

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3989964号  
(P3989964)

(45) 発行日 平成19年10月10日(2007.10.10)

(24) 登録日 平成19年7月27日(2007.7.27)

(51) Int. Cl.

G O 1 N 27/447 (2006.01)

F I

G O 1 N 27/26 3 3 1 E

請求項の数 13 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願平10-509154	(73) 特許権者	アクラーラ バイオサイエンス インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成9年7月30日(1997.7.30)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(65) 公表番号	特表2000-515978 (P2000-515978A)		545-3716 ハイワード トラスト
(43) 公表日	平成12年11月28日(2000.11.28)		ウェイ 3906
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/013503		
(87) 国際公開番号	W01998/004909	(74) 代理人	弁理士 中村 稔
(87) 国際公開日	平成10年2月5日(1998.2.5)		
審査請求日	平成16年5月18日(2004.5.18)	(74) 代理人	弁理士 大塚 文昭
(31) 優先権主張番号	08/690,307		
(32) 優先日	平成8年7月30日(1996.7.30)	(74) 代理人	弁理士 穴戸 嘉一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	弁理士 竹内 英人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 統合マイクロフルイディック素子

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

分析物部分と廃物部分とを有するサンプルを分析する検出器に用いられるマイクロ純流体素子であって、

表面を有し、少なくとも1つのマイクロチャンネルと、この少なくとも1つのマイクロチャンネルと連通する入口とが設けられ、前記サンプルを前記少なくとも1つのマイクロチャンネルに供給するように構成されている基板と、

前記少なくとも1つのマイクロチャンネル内に設けられ前記分析物部分の一部分を前記廃物部分から分離する濃縮手段と、を備え、

前記少なくとも1つのマイクロチャンネルは、前記サンプルの特性を分析する検出器によってアクセス可能な検出領域を前記濃縮手段の下流側に有し、

前記基板は、前記検出領域の上流側で前記少なくとも1つのマイクロチャンネルと流体連通する廃物出口を有し、

前記マイクロ純流体素子は、さらに、

前記サンプルを前記入口から前記濃縮手段まで移動させ、かつ前記廃物部分を前記濃縮手段から前記廃物出口まで移動させる移送手段と、

前記サンプルが前記マイクロ純流体素子内に存在するとき該サンプルと電氣的に接触し、前記分析物部分を前記濃縮手段から前記検出領域に移動させる間隔をおいた少なくとも第1及び第2の電極と、を有し、

前記廃物部分ではなく前記分析物部分の一部分が前記検出領域に移動させられ、前記検出

10

20

領域で前記検出器によって該分析物部分の一部分の正確な検出が容易に行われるようにする、

ことを特徴とするマイクロ純流体素子。

【請求項 2】

前記濃縮手段は、クロマトグラフ材料を含む、

請求項 1 記載のマイクロ純流体素子。

【請求項 3】

前記濃縮手段は、電気泳動ゲル媒質を含む、

請求項 1 記載のマイクロ純流体素子。

【請求項 4】

前記基板には、前記濃縮手段の上流側で前記少なくとも 1 つのマイクロチャネルと流体連通する追加流体入口と、該追加流体入口に溶剤を導入して前記濃縮手段に接触させ、前記分析物部分の前記一部分を前記濃縮手段と分離する手段とが設けられている、

請求項 1 記載のマイクロ純流体素子。

【請求項 5】

前記廃物出口が前記濃縮手段で前記少なくとも 1 つのマイクロチャネルと流体連通して、

前記廃物部分が前記濃縮手段で前記少なくとも 1 つのマイクロチャネルを出る、

請求項 1 記載のマイクロ純流体素子。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つのマイクロチャネルは、前記入口から前記廃物出口まで延びる第 1 マイクロチャネル部分と、この第 1 マイクロチャネル部分と交差点で交わり、かつ前記検出領域まで延びる第 2 マイクロチャネル部分と、を含み、

前記濃縮手段は、少なくとも一部分が、前記交差点にある、

請求項 1 記載のマイクロ純流体素子。

【請求項 7】

前記廃物出口は、前記濃縮手段と前記検出領域との間で前記少なくとも 1 つのマイクロチャネルと連通している、

請求項 1 記載のマイクロ純流体素子。

【請求項 8】

さらに、前記少なくとも 1 つのマイクロチャネル内の前記検出領域の近傍に配置された電気泳動媒質を含み、

前記廃物出口は、前記濃縮手段と前記電気泳動媒質との間で少なくとも 1 つのマイクロチャネルと連通している、

請求項 1 記載のマイクロ純流体素子。

【請求項 9】

前記移送手段は、前記サンプルが前記マイクロ純流体素子に存在するとき、前記サンプルと電氣的に接触する間隔をおいた第 3 及び第 4 の電極を有する、

請求項 1 記載のマイクロ純流体素子。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つのマイクロチャネルは、前記濃縮手段の下流側にある第 1 マイクロチャネル部分と、この第 1 マイクロチャネル部分と交差点で交わり、かつ前記検出領域まで延びる第 2 マイクロチャネル部分と、を含み、

前記間隔をおいた少なくとも第 1 及び第 2 の電極は、前記分析物部分の前記一部分を前記濃縮手段から前記第 1 マイクロチャネル部分を通して前記交差点まで移動させるための間隔をおいた第 1 及び第 2 の電極と、前記分析物部分の前記一部分を前記交差点から前記第 2 マイクロチャネル部分を通して前記検出領域まで移動させるための間隔をおいた第 3 及び第 4 の電極と、を含む、

請求項 1 記載のマイクロ純流体素子。

【請求項 11】

前記基板には、前記少なくとも 1 つのマイクロチャネルと連通する 1 つの追加流体入口が

10

20

30

40

50

設けられ、

前記少なくとも1つのマイクロチャネルは、前記入口から前記濃縮手段まで延びる第1マイクロチャネル部分と、前記追加流体入口から延びて前記第1マイクロチャネル部分と交わる第2マイクロチャネル部分と、を含み、

前記追加流体入口を通して前記サンプル以外の流体を前記少なくとも1つのマイクロチャネルに供給することができる、

請求項1記載のマイクロ純粒体素子。

【請求項12】

前記基板には、前記少なくとも1つのマイクロチャネルと連通する複数の追加流体入口が設けられ、

10

前記少なくとも1つのマイクロチャネルは、前記入口から前記濃縮手段まで延びる第1マイクロチャネル部分と、前記追加流体入口から延びて前記第1マイクロチャネル部分と交わる複数の追加マイクロチャネル部分と、を含み、

前記追加流体入口を通して前記サンプル以外の複数の流体を前記少なくとも1つのマイクロチャネルに供給することができる、

請求項1記載のマイクロ純流体素子。

【請求項13】

前記少なくとも1つのマイクロチャネルには、追加検出領域が設けられ、

前記廃物出口が、前記追加検出領域の上流側で前記少なくとも1つのマイクロチャネルと連通している、

20

請求項1記載のマイクロ純流体素子。

【発明の詳細な説明】

背景

本発明は、マイクロフルイディックスに、詳細には、電界の適用によりその中で流体の少なくとも一部分が操作されるマイクロチャネル素子に関する。

電気泳動法は、核酸、蛋白質、炭水化物の純粋試料の分離、同定及び調製、複雑な混合物中の特定の分析物の同定等を含む多様な用途で広範に使用されることから、バイオテクノロジーやその他の産業に不可欠の手段となっている。

