

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-513924

(P2014-513924A)

(43) 公表日 平成26年6月19日(2014.6.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00 A	2G045
G01N 33/48 (2006.01)	G01N 33/48 M	4B024
C12M 1/26 (2006.01)	C12M 1/26	4B029
C12N 1/00 (2006.01)	C12N 1/00 Z	4B033
C12N 11/14 (2006.01)	C12N 1/00 N	4B063

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全40頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-556777 (P2013-556777)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月27日 (2012.2.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年10月29日 (2013.10.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/026781
 (87) 国際公開番号 W02013/012452
 (87) 国際公開日 平成25年1月24日 (2013.1.24)
 (31) 優先権主張番号 61/448,998
 (32) 優先日 平成23年3月3日 (2011.3.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 607 オークランド フランクリン ス
 トリート 1111 トゥエルフス フロ
 ア
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100119530
 弁理士 富田 和幸
 (74) 代理人 100136858
 弁理士 池田 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞操作用ナノピペット装置

(57) 【要約】

ナノピペットを用いて単細胞を含む表面上に所望の材料を制御排出する方法及びシステムを提供する。あるシステムは、細胞付着及び成長の制御目的のために任意の基板上にユーザ規定のパターンを堆積するx y zコントローラと組み合わせたナノピペットを有する方法及びシステムに向けるものである。他の実施例は、ナノピペットを有する方法及びシステムに向けたものであり、このナノピペットは、処理量が高く且つ細胞に対する損傷を最少にするように材料を細胞内に電気浸透注入するナノピペットの孔内の電圧差の電子制御部及びx y zコントローラと組み合わされているようにする。更に他の実施例は、官能化されたナノピペットを有する方法及びシステムに向けたものであり、このナノピペットは、分子間相互作用及び単一の生体細胞内の生体分子の検出を研究するために走査型イオンコンダクタンス顕微鏡と組み合わされている。

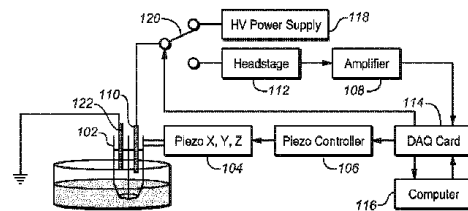


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

基板上の個々の細胞を操作する操作装置において、

(a) マルチパレル式のナノピペットであって、このマルチパレル式のナノピペットが、
(i) 第 1 のパレル内の液体と接触するように配置した第 1 の電極を収容している当該第 1 のパレルと、

(ii) この第 1 のパレルに隣接する第 2 のパレルであって、この第 2 のパレル内の液体と接触するように配置した第 2 の電極を収容している当該第 2 のパレルと、

(iii) 前記第 1 の電極に接続され、前記第 1 の電極及び前記第 2 の電極間の電圧を制御する増幅器と

を有する当該マルチパレル式のナノピペットと、

(b) このマルチパレル式のナノピペットに取り付けられ、サブミクロンの x 及び y ステップでこのマルチパレル式のナノピペットの機械的移動を行うとともに、前記基板に向かう又はこの基板から離れる z 方向でこのマルチパレル式のナノピペットを移動させる x y z コントローラであって、更にユーザ規定の制御に応じて前記機械的移動を制御する電子制御部を有している当該 x y z コントローラと、

(c) 前記第 1 の電極及び前記第 2 の電極間の電圧を制御するとともに、前記ナノピペット内の液体を排出させる必要のある所望の位置で前記第 1 のパレルから液体を排出させる排出電圧を前記第 1 の電極に印加し、且つ前記 x y z コントローラが、前記所望の位置から離れる方向で前記ナノピペットの機械的移動を行ない、これにより個々の細胞が排出された液体と接触しうるようにした際に、前記排出電圧を除去するようにする回路とを具える操作装置。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の操作装置において、電圧を制御する前記回路が、ピペットバイアス電圧を生じるとともに第 1 のパレルを流れるイオン電流を測定する低雑音増幅器を有するようにした操作装置。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の操作装置において、この操作装置が更に、前記 x y z コントローラのサブミクロン制御のための圧電アクチュエータを具えるようにした操作装置。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の操作装置において、この操作装置が更に、前記所望の位置を決定するユーザ入力のためのフィールドプログラマブルゲートアレイ (F P G A) を有するようにした操作装置。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の操作装置において、前記フィールドプログラマブルゲートアレイは、前記基板上のパターン内にスポットを堆積するようにプログラミングされているようにした操作装置。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の操作装置において、前記フィールドプログラマブルゲートアレイは、前記基板上の所定の位置にある細胞を注入するようにプログラミングされているようにした操作装置。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の操作装置において、前記フィールドプログラマブルゲートアレイは、前記細胞内のオルガネラを注入するようにプログラミングされているようにした操作装置。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 の何れか一項に記載の操作装置において、この操作装置は、それぞれの細胞が個々の位置にある複数の細胞を含むようにした基板に動作的に接続されている操作装置。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の操作装置において、前記基板は、個々の細胞を単一の空洞内に収容する寸法となるように内部に規定した複数の空洞を有するようにした操作装置。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の操作装置において、前記基板が、細胞を空洞内に保持するための負圧を加える貫通孔を有するようにした操作装置。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の操作装置において、前記空洞が、細胞を空洞に取り付けるための電極を具えるようにした操作装置。

【請求項 12】

サブミクロンの形態を有する所定のパターンで液体を堆積させる堆積方法において、
(a) 液体をマルチパレル式のナノピペット内に堆積するように配置するステップであって、このナノピペットは、

10

(i) 第 1 のパレル内の液体と接触するように配置する第 1 の電極を収容する当該第 1 のパレルと、

(ii) この第 1 のパレルに隣接する第 2 のパレルであって、この第 2 のパレル内の液体と接触するように配置する第 2 の電極を収容する当該第 2 のパレルと、

(iii) 前記第 1 の電極に接続され、前記第 1 の電極及び前記第 2 の電極間の電圧を制御する増幅器と

を有するようにするステップと、

20

(b) 前記マルチパレル式のナノピペットに取り付けられ、サブミクロンの x 及び y ステップでこのマルチパレル式のナノピペットの機械的移動を行うとともに、前記基板に向かう又はこの基板から離れる z 方向でこのマルチパレル式のナノピペットを移動させるようにした x y z コントローラであって、この x y z コントローラは更に、ユーザ規定の制御に応じて前記機械的移動を制御する電子制御部を有するようにする当該 x y z コントローラを動作させるステップと、

(c) 前記第 1 の電極及び前記第 2 の電極間の電圧を制御するとともに、前記ナノピペット内の液体を排出させる必要のある所望の位置で前記第 1 のパレルから液体を排出させる排出電圧を前記第 1 の電極に印加し、且つ前記 x y z コントローラが、前記所望の位置から離れる方向で前記ナノピペットの機械的移動を行なう際に、前記排出電圧を除去し、これにより前記液体が前記所定のパターンで堆積されるようにする回路を用いるステップと

30

【請求項 13】

請求項 12 に記載の堆積方法において、前記液体が細胞付着材料を有し、堆積されたこの細胞付着材料の領域でのみ基板上に細胞を取り付けるようにする堆積方法。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の堆積方法において、前記細胞付着材料をラミニンとする堆積方法。

【請求項 15】

請求項 12 に記載の堆積方法において、前記基板が均一のポリマーの頂面を具えるようにする堆積方法。

【請求項 16】

40

請求項 12 に記載の堆積方法において、前記液体が、堆積された細胞付着材料の領域でのみ前記基板上に細胞を取り付ける細胞付着材料を有しているようにするとともに、前記堆積方法は更に、培養すべき付着細胞を前記基板に被着させ、これにより前記細胞が細胞付着材料を有する領域にのみ付着されるようにするステップを具えている堆積方法。

【請求項 17】

請求項 12 に記載の堆積方法において、細胞付着材料を有する領域が、100 平方マイクロン当たり少なくとも約 10 個のスポットの密度にあるようにする堆積方法。

【請求項 18】

請求項 12 に記載の堆積方法において、この堆積方法を、ナノピペットの異なるパレルから異なる材料を堆積するのに用いるようにする堆積方法。

50

【請求項 19】

請求項 12 ~ 18 の何れか一項に記載の堆積方法において、前記ナノピペットを石英から形成し、このナノピペットが約 20 ~ 100 nm の開口を有するようにする堆積方法。

【請求項 20】

基板上的に選択された細胞内に材料を注入する注入方法において、

(a) 液体をマルチバレル式のナノピペット内に注入するように配置するステップであって、このマルチバレル式のナノピペットは、

(i) 第 1 のバレル内の液体と接触するように配置する第 1 の電極を収容する当該第 1 のバレルと、

(ii) この第 1 のバレルに隣接する第 2 のバレルであって、この第 2 のバレル内の液体と接触するように配置する第 2 の電極を収容する当該第 2 のバレルと、

(iii) 前記第 1 の電極に接続され、前記第 1 の電極及び前記第 2 の電極間の電圧を制御する増幅器と

を有するようにするステップと、

(b) 前記マルチバレル式のナノピペットに取り付けられ、サブミクロンの x 及び y ステップでこのマルチバレル式のナノピペットの機械的移動を行うとともに、前記基板に向かう又はこの基板から離れる z 方向でこのマルチバレル式のナノピペットを移動させるようにした x y z コントローラであって、この x y z コントローラは更に、ユーザ規定の制御に応じて前記機械的移動を制御する電子制御部を有するようにする当該 x y z コントローラを動作させるステップと、

(c) 前記第 1 の電極及び前記第 2 の電極間の電圧を制御するとともに、前記ナノピペット内の液体を排出させる必要のある所望の位置で前記第 1 のバレルから液体を排出させる排出電圧を前記第 1 の電極に印加し、且つ前記 x y z コントローラが、前記所望の位置から離れる方向で前記ナノピペットの機械的移動を行う際に、前記排出電圧を除去し、これにより前記液体が前記細胞内に注入されるようにする回路を用いるステップとを具える注入方法。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の注入方法において、この注入方法が更に、前記基板内の空洞であって、個々の細胞のみを保持する寸法とした当該空洞内に前記細胞を配置することにより、前記基板上的の前記細胞を固定化するステップを具える注入方法。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の注入方法において、この注入方法が更に、前記細胞の固定化の援助のために前記空洞にまたがる圧力差を加えるステップを具える注入方法。

【請求項 23】

請求項 21 に記載の注入方法において、注入された前記材料を、ポリ核酸、抗体及び染料より成る群から選択するようにする注入方法。

【請求項 24】

基板上的に個々の細胞内の検体を検出する検出装置において、

(a) 第 1 の電極を収容するバレルを有するナノピペットであって、この第 1 の電極は、前記細胞に接触する液体内の第 2 の電極である基準電極と接触するように前記検体を保持するとともに、使用中に前記第 1 及び第 2 の電極間の電圧を制御する回路に接続されているようにした当該ナノピペットと、

(b) 前記ナノピペットに取り付けられ、サブミクロンの x 及び y ステップで前記ナノピペットの機械的移動を行うとともに、z 方向でこのナノピペットを移動させるようにした x y z コントローラであって、この x y z コントローラは更に、ユーザ規定の制御に応じて前記機械的移動を制御する電子制御部を有している当該 x y z コントローラとを具えており、

(c) 前記ナノピペットの先端部が、先端部付近の前記細胞内で内側表面上に固定された検体結合材料を有するようにした検出装置。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

請求項 24 に記載の検出装置において、前記検体結合材料をタンパク質又はポリ核酸とした検出装置。

【請求項 26】

請求項 24 に記載の検出装置において、前記検体結合材料を、スルホ S M C C により前記内側表面上のポリエリジン (P L L) 被膜に結合されたタンパク質とした検出装置。

【請求項 27】

単一の生細胞内の生体分子を検出する検出方法において、

- (a) 官能化されたナノピペットを、細胞内で規定の深さに配置するステップと、
- (b) 電流を監視して細胞膜付近のナノピペットの正確な位置を制御するステップと、
- (c) ナノピペットを高速度で細胞内に挿入するステップと、
- (d) 高電圧を印加するステップと、
- (e) 電流変化を測定して細胞内の生体分子を検出するステップと

を具備し、前記官能化されたナノピペットはシステムに設けられており、更にこのシステムは、ピペットをバイアスするとともに電流測定を行う増幅器と、X、Y及びZ方向で制御を行うマイクロマニピュレータと、X、Y及びZ方向で微細制御を行う圧電アクチュエータと、構造化可能な集積回路と、高電圧源と、低電圧及び高電圧間の切換えを行うリレーとを具備しているようにする検出方法。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の検出方法において、前記ナノピペットを抗体で官能化する検出方法。

【請求項 29】

請求項 27 に記載の検出方法において、前記ナノピペットをアプタマーで官能化する検出方法。

【請求項 30】

請求項 27 に記載の検出方法において、この検出方法を、免疫測定法で単一の生細胞内で用いるようにする検出方法。

【請求項 31】

請求項 27 に記載の検出方法において、前記ナノピペットを受容体リガンドで官能化する検出方法。

【請求項 32】

請求項 27 に記載の検出方法において、前記検出は、単一の生細胞内でのがんタンパクの検出とする検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体分子の単細胞注入、パターン化及び検出用のナノデバイス及びナノセンサに関するものである。

【0002】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2011年3月3日に提出された出願番号61/448,998の米国特許仮出願の優先権を主張するものであり、この米国特許仮出願の開示内容全体は、参考のためにここに導入されるものである。

【0003】

[政府支援声明]

本発明は、米国航空宇宙局 (N A S A) により与えられた契約番号 N C C 9 1 6 5 及び N N X 0 8 B A 4 7 A や、米国国立衛生研究所により与えられた契約番号 P 0 1 H G 0 0 0 2 0 5 や、N A S A により与えられた契約番号 N N X 0 9 A Q 4 4 A や、米国国立がん研究所により与えられた契約番号 U 5 4 C A 1 4 3 8 0 3 の下での政府支援に基づい

10

20

30

40

50

て達成されたものである。米国政府はこの発明に、ある権利を有するものである。

【0004】

[配列表、コンピュータプログラム又はコンパクトディスクに関する参照]

該当なし。

【背景技術】

【0005】

[関連技術]

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

10

【0006】

ナノピペット技術は多くの適用分野に対して使用可能なプラットフォームであるとみられている。Actis 氏等(二人の本発明者を含む)は、S T I N G (Signal Transduction by Ion Nano Gating; イオンナノゲーティングによるシグナル変換)と称される検出用プラットフォームを開発し、この場合、石英ナノピペットの最先端部を化学的な又は生物学的な受容体で官能化している(文献: Biosensors & Bioelectronics, 2010. 26(2): pp. 333-337 の“Ultrasensitive mycotoxin detection” Actis P. 氏、O. Jejelowo 氏及び N. Pourmand 氏著参照)。石英ナノピペットの最先端部におけるナノメートルスケールの開口は、付着した受容体と結合している検体に感応する領域を形成する。更に、Rodolfa 氏等は、官能化された表面上に制御析出させるのに、ナノピペットを用いることができることを確かめている(文献: Angewandte Chemie-International Edition, 2005. 44(42): pp. 6854-6859の“Two-component graded deposition of biomolecules with a double-barreled nanopipette” Rodolfa K. T. 氏等著参照)。更なる研究では、無機溶媒中で、表面上に材料(物質)を堆積することが実証されている(文献: Nano Letters, 2006. 6(2): p.6 の“Nanoscale pipetting for controlled chemistry in small arranged water droplets using a double-barrel pipet” Rodolfa K. T. 氏等著参照)。又ナノピペットを用いることで、個々の分子が細胞の原形質膜に与えられた(文献: Biophysical Journal, 2007. 93: pp. 3120-3131の“Nanopipette delivery of individual molecules to cellular compartments for single-molecule fluorescence tracking” Bruckbauer A. 氏等著参照)。

20

30

【0007】

Laforge 氏等は、ナノピペットの開口に形成された液液界面にまたがって電圧を印加することにより液体を送出するナノピペットに基づく電気化学的アトシリンジを開発した(文献: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. 104(29): pp. 11895-11900 の“Electrochemical attsyringe” Laforge F. O. 氏著参照)。これにより得られる力は、液体の流れをピペット内に導入するとともにピペットから導出させる十分に強いものである。これらの電気化学的アトシリンジはこの効果を良好に用いて、フェムトリットルの水溶液を培養中の哺乳類細胞内に供給しうる。炭素ナノピペットも同様に細胞注入に効果があることが分かっている。蛍光染料を口腔扁平がん細胞内に圧力駆動注入することは、Schrlau 氏等により実証されている(文献: Nanotechnology, 2008: p. 015101-1-4 の“Carbon nanopipettes for cell probes and intracellular injection” 参照)。

40

【0008】

[細胞のパターン化]

細胞の付着及び増殖を制御することは、神経科学から肝細胞研究までの生物分野におけ

50

る重要なテーマとして浮上した（文献：IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2000. 47(1): pp. 17-21 の “Aligned Microcontact Printing of Micrometer Scale Polylysine Structures for Controlled Growth of Cultured Neuronson Planar Microelectrode Arrays” James C. D.氏等著及び文献：Journal of Neuroscience Methods, 2005. 142(2): pp. 243-250の “Photo-chemically patterned polymer surfaces for controlled PC-12 adhesion and neurite guidance” Welle A. 氏等著参照）。細胞を何処で且つ如何に成長（生育）させ且つ熟成させるかを制御することにより、細胞の成長中に特定の特性を誘導させることができる。例えば、化学キューにより神経細胞分化を制御して、特定の実験に対して軸索成長の方向を予め決定させるとともにカスタマイズさせるようにすることができることは、Oliva 氏等により確かめられている（文献：Neurochemical Research, 2003. 28(11): pp. 1639-1648 の “Patterning axonal guidance molecules using a novel strategy for microcontact printing” 参照）。同様に、インクジェット印刷が神経幹細胞分化を制御しうることが確かめられている（文献：Biomaterials, 2007. 28(27): pp. 3936-3943 の “Inkjet printing of macromolecules on hydrogels to steer neural stem cell differentiation” Ilkhanizadeh S. 氏等著参照）。

