

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3566207号
(P3566207)

(45) 発行日 平成16年9月15日(2004.9.15)

(24) 登録日 平成16年6月18日(2004.6.18)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 21/64
GO 1 N 27/447

GO 1 N 21/64 F
GO 1 N 27/26 3 2 5 B

請求項の数 1 (全 8 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2000-529596 (P2000-529596)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成11年1月25日 (1999.1.25)</p> <p>(65) 公表番号 特表2002-502029 (P2002-502029A)</p> <p>(43) 公表日 平成14年1月22日 (2002.1.22)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US1999/001446</p> <p>(87) 国際公開番号 W01999/039193</p> <p>(87) 国際公開日 平成11年8月5日 (1999.8.5)</p> <p>審査請求日 平成12年7月31日 (2000.7.31)</p> <p>(31) 優先権主張番号 09/015, 198</p> <p>(32) 優先日 平成10年1月29日 (1998.1.29)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(73) 特許権者 500205611 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 947 20-1620, バークレー, シャタック アベニュー 2150, スイート 510 , オフィス オブ テクノロジー ライセ ンシング</p> <p>(74) 代理人 100059959 弁理士 中村 稔</p> <p>(74) 代理人 100067013 弁理士 大塚 文昭</p> <p>(74) 代理人 100082005 弁理士 熊倉 禎男</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キャピラリアレイ検出用回転共焦スキャナ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キャピラリ管内の励起体積からのエネルギーを励起して検出し、当該励起体積中の物質を表す出力を提供するためのスキャナであって、
 平面内に配置された放射状に配向している複数の並んでいるキャピラリ管、
 放射エネルギー源、
 体積を励起するために、放射エネルギーを受け、当該放射エネルギーの焦点を合わせる、一つの対物レンズを有する、光学的手段、
 連続的に、また反復して前記対物レンズを円形のパターンにより動かして、各一連のキャピラリ管内の放射状での同じ位置において前記体積を走査するための手段、
 各一連のキャピラリ管中の前記励起体積から蛍光エネルギーを収集して、当該蛍光エネルギーを向けるための前記対物レンズと空間フィルタ及びニュートラル・フィルタを含む光学的系统、
 前記共焦点光学的系统から、前記向けられた蛍光エネルギーを受け、出力信号を提供するように配置された、検出器、及び、
 前記出力信号を受け、サンプル体積から前記蛍光エネルギーを表す出力を提供するコンピュータ手段、
 を有し、
 前記放射状に配向しているキャピラリ管が外向きのらせん状になっている、前記スキャナ

10

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、一般に、キャピラリアレイスキャナに関する。特に、本発明は、平面キャピラリアレイ上で行われる電気泳動分離を円形に走査し、検出する、キャピラリアレイ共焦スキャナに関する。

【0002】

(背景技術)

ヒトゲノムプロジェクトのゴールは、 3×10^9 個の塩基対からなるヒトゲノムの配列を決定することにある。最も自動化されたDNAシーケンサは、多色蛍光検出を備えた大型のスラブゲルの構成を採用している。スラブゲルの検出との関連で使用される走査型共焦システムも、キャピラリアレイにおいて行われる電気泳動分離の検出に有用となっている。当業界の現状では、キャピラリアレイ電気泳動用の共焦検出システムにより、毎時25,000塩基(96サンプル、サンプルあたり500塩基、1回の運転は2時間)の配列決定速度が達成されている。しかしながら、最適化された電気泳動装置を使用して、この分離をさらに迅速に行うのが望ましく、この点で、この分離の検出はさらに困難なものとなっている。

【0003】

写真平版的に製造されたチップ上でDNAフラグメントの寸法及び配列を決定する方法は、様々な文献、例えば、A.T.ウーリー及びR.A.マチスの『キャピラリ電気泳動チップを使用した超高速DNA配列決定』、Anal.Chem.誌、第67巻、第3676~3680頁(1995年)、及びA.T.ウーリー、G.F.センサポー及びR.A.マチスの『微細加工したキャピラリアレー電気泳動チップを使用した高速DNAゲノタイピング』、Anal.Chem.誌、第69巻、第2181~2186頁(1997年)に記載されている。

