧＣＡＴＣＧＡＣＴＧＣＡＴＴＣＡ－ＰＣ－ＰＣ－ＣＣＣＴＣＧＴＣＣＣＣＡＧＣＴＡＣＧＣＣＴ３’

ＮＰ－９（９）（配列番号：８）：ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ５４６－５’ＡＧＧ ＣＧＴ ＡＧＣ ＴＧＧ ＧＧＡ ＣＧＡ ＧＧＧ３’

【０４５２】

【化２１】



光切断可能な部分(PC)

【０４５３】

光切断実験を以下の方法によって磁性マイクロ粒子上で実行した（図２６Ａおよび２６Ｂを参照）。ＮＰ－８を抗体へ共有結合により添付して、Ａｂ－オリゴの複合体を生成した（Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｉｎｃ．によって調製した）。１００μＬの３３ｎＭの抗体－オリゴの複合体を、１μＬの０．１％の固体のヤギ抗マウスマイクロ粒子と共に室温で３０分間インキュベーションした。磁石へ粒子を誘引することおよびＰＢＳＴバッファー（ｐＨ７．４）により１０回洗浄することによって、過剰な抗体－オリゴの複合体を除去した。マイクロ粒子複合溶液を、紫外線（３００～３５０ｎｍの波長）下で５分間照明した。マイクロ粒子を磁石へ誘引し、ＰＢＳＴバッファー（ｐＨ７．４）により１０回洗浄して、任意の切断されたオリゴセグメントを除去した。ＰＢＳＴバッファー（ｐＨ７．４）中での粒子の再懸濁に続いて、蛍光標識されたオリゴ９（配列番号：８）を照射されたマイクロ粒子へ添加し、室温で３０分間インキュベーションした。上記のように調製されたコーティングマイクロ粒子を洗浄したが、ＵＶ照明を行わず（未切断オリゴ８－２）、対照として供した。粒子上の蛍光シグナル（ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）５４６）を蛍光顕微鏡によって画像化した。表２中に示されるように、常磁性マイクロ粒子へ結合されている場合の切断効率は７４％と測定された。

【０４５４】

【表２】

	マイクロ粒子上の蛍光シグナル（相対発光単位）
照明	3660
照明無し（対照）	13928
切断効率	74%

【０４５５】

（実施例２０）

<u>熱切断可能なリンカー</u>

この実施例は、熱切断可能なリンカーおよびそれらの切断を記載する。本明細書において記載されるように、かかる熱切断可能なリンカーは、例えばＤＭＦチップ、小滴ベースのマイクロ流体チップ、ＳＡＷチップ、または同種のもの中で用いることができる。

【０４５６】

熱切断可能なリンカーを、閾値より上の温度の上昇（二本鎖ＤＮＡの熱分離において等）によって切断する。ＤＭＦチップにおける温度上昇は、光から吸収標的へエネルギーを転

送することによって光と熱で達成することができる。１つの方法において、約９８０ｎｍ（約９３０ｎｍ～約１０４０ｎｍの範囲）の波長を有する光源（レーザー等）を、流体サンプルの領域中のＤＭＦチップへ適用することができる。光は流体中の水分子によって吸収することができ、温度の増加およびリンカーの切断をもたらす。加熱のレベルおよび継続時間は、パルス長、パルスエネルギー、パルス数、およびパルス反復率によって制御することができる。例えば、水の吸光度帯域を使用する光と熱による加熱は、例えば米国特許第６，０２７，４９６号に記載される。

【０４５７】

光と熱による加熱は、色素または顔料含有標的と光源のカップリングによっても達成することができる。この事例において、ＤＭＦチップの標的領域は、吸収色素または顔料（例えばカーボンブラック）により印刷される。流体が標的に接している場合に、光源（例えば商業的に入手可能なレーザーダイオード）は光を吸収する標的に向けられ、温度の局在化した増加およびリンカーの切断をもたらす。加熱のレベルおよび継続時間は、標的の吸収特性、光波長、パルス長、パルスエネルギー、パルス数、およびパルス反復率によって制御することができる。例えば、光吸収標的と組み合わせて光源を使用する光と熱による加熱は、米国特許第６，６７９，８４１号中で記載される。

【０４５８】

光と熱による加熱の第３の方法において、吸収色素または顔料は、ＤＭＦチップ中で流体の中へ導入することができる。次いで光はＤＭＦチップを介して伝達され、エネルギーは溶解または懸濁された吸収材料へ転送され、温度の局在化した増加およびリンカーの切断をもたらす。加熱のレベルおよび継続時間は、標的材料の吸収特性、光波長、パルス長、パルスエネルギー、パルス数、およびパルス反復率によって制御される。この方法の一実施形態において、光を吸収する標的は、デバイス中で使用される磁性マイクロ粒子懸濁物である。例えば、流体小滴中で懸濁されるナノ粒子を使用する光と熱による加熱は、Ｗａｌｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌｙｓｔ，１４０（５），１５３５－４２（２０１５）中で記載される。Ｗａｌｓｈ　ｅｔ　ａｌ．の参照文献は、光と熱の適用において達成することができる制御のいくつかも実証する。

【０４５９】

（実施例２１）

マイクロ波誘導性の粒子ハイパーサーミアによって達成される熱切断

この実施例は、低出力のマイクロ波照射の使用により免疫アッセイ検出を加速できるように、熱変性（ｄｓＤＮＡ変性、逆マイケル反応、逆ディールス・アルダー、および他の脱離等）を促進して、熱感受性切断可能なリンカー経由でカウント可能な部分を放出するマイクロ波誘導性の粒子ハイパーサーミアの使用を記載する。本明細書において記載されるように、かかる熱感受性切断可能なリンカーは例えばＤＭＦチップ中で用いることができる。

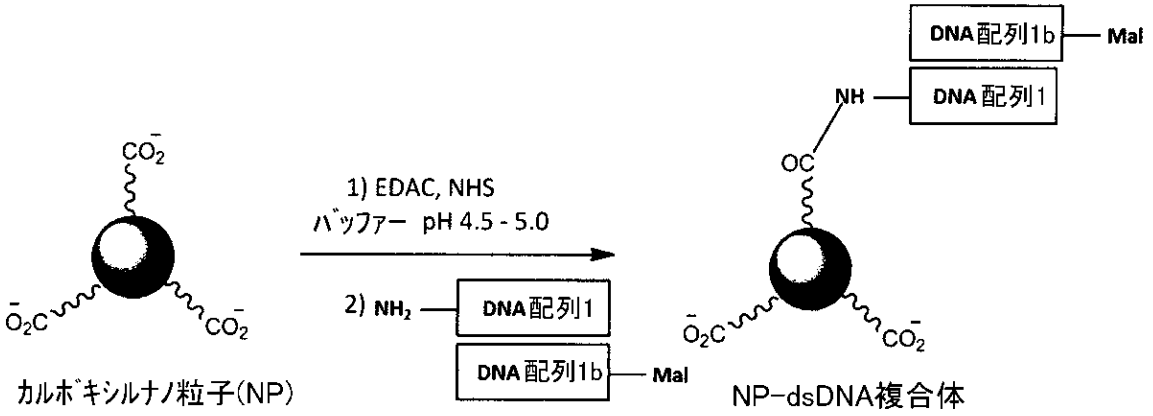
【０４６０】

この実施例において、直交官能化された短いｄｓＤＮＡセグメント（４０～５５℃の範囲中での二本鎖T_mを備えた１５ｂｐ配列等）の形成は、熱性放出剤として働く。ｄｓＤＮＡセグメントは、スルフヒドリル－マレイミド相互作用等のアタッチメントケミストリーによって抗体、およびアミン活性化カルボン酸ケミストリー等のアタッチメントケミストリーによって２６ｎｍのカルボキシル化ポリスチレンナノ粒子（ＮＰ）（Ｂａｎｇｓ　Ｌａｂｓ（Ｆｉｓｈｅｒｓ、ＩＮ、米国）から得ることができるもの等）と反応させることができる。２６ｎｍのＮＰは、５２８．７μ当量／ｇの表面電荷および６８．４平方Å／基のパーキングエリアを有する（製造業者情報によって）。抗体およびナノ粒子は、熱によりトリガーされる放出可能なリンカーを形成するｄｓＤＮＡセグメントを介して会合される。熱性リンカーは、粒子ハイパーサーミアおよび局在化した温度勾配をトリガーするマイクロ波照射等の技法を使用して切断することができる。

【０４６１】

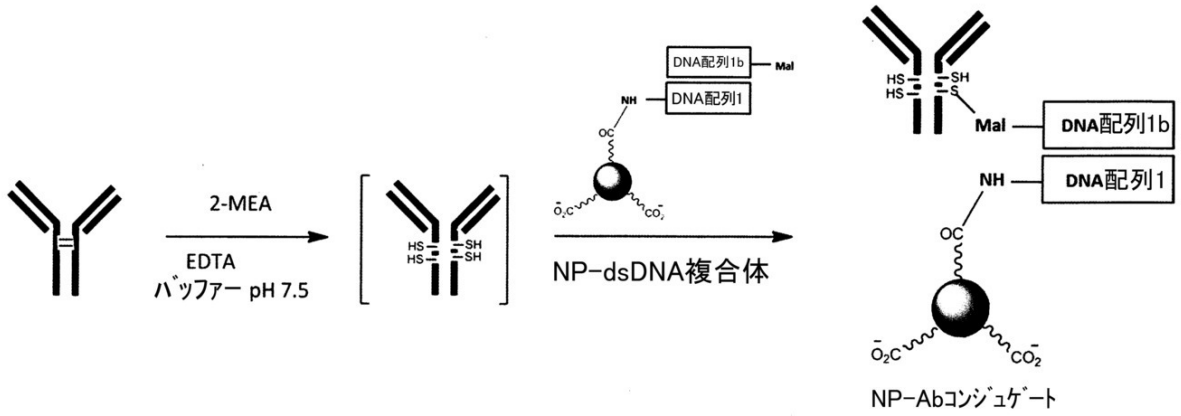
ＤＮＡ配列１（１０）（配列番号：９）：H_2N－５’ＣＡＡ　ＧＣＣ　ＣＧＧ　ＴＣＧ　Ｔ

ＡＡ３’
ＤＮＡ配列１ｂ（１１）（配列番号：１０）：マレイミド－５’ＴＴＡ　ＣＧＡ　ＣＣＧ　ＧＧＣ　ＴＴＧ３’
ｄｓＤＮＡ配列（１２）（配列番号：９、フォワードストランド（上部）；配列番号：１０、リバースストランド（下部））：
H_2N－５’ＣＡＡ　ＧＣＣ　ＣＧＧ　ＴＣＧ　ＴＡＡ３’
３’ＧＴＴ　ＣＧＧ　ＧＣＣ　ＡＧＣ　ＡＴＴ５’－マレイミド。
【０４６２】
直交官能化された相補的ＤＮＡ配列複合体のアニール
ＰＢＳ（ｐＨ７．５）中のおよそ１００μＭのＤＮＡ配列１（配列番号：９）の溶液を、ＰＢＳ（ｐＨ７．５）中の１．０モル当量のＤＮＡ配列１ｂ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓオリゴ分析器ツールによって理論的T_mは５１．６℃）（配列番号：１０）と混合し、６０℃で３０分間加熱ブロック中に設置し、続いて、２時間にわたって室温へ徐冷することができる。全アニーリング体積を注入することによって、１０ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ７．２）を使用するＴｏｓｏＨ　Ｇ３０００ＳＷカラム（７．８ｍｍ×３００ｍｍ）上で、もたらされたｄｓＤＮＡ産物を精製する。溶出液体積を、０．５ｍＬのＡｍｉｃｏｎフィルター濃縮器を使用して低減する。最終的なｄｓＤＮＡ濃度をＡ２６０の吸光度によって決定する。反応スキームを以下で描写する（「Ｍａｌ」はマレイミドである）。
【０４６３】
【化２２】



【０４６４】
カルボキシル－ポリスチレンナノ粒子の活性化および二本鎖ＤＮＡの添加
セクション「カルボキシル－ポリスチレンナノ粒子の活性化」下の実施例５中で記載されるように、カルボキシナノ粒子を前活性化する。ＮＰ上のＤＮＡローディングを、結合されているＤＮＡ鎖の熱変性、粒子の洗浄、蛍光標識された相補的ＤＮＡ配列（ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ５４６－５’－ＴＴＡ　ＣＧＡ　ＣＣＧ　ＧＧＣ　ＴＴＧ３’（配列番号：１１）等）のアニールによって決定し、蛍光顕微鏡を使用して定量化する。
【０４６５】

【化２３】



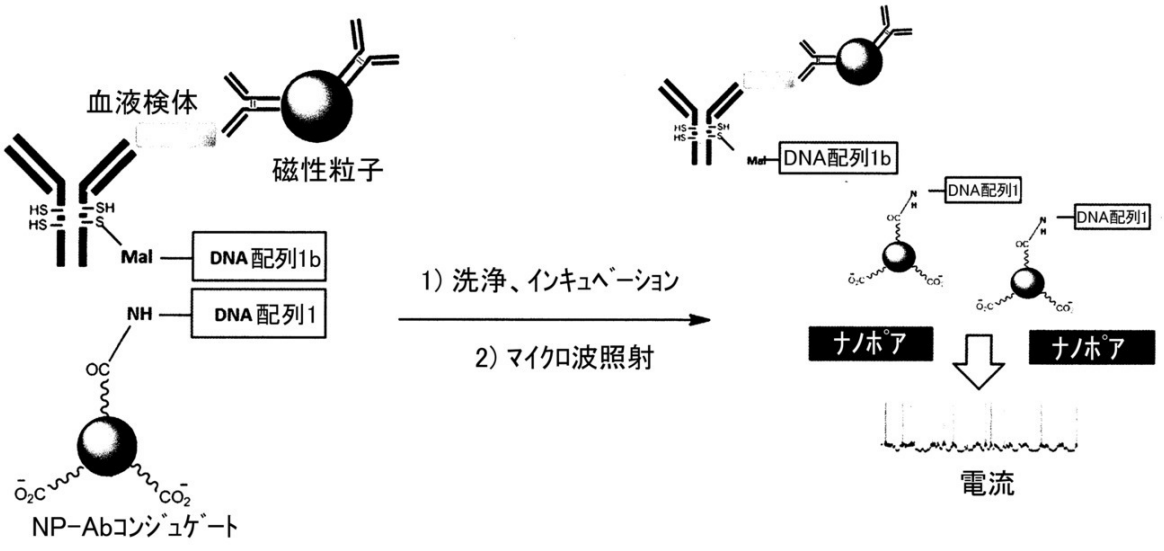
【０４６６】

抗体の還元およびＮＰ－ｄｓＤＮＡの複合体へのコンジュゲーション

セクション「抗体の還元」下の実施例５中で記載されているように、抗体を還元する。還元された抗体を、ＮＰ－ｄｓＤＮＡの複合体へのカップリングのために直ちに使用することができる。もたらされたコンジュゲートを６，５００ｇで遠心分離し、上清をデカントによって除去する。洗浄手順をＰＢＳ（ｐＨ７．５）により５回反復して、ナノ粒子から任意の遊離抗体を除去する。活性抗体対ナノ粒子の取り込み比を、与えられた抗体に対する蛍光標識された抗原を使用して定量化することができる。コンジュゲートのＮＰ濃度（％固体）を、紫外線－可視光線分光法（６００ｎｍ）を使用して決定する。粒子コンジュゲートを走査電子顕微鏡によって検査し、サイズ／電荷分布をＺｅｔａＳｉｚｅｒを使用して決定する。

【０４６７】

【化２４】



【０４６８】

マイクロ波誘導性の粒子ハイパーサーミアおよびナノポアカウント免疫アッセイ

上記のスキームは、熱変性させた抗体－ナノ粒子のコンジュゲート（その調製は上記される）を利用する、ナノポアカウントアッセイを図示する。サンドイッチタイプの免疫アッセイは、検体捕捉剤によりコーティングされた磁性マイクロ粒子を使用して調製することができ、そこで、血液検体は洗浄され、磁性マイクロ粒子と共にインキュベーションされ、記載される抗体－ナノ粒子のコンジュゲート共にインキュベーションされる。マイクロ

波照射を使用して粒子ハイパーサーミアを誘導して、粒子表面の近くで局所温度の勾配を生ずることができる。粒子ハイパーサーミア方法（Ｄｕｔｚ　ａｎｄ　Ｈｅｒｇｔ（Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２５：４５２００１（２０１４））中に概説されるもの等）を使用することができる。免疫アッセイ設定における局所的熱変性へのこれらの技法の適応は、カウント部分（ナノ粒子等）を放出する方法を提供することができる。磁性マイクロ粒子の除去に続いて、カウント部分（ナノ粒子）はナノポアを介する通過に際してカウントされる。

【０４６９】

（実施例２２）

ナノポアカウントデータ

この実施例は、様々なタグ（例えばポリエチレングリコールを備えたｓｓＤＮＡハイブリッド分子（ＤＮＡ－スター）、ｄｓＤＮＡ、ＤＢＣＯにより標識されたｄｓＤＮＡ、およびＰＡＭＡＭスクシンアミド酸デンドリマー）についてのナノポアカウントデータを記載する。異なるサイズのナノポアと共にこれらの異なるタグを使用して、ナノポアに至適化を提供した。異なる分子ポリマー標識を適切な塩バッファー中に懸濁し、標準的な流体セルカセットを使用して検出した。

【０４７０】

電流－電圧（ｉ－Ｖ）記録（電解電量計データ）および電流－時刻（ｉ－ｔ）記録を、インハウスの装置類を使用して記録した。ＣＵＳＵＭと呼ばれるコンピューターソフトウェアプログラムを用いて取得したデータをざっと調べ、ユーザーによる閾値インプットに基づいて事象を検出した。査定における主観性の任意の影響は、可能な限り多くの事象を検出することおよびその後の具体的な目的のためにフィルタリングすることによって最小限にした。

【０４７１】

初期実験を、膜のシス側面へ添加されたタグにより実行した。２００ｍＶの電気的なバイアスを標識溶液へ適用し、Ａｘｏｐａｔｃｈ　２００Ｂ増幅器およびＣＵＳＵＭソフトウェアを使用して、電流遮断をモニターした。

【０４７２】

もしポアサイズが流路を制限しなければ、小分子はナノポアを介してかなり速く進めることは公知である。速い事象の電流遮断は、システムの限定的な帯域幅に起因して変形させることができる。より速い分子は、特定のシステムによってでさえも完全に検出できない。

【０４７３】

本研究において、大きな基の修飾物質により標識された大きなポリマーおよび分子のみが検出された。検出可能な事象の実験条件および数を表３中で示す。

【表３】

ポリマー	Ccone（ｎＭ）	バックグラウンド電解質	電解質濃度（M）	ｐＨ	膜の厚み(nm)	ナノポア直径（nm）	検出電圧(mV)	CUSUMによって検出された事象
50bpのdsDNA対照	60	LiCl	3.6	8.0	10	3.9	200	414
DBCO骨格	96	LiCl	3.6	8.0	10	3.9	200	594
dsDNaスター	20	LiCl	3.6	8.0	10	3.9	200	5589
PAMAM(世代6)-スクシンアミド酸	100	KCl	1.0	1.0	10	7.80	100	264
							150	1122
							200	1322

【０４７４】

これらのデータから、ＤＮＡデンドリマー、ポリマー、およびＰＡＭＡＭデンドリマーを

、検出標識として固相ナノポアセンサーのために使用できることが確認される。
【０４７５】
（実施例２３）
生体分子のナノポアによる区別
この実施例において、ナノポアを使用して、生体分子（例えばｄｓＤＮＡスター、ＤＢＣＯ修飾ｄｓＤＮＡ、および通常のｄｓＤＮＡ）を区別した。この方法論は、異なる標識タイプを使用するマルチプレックス化のために使用することができる。
【０４７６】
この実施例は、一本鎖オリゴヌクレオチドが共有結合で連結されて中央（ｂｐ番号２５）中で分岐点を含有する５０ｂｐのオリゴヌクレオチド（ＤＮＡ－スター）；中央（塩基番号２５）中でジベンジルシクロオクチン（ＤＢＣＯ）修飾を含有する二本鎖の５０ｂｐのオリゴヌクレオチド；および５’チオール修飾二本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドを用いた。
【０４７７】
これらの様々な修飾されたＤＮＡ分子を、３．６ＭのＬｉＣｌバッファー中で３つの異なるＳｉＮｘナノポアを使用して分析した。ＤＮＡ－スター分子を４．０ｎｍの直径のポアにより分析し；ＤＢＣＯ修飾ＤＮＡを３．７ｎｍの直径のポアにより分析し；チオール修飾ＤＮＡを４．２ｎｍの直径のポアにより分析した。ナノポアが３つの異なる生体分子を区別する能力を示すために、電流遮断レベル（ｐＡ）をナノポア継続時間（μｓｅｃ）に対してプロットした。集団レベルで、スキャッタープロットにおける特徴的パターンの差によって実証されるように、３つの異なる標識は識別可能であると思われる（図２４Ａ～２４Ｃ）。個々の事象の同定には、リアルタイムでシグナルとノイズを識別する手法として、追加レベルの遮断レベルおよび時間情報が要求される。異なるナノポア標識を区別する能力は、様々なアッセイにおけるマルチプレックス化のためにナノポアを用いることができることを実証する。
【０４７８】
（実施例２４）
定性分析
以下の実施例は、定性アッセイを遂行するための方法を記載する。基本的に、この実施例において、コンストラクトを使用して、ＤＭＦチップ上のアッセイの原理を実証した。コンストラクトを切断し標識を放出させ、次いでそれがナノポアを移動するにつれてシグナルを生成するのでナノポアを使用してカウントし、したがって２つの特異的な結合メンバーペア（ストレプトアビジンおよびビオチン）の結合が指摘され、そこで、ｄｓＤＮＡ標識のこの切断および後続のカウントはアッセイの間に発生した特異的な結合に相関していた。さらに、適切な対照実験を遂行して、ナノポア移動測定の間にカウントされた標識から生成されるシグナルは、アッセイプロセスの間に発生した特異的な結合事象のためであり、アッセイプロセス流の中へ導入されているチオール切断試薬の存在に相関するのではないことを確認した。遂行された実験の詳細は以下の通りである。
【０４７９】
チオール媒介性切断を使用するＤＭＦ
切断可能なジスルフィド結合を含有するビオチン標識二本鎖ＤＮＡ（実施例１７の（６））を、ナノポア検出／カウントのための標的として使用した。結合アッセイは、ＤＭＦチップ上のストレプトアビジン磁性マイクロ粒子へのビオチンＤＮＡの結合、続いて、チオール媒介性化学切断ステップからなっていた（図２５を参照）。ＤＭＦチップ上の試薬の設置を図２７中で示す。切断されたＤＮＡ標的（ストレプトアビジン磁性粒子へ結合されている種から分離された）を、制御された誘電破壊によって生じたあらかじめ開けられたナノポアを備えた固相窒化ケイ素（SiN_x）膜を含有するナノポア流体セルへ転送した（Ｈ．Ｋｗｏｋ，ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ，９（３），２０１４）。ＤＮＡ標的材料をカウントし、オープンソースのＣＵＳＵＭソフトウェア解析パッケージ（ＮＩＳＴ）を使用して分析した。
【０４８０】