10

【0009】

複数の方法を用いて細胞のパターン化を研究した。半導体製造技術で達成された進歩を利用することにより、単細胞を導くのに充分小さい形状を有するパターンが可能となった。最も広く用いられている細胞のパターン化成技術はマイクロ接触プリンティング（ $\mu\text{C}\text{P}$ ）であり、この場合、従来のフォトリソグラフィ技術を用いてマスターモールド（型）を製造し、このマスターモールドからエラストマーのスタンプを形成する。次いで、このスタンプに生体分子を塗布し、任意の基板（サブストレート）にパターンを与えることができる（文献：Advanced Materials, 1994. 6(7-8): pp. 600-604 の “Microfabrication by microcontact printing of self-assembled monolayers” Wilbur J.L.氏等著参照）。この方法によれば、特に制御神経成長領域（アリーナ）において、細胞の成長を制御するのに多数の成功があることが確かめられている（文献：Biotechnology Progress, 2003. 19(2): pp. 243-253の “Integration of cell culture and microfabrication technology” Park T.H.及びM.L. Shuler 氏著参照）。放射線を、マスクを介して基板に当てることにより、界面化学を変更させ、これにより特定の付着分子を適切な領域内に配置させるようにすることができる（文献：Journal of Neuroscience Methods, 2005. 142(2): pp. 243-250の “Photo-chemically patterned polymer surfaces for controlled PC-12 adhesion and neurite guidance” Welle A.氏等著参照）。更に細胞成長を制御する地理学的（トポグラフィック）キューが確かめられた。細胞が細胞と界面を形成する表面粗さを変更させることにより、付着力を制御することができる。化学的な付着キューと地理学的な付着キューとの組み合わせも、細胞分化を改善させるものとして確かめられている（例えば、文献：Journal of Neuroscience Methods, 1998. 82(2): pp. 167-173 の “Microlithographic determination of axonal/ dendritic polarity in cultured hippocampal neurons” Stenger D.A.氏等著参照）。これらの方法に対する欠点は、一旦パターンが設計されて製造されると、新たなマスクを設計したり、処理全体を最初から再開したりすることなしにこのパターンを変更させることができないということである。標準の半導体製造技術に頼らない、従って、製造処理により制限されないうでパターン化を行う幾つかの方法が開発された。Gustavsson氏等は、100 pLのドロップレットを6～8 μm の精度で堆積させうる圧電駆動型のマイクロディスペンサを実証した（文献：Biomaterials, 2007. 28(6): pp. 1141-1151の “Neurite guidance on protein micropatterns generated by a piezoelectric microdispenser” 参照）。つけペンリソグラフィや万年筆リソグラフィによれば、Schmidt R.C.及びK.E. Healy氏により確認されているように、大きさが40 nm程度のスポットをユーザが規定した任意のパターンに堆積しうるのである（文献：Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009. 90A(4): pp. 1252-1261の “Controlling biological interfaces on the nanometer length scale” 参照）。しかし、この技術は、所定の時間で単一のパターンのみを堆積するのに制限されている。

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

以下に説明する石英ナノピペット技術を用いることにより、基板上に堆積されるパターンがコンピュータ制御され、従って、このパターンを如何なる時にもユーザにより変更しうようになり、互いに関連させて記録される複数のパターンを容易に堆積しうるものである。このパターンを用いて図2に示すように基板216に対する細胞の付着を達成することができ、この場合、付着材料が堆積されている基板上の点に細胞212が付着されている。

【 0 0 1 1 】

[細胞注入]

細胞注入方法は、歴史的に引上式ガラスマイクロピペットを用いている。従来のマイクロピペットは、代表的な細胞に比べて寸法が大きいとか、細胞の生存性が低いとか、熟練オペレータの条件及びフィードバックに欠けているとかの欠点を含む幾つかの欠点を有している(文献: IEEE Transactions on Automation Science and Engineering, 2007. 4(3): pp. 322-331の“Evaluating the effect of force feedback in cell injection” Pillarisetti A.氏等著及び文献: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. 98(8): pp. 4295-4298の“The many ways to cross the plasma membrane” Stephens D.J.及びR. Pepperkok氏著参照)。

【 0 0 1 2 】

上述した欠点を軽減させるための細胞注入用の多数の他の方法が開発された。電気穿孔法のような方法や、毒素ストレプトリジンO (SL O)を形成する細孔の使用が、材料を細胞内に受動伝達するために開発された(文献: Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. 397(8): pp. 3235-3248の“Single-cell electroporation” Wang M.Y.氏等著; 文献: Biochemical Journal, 1986. 234(3): pp. 497-506の“Gaining access to the cytosol - the technique and some applications of electropermeabilization” Knight D.E.及びM.C. Scrutton氏著; 文献: Nucleic Acids Research, 1998. 26(7): pp. 1567-1575の“Selecting optimal oligonucleotide composition for maximal antisense effect following streptolysin O-mediated delivery into human leukaemia cells” Giles R.V.氏等著参照)。電気穿孔法は、高電圧を印加することにより細胞膜内に一時的な透過性を導入し、その後材料を拡散しうようにするものとして実証されている。細胞は、ある状況の下でSL Oの障害を治療する能力を呈した。どちらの場合も細胞に歪が導入され、SL Oの障害の場合には、摂取量が~100 kDaに制限される。

【 0 0 1 3 】

細胞注入の直接的な方法は、他の関係のないナノ加工構造体を用いて実証されている。AFMの先端上に製造されDNAで被覆されたナノニードルが単細胞内に挿入された。注入はナノニードルからのDNAの拡散により達成された(文献: Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2008: pp. 215-225の“High-efficiency DNA injection into a single human mesenchymal stem cell using a nanoneedle and atomic force microscopy” Sung-Woong H.氏等著参照)。同様に、細胞内で量子ドットをナノニードルに結合させるジスルフィド結合を開裂させることによりこれらの量子ドットが放出された(文献: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. 104(20): pp. 8218-8222の“A cell nanoinjector based on carbon nanotubes” Chen X.氏等著参照)。

【 0 0 1 4 】

[細胞内分子種の単細胞生体内検出]

細胞内記録を行う幾つかの方法が開発された。Kopelman氏及びその協力者は、pH及び一酸化窒素を細胞外監視するために化学的に修飾されたテーパ型光ファイバを適用することを開発した(文献: Science 258, 778-781, doi: 10.1126/science.1439785, 1992の“Submicrometer intracellular chemical optical fiber sensors” Tan W.氏等著及び文献: Analytical Chemistry 71, 2071-2075, doi: 10.1021/ac9901081, 1999の“Cellular Applications of a Sensitive and Selective Fiber-Optic Nitric Oxide Biosensor Based

on a Dye- Labeled Heme Domain of Soluble Guanylate Cyclase” Barker S. L. R.氏等著参照)。Vo-Dihn氏及びその協力者は、単細胞中の蛍光被検体を測定するために抗体修飾された光ファイバを分析応用することを報告している(文献:Nat Biotech 18: 764-767, 2000の“Antibody-based nanoprobe for measurement of a fluorescent analyte in a single cell” Vo-Dihn氏等著参照)。テーバ型光ファイバを採用することによる利点の1つは、近接場走査型光学顕微鏡を用いて達成しうる高空間分解能に頼るものである。センサは、細胞に対する損傷を回避するために、顕微鏡下で注意深く操作する必要がある。これらの物理的な制約に加えて、細胞質内の多くの妨害種の為に、アフィニティ法により生体分子を選択的に検出すること自体に挑戦が行われている。つい最近では、光ファイバナノバイオセンサが、酸素サンドイッチ免疫測定法により単細胞中のがんバイオマーカーを検出するように構成された(文献:Biosensors and Bioelectronics 25: 1548-1552, 2010の“Single living cell detection of telomerase over-expression for cancer detection by an optical fiber nanobiosensor” Zheng X. T.及びLi C. M.氏著参照)。電気的な検出方法は、耐久性、感度、高速応答及び他の装置の構成要素との一体化において改善されている為に他の方法よりも適していることが知られている。たとえそうでも、細胞内測定用の、電気に基礎を置くセンサは多くの課題に直面している。微小電極は通常、代表的な哺乳類細胞を損傷させるほど十分に大きく(5~10 μ m)、少なくとも10倍大きい卵母細胞及び胚中で測定するのに手順がしばしば制限される。最近、Hai A.氏等は細胞の内側に突出する微小電極を用いてサブシュレシヨルドシナプス電位を測定した(文献:Nature Methods (2010) 7, 200-202における“*In-cell recordings by extracellular microelectrodes*”参照)。Bakker E. 及びPretsch E.氏によるイオン選択性膜が被覆された微小電極を用いる良好な細胞内陽イオン及びpHセンサ(文献:TrAC Trends in Analytical Chemistry 27, 612-618の“Nanoscale potentiometry”参照)にもかかわらず、細胞内で生体分子を電気的に検出するのは分かりにくいままである。Lieber氏及びその協力者は、リン脂質二重層を用いて変更されたナノスケールの電界効果トランジスタ(ナノFET)が、単細胞の浸透を達成させるとともに細胞内電位を記録しうるようにした新規な方法を開発した(文献:Science 329, 830-834, doi: 10.1126/science.1192033, 2010の“Three-Dimensional, Flexible Nanoscale Field-Effect Transistors as Localized Bioprobes” Tian B.氏等著参照)。しかし、単細胞の内部における生体分子の相互作用を検出するのに電気的なセンサが用いられなかった。

10

20

30

40

50

【0015】

STING (Signal Transduction by Ion Nano-Gating; イオンナノゲーティングによるシグナル変換)技術は、試料中のDNA、タンパク質及びマイコトキシンを検出しうるものとしても確かめられている(文献:Chem Commun (Camb), (2009), 4877-4879, doi: 10.1039/b910511eの“Nanopore DNA sensors based on dendrimer -modified nanopipettes” Fu Y.氏等著; 文献:Proceedings of the National Academy of Sciences (2009) 106, 4611-4616, doi: 10.1073/pnas.0900306106の“Label-free biosensing with functionalized nanopipette probes” Umehara S.氏等著; 文献:Biosensors and Bioelectronics (2010)26, 333-337の“Ultrasensitive mycotoxin detection by STING sensors” Actis P.氏等著参照)。官能化された石英のナノピペットに基づいたSTING技術は、如何なるナノファブリケーション施設をも必要としない。すなわち、各プローブは容易に且つ廉価にベンチ仕様でできる。受容体分子は良好に確立された表面化学を用いて導入しうる。バイオセンシング以外には、ナノピペットプラットフォームを用いて、単分子生物物理学である個々の細胞内部でのコントロールデリバリーを研究するとともに、ナノスケールで細胞を記録している(文献:Angew Chem Int Ed Engl (2005), 44, 3747-3750, doi: 10.1002/anie.200500196の“Trapping of proteins under physiological conditions in a nanopipette” Clarke R. W.氏等著; 文献:Proceedings of the National Academy of Sciences (2007), 104, 11895-11900, doi: 10.1073/pnas.0705102104の“Electrochemical attosyringe” Laforge F. O.氏等著; 文献:Nanomedicine (Lond) (2006), 1, 107-114, doi: 10.2217/17435889.1.1.107の“Potential biomedical applications of the

scanned nanopipette” Klenerman D. 及び Korchev Y. 氏著参照)。Vitol 氏及びその協力は細胞内解析のための S E R S 活性炭ナノピペットを開発した（文献：Nano technology, (2010), 015304 の “Small diameter carbon nanopipettes” Singhal R. 等著参照）。外側表面のピペット先端上に金のナノ粒子を導入することにより S E R S の官能性が加えられた。ナノピペットを核内に挿入することにより得られた S E R S スペクトルは DNA と関連する代表的な特性を示している。

【0016】

しかし、生体細胞内で動作しうるナノピペットバイオセンサの必要性が当該技術分野に残っている。

【0017】

[特定の特許及び刊行物]

2010年3月25日に出願された米国特許出願公開2010/0072080（発明者：Karhanek 氏等）には、ペプチド及びタンパク質を含む生体分子を検出するための官能化されたナノピペットを具える方法及び装置が開示されている。

2009年3月24日に発行された刊行物：Proceedings of the National Academy of Sciences, vol 106の第4611～4616頁（Umehara 氏等著）には、官能化されたナノピペットの電極を用いる無標識リアルタイムタンパク質測定が開示されている。

2009年に発行された刊行物：Biochemical Society Transactions, vol 37の第702～706頁（Ying Liming氏著）は、ナノピペットについて論評しており、且つイオン、（生体分子を含む）分子及び細胞のナノセンシング及びナノマニピュレーションにこれらナノピペットを使用することについて論評している。

2010年に発行された刊行物：Bioanalytical Reviews 1, 177-185, doi:10.1007/s12566-010-0013-y（Actis P. 氏等著）は、核酸及び低分子タンパク質用の電気化学バイオセンサとしてナノピペット技術を適用することについて論評している。

1990年5月8日に発行された “Scanning Ion Conductance Microscope” と題する米国特許 US 4, 924, 091（発明者：Hansma氏等）には、マイクロピペットプローブを表面から一定のコンダクタンス距離に保つことにより、電解質で被覆された柔軟な非導電性表面のトポグラフィを撮像しうる走査型イオンコンダクタンス顕微鏡（SICM）が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0018】

【特許文献1】米国特許出願公開2010/0072080

【特許文献2】米国特許US4,924,091

【特許文献3】米国特許US5,394,741

【特許文献4】米国特許US5,660,985

【特許文献5】米国特許US5,567,588

【特許文献6】米国特許US5,660,985

【特許文献7】米国特許US5,756,703

【特許文献8】米国特許US5,580,737

【特許文献9】米国特許出願公開第2009/0318363号明細書

【特許文献10】米国特許US6,335,440

【特許文献11】米国特許US7,597,941

【非特許文献】

【0019】

【非特許文献1】Biosensors & Bioelectronics, 2010. 26(2): pp. 333-337

【非特許文献2】Angewandte Chemie-International Edition, 2005. 44(42): pp. 6854-6859

【非特許文献3】Nano Letters, 2006. 6(2): p.6

【非特許文献4】Biophysical Journal, 2007. 93: pp. 3120-3131

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 5】Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. 104(29): pp. 11895-11900
- 【非特許文献 6】Nanotechnology, 2008: p. 015101-1-4
- 【非特許文献 7】IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2000. 47(1): pp. 17-21
- 【非特許文献 8】Journal of Neuroscience Methods, 2005. 142(2): pp. 243-250
- 【非特許文献 9】Neurochemical Research, 2003. 28(11): pp. 1639-1648
- 【非特許文献 10】Biomaterials, 2007. 28(27): pp. 3936-3943
- 【非特許文献 11】Advanced Materials, 1994. 6(7-8): pp. 600-604
- 【非特許文献 12】Biotechnology Progress, 2003. 19(2): pp. 243-253 10
- 【非特許文献 13】Journal of Neuroscience Methods, 2005. 142(2): pp. 243-250
- 【非特許文献 14】Journal of Neuroscience Methods, 1998. 82(2): pp. 167-173
- 【非特許文献 15】Biomaterials, 2007. 28(6): pp. 1141-1151
- 【非特許文献 16】Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009. 90A(4): pp. 1252-1261
- 【非特許文献 17】IEEE Transactions on Automation Science and Engineering, 2007. 4(3): pp. 322-331
- 【非特許文献 18】Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. 98(8): pp. 4295-4298
- 【非特許文献 19】Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. 397(8): pp. 3235-3248 20
- 【非特許文献 20】Biochemical Journal, 1986. 234(3): pp. 497-506
- 【非特許文献 21】Nucleic Acids Research, 1998. 26(7): pp. 1567-1575
- 【非特許文献 22】Nanomedicine: Nano technology, Biology and Medicine, 2008: pp. 215-225
- 【非特許文献 23】Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. 104(20): pp. 8218-8222
- 【非特許文献 24】Science 258, 778-781, doi: 10.1126/science.1439785, 1992
- 【非特許文献 25】Analytical Chemistry 71, 2071-2075, doi: 10.1021/ac9901081, 1999 30
- 【非特許文献 26】Nat Biotech 18: 764-767, 2000
- 【非特許文献 27】Biosensors and Bioelectronics 25: 1548-1552, 2010
- 【非特許文献 28】Nature Methods (2010) 7, 200-202
- 【非特許文献 29】TrAC Trends in Analytical Chemistry 27, 612-618
- 【非特許文献 30】Science 329, 830-834, doi: 10.1126/science.1192033, 2010
- 【非特許文献 31】Chem Commun (Camb), (2009), 4877-4879, doi: 10.1039/b910511e
- 【非特許文献 32】Proceedings of the National Academy of Sciences (2009) 106, 4611-4616, doi: 10.1073/pnas.0900306106
- 【非特許文献 33】Biosensors and Bioelectronics (2010)26, 333-337
- 【非特許文献 34】Angew Chem Int Ed Engl (2005), 44, 3747-3750, doi: 10.1002/anie.200500196 40
- 【非特許文献 35】Proceedings of the National Academy of Sciences (2007), 104, 11895-11900, doi: 10.1073/pnas.0705102104
- 【非特許文献 36】Nanomedicine (Lond) (2006), 1, 107-114, doi: 10.2217/17435889.1.1.107
- 【非特許文献 37】Nano technology, (2010), 015304
- 【非特許文献 38】2009年3月24日発行のProceedings of the National Academy of Sciences, vol 106の第4611~4616頁
- 【非特許文献 39】2009年発行のBiochemical Society Transactions, vol 37の第702~706頁 50