これらの刊行物に記載されている装置では、ガラス基板またはチップを写真平版的にエッチングして、基板の表面にチャンネルが形成されている。このチャンネルは通常10~50ミクロンの深さ、50~200ミクロンの幅を有し、配置によってチップ上で5~10cm拡張することが可能である。次いで、第2の基板をエッチングした表面の上に接合して、キャピラリ電気泳動分離に好適な閉じたチャンネルないしキャピラリを形成する。この微細加工したゲルが充填されたチャンネルを使用して、スラブゲルよりも100倍速く、かつ従来のキャピラリ分離よりも10倍速く、高品質のDNA分離を行うことができることが、明らかにされている。また、ds-DNAフラグメント、短いタンデム繰返し体、DNA配列フラグメント、タンパク質、アミノ酸及びその他の化学分析物の分離をこのチップ上で行うことができることも、明らかにされている。これらの研究では、単チャンネルが使用され、検出には、従来の共焦または非共焦の顕微鏡構成を使用する単チャンネル内のフラグメントのレーザ励起蛍光検出が採用されていた。

【0004】

L.B.コートニー、D.シュマルツィング、T.A.テイラー及びM.フクスの『血清コルチゾールのためのマイクロチップ電気泳動免疫アッセイ』、Anal.Chem.誌、第68巻、第18~22頁(1996年)では、チップ上に多チャンネルを形成し、CCD検出器でチップ全体を照射しイメージングして、検出を行っている。しかしながら、後者の研究における感度は低い。この設計をどのように利用すれば多数の多チャンネルを高速で検出できるのかを理解するのは、困難である。

最近、チップには12個までのチャンネルが形成されるようになった(ウーリーら(1997年))。チャンネルのアノード末端は、検出のために互いに束ねられ、次いで束ねられたチャンネルは、共焦検出器を通過させてチップを動かす機械的走査ステージを用いて検出される。リニア走査共焦検出システムでは、2Hzの速度の蛍光データが得られている。この方法は、多チャンネルの高感度検出を行うのに良好に機能するが、検出器を通過させるチップの機械的走査が扱いにくいものであり、かつ走査速度(2Hzに制限されている)が

10

20

30

40

50

大部分のフラグメントの寸法及び配列決定の用途に十分な速さではないにもかかわらず、このアプローチをどのように12チャンネルよりも多くまで拡張できるのかを理解するのは、困難である。

チップ上でのDNA配列決定についての電気泳動時間は、極めて短く(<10分)、したがって、妥当なバンドの解像度を提供するには、10Hz以上の速度でチップを走査する必要がある。走査工程の停止段階及び反転段階の間にモータシステム負荷がかかること、及び反転のための時間が必要であることから、リニアスキャナは高走査速度での使用には好適でない。

【0005】

共焦走査システムの利点は、高い光収集効率に結びつく高い開口数、及び、光検出を蛍光共焦体積の範囲に制限する能力にある。これにより、迷走光に対するシステムの感受性が劇的に低減され、また、ガラスまたはプラスチックの基板からの迷走光、蛍光及び散乱光が遮断され、キャピラリチップが光学的に切断される。

共に係属している出願(該出願の明細書の記載内容は、本願明細書に含まれるものとする。)には、微細加工されたキャピラリアレイ電気泳動装置ないしチップが記載されている。この装置は、サンプルをチャンネルに導入するために分離チャンネルに結合されたサンプルリザーバのアレイを有するプレート上に形成された、分離チャンネルのアレイを有している。この微細加工されたキャピラリアレイ電気泳動装置の一形態においては、チャンネルが外向きに放射状あるいはらせん状に、プレートの中心からサンプルリザーバへ延び、平面アレイを形成している。他の形態においては、該平面アレイは、複数の平行な微細加工されたキャピラリないしチャンネルを有している。キャピラリ分離チャンネルの放射状アレイ、あるいは、線形に平行なチャンネルの大型のアレイにおいて、高いサンプリング速度で、分離の高感度検出を行うことのできるスキャナを提供することに対する要求が存在する。