電気泳動のより幅広い分野において関心が高まっているのが、適用された電界の影響の下で毛管サイズの電気泳動室内の媒質の中で特定のエンティティ又は種を動かす毛管電気泳動(CE)である。CEの利点としては、ラン時間の速さ、分離効率の高さ、試料容量の小ささ等がある。たしかにCEは元々は毛管の中で行われていたが、関心が高まっているのは、マイクロチャネル電気泳動(MCE)として公知の、平面基板上の毛管サイズのマイクロチャネル又はトレンチを使用する方法である。CE及びMCEは、基礎研究と工業プロセスに両方において、分析、生物医学、製薬、環境、分子生物学、食品、医療を含めた各種の数多くの用途での使用例が増加しつつある。

30

CE及びMCEの多くの長所にもかかわらず、これらの技術の潜在的利益は種々の理由からまだ完全に実現されていない。CE及びMCEで用いられる電気泳動室の性質から、分析物濃度が約 $10^{-5}$ M未満の試料では、良好な結果は一般的には得られない。この比較的低い分析物濃度がCE及びMCEの潜在的用途を大きく限定してきた。例えば、関心を引く分析物が、血液又は尿のような複雑なサンプル中にナノモル濃度で存在することが非常に多い医療用途では、CE及びMCEはまだそれほど普及していない。

40

検出限界を高めるために、分析物スタッキング(Beckers & Ackermans, "The Effect of Samples Stacking for High Performance Capillary Electrophoresis," J.Chromatogr. (1993) 629:371-378)、電界増幅(Chien & Burgi, "Field Amplified Sample Injection in High Performance Capillary Electrophoresis," J.Chromatogr. (1991) 559:141-152)、遷移等速電気泳動(Stegehuis et al., "Isotachopheresis as an On-Line Concentration Pretreatment Technique in Capillary Electrophoresis," J.Chromatogr. (1991) 538:393-402)のような改良試料注入手順や、さらには、改良試料検出手順及び「オフライン」試料調製を含めて、各種の技術が開発されてきた。

50

C Eにより実現可能な検出限界を高めるために開発されたもう1つの技術が、毛管のすぐ上流に、すなわち、「オンライン」又は「単一フローパス」関係で配置された分析物予濃縮素子の採用であった。ここでの「オンライン」及び「シングルフローパス」という用語は、分析物予濃縮コンポーネントの中に入れられた流体の全てが、すなわち、元の試料の容積の濃縮画分と残りの廃物画分が、素子の主電気泳動部の中を、すなわち、分離媒質を含む毛管の中を必ず流れる関係を表すために使用されている。これまでに採用された各種の構成を概観したものとしては、Tomlinson et al., "Enhancement of Concentration Limits of Detection in CE and CEMS: A Review of On-line Sample Extraction, Cleanup, Analyte Preconcentration, and Microreactor Technology," J.Cap.Elec. (1995) 2:247-266と、そこに掲載された図とがある。

10

この後者のアプローチは、分析物検出限界に関して、特に検出の濃度限界に関して結果を改善することができるが、C Eの他の要素に対して悪影響を及ぼし、それにより達成可能な全体性能を低下させることがある。例えば、分析物予濃縮器を含むオンライン又はシングルフローパス素子では、分析物ピーク幅が拡大することがある。

従って、分析物が低濃度である、特に分析物の濃度がフェムトモルからナノモルの範囲にある試料について良好な結果が得られる改良C E素子の開発への関心が衰えることはないのである。

M C E素子が、アメリカ特許第5,126,022号、アメリカ特許第5,296,114号、アメリカ特許第5,180,480号、アメリカ特許第5,132,012号、及びアメリカ特許第4,908,112号に開示されている。M C E素子を記載したその他の参考文献としては、Harrison et al., "Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip," Science (1992) 261:895と、Jacobson et al., "Precolumn Reactions with Electrophoretic Analysis Integrated on a microchip" Anal.Chem. (1994) 66:2949、Effenhauser et al., "High-Speed Separation of Antisense Oligonucleotides on a Micromachined Capillary Electrophoresis Device," Anal.Chem. (1994) 66:2949と、Woolley & Mathies, "Ultra-High-Speed DNA Fragment Separations Using Capillary Array Electrophoresis Chips," P.N.A.S. USA (1994) 91:11348とがある。

20

C Eの前に試料「オンライン」中で分析物を予濃縮する素子と方法を開示した特許としては、アメリカ特許第5,202,010号と、アメリカ特許第5,246,577号と、アメリカ特許第5,340,452号とがある。C Eに採用された各種の分析物予濃縮の方法の概観としては、Tomlinson et al., "Enhancement of Concentration Limits of Detection in CE and CEMS: A Review of On-line Sample Extraction, Cleanup, Analyte Preconcentration, and Microreactor Technology," J.Cap.Elec. (1995) 2:247-266がある。

30

#### 発明の概要

少なくとも濃縮チャネルと主電気泳動フローパスとを含む統合電気泳動マイクロ素子、及びそれらの素子を電気泳動用途に使用する方法が提供される。濃縮チャネルは、後に主電気泳動フローパスの中を通過させるために液体試料の特定の画分を濃縮する役割を果たす。本素子においては、濃縮チャネルと主電気泳動フローパスは、濃縮チャネルからの廃流体が主電気泳動フローパスの中を流れず、排出口を通るように配置されている。本素子は、適用された電界に応答してエンティティが媒質の中を通過させられる多種多様な電気泳動用途において使用される。本素子は、遺伝子発見、薬剤発見及び開発、臨床開発のようなゲノム研究や製薬、ポイントオブケア試験管内診断、分子遺伝子診断や拡散診断、細胞隔離及び捕獲を含む細胞分離、さらにはバイオ研究一般のための高処理量スクリーニングに特に効果を発揮することができる。

40

#### 【図面の簡単な説明】

第1図は、本発明による素子で使用するための濃縮チャネルの略図である。

第2図は、本発明による素子で使用するのにやはり適した濃縮チャネルの他の実施の形態の略図である。

50

第 3 A 図は、本発明による素子の略平面図である。

第 3 B 図は、第 3 A 図の素子の側面図である。

第 4 図は、本発明のもう 1 つの実施の形態の略平面図である。

第 5 図は、濃縮チャンネルが流体入口と出口を 1 つか有していない本発明の実施の形態の略図である。

第 6 図は、第 1 及び 2 図に示されたように、濃縮チャンネルがクロマトグラフ材料の代わりに電気泳動媒質を含む本発明による素子の略図である。

第 7 図は、本発明によるディスク形素子の略平面図である。

第 8 図は、第 1 又は 2 図のような素子の流れ図である。

第 9 図は、第 3 A、3 B 図のような素子の流れ図である。

10

第 10 図は、第 4 図のような素子の流れ図である。

第 11 図は、第 5 図のような素子の流れ図である。

第 12 図は、第 6 図のような素子の流れ図である。

第 13 図は、第 7 図のような素子の流れ図である。

第 14 図は、分離チャンネルへの複数の入口を示した本発明による素子の実施の形態の一部の流れ図である。

第 15 図は、主電気泳動フローパスと 2 次電気泳動フローパスとの交差点の他の構成を示した本発明による素子の実施の形態の流れ図である。

第 16 図は、濃縮チャンネルから下流に直列に配置された複数の分析ゾーンを示した本発明による素子の実施の形態の流れ図である。

20

第 17 図は、濃縮チャンネルから下流に並列に配置された複数の分析ゾーンを示した本発明による素子の実施の形態の流れ図である。

第 18 図は、濃縮チャンネルから下流の複数の主電気泳動フローパスを示した本発明による素子の実施の形態の流れ図である。

第 19 図は、並列に配置された複数の濃縮チャンネルを示した本発明による素子の実施の形態の流れ図である。

第 20 図は、第 15 図に示されたものと類似しており、試薬を直接リザーバから主電気泳動フローパスに運ぶための試薬フローパスを追加的に有する本発明による素子の実施の形態の流れ図である。