【非特許文献 4 0】2010年発行のBioanalytical Reviews 1, 177-185, doi:10.1007/s12566-010-0013-y

【非特許文献 4 1】Science, 1989. 243(4891): pp. 641-643

【非特許文献 4 2】Virology 214, 289-293 (1995)

【非特許文献 4 3】Nature 341:544-546 (1989)

【非特許文献 4 4】The eleven-year switch of peptide aptamers, J. Biol. 7(1) 2 (2008)

【非特許文献 4 5】The Scanning Ion- Conductance Microscope. Science, 1989. 243(4891): pp. 641-643

【非特許文献 4 6】Scanning Ion-Conductance Microscope And Atomic Force Microscope. Scanning, 1990 10

【非特許文献 4 7】Angewandte Chemie-International Edition, 44: pp. 6854- 6859

【非特許文献 4 8】Oncogene 18(42):5727-5737 (1999)

【非特許文献 4 9】Genes Dev. 18(18):2269-2282 (2004)

【発明の概要】

【0020】

以下の概要は、本発明の全ての特徴及び態様を含むものではなく、本発明がこの概要に記載した全ての特徴及び態様を含む必要があることを意味するものでもない。

【0021】

ある態様では、本発明は、基板上でサブミクロンの形態を有する所定の位置で液体を堆積させる装置に関するものであり、この装置は、 20

(a) マルチパレル式のナノピペットであって、2つのパレルがこれらの内部に第1及び第2の電極を有し、1つのパレル内の前記第1の電極は、このパレル内の電極と接触するように前記液体を保持するとともに、使用中に前記第1及び第2の電極間の電圧を制御する回路に接続されている当該ナノピペットと、

(b) このナノピペットに取り付けられ、サブミクロンのx及びyステップで前記ナノピペットの機械的移動を行うとともにz方向でこのナノピペットを移動させるxyzコントローラであって、ユーザ規定の制御に応じて前記機械的移動を制御する電子制御部を有している当該xyzコントローラと 30

を具えており、

(c) 前記電圧を制御する回路は、前記電子制御部に接続され、この回路が、前記ナノピペット内の液体を堆積させる必要のある前記所定の位置における所望の位置で前記液体に排出電圧を印加し、前記xyzコントローラが、液体を堆積させる必要のある前記所定の位置における前記所望の位置から離れる方向で前記ナノピペットの機械的移動を行う際に前記排出電圧を除去するようにしたものである。

【0022】

本発明のある態様では、基板が均一層を有し、この均一層上にパターン化材料が堆積されているようにする。このパターン化材料は細胞成長用の付着材料を規定しうる。

【0023】 40

本発明のある態様では、前記装置は、ピペットバイアスを行うとともに前記第1のパレルを流れるイオン電流を測定する低雑音増幅器を有する、電圧を制御する回路を具えている。この装置は更に、xyzコントローラのサブミクロン制御のための圧電アクチュエータを具えることができる。この装置は更に、前記所定の位置をユーザ入力させるためのコンピュータ又はFPGAのようなプログラマブル装置を具えることができる。FPGAは、パターン中にスポットを堆積させ、細胞が所定のパターン内に成長するようにプログラミングさせることができる。FPGAは、所定の位置で細胞を注入するようにプログラミングしうる。この位置は、個々の細胞を適所に保持させて、細胞を走査及び注入しうるように定めることができる。所定の位置は、核又はミトコンドリアのような細胞内のオルガネラ(細胞小器官)とすることができる。 50

【 0 0 2 4 】

本発明のある態様では、細胞の基板は、個々の細胞を単一の空洞内に收容するために規定したこれら空洞をこの基板が有するようにより細胞を保持するようにしてある。空洞は、細胞を空洞内に保持するための負圧を加える貫通孔を有するようしうる。又空洞は、細胞をこの空洞に引き付けるための電極を有することができる。更に空洞は、ナノピペットが細胞と接触している間に、且つこのナノピペットが細胞内に注入されている間に、個々の細胞を固定位置に保持する作用を行うことができる。

【 0 0 2 5 】

本発明のある態様は、サブミクロンの形態を有する所定のパターンで基板上に液体を堆積させる方法を有するものであり、この方法は、

10

(a) 液体をマルチパレル式のナノピペット内に堆積するように配置するステップであって、このマルチパレル式のナノピペットの少なくとも2つのパレルがこれらの内部に第1及び第2の電極を有し、1つのパレル内の前記第1の電極は、このパレル内の電極と接触するように前記液体を保持するとともに、使用中に前記第1及び第2の電極間の電圧を制御する回路に接続されているようにするステップと、

(b) 前記ナノピペットに取り付けられた x y z コントローラを動作させてサブミクロンの x 及び y ステップで前記ナノピペットの機械的移動を行うとともに z 方向でこのナノピペットを移動させ、前記 x y z コントローラは更に、ユーザ規定の制御に応じて前記機械的移動を制御する電子制御部を有しており、前記の動作により前記ナノピペットを前記所定のパターンで移動させるステップと、

20

(c) 前記電子制御部に接続された、電圧を制御する前記回路を用いて、この回路が、前記ナノピペット内の液体を堆積させる必要のある前記所定のパターンにおける所望の位置で前記液体に排出電圧を印加し、前記 x y z コントローラが、液体を堆積させる必要のある前記所定のパターンにおける前記所望の位置から離れる方向で前記ナノピペットの機械的移動を行う際に前記排出電圧を除去するようにするステップと

を具えるものである。これらの方法は更に、前述した装置の特定例に応じて実施することができる。

【 0 0 2 6 】

本発明のある態様は、上述した装置を用いて基板上の細胞内に材料を注入する方法を有するものである。これらの方法は、基板内の空洞であって、個々の単細胞のみを保持する寸法とした当該空洞内に前記細胞を配置することにより、前記基板上の前記細胞を固定化するステップを有することができる。この固定化は、細胞を適所に保持するために電圧を細胞に印加するか、又は前記細胞の固定化の援助のために前記空洞にまたがる圧力差を加えるステップを有するようしうる。細胞には、ポリ核酸、抗体及び染料を含む、ナノピペットの孔内にある種々の材料を注入することができる。

30

【 0 0 2 7 】

本発明のある態様は、単細胞内の検体を測定する装置を有するものであり、この装置は、

(a) 第1の電極を收容するパレルを有するナノピペットであって、この第1の電極は、前記細胞に接触する液体内の第2の電極である基準電極と接触するように前記検体を保持するとともに、使用中に前記第1及び第2の電極間の電圧を制御する回路に接続されているようにした当該ナノピペットと、

40

(b) 前記ナノピペットに取り付けられ、サブミクロンの x 及び y ステップで前記ナノピペットの機械的移動を行うとともに z 方向でこのナノピペットを移動させるようにした x y z コントローラであって、この x y z コントローラは更に、ユーザ規定の制御に応じて前記機械的移動を制御する電子制御部を有している当該 x y z コントローラとを具えており、

(c) 前記ナノピペットの先端部が、先端部付近の前記細胞内で内側表面(内面)上に固定された検体結合材料を有するようにした

ものである。官能化したナノピペットの先端部で検体を検出する上述した種類のものには

50

、個々のセル内に又はその付近にこの先端部を挿入することも含まれる。この先端部は、特に検出又は測定している検体に結合させるためのタンパク質又はポリ核酸のような検体結合材料で官能化されている。検体を結合させることにより、ナノピペットの先端部におけるナノ細孔を通る電流の流れに影響を及ぼす。検体を検出するタンパク質は、ナノピペットの内側表面上のPLL被膜に結合されたスルホ(sulfo)SMCCにより先端部に固定させることができる。ナノピペットの先端部は抗体又はアプタマーにより、或いは検出すべきリガンドに対する受容体により官能化させることができる。上述した装置は、免疫測定法で単一の生細胞の内部で用いることができる。

【0028】

従って、本発明の装置は、種々の適用分野に対し種々の形態で形成しうる。各々の場合、高感度のxyzコントローラに取り付けられたナノピペットが装置に含まれる。

10

【0029】

ある態様では、本発明は、基板上の個々の細胞を操作する装置を有するものであり、この装置は、

(a) マルチバレル式のナノピペットであって、(i) 第1のバレル内の液体と接触するように配置した第1の電極を収容している当該第1のバレルと、(ii) この第1のバレルに隣接する第2のバレルであって、この第2のバレル内の液体と接触するように配置した第2の電極を収容している当該第2のバレルと、(iii) 前記第1の電極に接続され、前記第1の電極及び前記第2の電極間の電圧を制御する増幅器とを有する当該マルチバレル式のナノピペットと、

20

(b) このマルチバレル式のナノピペットに取り付けられ、サブミクロンのx及びyステップでこのマルチバレル式のナノピペットの機械的移動を行うとともに、前記基板に向かう又はこの基板から離れるz方向でこのマルチバレル式のナノピペットを移動させるxyzコントローラであって、更にユーザ規定の制御に応じて前記機械的移動を制御する電子制御部を有している当該xyzコントローラと、

(c) 前記第1の電極及び前記第2の電極間の電圧を制御するとともに、前記ナノピペット内の液体を排出させる必要のある所望の位置で前記第1のバレルから液体を排出させるのに十分な電圧である排出電圧を前記第1の電極に印加し、且つ少なくとも、前記xyzコントローラが、前記所望の位置から離れる方向で前記ナノピペットの機械的移動を行う際に、前記排出電圧を除去するようにする回路と

30

を具えるようにする。

【0030】

ある態様では、本発明は、検出を、単一の生細胞内の特定のがんタンパクの検出とする装置を有する。

【0031】

ある態様では、本発明は、電圧を制御する前記回路が、ピペットバイアス電圧を生じるとともに第1のバレルを流れるイオン電流を電流測定する低雑音増幅器を有するようにした装置を有するようにする。

【0032】

ある態様では、本発明は、xyzコントローラのサブミクロン制御のための圧電アクチュエータを具える装置を有するようにする。ある態様では、本発明は、前記所望の位置を決定するユーザ入力のためのフィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)を有するようにする。ある態様では、本発明は、前記FPGAが前記基板上のパターン内にスポットを堆積するようにプログラミングされている装置を有するようにする。ある態様では、本発明は、前記FPGAが前記基板上の所定の位置にある細胞を注入するようにプログラミングされている装置を有するようにする。ある態様では、本発明は、前記FPGAが前記細胞内のオルガネラを注入するようにプログラミングされている装置を有するようにする。

40

【0033】

ある態様では、本発明は、それぞれの細胞が個々の位置にある複数の細胞を含むように

50

した基板に動作的に接続された装置を有するようになる。ある態様では、本発明は、個々の細胞をそれぞれ単一の空洞内に収容する複数の空洞を規定した基板を有するようになる。ある態様では、本発明は、細胞を空洞内に保持するための負圧を加える貫通孔を基板が有するようにした装置を有するようになる。ある態様では、本発明は、細胞を空洞に取り付けるための電極を空洞が具えるようにした装置を有するようになる。

【0034】

ある態様では、本発明は、サブミクロンの形態を有する所定のパターンで液体を堆積させる方法を有するものであり、この方法は、

(a) 液体をマルチパレル式のナノピペット内に堆積するように配置するステップであって、このナノピペットは、(i) 第1のパレル内の液体と接触するように配置する第1の電極を収容する当該第1のパレルと、(ii) この第1のパレルに隣接する第2のパレルであって、この第2のパレル内の液体と接触するように配置する第2の電極を収容する当該第2のパレルと、(iii) 前記第1の電極に接続され、前記第1の電極及び前記第2の電極間の電圧を制御する増幅器とを有するようになるステップと、

(b) 前記マルチパレル式のナノピペットに取り付けられ、サブミクロンのx及びyステップでこのマルチパレル式のナノピペットの機械的移動を行うとともに基板に向かう又はこの基板から離れるz方向でこのマルチパレル式のナノピペットを移動させるようにしたxyzコントローラであって、このxyzコントローラは更に、ユーザ規定の制御に応じて前記機械的移動を制御する電子制御部を有するようになる当該xyzコントローラを動作させるステップと、

(c) 前記第1の電極及び前記第2の電極間の電圧を制御するとともに、前記ナノピペット内の液体を排出させる必要のある所望の位置で前記第1のパレルから液体を排出させる排出電圧を前記第1の電極に印加し、且つ前記xyzコントローラが、前記所望の位置から離れる方向で前記ナノピペットの機械的移動を行う際に、前記排出電圧を除去し、これにより前記液体が前記所定のパターンで堆積されるようにする回路を用いるステップとを具えるようになる。

【0035】

ある態様では、本発明は、前記液体が細胞付着材料を有し、堆積されたこの細胞付着材料の領域でのみ基板上に細胞を取り付けるようになる上述した方法を有するようになる。ある態様では、本発明は、前記細胞付着材料がラミニンである上述した方法を有するようになる。ある態様では、本発明は、基板が均一のポリマーの頂面を具える上述した方法を有するようになる。ある態様では、本発明は、前記液体が、堆積された細胞付着材料の領域でのみ基板上に細胞を取り付ける細胞付着材料を有しているようにするとともに、更に培養すべき付着細胞を基板に被着させ、これによりこれら細胞が細胞付着材料を有する領域にのみ付着されるようになるステップを具えているようにする上述した方法を有するものである。

【0036】

ある態様では、本発明は、細胞付着材料を有する領域は、100平方マイクロン当たり少なくとも約10個のスポットの密度にあるようにする上述した方法を有するようになる。ある態様では、本発明は、ナノピペットの異なるパレルから異なる材料を堆積する上述した方法を用いるようになる当該方法を有するものである。

【0037】

ある態様では、本発明は、ナノピペットを石英から形成し、このナノピペットが約20~100nmの開口を有するようになる上述した方法を有するものである。

【0038】

ある態様では、本発明は、基板上の選択された細胞内に材料を注入する方法を有するものであり、この方法は、

(a) 液体をマルチパレル式のナノピペット内に注入するように配置するステップであって、このマルチパレル式のナノピペットは、(i) 第1のパレル内の液体と接触するように配置する第1の電極を収容する当該第1のパレルと、(ii) この第1のパレルに隣接す

る第2のパレルであって、この第2のパレル内の液体と接触するように配置する第2の電極を収容する当該第2のパレルと、(iii)前記第1の電極に接続され、前記第1の電極及び前記第2の電極間の電圧を制御する増幅器とを有するようにするステップと、

(b)前記マルチパレル式のナノピペットに取り付けられ、サブミクロンのx及びyステップでこのマルチパレル式のナノピペットの機械的移動を行うとともに基板に向かう又はこの基板から離れるz方向でこのマルチパレル式のナノピペットを移動させるようにしたxyzコントローラであって、このxyzコントローラは更に、ユーザ規定の制御に応じて前記機械的移動を制御する電子制御部を有するようにする当該xyzコントローラを動作させるステップと、

(c)前記第1の電極及び前記第2の電極間の電圧を制御するとともに、前記ナノピペット内の液体を排出させる必要のある所望の位置で前記第1のパレルから液体を排出させる排出電圧を前記第1の電極に印加し、且つ前記xyzコントローラが、前記所望の位置から離れる方向で前記ナノピペットの機械的移動を行う際に、前記排出電圧を除去し、これにより前記液体が前記細胞内に注入されるようにする回路を用いるステップとを具えるようにする。

【0039】

ある態様では、本発明は、基板内の空洞であって、個々の細胞のみを保持する寸法とした当該空洞内に前記細胞を配置することにより、前記基板上的前記細胞を固定化するステップを更に具える上述した方法を有するようにする。

【0040】

ある態様では、本発明は、前記細胞の固定化の援助のために前記空洞にまたがる圧力差を加えるステップを更に具える上述した方法を有するようにする。

【0041】

ある態様では、本発明は、注入された前記材料を、ポリ核酸、抗体及び染料より成る群から選択するようにする上述した方法を有するようにする。

【0042】

ある態様では、本発明は、基板上的個々の細胞内の検体を検出する装置を有するものであり、この装置は、

(a)第1の電極を収容するパレルを有するナノピペットであって、この第1の電極は、前記細胞に接触する液体内の第2の電極である基準電極と接触するように前記検体を保持するとともに、使用中に前記第1及び第2の電極間の電圧を制御する回路に接続されているようにした当該ナノピペットと、

(b)前記ナノピペットに取り付けられ、サブミクロンのx及びyステップで前記ナノピペットの機械的移動を行うとともにz方向でこのナノピペットを移動させるようにしたxyzコントローラであって、このxyzコントローラは更に、ユーザ規定の制御に応じて前記機械的移動を制御する電子制御部を有している当該xyzコントローラとを具えており、

(c)前記ナノピペットの先端部が、先端部付近の前記細胞内で内側表面上に固定された検体結合材料を有するようにしたものである。

【0043】

ある態様では、本発明は、前記検体結合材料をタンパク質又はポリ核酸とした装置を有するようにする。

【0044】

ある態様では、本発明は、検体結合材料を、スルホスクシンイミジル 4 (N マレイミドメチル)シクロヘキサニールカルボキシラート (Sulfo-SMCC) により前記内側表面上のポリ L リジン (PLL) 被膜に結合されたタンパク質とした装置を有するようにする。