適切な試薬を、８つの試薬リザーバーを含有するガラスＤＭＦチップ（３インチ×２インチ×０．０２７６インチ）上にロードした。廃液リザーバー以外の各々のリザーバーは、およそ５μＬの各々の試薬を含有した。試薬の濃度は以下の通りであった。ＰＢＳ（ｐＨ＝７．２）中の１１μＭのビオチン－ＳＳ－ＤＮＡ；１０ｍｇ／ｍＬ（ｗ／ｖ）のＭ－２７０（２．７μｍ）のストレプトアビジンコーティング磁性マイクロ粒子（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）；ＰＢＳ洗浄バッファー（ｐＨ＝７．２）＋０．０５％のＥＴＫＴ（エチレンテトラ－ＫＩＳ（エトキシレート－ブロック－プロポキシレート）テトロ）、５０ｍＭのトリス－（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）。分注されたＤＭＦ小滴のおよそのサイズは１．５μＬであった。

【０４８１】

Ｍ－２７０ストレプトアビジンコーティングマイクロ粒子の１つの小滴を分注し、ｄｓＮＰ－３１－ＳＳビオチンの１つの小滴とおよそ４０分間混合した。２つの小滴を組み合わせることによって混合を達成し、１２の電極（３×４）の上ににわたるＤＭＦチップ上で円形パターンで動かした。底部磁石を係合してマイクロ粒子を収集し、上清を廃液リザーバーへ動かした。次に、ＰＢＳ／ＥＴＫＴのバッファーの２つの小滴を分注し、マイクロ粒子スラグへ動かし、次いでそれを溶液中で再懸濁した。磁石が再び係合される前に懸濁物を５分間混合し、上清を廃液リザーバーへ除去した。４５分間まで混合時間を徐々に増加しながら、粒子洗浄ステップを合計１１回繰り返した。最後の洗浄上清を空リザーバーへ動かした。ＰＢＳ／ＥＴＫＴの追加の５つの小滴を同じリザーバーへ動かした。ナノポア分析のための調製において、リザーバー中の洗浄物およびＰＢＳ／ＥＴＫＴを、３４－ＡＷＧの非金属シリンジ（Ｍｉｃｒｏｆｉｌ　３４－ＡＷＧ）を使用して除去し、１．５ｍＬのエッペンドルフチューブへ移した。マイクロ粒子スラグへＴＣＥＰ試薬の２つの小滴を動かすことおよび４５分間混合することによって、切断を開始した。底部磁石を係合し、上清（切断されたＤＮＡを含有する）を空リザーバーへ動かした。ＰＢＳ／ＥＴＫＴの洗浄バッファーの追加の５つの小滴を同じリザーバーへ動かした。ナノポア分析のための調製において、最終抽出物を、３４ゲージの非金属シリンジを使用してＤＭＦチップから除去し、１．５ｍＬのエッペンドルフチューブへ移した。切断溶出液を３０秒間微量遠心し、１分間磁性ラック中に設置して、任意の微量のマイクロ粒子を除去した。

【０４８２】

ナノポア分析

ＴＥＭウィンドウ（０．０５μｍ×０．０５μｍ）中に包埋した１０ｎｍ厚のＳｉＮ$_X$膜（Ｎｏｒｃａｄａ　ＮＴ００５２、低応力ＳｉＮ$_X$）の制御された誘電破壊（ＣＢＤ）を使用して、ナノポア製作を達成した。この方法は、高精度で最小の費用の小直径の固相ポアを産生することができる。ＴＥＭ－ＳｉＮｘ膜を２つのバッファーチャンバーを含有するポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ）流体セル中に設置し、２つのシリコンエラストマーガスケットを使用してシールした。流体セルはセルの底部において１６μＬの体積のチャンネルを含有し、それは上方チャンバー中の塩溶液をナノポア膜へ接続させた。ナノポア製作のために、流体セルを脱気したエタノールにより最初に充填し、脱気した脱イオン水により交換し、次いで、１８ＭΩ脱イオン水中の重炭酸ナトリウムによりｐＨ１０へ緩衝された脱気した０．５ＭのＫＣｌにより充填した。８Ｖのバイアス電圧を使用する増幅器を使用して、製作を実行した。流体セルの２つの側面を、銀／塩化銀ワイヤーを使用して接続した。Ｋｗｏｋ　ｅｔ　ａｌ中で記載されるように、８Ｖの固定した電圧を設定している間、電流はリアルタイムでの静電容量（電流の低減）を示す。電流が増加する場合に、電力をセルから除去する。製作のためのサンプリングレート＝２５ｋＨｚであった。漏洩電流の増加はポアの形成を指摘し、それによって電圧をオフした。ポア直径を、以下のコンダクタンスベースの方程式

【０４８３】

【数３】

$$G=\sigma\left(\frac{4L}{\pi d^2}+\frac{1}{d}\right)^{-1}$$

（式中、Ｇ＝コンダクタンス、σ＝バルク伝導率（ＫＣｌについて１２．３５Ｓ／ｍと測定された）、Ｌ＝膜の厚み（１０ｎｍ）、ｄ＝ポア直径（Ｓ．Ｋｏｗａｌｃｚｙｋ，Ａ．Ｇｒｏｓｂｅｒｇ，Ｙ．Ｒａｂｉｎ，Ｃ．Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎａｎｏｔｅｃｈ．，２２，２０１１））から決定した。ナノポアを、Ｉ－Ｖカーブの生成によってオーム性挙動についてチェックした。ナノポアの測定された直径は４．４ｎｍであると決定され、続いて、切断されたｄｓ－ＳＳ－ＤＮＡ標的の検出のために使用された。

【０４８４】

製作のための塩バッファーを、３．６ＭのＬｉＣｌ（移動事象の検出のためにセンシングバッファーとして使用される）と置き換えた。ヘッドステージを、Ａｘｏｐａｔｃｈ ２００Ｂ増幅器とナノポア膜を収容する流体セルへの銀／塩化銀接続との間に設置した。

【０４８５】

およそ０．２μＬのＴＣＥＰ切断ｄｓ－ＤＮＡ標的を１．８μＬのＰＢＳバッファーにより希釈し（これはＴＣＥＰ切断溶出液の１０倍希釈を表わす）、全体積を、ナノポアセルチャンバー（それはおよそ３０μＬの３．６ＭのＬｉＣｌ塩溶液を含有した）の中へロードし、混合した。最後のＤＭＦ洗浄物溶出液を、陰性切断対照（これは希釈されなかった）として使用した。ＤＮＡ移動の数を、ＴＣＥＰ溶出液および陰性対照についてそれぞれ２３および６５分間測定し、流動速度（秒$^{-1}$）に変換した。図２８中で描写された結果は、ｄｓ－ＳＳ－ＤＮＡ標的が、ＤＭＦを使用してＭ－２７０ストレプトアビジン粒子から成功して切断され、検出器として固相ナノポアを使用して検出されたことを実証する。ナノポア流動速度から測定されるように、ＳＮＲは２１．９であると決定された。

【０４８６】

データ分析

移動事象の数は、方程式

【数４】

$$\Delta G=\frac{\sigma\pi d_{DNA}^2}{4L}\quad(S1)$$

を使用して、実験試験条件下の二本鎖ＤＮＡ移動事象において見出される予想された電流変化を最初に計算することによって、決定し、この方程式は、Ｋｗｏｋ ｅｔ ａｌ．、「Ｎａｎｏｐｏｒｅ Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ ｂｙ ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｉｅｌｅｃｔｒｉｃ Ｂｒｅａｋｄｏｗｎ」Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｓｅｃｔｉｏｎ ８およびＫｗｏｋ，Ｈ．；Ｂｒｉｇｇｓ，Ｋ．；ａｎｄ Ｔａｂａｒｄ－Ｃｏｓｓａ，Ｖ．；「Ｎａｎｏｐｏｒｅ Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ ｂｙ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｉｅｌｅｃｔｒｉｃ Ｂｒｅａｋｄｏｗｎ」－ＰＬｏＳ ＯＮＥ ９（３）：ｅ９２８８０（２０１４）中で参照される通りである。この予想された電流遮断値を使用して、実験的ナノポアアウトプットのバイナリーファイルデータを、許容される予想された電流遮断事象について視覚的に手動でスキャンした。これらの事象を使用して、ＣＵＳＵＭナノポアソフトウェアのために要求される閾値およびヒステリシスパラメーターを適用および履行した。このソフトウェアからのアウトプットを、ｃｕｓｕｍｔｏｏｌｓ ｒｅａｄｅｖｅｎｔｓ．ｐｙソフトウェアを使用し、１０００ｐＡより大きい遮断事象（第１の計算から決定されるように）をフィルタリングして、更に分析した。流動事象、事象の間の時間、および他の計算を、ｒｅａｄｅｖｅｎｔｓ．ｐｙ分析ツールから決定した。追

加の計算を、ＪＭＰソフトウェア（ＳＡＳ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、Ｃａｒｙ、Ｎｏｒｔｈ Ｃａｒｏｌｉｎａ）を使用して、ＣＵＳＵＭ生成データに対して行った。閾値設定のこの方法が、データ分析および閾値の設定への１つのアプローチであり、本発明はこの方法に限定されず、当業者に公知であるような他のかかる方法も使用できることが理解される。

【０４８７】

要約

この実施例は、本明細書において記載されるようなステップのプロセスの遂行による定性アッセイを記載する。図２５中で示され、実施例１７中で記載されるように、チオールベースの切断ステップにより、切断可能なリンカーコンジュゲートを使用して、直接分析を遂行した。本明細書において記載されるような様々なタグのカウントを可能にするように、かかるアッセイの遂行への他の切断可能なリンカーアプローチは、リンカーの切断の様々な他の方法も包含し得るが、これらに限定されないことが理解される。例えば、実施例１７中で記載される方法に加えて他のかかる代替の切断方法および／または試薬は、実施例１６、実施例１８、実施例１９、実施例２０および実施例２１中で記載されるものに加えて、本明細書において記載されるおよび当業者に公知の他の切断方法を包含することができる。この実施例（実施例２４）において実証されたアッセイフォーマットが、直接分析を表わしている一方で、他のフォーマット（サンドイッチ免疫アッセイフォーマットおよび／または様々な競合アッセイフォーマット等、当業者に公知のもの等）は、記載される方法を使用して、アッセイを実装、また遂行することができることも理解される。

【０４８８】

例えば、ＴＳＨ（甲状腺刺激ホルモン）の検出のためのサンドイッチ免疫アッセイフォーマットは、実施例９中で記載されるように、低費用のＤＭＦチップ上でかかるアッセイを遂行する能力を実証した。加えて、切断可能なリンカーを有する免疫コンジュゲートまたは他の活性のある特異的な結合メンバーの生成のために有用な多くの様々なバイオコンジュゲーション試薬は、様々なヘテロ二官能性の切断可能なリンカー（実施例１、実施例２、実施例３、実施例４、実施例５および実施例６中で記載されるもの等）に加えて、それ以外に当業者に公知の他の切断可能なリンカーを使用して、合成することができる。本発明の実践のために有用な免疫コンジュゲートは、実施例３、実施例４、実施例５および実施例６中で記載されるもの等の方法に加えて、当業者に公知の方法によって、合成することができる。加えて、実施例８は、様々なアッセイフォーマット（サンドイッチおよび競合アッセイのフォーマットが含まれ、それらに加えて、当業者に公知の他のその変形）を実行するのに必要とされる様々なステップを促進することができる、低費用のチップ上での様々な流体小滴操作の機能性を示す。実施例１１は、アッセイにおける切断可能な標識をカウントするのに使用できるナノポアの製作を示すが、当業者に公知のナノポア製作のための他の方法を、この目的のために使用できることが理解される。実施例１６もアッセイの遂行のために有用な別のコンストラクトを表わし、そこでは、切断が達成され、したがって、この実施例内で記載されるようなナノポアカウント方法を使用してカウント可能であるように、放出されているカウント可能な標識を導く。

【０４８９】

実施例２２は、カウントが、一般的にはどのようにナノポアを横断する様々な標識の存在に関係する移動事象を測定できるように達成するのかを示す。図２９は、カウントアッセイにおけるデータの質を操作できるようにシグナルを閾値化する概念を示す。図２８は、この実施例内で記載されるようなかかるアッセイ方法を使用して検体の存在を決定するのに使用できるタイプのデータの代表である定性アッセイデータを示す。ｄｓＤＮＡはこの特定の実施例において標識として使用されたが、他の標識（実施例５および／または実施例２２中で記載される標識等）を利用することができ、ナノビーズおよびデンドリマーおよび同種のものが含まれるが、これらに限定されないことも理解される。適切な試薬を生成するのに必要なコンストラクトは、本出願の様々な実施例を介して、またはそうでなければ当業者に公知の方法によって合成することができる。

【０４９０】

（実施例２５）

定量分析

以下の実施例は、定量アッセイを遂行するための方法を記載する。基本的に、この実施例において、および実施例２４の延長として、カウント標識の増加量（この事例においてｄｓＤＮＡ分子であるカウント可能な標識）が、スタンダードカーブ上で、アッセイ（結合）ステップにおいて、結合されていた特異的な結合剤の量に相関する（それは、そしてもとのサンプル中に存在する検体の量に相関する）ことを実証するように、スタンダードカーブを生成した。この特定の実験のためのスタンダードカーブは、データ分析の様々な異なる方法に基づいた図３１、図３２、図３４、またはスタンダードカーブを生成するのに流動に依存する図３４中で見出すことができる。後者の事例において、図３４中で示される測定法は事象／時間（カウントの流動の事象）に基づいていたが、与えられたサンプル中で測定される検体濃度の量に相関するスタンダードカーブを生成するのに他の測定法を使用できることは理解される。遂行された実験の詳細は以下の通りである。

【０４９１】

ナノポアの製作

この方法は高精度で最小の費用の小直径の固相ポアを産生することができるので、ＴＥＭウィンドウ（０．０５μｍ×０．０５μｍ）中に包埋した１０ｎｍ厚のＳｉＮχ膜（Ｎｏｒｃａｄａ　ＮＴ００５２、低応力ＳｉＮχ）の制御された誘電破壊（ＣＢＤ）を使用して、ナノポア製作を達成した。ＴＥＭ－ＳｉＮｘ膜を２つのバッファーチャンバーを含有するポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ）流体セル中に設置し、２つのシリコンエラストマーガスケットを使用してシールした。流体セルはセルの底部において１６μＬの体積のチャンネルを含有し、それは上方チャンバー中の塩溶液をナノポア膜へ接続させた。ナノポア製作のために、流体セルを脱気したエタノールにより最初に充填し、脱気した脱イオン水により交換し、次いで、１８ＭΩ脱イオン水中の重炭酸ナトリウムによりｐＨ１０へ緩衝された脱気した０．５ＭのＫＣｌにより充填した。８Ｖのバイアス電圧を使用して増幅器を使用して、製作を実行した。流体セルの２つの側面を、銀／塩化銀ワイヤーを使用して接続した。Ｋｗｏｋ　ｅｔ　ａｌ中で記載されるように、８Ｖの固定した電圧を設定している間、電流はリアルタイムでの静電容量（電流の低減）を示す。電流が増加する場合に、電力をセルから除去する。製作のためのサンプリングレートは２５ｋＨｚであった。漏洩電流の急激な増加はポアの形成を指摘し、それによって電圧をオフした。０．５ＭのＫＣｌバッファーを３．６ＭのＬｉＣｌ（ｐＨ＝８．３）と置き換えた。

【０４９２】

ポア直径を、以下のコンダクタンスベースの方程式

【数５】

$$G = \sigma\left(\frac{4L}{\pi d^2} + \frac{1}{d}\right)^{-1}$$

（式中、Ｇ＝コンダクタンス、σ＝バルク伝導率（ＬｉＣｌについて１６．０６Ｓ／ｍと測定された）、Ｌ＝膜の厚み（１０ｎｍ）、およびｄ＝ポア直径（Ｓ．Ｋｏｗａｌｃｚｙｋ，Ａ．Ｇｒｏｓｂｅｒｇ，Ｙ．Ｒａｂｉｎ，Ｃ．Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎａｎｏｔｅｃｈ．，２２，２０１１））から決定した。ナノポアを、Ｉ－Ｖカーブの生成によってオーム性挙動についてチェックした。ナノポアの測定された直径は４．８ｎｍであると決定され、続いて、ＤＮＡキャリブレーションスタンダードの検出のために使用された。

【０４９３】

ＤＮＡの用量－応答

ＤＮＡスタンダードをキャリブレーターとして使用して、ＤＮＡの濃度の増加にともなうナノポア流動速度の変化の決定によって、用量－応答カーブを観察した。これによりスタンダードカーブが生成され、それは免疫アッセイにおいて切断されたＤＮＡ標識の定量のために使用することができる。２μｌの１．５ＭのＤＮＡスタンダード（

ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、３３０μｌの．６ＭのＬｉＣｌ塩溶液を含有するＰＴＦＥ流体セルの中へピペットで移して、９４ｎＭのＤＮＡの最終濃度を得た。ナノポア分析の前に、溶液を数回を上下にピペッティングすることによって、試薬を混合した。セルを＋２００ｍＶのＤＣのバイアスにさらし、６０分間にわたって電流遮断についてモニターした。ＣＵＳＵＭ解析ソフトウェアを使用して、電気信号およびカウント率を特徴づけた。この手順を２回反復して、スタンダードカーブ上で２つの追加の点（１８２ｎＭおよび２６６ｎＭ）を得た。異なる時間的な期間にわたる電流遮断がすべての３つのスタンダードについて示され、それらは９４ｎＭについて４１秒（図３０Ａ）；１８２ｎＭについて２４秒（図３０Ｂ）；２６６ｎＭについて８秒（図３０Ｃ）であった。ベースラインノイズは、図３０Ａ、図３０Ｂおよび図３０Ｃについて、それぞれおよそ９００ｐＡ、９００ｐＡおよび１，０００ｐＡであると経験的に推測された。

【０４９４】

ランからのデータを使用して３つの異なるタイプの用量－応答カーブを生成し、それらは、固定された量の時間（５分間）にわたる事象の数（図３１）；固定された数の事象（２００事象）について要求される時間（図３２）；および単位時間あたりの事象（図３３）である。各々のこれらのカーブは、標識としてＤＮＡを使用するスタンダードカーブとして、定量的ナノポアベースの免疫アッセイのために使用することができる。同様に、他の標識（デンドリマー、ポリマー、ナノ粒子、および同種のもの等）を使用して様々な検体を定量することができる。

【０４９５】

<u>Ｓｅｑ３１－ＳＳ－ビオチンＤＮＡの用量－応答</u>

合成のＤＮＡコンストラクト（Ｓｅｑ３１－ＳＳ－ビオチン）を原材料として使用して、用量－応答カーブを生成した（図４７）。この標的を使用して切断された標識ＮＰ－Ｓｅｑ３１－ＳＳ－ビオチン（それは定性アッセイにおいてストレプトアビジンビーズから切断される）を定量することができる。この材料は、切断された標識Ｓｅｑ３１－ＳＳ－ビオチンとおよそ同じＭＷおよび電荷密度を有するので、これをキャリブレーションカーブにおいて使用して、ストレプトアビジンマイクロ粒子から、ＴＣＥＰおよび／またはＤＴＴを使用して切断された標的を定量することができる。

【０４９６】

<u>データ分析</u>

移動事象の数は、方程式

【数６】

$$\Delta G = \frac{\sigma \pi d_{DNA}^2}{4L} \quad (S1)$$

を使用して、実験試験条件下の二本鎖ＤＮＡ移動事象において見出される予想された電流変化を最初に計算することによって、決定し、この方程式は、Ｋｗｏｋ ｅｔ ａｌ．、「Ｎａｎｏｐｏｒｅ Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ ｂｙ ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｉｅｌｅｃｔｒｉｃ Ｂｒｅａｋｄｏｗｎ」Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｓｅｃｔｉｏｎ ８およびＫｗｏｋ，Ｈ．；Ｂｒｉｇｇｓ，Ｋ．；ａｎｄ Ｔａｂａｒｄ－Ｃｏｓｓａ，Ｖ．；「Ｎａｎｏｐｏｒｅ Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ ｂｙ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｉｅｌｅｃｔｒｉｃ Ｂｒｅａｋｄｏｗｎ」－ＰＬｏＳ ＯＮＥ ９（３）：ｅ９２８８０（２０１４）中で参照される通りである。この予想された電流遮断値を使用して、実験的ナノポアアウトプットのバイナリーファイルデータを、許容される予想された電流遮断事象について視覚的に手動でスキャンした。これらの事象を使用して、ＣＵＳＵＭナノポアソフトウェアのために要求される閾値およびヒステリシスパラメーターを適用

および履行した。このソフトウェアからのアウトプットを、ｃｕｓｕｍｔｏｏｌｓ ｒｅａｄｅｖｅｎｔｓ．ｐｙソフトウェアを使用し、１０００ｐＡより大きい遮断事象（第１の計算から決定されるように）をフィルタリングして、更に分析した。流動事象、事象の間の時間、および他の計算を、ｒｅａｄｅｖｅｎｔｓ．ｐｙ分析ツールから決定した。追加の計算を、ＪＭＰソフトウェア（ＳＡＳ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、Ｃａｒｙ、Ｎｏｒｔｈ Ｃａｒｏｌｉｎａ）を使用して、ＣＵＳＵＭ生成データに対して行った。閾値設定のこの方法が、データ分析への１つのアプローチであり、本発明はこの方法に限定されないが、当業者に公知であるような他のかかる方法も使用できることが理解される。

【０４９７】

要約

この実施例は、本明細書において記載されるようなステップのプロセスの遂行による定量アッセイを記載する。図２５中で示され、実施例１７中で記載されるように、チオールベースの切断ステップにより、切断可能なリンカーコンジュゲートを使用して、直接分析を遂行した。本明細書において記載されるような様々なタグをナノポアを使用してカウントすることを可能にするように、かかるアッセイの遂行への他の切断可能なリンカーアプローチは、リンカーの切断の様々な他の方法も包含し得るが、これらに限定されないことが理解される。例えば、実施例１７中で記載される方法に加えて他のかかる切断方法は、実施例１８、実施例１９、実施例２０および実施例２１中で記載されるものに加えて、本明細書において記載されるおよび当業者に公知の他の方法を包含することができるが、これらに限定されない。この実施例（実施例２５）において実証されたアッセイフォーマットが、直接分析を表わしている一方で、他のフォーマット（サンドイッチ免疫アッセイフォーマットおよび／または様々な競合アッセイフォーマット等、当業者に公知のもの等）は、アッセイを実装、また遂行することができることも理解される。