第 21 図は、第 16 図に示されたものと類似しており、試薬を直接リザーバから主電気泳動フローパスに運ぶための試薬フローパスを追加的に有する本発明による素子の実施の形態の流れ図である。

30

第 22 図は、第 17 図に示されたものと類似しており、試薬を直接リザーバから主電気泳動フローパスの下流路に運ぶための試薬フローパスを追加的に有する本発明による素子の実施の形態の流れ図である。

第 23 図は、濃縮媒質が被覆磁性ビードを含む本発明による素子の実施の形態の流れ図である。

#### 詳細な説明

少なくとも濃縮チャンネルと主電気泳動フローパスとを含む統合電気泳動マイクロ素子が提供される。濃縮チャンネルは、液体試料の一部からなる特定の分析物を濃縮する役割を果たす。本素子においては、濃縮チャンネルと主電気泳動フローパスは、濃縮チャンネルからの廃流体が主電気泳動フローパスの中を流れず、排出口と通って主電気泳動フローパスから出るように配置されている。対象装置は、臨床検査分析を含む多種多様な電気泳動用途で使うことができる。以降の発明の説明においては、まず最初に素子について概説し、次に、図との関連で本発明の代表的な特定の実施の形態についての検討を行う。

40

本発明は統合電気泳動マイクロ素子である。統合とは、例えば、濃縮チャンネル、主電気泳動フローパス等のような、素子のコンポーネントの全てが、チップ、ディスク等のような、単一で、コンパクトで、取扱いの簡単なユニットの中に存在していることを意味する。素子は電気泳動素子であるので、分子、粒子、細胞等のようなエンティティが適用された電界の影響の下で媒質の中を通過させられる多種多様な用途において有用である。例えば

50

、電荷を有するかどうかなのような、エンティティの性質に応じて、さらには、電気泳動が行われる電気泳動室の界面化学的性質に応じて、適用された電界の直接の影響の下で、又は、例えば、電気浸透流（EOF）のような、電界の適用により生じる流路の中のバルク流体流の結果として、エンティティを媒質の中を通過させることができる。マイクロ素子は、主電気泳動フローパスとしてのマイクロチャンネルを含むことになる。マイクロチャンネルとは、以下でさらに詳細に説明するように、媒質が入れられている主電気泳動フローパスの電気泳動室が、電気泳動室を貫流する毛管流を作り出す横断面積を有する、例えば、トレンチ又はチャンネルのような、導管であり、電気泳動室が平面基板上に存在することを意味する。

対象素子にとって極めて重要であるのが、試料入口と、廃流体出口と、試料の特定の画分を濃縮するための内部濃縮媒質と、随意の濃縮画分流体出口とを含む濃縮チャンネルである。濃縮チャンネルの目的は、特定の画分を濃縮するために初期試料を処理することであり、ここで、濃縮される特定の画分とは、関心を引く（目的の）単数又は複数の分析物である。従って、濃縮チャンネルは、初期試料容積の残りの成分又は廃物部分からの画分を含む標的分析物を選択的に保持・分離する役割を果たす。素子が用いられる特定の用途に応じて、濃縮チャンネルは多数の様々な機能を提供することができる。濃縮チャンネルは関心を引く分析物を初期試料容積よりも小さな容積にする役割を果たすことができる、すなわち、分析物濃縮器としての役割を果たすことができる。さらに、濃縮チャンネルは、潜在的な妨害試料成分が主電気泳動フローパスの中に入り、内部を貫流するのを防止する役割を果たすことができる、すなわち、試料「クリーンアップ」手段の役割を果たすことができる。それに加えて、濃縮チャンネルは、例えば、ラベリング、蛋白質消化、DNA消化又は断片形成、DNA合成等の、化学的、免疫学的又は酵素学的手順のような、流体試料中に存在する標的分析物の調製手順用のマイクロ反応器の役割を果たすこともできる。

濃縮チャンネルは、その内部に入れられた特定の濃縮媒質に応じて、多種多様な形状で素子の中に位置することができる。チャンネルの内部容積は一般的に約1 pL ~ 1 µL、通常は約1 pL ~ 100 nLの範囲になり、チャンネルの長さは一般的に約1 µm ~ 1 mm、通常は10 µm ~ 1 mmの範囲になり、横断面寸法（例えば、幅、高さ等）は約1 µm ~ 200 µm、通常は約10 µm ~ 100 µmの範囲になる。チャンネルの横断面形状は、円形、楕円形、長方形、台形、正方形、又はその他の便利な形状とすることができる。

濃縮チャンネル内では多種多様な濃縮媒質を使用することができる。代表的濃縮媒質又は手段としては、アメリカ特許第5,202,010号と、アメリカ特許第5,246,577号と、アメリカ特許第5,340,452号と、上記のTomlinson et al. に開示された分析物予濃縮素子に記載された手段とがあり、それらの開示内容は引用により本願に援用される。本発明のマイクロチャンネル電気泳動素子内での使用に適用可能であると考えられる技術的に公知の特定の濃縮手段としては、Kasicka & Prusik, "Isotachophoretic Electrodesorption of Proteins from an Affinity Adsorbent on a Microscale," J.Chromatogr. (1983) 273:117128に記載された蛋白質予濃縮素子に用いられたものと、アメリカ特許第5,202,010号とWO第93/05390号とに記載されたような親和性吸着剤を含む毛管束と、Cai & El Rassi, "On-Line Preconcentration of Triazine Herbicides with Tandem Octadecyl Capillaries-Capillary Zone Electrophoresis," J.Liq. Chromatogr. (1992) 15:1179-1192に記載されたようなオクタデシルシラン被覆固体相と、Cai & El Rassi, "Selective On-Line Preconcentration of Proteins by Tandem Metal Chelate Capillaries-Capillary Zone Electrophoresis," J.Liq.Chromatogr. (1993) 16:2007-2024に記載されたような金属キレート層被覆固体相と、アメリカ特許第5,246,577号に記載されたような逆相HPLC固体パッキング材料と、Cole & Kennedy, "Selective Preconcentration for Capillary Zone Electrophoresis Using Protein G Immunoaffinity Capillary Chromatography," Electrophoresis (1995) 16:549-556に記載されたような蛋白質G固体相と、アメリカ特許第5,423,966号に記載されたような溶解性アガロースゲルと、Guzman, "Biomedical Applications of On-Line Preconcentration-Capillary Electrophoresis Using an Analyte Concentrator: Investigatio

10

20

30

40

50

n of Design Options," J.Liq.Chromatogr. (1995) 18:3751-3568に記載されたような親和性吸着剤と、アメリカ特許第5,318,680号に記載されたような固体相反応器材料とがある。上記引例特許及びその他の刊行物の各々の開示内容を本願に援用する。