【0045】

ある態様では、本発明は、単一の生細胞内の生体分子を検出する方法を有するものであ

10

20

30

40

50

り、この方法は、

- (a) 官能化されたナノピペットを、細胞内で規定の深さに配置するステップと、
- (b) 電流を監視して細胞膜付近のナノピペットの正確な位置を制御するステップと、
- (c) ナノピペットを高速度で細胞内に挿入するステップと、
- (d) 高電圧を印加するステップと、
- (e) 電流変化を測定して細胞内の生体分子を検出するステップと

を具備し、官能化されたナノピペットはシステムに設けられており、更にこのシステムは、ピペットをバイアスするとともに電流測定を行う増幅器と、X、Y及びZ方向で制御を行うマイクロマニピュレータ（極微操作装置）と、X、Y及びZ方向で微細制御を行う圧電アクチュエータと、構造化可能な集積回路と、高電圧源と、低電圧及び高電圧間の切換えを行うリレーとを具備しているようにする。

10

【0046】

ある態様では、本発明は、ナノピペットを抗体で官能化する上述した方法を有するようになる。ある態様では、本発明は、ナノピペットをアプタマーで官能化する上述した方法を有するようになる。

【0047】

ある態様では、本発明は、免疫測定法では単一の生細胞内で用いるようにした上述した方法を有するものである。ある態様では、本発明は、ナノピペットを受容体リガンドで官能化する上述した方法を有するものである。

【図面の簡単な説明】

20

【0048】

【図1】図1は、現在の堆積及び細胞注入システムを示す線図である。

【図2】図2は、この現在のシステムでダブル平行型ピペットを用いて行う細胞透過を示す線図である。

【図3】ナノピペットの先端部から排出される液体の量を時間に対して示しており、排出レートは時間に対し直線的であることを示しているグラフ線図である。

【図4A】図4Aは、パターン化されたスポットのアレイを示す上面写真である。

【図4B】図4Bは、スルホローダミンを用いたパターン化スポットのアレイの蛍光画像を示す疑似3Dグラフである。

【図5】図5は、現在のナノインジェクション装置を示す一連の写真であり、図5Aはカルボキシフルオレセインをヒラ細胞内に注入した状態を示す写真であり、これは細胞及びナノピペットの明視野像であり、矢印がナノピペットの先端部を示しており、図5Bも図5Aにおけるような細胞注入状態を示す写真であり、この図5Bは注入後のヒラ細胞及びナノピペットの蛍光画像を示す。

30

【図6】図6は、セルシフター（Cell Shifter：登録商標）の製造を示す一連の図であり、図6Aはシリコン窒化物層をシリコンウエハ上に堆積した状態を示す図であり、図6Bは窒化物層を貫通する深い反応性イオンエッチングを示す図であり、図6Cは裏側のKOHエッチングを示す図であり、図6Dはガラスウエハに接着したシリコンウエハを示す図であり、図6Eは最終装置においてプラスチックリングを表面に取り付けた状態を示す図である。

40

【図7】図7は、培養チャンバと、真空状態適用設備とを示す最終装置の写真であり、この装置がペニー硬貨よりも小さいことを表すためにペニー硬貨を示しており、この装置を用いて細胞を培養リング内で培養するとともに、負圧を加えることにより貫通孔上に固定させるようにしうるものである。

【図8】図8は、セルシフター上に固定した10mmのポリスチレンビーズの蛍光画像を示す写真である。

【図9A】図9Aは、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡（SICM）を用いた地理学的写像を示す画像図である。

【図9B】図9Bは、細胞に亘る位置に対するナノピペットの先端部の高さ変化を示す地理学的写像のグラフ線図である。

50

【図10】図10は、ナノピペットセンサによるHPV18E6抗原の選択的検出を示す線図であり、印加電圧は-400mVであり、抗原は時間0で加えたものである。

【図11】図11は、ヒラ細胞溶解物に対するナノピペットセンサの応答を示す棒グラフである。

【図12】図12は、ナノピペットセンサによる単細胞内のがんタンパクの検出を示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0049】

[概説]

ここには、3次元移動用のロボット機構に取り付けられたナノピペットを有し、このナノピペットから基板上に材料を制御堆積するのに有効なシステムであって、細胞成長を制御するか、又は個々の細胞表面又は細胞の内部における生化学的マーカーをナノピペットの先端部で検出するか、又はナノピペットの内容物を単細胞内に注入するようにするシステムを開示する。化学的な堆積に用いる場合、ナノピペットの開口の寸法を小さくすることにより、パターンの鮮明度を単一細胞レベルよりも低い解像度とする。このシステムでは更に、パターン堆積するための基礎として走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)を用いる。従って、パターンはユーザにより予め規定することができ、このパターンを、その後ソフトウェアを制御することにより、フォトリソグラフィ技術又は何れの種類のパターンの前処理を必要とすることなく設定することができる。これにより、任意のユーザ規定パターンの一定で急速な開発を試験管内細胞培養で且つ解像度を失うことなく迅速に且つ効率的に評価できるようになる。ここに開示するシステムは、細胞付着及び成長を制御する生物学的研究に適用しうるものである。

10

20

【0050】

SICM装置は、軟質の非導電性の表面の地理学的形状を撮像するために従来考案されている(例えば、文献「Science, 1989. 243(4891): pp. 641-643」の“The Scanning Ion-Conductance Microscope” Hansma P.K.氏等著参照)。このような従来技術の装置は、XYZ走査、Z帰還及び制御論理を用いている(Zは走査表面に対し直交方向であるとみなされる)。

【0051】

本発明の他の態様は、細胞の固定化及び注入方法を含むハイスループット(高処理能力)の細胞注入のためのナノピペットを有するシステムに向けたものである。本発明の実施例は、ナノピペット及び電気浸透注入を用いて、細胞に対する損傷を最少となるように任意の材料を細胞内に注入することに向けたものである。電気浸透注入は、ナノピペットから所望の化合物を取り出すためのナノ細孔である開口にまたがる電圧及びイオン電流を変化させることを含むものである。細胞の注入及び排出の効率を高くするためのダブルバレル型のナノピペットも開示する。

30

【0052】

又、細胞内に完全に自動化して注入するために、細胞を所定のアレイで固定化するように形成したセルシフターも開示する。セルシフターは、単一の細胞を所定の位置に保つように、好ましくは各位置が単一の細胞を含むこれらの位置のアレイに単一の細胞を保つようにすることができる、凹所開口のような3次元形状部を有する。この技術の実施例は、材料を単一の生体細胞内に導入する方法又は細胞内部の免疫測定法を含むハイスループットの単一細胞研究用の手段として用いることができる。他の実施例は、高分子ビーズを有する構造体を固定化することを含むものである。

40

【0053】

又、ナノピペットを生体材料に亘って走査する装置と、現在のナノピペットセンサとを一体化する方法及び装置をも開示する。個々の生体細胞内部の分子間相互作用を研究するために、ここで述べるナノピペットセンサを走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)と結合させることができる。細胞は、固定化又は前処理を必要とせず成長培地内で調べることができる。細胞の寸法に対してナノピペットの寸法を小さくすることと、浸透

50

状態を制御することとを組み合わせることにより、細胞の生存率を最大にする。この技術の適用には、単一細胞レベルよりも低くなる生体内分析を含むものである。他の適用は、個々の細胞内の生体分子を連続的に監視すること、例えば、タンパク質の発現を監視する免疫測定法を可能にすることである。

【0054】

[定義]

他の規定をしない限り、ここで用いる全ての技術的な及び科学的な用語は、本発明に属する当業者により通常理解されるのと同じ意味を有するものである。ここで記載するのと類似する又は等価な如何なる方法及び材料も本発明の実行又は検査に用いるものであるが、好適な方法及び材料のみを説明する。一般に、細胞及び分子の生物学及び化学の技術やこれらと関連して用いられる用語は、当該技術分野で周知であり且つ一般的に用いられているものである。特に規定していないある実験的手法は一般的に、当該技術分野で周知で、この明細書全体で引用し且つ説明した種々の一般的な且つより特定の参考文献に記載されているような従来の方法に応じて実行されるものである。明瞭とするために、以下の用語を規定する。

10

【0055】

用語「ナノピペット」は、ここでは、ナノスケールとした、すなわち0.05nm~約500nm、好ましくは約(+又は-20%)50nmとした円錐状の先端部開口(すなわち、ナノ細孔)を有する中空の自己支持型で、不活性で、非生物学的な構造体を言及するために用いている。この中空構造体は、ガラス又は石英とすることができ、その内部に又はナノ細孔の一方の側に、ナノ細孔開口を通る流体を保持するのに適している。ナノピペットの内部は検体の非特異的結合を最小にするように選択又は変更されている。この内部は、ナノピペット内の溶液に接触する電極を挿入しうる寸法となっている。ナノピペットは、ガラス又は石英の毛細管のレーザープリンクにより製造するのが好ましい。ナノピペットは、10~100nm程度の内径と、200~800nm程度の外径と、約10μmの代表的な長さとを有している。これらの寸法は、特定の適用分野に適した寸法であり、ナノ細孔の寸法の制御は重視すべき事項である。「マルチパレル式のナノピペット」は、代表的に共通の壁部を共有する2つ以上の平行な孔を有するナノピペットである。孔は、代表的に径方向で離間した同軸となっているが、同心とすることができる。これらは、一般的に入手しうるマルチポア(登録商標)毛細管から形成しうる。

20

30

【0056】

用語「ナノ細孔」は、ここでは、単一分子検出器として用いる電気絶縁膜内の小さい孔を言及するために用いている。検出原理は、電圧をこの膜の両端間に印加した際にナノ細孔を通るイオン電流を監視することに基づくものである。好適なナノ細孔開口は、約(10%の範囲内の)20及び100nm間のものである。

【0057】

用語「電流検出回路」又は「電圧を制御する回路」は、可制御増幅器と高感度の電圧及び電流検出器とを有する既知の電気回路及び装置を言及するものである。これらは、10~10000ピコアンペアのベースライン電流に基づいて1~10ピコアンペア程度の電流変化を検出する何らかの感応装置を有することができる。この用語は更に、時間に応答するとともに、温度に比較的依存しないか又は温度変化を補償する回路を言及するものである。回路は、既知の電圧が供給される入力端を有する必要がある。電圧クランプ増幅器及びトランスインピーダンス増幅器を有する感応検出回路は既知である。この場合、用語「電圧クランプ」は、1つの入力端を可変コマンド(指令)電圧の点に接続し、他の1つの入力端を測定電圧の点に接続した差動増幅器と、帰還回路とを用いた回路を言及するものである。電圧クランプは負帰還を用いてシステムをコマンド電圧に維持する。この場合、コマンド電圧は、信号発生器から得られる交流電圧信号のような所定の交流信号である。出力電流は入力電圧の変化を追従し、電流の僅かな変化を検出しうる。

40

【0058】

用語「電気浸透流」は、ここではその通常の意味において、ナノピペットの表面に形成

50

される電気二重層に対する印加電界の影響を言及するものである。ナノピペットの先端部の内側表面に配置されたイオンは、十分に強い電界の下でナノピペットから強制的に取り出され、同時に少量の溶液が先端部から強制的に取り出される。電気浸透が液体を排出させ、一方、電気泳動が液体又はゲルのような培地内の荷電粒子を移動させる。電気浸透は、毛細管又は他の何らかの流体管にまたがる印加電圧により誘起される。

【0059】

用語「ラミニン」は、ここではその通常の意味において、基底膜 (basal lamina: 以前は不適切にbasement membrane と称されていた) 内の主要タンパク質、すなわち、殆どの細胞及び臓器に対するタンパク質のネットワークファンデーションを言及するものである。ラミニンは、細胞の分化、移動、付着や、表現型及び生存に影響を及ぼす基底膜の重要な且つ生物学的に活性な部分である。又、ラミニンは、5つ、3つ及び3つの遺伝的バリアントでそれぞれみられる鎖、鎖及び鎖を含む三量体タンパク質である。又、ラミニンは、細胞組織の維持及び生存にとって極めて重要なものである。ラミニンが欠乏することにより、筋肉を不適切に組織化し、これにより筋ジストロフィー、致命的な水疱形成性皮膚疾患 (接合部型表皮水疱症) 及び腎臓濾過の不良 (ネフローゼ症候群) の一形態をもたらすおそれがある。ラミニンは、細胞外環境に対する細胞間相互作用の研究のために細胞培養に用いられる。例えば、ラミニン 111 は主要基板であり、生体内及び試験管内の双方でこの主要基板に沿って神経軸索が成長する。例えば、この主要基板は、網膜神経節細胞の熟成が網膜から視蓋までの途中で起きる経路を設定する。この主要基板は細胞培養実験における基板としてもしばしば用いられる。

10

20

【0060】

用語「がんタンパク」は、ここではその通常の意味において、がん遺伝子によりコード化されたタンパク質を言及するものであり、これらにはがんに関連するものとして知られたウイルスタンパク質を含みうるものである (例えば、文献「Virology 214, 289-293 (1995)」の“Dimerization of Human Papillomavirus E7 Oncoprotein in Vivo” Clemens氏等参照)。細胞質のがんタンパクは代表的に大きく、正常な細胞内には少量だけ存在し、従って、腫瘍状態とのみ関連させる必要はないが、ウイルスのがん遺伝子によりコード化されたタンパク質と、これに対応する、宿主細胞内の相同 {そうどう} タンパク質との双方をここでは、がんタンパクと称する。これらには、MYC、BCL2、変異したp53、DEK、HPV E6、HPV E7等が含まれる。

30

【0061】

用語「細胞付着材料」は、ここでは、例えば、實際上、細胞を細胞外マトリックス内の特定の化合物に付着させる (細胞付着として知られた処理の) タンパク質のような材料を言及するものである。基板付着分子 (SAM) 内のアミノ酸の幾らかは細胞外マトリックスの化合物に結合し、他のアミノ酸は細胞の表面上のインテグリンに結合する。インテグリン分子は2つのアミノ酸鎖より成り、一方のアミノ酸鎖は細胞骨格内のアクチンフィラメントに接続されており、他方のアミノ酸鎖はSAMに接続されている。これにより、細胞外マトリックス内の外部活動が細胞の形状及び移動に影響を及ぼすようにしうる。これらのアミノ酸鎖は他のSAMにも連結して互いの作用に影響を及ぼすようにしうる。

40

【0062】

用語「フィールドプログラマブルゲートアレイ」は、ここでは、製造後に顧客又は設計者により構成されるように設計された、従って、「フィールドプログラマブル」である集積回路を言及するものである。フィールドプログラマブルゲートアレイ (FPGA) の構成は一般に、特定用途向け集積回路 (ASIC) に対して用いられているのに類似しているハードウェア記述言語 (HDL) を用いて特定される。FPGAは、「論理ブロック」と称されているプログラマブル論理構成要素と、ブロックを「互いに配線接続」させる再構成可能な相互接続の階層とを有しており、これは (多くの) 異なる構成で相互配線接続しうる多くの (変更可能な) 論理ゲートと幾分似ている。論理ブロックは、複雑な組み合わせ機能を実行するか、又は単にAND及びXORのような簡単な論理ゲートを実行するように構成しうる。殆どのFPGAでは、論理ブロックが、簡単なフリップフロップ又は

50

メモリのより完全なブロックとしうるメモリ素子をも有する。

【0063】

用語「xyzコントローラ」は、x及びy次元、代表的に平坦表面、及びz方向、代表的に垂直、として知られている3次元で移動する機械装置を言及するものである。xyzコントローラは、原子プローブ顕微鏡のような種々のマイクロスケール分野で用いるものとして既知である（典型的なxyzコントローラに関する更なる詳細のために、例えば、“Atomic probe microscope”と題する米国特許US5,394,741（発明者：Kajimura氏等）参照）。

【0064】

用語「排出電圧」は、以下に更に説明するように、現在のナノピペットにおいて、溶液を含む孔と外部の溶液との間に印加する電圧を言及するものであり、この電圧により孔からのイオンの流れを生ぜしめる、すなわち溶液内の原子種を排出させる。すなわち、現在の装置では、ナノピペットの孔からの排出は、電気浸透により生じるものであり、このことは、何を排出するかであること以外でナノピペットの特性にこの排出が依存することを意味する。流体は、他の孔内にあるカウンター電極に対し正にバイアスされた電極を収容する孔から排出される。以下に例示するように、0.1～100Vの電圧をダブルパレル型のナノピペットの2つの孔にまたがるように印加して、排出を達成する。排出される材料の量は、時間と印加電圧の大きさに依存する。説明のために、低電圧を0.01～1Vとし、高電圧を1～100Vとする。単一の孔のピペットを用い、細胞の外部の電極に対して高電圧を印加する場合、電圧が細胞膜を通過する必要があり、損傷を生ぜしめるおそれがある。従って、単一の孔のピペットを用いるよりもダブルの孔のピペットを用いるのが好ましい。

10

20

【0065】

用語「低雑音増幅器」、すなわち当該技術分野で既知のLNAは、種々の増幅器の1つを言及するものであり、この増幅器は、（例えば、アンテナにより捕捉される）極めて弱い信号を増幅するのに用いる電子増幅器である。この増幅器は通常、検出装置に極めて接近させて配置され、フィードラインにおける損失を低減させるようになっている。LNAを用いる場合、代表的に、受信チェーン回路の後段からの雑音の影響は、LNAの利得に基づいて減少され、一方LNA自体の雑音は受信信号内に直接投入される。従って、LNAは、所望信号電力を上昇させるのと同時に加わる雑音及び歪みをできるだけ少なくし、この信号の回復がシステム中の後の段階で可能となるようにする必要がある。良好なLNAは、（1dBのような）低いNFを有するとともに（20dBのような）充分大きな利得を有し、且つ充分大きな相互変調及び圧密点（IP3及びP1dB）を有する必要がある。