【0006】

(発明の開示)

本発明の目的は、一般に、キャピラリの平面アレイを高速でサンプリングする共焦走査システムを提供することにある。

本発明の他の目的は、電気泳動のレーン(キャピラリ)が中心アノードで中心放射状に配列されているチップのデザイン、及び、該レーンを円形運動により走査する回転共焦スキャナを提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、キャピラリの放射状アレイを走査して、該キャピラリ内にある物質の分離を検出する装置を提供することにある。

本発明のさらなる目的は、キャピラリ分離の平面アレイを、高サンプリング速度で、高感度で共焦検出する装置を提供することにある。

本発明のこれらの目的及びその他の目的は、電気泳動分離の間に連続的かつ反復してキャピラリの平面アレイにおける分離を検出する、回転共焦スキャナによって達成される。

本発明の上記の目的及びその他の目的は、添付図面との関係で以下の記載を参照することにより、さらに容易に理解することができるであろう。

【0007】

(発明を実施するための最良の形態)

図1及び2は、2個の多チャンネルキャピラリアレイ電気泳動チップであって、キャピラリチャンネル11が、円形のガラスサンドイッチ構造体12の上に、放射状及びらせん状に配列されているものを示す。この装置において、分析物は、マイクロプレートの周縁上に配列されたりザーバ13から、チャンネル11に注入され、チャンネル11中に設置された分離媒体を通して中心リザーバに向かって分析物を移動させることにより、電気泳動または他の分離方法を介して分析される。カソード14と中心アノード16との間に電圧を印加することにより、分析物を移動させる。中央アノード16の入口の直前で、レーンを検出する。線状及び平行並びに放射状及びらせん状のキャピラリアレイチップは、共に係属している出願に詳細に記載されており、該出願の明細書の記載内容は、全て本願明細書に含まれるものとする。

本発明によれば、円運動によりレーンを走査する新規な共焦スキャナを使用して、キャピラリ中の分離の検出を行う。以下に詳細に記載する好ましい形態において、チップの上部を、溶液リザーバ13、電極接点などへのアクセスが可能な状態にしたまま、回転しているスキャナにより、下からチップを走査するのが最も容易である。ただし、この方法が便利であるものの、同様のデザイン原理を利用した機械的または電流的スキャナを使用して、チップを上から走査することもできる。

【0008】

図3～6は、本発明による回転スキャナの機械的及び光学的部分の概略を示している。図3を参照して、未偏光または円偏光のレーザビーム17は、レーザ18から制限開口 a_1 を通過し、並進ステージ t_{1y} 上の二色性ビームスプリッタ d_1 によって進路を変更され、直交調節器により並進ステージ t_{2x} 上に取り付けられたミラー m_1 に向かう。ミラー m_1 は、2個の高精度のベアリング b_1 及び b_2 によって支持された中空のシャフト19を通して、ビームを上方に送る。シャフトの頂部にあるハウジング20（詳細には示していない）は、ビームを所定の量だけ排除する偏菱形のプリズムを有し、これを、顕微鏡対物レンズ21（NA0.5、作業距離1.7mm、無限結合モードで使用）を通して上方に、チップ中のチャンネル11の平面に送る。示していない手段により、z方向に沿って微小な増分で対物レンズを移動させて、レーザの焦点を全てのチャンネルの中心に合わせることができる。図4は、対物レンズ21によりチャンネル11上に焦点を合わせたレーザビームを示す。点線で描いた円22は、円形の操作経路を示す。図5の拡大図は、プレート24とプレート25との間に設置されたキャピラリないしチャンネル11の体積23中に合焦されたレーザビーム17を示す。