濃縮媒質として使用することができる濃縮媒質又は材料の1つのクラスが、クロマトグラフ媒質又は材料、特に収着相材料である。かかる材料としては、例えば、C8又はC18化合物被覆粒子のような、逆相材料と、イオン交換材料と、結合成分が不溶性基質に共有結合された親和性クロマトグラフ材料とがあり、親和性クロマトグラフ材料の場合、結合成分は、例えば、レシチン、酵素共同因子、蛋白質A等のように、グループ特定とすることもできるし、例えば、その抗体又結合断片、関心を引く特定の抗体用の抗原、オリゴヌクレオチド等のように、物質特定とすることもでき、結合成分が結合された不溶性基質は、多孔性ガラスのような粒子、ポリマービード、磁性ビード、ガラスストランド又はフィラメントの網目、複数の細いロッド又は毛管、チャンネルの壁等とすることができる。濃縮手段として用いられたクロマトグラフ材料の性質に応じて、クロマトグラフ材料を濃縮チャンネル内に保持するために保持手段を用いることが必要になるかもしれない。電気泳動室の流体出口又は入口を覆うために、ガラスフリット又はアガロースゲルのプラグを用いるのが便利であり、フリット又はプラグは、濃縮チャンネルからの流体の流出は許容するが、粒子又はその他の不溶性基質の流出は許容しない。濃縮手段がクロマトグラフ材料である実施の形態においては、典型的には、試料が濃縮チャンネルの中に入れられ、その中を貫流させられる。試料が濃縮チャンネルの中を貫流する時には、分析物含有画分はクロマトグラフ材料により保持され、試料の残りの廃物部分は廃物出口からチャンネルの外に出る。

濃縮手段がポリマービード床又は常磁性ビード又は粒子床である実施の形態においては、ビードは、多種多様なあらゆるほ乳類細胞マーカー、特に、T細胞、T細胞サブセット、B細胞、単球、幹細胞、骨髄細胞、白血球及びHLAクラスII正細胞用のマーカーを含むヒト細胞マーカーに対する親和性精製モノクローナル抗体と、B細胞、T細胞及びT細胞サブセットの分離用の多種多様なあらゆるげっ歯動物細胞マーカー、特にマウス、ラット又はウサギ免疫グロブリンに対する2次抗体と、何らかの生体分子をカスタム被覆するための未被覆又はトシラクト化形態抗体と、ビオチニレート化抗体とともに使用するためのストレプトタビジン被覆抗体とを含む、抗体又はその他の標的特定親和性結合成分により被覆することができる。常磁性ビード又は粒子は磁界の適用により濃縮チャンネル内に保持することができる。

代替的に、又は、濃縮手段としての被覆粒子又はその他の不溶性基質のような固体層材料に加えて、試料の分析物含有画分を選択的に保持しつつ、試料の残りを貫流させ、廃物出口から濃縮手段の外に出すことを可能にする被覆及び/又は含浸膜を使用することができる。本発明において使用することもできる固体層抽出の際に使用するために、多種多様な親水性、疎水性及びイオン交換膜がすでに開発されている。例えば、Tomlinson et al., "Novel Modifications and Clinical Applications of Preconcentration-Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry," J.Cap.Elect. (1995) 2:97-104と、Tomlinson et al., "Improved On-Line Membrane Preconcentration-Capillary Electrophoresis (mPC-CE)," J.High Res.Chromatogr. (1995) 18:381-3とを参照。

代替的に又は追加的に、濃縮チャンネル又は濃縮媒質は多孔性膜又はフィルタを含むことができる。ゲノムDNAやウイルス核酸を捕獲するのに適した材料としては、QIAGEN社によりQIAampの名前で販売されているものがあり、DNAを植物細胞や組織から捕獲するのに適した材料としては、QIAGEN社によりDNAeasyの名前で販売されているものがある。

素子の形状に応じて、多種多様な手段のいずれか1つ又は複数の手段の併用により、試料に濃縮チャンネルの中を貫流させることができる。いくつかの素子形状の場合、試料に働く重力により、試料に濃縮チャンネルの中を貫流させることで十分であろう。いくつかの形状の場合、所望の方向に遠心力を働かせるために、素子を選択された軸のまわりでスピンさせることもできる。その他の実施の形態においては、試料に濃縮チャンネルとその内部に収容された濃縮手段の中を通過させるために、能動ポンピング手段を用いることもできる。

その他の実施の形態においては、試料を動かすために、又は、洗浄及び溶離段階中に常磁性ビード・標的複合体を捕獲又は不動化するために、磁力を適用することもできる。本発明のさらに別の実施の形態においては、流体に濃縮チャンネルの中を通過させる電界を適用するために、電極を用いることもできる。次に、濃縮試料画分を材料から分離し、主電気泳動フローパスに運ぶために、溶離液が濃縮媒質の中を貫流させられる。一般的には、電界を与えるのは、溶離液に濃縮チャンネルの中を貫流させるためである。

対象用途においては、電気泳動ゲル媒質も濃縮手段として用いることができる。ゲル媒質が提供するふるい分け能力にかなりの違いがあることは公知である。媒質の気孔寸法を変えることと、気孔率の異なる2つ以上のゲルを用いることと、及び（又は）気孔寸法勾配を提供し、濃縮チャンネルと主電気泳動フローパスとの間に適切な関係を選択することにより、初期試料の関心を引く分析物の画分だけが確実に主電気泳動フローパスに入るようにすることができる。例えば、主電気泳動チャンネルと交差する濃縮チャンネルを含み、濃縮チャンネルが、試料の流動方向において、気孔率の大きいスタッキングゲルと気孔率の小さい第2のゲルとを含み、ゲルとゲルとの境界が濃縮チャンネルと主電気泳動フローパスとの間に生じる素子を得ることもできる。この実施の形態においては、試料がスタッキングゲルの中に入れられ、電界が濃縮チャンネル内で両ゲルに適用された後に、試料成分はスタッキングゲルの中を通過し、濃縮チャンネルと主電気泳動フローパスとの交差点のゲル界面において狭い帯域に濃縮する。濃縮試料画分の狭い帯域が主電気泳動フローパスの中に入り、そこを通過するように、次に、第2の電界を主電気泳動フローパスに適用することができる。代替的に、濃縮チャンネルは気孔率勾配を有するゲルを含むこともできる。この実施の形態においては、関心を引く帯域が濃縮チャンネルと主電気泳動フローパスとの交差点に達すると、関心を引く帯域は主電気泳動フローパスの中に入り、それに沿って動くことができる。

核酸の濃縮及び／又は精製に特に有用な濃縮媒質としては、配列順特定捕獲媒質と総括捕獲媒質とがある。包括捕獲媒質としては、例えば、核酸を非特定結合するとともに、試料中のほとんど全てのDNAを保持すると予想することができるイオン交換及びシリカ樹脂又は膜と、試料中のほとんど全てのシングルストランドDNAを結合すると予想することができる不動化シングルストランドDNA結合蛋白質（SSB蛋白質）と、試料中のほとんど全てのmRNAを結合すると予想することができるポリdT変性ビードとがある。配列順特定捕獲媒質としては、例えば、試料中の相補性配列順を有する核酸を結合すると予想することができるオリグヌクレオチドプローブや、試料中の相補性配列順によりハイブリッド形成された固体相ビオチニレート化プローブを結合すると予想することができるストレプタビデンのような、多種多様なあらゆる捕獲分子を不動化するビード

、膜、又は表面がある。捕獲分子の不動化に適したビードとしては、化学的又は物理的架橋ゲルと、ポリマー又はシリカベース樹脂のような、多孔性又は非多孔性樹脂とがある。蛋白質の捕獲に適した媒質としては、以下のものがある。すなわち、蛋白質の捕獲に適した媒質としては、陰イオン（例えば、DEAE）及び陽イオン交換を含むイオン交換樹脂と、疎水性相互作用化合物（例えば、C4、C8及びC18化合物）と、サルフィドリルと、固有活性表面（例えば、プラスチック、ニトロセルロース吸収紙）と、活性化プラスチック表面と、Cibacronブルー、Remazolオレンジ及びProcionレッドのような芳香族染料とがある。炭水化物には、蛋白質、レシチン、不動化疎水性オクチル及びフェニルアルカン誘導体の一部が適している。酵素には、特定の酵素基質生成物遷移状態中間物の類似体が適している。キナーゼには、カルモジュリンが適している。受容体に適した捕獲媒質としては、受容体配位子親和性化合物がある。