30

【0066】

用語「圧電アクチュエータ」は、当該技術分野で既知のように、圧電変換器を言及するものである。能動素子は、基本的にその2つの対向面に電極が取り付けられた分極材料片である（すなわち、ある部分の分子が正に荷電され、他の部分の分子が負に荷電されている）。電界がこの材料にまたがって印加されると、分極分子自体が電界と整列され、その結果材料の分子又は結晶構造内に双極子が誘起される。この分子の整列により、材料の寸法を変化させる。現在の装置に関しては、変換器が極めて小規模で微細移動を達成するのに用いられている。

40

【0067】

用語「ポリ核酸」は、一本鎖とした又は（部分的に）二本鎖としたDNA又はRNAの何らかのオリゴマー又はポリマー或いはその合成類似化合物を言及するものであり、ここで用いるものとしては、ポリ核酸は、ワトソン・クリック型塩基対に基づく特異性を有する相補鎖に結合しうるものとする。

【0068】

用語「抗体」は、抗原結合部を通る結合特異性を有する何らかの抗体又は抗体フラグメント（断片）を言及するものである。例えば、抗体の抗原結合機能は、抗体全長のフラグメントにより実行しうるものが確かめられている。抗体の用語「抗原結合部」に包含され

50

る結合フラグメントの例には、

(i) Fab フラグメント、すなわち V L、V H、C L 及び C H I 領域より成る 1 価のフラグメント、

(ii) F(ab')₂ フラグメント、すなわちヒンジ領域でジスルフィド架橋により結合された 2 つの Fab フラグメントを有する 2 価のフラグメント、

(iii) V H 及び C H I 領域より成る Fd フラグメント、

(iv) 抗体の単一アームの V L 及び V H 領域より成る Fv フラグメント、

(v) V H 領域より成る dAb フラグメント (文献「Nature 341:544-546 (1989)」Ward 氏等著参照)、

(vi) 分離された相補性決定領域 (C D R)

が含まれる。

【 0 0 6 9 】

用語「アプタマー」は、特定の標的分子に結合するポリヌクレオチド又はペプチドを言及するものである。代表的なアプタマーには、例えば、“Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Solution SELEX”と題する米国特許 U S 5, 5 6 7, 5 8 8 (発明者: Gold 氏等) に記載されているように、S E L E X プロトコルから取り出されるアプタマーが含まれるものであり、修飾ヌクレオチドを含む S E L E X 同定のオリゴヌクレオチドは例えば、リボースの 2' 位置、ピリミジンの 5 位置及びプリン の 8 位置で化学的に修飾されたヌクレオチドを誘導体含むオリゴヌクレオチドを開示している米国特許 U S 5, 6 6 0, 9 8 5、種々の 2' 修飾ピリミジンを含むオリゴヌクレオチドを開示する米国特許 U S 5, 7 5 6, 7 0 3 及び 2' アミノ (2' N H 2) 基板と、2' フルオロ (2' F) 基板と、2' O メチル (2' O M e) 基板との何れか 1 つ

又は何れかの組み合わせで修飾された 1 つ以上のヌクレオチドを含む特異性の高いオリゴヌクレオチドを開示する米国特許 U S 5, 5 8 0, 7 3 7 に記載されている。ペプチドアプタマーはコンビナトリアル認識タンパク質である。ペプチドアプタマーは、文献: The eleven-year switch of peptide aptamers, J. Biol. 7(1) 2 (2008) (Colas 氏著) に記載されているように、酵母ツーハイブリッド法を用いて、種々の調節経路内に含まれる広範囲の細胞、ウイルス及び細菌の標的タンパク質に結合するように選択されている。ペプチドアプタマーは、“Peptide aptamer for neutralizing the binding of platelet antigen specific antibodies and diagnostic and therapeutic applications containing the same”と題する米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 3 1 8 3 6 3 号明細書に記載されている。

【 0 0 7 0 】

用語「染料」は、他の物質組成物又は混合物に色を付ける組成物を言及するものである。好適な染料は蛍光性化合物である。この定義にはエネルギー移動染料も含まれるものである。又、米国特許 U S 6, 3 3 5, 4 4 0 で規定されている又は用いられているような、キサンテン染料、不斉ベンゾキサンテン染料、ローダミン染料、フルオレセリン染料、4, 7 ジクロロローダミン染料、カルボキシフルオレセイン染料、カルボキシローダミン染料、カルボキシ R 1 1 0 染料、カルボキシ R 6 G 染料、カルボキシ X ローダミン染料、シアニン染料、フタロシアニン染料、スクアレイン染料及び C y 5 染料をも含まれるものであり、この米国特許も参考のためにここに開示したものである。

【 0 0 7 1 】

(一般的方法及び装置)

第 1 の態様では、本発明は、細胞を制御して付着及び成長させる目的で、任意の基板上にユーザ規定のパターンを堆積するシステムを包含する。この手法には、制御による堆積を周囲環境内で非官能化表面上に実行するという利点がある。このようなパターン化された基板は、細胞培養法を成功させるとともに、所定のパターンに対する細胞の付着及び生存性を良好にするのに用いられる。

【 0 0 7 2 】

[基板をパターン化するのに適した装置]

10

20

30

40

50

上述したシステムは、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡（S I C M）に対するシステムにより例示されるコンピュータ制御システムを有する。S I C Mの基本動作は、当該技術分野で充分理解されている（例えば、文献：The Scanning Ion-Conductance Microscope. Science, 1989. 243(4891): pp. 641-643, Hansma P.K.氏等著及び文献：Scanning Ion-Conductance Microscope And Atomic Force Microscope. Scanning, 1990, Prater C. B.氏等著参照）。簡潔に言えば、基本的なS I C Mは、電解質が裏込めされているとともに電解槽内に浸漬された単一のピペットより成っている。ナノピペット内には電極が配置されており、この電解槽内にはこの電極からある距離だけ離して接地電極が配置されている。ナノピペットの開口が表面に対し垂直な方向で基板に近づくと、所定の間ピペットのオリフィスを通して流れる電流が「電流のスケーリング」により低減される。この電流の降下分が帰還信号として作用してナノピペットの高さを制御することができ、この制御は表面の上方の所定の距離で行うことができる。その後、ナノピペットを表面に亘って走査すると、基板の地理学的な画像を示すことができる。

10

【0073】

以下で説明するように、この装置の特徴を、単細胞を注入するか又は単細胞内で結合する分子を測定するための関連装置内に導入することができる。

【0074】

図1は現在の装置を示す線図であり、この現在の装置を本発明により細胞注入のために特注した修正済みのS I C M（走査型イオンコンダクタンス顕微鏡）内に設け得るようにする。この現在の装置は、膜の浸透に対する微調整のためにz方向において帰還制御される位置決めに依存する。この現在の装置によれば、ダブルパレル型のナノピペット102が、圧電xyzコントローラ104と、この圧電xyzコントローラに動作的に接続された圧電コントローラ106とを有するxyz制御部分に取り付けられている。圧電xyzコントローラ104は極めて微小な移動に対し用いられるものであり、より粗い移動のためにステップモータによるマイクロマニピュレータ（図示せず）上に装着されている。圧電制御回路はDAQカード114を介してコンピュータ116に接続されている。DAQカード114は、ナノピペット内の電極110に接続された電子センサ及び増幅器に接続されている。（第1に孔に結合した第2の孔内の基準電極122は、図示するように接地されている。）S I C Mモジュールは更に、ピペットバイアス及び電流測定のために、低雑音増幅器108（例えば、Axopatch 200B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA）を有している。この増幅器は、図示するようにDAQカード114を介してナノピペット内の電極110に接続されている。図1の装置は、増幅器108に信号を供給するヘッドステージ増幅器112を有し、増幅器108がDAQ（データ収集）カード114に信号出力する。適切なDAQカードは市販されている。（National Instruments社製の）DAQカードのボードは、例えば、内臓タイマと、8チャンネル入力端を有する12ビットのアナログ デジタル変換器（ADC）と、2つのデジタル アナログ変換器（DAC）と、24個のTTLレベル論理入力端とより成るマルチファンクションのプラグ アンド プレイであるアナログ及びデジタル入出力ボードである。

20

30

【0075】

コンピュータコントローラ116にインターフェース接続された（FPGAである）DAQカードは、圧電xyzコントローラを介してナノピペットの移動を制御する回路にも接続されている。1つのxyzコントローラは、X、Y及びZ方向で粗調整するためのマイクロマニピュレータ106（例えば、MP 285）である。この場合、このマイクロマニピュレータは、X、Y及びZ方向で（2～3nm内で位置決め可能な）微調整を行うための圧電アクチュエータ104とシステムのハードウェア制御のためのFPGAとに結合されている。システムは更に、低雑音の高電圧源118（例えば、A-M Systems社のModel 2100 Isolated Pulse Stimulator）と、帰還制御に必要とする低電圧（約0.01～1V）及び電気泳動材料の排出（図2）に必要とする高電圧間で切換えを行うカスタムリレー120とで修正されている。システムは、例えば、LabVIEW内に書き込まれたユーザコード化ソフトウェアを用いて制御される。LabVIEWはNational Instruments社が

40

50

ら入手でき、このLabVIEWは、フローチャートに似せる直感的なグラフィカルアイコン及びワイヤを用いる高度な測定、検査及び制御システムを開発するのに用いられるグラフィカルプログラミング環境である。従って、ユーザは、ナノピペットのxyz運動の所定のパターンと、所定の時間長の間所定の位置で材料を排出させる電圧変化とを設計する。LabVIEW又は他の従来のソフトウェアは現在の装置により提供し、ナノピペットからの検出及び排出とナノピペットの運動とを制御する。

【0076】

ピペットの孔からの材料の排出は、適切な緩衝材（バッファ）及び所望の材料が裏込めされたダブルバレル型ナノピペットを用いて実行される。適切な緩衝材はリン酸塩、クエン酸塩、又は分子の研究で日常的に用いられている他の何らかの緩衝材を含むものである。排出電圧は、電源118から生ぜしめられる電圧を変化させることにより電極110及び122間に印加される。

10

【0077】

所望の材料を排出させるためには、種々の電解質溶液をナノピペットの孔内に用いることができる。細胞をパターン化する場合、細胞付着パターンを形成するのに所望の材料が用いられる。以下に説明するように、所望の材料は応用分野に応じて変えることができる。この所望の材料は、既知のように溶解電解質、すなわち自由イオンを含む電解質溶液内で孔内に浮遊される。代表的なイオンには、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、塩化物、リン酸塩及び重炭酸塩が含まれる。しかし、他のイオン種を用いることもできる。所望の材料は代表的に液体であり、この場合、所望の材料と溶液中のイオンとが設けられる。所望の材料自体は、ヒト血漿又はその他の体液、溶液、試水等のような電解質とすることができる。電解質はイオン電流を伝える必要があり、この機能に対しては、約10～100mM、好ましくは約100mMの正及び負イオン種が必要となると考えられている。現在の装置では、ナノピペットの内部及び試料材料に同じ又は異なる電界質を採用しうる。電解質溶液内には種々の塩を用いることができる。これらはカチオン（正に荷電されたイオン）及びアニオン（負イオン）より成り、従って、生成物は電氣的に中性（正味の電荷が無い）である。これらの成分イオンは、塩化物（Cl⁻）のような無機や、酢酸塩（CH₃COO⁻）のような有機にしたり、フッ化物（F⁻）のような単原子イオンや、硫酸塩（SO₄²⁻）のような多原子イオンにしたりすることができる。種々の塩が存在する。水中で溶解した場合に水酸化物イオンを生じるように加水分解する塩は塩基性塩であり、水中でヒドロニウムイオンを生じるように加水分解する塩は酸性塩である。中性塩は、酸性塩でも塩基性塩でもない塩である。溶融塩や、溶解塩（例えば、水中の塩化ナトリウム）を含む溶液は、電気を通しうるために電界質と称される。

20

30

【0078】

排出すべき所望の材料には、小分子、代謝物、核酸、オリゴヌクレオチド、ペプチド、アミノ酸、染料、ポリマー、ナノ粒子が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0079】

ナノピペットは、石英を用いて製造しうる。ダブルバレル型ピペットによれば、小さなメニスカスをピペットの先端部を横切るように形成し、シングルバレル型ピペットでは通常であるように外部接地電極の必要性を排除するという利点を生じる。更に、回路はピペットの2つのバレル間に形成される為、先端部は空中でSICMとして機能でき、従って、ナノピペットの先端部を乾燥表面に接近させることができるようになる。従来では、2005年に発行された文献：Angewandte Chemie-International Edition, 44: pp. 6854-6859の“Two-component graded deposition of biomolecules with a double-barreled nanopipette” Rodolfa氏等著に開示されているように、電気浸透力及び比較的高い電圧を用いて、材料をナノピペットの先端部から排出させようとしている。ナノピペットは、結晶質の石英よりも廉価な溶融シリカ又は非晶質の石英から形成するのが好ましい。しかし、結晶質の石英を用いることができる。セラミックス及びガラスセラミックスや、ホウケイ酸ガラスも用いることができるが、精度は石英ほど良好ではない。用語「石英」は、上述した特定の材料や、適用可能なセラミック、ガラスセラミック又はホウケイ酸ガ

40

50

ラスを含むことを意図及び規定するものである。現在のナノピペットの製造には、種々のガラス又は石英を用いることができることに注意すべきである。主として考慮することは、直径が小さい開口に材料が引き込まれる能力である。或いはまた、ナノピペットは、他のシリコン酸化物、金属（例えば、アルミニウム）酸化物、炭素（“Tubular carbon nano/micro structures and method of making same”と題する米国特許US7,597,941参照）等のような他の非導電性材料から製造することができる。

【0080】

ある実施例では、基板上で細胞をパターン化するのにシステムを用いる。このパターン化は、ナノピペットの高さ及び位置を制御するようにプログラミングされたソフトウェアを用いて制御する。このソフトウェア内には所定のパターンをローディングしておく。ナノピペットは、所定の領域で、パターン化すべき基板の表面に向けてゆっくり降下させる。ピペットのメニスカスが一旦基板と接触すると、リレーが増幅器を分離させ、所定の時間の間高電圧を印加する。その時間が経過した後、ピペットの先端部を迅速に後退させ、このピペットの先端部にまたがる電圧を、抵抗を介して大地に放電させ、増幅器をピペットに再接続する。次にこの先端部を次の個所に移動させ、パターン全体が堆積されるまで処理を繰り返す。排出レートは、印加電圧とこの印加電圧の持続時間との双方に依存する（図3における排出量対時間のグラフを参照されたい）。

【0081】

上述した装置を用いる場合、50pL/s~100pL/sの少量をナノピペットから排出させることができる。排出量はこれらの量よりも少なくすることもできるが、その量は光学顕微鏡の解像度を超えてしまう。排出量はオイル、例えば、ミネラルオイルの槽内で適切なポリマー表面上に排出させることにより決定した。先端部と基板との間で接触する適切な液体には、有機液体ポリマー（例えば、オイル）及びシリコンベースのポリマー、例えば、シリコンが含まれる。シリコンの一例はポリジメチルシロキサンである。排出量を計算する場合、オールドロップ（油滴）を半球形状とみなした。排出量は、印加電圧の時間に対し直線状に現れる。直径3 μ mの小さなスポット寸法のスポットを堆積することができる。図4は、平均のスポット直径が4+8 μ m又は4-8 μ mであるスルホローダミンのパターン化スポットのアレイの例を示す。ここに示した結果は、個々のナノピペットを表し、パラメータはこれらのデータに対する線形フィットにより得られるとともにナノピペット間で変えることができる。それにもかかわらず、標準化されたアレイ印刷の場合、ドロップレットをオイル中に排出させることにより各ナノピペットを容易に校正することができる。更に、パレルにまたがるバイアスを反転させることにより、異なるパレルから異なる材料を制御可能に排出させることができる。各パレルに別々の材料を装填することにより、多層パターンを、一回のパターン化の実行で予め登録したように設定しうる。

【0082】

細胞を培養のために付着させる必要がある基板上的パターンは、タンパク質、有機ポリマーを含むポリマー又はバイオポリマーを用いることによりこの基板に規定しうる。パターン化は、個別の細胞成長を行い得る多数の分離領域を規定するように用いるのが好ましい。パターン化材料の例には、ポリリシン、ウシ血清アルブミン（BSA）及び表面接着分子、例えば、フィブロネクチン又はラミニンが含まれるが、これらに限定されるものではない。パターンの堆積は、量子ドットと電解質溶液との混合により確認しうる。パターンは、例えば、蛍光顕微鏡法を用いて堆積を視覚化するとともに、印刷エラーをチェックすることにより評価することができる。次に、堆積が行われた基板をセルフマスキング工程で洗浄する。この洗浄工程の場合、マスキング分子に対する適切な緩衝材を用いることができる。マスキングに対して用いる分子の例には、ウシ血清アルブミン（BSA）が含まれる。パターンの規定後、基板を細胞培地内に入れることができる。細胞は培地内に分散させて基板上に定着させることができる。数時間の培養後、予め温めておいた培地を用いて細胞をそっとすすぎ洗いして、基板にしっかり付着していない如何なる細胞も除去する。細胞の付着は、質と量との双方で査定される。

【0083】

[細胞の注入]