精密ベルトBは、高精度ベアリング b_1 と b_2 、及びベアリング b_3 と b_4 の間に固定されたベルトプリーを介して、対物レンズ21を駆動する。ベアリング b_3 及び b_4 を通るソリッドシャフトは、可撓性継手27を介してマイクロステッピングモータ26に接続されている。光ファイバ28は、チップの上の移動するレーザビームの経路上に配置されている。回転している対物レンズからの光は、光ファイバに入り、データ獲得の開始をトリガするフォトダイオードに導かれる。

【0009】

蛍光DNAフラグメントなどのサンプル体積からの光は、対物レンズ21により収集され、逆経路で二色性ビームスプリッタ d_1 を通して送られる。次いで、4色検出器アッセンブリへと導く開口 a_2 の中心にビームを並進させるためにジンバルマウントされた平面平行の厚いガラス片 g_1 を通過する（図6）。二色性ビームスプリッタ D_2 （図6）は、光を波長497～548nmで反射し、バンドパスフィルタ B_1 が、波長領域を510～540nmに制限する。アイリス A_3 及びピンホール P_1 の位置は、未合焦ビーム経路及び適切な二色性位置を規定するのに使用される。xyz調節器を備えた色消しレンズ L_1 は、カラーフィルタをかけたビームの焦点を、200 μ mの共焦ピンホール P_1 に合わせる。直交ミラー M_3 は、 L_1 と P_1 との間のビーム経路中に移動させることができ、コンパートメントの頂部カバーに画像平面を形成し、画像平面を観るために、20倍のラムズデン接眼レンズE（ロリン光学）を使用する。ピンホール P_1 を通過する光は、光電子倍增管によって検出される。

D_2 を通過したビームは第2のコンパートメントに入るが、これは第1のコンパートメントの鏡像になっている。レーザ波長の追加のブロックのため、取り外し可能なロングパスガラスフィルタを使用する。各々の連続するコンパートメントは、各バンドパスフィルタによって規定される、より長い波長領域を測定する。コンパートメント2、3及び4は、光が光電子倍增管に入るのをブロックするため、直交ミラーの代わりに、それぞれスライディングシャッタSを有する。コンパートメント4は、二色性ビームスプリッタの代わりにミラーを有しており、長波長検出範囲を制限するため、バンドパスフィルタを使用していない。主レーザビーム中のプラズマラインは590nmを超えると著しいため、ラインフィルタにより除去する。光電子倍增管（PMTs）の出力を増幅し、500Hzのローパスフィルタを使用してフィルタをかける。1kHzで動作する16bitのADCを使

10

20

30

40

50

用して、信号をデジタル化する。強度データを双方向で収集し、PCに保存する。検出された蛍光の焦点をピンホール上に合わせる操作は、共焦検出に影響を及ぼす。このことは、レーザにより照射されたチップ中のチャンネルないしキャピラリ内の共焦体積のみから、放射が収集されることを意味する。

【0010】

一形態として、半径が $< 1\text{ cm}$ の中心アノードウェル16に96本の電気泳動レーンを集めた。回転スキャナにより生成されるビーム経路の半径は r_0 ($< 1\text{ cm}$)であり、 $r = 1\text{ cm}$ の場合その経路長は 62.832 cm であった。データ獲得を開始する光ファイバのための空間を残すと、レーン中心の間は約 $640\text{ }\mu\text{m}$ であった。これを、電気泳動レーン及びレーンとの間の空間に分割した。 $20\text{ }\mu\text{m}$ 毎にデータを取り、1回転あたり3072個のデータ点をとった。 $640\text{ }\mu\text{m}$ のデータ空間をなす32個のデータ間隔を、チャンネルからのデータ及びチャンネル間の空間からのデータに分割した。10回転(RPS)で、データ速度は 30.72 kHz ないし $32.55\text{ }\mu\text{s}$ /データ点であった。増幅器/ローパスフィルタの出力を、4個の独立したアナログからデジタルへの変換器(ADCs)によってサンプリングした。全ての位置でサンプリングを行うマルチタスクプログラムによってADCsを制御し、非チャンネルデータを除去し、データの平均をとってコンピュータに記録した。チャンネル空間及びデータ速度は可変であり、マルチタスクプログラム中で容易に変えることができる。