上記のように、濃縮チャンネルは少なくとも1つの入口と少なくとも1つの出口を有する。もちろん、入口が1つの場合、入口は工程の濃縮段階においては試料を濃縮チャンネルの中に入れ、工程の溶離段階においては溶離媒質を入れる役割を果たさなければならない。出口が1つの場合、出口は濃縮媒質により保持された画分から取出された試料の部分を排出し、溶離段階においては濃縮画分を電気泳動マイクロチャンネルに送る役割を果たさなければならない。濃縮チャンネル内に収容された特定の濃縮手段の性質と、特定の素子形状とに

10

20

30

40

50



応じて、濃縮チャネルは、例えば、試料入口と溶離緩衝剤の役割を果たす複数の流体入口を有することもできるし、又は、濃縮チャネルは、例えば、廃物出口と濃縮画分流体出口との役割を果たす複数の出口を有することもできる。濃縮チャネルが主電気泳動フローパスと直接流体連通している場合、すなわち、流体が濃縮チャネルから直ちに主電気泳動フローパスの中に流入するように、濃縮チャネルと主電気泳動フローパスとが結合されている場合、濃縮チャネルは、廃物出口に加えて、試料の濃縮画分が主電気泳動フローパスの中に流入する際に通る濃縮画分出口を有することになる。例えば、洗浄及び/又は溶離溶剤を濃縮チャネルの中に入れるのに便利であれば、かかる溶剤を流体リザーバから濃縮チャネルの中に導くために、1つ又は複数の追加流体入口を備えることもできる。濃縮チャネルを通るバルク流体流を制御し、例えば、廃試料が主電気泳動フローパス中に流入するのを防止するために、例えば、バルブ、膜等のような、流体制御手段等を各入口及び出口と組合せることもできる。例えば、試料、溶離緩衝剤、試薬、反応物、洗浄又はすすぎ溶液等のような、流体とエンティティに、濃縮チャネルの中を通過させたいのであれば、濃縮チャネル内に存在する材料と流体に電界を適用可能な電極を備えることもできる。

本発明の素子の次のコンポーネントは主電気泳動フローパスである。主電気泳動フローパスは、チューブ状、トレンチ状又はその他の便利な形状を含む多種多様な形状を有することができ、フローパスの横断面形状は、フローパスを内部に有する基板の平面表面上にマイクロチャネルを形成するように、円形、楕円形、正方形、長方形、三角形等のいずれでも構わない。マイクロチャネルは、マイクロチャネル内に毛管流体流を形成するだけの横断面積を有し、しかも、例えば、幅、高さ、直径のような、横断面寸法の少なくとも1つが約1  $\mu\text{m}$ 、通常は約10  $\mu\text{m}$ であるが、約200  $\mu\text{m}$ を超えることはなく、通常は約100  $\mu\text{m}$ を超えることはない。統合素子の特定の性質に応じて、主電気泳動フローパスは平面基板の表面上において直線でも、曲がっていても、その他の便利な形状でもよい。

主電気泳動フローパスと、あらゆる追加的電気泳動フローパスは、フローパス内に存在する媒質に電界を適用する少なく1対の電極と組合せられている。用いられる電極が1対の場合、典型的には、1対の各電極がフローパスの各端に存在することになる。便利であれば、引用により開示内容がここに取り入れられたアメリカ特許第5,126,022号に記載されたように、複数の電極を電気泳動フローパスと組合せることもでき、この場合、複数の電極が電気泳動フローパスに沿ったエンティティの精密な動きを可能にする。対象素子に用いられる電極は、組合せられた電気泳動フローパス内に存在する媒質に適正な電界を付与可能でありさえすれば、便利なタイプのものをどれでも使用することができる。

対象素子にとって極めて重要であるのが、実質的に試料の濃縮画分だけが主電気泳動フローパスの中を貫流するように、濃縮チャネルと主電気泳動フローパスが素子の中に配置されていることである。その目的で、素子は、さらに、例えば、廃物部分のような、濃縮画分以外の試料の一部を主電気泳動フローパスから排出ための排出口を有する。従って、濃縮チャネルが主電気泳動フローパスと直接流体連通している場合、濃縮チャネルの中を通る廃流体フローパスは主電気泳動フローパスと交差関係になる。間接流体連通状態になるように、濃縮チャネルと主電気泳動フローパスが第2の電気泳動フローパスにより接続された本発明のその他の実施の形態においては、濃縮チャネルの中を通る廃物フローパスは主電気泳動フローパスと交差関係になる必要は必ずしもない。廃物フローパスと主電気泳動フローパスは相互に平行にすることもできる。

対象素子は、濃縮画分を濃縮チャネルから主電気泳動フローパスに移送する手段も有する。特定の素子形状に応じて、濃縮画分移送手段は、濃縮画分出口、2次電気泳動フローパス、又はその他の適当な移送手段とすることができ、主電気泳動フローパスに加えて第2の電気泳動フローパスを有することにより、濃縮試料画分を濃縮チャネルから主電気泳動フローパスに運ぶための導管として、第2の電気泳動フローパスを使用することが可能になる。廃物出口がたった1つの流体出口である実施の形態においては、濃縮チャネルと主電気泳動フローパスを間接流体連通関係にするためには、2次電気泳動フローパスの存在は不可欠である。

主電気泳動フローパスと、濃縮試料移送手段としての2次電気泳動フローパスに加えて、

10

20

30

40

50

本発明の素子はさらに１つ又は複数の追加的電気泳動フローパスを有することもでき、これらの追加的フローパスは毛管サイズであってもなくてもよく、多種多様な役割を果たすことができる。複数の電気泳動フローパスを有する素子の場合、複数の電気泳動フローパスが主電気泳動フローパスと流体連通した分枝形状のような、多種多様な形状が可能である。アメリカ特許第５，１２６，０２２号を参照。その開示内容は引用によりここに取入れられている。

素子の中に存在する主電気泳動フローパス及び／又は２次電気泳動フローパスは、一端又は両端に、すなわち、フローパスのいずれかの端に、随意で流体リザーバを有することができ、通常はその流体リザーバを有する。リザーバが備えられている場合、主電気泳動フローパスの中への緩衝剤、溶離溶剤、試薬、すすぎ及び洗浄溶液等の導入、電気泳動フローパスからの廃流体の受取り等のための手段のような、多種多様な役割を果たすことができる。

10

本発明の素子の中に存在することができるもう１つの随意のコンポーネントは、初期試料容積の廃物部分を濃縮チャネルから受取り、貯蔵するための廃流体リザーバであり、この場合、廃物リザーバは排出口と流体連通している。特定の素子形状に応じて、排出口は廃物出口と同じでも、違っていてもよく、廃物リザーバの中に通じるか、又は素子からの出口を提供する。廃物リザーバは、チャネル、コンパートメント、又は装置のその他のコンポーネントの障害とならないその他の便利な形状のものとして、素子の中に存在することができる。

本発明の素子は、やはり随意で、試料調製手段の中への試料の導入を助けるインタフェース手段を有することもできる。例えば、試料をシリンジにより素子の中に導入しなければならない場合、素子は、シール等のような、シリンジ針を素子の中に案内する役割を果たすシリンジインタフェースを有することもできる。