他の実施例では、処理量が高く且つ細胞に対する損傷を最少にするように、材料を単一細胞内に電気浸透注入するために現在のナノピペットシステムを用いる。この手法の利点は、注入が高度に自動化され、注入量を正確に制御でき、細胞の生存率が高くなるということである。更に、システムの全自動化の可能性を高める細胞固定化のために細胞のふるい分け装置を以下に説明する。細胞の注入は、適切な緩衝材及び注入すべき材料が裏込めされた(図2に示す)ダブルパレル型ナノピペットを用いて実行しうる。適切な緩衝材には、リン酸塩、クエン酸塩又は分子生物学の研究で通常用いられている他の如何なる緩衝材も含まれる。注入すべき材料には、小分子、代謝物、核酸、オリゴヌクレオチド、ペプチド、アミノ酸が含まれるが、これらに限定されるものではない。図2は、パレル204及び206と、これらのパレル内にそれぞれ1つずつ入れられた電極208及び210とを有するダブルパレル型のピペット202を用いる細胞透過を示している。ピペット202は、図1に示されているように圧電コントローラに取り付けられる。ダブルパレル型のピペットによれば、一方のパレルを、接地電極(図1における電極122を参照)として作用しうる他方のパレルに対してバイアスし、シングルパレル型のピペットでは一般的であるような外部接地電極の必要性を排除するという利点を生じる。このピペットによれば、シングルパレル型のピペット及び外部の接地電極の場合に生じるおそれのある何れの電気穿孔の影響をも除外するという更なる利点が得られる。ナノピペットの先端部からの排出レートは、印加電圧とこの印加電圧の持続時間との双方に依存する(図3)。排出量は、ピペットの先端部をミネラルオイル内に浸漬した場合、100Vとした印加電圧の時間に対し直線状に現れる。ミネラルオイルは、排出材料のドロップレット寸法を測定することにより校正する目的のためにのみ用いた。ミネラルオイルには排出材料が含まれる。その理由は、水溶液はミネラルオイル内に溶解できないためである。

【0084】

電源118に接続されたパレル202から細胞212内に材料を注入するのは、図1で上述した且つカスタムソフトウェアを用いて制御される回路を用いることにより実行される。注入は、細胞212の細胞質領域内に行うものとして示してあるが、観測される核214内の注入も達成しうる。細胞は、図6に示すように形成しうる固体の支持体216上に載せる。細胞株からの細菌、真菌、獣類、哺乳類の細胞を含む細胞を注入の目的に用いることができる。この注入は、ナノピペットを細胞膜の50~200nmの範囲に、好ましくは約100nmまでゆっくり降下させ、ここで帰還状態に入れるとともに停止させることにより達成させる。次に、このナノピペットを0.5~2 μ mの範囲で、好ましくは0.9~1.2 μ mの範囲内で迅速に降下させ細胞膜に侵入させる。降下させているナノピペットの速度は50~200 μ m/秒、好ましくは80 μ m/秒の範囲とすることができる。低電圧帰還システムをナノピペットから切り離し、高電圧源を高電圧リレーにより所定の時間の間接続する。帰還のための低電圧には、2Vよりも低い、好ましくは1Vよりも低い電圧が含まれる。帰還のための高電圧には、0.5Vよりも高い、好ましくは1Vよりも高い電圧が含まれる。これら2つの電源を用い、一方の電源は、-1~+1Vの範囲の電源を有するナノピペットを配置するためのものであり、他方の電源は-100V~+100Vの範囲の電源を導入するためのものである。代表的な細胞注入は約5~30Vの範囲で行われるが、これらの電圧は、排出が再現可能であり電圧が細胞を損傷させない限り変えることができる。次に、抵抗を介してナノピペットを放電させ、このナノピペットを高速度で後退させる。図5は、染料のカルボキシフルオレセインをヒラ細胞内に注入した一例を示す。細胞の損傷が無いことがすぐに視覚化され、蛍光発光が数分の間細胞壁部内に閉じ込められる(図5)。

【0085】

[細胞基板のパターン化]

本発明の他の態様は、規則的なアレイのピースを含む細胞又は分子構造の固定化のために設計及び製造したセルシフターに向けたものである。細胞を規則的なアレイに固定することにより、このアレイの各要素を順次にアドレスするようにSICMを制御することが

10

20

30

40

50

でき、これによりオペレータが各細胞に別々に個別注入する必要性を低減させるようにする。セルシフターは、半導体製造技術を用いて製造する(図6A~6E)。簡潔に言えば、シリコンの塩(例えば、シリコン窒化物)の500~1000nmの層、好ましくは約750nmの層602をシリコンウエハ604の表面上に堆積する。シリコンウエハは200~1000 μ m、好ましくは300~600 μ mの厚さとすることができる。1~5 μ m、好ましくは2~3 μ mの孔606を、反応性イオンエッチングを用いて適切なピッチのアレイでシリコンの塩の層を貫通するようにエッチング形成する。適切なピッチは50 μ mよりも大きくし、好ましくは100 μ mのピッチとする。信用(fiduciary)マーク(図示せず)をアレイの1つの隅部内にエッチング形成し、SICMのアライメントに対して用いるようにする。次に、ウエハの裏面608を適切なアルカリ(例えば、水酸化ナトリウム又は水酸化カリウム)によりエッチングして、孔の下側にチャンバ610を形成するとともに、このチャンバに負圧を与えるための溝612を形成する。次に、シリコンウエハをガラスウエハ614に接着して、エッチング形成したチャンバ及び溝を封止する。装置は対称的に設計されている為、装置の両対向面に2つのアレイが存在する。装置は、アレイ上のシリコンの塩を取り外し、バープ(barb)616を取り付け、これに真空ラインを取り付ける。他のアレイを囲んで、プラスチックリング618を適切なポリマーを用いて取り付け、これを細胞培養チャンバとして作用させ、細胞を細胞培地内に浸漬させる。適切なポリマーには、シリコンポリマー、例えば、シリコンを含む有機ポリマーが含まれる。シリコンの一例は、ポリジメチルシロキサンである。装置は、ポリマーを含む(しかしポリマーに限定されない)分子を固定させるのに用いることができる。分子はビーズ620内に含めることができる。細胞又は分子は、負圧を装置の貫通孔に与えることにより固定化される。細胞は、例示的なビーズ620により示すように、孔により規定されたアレイに配置される。

10

20

30

40

50

【0086】

一例として、10 μ mの蛍光ポリスチレンビーズ(黄緑吸収:505;放出:515)を用いて装置を検査した。これらのビーズはほぼ哺乳類細胞の寸法となっており、装置を検査するための良好なモデルを提供するものである。これらのビーズは、負圧を装置の貫通孔に与えることにより良好に固定された。丁寧な洗浄後、全ての貫通孔は各孔上に単一のポリスチレンビーズを固定していることが観察された(図6E)。他の例では、セルシフターを用いてヒラ細胞を固定化させた。細胞は、0.1MのPBS内に浮遊させ、負圧を貫通孔に与えることにより良好に固定された。

【0087】

[単細胞内の分子検出]

本発明の他の態様は、図1に示すように、xyz制御注入装置と結合され且つセンサとして作用するように官能化されたナノピペットの組み合わせに向けたものである。ナノピペットセンサは、極めて幾何学的にテーパ型光ファイバに類似しており、これらは同じレーザープリング処理で製造しうるが、変換メカニズムは基本的に異なるものである。光ファイバによる生物学的検出は、蛍光的に標識が付された検体の検出に依存するか、又はナノピペットセンサの読出しが純粹に電氣的であり、生体分子の標識化が必要としないELISAのような読出しに依存する。ナノピペットセンサの感度は、円錐形状としたナノピペットの先端部で最大として、この先端部のオリフィスの寸法及び幾何学的形状はバイオセンサの性能に欠かせないように形成する。ナノスケールの寸法とした先端部の開口における永続的な結合からのゲーティングによりナノピペットの電気信号に対する明瞭な変化を生ぜしめる。次に、この電氣的な変化を、簡単な電気機械機構により実時間で如何なる標識も必要とすることなしに検出する。走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)で利用されているように、光ファイバのように、ナノピペットセンサを、高空間解像度を達成する圧電アクチュエータと一体化させることができる。ナノピペットセンサとSICMとのこの組み合わせは、複数の細胞及び単一の細胞を含む表面の地理学的写像に用いる。他の適用は、無標識のバイオセンサを用いて、単一生細胞内の、タンパク質及び核酸を含む分子及び代謝物を検出することにある。ある実施例では、単一生細胞内で免疫測定法

を実行しうる。他の適用は、単一のがん細胞内のがんタンパクを検出することにある。他の適用は、実時間及びナノスケールの解像度で単細胞内の生物活性を測定することにある。これは、例えば、単細胞内のタンパク質 タンパク質の相互作用を研究するのに用い

【0088】

図9Aは、ここで具体化した技術を用いた細胞の地理学的写像を示す画像図である。細胞902内の分子の検出は、ナノピペットセンサ904を調査細胞内に規定の深さまで挿入するために、高精度のナノマニピュレータと電流帰還ループとに依存する。ナノピペット904が細胞の表面に近づくと、単一の孔とその内部の電極906とを有するピペット904を流れるイオン電流が、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡で利用されている周知の10効果である「電流のスケーリング」により減少する。このイオン電流を監視することにより、図1に示すような帰還回路及びxyzコントローラを用いて細胞膜の約200nm以内でナノピペットの正確な位置を決定且つ制御できる。更に、帰還機構により、ナノピペットの先端部が細胞膜を除いて何とも接触せず、この先端部が他の構造体又は基板と接触することによる破壊のおそれを回避する。細胞は、適切なポリマーの層で被覆された平坦な表面908（例えば、ペトリ皿、スライドガラス）上に配置しうる。適切なポリマーには、シリコンポリマー、例えば、シリコンを含む有機ポリマーが含まれる。シリコンの一例は、ポリジメチルシロキサンである。細胞には、リン酸塩緩衝材、クエン酸塩緩衝材を含む（しかし、これらには限定されない）適切な緩衝材で被覆することができる。20電気浸透流をナノピペットパレルから外方に向ける際には、ナノピペットセンサを正電圧（例えば、+100mV~+1000mV、好ましくは+500mVよりも高い電圧）でバイアスすることができる。この構成によれば、何らかの細胞残屑又は分子が培地内に存在してセンサと作用し合ったり、この構成の性能に悪影響を及ぼしたりすることを回避する。帰還ループは、電流がその初期値の70~99%、好ましくは99%よりも多く減少されるまで、約10nmのステップでセンサを降下させる。細胞膜の上方のこの初期位置決め後に、ナノピペットを約2μm、好ましくは1μmだけ、50~200μm/秒、好ましくは80~150μm/秒の範囲の速度で細胞内に挿入する。センサは極めて高速度で挿入させて、細胞に対する妨害を低減させるとともに細胞の生存率を最大にする。ナノピペットのベースライン電流及び細胞の生存率に何らかの顕著な変化を生ぜしめることなく、同じ細胞上で複数の浸透を実行しうる。センサが一旦細胞内に挿入されると、250mV~500mVの振幅及び1~10Hz、好ましくは4Hzよりも高い周波数を有するAC電圧をナノピペットセンサに印加して検出を実行する。30

【0089】

現在のナノピペットセンサは、現在の装置の構成要素を検出するために用いられている官能化されたナノピペットを有する。これらの官能化されたナノピペットは、2010年3月25日に公開された“Functionalized Nanopipette Biosensor”と題する米国特許出願公開US2010/0072080に発明者のうちの2人により記載されている。この米国特許出願公開は参考のために記載したものである。簡潔に言えば、ナノピペットは、ポリマー、多糖類を含む分子や、抗体、ペプチド及びバイオポリマーを含む（しかし、これらに限定されない）生体分子に対する化学結合により官能化させることができる。これらのセンサは、その内側表面上でポリアクリル酸(PAA)、すなわちアクリル酸単位のポリマーで被覆することができる。PAAの化学式は $(C_3H_4O_2)_n$ である。中性のpHでの水溶液内では、PAAの側鎖の多くがこれらのタンパク質を失い、負電荷を得る。これにより、PAAをポリ電解質とする。表面は更に、多糖又はタンパク質に結合するように官能化させる。ナノピペットセンサに対する結合の検出は、電流整流に基づいている。この検出は、荷電したナノ細孔が、非対称的な電流出力に対する対称的な入力電圧に応答した場合の効果を言及している。拡散電気二重層の厚さが孔の大きさと同程度である場合、ナノ細孔表面上の固定された荷電種と溶液内のイオン種との間の静電相互作用がナノピペットの選択透過性を変える。整流係数は、特定の正電圧で測定した電流と、大きさは同じであるが極性を逆とした電圧で測定した電流との間の比の対数として規定される4050

【数 1】

$$r = \log_{10} \frac{I_+}{I_-}$$

【0090】

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

10

【0091】

(例 1 : 材料及び方法)

[ダブルパレル型ナノピペットの製造] : ナノピペットは外径を 1.2 mm とし、内径を 0.9 mm としたシータ石英キャピラリー (Sutter Instrument 社の QT120-90-7.5) から製造した。この場合、このキャピラリーは、約 50 nm の内径を有するナノピペットを製造する 2 ラインプログラムでプログラミングした P 2000 レーザプラ (Sutter Instrument 社) を用いてプリング処理した。使用したパラメータは、Heat 650、Fil 4、Vel 20、Del 170 及び Pul 0 と、Heat 750、Fil 4、Vel 40、Del 170 及び Pul 200 とした。その結果のナノピペットの先端部は約 50 nm の内径を有した。

20

[細胞培養] : (研究室に保たれていた) ヒーラ細胞を、P D M S の薄肉層で被覆されたペトリ皿上で 37 °C で 5 % の C O₂ 内で、10 % のウシ胎仔血清、1 % のビルビン酸ナトリウム及び 1 % の Pen/Strep/Glu (ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミン) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) で培養した (37 °C、5 % の C O₂) 。

[試薬] : ポリエルリジン (P L L ; 19320 A) を Electron Microscopy Sciences 社 (Hatfield, PA 所在) から購入した。ダルベッコ変法イーグル培地 (M T 10017 C V)、ウシ胎仔血清 (B W 14502 F)、ビルビン酸ナトリウム (B W 13115 E) 及び Pen/Strep/Glu (S V 3008201) は Fisher 社から購入した。ポリジメチルシロキサンは Dow Corning 社から購入した (Sylgard (登録商標) 184 シリコンエラストマーキット)。p H 7.4 の (B S A, Q ドット) P B S 溶液は標準の方法を用いて調製した。水性試薬は、18 M Ω cm⁻¹ よりも大きい抵抗値とした MilliQ 水を用いて調製した。

30

[電気浸透排出用測定機構] : この機構は、ピペットバイアス及び電流測定のための低雑音増幅器 (Sunnyvale, CA 所在の Molecular Devices 社製の Axopatch 200B) と、X、Y 及び Z 方向における粗調整のためのマイクロマニピュレータ (M P 285) と、X、Y 及び Z 方向における微調整のための圧電アクチュエータと、システムのハードウェア制御のための F P G A (National Instruments 社製) とから構成した。このシステムは更に、低雑音高電圧源 (A-M Systems 社製の Model 2100 Isolated Pulse Stimulator) と、帰還制御に必要とする低電圧及び電気泳動材料の排出に必要とする高電圧間で切換えを行うカスタムリレーとで修正する。このシステムは Lab V I E W 内に書き込まれたカスタムコード化ソフトウェアを用いて制御される。

40

【0092】

(例 2 : ナノピペットセンサを用いた単細胞生体内免疫測定法)

(実験項)

[測定機構] : 基準電極を分極させるにはナノピペットを流れる電流が小さすぎる為、2 電極機構を用いた。作用電極として機能するナノピペットセンサには作業緩衝材が裏込めされているとともに、Ag/AgCl 電極が挿入されている。バルク溶液内には他の Ag/AgCl 電極が配置されており、この電極が補助/基準電極として機能している。これらの双方の電極が、DigiData 1322A デジタイザを有する Axopatch 700B 増幅器 (Molecular Devices 社製) と、pClamp 10 ソフトウェアを具える P C (Molecular Devices 社製) とに接続されている。このシステムは、室温で行われた測定の間はかくはんしない状態に維持した。

50

[試薬] : ポリエルリジン (P L L ; 1 9 3 2 0 A) を Electron Microscopy Sciences 社 (Hatfield, PA 所在) から購入した。ポリクローナル抗体 H P V 1 6 E 6 (C 1 9) 及び H P V 1 8 E 6 は Santa Cruz Biotechnology 社 (Santa Cruz, CA 所在) から購入した。ダルベッコ変法イーグル培地 (M T 1 0 0 1 7 C V) 、 ウシ胎仔血清 (B W 1 4 5 0 2 F) 、 ビルビン酸ナトリウム (B W 1 3 1 1 5 E) 及び Pen/Strep/Glu (S V 3 0 0 8 2 0 1) は Fisher 社から購入した。ポリジメチルシロキサンは Dow Corning 社から購入した (Sylgard (登録商標) 1 8 4 シリコンエラストマーキット) 。 p H 7 . 4 の P B S 溶液は標準の方法を用いて調製した。水性試薬は、 $1 8 \text{ M } \text{ cm}^{-1}$ よりも大きい抵抗値とした MilliQ 水を用いて調製した。

[ナノピペットセンサの製造] : ナノピペットは、フィラメント、 $1 . 0 \text{ mm}$ の外径及び $0 . 7 0 \text{ mm}$ の内径を有する石英キャピラリー (Sutter Instrument 社の QF100-70-5) から製造した。この場合、このキャピラリーは、約 $5 0 \text{ nm}$ の内径を有するナノピペットを製造するようにプログラミングした P 2 0 0 0 レーザプラ (Sutter Instrument 社) を用いてプリング処理した。使用したパラメータは、Heat 700、Fil 4、Vel 60、Del 150 及び Pul 192 とした。その結果のナノピペットの先端部は $3 7 \sim 8 2 \text{ nm}$ の範囲の内径を有し、平均の内径は $5 6 \text{ nm}$ のとした。