【０４９８】

例えば、ＴＳＨ（甲状腺刺激ホルモン）の検出のためのサンドイッチ免疫アッセイフォーマットは、実施例９中で記載されるように、低費用のＤＭＦチップ上でかかるアッセイを遂行する能力を実証した。加えて、切断可能なリンカーを有する免疫コンジュゲートまたは他の活性のある特異的な結合メンバーの生成のために有用な多くの様々なバイオコンジュゲーション試薬は、方法（実施例１、実施例２、実施例３、実施例４、実施例５および実施例６中で記載されるもの等）によって合成された様々なヘテロ二官能性の切断可能なリンカーおよびコンジュゲートに加えて、当業者に公知の方法によって合成することができる他の切断可能なリンカーまたはコンジュゲートを使用して、当業者によって合成することができる。加えて、実施例８は、様々なアッセイフォーマット（サンドイッチおよび競合アッセイのフォーマットが含まれ、それらに加えて、当業者に公知の他のその変形）を実行するのに必要とされる様々なステップを促進することができる、低費用のチップ上での様々な流体小滴操作の機能性を示す。実施例１６もアッセイの遂行のために有用な別のコンストラクトを表わし、そこでは、切断が達成され、したがって、この実施例内で記載されるようなナノポアカウント方法を使用してカウント可能であるように、放出されているカウント可能な標識を導く。

【０４９９】

実施例２２は、カウントが、一般的にはどのようにナノポアを横断する標識の存在に関係する移動事象を測定できるようにするのかを示す。図２９は、カウントアッセイにおけるデータの質を操作できるようにシグナルを閾値化する概念を示す。図３１、３２および３３は、この実施例内で記載されるようなかかるアッセイ方法を使用して検体の量を決定するのに使用できるタイプのデータの代表である定量アッセイデータアウトプットを示す。図３４は、化学的方法を使用して切断されたコンストラクトから生成されたスタンダードカーブを示す。ｄｓＤＮＡはこの特定の実施例において標識として使用されたが、他の標識（実施例５中で記載される標識等）を利用することができ、ナノビーズおよびデンドリマーおよび同種のものが含まれるが、これらに限定されないことも理解される。かかるコンストラクトは当業者に公知の方法によって合成することができる。

【０５００】
（実施例２６）
ナノポア電界シミュレーション
ＣＯＭＳＯＬシミュレーションランのシリーズを、シリコンモジュールにおいて使用される提案されたナノポア膜デザイン上で実行して、理論上の１０ｎｍの直径ナノポアを介するカウンターイオン濃度および電気浸透流速度に対するSiO_2ビアのサイズの影響を研究した。SiO_2の上部層は複数の目的を果たし、それらは、１）SiN_X膜に絶縁する層を提供し、それによって、ナノポアの容量性ノイズを低減すること；２）シリコン基板内のSiN_X膜の堅牢性および強度を増加すること；３）溶液へ曝露されるSiN_X領域のサイズを減少させ、それによって、制御された誘電破壊（ＣＢＤ）プロセスからの膜上のポアの位置決めを改善することである。電界シミュレーションを使用して、ポアを介する局在化カウンターイオン濃度および電気浸透流に対するSiO_2層の干渉を決定した。
【０５０１】
図３５を参照して、シリコン基板（１）をエッチングして、SiN_X膜の上および下に位置するシスおよびトランスのチャンバーを得た。SiN_X膜（５０μｍ×５０μｍ）（２）は、３００μｍの厚みのSiO_2の底部層と３００μｍの厚みのSiO_2の上部層（３）との間の層であった。上部層はSiO_2ビア（４）を形成するように製作され、それはＣＢＤの間にナノポアの形成を可能した。SiO_2ビアの至適直径をシミュレーションによって決定した。
【０５０２】
ＣＯＭＳＯＬのシミュレーション結果
ＣＯＭＳＯＬ電界シミュレーションは、材料、静電気学、分子輸送、および層流特性に基づく物理的モデルを使用した。電位はポアソン方程式に基づき；イオン流動はネルンスト－プランク方程式に基づき；流体速度はストークス方程式に基づいていた。シミュレーションのために使用される物理的パラメーターは、図３６において示される表１中で定義される。
【０５０３】
ポアの近くのカウンターイオン濃度勾配についてのＣＯＭＳＯＬの結果を図３７中で示し、SiO_2ビアの直径が＞５０ｎｍの直径であった場合に、イオン濃度の影響がほとんどまたは全くないことを示す。５０ｎｍ未満で、ポアの口の近くの正味電荷の蓄積を生じた。最も重度の効果が２５ｎｍの直径で観察され、そこでは大きなイオン勾配がポアの近くに形成された。結果から、ナノポアがSiO_2壁から２５～５０ｎｍ未満離れていた場合に、SiO_2表面にかなり大きな影響あることが示された。
【０５０４】
ポアを介するカウンターイオンの電気浸透流速度は、ナノポアセンシングに対するSiO_2層が有し得る任意の影響を決定する手法として、シミュレートされた（図３８）。電気浸透流の最も高い速度はより大きなビア径（１００～４，５００ｎｍ）で発生した。５０ｎｍのSiO_2ビアについてポアを介する流速の低減、続いて、２５ｎｍのビアについて有意な低減が観察された。
【０５０５】
図３９中で示されるように、ポアを介するコンダクタンスの測定値ｖｓビア直径は１００ｎｍより上で飽和するカーブを示し、ビア直径が１００ｎｍから２５ｎｍへサイズが低減するにつれてコンダクタンスは低下した。
【０５０６】
（実施例２７）
デジタルマイクロ流体（ＤＭＦ）モジュールの中へのナノポアモジュールの集積
ナノポアモジュールはＤＭＦモジュールの１つの側面上に所在した。孔は、ポア生成および検体検出のためにＤＭＦモジュールからナノポアモジュールへの液体輸送を可能にするように、ＤＭＦモジュール中に存在した（例えば図４０を参照）。
【０５０７】

ナノポアモジュールからの１つの電極はナノポアモジュール中の流体体積内で終結した。他の電極はＤＭＦモジュール中の流体体積内で終結した。この電極はＤＭＦモジュール中の第２の孔を介してルーティングされた。液体がＤＭＦモジュール内の孔を介して動くことができたことを実証するために、液体が適所に動かされた後に、ペーパーの平らな片をチップの外表面にわたって押しつけた。この紙の濡れは、ＤＭＦモジュールからこの孔の上に所在する別のモジュールへ液体が毛細管力によって動くことができたことを示した（図４１）。

【０５０８】

図４２を参照して、ＤＭＦモジュールはナノポア製作の制御のためのＡｇ／ＡｇＣｌ電極を装備していた。このセットアップにおいて、ナノポアモジュール上での液体体積はＬｉＣｌのオープンエアの小滴であった。この液体をナノポアモジュールの上へ直接分注し、電極の末端をこの小滴内で吊るした。

【０５０９】

ＤＭＦ技術を使用して、サンプルをＤＭＦモジュール中の孔へ動かした。サンプルは孔を介して受動的に移動して、ナノポア生成のためのナノポアモジュールへ曝露されるようになった。ナノポアモジュールはＤＭＦモジュールへシールされ（例えば、ＰＤＭＳ、圧力、ワックスなどを使用して）、各々のモジュール内で保持される液体体積を単離する。図４５はナノポアの製作の間の時間の関数としての電流を示す。

【０５１０】

一旦ナノポアが生じたならば、条件付けプロセス（経時的に電圧を変動する）を使用して、ナノポアを物理的に修飾し、シグナルをクリーンにした。このプロセスはＩ－Ｖカーブにおける対称性を改善した。前後のＩ－Ｖカーブを、それぞれ図４６Ａおよび４６Ｂ中で示す。

【０５１１】

（実施例２８）

<u>カウントされる標識およびポアサイズの分析</u>

様々な条件のセット下で二本鎖ＤＮＡを使用して実験のセットを行って、ポアサイズおよびカウントされる標識サイズと比べて特定の属性があることを分析および実証した。これらの実験において、様々なパラメーターを調査し、それらには、検出電圧、ＤＮＡ長、ＤＮＡ濃度、塩濃度および塩組成、膜材料、膜厚、ナノポア直径、ならびに他の因子が含まれる。

【０５１２】

次いでデータセットをシグナル対ノイズ比と比べて分析し、カウントされる標識サイズ（推定される分子直径）と比べた様々なポアサイズに対して、その因子を比較した。他の因子は変動させたが、ある特定の因子（例えば膜材料および厚み等）はこの実験のセットにおいて一定に維持した。

【０５１３】

集合データセット分析から、比の平均は、実験において決定されたＳＮＲ（シグナル対ノイズ比）に対して、カウントされる標識平均直径とナノポアサイズとの間でプロットされた（図４７）。図４７は、一般的には、約０．４～０．８の間のかかる比（およそ約２．０ｎｍのｄｓＤＮＡの分子直径を想定する）からのこの特定のデータセットにおいて、かかる比の範囲から有用なカウントデータを得ることができることを実証する。直線状ｄｓＤＮＡはその分子直径くらいであることが文献から公知であり、この分析は直線状の立体配座でポアを介するＤＮＡスレッドを想定する。表４は計算データを示す。

【０５１４】

【表４】

平均のポアに対するポア標識分子直径の比	SNR
0.645	27.5
0.556	53.7
0.476	12
0.714	23.7
0.803	17
0.645	22.5
0.8	20.2
0.588	17
0.69	55
0.476	23.5

【０５１５】
条件を変動させたが、これまでにこの実施例において言及されるように、このデータセットにおける一般的な範囲は、この範囲内で合理的なシグナル対ノイズを備えたカウントデータを得ることができることを示す。さらに、当業者は、他のカウントされる標識分子直径対ナノポア直径の比を利用して、合理的なＳＮＲを達成できることを認識するだろうということが指摘されるべきである。加えて、一般的には、標識が、ポアを介して通過することができるようにナノポアのサイズ未満の分子直径の少なくとも１つの寸法を有するべきであること、または換言すれば、一般的には、標識分子直径対ナノポア直径のこの比は、標識がポアを介して通過することができるもの未満であるべきであることは、当業者によって認識されるであろうが、但し、条件が恐らく、ナノポア力分光法と呼ばれる技術（そこでは、エネルギーがシステムへ加えられて立体配座的変化が標識中で発生することを促進し、したがって、標識が、かかる移動事象が発生することを可能にするレベルへの変形の後に、ポアを介して通過することを可能にする）が使用されることが記載される事例等は除外される。
【０５１６】
この実施例中で記載されているようなｄｓＤＮＡ以外に、カウントのために他の標識を利用することができ、それらがこのグラフにおいて示されるものとは異なる挙動を有し得ることも、当業者に理解されるべきである。さらに、かかる標識の分子カウントを可能にする他の分子直径対ナノポアの比からも許容されるＳＮＲを得ることが可能であること、および電流遮断は、以下の方程式
【数７】

$$\Delta G = \frac{\sigma \pi d_{DNA}^2}{4L} \quad (S1)$$

中で記載されるように、カウントされる標識の分子直径に関係し得ることも理解すべきであり、この方程式は、以下の参照文献、Ｋｗｏｋ ｅｔ ａｌ．、「Ｎａｎｏｐｏｒｅ Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ ｂｙ ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｉｅｌｅｃｔｒｉｃ Ｂｒｅａｋｄｏｗｎ」Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｓｅｃｔｉｏｎ ８および／またはＫｗｏｋ，Ｈ．；Ｂｒｉｇｇｓ，Ｋ．；ａｎｄ Ｔａｂａｒｄ－Ｃｏｓｓａ，Ｖ．；「Ｎａｎｏｐｏｒｅ Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ ｂｙ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｉｅｌｅｃｔｒｉｃ Ｂｒｅａｋｄｏｗｎ」－ＰＬｏＳ ＯＮＥ ９（３）：ｅ９２８８０（２０１４）中で見出すことができる。この方程式は、本明細書中の実施例２４および２５において記載されているようなシグナルをゲートするためまたは閾値を決定するために

使用することができる。
【０５１７】
ナノポアカウント実験のこの合計のセット内で変動された特定の具体的な条件には、以下のものが含まれていた。
・イオン強度（３Ｍまたは３．６Ｍのいずれか）
・ＤＮＡ長（１０ｋｂｐ、５０ｂｐまたは１ｋｂｐ）
・使用されるイオン性塩（ＬｉＣｌまたはＫＣｌのいずれか）
・膜材料（ＳｉＮｘ、データセットを通して一定）
・膜の厚み（１０ｎｍ、データセットを通して一定）
・ＤＮＡ濃度（複数可）（３ｎＭ～約３０６ｎＭの間で変動）
・電圧（５０～６００ｍＶの間で増分を含んで変動）
・ナノポア直径（様々なポアサイズ、８．０、１．１、３．６、４．２、２．８、２．５、７．７、３．１、２．７、２．６、２．９および４．２が含まれる（すべてナノメートルで））。
【０５１８】
様々な条件が含まれるがこれらに限定されないものは、計算可能なこの実施例において参照されるＫｗｏｋ　ｅｔ　ａｌのこの方程式での量に従って電圧が適用される場合に、カウント可能な標識がポアの直径よりも小さいことで、ポアを横切るイオン電流の流動の遮断を引き起こし得る状況を得ることができるという結論を、引き出すことができる［Ｋｗｏｋ　ｅｔ　ａｌ．、「Ｎａｎｏｐｏｒｅ　Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ　ｂｙ　ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｄｉｅｌｅｃｔｒｉｃ　Ｂｒｅａｋｄｏｗｎ」Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　Ｓｅｃｔｉｏｎ　８および／またはＫｗｏｋ，Ｈ．；Ｂｒｉｇｇｓ，Ｋ．；ａｎｄ　Ｔａｂａｒｄ－Ｃｏｓｓａ，Ｖ．；「Ｎａｎｏｐｏｒｅ　Ｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ　ｂｙ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｄｉｅｌｅｃｔｒｉｃ　Ｂｒｅａｋｄｏｗｎ」－ＰＬｏＳ　ＯＮＥ　９（３）：ｅ９２８８０（２０１４）］。
【０５１９】
これらの条件を適用して、ｄｓＤＮＡ以外の他の標識（デンドリマー、ヘミデンドリマー、ナノビーズ、陰イオン性もしくは陽イオン性のポリマー、変性した線形化アプタマー、負もしくは正に荷電したポリペプチドまたは他の荷電したポリマー、またはカウント可能な分子実体、および同種のものが含まれるが、これらに限定されない）についての合理的なシグナル対ノイズにより機能する、カウントされる標識分子直径対ポア直径を示すことができることも理解される。
【０５２０】
最後に、本発明の様々な態様および特徴は、様々な実施形態および具体的な実施例に関して本明細書において記載したが、そのすべては従来通りに作製または実行することができ、本発明は添付の請求項の全範囲内での保護を得る権利を与えられることが理解されるはずである。
【０５２１】
前述の詳細な記載および付随する実施例は単に例示的であり、本発明の範囲に対する限定として見なすことはできず、もっぱら添付された請求項およびそれらの等価物によって定義されることが理解される。
【０５２２】
開示された実施形態への様々な変形および変更は当業者に明らかである。かかる変形および変更（本発明の使用のための化学構造、置換基、誘導体、中間体、合成、組成物、製剤、または方法に関係するものが含まれるがこれらに限定されない）は、その精神および範囲から逸脱せずに行うことができる。
【０５２３】
完全性の理由のために、本発明の様々な態様は以下の番号付けした条項において述べられる。
【０５２４】

条項１。生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法であって、（ａ）第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；（ｂ）第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがそれへ添付された切断可能なタグを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること；（ｃ）第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されない第２の結合メンバーを除去すること；（ｄ）第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されている第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｆ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法。

【０５２５】

条項２。前記層を介する各々のタグの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定が前記サンプル中に存在する検体の量を測定し、そこで前記サンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードである、条項１に記載の方法。

【０５２６】

条項３。サブセクションｉ）中の前記スタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中の前記スタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中の前記スタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、条項２に記載の方法。

【０５２７】

条項４。前記方法が単一分子のカウントを包含する、条項１～３のいずれか一項に記載の方法。

【０５２８】

条項５。前記タグが、陰イオン性ポリマー、陽イオン性ポリマー、デンドリマー、およびナノ粒子からなる群から選択される、条項１～４のいずれか一項に記載の方法。

【０５２９】

条項６。前記タグが実質的に球状または半球状である、条項１または５のいずれか一項に記載の方法。

【０５３０】

条項７。前記タグが実質的に球状であり、ナノ粒子を含む、条項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【０５３１】

条項８。前記タグが実質的に球状または半球状であり、デンドリマーを含む、条項１～７のいずれか一項に記載の方法。

【０５３２】

条項９。前記デンドリマーが正または負に荷電される、条項８に記載の方法。

【０５３３】

条項１０。前記ナノ粒子が正に荷電されたナノ粒子を含む、条項５または７のいずれか一項に記載の方法。

【０５３４】

条項１１。前記ナノ粒子が負に荷電されたナノ粒子を含む、条項１０に記載の方法。

【０５３５】

条項１２。前記第１の結合メンバーおよび前記第２の結合メンバーが抗体または受容体である、条項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【０５３６】
条項１３。前記第１の結合メンバーが受容体であり前記第２の結合メンバーが抗体であるか、または前記第１の結合メンバーは抗体であり前記第２の結合メンバーは受容体である、条項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【０５３７】
条項１４。前記第１の結合メンバーが第１の抗体であり、前記第２の結合メンバーが第２の抗体である、条項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【０５３８】
条項１５。前記タグが負に荷電され、前記移動が、前記層を横切って正電位を適用し、それによって、前記層を介して前記タグを移動させることを含む、条項１～１４のいずれか一項に記載の方法。
【０５３９】
条項１６。前記タグが正に荷電され、前記移動が、前記層を横切って負電位を適用し、それによって、前記層を介して前記タグを移動させることを含む、条項１～１４のいずれか一項に記載の方法。
【０５４０】
条項１７。少なくとも前記ステップ（ａ）～（ｄ）が、マイクロ流体デバイス、小滴ベースのマイクロ流体デバイス；デジタルマイクロ流体デバイス（ＤＭＦ）、弾性表面波ベースのマイクロ流体デバイス（ＳＡＷ）、完全集積ＤＭＦおよびナノポアデバイス、または完全集積ＳＡＷおよびナノポアデバイスにおいて実行される、条項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【０５４１】
条項１８。ＤＭＦ素子およびナノポア素子が、前記完全集積ＤＭＦおよびナノポアデバイスにおいて作動可能にカップリングされるか、またはＳＡＷ素子およびナノポア素子が前記完全集積ＳＡＷおよびナノポアデバイスにおいて作動可能にカップリングされる、条項１７に記載の方法。
【０５４２】
条項１９。前記ＤＭＦデバイスまたは前記ＳＡＷデバイスが、ロール・ツー・ロールベースのプリンテッドエレクトロニクス方法によって製作される、条項１７に記載の方法。
【０５４３】
条項２０。前記ＤＭＦ素子または前記ＳＡＷ素子が、ロール・ツー・ロールベースのプリンテッドエレクトロニクス方法によって製作される、条項１８に記載の方法。
【０５４４】
条項２１。前記完全集積ＤＭＦおよびナノポアデバイスまたは前記完全集積ＳＡＷおよびナノポアデバイスが、マイクロ流体導管を含む、条項１７に記載の方法。
【０５４５】
条項２２。前記マイクロ流体導管がＤＭＦ素子をナノポア素子へカップリングし、前記マイクロ流体導管が受動的な力または能動的な力によって誘導される流体流を含む、条項２１に記載の方法。
【０５４６】
条項２３。前記ナノポアが固体ナノポアまたは生体ナノポアである、条項１～２２のいずれか一項に記載の方法。
【０５４７】
条項２４。前記層を介して移動するタグの数の測定が、前記ナノポアと前記タグの相互作用によって誘導される電流の変化を観察することを含む、条項１～２３のいずれか一項に記載の方法。
【０５４８】
条項２５。前記電流変化が閾値より上の大きさを有する場合に、前記検体が前記サンプル

中に存在する、条項２４に記載の方法。
【０５４９】
条項２６。前記方法が、ステップ（ｄ）において得られた前記タグを含有する小滴をナノポアデバイスへ輸送し、そして小滴がナノポア層によって分割され、ナノポア層中に存在するナノポア（複数可）によって接続されるように、ナノポアデバイス中に存在するナノポア層を横切って小滴を設置することを更に含み、そこで前記タグがナノポア層の両側上の小滴中に存在する、条項２３に記載の方法。
【０５５０】
条項２７。前記方法が、前記ナノポア層の第１の側面上に存在する前記タグを前記ナノポアを横切って前記ナノポア層の第２の側面へ移動させ、それによって、ナノポア層の第２の側面上の前記分割された小滴中に前記タグを収集することを含む、条項２６に記載の方法。
【０５５１】
条項２８。前記タグを前記ナノポア層の前記第１の側面へ移動させ、前記小滴中に存在するタグの数を決定することを更に含む、条項２６に記載の方法。
【０５５２】
条項２９。前記タグが切断可能なリンカーを含む、条項１～２８のいずれか一項に記載の方法。
【０５５３】
条項３０。生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出する方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、第１の特異的な結合メンバーが固定化剤のためのリガンドを含み、第１の特異的な結合メンバーが対象となる検体を特異的に結合し、第２の特異的な結合メンバーが切断可能なタグを含み、第２の特異的な結合メンバーが対象となる検体を特異的に結合し、固体支持体／第１の特異的な結合メンバー／対象となる検体／第２の特異的な結合メンバーの複合体が形成されるところで、サンプルを固体支持体、第１の特異的な結合メンバーおよび第２の特異的な結合メンバーと接触させること；（ｂ）固体支持体／第１の特異的な結合メンバー／検体／第２の特異的な結合メンバーの複合体へ結合されない第２の特異的な結合メンバーを除去すること；（ｃ）固体支持体／第１の特異的な結合メンバー／対象となる検体／第２の特異的な結合メンバーの複合体中の第２の特異的な結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること；（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法。
【０５５４】
条項３１。生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法であって、（ａ）第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；（ｂ）第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがアプタマーを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること；（ｃ）固体基板へ結合されている検体へ結合されないアプタマーを除去すること；（ｄ）検体へ結合されているアプタマーを解離すること、（ｅ）解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｆ）層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含む、該方法。
【０５５５】
条項３２。前記層を介する各々のアプタマーの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定が前記サンプル中に存在する検体の量を測定し、そこで前記サンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対

照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードである、条項３１に記載の方法。

【０５５６】

条項３３。サブセクションｉ）中の前記スタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中の前記スタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中の前記スタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、条項３２に記載の方法。