20

特定の形状と素子の材料の性質とに応じて、少なくとも主電気泳動フローパスとの関連で、電気泳動フローパス内に含まれた媒質中の特定の種の存在を検出するための検出領域が決まることになる。検出領域内の主電気泳動フローパスの少なくとも１つの領域は、光学的に透明で、一般的には１８０～１５００nmの、通常は２２０～８００nmの、より通常は２５０～８００nmの波長の光の透過損失を小さくすることを可能にする材料から製造される。適当な材料としては、融解シリカ、プラスチック、石英ガラス等がある。

統合素子は、濃縮チャネル及び主電気泳動フローパスと、任意の追加的コンポーネントを備えることが可能なでありさえすれば、便利な形状をどれでも有することができる。素子はマイクロチャネル電気泳動素子であるので、電気泳動フローパスは平面基板の表面上に存在しており、この場合、基板は通常は、必ずしも不可欠ではないが、表面上に存在するマイクロチャネルを環境からシールするために、平面カバープレートにより覆われている。一般的には、素子は小さく、表面平面における最大寸法がわずか約２００mm、通常はわずか約１００mmであり、その結果、素子の取扱いや操作が簡単になる。上記のように、素子は、例えば、クレジットカード又はチップ状、ディスク状、シリンジ状、又はあらゆるその他の便利な形状のような、平行パイプを含む多種多様な形状を有することができる。本発明の素子は、ガラス、融解シリカ、アクリル、熱塑性プラスチック等を含む多種多様な材料から製造することができる。統合素子の種々のコンポーネントは、素子の特定の用途、経済的関心、溶剤相容性、光学的透明度、色、機械強度等に応じて、同じ材料から製造することも、異なる材料から製造することもできる。例えば、マイクロチャネル電気泳動フローパスを含む平面基板とカバープレートの両方を、例えば、ポリメチルメタクリレート（PMMA）のような、同じ材料から製造することも、例えば、基板はPMMAから、カバープレートはガラスからというように、異なる材料から製造することもできる。使捨て統合素子を有することが望ましい用途の場合、製造の容易さと材料のコストの点から、素子は典型的にはプラスチックから製造される。探知と製造の容易さのために、上に定義したような、光学的に透明なプラスチック材料から、素子全体を製造することもできる。特定の用途において興味深いのが、電気泳動の条件の下での表面電荷が低いプラスチックである。使用される特定のプラスチックとしては、ポリメチルメタクリレート、ポリカ

30

40

50

ーボネート、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレン又はポリスチレンコーポリマー等がある。

素子は、従来の成形及び流込み技術を含む、いずれかの便利な手段により製造することができる。例えば、プラスチック材料から製造される素子の場合、素子の平面基板の中のチャンネル構造用のネガであるシリカ成形マスクは、エッチング又はレーザマイクロ機械加工により製造することができる。基板の中にチャンネルを形成する浮彫りリッジを有することに加えて、シリカ成形マスクは、濃縮チャンネルを収容するために平面基板の中に空洞を提供する浮彫り領域も有することができる。次に、ポリマー前駆物質製剤を、シリカマスクと、ガラス板のような支持平面板との間で、熱硬化又は光重合化することができる。便利であれば、その開示内容が引用によりここに取り入れられたアメリカ特許第5,110,514号に記載された手順を用いることもできる。平面基板が製造された後に、濃縮チャンネルを平面基板の空洞の中に配置し、所望する場合は、電極を入れることができる。最後に、カバープレートは基板の表面にかぶせて、シールし、それにより、統合素子を形成する。カバープレートは、超音波溶接、接着剤等を含む、いずれかの便利な手段を使用して、基板にシールすることができる。

一般的には、本発明の素子を使用する前に、適当な第1又は電気泳動媒質が、素子の電気泳動フローパス又はマイクロチャンネルの中に入れられ、この場合、第1の媒質は、濃縮チャンネル内に存在する濃縮媒質とは違ったものになる。電気泳動媒質という言葉は、媒質の中で種を動かすために電界が適用されるいずれかの媒質を表すために使用されている。電気泳動媒質は、基板へのカバープレートのシールの前に、電気泳動フローパスの端に存在するリザーバ経由で又は直接に電気泳動フローパスのチャンネル又はチャンバの中に簡便に入れることができる。いずれかの便利な電気泳動媒質を用いることができる。使用に適した電気泳動媒質としては、Barron & Blanch, "DNA Separations by Slab Gel and Capillary Electrophoresis: Theory and Practice," Separation and Purification Method (1995) 24:1-118と、その開示内容が引用によりここに取り入れられたアメリカ特許出願第08/241,048号、第08/636,599号、及び第08/589,150号とに記載されたような、緩衝剤、架橋及び非架橋ポリマー媒質、有機溶剤、清浄剤等がある。電気泳動媒質として特に興味深いのは、セルロース誘導体、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリエチレン酸化物等である。

以下、本発明を図を参照してさらに説明する。第1図は、本発明による素子で使用する濃縮チャンネルの略図である。濃縮チャンネル10は、逆相C18材料2を囲む側壁1を含む。チャンネル10はさらに流体入口7及び4と、流体出口5及び6を含む。チャンネル入口及び出口を通る流体流を制御するために、バルブ8、9及び10が備えられている。ガラスフリット3は、流体流が入口4及び出口5を通るのを許容するが、しかし逆相材料2をチャンネル内に保持する。この濃縮チャンネルを使用する際には、試料がフローパス12の方向で試料入口7を通過して中に入れられる。試料がチャンネル10の中を通過するにつれて、画分を含む分析物は逆相材料2上に保持され、一方、試料の残りの廃物画分は廃物出口6からフローパス13に沿って外に出る。試料が入口4又は出口5から流出又は「漏出」するのを防止するために、バルブ8及び9は閉じられている。試料がチャンネル10を通過した後に、バルブ11が閉じられ、バルブ8及び9が開かれる。次に、溶離緩衝剤がガラスフリット3及び試料入口4を通過してフローパス14の方向でチャンネル10の中に入れられる。溶離緩衝剤が材料2の中を通過するにつれて、試料の保持された画分が分離され、溶離緩衝剤とともに濃縮画分出口5からフリット3を通過してフローパス15に沿って搬出される。

第2図には、逆相材料2に代わって、結合対部材が共有結合された架橋ガラスフィラメントの編み6が使用されている点を除いて、第1図に示したものと同一濃縮チャンネルが図示されている。

第3A図は、本発明によるクレジットカード形(長方体)素子の略平面図である。素子30は、第1端にリザーバ32を有し、第2端にリザーバ33を有する主電気泳動フローパス31を含む。主電気泳動フローパス31と直接流体連通しているのが、濃縮チャンネル3

10

20

30

40

50

4（上から見て）である。電気泳動フローパス31内に存在する媒質に電界を適用するために、電極35及び36が備えられている。フローパス内に含まれた媒質中に存在する分析物を見るために、検出領域37が電気泳動フローパス31の上方に配置されている。検出領域は濃縮チャンネル34の上方にも備えることができる。第3A図に示された素子は濃縮チャンネルを1つしか含んでいないが、追加の濃縮チャンネルを、検出領域内を含めて、フローパス内に備えることもできる。

第3B図は、第3A図に示された素子の略側面図である。本発明のこの実施の形態を使用する際には、試料はシリンジインタフェース38を通じて濃縮チャンネル34の中に入れられ、サンプルの画分である分析物は保持されるが、廃物画分は排出口39を通過して濃縮チャンネル34の外に出て、素子の外に流出する。溶離緩衝剤が次にポート40からリザーバ32の中に入れられる。次に、溶離緩衝剤をリザーバ32から濃縮チャンネル43を通過して電気泳動フローパス31に沿ってリザーバ33まで移動させる電界が電極35と36との間に与えられる。溶離緩衝剤が濃縮チャンネル34の中を通過するにつれて、溶離緩衝剤は初期試料容積の画分である保持された分析物を分離し、これを電気泳動フローパス31の中に運ぶ。