[抗体の固定] : 抗体は、以下のステップにより固定させた。最初に、水中のポリエリジンの $0 . 0 1 \%$ 溶液をナノピペットに入れ、続く 3 分間の $4 6 0 0 \text{ rpm}$ での遠心分離によりその内部を被覆した。この遠心分離ステップは、ナノピペットの最先端部にこの溶液を与えるのに役立つ。過剰の P L L 溶液を除去した後、このナノピペットを $1 2 0$ で 1 時間の間焼いて P L L 被膜を安定化させた。次に、ナノピペットにスルホ S M C C 溶液 (2 mg/ml 、 $1 0 \text{ mM}$ E D T A、 $5 0 \text{ mM}$ P B S) を充填して、3 分間の $4 6 0 0 \text{ rpm}$ で遠心分離させ、次いで 1 時間の間室温でインキュベートした。次に、ナノピペットを $0 . 0 1 \text{ M}$ P B S ですすぎ洗いし、少なくとも 3 時間の間遠心分離させ、未反応の如何なるスルホ S M C C 分子をも除去した。スルホ S M C C には、P L L アミノ基と反応して、チオエーテル結合を介する抗体架橋に対し得られるマレイミド基を残すアミン反応性 N ヒドロキシスクシンイミドを含む。次に、ナノピペットを抗体溶液 ($1 0 \mu \text{ g/ml}$ IgG、P B S、1 時間、 $3 7$) に対してインキュベートした。次に、抗体官能化が行われたナノピペットを P B S で少なくとも 3 回すすぎ洗いするとともに遠心分離させて、結合されていない如何なる抗体をも除去するとともに先端部全体に亘る電解質の充填が平滑に行われようにする。

[細胞の融解] : ヒーラ細胞を、成長培地 ($1 0 \%$ の D M S O) 内に約 $1 0^6$ 個の細胞を含むアリコート内に凍結させた。解凍後、細胞をペレットに沈降させ、浮遊物を捨て、 $1 0 0 \mu \text{ L}$ の P B S 溶液中で再び懸濁状態にした。細胞膜を溶解させるのにコバリス (Covaris : 登録商標) を S シリーズの SonoLAB (登録商標) ソフトウェアにより制御して用いた。条件は、 $6 0$ 秒間で、 5% のデューティサイクル、 $2 0 0$ のサイクル/バーストとした。細胞溶解物を 5 分間の間 $4 0 0 0 \text{ rpm}$ で遠心分離させ、細胞残屑から生体分子を分離させた。バイアルを 2 時間以内で氷の中に入れて用い、プロテアーゼ阻害を最少にした。

[走査型イオンコンダクタンス顕微鏡] : S I C M を社内で組立てた。これは、電流増幅器 (Molecular Instruments 社の Multiclamp 700B)、粗調整のためのマイクロマニピュレータ (Sutter Instruments 社の MP-285) 及び微調整のための圧電アクチュエータ (Physik Instrumente 社の NanoCube (登録商標)) に基づいている。この機構を、この分野に対し特に社内開発したユーザカスタマイズソフトウェア (Lab V I E W) を用いて制御した。

[細胞培養] : (研究室に保たれていた) ヒーラ細胞を、P D M S の薄肉層で被覆されたペトリ皿上で $3 7$ で 5% の CO_2 内で、 $1 0 \%$ のウシ胎仔血清、 1% のビルビン酸ナトリウム及び 1% の Pen/Strep/Glu を含むダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) で培養した ($3 7$ 、 5% の CO_2) 。

[0 0 9 3]

[細胞内タンパク質の検出]

10

20

30

40

50

現在のナノピペットセンサは細胞内のがんタンパクを生体外で選択的に検出する。最初に、種々のHPV遺伝子型を識別するためのナノピペットセンサの選択性を調査した。プローブセンサを、HPV18E6をターゲティングする抗体で官能化するとともに、制御プローブにはHPV16E6を入れた。HPV18E6は、人間内の「悪性」タンパク質として知られている。文献：Oncogene 18(42):5727-5737 (1999)の“The human papilloma virus (HPV)- 18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon- alpha ” (Li氏等著)を参照されたい。更に、HPV16E6は、文献：Genes Dev. 18(18):2269-2282 (2004)の“Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex ” (Gewin氏等著)に記載されている。双方のセンサを、100pg/mLのHPV18E6抗原を含む溶液内に浸漬させた。特定のタンパク質-タンパク質の相互作用により、プローブセンサの電流振幅を、段階的なブロックエイド(blockade)を経て瞬時的に減少させた(図10)。ナノピペットセンサの開口のごく近くでのこれらの逐次結合が局所的なインピーダンスを変化させ、従って、記録されるイオン電流に段階的な変化を生ぜしめる。これらの永久的なブロックエイドは、電気特性がHPV18のタンパク質E6抗原により乱されない制御センサでは見られない。更に、これらのブロックエイドは分子移動により生ぜしめられるものとも識別する。その理由は、ナノピペットを移動するタンパク分子は、マイクロ秒レンジの持続時間を有する短くて瞬時的なブロックを発生する為である。

10

【0094】

20

次に、細胞溶解物内のナノピペットセンサの選択性を検出した。連続希釈を約 10^6 個のヒラ細胞を含むアリコートによって実行してセンサの感度を決定した。350,000xの希釈では、HPV16E6で官能化されている以外何もしていない裸のナノピペットでは如何なる変化も得られないが、HPV18E6で修飾されたナノピペットセンサに対しては測定電流が7%だけ変化することが検出された(図11)。制御センサは依然として10倍多く濃縮した試料に反応しないが、プローブセンサ内の測定電流はその初期値の23%だけ低下した。その結果を以下の表1に集約してある。

【0095】

【表1】

30

(表1： 10^6 個のヒラ細胞の溶解物の連続希釈に対するナノピペットセンサの出力電流の正規化変化)

希釈度	ナノピペット	HPV16E6 センサ	HPV18E6 センサ
350000X	100	100	93
35000X	100	100	77
35000x	93	86	9
3500x	2	4	4

【0096】

印加電圧は、非特異的吸着を回避しない場合に制限する極めて重要な役割を奏するために示したものであるが、この問題は、図11が3500Xの細胞溶解物の希釈度に対し且つそれよりも低い値で、信号が非特異的吸着から顕著に上昇したことを示している通り、濃縮溶液内で顕著となる為に常に考慮する必要がある。図11は、ヒラ細胞溶解物を異なる濃度で加えた後の測定電流に関する変化をもパーセントで示している。印加電圧はpH7.4のPBS溶液中で-500mVとした。

40

【0097】

単細胞内のがんタンパクは、所定の深さに対するナノピペットセンサをプローブセル内に挿入するのに、高精度のナノマニピュレータ及び電流帰還ループに依存する。ナノピペットが細胞の表面に近づくにつれ、このナノピペットを通るイオン電流は、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡で利用されている周知の効果である「電流のスケーリング」によ

50

り減少する。イオン電流を監視することにより、細胞膜の約200nm以内でナノピペットの正確な位置を決定及び制御することができる。更に、帰還機構により、ナノピペットの先端部が細胞膜を除く他の如何なるものとも接触せず、この先端部が他の構造体又は基板と接触することによりこの先端部が破壊する可能性が回避される。ヒラ細胞は、PDM Sの層で被覆され且つ完全培地で被覆されたペトリ皿上に配置した。

【0098】

電気浸透流がナノピペットのパレルから外方に向けられた際に、ナノピペットセンサは+500mVでバイアスした。この構造によれば、培地内に存在し、センサと作用し合っ
てその性能に悪影響を及ぼす如何なる細胞残屑又は分子をも回避する。帰還ループは、電
流がその初期値の92%減少されるまで、センサを10nmのステップで降下させる。細胞
膜の上方のこの初期の位置決め後、ナノピペットを100μm/秒の速度で2μmだけ細胞
内に挿入した。センサは極めて高速度で挿入させて、細胞に対する妨害を低減させると
ともに細胞の生存率を最大にする。ナノピペットのベースライン電流及び細胞の生存率に
何らかの顕著な変化を生ぜしめることなく、同じ細胞上で複数の浸透を実行しうる。セン
サが一旦細胞内に挿入されると、250mVの振幅及び5Hzの周波数を有するAC電圧を
ナノピペットセンサに印加して検出を実行した。

10

【0099】

図12は、ヒラ細胞内に挿入されたナノピペットセンサの応答特性を示す。裸のナノ
ピペットをヒラ細胞内に挿入した際に、ベースライン電流には顕著な変化が検出されな
いが、HPV18E6をターゲティングする抗体で官能化された制御センサでは5%の
減少が検出された。ヒラ細胞は、HPV18のみ影響されることが知られている。こ
のことは、アンチHPV18E6で官能化されたナノピペットセンサを有するヒラ細胞
の浸透により確認された。HPV18E6のがんタンパクの特定の検出によりヒラ細胞
内での検出後に8%の電流降下が測定された。これらの結果は、ナノピペット技術が個々
の細胞内のタンパク質-タンパク質の相互作用の研究を、如何なる標識化の必要性も無く
可能にしようということを示すものである。

20

【0100】

(例3：石英のナノピペットを用いる制御式電気浸透による細胞のパターン化)

ポリリシン及びウシ血清アルブミン(BSA)を用いて細胞に対するパターンを規定した
。ナノピペットのパレル内には、1mg/mlのラミニンを用い、これを35mmのペトリ皿内
のPDM S基板上に直接堆積した。パターンの堆積は、電解質溶液と量子ドットとの混合
により確認した。次に、堆積を可視化するとともに印刷中のエラーを検査する蛍光顕微鏡
法を用いてこれらのパターンを評価した。次に、基板をセルフマスキング工程において1
mg/mlのBSAで洗浄した。パターンを規定した後、基板を細胞培地内に浸漬させた。ヒ
ラ細胞は、用いるのが容易であるとともにこれらのロバスト性の為にこれらの研究にお
けるモデル細胞として用いた。細胞は培地内に分散されているとともに、基板上に定着
された。数時間の培養後、予め温めておいた培地を用いて細胞をそとすすぎ洗いして、
基板にしっかり付着していない如何なる細胞も除去した。細胞の付着は、質と量との双方
で査定した。

30

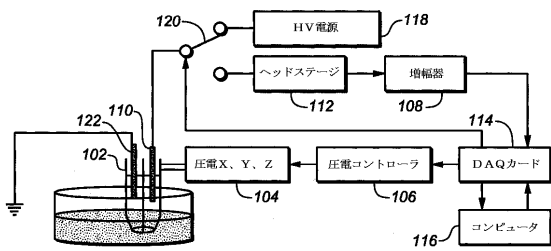
【0101】

(結論)

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

40

【 図 1 】



【 図 2 】

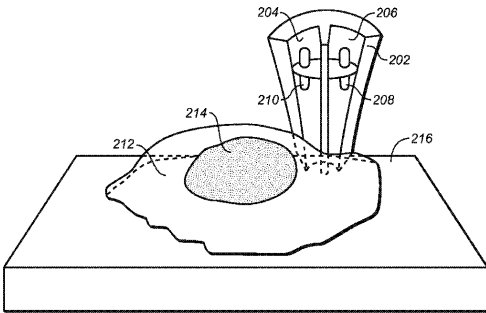
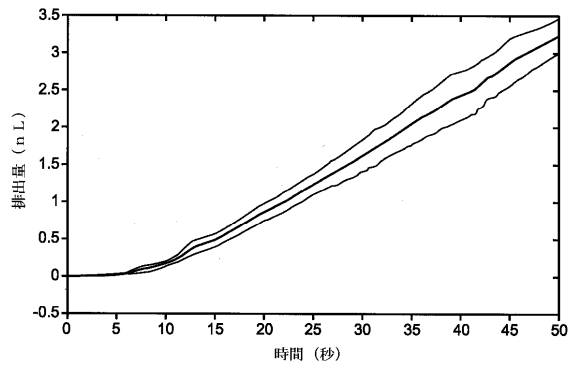


FIG. 2

【 図 3 】



【 図 4 A 】

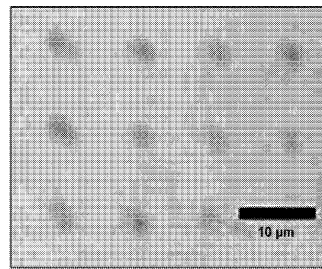


FIG. 4A

【 図 5 A 】

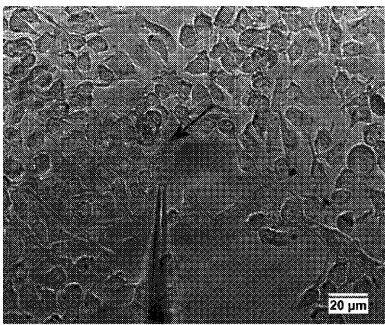


FIG. 5A

【 図 5 B 】

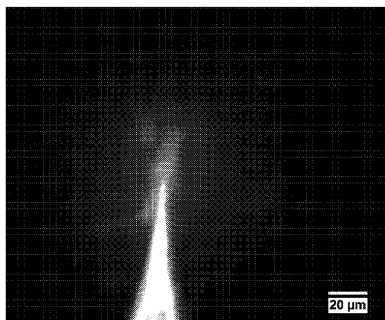


FIG. 5B

【 図 6 A 】

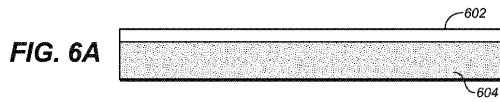


FIG. 6A

【 図 6 B 】

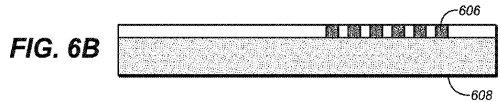


FIG. 6B

【 図 6 C 】

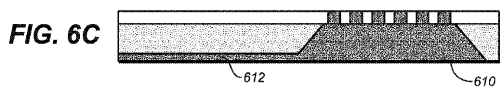


FIG. 6C

【 図 6 D 】

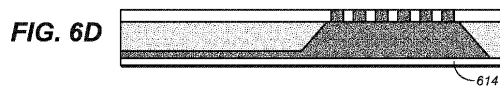


FIG. 6D

【 図 6 E 】

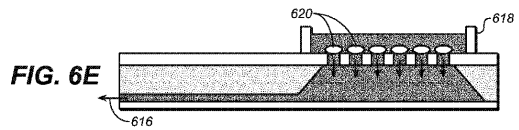


FIG. 6E

【 図 8 】

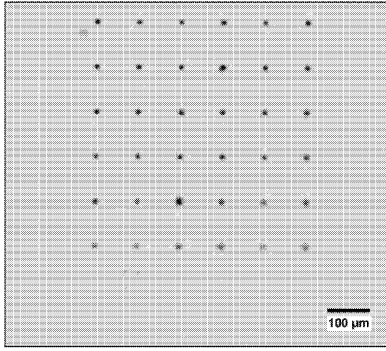


FIG. 8

【 図 9 A 】

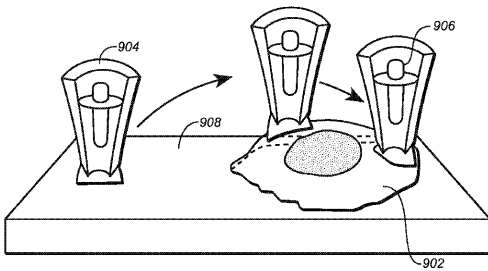
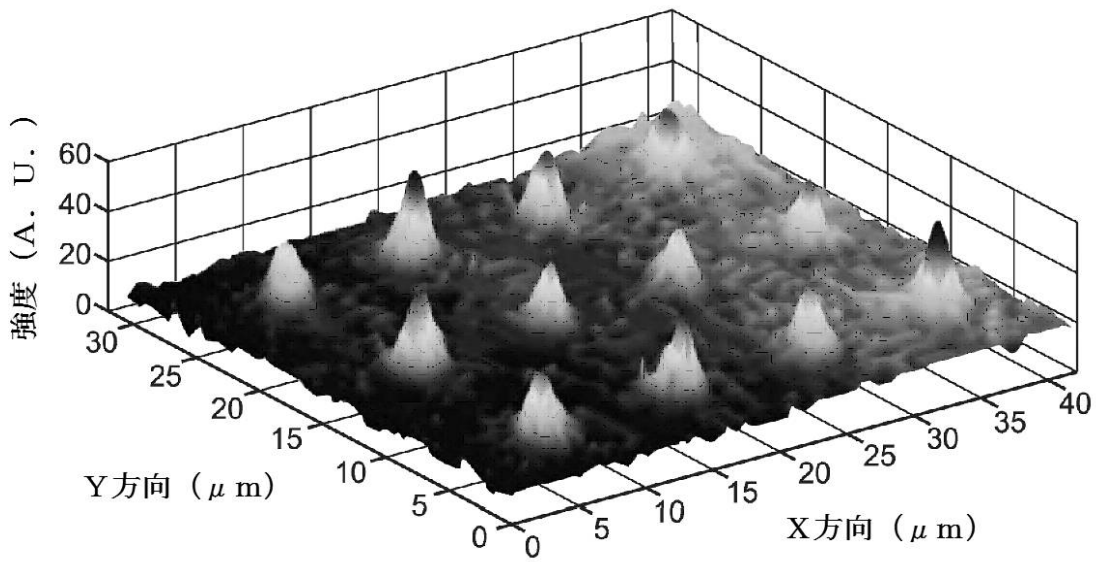
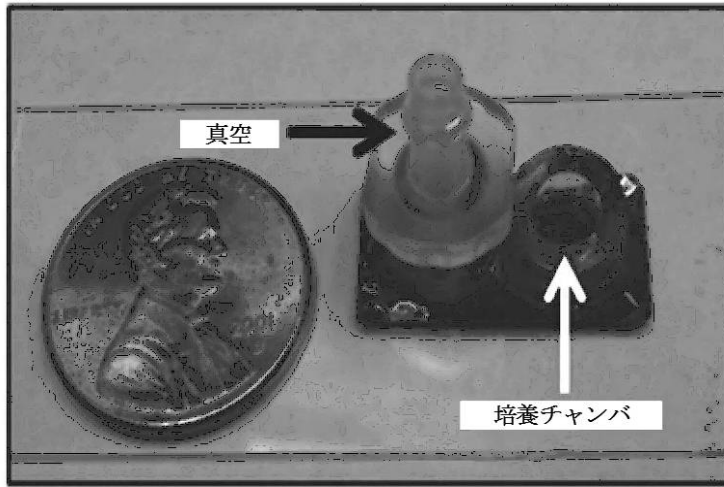