【０５５７】

条項３４。前記方法が単一分子のカウントを包含する、条項３１～３３のいずれか一項に記載の方法。

【０５５８】

条項３５。前記アプタマーがＤＮＡアプタマーである、条項３１～３４のいずれか一項に記載の方法。

【０５５９】

条項３６。前記アプタマーがＲＮＡアプタマーである、条項３１～３４のいずれか一項に記載の方法。

【０５６０】

条項３７。前記第１の結合メンバーが抗体である、条項３１～３６のいずれか一項に記載の方法。

【０５６１】

条項３８。前記検体がリガンドであり、前記第１の結合メンバーが受容体である、条項３１～３６のいずれか一項に記載の方法。

【０５６２】

条項３９。少なくとも前記ステップ（ａ）～（ｄ）が、マイクロ流体デバイス、小滴ベースのマイクロ流体デバイス、デジタルマイクロ流体デバイス（ＤＭＦ）、弾性表面波ベースのマイクロ流体デバイス（ＳＡＷ）、完全集積ＤＭＦおよびナノポアデバイス、または完全集積ＳＡＷおよびナノポアデバイスにおいて実行される、条項３１～３８のいずれか一項に記載の方法。

【０５６３】

条項４０。ＤＭＦ素子およびナノポア素子が、前記完全集積ＤＭＦおよびナノポアデバイスにおいて作動可能にカップリングされるか、またはＳＡＷ素子およびナノポア素子が前記完全集積ＳＡＷおよびナノポアデバイスにおいて作動可能にカップリングされる、条項３９に記載の方法。

【０５６４】

条項４１。前記ＤＭＦデバイスまたは前記ＳＡＷデバイスが、ロール・ツー・ロールベースのプリンテッドエレクトロニクス方法によって製作される、条項３９に記載の方法。

【０５６５】

条項４２。前記ＤＭＦ素子または前記ＳＡＷ素子が、ロール・ツー・ロールベースのプリンテッドエレクトロニクス方法によって製作される、条項４０に記載の方法。

【０５６６】

条項４３。前記完全集積ＤＭＦおよびナノポアデバイスまたは前記完全集積ＳＡＷおよびナノポアデバイスが、マイクロ流体導管を含む、条項３９に記載の方法。

【０５６７】

条項４４。前記マイクロ流体導管がＤＭＦ素子をナノポア素子へカップリングし、前記マイクロ流体導管が受動的な力または能動的な力によって誘導される流体流を含む、条項４

３に記載の方法。
【０５６８】
条項４５。前記ナノポアが固体ナノポアまたは生体ナノポアである、条項３１～４４のいずれか一項に記載の方法。
【０５６９】
条項４６。集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって、電極のアレイを含む第１の基板；第１の基板から離れて置かれた第２の基板；および第１の基板と第２の基板との間に配置されたナノポア層を含み、そこで電極のアレイが小滴をナノポア層を横切って位置させるように構成され、その結果、小滴がナノポア層によって第１の部分および第２の部分へと分割され、電極のアレイのうちの少なくとも２つの電極がナノポア層を横切って位置し、２つの電極がアノードおよびカソードを形成し、そして液滴がナノポア層を横切って位置する場合にナノポア層中のナノポアを介する電流を駆動するように作動する、該デバイス。
【０５７０】
条項４７。前記ナノポア層が第１の基板および第２の基板へ添付される、条項４６に記載のデバイス。
【０５７１】
条項４８。前記ナノポア層が第１の基板または第２の基板へ添付される、条項４６に記載のデバイス。
【０５７２】
条項４９。前記電極が透明である、条項４６～４８のいずれか一項に記載のデバイス。
【０５７３】
条項５０。前記電極がグリッドパターンで配置される、条項４６～４９のいずれか一項に記載のデバイス。
【０５７４】
条項５１。前記ナノポア層を横切って位置する前記電極のアレイのうちの少なくとも２つの電極が、前記ナノポア層に接し、前記ナノポア層を横切って位置しない、条項４６～５０のいずれか一項に記載のデバイス。
【０５７５】
条項５２。前記電極が　　型である、条項４６～５１のいずれか一項に記載のデバイス。
【０５７６】
条項５３。前記電極のアレイが電力源による活性化のために構成され、そこで電力源が連続的な様式で電極を活性化する、条項４６～５１のいずれか一項に記載のデバイス。
【０５７７】
条項５４。連続的な様式が、１又は２以上の電極のオンまたはオフを含む、条項５３に記載のデバイス。
【０５７８】
条項５５。電力源による前記電極のアレイの前記活性化が、電力源を制御するプロセッサーによって実施される命令のセットによって制御される、条項５２～５４のいずれか一項に記載のデバイス。
【０５７９】
条項５６。集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって、電極のアレイを含む第１の基板；第１の基板から離れて置かれた第２の基板；および第１の基板と第２の基板との間に配置されたナノポア層を含み、そこで電極のアレイが小滴をナノポア層を横切って位置させるように構成され、その結果、ナノポア層が小滴を第１の部分および第２の部分へと分割し、電極のアレイのうちの少なくとも１つの電極がナノポア層を横切って位置する小滴の第１の部分と接触し、第２の基板中の電極がナノポア層を横切って位置する小滴の第２の部分に接触するように位置し、２つの電極がアノードおよびカソードを形成し、そして液滴がナノポア層を横切って位置する場合にナノポア層中のナノポアを介する電流を駆動するように作動する、該デバイス。

【０５８０】
条項５７。前記ナノポア層が第１の基板へ添付される、条項５６に記載のデバイス。
【０５８１】
条項５８。前記ナノポア層が第２の基板へ添付される、条項５６または５７のいずれか一項に記載のデバイス。
【０５８２】
条項５９。前記第１の基板および／または第２の基板が透明である、条項５６～５８のいずれか一項に記載のデバイス。
【０５８３】
条項６０。前記電極のアレイが透明である、条項５６～５９のいずれか一項に記載のデバイス。
【０５８４】
条項６１。条項４６～６０のいずれか一項に記載のデバイスを含むか、または条項１～４５のいずれか一項に記載の方法における使用のための、キット。
【０５８５】
条項６２。追加の試薬を更に含み、そこで少なくとも１つの試薬が、前記デバイスの前記ナノポア層を介する移動によって検出することができるタグを含む、条項６１のキット。
【０５８６】
条項６３。生物学的サンプル中に存在する検体を測定もしくは検出するための、または患者を診断もしくは血液供給をスクリーニングするための、条項４６～６０のいずれか一項に記載のデバイスを使用する方法または条項１～４５のいずれか一項に記載の方法。
【０５８７】
条項６４。少なくとも前記ステップ（ａ）～（ｄ）が、条項４６～６０のいずれか一項に記載のデバイスを使用して実行される、条項１～４５のいずれか一項に記載の方法。
【０５８８】
条項６５。患者を診断もしくは血液供給をスクリーニングする方法または生物学的サンプル中に存在する検体を測定もしくは検出するための方法における、条項４６～６０のいずれか一項に記載のデバイスの使用または条項１～４５のいずれか一項に記載の方法の使用。
【０５８９】
条項６６。生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法であって、（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）標識検体が切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを標識検体と接触させること；（ｃ）結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；（ｄ）結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること；（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｆ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法。
【０５９０】
条項６７。生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法であって、（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）標識検体がアプタマーを含むところで、サンプルを標識検体と接触させること；（ｃ）結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；（ｄ）標識検体へ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含む、該方法。
【０５９１】
条項６８。生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法であって、（ａ

）結合メンバーが検体へ特異的に結合し、結合メンバーが切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプルを固定化検体と接触させること；（ｃ）固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること；（ｄ）固定化検体へ結合されている結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｆ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法。

【０５９２】

条項６９。生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法であって、（ａ）結合メンバーが検体に特異的に結合し、結合メンバーがアプタマーを含むところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプルを固定化検体と接触させること；（ｃ）固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること；（ｄ）固定化検体へ結合されている結合メンバーへ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含む、該方法。

【０５９３】

条項７０。前記層を介する各々のタグの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定が前記サンプル中に存在する検体の量を測定し、そこで前記サンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードである、条項６６または６８のいずれか一項に記載の方法。

【０５９４】

条項７１。前記層を介する各々のアプタマーの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定が前記サンプル中に存在する検体の量を測定し、そこで前記サンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードである、条項６７または６９のいずれか一項に記載の方法。

【０５９５】

条項７２。サブセクションｉ）中の前記スタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中の前記スタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中の前記スタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、条項７０または７１のいずれか一項に記載の方法。

【０５９６】

条項７３。前記方法が単一分子のカウントを包含する、条項６６～７２のいずれか一項に記載の方法。

【０５９７】

条項７４。少なくとも前記ステップ（ａ）～（ｄ）が、条項４６～６０のいずれか一項に

記載のデバイスを使用して実行される、条項６６、６８、７０、７２、または７３のいずれか一項に記載の方法。

【０５９８】

条項７５。少なくとも前記ステップ（ａ）～（ｄ）が、条項４６～６０のいずれか一項に記載のデバイスを使用して実行される、条項６７、６９、７１、７２、または７３のいずれか一項に記載の方法。

【０５９９】

条項７６。前記タグが、陰イオン性ポリマー、陽イオン性ポリマー、デンドリマー、およびナノ粒子からなる群から選択される、条項６６、６８、７０、７２、７３、または７４のいずれか一項に記載の方法。

【０６００】

条項７７。前記タグが実質的に球状または半球状である、条項６６、６８、７０、７２、７３、または７４のいずれか一項に記載の方法。

【０６０１】

条項７８。前記タグが実質的に球状であり、ナノ粒子を含む、条項６６、６８、７０、７２、７３、または７４のいずれか一項に記載の方法。

【０６０２】

条項７９。前記タグが実質的に球状または半球状であり、デンドリマーを含む、条項６６、６８、７０、７２、７３、または７４のいずれか一項に記載の方法。

【０６０３】

条項８０。前記デンドリマーが正または負に荷電される、条項７９に記載の方法。

【０６０４】

条項８１。前記ナノ粒子が正に荷電されたナノ粒子を含む、条項７９に記載の方法。

【０６０５】

条項８２。前記ナノ粒子が負に荷電されたナノ粒子を含む、条項７６または７８のいずれか一項に記載の方法。

【０６０６】

条項８３。前記結合メンバーが抗体または受容体である、条項６６、６８、７０、７２、７３、７４、または７６～８２のいずれか一項に記載の方法。

【０６０７】

条項８４。前記タグが負に荷電され、前記移動が、前記層を横切って正電位を適用し、それによって、前記層を横切って前記タグを移動させることを含む、条項６６、６８、７０、７２、７３、７４、または７６～８３のいずれか一項に記載の方法。

【０６０８】

条項８５。前記タグが正に荷電され、前記移動が、前記層を横切って負電位を適用し、それによって、前記層を横切って前記タグを移動させることを含む、条項６６、６８、７０、７２、７３、７４、または７６～８４のいずれか一項に記載の方法。

【０６０９】

条項８６。前記層を介して移動するタグの数の測定が、前記ナノポア上の前記タグの電流遮断効果を観察することを含む、条項６６、６８、７０、７２、７３、７４、または７６～８５のいずれか一項の方法。

【０６１０】

条項８７。前記電流遮断効果が閾値より上である場合に、前記検体がサンプル中に存在する、条項８６に記載の方法。

【０６１１】

条項８８。前記アプタマーがＤＮＡアプタマーである、条項６７、６９、７１、７２、７３、または７５のいずれか一項に記載の方法。

【０６１２】

条項８９。前記アプタマーがＲＮＡアプタマーである、条項６７、６９、７１、７２、７３、または７５のいずれか一項に記載の方法。

【０６１３】
条項９０。前記結合メンバーが抗体である、条項６７、６９、７１、７２、７３、７５、８８、または８９のいずれか一項に記載の方法。
【０６１４】
条項９１。前記検体がリガンドであり、前記結合メンバーが受容体である、条項６７、６９、７１、７２、７３、７５、８８、または８９のいずれか一項に記載の方法。
【０６１５】
条項９２。前記方法が、前記タグを含有する小滴をナノポアデバイスへ輸送し、そして小滴がナノポア層によって分割され、ナノポア層中に存在するナノポア（複数可）によって接続されるように、ナノポアデバイス中に存在するナノポア層を横切って小滴を設置することを更に含み、そこで前記タグがナノポア層の両側上の小滴中に存在する、条項６７、６９、７１、７２、７３、７５、または８８～９１のいずれか一項に記載の方法。
【０６１６】
条項９３。前記方法が、前記ナノポア層の第１の側面上に存在する前記タグを前記ナノポアを横切って前記ナノポア層の第２の側面へ移動させ、それによって、ナノポア層の第２の側面上の前記分割された小滴中に前記タグを収集することを含む、条項９２に記載の方法。
【０６１７】
条項９４。前記タグを前記ナノポア層の前記第１の側面へ移動させ、前記小滴中に存在するタグの数を決定することを更に含む、条項９２に記載の方法。
【０６１８】
条項９５。前記方法が、前記アプタマーを含有する小滴をナノポアデバイスへ輸送し、そして小滴がナノポア層によって分割され、ナノポア層中に存在するナノポア（複数可）によって接続されるように、ナノポアデバイス中に存在するナノポア層を横切って小滴を設置することを更に含み、そこで前記アプタマーがナノポア層の両側上の小滴中に存在する、条項６７、６９、７１、７２、７３、７５、または８８～９４のいずれか一項に記載の方法。
【０６１９】
条項９６。前記方法が、前記ナノポア層の第１の側面上に存在する前記アプタマーを前記ナノポアを横切って前記ナノポア層の第２の側面へ移動させ、それによって、ナノポア層の第２の側面上の前記分割された小滴中に前記アプタマーを収集することを含む、条項９５に記載の方法。
【０６２０】
条項９７。前記アプタマーを前記ナノポア層の前記第１の側面へ移動させ、前記小滴中に存在するアプタマーの数を決定することを更に含む、条項９５に記載の方法。
【０６２１】
条項９８。前記ナノポアが固体ナノポアまたは生体ナノポアである、条項６６～９７のいずれか一項に記載の方法。
【０６２２】
条項９９。前記第２の結合メンバーがスペーサーを更に含む、条項１～４５または６３～９８のいずれか一項に記載の方法。
【０６２３】
条項１００。前記スペーサーが、ニトロベンジル基、ジチオエチルアミノ、６炭素のスペーサー、１２炭素のスペーサー、または３－（９－（（３－カルボキシプロピル）（トシル）カルバモイル）アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネートを含む、条項９９に記載の方法。
【０６２４】
条項１０１。前記スペーサーがニトロベンジル基を含み、前記タグがＤＮＡ分子である、条項１００に記載の方法。
【０６２５】

条項１０２。前記スペーサーがジチオエチルアミノであり、前記タグがカルボキシル化ナノ粒子である、条項１００に記載の方法。
【０６２６】
条項１０３。前記スペーサーが３－（９－（（３－カルボキシプロピル）（トシル）カルバモイル）アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネートであり、前記タグがオリゴヌクレオチドである、条項１００に記載の方法。
【０６２７】
条項１０４。前記スペーサーが６炭素のスペーサーまたは１２炭素のスペーサーを含み、前記タグがビオチンである、条項１０３に記載の方法。
【０６２８】
条項１０５。前記第２の結合メンバーが配列番号：１～１１のうちの任意の１つにおいて示されるヌクレオチド配列を含む核酸を含む、条項１０４に記載の方法。
【０６２９】
条項１０６。マイクロ流体モジュールおよびナノポアモジュールを含む、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって；マイクロ流体モジュールが電極のアレイを含み、そこで電極のアレイが少なくとも１つの流体の小滴を電極のアレイ中の第１の転送位置へ輸送し、第１の転送位置がマイクロ流体モジュールとナノポアモジュールとの間のインターフェースにあり；ナノポアモジュールが以下の：第１のキャピラリーチャンネル；および第２のキャピラリーチャンネルを含み；そこで少なくとも第１のキャピラリーチャンネルがインターフェースへ延長し、第１の転送位置へ隣接し、第１の転送位置に位置する流体小滴を受け取るように位置し；そこで第１のキャピラリーチャンネルが第２のキャピラリーチャンネルと交差し、ナノポア層が、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルが交差する場所で第１のキャピラリーチャンネルと第２のキャピラリーチャンネルとの間に位置する、該デバイス。
【０６３０】
条項１０７。前記電極のアレイが少なくとも１つの流体の小滴を前記電極のアレイ中の第２の転送位置へ輸送し、そこで第２の転送位置が前記マイクロ流体モジュールと前記ナノポアモジュールとの間のインターフェースにあり、前記第２のキャピラリーチャンネルがインターフェースへ延長し、第２の転送位置へ隣接し、第２の転送位置に位置する流体小滴を受け取るように位置する、条項１０６に記載のデバイス。
【０６３１】
条項１０８。前記第２のキャピラリーチャンネルが、前記第２のキャピラリーチャンネルの１つまたは両方の端部上でベントまたはリザーバーの間に延長する、条項１０６に記載のデバイス。
【０６３２】
条項１０９。前記第２のキャピラリーチャンネルが、１つの端部で第１のリザーバーおよび他の端部で第２のリザーバーへ接続される、条項１０８に記載のデバイス。
【０６３３】
条項１１０。前記第１のリザーバーおよび／または前記第２のリザーバーが、交差で前記第２のキャピラリーチャンネル内に位置する流体を含み、その流体が前記ナノポア層のナノポアを介する電流を駆動するように前記ナノポア層の作動を促進する、条項１０９に記載のデバイス。
【０６３４】
条項１１１。前記第１のキャピラリーチャンネルおよび／または前記第２のキャピラリーチャンネルが、前記交差のいずれかの側面での幅と比較して、幅が前記交差で減少するように、前記キャピラリーチャンネルの長さを横切る横断面の幅で変動する、条項１０９に記載のデバイス。
【０６３５】
条項１１２。前記第１のキャピラリーチャンネルが第１のペアの電極を含み、前記第２のキャピラリーチャンネルが第２のペアの電極を含み、そこで第１のペアの電極が前記第１

のキャピラリーチャンネル中に位置し、前記ナノポア層中の前記ナノポアに接し、第２のペアの電極が前記第２のキャピラリーチャンネル中に位置し、前記ナノポア層中の前記ナノポアに接する、条項１０６に記載のデバイス。

【０６３６】

条項１１３。前記小滴が前記ナノポア層中の前記ナノポアを介して輸送されることによってカウントされる分子を含む小滴である、条項１０７～１１２のいずれか一項に記載のデバイス。

【０６３７】

条項１１４。前記流体小滴が異なる組成物を有し、それらは第１の小滴および第２の小滴であり、第１の小滴が前記ナノポアを介して前記ナノポア層を横切って輸送することによってカウントされる分子を含み、第２の小滴が分子を欠損する伝導性流体を含み、そこで伝導性流体が前記ナノポア経由で前記ナノポア層を横切る分子の輸送を促進する、条項１０７に記載のデバイス。

【０６３８】

条項１１５。前記第１のキャピラリーチャンネルが前記ナノポア層に近位に位置する第１の電極を含み、前記第２のキャピラリーチャンネルが前記ナノポア層に近位に位置する第２の電極を含み、そこでそれらが前記キャピラリーチャンネル中に存在する流体と接触するように、第１の電極および第２の電極の各々が前記キャピラリーチャンネル中で曝露され、第１の電極および第２の電極が、液体が前記第１のキャピラリーチャンネルおよび前記第２のキャピラリーチャンネル中の前記ナノポア層を横切って位置する場合に、前記ナノポア層中のナノポアを介する電流を駆動するように作動する、条項１０６～１１４のいずれか一項に記載のデバイス。

【０６３９】

条項１１６。前記第１の転送位置および前記第１のキャピラリーチャンネルは実質的に同じ平面上にあり、そこで前記流体小滴が前記第１のキャピラリーチャンネルの開口部と整列される、条項１０６～１１５のいずれか一項に記載のデバイス。

【０６４０】

条項１１７。前記第１の転送位置が前記第１のキャピラリーチャンネルよりも高い平面にあり、そこで前記デバイスが、前記第１のキャピラリーチャンネルの開口部まで前記流体小滴を転送するための垂直ポートを備えて構成される、条項１０６～１１５のいずれか一項に記載のデバイス。

【０６４１】

条項１１８。前記第１の基板の第１の表面が、前記電極のアレイが配置される第１の領域および前記第１のマイクロチャンネルが形成される第２の領域を含み、そこで前記電極のアレイが、前記第１のマイクロチャンネルが形成される平面よりも高い平面上にある、条項１１７に記載のデバイス。

【０６４２】

条項１１９。前記第２の基板が前記インターフェースに所在する側面端部でノッチを含み、そこでノッチが前記第１のキャピラリーチャンネルの上にわたって整列し、前記転送電極に所在する小滴を前記第１のキャピラリーチャンネルの前記開口部へ輸送するための垂直ポートを提供する、条項１１７に記載のデバイス。

【０６４３】

条項１２０。前記電極のアレイから離れて置かれた単一電極を更に含み、そこで前記単一電極が前記第１の転送位置での前記電極のアレイの少なくとも一部分にわたって延長し、前記第１の転送位置での前記電極のアレイの少なくとも一部分と２平面の立体配置である、条項１０６～１１９のいずれか一項に記載のデバイス。

【０６４４】

条項１２１。前記電極のアレイから離れて置かれた単一電極を更に含む、条項１０７～１１９のいずれか一項に記載のデバイス。

【０６４５】

条項１２２。前記電極のアレイから離れて置かれた単一電極を更に含み、そこで前記単一電極が前記第１の転送位置の上にわたって延長せず、電極のアレイと２平面の立体配置でなく、前記流体小滴が共面電極の使用によって前記第１の転送位置へ動く、条項１０６～１１９のいずれか一項に記載のデバイス。

【０６４６】

条項１２３。前記電極のアレイから離れて置かれた単一電極を更に含み、そこで前記単一電極が前記第１の転送位置の上にわたって延長せず、電極のアレイと２平面の立体配置でなく、前記流体小滴（複数）が共面電極の使用によって前記転送位置へ動く、条項１０６～１１９のいずれか一項に記載のデバイス。

【０６４７】

条項１２４。生物学的サンプル中に存在する検体を測定もしくは検出するための、または患者を診断もしくは血液供給をスクリーニングするための、条項１０６～１２３のいずれか一項に記載のデバイスを使用する方法または条項６６～１０５のいずれか一項に記載の方法。

【０６４８】

条項１２５。少なくとも前記ステップ（ａ）～（ｄ）が、条項１０６～１２３のいずれか一項に記載のデバイスを使用して実行される、条項１～４５または６６～１０５のいずれか一項に記載の方法。

【０６４９】

条項１２６。患者を診断もしくは血液供給をスクリーニングする方法または生物学的サンプル中に存在する検体を測定もしくは検出するための方法における、条項１０６～１２３のいずれか一項に記載のデバイスの使用または条項１～４５のいずれか一項に記載の方法の使用。

【０６５０】

条項１２７。生物学的サンプル中に存在する検体を測定する方法であって、（ａ）第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；（ｂ）第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがそれへ添付された切断可能なタグを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること；（ｃ）第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されない第２の結合メンバーを除去すること；（ｄ）第１の結合メンバーへ結合されている検体へ結合されている第２の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｆ）層を介する各々のタグの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するタグを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法。

【０６５１】

条項１２８。生物学的サンプル中に存在する検体を測定する方法であって、（ａ）第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；（ｂ）第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがアプタマーを含むところで、検体を第