任意のキャピラリの平面アレイを走査するのに、この回転スキャナを使用することが可能であることは、明らかである。図7は、ガラス基板32の上に線33に沿って微細加工されたキャピラリ31の平面平行アレイを走査するための、回転スキャナの使用の概略を示す。図8は、平面平行の関係に配列された、米国特許第5,274,240号明細書に記載されているような複数のキャピラリ34を走査するための、回転スキャナの使用の概略を示す。

本発明は、マイクロチップ中のレーンの構成に依存するものではなく、円形の検出経路を使用する任意の構成との関係で、容易に使用することが可能である。共焦蛍光電流スキャナは、これらのチップの円形走査または楕円形走査を行うのに同等に使用し得る。本発明の回転共焦スキャナの利点は、極めて速いサンプリング速度(10 Hz あるいはそれ以上)の、共焦検出及び同時に4色またはそれ以上の蛍光信号の検出を可能にすることにある。

【図面の簡単な説明】

【図1】多チャンネル電気泳動解析を行うための、放射状のキャピラリアレイ電気泳動チップを示す図である。

【図2】多チャンネル電気泳動解析を行うための、らせん状のキャピラリアレイ電気泳動チップを示す図である。

【図3】本発明による回転共焦スキャナの機械的部分及び光学的部分の概略図である。

【図4】電気泳動チップ、合焦したレーザビーム、及びスキャナによって調べられる円形の経路の概略図である。

【図5】照射され、検出される共焦体積を示す、図4の線5-5に沿って見た拡大図である。

【図6】回転スキャナ検出システムの、4色の検出器部分の概略図である。

【図7】回転スキャナにより走査される、微細加工されたキャピラリの平面平行アレイを示す図である。

【図8】回転スキャナにより走査される、従来のキャピラリの平面アレイを示す図である。

【符号の説明】

- 11 キャピラリ
- 18 レーザ
- 21 対物レンズ

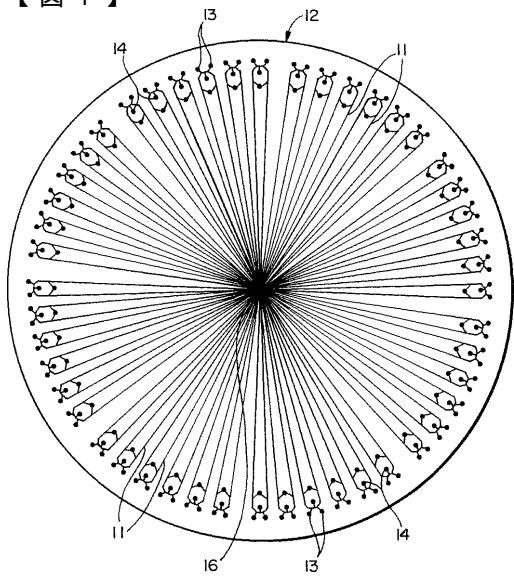
10

20

30

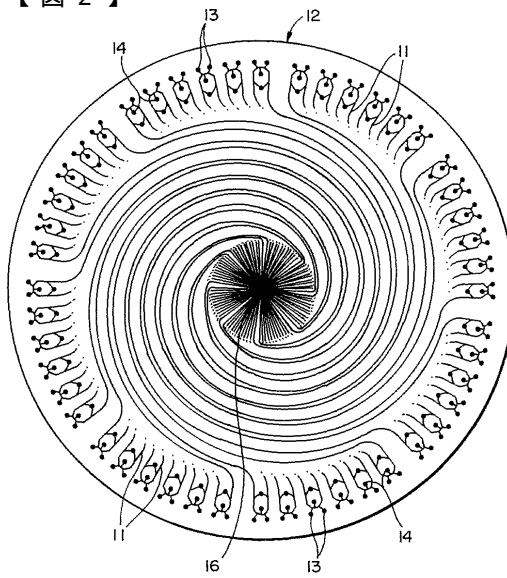
40

【 図 1 】



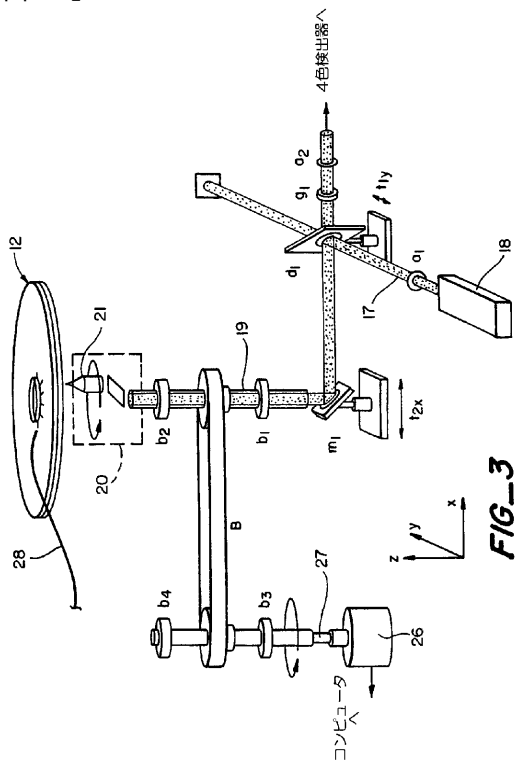