FIG. 9A

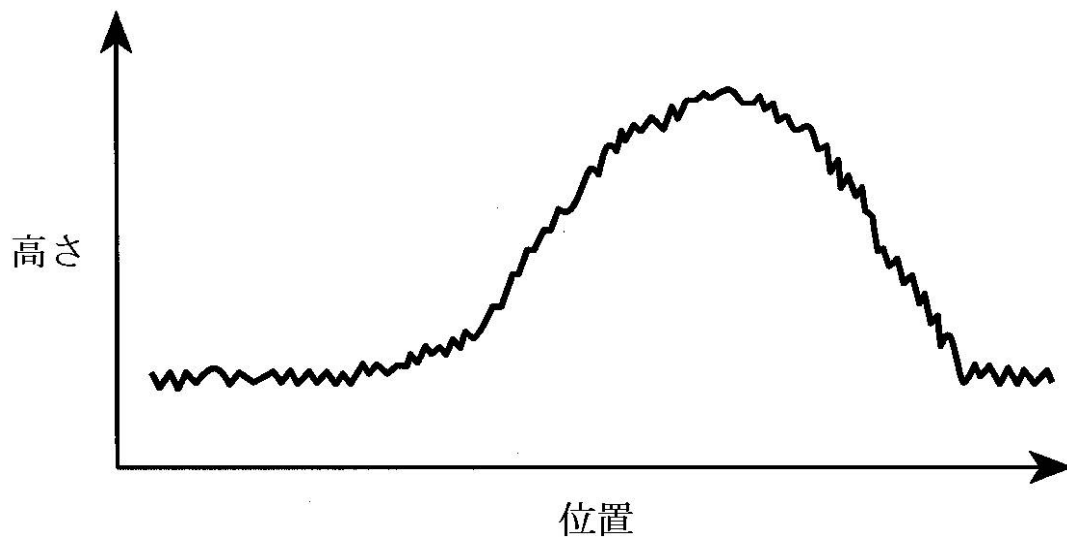
【 図 4 B 】



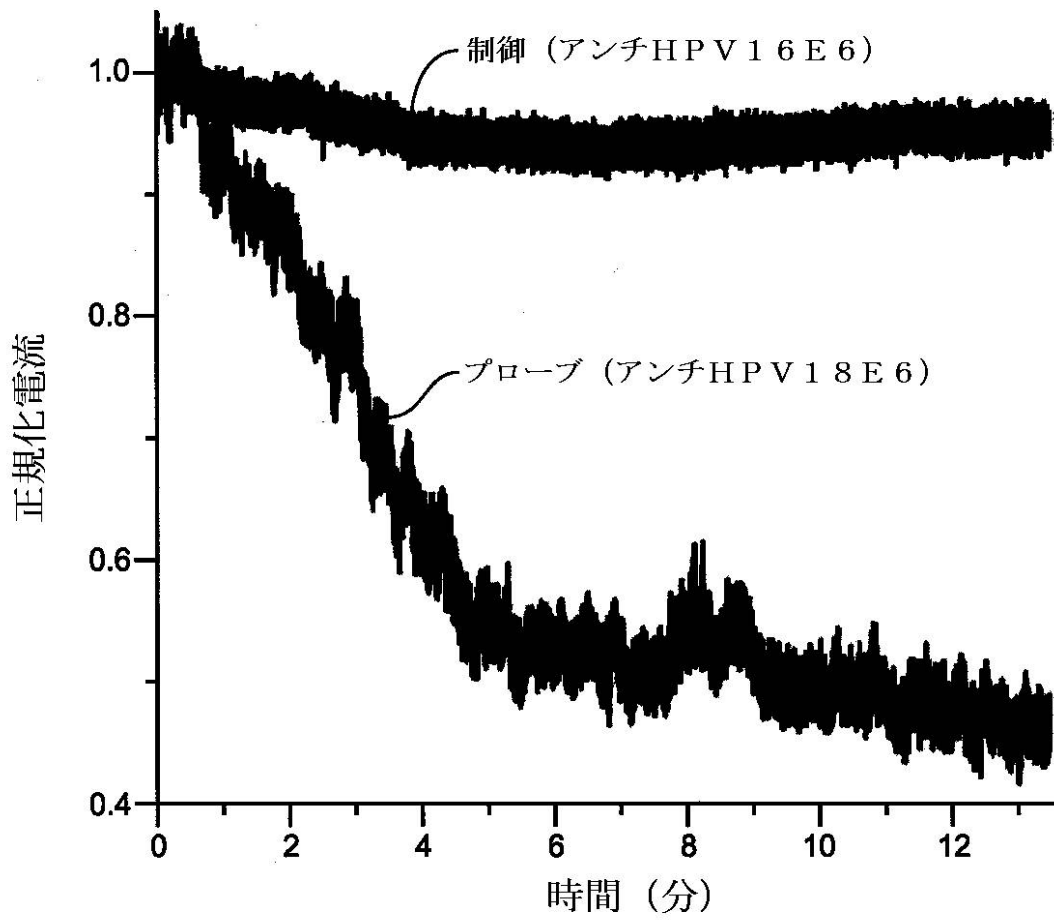
【図7】



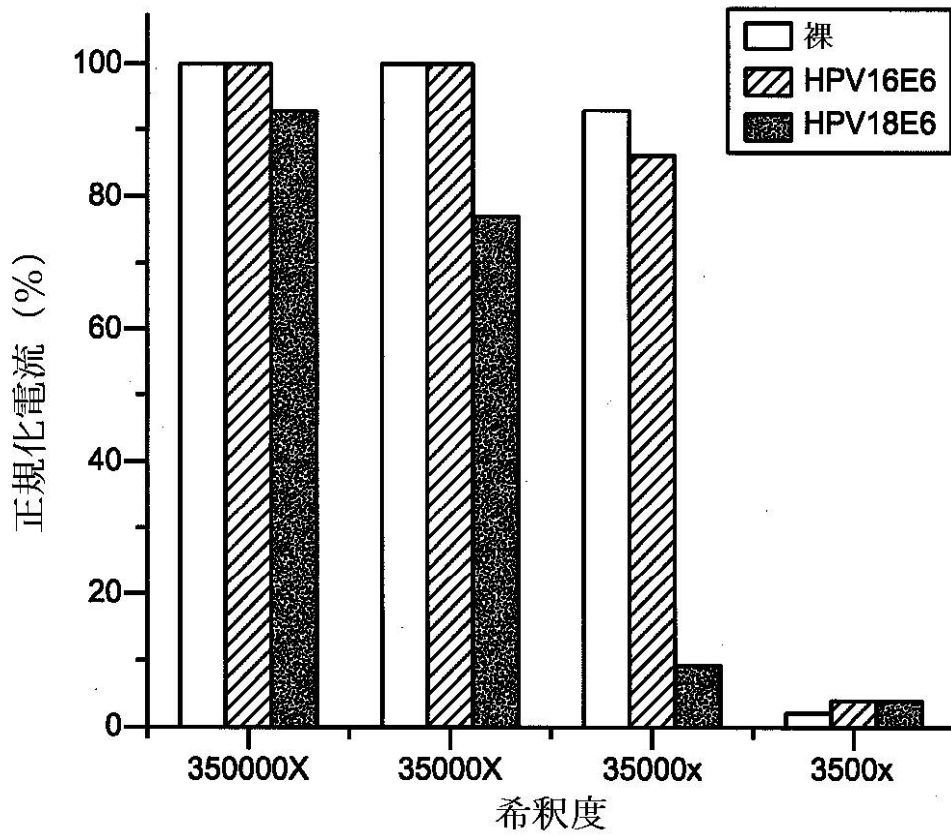
【図9B】



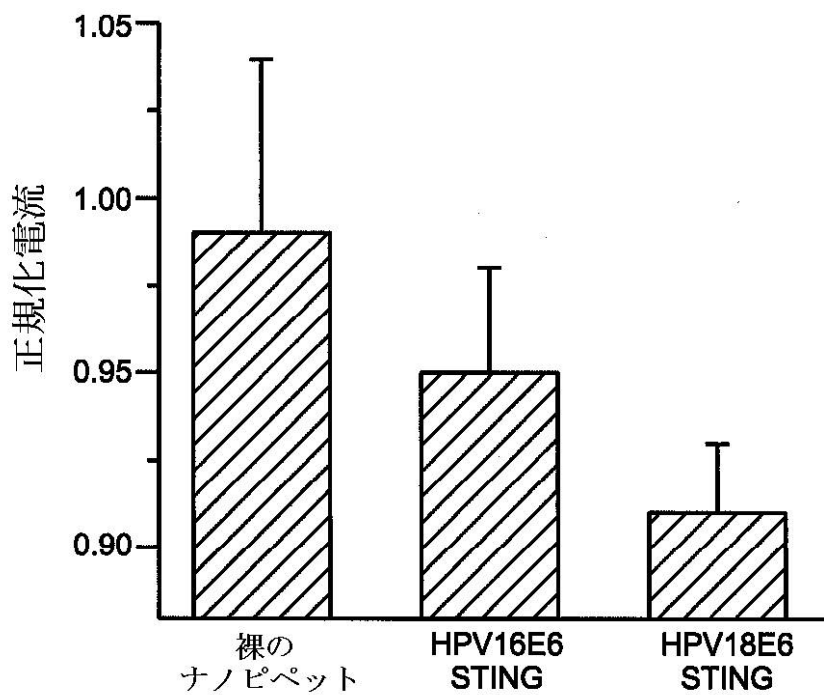
【図10】





【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/026781
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12M 1/42(2006.01)i; C12N 13/00(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12M 1/42; B05D 5/12; G01N 27/00; B05D 3/00; G01N 27/26; G01K 7/02; C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & keywords: multi-barrel, double-barrel, nanopipette, electrode, amplifier, xyz control, circuit, voltage, eject, field-programming gate array, etc.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RODOLFA, KIT. T. et al., 'Two-component graded deposition of biomolecules with a double-barreled nanopipette', <i>Angewandte Chemie</i> , 28 October 2005, Vol. 117, No. 442, pp. 7014-7019, ISSN 1433-7851. See the whole document.	1-32
A	RODOLFA, KIT. T. et al., 'Nanoscale pipetting for controlled chemistry in small arrayed water droplets using a double-barrel pipet', <i>Nano Letters</i> , 7 January 2006, Vol. 6, No. 2, pp. 252-257, ISSN 1530-6984. See Abstract; Fig. 1.	1-32
A	KR 10-0816088 B1 (KOREA RES INST OF STANDARDS) 24 March 2008 See claims 1, 2, and 4; Fig. 1.	1-32
A	US 2010-0285210 A1 (CHOI, TAE-YOUL) 11 November 2010 See claim 35; paragraphs [0042] and [0047].	1-32
A	US 2004-0241681 A1 (KORCHEV, Y. E. et al.) 2 December 2004 See claims 1, 6, and 7; paragraphs [0051] and [0056].	1-32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 25 FEBRUARY 2013 (25.02.2013)		Date of mailing of the international search report 26 FEBRUARY 2013 (26.02.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. 82-42-481-8150 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/026781

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 10-0816088 B1	24.03.2008	WO 2008-075842 A1	26.06.2008
US 2010-0285210 A1	11.11.2010	None	
US 2004-0241681 A1	02.12.2004	AT 511091 T	15.06.2011
		AU 2002-310627 A1	02.01.2003
		DK 1397675 T3	18.07.2011
		EP 1397675 A2	17.03.2004
		EP 1397675 B1	25.05.2011
		JP 2005-503269 A	03.02.2005
		JP 3981071 B2	26.09.2007
		US 7297486 B2	20.11.2007
		WO 02-102504 A2	27.12.2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 N 11/14	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	B
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
G 0 1 N 33/566 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/566	
B 8 2 Y 5/00 (2011.01)	G 0 1 N 33/543	5 2 5 U
B 8 2 Y 40/00 (2011.01)	B 8 2 Y 5/00	
	B 8 2 Y 40/00	

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

(72)発明者 アール アダム セガール
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 6 4 サンタクルーズ ハイ ストリート 1 1 5 6
 ビーイー 2 0 6

(72)発明者 バオロ アクティス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 6 4 サンタクルーズ ハイ ストリート 1 1 5 6
 ビーイー 2 0 6

(72)発明者 ボアズ ビロズニー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 6 2 サンタクルーズ ハルターマン アベニュー
 2 0 5 0 ナンバーエイ

(72)発明者 ナダル ポウルマンド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 6 4 サンタクルーズ ハイ ストリート 1 1 5 6
 エスオーイー 2

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BA13 BB20 BB24 CB01 CB02 DA36 FA34 FB03
 FB05 FB15 GC20 HA09 HA14 HA20 JA07 JA08 JA09 JA11
 JA20
 4B024 AA19 AA20 GA12 HA20
 4B029 AA07 AA08 AA09 AA25 BB01 CC02 CC03 FA01 FA15 GB05
 HA07
 4B033 NA11 NB02 NB24 NB63 NB66 NC04 NC06 ND05 ND20
 4B063 QA01 QQ42 QQ52 QQ79 QS33 QS39 QX02 QX04
 4B065 BA01 BD50 CA46 CA60

专利名称(译)	Nanopipette用于细胞操作		
公开(公告)号	JP2014513924A	公开(公告)日	2014-06-19
申请号	JP2013556777	申请日	2012-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	アールアダムセガール パオロアクティス ボアズピロズニー ナダルポウルマント		
发明人	アール アダム セガール パオロ アクティス ボアズ ピロズニー ナダル ポウルマント		
IPC分类号	C12M1/00 G01N33/48 C12M1/26 C12N1/00 C12N11/14 C12M1/34 C12Q1/02 C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/543 B82Y5/00 B82Y40/00		
CPC分类号	B82B3/0004 C12M35/02 C12M41/00 C12M41/48 B01J2219/00371 B82Y5/00 G01N33/48728 G01Q60 /44 B01L3/502715 B01L3/50273 B01L2300/0645 B82Y15/00		
FI分类号	C12M1/00.A G01N33/48.M C12M1/26 C12N1/00.Z C12N1/00.N C12N11/14 C12M1/34.B C12Q1/02 C12Q1/68.A C12N15/00.A G01N33/53.Y G01N33/566 G01N33/543.525.U B82Y5/00 B82Y40/00		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045 /DA36 2G045/FA34 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB15 2G045/GC20 2G045/HA09 2G045/HA14 2G045/HA20 2G045/JA07 2G045/JA08 2G045/JA09 2G045/JA11 2G045/JA20 4B024/AA19 4B024 /AA20 4B024/GA12 4B024/HA20 4B029/AA07 4B029/AA08 4B029/AA09 4B029/AA25 4B029/BB01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/FA01 4B029/FA15 4B029/GB05 4B029/HA07 4B033/NA11 4B033 /NB02 4B033/NB24 4B033/NB63 4B033/NB66 4B033/NC04 4B033/NC06 4B033/ND05 4B033/ND20 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX02 4B063 /QX04 4B065/BA01 4B065/BD50 4B065/CA46 4B065/CA60		
代理人(译)	杉村健二 池田 浩		
优先权	61/448998 2011-03-03 US		
其他公开文献	JP2014513924A5 JP6151644B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了使用纳米移液管将所需材料受控地喷射到含有单个细胞的表面上的方法和系统。一种系统涉及具有纳米移液管和xyz控制器的方法和系统，所述xyz控制器将用户定义的图案沉积在任何基板上以控制细胞附着和生长。另一个实例涉及具有纳米移液管的方法和系统，所述纳米移液管是纳米移液管，其将材料电动地注入细胞中以实现高通量并最小化对细胞的损害。结合电子控制孔和xyz控制器中的电压差。又一个实施方案涉及具有官能化纳米吸管的方法和系统，以研究单个生物细胞内的分子间相互作用和生物分子的检测。结合扫描离子电导显微镜。

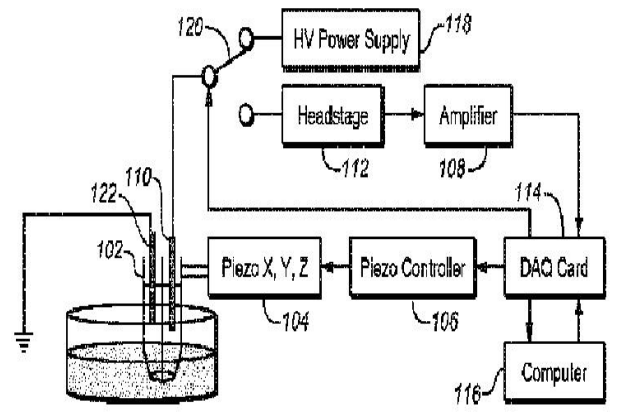


FIG. 1