２の結合メンバーと接触させること；（ｃ）固体基板へ結合されている検体へ結合されないアプタマーを除去すること；（ｄ）検体へ結合されているアプタマーを解離すること、および（ｅ）解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｆ）各々のアプタマーの層を介する移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法。

【０６５２】

条項１２９。生物学的サンプル中に存在する検体を測定する方法であって、（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）標識検体が切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを標識検体と接触させること；（ｃ）結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；（ｄ）結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること；（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｆ）層を介する各々のタグの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するタグを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法。

【０６５３】

条項１３０。生物学的サンプル中に存在する検体を測定する方法であって、（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）標識検体がアプタマーを含むところで、サンプルを標識検体と接触させること；（ｃ）結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；（ｄ）標識検体へ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）各々のアプタマーの層を介する移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、

参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法。

【０６５４】

条項１３１。生物学的サンプル中に存在する検体を測定する方法であって、（ａ）結合メンバーが検体へ特異的に結合し、結合メンバーが切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプルを固定化検体と接触させること；（ｃ）固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること；（ｄ）固定化検体へ結合されている結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；（ｅ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｆ）層を介する各々のタグの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するタグを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法。

【０６５５】

条項１３２。生物学的サンプル中に存在する検体を測定する方法であって、（ａ）結合メンバーが検体に特異的に結合し、結合メンバーがアプタマーを含むところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプルを固定化検体と接触させること；（ｃ）固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること；（ｄ）固定化検体へ結合されている結合メンバーへ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）各々のアプタマーの層を介する移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含み、そこでサンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照スタンダードであり、サブセクションｉ）中のスタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中のスタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、該方法。

【０６５６】

条項１３３。生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法であって、（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーがそれへ添付された切断可能なタグを含み、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メン

バーと接触させること；（ｂ）検体へ結合されない結合メンバーを除去すること；（ｃ）検体へ結合されている結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介する各々のタグの移動が移動事象であり、移動事象の数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するところで、層を介して移動するタグを査定することを含み、そこで前記サンプル中に存在する検体の量が、ｉ）設定された時間の期間の間の移動事象の数をカウントし、移動事象の数を対照へ相関させること；ｉｉ）設定された数の移動事象の発生についての時間の量を測定し、対照へ相関させること；またはｉｉｉ）移動事象の発生間の平均時間を測定し、対照へ相関させることによって決定され、そこで対照が、キャリブレーションカーブ、スタンダード添加、またはデジタルポリメラーゼ連鎖反応を含む、参照である、該方法。

【０６５７】

条項１３４。サブセクションｉ）中の前記スタンダードカーブが、設定された時間の期間の間の検体の対照濃度についての移動事象の数を測定することによって決定され；サブセクションｉｉ）中の前記スタンダードカーブが、検体の対照濃度の移動事象の発生の設定された数について要する時間の測定によって決定され；サブセクションｉｉｉ）中の前記スタンダードカーブが、検体の対照濃度についての移動事象の発生間の平均時間の測定によって決定される、条項１３３に記載の方法。

【０６５８】

条項１３５。マイクロ流体モジュールおよびナノポア使用可能モジュールを含む、集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイスであって；マイクロ流体モジュールが少なくとも電極のアレイの一部分とオーバーラップするようにサイズ合わせされた単一電極から離れて置かれた電極のアレイを含み、そこで電極のアレイおよび単一電極が少なくとも１つの流体の小滴を電極のアレイ中の転送電極へ輸送し、転送電極がマイクロ流体モジュールとナノポア使用可能モジュールとの間のインターフェースに位置し；ナノポア使用可能モジュールが以下の：第１の基板の第１の表面上に位置する第１のマイクロチャンネル；第２の基板の第１の表面上に位置する第２のマイクロチャンネルを含み；そこで第１の基板の第１の表面が第２の基板の第１の表面と接触し、それによって、第１のマイクロチャンネルおよび第２のマイクロチャンネルを囲んで、それぞれ第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルを提供し、少なくとも第１のキャピラリーチャンネルがマイクロ流体モジュールとナノポア使用可能モジュールとの間のインターフェースへ延長し、転送電極に隣接し、転送電極上に位置する流体小滴を受け取るように位置し；そこで第１のキャピラリーチャンネルが第２のキャピラリーチャンネルと交差し、層が、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルが交差する場所で第１の基板と第２の基板との間に位置し、層がナノポアを欠損し、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネル中に存在するイオン性液体を分離し、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルが、第１のキャピラリーチャンネルから第２のキャピラリーチャンネルへ（またはその逆）電圧を駆動するために電極と電気的に接続し、第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネルの交差で層中でナノポアを生じる、該デバイス。

【０６５９】

条項１３６。前記イオン性液体が水溶液である、条項１３５に記載のデバイス。

【０６６０】

条項１３７。前記水溶液が塩溶液である、条項１３６に記載のデバイス。

【０６６１】

条項１３８。前記イオン性液体が対象となる検体を含み、そこで前記デバイスが前記イオン性液体中の検体の存在または非存在を検出するように構成される、条項１３５～１３７のいずれか一項に記載のデバイス。

【０６６２】

条項１３９。集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイス中でナノポアを生成する方法であって、条項１３５～１３８のいずれか一項に記載の集積デジタルマイクロ流体

ナノポア使用可能デバイスを提供すること；層を介する電流を駆動するように第１のキャピラリーチャンネルおよび第２のキャピラリーチャンネル中に電圧を適用すること；層を横切るコンダクタンスを測定すること；層中のナノポアの生成を表すコンダクタンスの検出に際して、電圧の適用を終了することを含む、該方法。

【０６６３】

条項１４０。集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって、電極のアレイを含む第１の基板；第１の基板から離れて置かれた第２の基板；ナノポアを含むナノポア層と流体的に連通される第１の基板または第２の基板中の開口部；およびナノポアを介して電界を適用するように構成されたペアの電極を含み、そこで電極のアレイが少なくとも１つの流体の小滴を開口部へ輸送するように構成される、該デバイス。

【０６６４】

条項１４１。前記開口部がキャピラリーチャンネルである、条項１４０に記載のデバイス。

【０６６５】

条項１４２。前記キャピラリーチャンネルが、前記第１の基板または前記第２の基板の第２の側面上の開口部よりも幅広い、前記第１の基板または前記第２の基板の第１の側面上の開口部を有する、条項１４１に記載のデバイス。

【０６６６】

条項１４３。前記ペアの検出電極が単一電極である第１の検出電極を含む、条項１４２に記載のデバイス。

【０６６７】

条項１４４。前記ペアの検出電極が、第２の側面上に配置された第２の検出電極を含む、条項１４２または１４３のいずれか一項に記載のデバイス。

【０６６８】

条項１４５。ペアの集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって、

【０６６９】

単一電極が第１の単一電極でありキャピラリーチャンネルが第１のキャピラリーチャンネルである、条項１４２に記載の第１の集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイス；および第２の集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスを、該ペアのデバイスが含み、第２の集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスが、以下の：第５の側面および第５の側面の反対側の第６の側面を含んで第５の側面が電極のアレイを含む、第３の基板；第３の基板から離れて置かれた、第４の基板を含み、そこで第４の基板が、第３の基板の第５の側面に直面する第７の側面および第７の側面の反対側の第８の側面を含み、第７の側面が第２の単一電極を含み、ナノポア層が第８の側面上に配置され、第４の基板が、第４の基板の第７の側面から第８の側面へ延長する第２のキャピラリーチャンネルを含み、ナノポア層がキャピラリーチャンネルの開口部にわたって位置し、ナノポアが第１のキャピラリーチャンネルと第２のキャピラリーチャンネルとの間の電気浸透導管を提供するように、ナノポア層が第２の基板と第４の基板との間にはさまれ、ペアの検出電極が、第２の単一電極である第２の検出電極を含む、該ペアのデバイス。

【０６７０】

条項１４６。集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイスであって、以下の：第１の側面および第１の側面の反対側の第２の側面を含み、そこで第１の側面が電極のアレイを含む、第１の基板；第１の基板から離れて置かれ、そこで第２の基板が第１の基板の第１の側面に直面する第３の側面および第３の側面の反対側の第４の側面を含む、第２の基板；ナノポアを欠損しデバイスの外部側面上に配置され、そこで外部側面が第２の側面または第４の側面から選択され、外部側面を含む第１の基板または第２の基板のうちの１つが、第１の基板の第１の側面から第２の側面へまたは第２の基板の第３の側面から第４の側面へ延長するキャピラリーチャンネルを含み、ナノポア使用可能層がキャピラリーチャンネルの開口部にわたって位置する、ナノポア使用可能層；およびナノポア使用可能層を横切って電界を適用するように構成され、そこで電極のアレイが少なくとも１つの流体の小滴をキャピラリーチャンネルへ輸送するように構成される、ペアの電極を含む、該デ

バイス。
【０６７１】
条項１４７。集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイス中でナノポアを生成する方法であって、条項１４３に記載の集積デジタルマイクロ流体ナノポア使用可能デバイスを提供すること；層の各々の側面上のイオン性液体がペアの検出電極のうちのいずれか１つと電気的に接触するように、イオン性液体中にナノポア使用可能層の両方の側面を沈めること；層を介する電流を駆動するようにペアの検出電極の間に電圧を適用すること；層を横切るコンダクタンスを測定すること；層中のナノポアの生成を表すコンダクタンスの検出に際して、電圧の適用を終了することを含む、該方法。
【０６７２】
条項１４８。前記イオン性液体が塩溶液である、条項１４７に記載の方法。
【０６７３】
条項１４９。前記イオン性液体が対象となる検体を含み、そこで前記デバイスが前記イオン性液体中の検体の存在または非存在を検出するように構成される、条項１４７または１４８のいずれか一項に記載の方法。
【０６７４】
条項１５０。生成されたナノポアを条件付けることを更に含む、条項１３９または１４７～１４９のいずれか一項に記載の方法。
【０６７５】
条項１５１。前記条件付けが、第１の極性を有する第１の電圧および第１の極性の反対の第２の極性を有する第２の電圧を前記ナノポア膜を横切って交互に適用し、そこで第１の電圧および第２の電圧が各々少なくとも１回適用されること；ならびに前記ナノポアのサイズと関係する電気浸透特性を測定することを含む、条項１５０に記載の方法。
【０６７６】
条項１５２。前記ナノポアのサイズと関係する前記電気浸透特性を前記条件付けの前に測定することを更に含む、条項１５０または１５１のいずれか一項に記載の方法。
【０６７７】
条項１５３。結合メンバー、タグおよびスペーサーを含む、組成物。
【０６７８】
条項１５４。前記スペーサーが、ニトロベンジル基、ジチオエチルアミノ、６炭素のスペーサー、１２炭素のスペーサー、または３－（９－（（３－カルボキシプロピル）（トシル）カルバモイル）アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネートを含む、条項１５３に記載の組成物。
【０６７９】
条項１５５。前記スペーサーがニトロベンジル基を含み、前記タグがＤＮＡ分子である、条項１５４に記載の組成物。
【０６８０】
条項１５６。前記スペーサーがジチオエチルアミノであり、前記タグがカルボキシル化ナノ粒子である、条項１５４に記載の組成物。
【０６８１】
条項１５７。前記スペーサーが３－（９－（（３－カルボキシプロピル）（トシル）カルバモイル）アクリジン－１０－イウム－１０－イル）プロパン－１－スルホネートであり、前記タグはオリゴヌクレオチドである、条項１５４に記載の組成物。
【０６８２】
条項１５８。前記スペーサーが６炭素のスペーサーまたは１２炭素のスペーサーを含み、前記タグがビオチンである、条項１５４に記載の組成物。
【０６８３】
条項１５９。前記第２の結合メンバーが配列番号：１～１１のうちの任意の１つにおいて示されるヌクレオチド配列を含む核酸を含む、条項１５８に記載の方法。
【０６８４】

条項１６０。前記タグが切断可能なリンカーを含む、条項１５３～１５９のいずれか一項に記載の組成物。

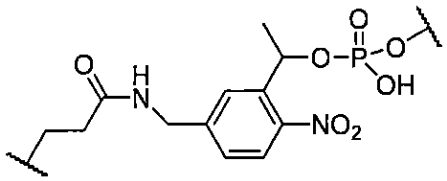
【０６８５】

条項１６１。前記切断可能なリンカーが、光切断可能なリンカー、化学切断可能なリンカー、熱切断可能なリンカー、熱感受性切断可能なリンカー、および酵素切断可能なリンカーからなる群から選択される、条項１６０に記載の組成物。

【０６８６】

条項１６２。前記切断可能なリンカーが光切断可能なリンカーであり、そこで光切断可能なリンカーが

【化２５】



に由来する光切断可能な部分を含む、条項１６１に記載の組成物。

【０６８７】

条項１６３。前記切断可能なリンカーが熱切断可能なリンカーであり、温度上昇の局在化を使用して切断される、条項１６１に記載の組成物。

【０６８８】

条項１６４。前記局在化した温度上昇が、光と熱でまたはマイクロ波照射によって生成される、条項１６３に記載の組成物。

【０６８９】

条項１６５。光からのエネルギーが吸収標的へ転送される、条項１６４に記載の組成物。

【０６９０】

条項１６６。前記吸収標的が色素、顔料、または水を含む、条項１６５に記載の組成物。

【０６９１】

条項１６７。前記切断可能なリンカーが二本鎖ＤＮＡを含む、条項１６３～１６６のいずれか一項に記載の組成物。

【０６９２】

条項１６８。前記切断可能なリンカーが化学切断可能なリンカーであり、切断がチオールによって媒介される、条項１６１に記載の組成物。

【０６９３】

条項１６９。前記タグが切断可能なリンカーを含む、条項２９、６６、６８、７０、７２～８６、９２～９４、９８～１０５、１２７、１２９、１３１、１３３、および１３４のいずれか一項に記載の方法。

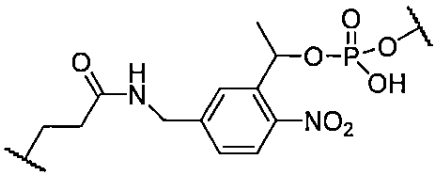
【０６９４】

条項１７０。前記切断可能なリンカーが、光切断可能なリンカー、化学切断可能なリンカー、熱切断可能なリンカー、熱感受性切断可能なリンカー、および酵素切断可能なリンカーからなる群から選択される、条項１６９に記載の方法。

【０６９５】

条項１７１。前記切断可能なリンカーが光切断可能なリンカーであり、光切断可能なリンカーが

【化２６】



に由来する光切断可能な部分を含む、条項１７０に記載の方法。
【０６９６】
条項１７２。前記切断可能なリンカーが熱切断可能なリンカーであり、温度上昇の局在化を使用して切断される、条項１７０に記載の方法。
【０６９７】
条項１７３。前記局在化した温度上昇が、光と熱でまたはマイクロ波照射によって生成される、条項１７２に記載の方法。
【０６９８】
条項１７４。光からのエネルギーが吸収標的へ転送される、条項１７３に記載の方法。
【０６９９】
条項１７５。前記吸収標的が色素、顔料、または水を含む、条項１７４に記載の方法。
【０７００】
条項１７６。前記切断可能なリンカーが二本鎖ＤＮＡを含む、条項１７２～１７５のいずれか一項に記載の方法。
【０７０１】
条項１７７。前記切断可能なリンカーが化学切断可能なリンカーであり、チオールによって切断される、条項３０および１７０のいずれか一項に記載の方法。
【０７０２】
条項１７８。１又は２以上の移動事象が、結合メンバーが検体へ結合する事象に対応する、条項２～３０、３１～４５、６４、７０～１０５、１２５、１２７～１３４、および１６９～１７７のいずれか一項に記載の方法。
【０７０３】
条項１７９。１つの移動事象が結合メンバーが検体へ結合する事象に対応する、条項１７８に記載の方法。
【０７０４】
条項１８０。２つ以上の移動事象が結合メンバーが検体へ結合する事象に対応する、条項１７８に記載の方法。
【０７０５】
条項１８１。２つ以上のタグが１つの結合メンバーあたり取り込まれ、２つ以上の移動事象が結合メンバーの検体への結合を表わす、条項１８０に記載の方法。
【０７０６】
条項１８２。少なくとも２つ以上のナノポアが層中にある、条項１～４５、６３～１０５、１２４、１２５、１２７～１３４、および１６９～１８１のいずれか一項に記載の方法。
【０７０７】
条項１８３。前記少なくとも２つの以上のナノポアが並んでまたは連続して提示される、条項１８２に記載の方法。
【０７０８】
条項１８４。集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって、電極のアレイを含む第１の基板；第１の基板から離れて置かれた第２の基板；ならびに第１の基板と第２の基板との間に配置された第１の表面および第２の表面を有するナノポア層を含み、そこで電極のアレイが第１の小滴をナノポア層の第１の表面に位置させるように構成され、電極のアレイのうちの少なくとも２つの電極がナノポア層を横切って位置し、２つの電極がアノードおよびカソードを形成し、液滴がナノポア層の第１の表面にある場合にナノポア層中のナノポアを介する電流を駆動するように作動する、該デバイス。
【０７０９】
条項１８５。前記ナノポア層の第２の表面で第２の小滴を位置させるように更に構成される、条項１７３に記載の電極のアレイ。
【０７１０】
条項１８６。マイクロ流体モジュールおよびナノポアモジュールを含む、集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって；マイクロ流体モジュールが電極のアレイを含み、

そこで電極のアレイが少なくとも１つの流体の小滴を電極のアレイ中の転送位置へ輸送し、転送位置がマイクロ流体モジュールとナノポアモジュールとの間のインターフェースにあり；ナノポアモジュールが以下の：転送位置からナノポア層へ延長する第１のキャピラリーチャンネルを含む、該デバイス。

【０７１１】

条項１８７。集積デジタルマイクロ流体ナノポアデバイスであって、電極のアレイを含む第１の基板；第１の基板から離れて置かれた第２の基板；１又は２以上のナノポアをその中に有する第１のナノポア層；１又は２以上のナノポアをその中に有する第２のナノポア層；ならびに第１のナノポア層および第２のナノポア層中のナノポアを介してタグを駆動する電界を生ずるための少なくとも２つの電極を含む、該デバイス。

【０７１２】

条項１８８。前記固定化剤がビオチンまたはストレプトアビジンを含む、条項３０に記載の方法。

【０７１３】

条項１８９。前記固定化剤がビオチンを含み、リガンドがストレプトアビジンを含む、条項１８８に記載の方法。

【０７１４】

条項１９０。前記固定化剤がストレプトアビジンを含み、リガンドがビオチンを含む、条項１８８に記載の方法。

【０７１５】

条項１９１。前記固体支持体、前記第１の結合メンバー、および第２の結合メンバーが、連続してまたは同時にサンプルへ添加される、条項３０および１８８～１９０のいずれか一項に記載の方法。

【０７１６】

条項１９２。前記孔対前記タグのサイズの比が１．０以下である、条項１～４５、６３～１０５、１２４、１２５、１２７～１３４、１６９～１８１、１８３、および１８８～１９１のいずれか一項に記載の方法。

【０７１７】

条項１９３。生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出する方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、結合メンバーが固定化剤のためのリガンドを含み、固体支持体／結合メンバー／対象となる検体の複合体または固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体のいずれかを形成するように、結合メンバーが対象となる検体を特異的に結合するところで、サンプルを固体支持体、結合メンバー、および切断可能なタグにより標識される標識検体と接触させること；（ｂ）固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体中の結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；（ｃ）固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体中の結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること；（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法。

【０７１８】

条項１９４。前記固定化剤がビオチンまたはストレプトアビジンを含む、条項１９３に記載の方法。

【０７１９】

条項１９５。前記固定化剤がビオチンを含み、リガンドがストレプトアビジンを含む、条項１９４に記載の方法。

【０７２０】

条項１９６。前記固定化剤がストレプトアビジンを含み、リガンドがビオチンを含む、条項１９４に記載の方法。

【０７２１】

条項１９７。前記固体支持体、前記結合メンバー、および前記標識検体が、連続してまたは同時にサンプルへ添加される、条項１９３～１９６のいずれか一項に記載の方法。
【０７２２】
条項１９８。生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出する方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、外来性検体が固定化剤のためのリガンドを含み、固体支持体／固定化検体の複合体を形成するように固体支持体を結合し、結合メンバーが切断可能なタグを含み、固体支持体／対象となる検体／結合メンバーの複合体または固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体のいずれかを形成するように、対象となる検体を特異的に結合するところで、サンプルを固体支持体、結合メンバー、および外来性検体と接触させること；（ｂ）固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体または固体支持体／対象となる検体／結合メンバーの複合体のいずれか中の結合されない結合メンバーを除去すること；（ｃ）固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体中の結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法。
【０７２３】
条項１９９。前記固定化剤がビオチンまたはストレプトアビジンを含む、条項１９８に記載の方法。
【０７２４】
条項２００。前記固定化剤がビオチンを含み、リガンドがストレプトアビジンを含む、条項１９９に記載の方法。
【０７２５】
条項２０１。前記固定化剤がストレプトアビジンを含み、リガンドがビオチンを含む、条項１９９に記載の方法。
【０７２６】
条項２０２。前記固体支持体、前記結合メンバー、および外来性検体が、連続してまたは同時にサンプルへ添加される、条項１９８～２０１のいずれか一項に記載の方法。
【０７２７】
条項２０３。ステップ（ｃ）中でのタグの切断の前に、前記固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体が単離される、条項１９８～２０１のいずれか一項に記載の方法。
【０７２８】
条項２０４。単離が磁界の使用により行われる、条項２０３に記載の方法。
【０７２９】
条項２０５。生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出する方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、結合メンバーが固定化剤のためのリガンドを含み、固体支持体／結合メンバー／対象となる検体の複合体または固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体のいずれかを形成するように、結合メンバーが対象となる検体を特異的に結合するところで、サンプルを固体支持体、結合メンバー、およびアプタマーにより標識される標識検体と接触させること；（ｂ）固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体中の結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；（ｃ）固体支持体／結合メンバー／標識検体の複合体中の結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたアプタマーを解離すること；（ｄ）解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定することを含む、該方法。
【０７３０】
条項２０６。前記固定化剤がビオチンまたはストレプトアビジンを含む、条項２０５に記