FIG_1

【 図 2 】



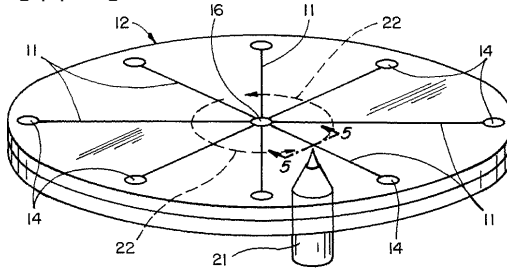
FIG_2

【 図 3 】



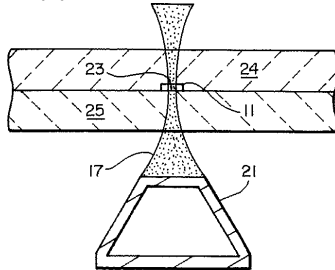
FIG_3

【 図 4 】



FIG_4

【 図 5 】



FIG_5

フロントページの続き

- (74)代理人 100065189
弁理士 宍戸 嘉一
- (74)代理人 100096194
弁理士 竹内 英人
- (74)代理人 100074228
弁理士 今城 俊夫
- (74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
- (74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫
- (74)代理人 100086771
弁理士 西島 孝喜
- (74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
- (72)発明者 マティース リチャード エイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 5 6 モラガ デインフィールド プレイス 9 3
- (72)発明者 シェアラー ジェームズ アール
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 7 0 3 バークレー アーチ ストリート 1 3 0 9
- (72)発明者 ウェクスラー ディヴィッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 7 サン フランシスコ コール ストリート 4
3 - # 1

審査官 田中 洋介

- (56)参考文献 米国特許第05538613 (US, A)
米国特許第05483075 (US, A)
特開平11-148900 (JP, A)
国際公開第96/034278 (WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
G01N 21/62-21/74
G01N 27/26