第4図は、濃縮チャンネル62が2次電気泳動フローパス55により主電気泳動フローパス52から分離されている本発明の実施の形態の略図である。素子50の場合、試料はシリンジインタフェース66を通じて濃縮チャンネル62の中に入れられる。試料が濃縮チャンネル62の中を流れるにつれて、廃試料は排出口64を通過して廃物リザーバ63の中に流入する。次に、電界を電極61と60との間に与えリザーバ57の中に存在する溶離緩衝剤を濃縮チャンネル62を通過して移動させ、その結果、分析物を分離する。分析物は次に溶離緩衝剤とともに2次電気泳動フローパスに沿って運ばれる。分析物が交差点51に達すると、電極59と58との間の電界が電極60と61との間の電界に代わる。本発明のこの実施の形態又は類似の実施の形態においては、分析物が交差点51に達する時期は、交差点における分析物の存在を検出することにより、又は、分析物の特定の性質、フローパス内の媒質、電界の強さ等に基づいて、分析物が交差点に達するはずの時期を経験的に定めることにより、定めることができる。リザーバ54と53とにそれぞれ配置された電極59と58との間の電界付与後には、分析物は交差点51から電気泳動フローパス52に沿ってリザーバ53に向かって移動し、検出領域65を通過する。

第5図は、濃縮チャンネルが流体入口と出口を1つしか有していない本発明のさらにもう1つの実施の形態の略平面図である。素子70は、2次電気泳動フローパス73と交差関係にある主電気泳動フローパス71を含む。2次電気泳動フローパス73に沿った交差点82の上流に、濃縮チャンネル72がある。この実施の形態を使用する際には、試料はシリンジインタフェース80を通じて濃縮チャンネル72の中に入れられ、それにより、試料の画分である分析物は濃縮チャンネル内に存在する材料に可逆結合される。次に、試料の不可逆結合した又は廃物画分を濃縮チャンネル72の外に出し、2次電気泳動フローパス73に沿って移動させ、交差点82を通過させ、排出口84から廃物リザーバ78の中に入れる電界が、電極81と79との間に適用される。次に溶離緩衝剤がシリンジインタフェース80を通じて濃縮チャンネル72の中に入れられ、溶離緩衝剤を濃縮チャンネル72を通過して2次流電気泳動フローパス73の中に流入させ、溶離緩衝剤とともに分析物を運ぶ電界が、電極81と79との間に与えられる。分析物が交差点82に達すると、電極76と77との間の電界が電極79と81との間の電界に代わり、分析物を主電気泳動フローパス71に沿って移動させ、検出領域99を通過してリザーバ74に向かわせる。

第6図に概略的に示された素子は、第1～5図の素子のクロマトグラフ濃縮手段の代わりに電気泳動濃縮手段を有する濃縮チャンネルを含む。素子90においては、試料はリザーバ96の中に入れられ、試料をリザーバ98に向かって移動させる電界が電極87と88との間に付与される。試料は、リザーバ98に向かって移動するにつれて、気孔寸法の比較的大きいスタッキング（積重ね）ゲル93の中に入り、気孔寸法の比較的小さい2次ゲル92に向かって移動する。界面94においては、試料成分は狭い帯域に圧縮される。この地点で、電極89と90との間の電界が電極87と88との間の電界に代わって、界面9

10

20

30

40

50

3における試料成分の狭い帯域を主電気泳動フローパスの中に移動させ、検出領域91を通過させ、リザーバ85に向かわせる。素子90においては、スタッキングゲル構造の代わりに、限界質量を下回る試料成分を選択的に通過させ、限界質量を超える成分を表面に保持することができる分子サイズ膜を界面93の領域に備えることもできる。第6図に示された素子のさらにもう1つの変更例として、93の領域内の関心を引く試料成分を保持し、それにより、93の領域内の成分濃度を必要な高さに維持するために、適正な電位を付与することができる電極を、界面93の位置に配置することもできる。例えば、関心を引く陰イオン分析物の場合、試料をリザーバ96の中に入れ、正電極である93とアースである87との間に電界を付与することにより、陰イオン分析物は93の領域に向かって移動し、そこで濃縮される。分析物が電極93の領域で濃縮された後に、陰イオン分析物をリザーバ85に向かって移動させる電界を89と90との間に付与することができる。第7図は、第3～6図のクレジットカード形の実施の形態とは対照的な、本素子のディスク形の実施の形態の略平面図である。素子100においては、試料は最初に濃縮チャンネル102の中に入れられる。電界が電極108と109との間に付与され溶離緩衝剤103を濃縮チャンネル102の中を通過させ、それにより、濃縮チャンネル102内に保持された分析物が分離され、溶離緩衝剤とともに交差点114まで運ばれる。次に、110と111との間の電界が108と109との間の電界に代わり、分析物を交差点114から主電気泳動フローパスに沿って移動させ、検出領域113を通過させ、リザーバ107に向かわせる。

10

その他の実施の形態は、第8～19図の流れ図を参照することにより理解でき、その中のいくつかは第1～7図に示された実施の形態に対応している。例えば、第8図には、第1図又は第2図に示されたような濃縮チャンネルの流れ図が、対応する識別番号ともに示されている。従って、第1及び2図との関連で記載されているように、試料はフローパス12を通して試料入口7から濃縮チャンネル10の中に入る。試料が濃縮チャンネル10の中を通過するにつれて、例えば、(第1図との関連で記載されたような)逆相C18材料のこともあるし、(第2図との関連で記載されたような)ガラスフィラメントの網に共有結合された結合対部材のこともある、関心を引く画分を含む画分は濃縮媒質上に保持され、一方、残りの廃物画分は廃物出口6からフローパス13に沿って流出される。適当な量の試料が濃縮チャンネル10の中を通過し、入口7及び出口8を通る流れが停止され、溶離緩衝剤がフローパス15を通して入口4から濃縮チャンネルの中に入る。濃縮チャンネル10の内部では、関心を引く保持された画分が分離されて、溶離緩衝剤の中に入り、濃縮媒質を通過し、フローパス15を通して濃縮画分出口5から外に出る。

20

30

第9図には、第3A、3B図の2つの図に図示され、図との関連で記載されたような素子30の実施の形態の流れ図が示されている。流れ図においては、濃縮チャンネル(第3A、3B、9図では34)は正方形により表され、種々のリザーバ(例えば、第3A、3B、9図では32、33)は、フローパス(チャンネル)の端の小さな円により表され、フローパス(例えば、第3A、3B、9図では主電気泳動フローパス31)は線により表され、電極(第3A、3B、9図では35、36)は、リザーバを表す円の中心までのびた細線により表され、シリンジ注入用のインタフェース(1つが存在する場合あり;例えば、第3B、9図では38)は試料入力フローパスの端の台形により表されている。検出領域(第3A、3B、9図では37)は、主電気泳動チャンネルに触れている太い矢印により表されている。同様に、第12図には、第6図に図示され、図との関連ですでに記載されたような素子90の実施の形態の流れ図が示されている。この実施の形態においては、濃縮チャンネル(第12図では120)は電気泳動濃縮により動作し、その結果、濃縮チャンネル120が主電気泳動チャンネル95と交差する地点に、関心を引く画分が集まることになる。電極87、88の間の電位差を与えることにより、試料材料が濃縮チャンネルの中を通過することができ、電極89、90の間の電位差を与えることにより、関心を引く画分を濃縮チャンネルから溶離させ、主電気泳動チャンネルを通過させ、検出帯域91に送ることができる。第6図に関して上に記載したように、統合点はスタッキングゲル93と2次ゲル92との間の界面94とすることができる。別の変更例においては、濃縮チャンネルの界面の領