載の方法。
【０７３１】
条項２０７。前記固定化剤がビオチンを含み、リガンドがストレプトアビジンを含む、条項２０６に記載の方法。
【０７３２】
条項２０８。前記固定化剤がストレプトアビジンを含み、リガンドがビオチンを含む、条項２０６に記載の方法。
【０７３３】
条項２０９。前記固体支持体、前記結合メンバー、および前記標識検体が、連続してまたは同時にサンプルへ添加される、条項２０５～２０８のいずれか一項に記載の方法。
【０７３４】
条項２１０。生物学的サンプル中に存在する対象となる検体を測定または検出する方法であって、（ａ）固体支持体が固定化剤を含み、外来性検体が固定化剤のためのリガンドを含み、固体支持体／固定化検体の複合体を形成するように固体支持体を結合し、結合メンバーがアプタマーを含み、固体支持体／対象となる検体／結合メンバーの複合体または固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体のいずれかを形成するように、対象となる検体を特異的に結合するところで、サンプルを固体支持体、結合メンバー、および外来性検体と接触させること；（ｂ）固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体または固体支持体／対象となる検体／結合メンバーの複合体のいずれか中の結合されない結合メンバーを除去すること；（ｃ）固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体中の結合メンバーへ結合されているアプタマーを解離すること；（ｄ）タグを層中の１又は２以上のナノポアを介して移動させること；および（ｅ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定することを含む、該方法。
【０７３５】
条項２１１。前記固定化剤がビオチンまたはストレプトアビジンを含む、条項２１０に記載の方法。
【０７３６】
条項２１２。前記固定化剤がビオチンを含み、リガンドがストレプトアビジンを含む、条項２１１に記載の方法。
【０７３７】
条項２１３。前記固定化剤がストレプトアビジンを含み、リガンドがビオチンを含む、条項２１１に記載の方法。
【０７３８】
条項２１４。前記固体支持体、前記結合メンバー、および外来性検体が、連続してまたは同時にサンプルへ添加される、条項２１０～２１３のいずれか一項に記載の方法。
【０７３９】
条項２１５。ステップ（ｃ）中でのアプタマーの解離の前に、前記固体支持体／固定化検体／結合メンバーの複合体が単離される、条項２１０～２１３のいずれか一項に記載の方法。
【０７４０】
条項２１６。単離が磁界の使用により行われる、条項２１５に記載の方法。
【０７４１】
条項２１７。生物学的サンプル中に存在する検体を測定または検出する方法であって、
【０７４２】
Ｉ。（ａ）第１の結合メンバーが固体支持体上で固定化され、第１の結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを第１の結合メンバーと接触させること；（ｂ）第２の結合メンバーが検体へ特異的に結合し、第２の結合メンバーがアプタマーを含むところで、検体を第２の結合メンバーと接触させること；（ｃ）固体基板へ結合されている

検体へ結合されないアプタマーを除去すること；（ｄ）検体へ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および（ｅ）層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定すること；

【０７４３】

ＩＩ。（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）標識検体が切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを標識検体と接触させること；（ｃ）結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；（ｄ）結合メンバーへ結合されている標識検体へ添付されたタグを切断すること；（ｅ）切断されたタグを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および（ｆ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定すること；

【０７４４】

ＩＩＩ。（ａ）結合メンバーが固体支持体上で固定化され、結合メンバーが検体へ特異的に結合するところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）標識検体がアプタマーを含むところで、サンプルを標識検体と接触させること；（ｃ）結合メンバーへ結合されない標識検体を除去すること；（ｄ）結合メンバーへ結合されている標識検体へ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および（ｅ）層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定すること；

【０７４５】

ＩＶ。（ａ）結合メンバーが検体へ特異的に結合し、結合メンバーが切断可能なタグにより標識されるところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプルを固定化検体と接触させること；（ｃ）固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること；（ｄ）固定化検体へ結合されている結合メンバーへ添付されたタグを切断すること；（ｅ）切断されたタグを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および（ｆ）層を介して移動するタグの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するタグの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するタグを査定すること；ならびに

【０７４６】

Ｖ。（ａ）結合メンバーが検体に特異的に結合し、結合メンバーがアプタマーを含むところで、サンプルを結合メンバーと接触させること；（ｂ）固定化検体が固体支持体上で固定化されるところで、サンプルを固定化検体と接触させること；（ｃ）固定化検体へ結合されない結合メンバーを除去すること；（ｄ）固定化検体へ結合されている結合メンバーへ結合されているアプタマーを解離し、解離されたアプタマーを層中の１又は２以上のナノポアを介してまたは横切って移動させること；および（ｅ）層を介して移動するアプタマーの数の測定がサンプル中に存在する検体の量を測定するか、または層を介して移動するアプタマーの検出がサンプル中に検体が存在することを検出するところで、層を介して移動するアプタマーを査定すること

を含む、該方法。

【０７４７】

条項２１８。前記孔対前記タグのサイズの比が１．０以下である、条項１９３～２１７のいずれか一項に記載の方法。

【図面】

【図１Ａ】

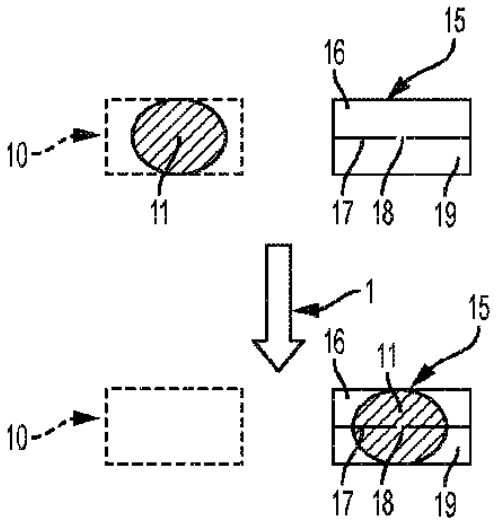


FIG. 1A

【図１Ｂ】

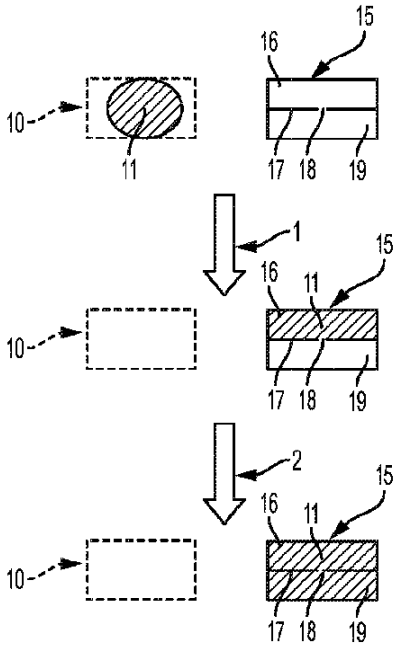


FIG. 1B

【図２Ａ】

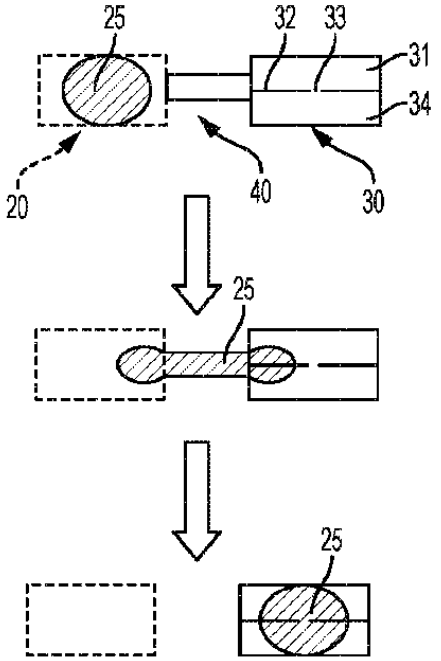


FIG. 2A

【図２Ｂ】

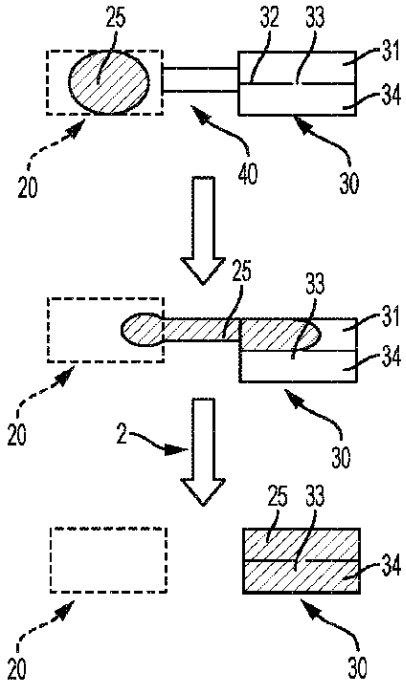


FIG. 2B

【図２Ｃ】

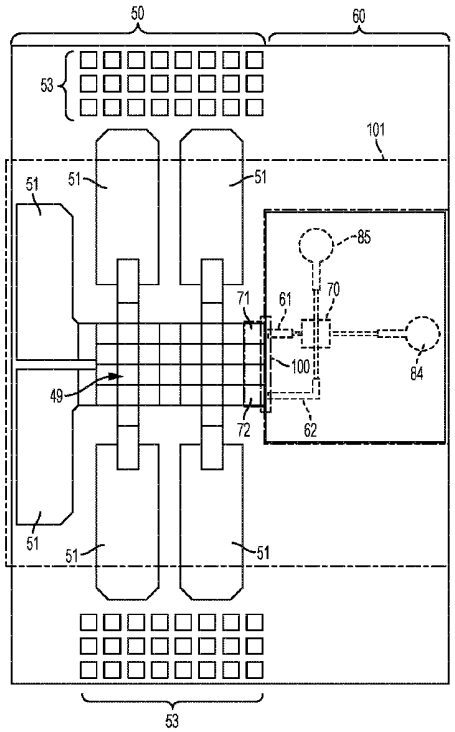


FIG. 2C

【図２Ｄ】

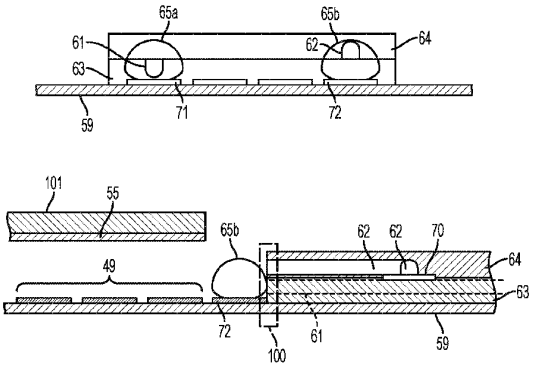


FIG. 2D

【図２Ｅ】

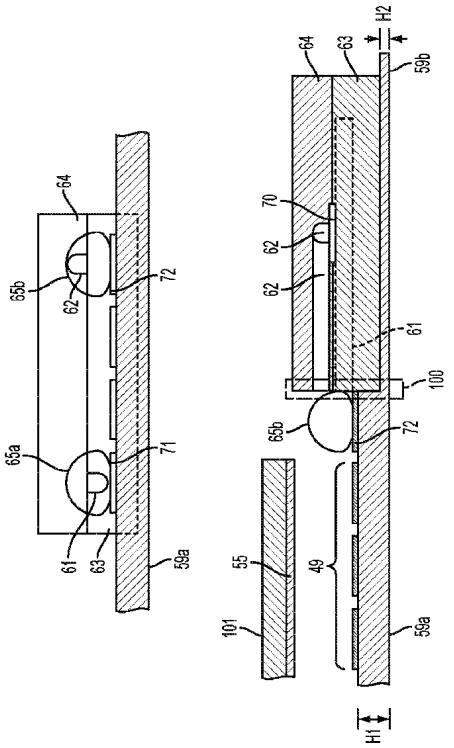


FIG. 2E

【図２Ｆ】

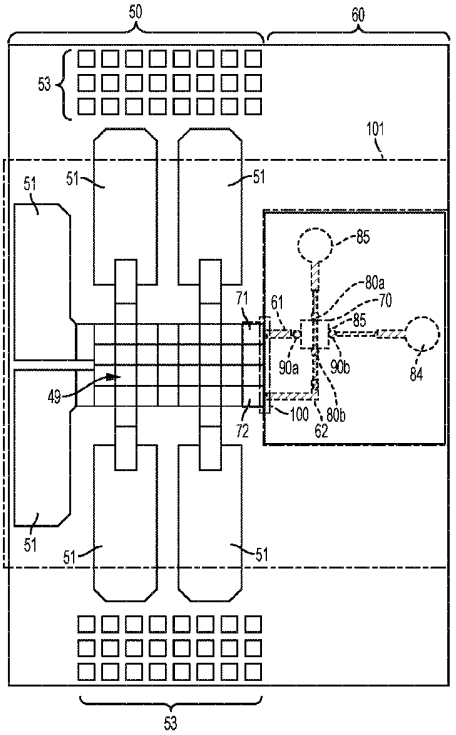


FIG. 2F

【図２Ｇ】

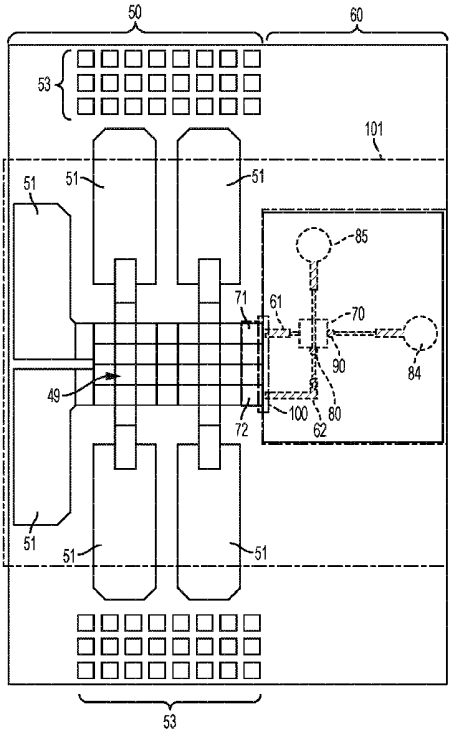


FIG. 2G

【図２Ｈ】

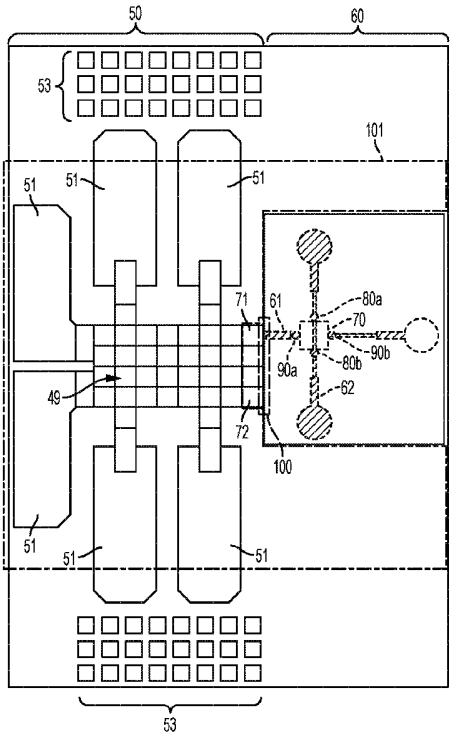


FIG. 2H

【図２Ｉ－１】

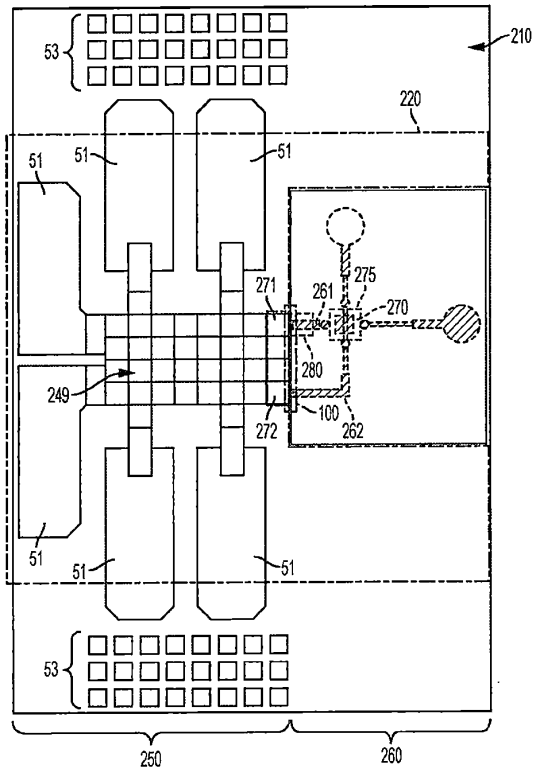


FIG. 2I

【図２Ｉ－２】

転送インターフェースの横断面の正面図

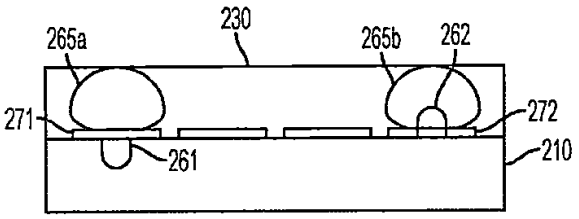


FIG. 2I
続き

【図２Ｊ】

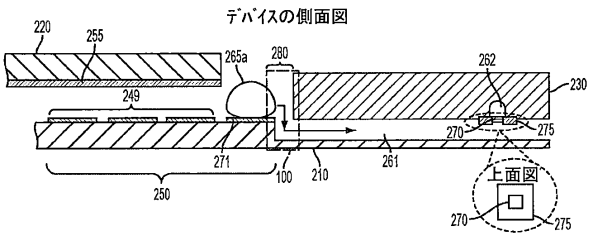


FIG. 2J

【図２Ｋ】

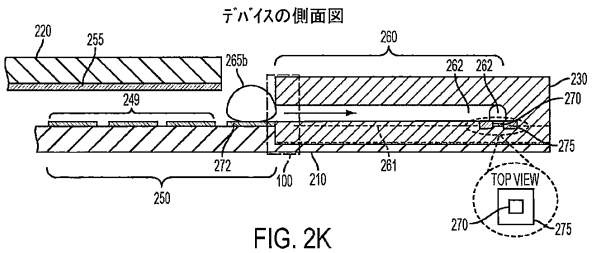


FIG. 2K

【図２Ｌ】

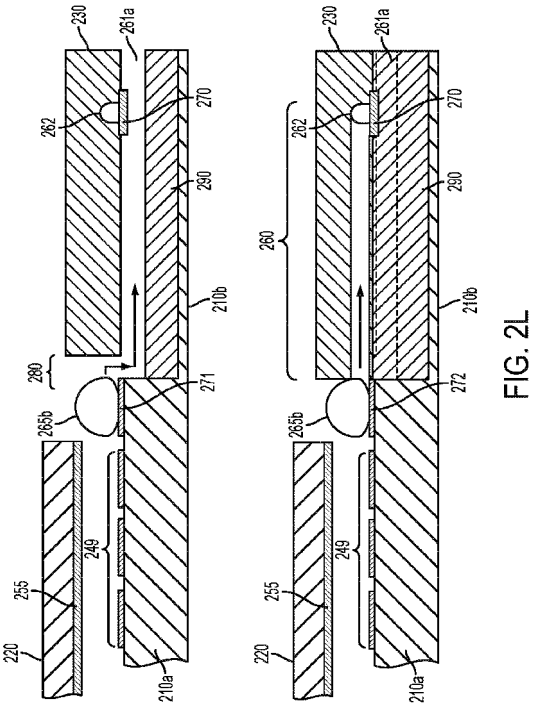


FIG. 2L

【図３】

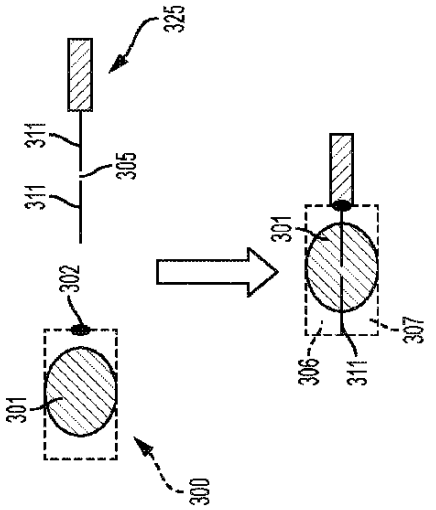


FIG. 3

【図４】

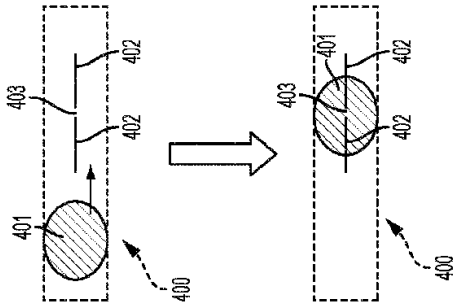


FIG. 4

【図５Ａ】

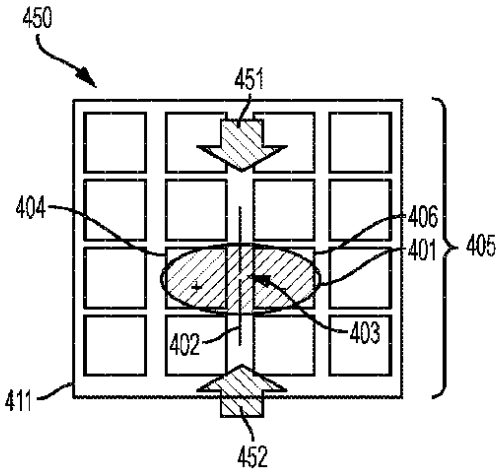


FIG. 5A

【図５Ｂ】

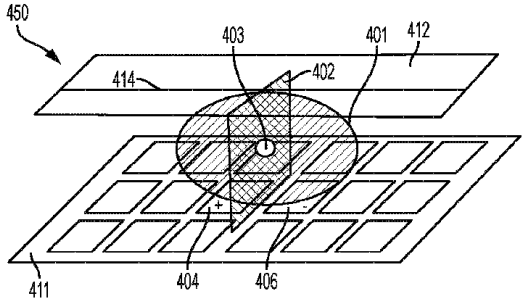


FIG. 5B

【図６】

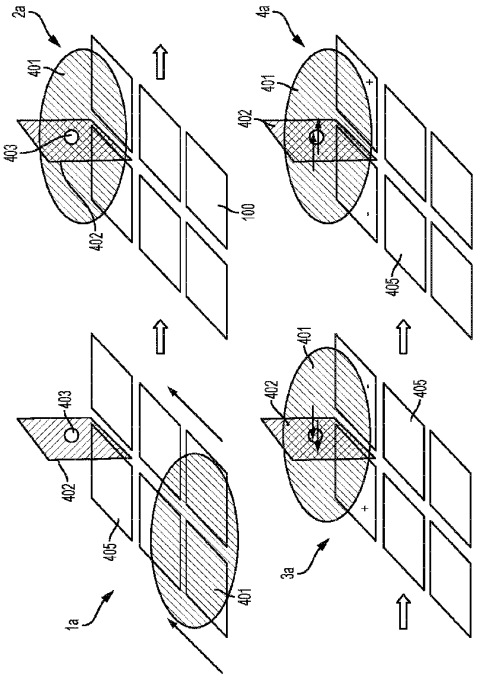


FIG. 6

【図７】

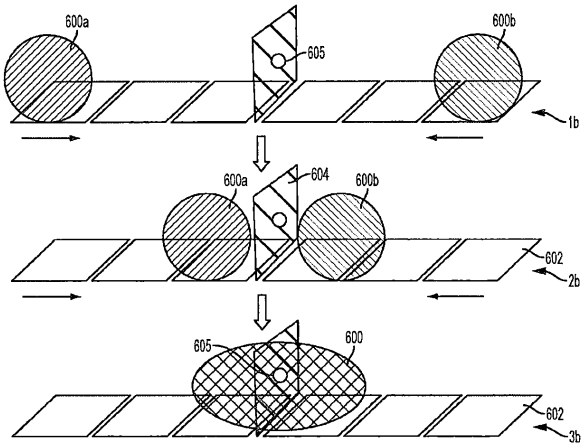


FIG. 7

【図７Ｂ】

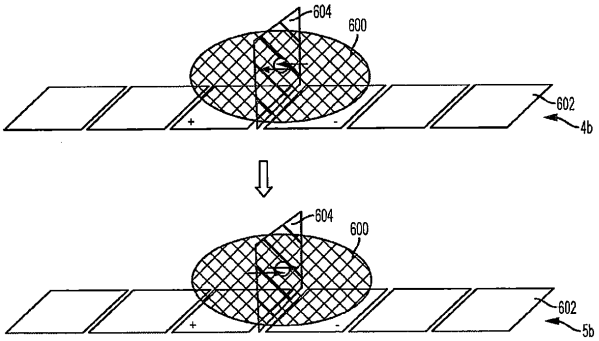


FIG. 7B
続き

【図８】

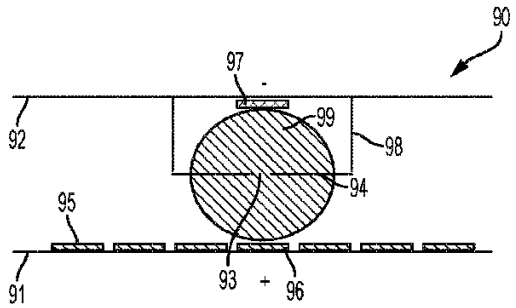


FIG. 8

【図９】

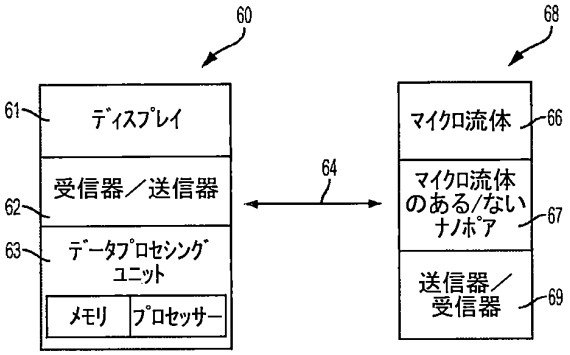


FIG. 9

【図１０】

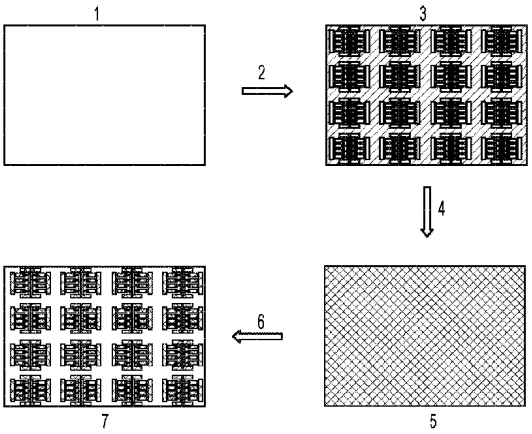


FIG. 10

【図１１】

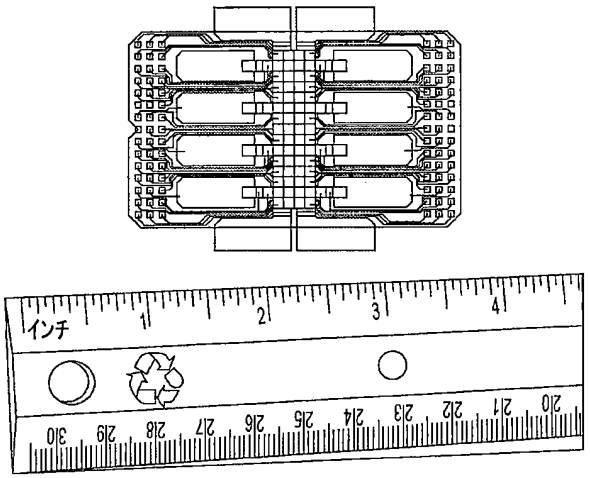


FIG. 11

【図１２】

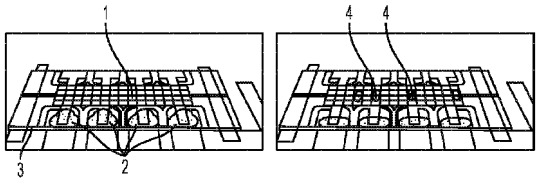


FIG. 12

【図１３Ａ】

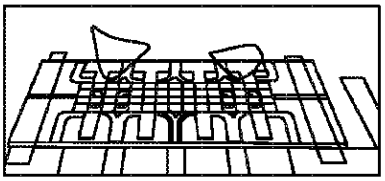


FIG. 13A

【図１３Ｂ】

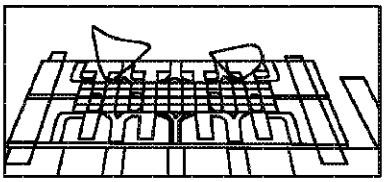


FIG. 13B

【図１３Ｃ】

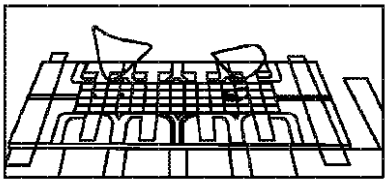


FIG. 13C

【図１３Ｄ】

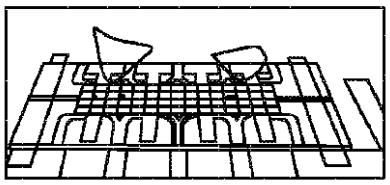
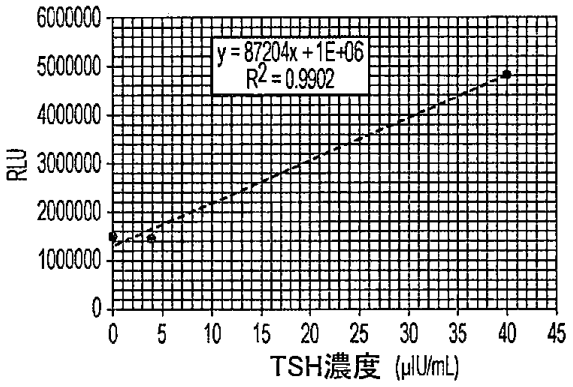


FIG. 13D

【図１３Ｅ】



TSH濃度	x1	x2	x3	x4	平均
0	1523009	1540911	1832762	1173542	1517556
4	1624957	1345836			1485397
40	5181831	4508782			4845307

FIG. 13E

【図１４Ａ】

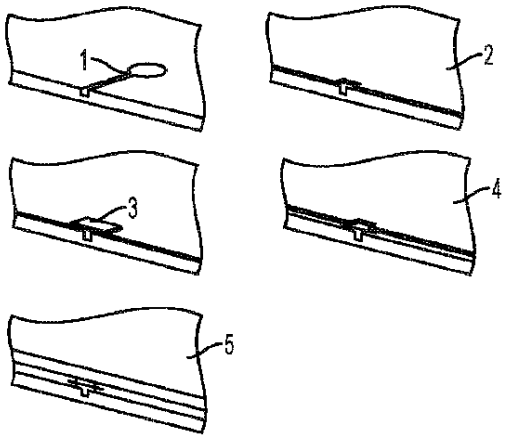


FIG. 14A

【図１４Ｂ】

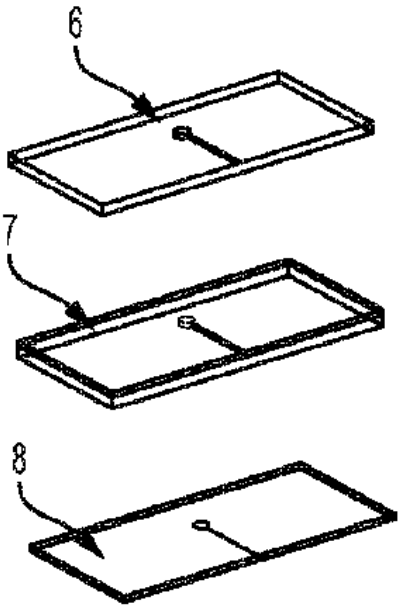


FIG. 14B

【図１４Ｃ】

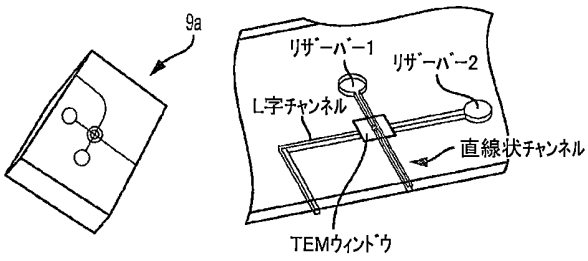


FIG. 14C

【図１５Ａ】

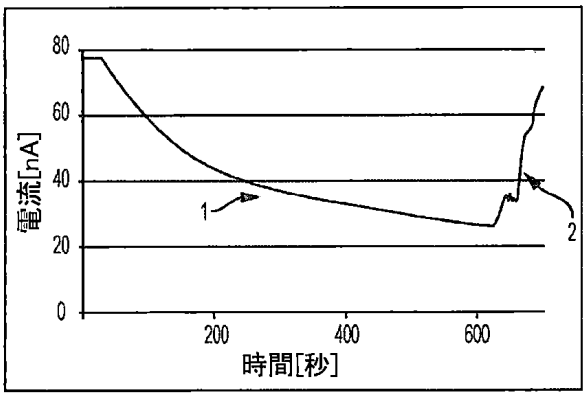


FIG. 15A

【図１５Ｂ】

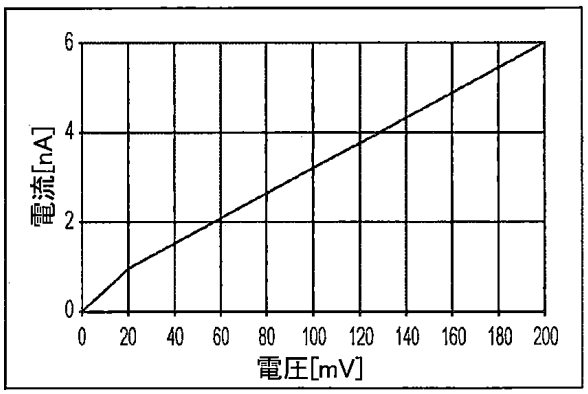


FIG. 15B

【図１６Ａ】

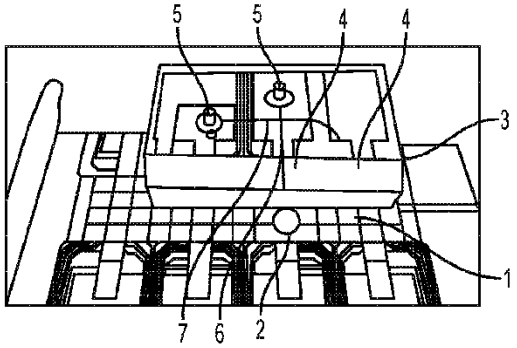


FIG. 16A

【図１６Ｂ】

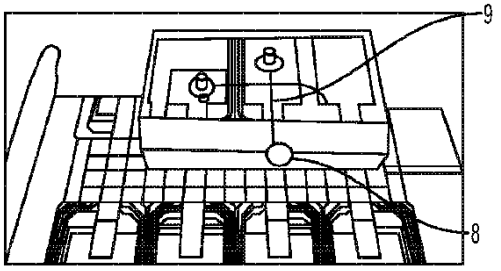


FIG. 16B

【図１６Ｃ】

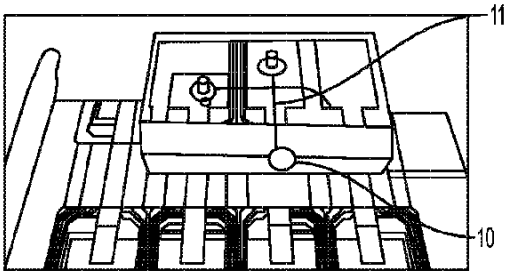


FIG. 16C

【図１７】

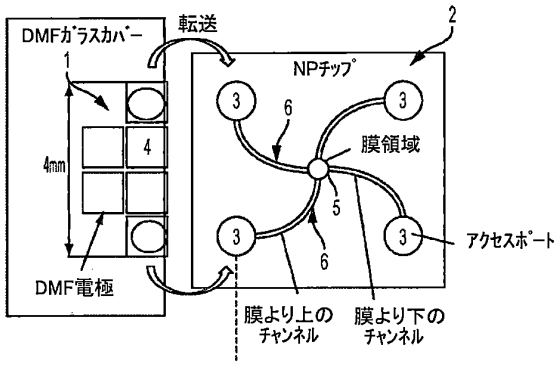


FIG. 17

【図１８】

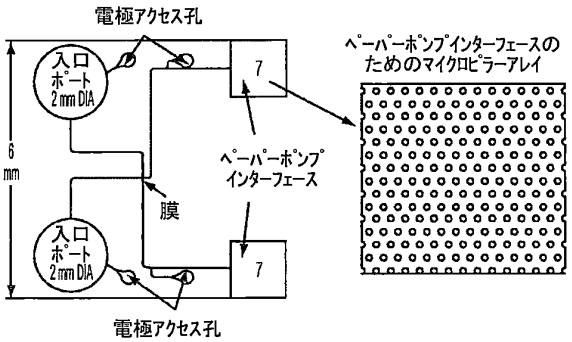


FIG. 18

【図１９】

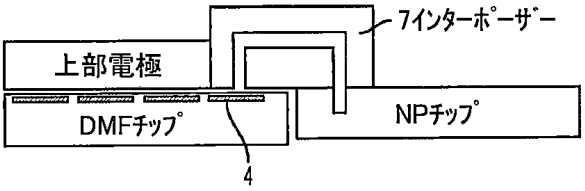


FIG. 19

【図２０】

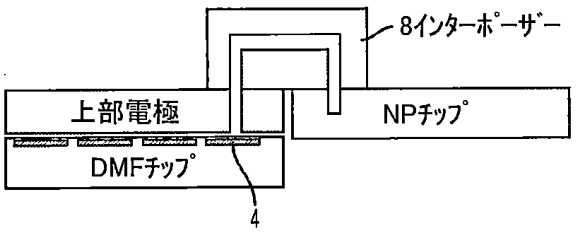


FIG. 20

【図２１】

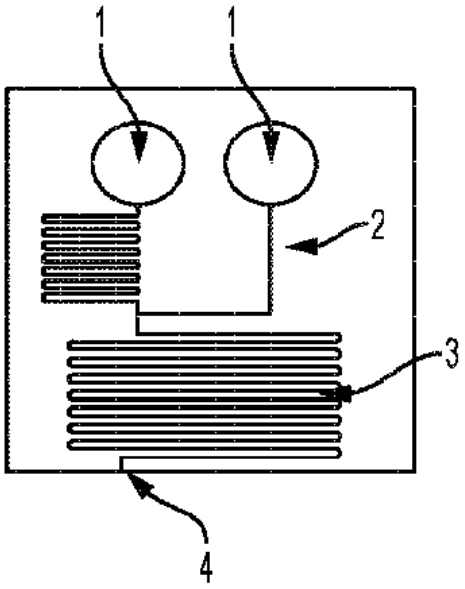


FIG. 21

【図２２】

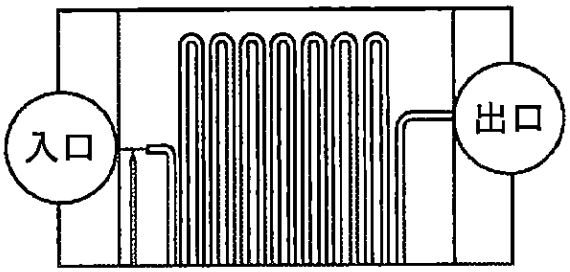


FIG. 22

【図２３Ａ】

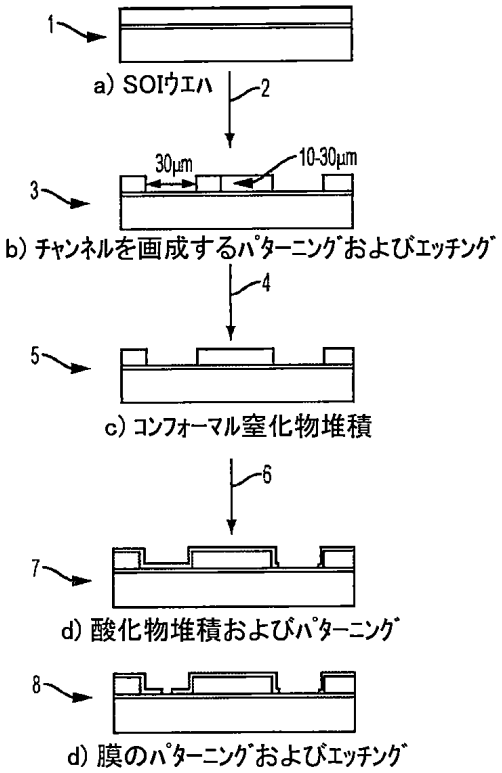


FIG. 23A

【図２３Ｂ】

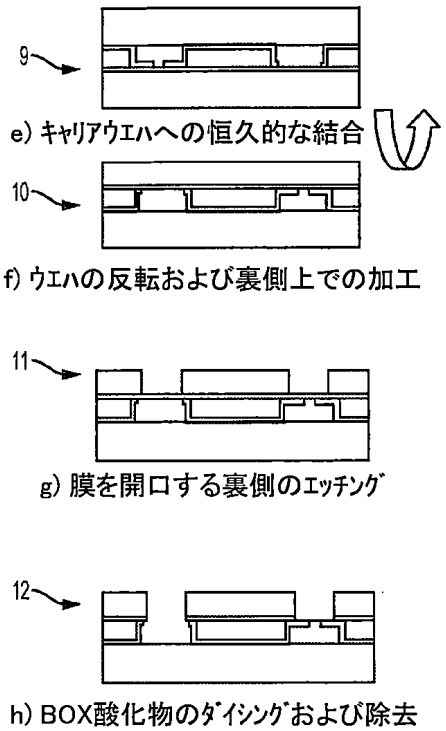


FIG. 23B

【図２４Ａ】

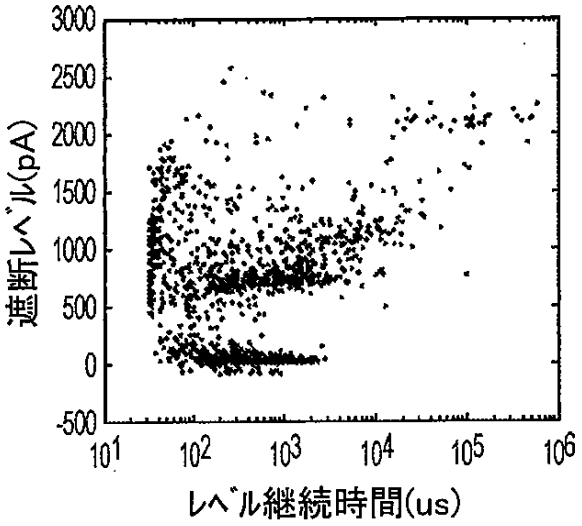


FIG. 24A

【図２４Ｂ】

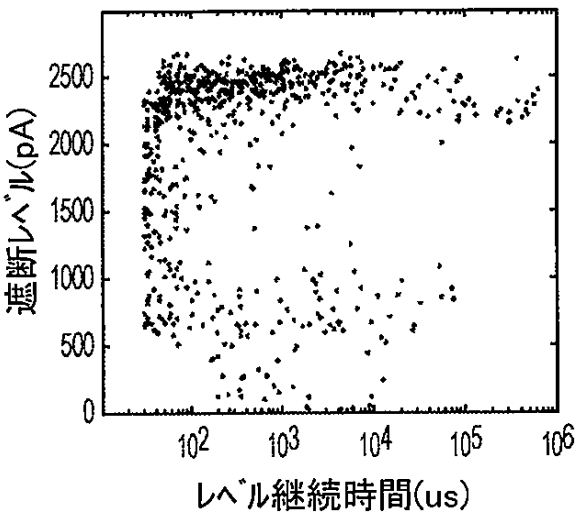


FIG. 24B

【図２４Ｃ】

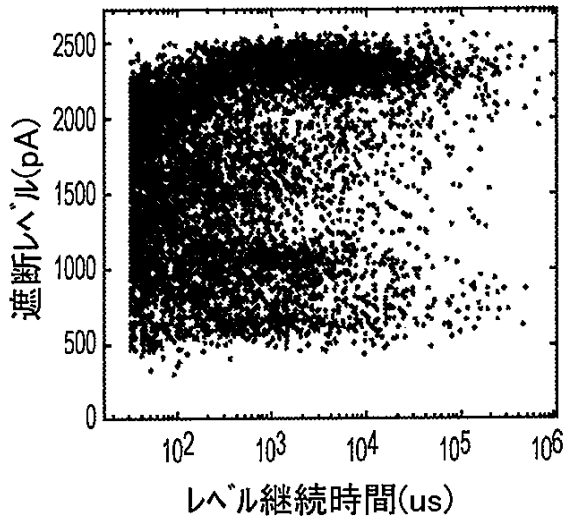


FIG. 24C

【図２５】

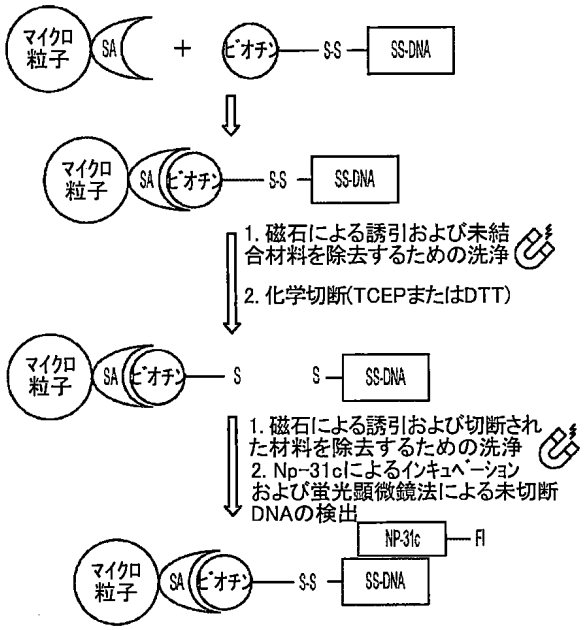


FIG. 25

【図２６Ａ】

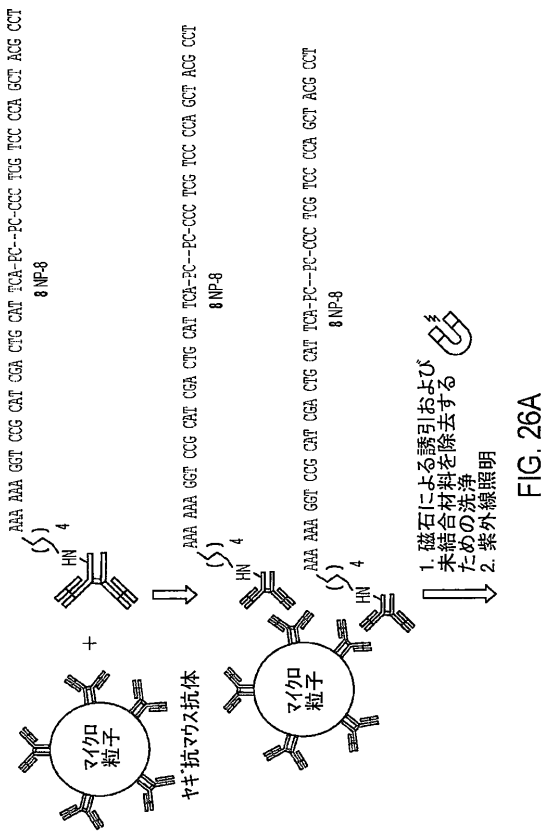


FIG. 26A

【図２６Ｂ】

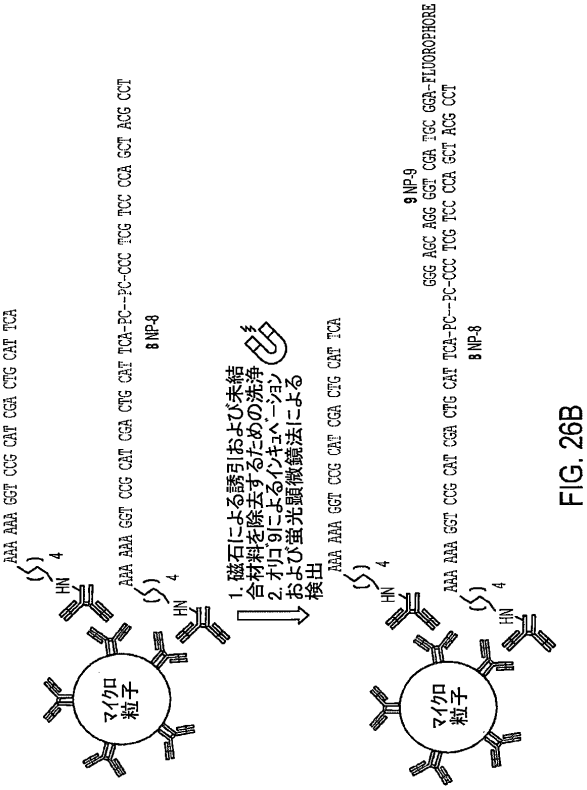


FIG. 26B

【図２７】

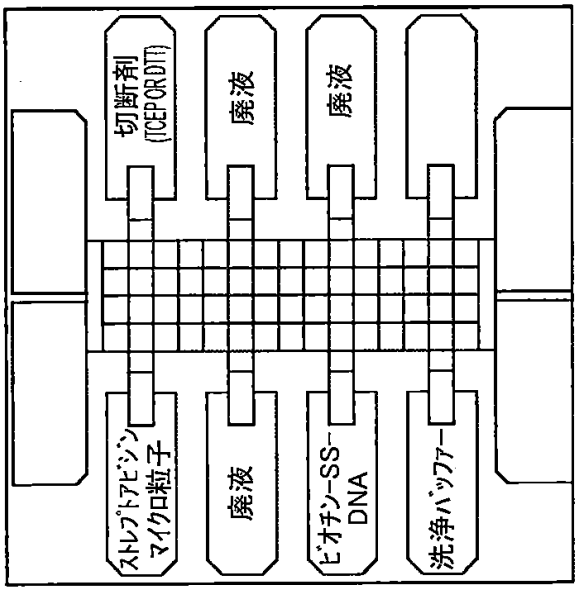


FIG. 27

【図２８】

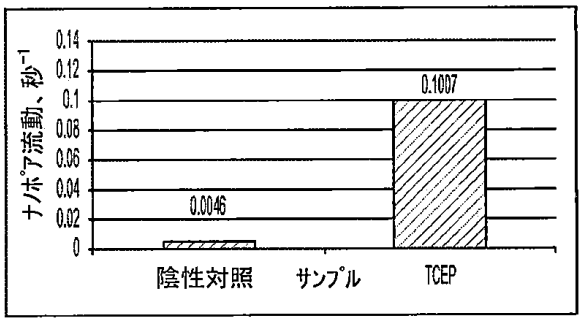


FIG. 28

【図２９】

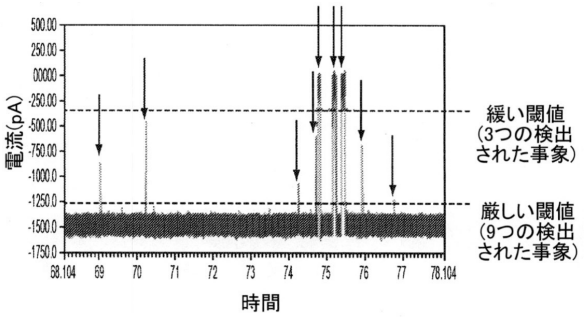


FIG. 29

【図３０Ａ】

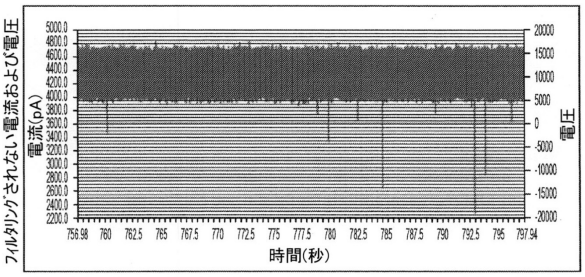


FIG. 30A

【図３０Ｂ】

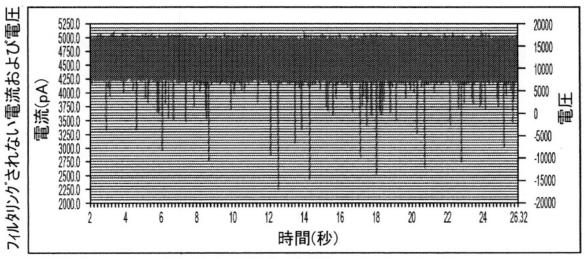


FIG. 30B

【図３０Ｃ】

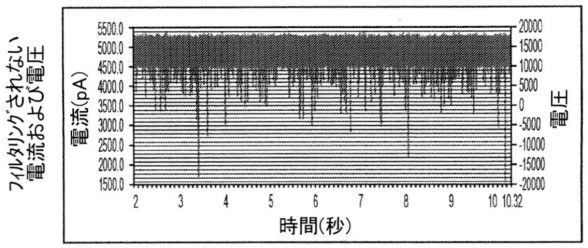


FIG. 30C

【図３１】

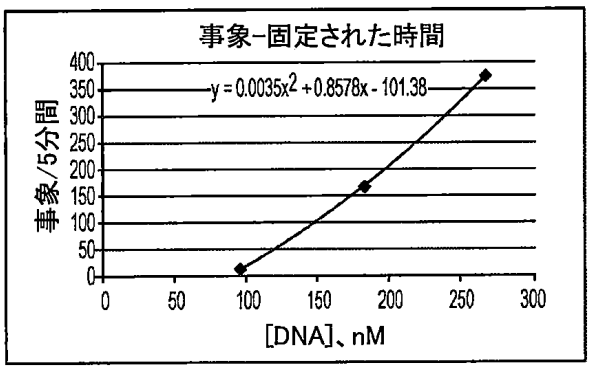


FIG. 31

【図３２】

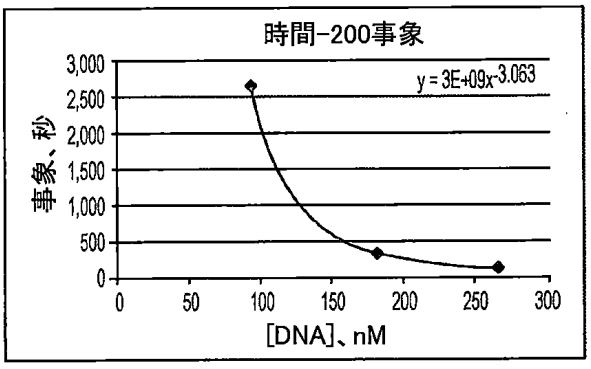


FIG. 32

【図３３】

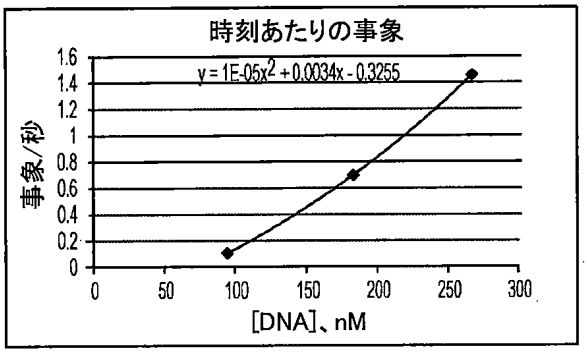


FIG. 33

【図３４】

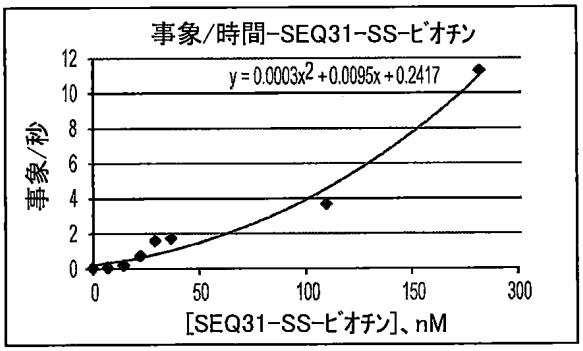


FIG. 34

【図３５】

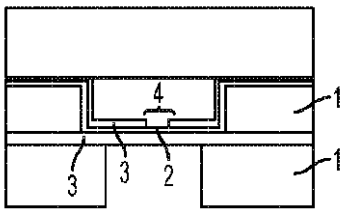


FIG. 35

【図３６】

パラメーター	値
ナノポアのサイズ	10 nm
ナノポアの形態	球状シリンダー
SiNx膜のサイズ	無限に大きい
SiNx膜の厚さ	50 nM
SiNx膜の粗度(R_a)	0 nM
SiNxチャージ密度	-30 mC/m^2
シリコン抵抗性	30 Ω-cm
電解質濃度	1 M KCl
感知電圧	-200 TO +200 mV
チャンネル高	725 μm
SiO_2直径	0-4,500 nM
SiO_2チャージ密度	-50 mC/m^2
SiO_2厚さ	100 nm

FIG. 36

【図３７】

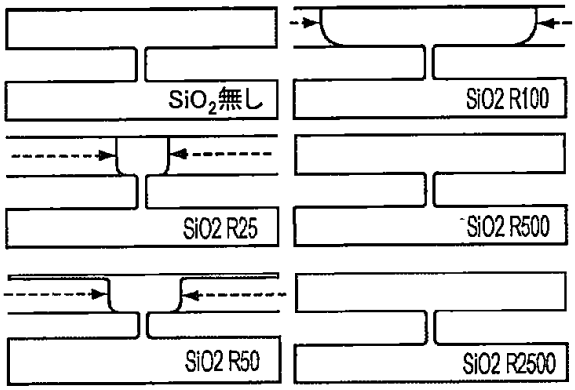


FIG. 37

【図３８】

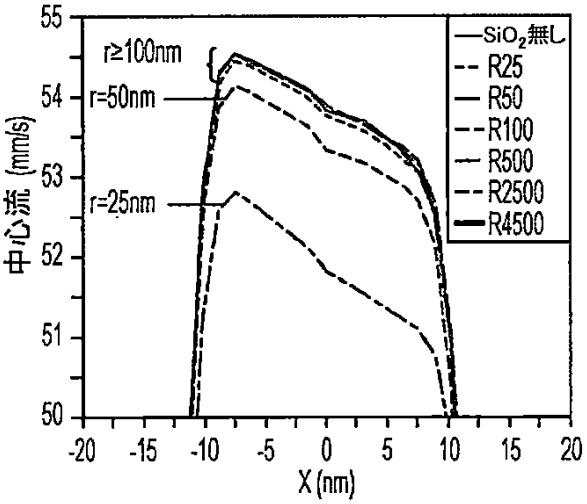


FIG. 38

【図３９】

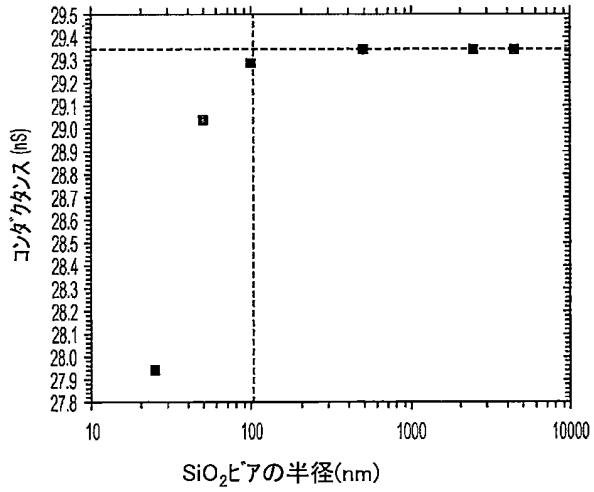


FIG. 39

【図４０】

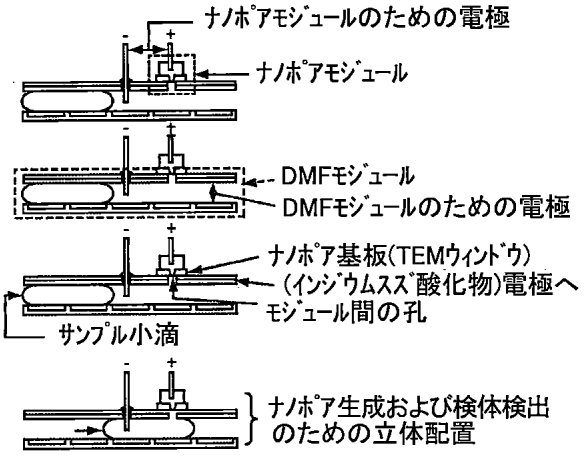


FIG. 40

【図４１】

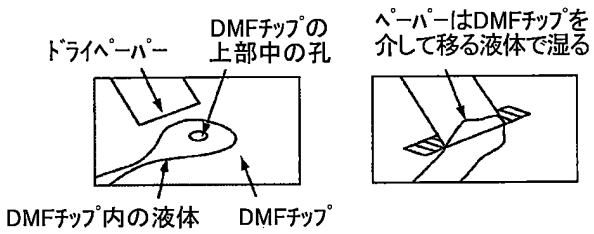


FIG. 41

【図４２】

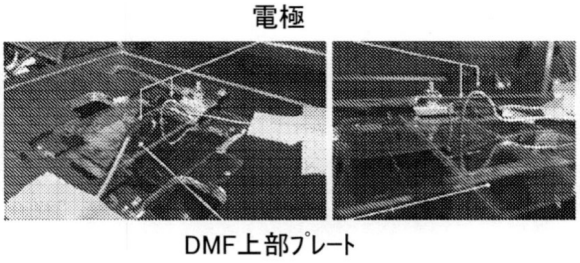


FIG. 42

【図４３】

FIG. 43

【図４４】

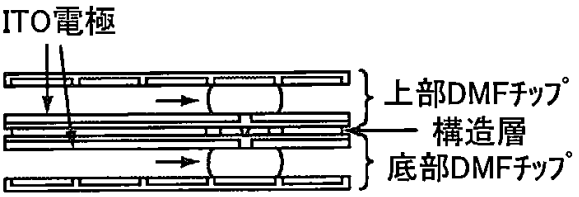


FIG. 44

【図４５】

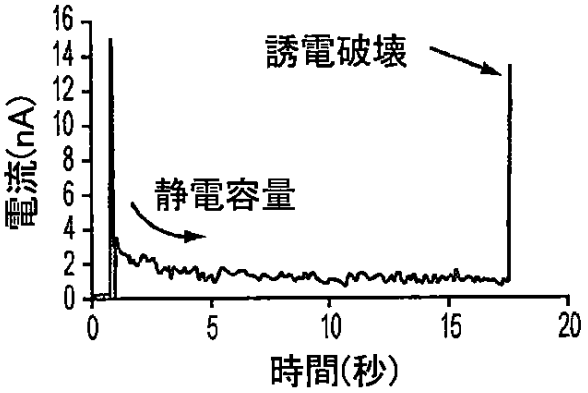


FIG. 45

【図４６Ａ】

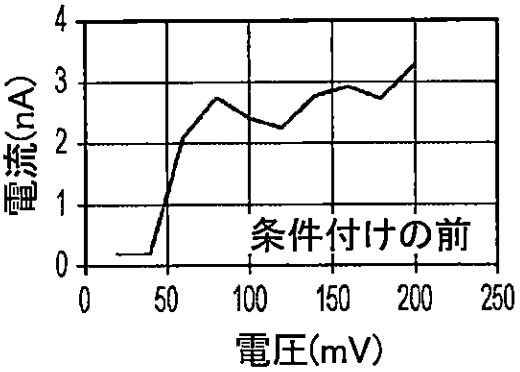


FIG. 46A

【図４６Ｂ】

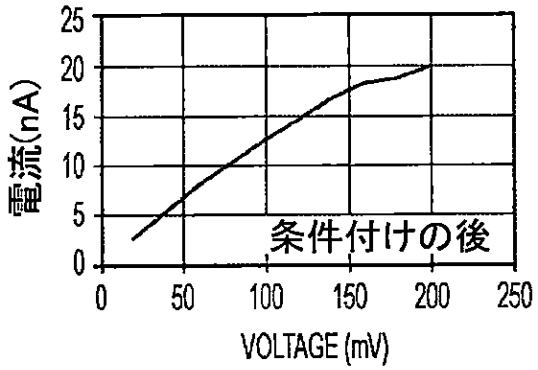


FIG. 46B

【図４７】

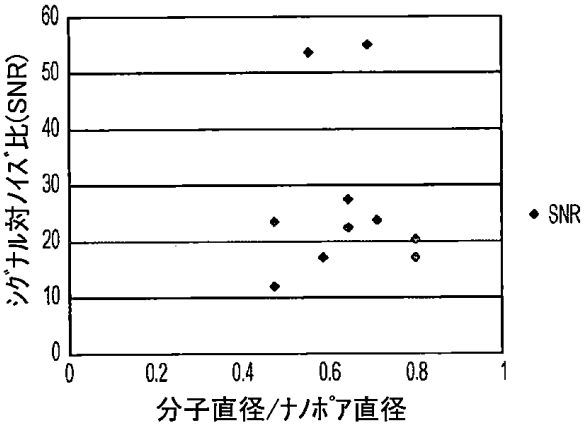


FIG. 47

フロントページの続き

(51)国際特許分類
G01N 29/02 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

FI
G01N 27/00 Z
G01N 29/02 501
C12M 1/34 B ZNA
C12Q 1/04

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/279,488
(32)優先日 平成28年1月15日(2016.1.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
(74)代理人 100137626
弁理士 田代 玄
(72)発明者 ハフ ジェフリー ビー
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６００６９ リンカーンシャー シャーウッド ドライヴ ２５
(72)発明者 ヘイデン マーク エイ
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６００４１ イングルサイド ウェスト シダーウッド ２５０５９
(72)発明者 カラバツォス ピーター ジェイ
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６００２２ グレンコー グリーンリーフ アベニュー ５０１
(72)発明者 シャパルズ アンドリュー エス
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 ５３１５８ プレザント プレーリー サーティサード アベニュー ９７０１
(72)発明者 ミュアホフ アンソニー エス
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 ５３１４３ ケノーシャ シックスティエイス プレイス １２１
(72)発明者 ボグダン フェリシア
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６００３１ ガーニー レッド パイン アベニュー ５０４６
(72)発明者 リーリー トマス
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 ５３１４２ ケノーシャ ワンハンドレッドアンドセヴンス アベニュー ６８２０
(72)発明者 ホレッツ－マコーマック シェリー アール
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６００８７ ウォキーガン バー オーク ドライヴ ３２１６
(72)発明者 ローレンソン ソフィー
スイス ４１２３ バーゼル－ラント アルシュヴィル アドレス ヘーゲンハイマーマットヴェーク １２７ サード－３－５
(72)発明者 フィッシャー アンドリュー ティー
アメリカ合衆国 テキサス州 ７６０３９ ユーレス ウィンストン ドライヴ １０１０
(72)発明者 ハーク リチャード
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６００７７ スコーキー パーク アベニュー ７８５０
(72)発明者 ハーシュバーガー ステファン
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６００３５ ハイランド パーク セント ジョンズ アベニュー １２１２
(72)発明者 ハウス ダスティン
アメリカ合衆国 テキサス州 ７５０１０ キャロルトン メア ロード ２３６１
(72)発明者 チャオ レイ
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６００４４ レイク ブラフ ノース バーチ アベニュー ２９５５４

(72)発明者　マーフィー エム ショーン
アメリカ合衆国 テキサス州 ７５０１３ アレン ティブロン コート １０３
(72)発明者　ポープ マーク アール
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６００３０ グレイズレイク ウェスト トレイル ５２０
(72)発明者　プリエト－バレンジー エドナ エム
アメリカ合衆国 テキサス州 ７５２０４ ダラス コール アベニュー ２６００ アパートメント ＃４１１
(72)発明者　ルアン チャオチャオ
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６００４７ キルディア ウェスト クリークサイド ドライヴ ２１２４７
(72)発明者　ソニ パティク
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６０６２２ シカゴ ウェスト ライス ストリート ２１４７ ユニット ＃２ダブリュー
(72)発明者　テティン セルゲイ
アメリカ合衆国 イリノイ州 ６００４６ リンデンハースト コンスティテューション ドライヴ ２６８０
(72)発明者　ヤーネル ライル
アメリカ合衆国 テキサス州 ７５０８２ リチャードソン イースト レナー ロード １２２５ アパートメント ＃３０４

審査官　北条 弥作子

(56)参考文献
米国特許出願公開第２０１５／００６９３２９（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１０／０１８１１９５（ＵＳ，Ａ１）
特表２０１１－５２１２２２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１３／０８３６２１（WO，Ａ１）
特表２００９－５３４６５３（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１０／０３０７９２２（ＵＳ，Ａ１）
特表２００８－５０５６３１（ＪＰ，Ａ）
特開２０１４－１６９９２０（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１４／１４４８９８（WO，Ａ１）
特表２０１２－５２６５５６（ＪＰ，Ａ）
特表２０１４－５２１９５６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００９／０９８５８２（WO，Ａ１）

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３７／００
Ｇ０１Ｎ　３３／４８－３３／９８
Ｇ０１Ｎ　２７／００
Ｃ１２Ｍ　１／３４
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）