40

50

域に必要な成分濃度を提供するために、適当な電位を界面 9 3 の位置の電極（第 1 2 図では 1 2 1 ）に与えることができる。

第 1 0 図は、第 4 図に図示され、第 4 図との関連で上に記載されたような、濃縮チャネル 6 2 が 2 次電気泳動フローパス 5 5 により主電気泳動フローパス 5 2 から分離されている素子 5 0 の実施の形態の流れ図である。同様に、第 1 3 図は、第 7 図に図示され、第 7 図との関連で上に記載されたような、素子 1 0 0 のディスク形の実施の形態の流れ図である。第 1 3 図は、試料をシリンジインタフェース 6 6 から濃縮チャネル 1 0 2 の中に入れる際に使用される試料入力フローパスと、関心を引く画分を濃縮チャネル内の保持媒質上に保持しつつ、廃物を廃物リザーバに送る際に使用される排出口 6 4 とを示している。これらの特徴は第 7 図又は第 4 図の平面図には図示されていない。

10

第 1 1 図には、第 5 図に図示され、第 5 図との関連で上に記載されたような、濃縮チャネル 7 2 への流体入口と、濃縮チャネル 7 2 からの流体出口が 1 つしかない素子 7 0 の流れ図が示されている。シリンジインタフェースによる試料の注入中には、流体入口 1 1 6 は試料入口の役割を果たし、流体出口 1 1 8 は廃物出口の役割を果たす。関心を引く画分は保持媒質により濃縮チャネル内に保持されるが、一方、廃物画分は下流に流れて 2 次電気泳動フローパス 7 3 を通過し、2 次電気泳動フローパスと主電気泳動フローパス 7 1 との交差点 8 2 を横断し、排出口 8 4 の中に入り、この排出口は廃物を主電気泳動フローパスから廃物リザーバ 7 8 に向かわせる。溶離中には、溶離緩衝剤はシリンジインタフェースにより注入される。流体入口 1 1 6 は溶離緩衝剤入口の役割を果たし、流体出口 1 1 8 は 2 次電気泳動チャネルへの濃縮画分出口の役割を果たす。関心を引く画分は溶離緩衝剤の中に入り、溶離緩衝剤中では、電極 7 9、8 1 を横断して 2 次電気泳動チャネルと主電気泳動チャネルとの交差点に電圧を与えることにより形成される電界の中で界面動電駆動される。関心を引く画分が交差点に達すると、関心を引く画分中の 1 つ又は複数の分析物を主電気泳動フローパスの中に引込み、主電気泳動フローパスに沿って検出ゾーン 9 9 に送るために、電圧が電極 7 6、7 7 を横断して付与される。

20

第 5 図との関連で指摘されたように、廃物画分（濃縮媒質に結合しなかった材料）は、濃縮チャネルの上流の電極と排出口の下流の電極との間に電界を与えることにより、濃縮チャネルと主電気泳動経路から洗流することができる。すなわち、溶離緩衝剤を濃縮チャネルの中に入れる前に、液体洗浄媒質が濃縮媒質を通過させられ、排出口から外に出され、廃物画分成分を運去る。洗浄媒質が関心を引く画分を濃縮媒質から溶離しない限りは、どんな材料でも洗浄媒質としての適性を有する。さらに、濃縮媒質と結合したり、その他の形で一体化することがある好ましくない成分を溶離の前に選択的に分離又は除去する作業を楽にするように、洗浄媒質を選ぶこともできる。例えば、関心を引く成分が DNA 断片である場合、洗浄媒質は、蛋白質又はポリペプチドを選択的に減成するか、又は RNA を選択的に減成し、溶離の前の関心を引く画分からのこれらの汚染物質の除去を楽にする酵素を含むことができる。又は、例えば、関心を引く成分が蛋白質である場合、洗浄媒質は DNA ses と RNA ses とを含むことができる。

30

濃縮チャネルの中に入り、濃縮チャネルの中を通過する各種の液体の連続的な動きは、濃縮チャネルの上流部に各液体用のリザーバとフローパスとを提供することにより、簡単に制御することができる。例えば、第 1 4 図の流れ図に図示されたように、濃縮チャネル 2 1 0 への入力部 2 1 2 は、試料リザーバ 2 1 8 からのびる試料供給フローパス 2 2 0 と、洗浄媒質リザーバ 2 1 7 からのびる洗剤媒質フローパス 2 1 8 と、溶離媒質リザーバ 2 1 5 からのびる溶離媒質フローパス 2 1 6 により供給を受ける。電位を（図示されてない）電極を横断して各リザーバと濃縮チャネル 2 1 4 の下流の（種々の形状についてここに記載されたような）適当な地点とに与えることにより、これらの材料の動きを選択的に制御することができる。蛋白質に適した洗浄媒質としては、例えば、pH 調節緩衝剤と有機溶剤とがある。洗浄は、例えば、洗浄媒質のイオン強度又は温度を調節することにより行うことができる。

40

その他の材料も入力フローパスに入れることができ、特に、濃縮チャネル上に移動させる前の試料自体の前処理のために、1 つ又は複数の試薬流を供給することができる。体液（

50

例えば、血液、リンパ液、羊水、随液、又は尿)の未加工の試料は、試料フローパス内で試料を試薬と結合させることにより前処理することができる。例えば、酵素又は洗浄剤を含む試薬の混合により、DNAを全血の未加工試料中の細胞から分離することができる。濃縮チャンネルの下流のフローパスについては、その他の構成を用いることもでき、これらの構成のあるもの、関心を引く画分の成分の特定の種類の下流処理又は分析に関していくつかの効果を提供することもできる。例えば、第15図では、2次電気泳動フローパスは主電気泳動フローパスを横断していない。主電気泳動フローパス238はT字形交差点において2次電気泳動フローパス236とつながっている(第12図と比較せよ)。この構成においては、主電気泳動フローパスの上流部は2次電気泳動フローパス236と同じチャンネル内をのびている。ここに記載されたその他の構成の場合と同様に、試料は試料リザーバ233から試料フローパス234を通して濃縮チャンネル230の中に入る。濃縮段階中には、廃流体は2次電気泳動フローパス236を通して濃縮チャンネル230から外に出て、次にT字形交差点237を通過し、排出口240から廃物リザーバ241に達する。濃縮段階が終了すると、洗浄媒質を濃縮チャンネルの中に流し、同様に排出口から排出することができる。洗浄媒質は、試料供給フローパスを通じて中に入れることもできるし、又は、随意で、第14図との関連で上に記載されたような独立の洗浄媒質フローパスから中に入れることもできる。電界を(図示されていない)電極を横断して廃物リザーバ241と、試料リザーバ233と(随意で、洗浄リザーバと)に与えることにより、試料と洗浄媒質を動かすことができる。次に、溶離媒質を溶離緩衝剤リザーバ231から溶離緩衝剤経路235を通じて濃縮チャンネル230の中に入れ、濃縮チャンネル230の中を通過させ、2次電気泳動経路236の中を通過させることができる。関心を引く大部分の下流成分が交差点237に達するまで、溶離画分成分の下流の媒質を主電気泳動フローパス238から遠ざけ、廃物排出フローパス240を通じて排出することができる。次に、成分を2次電気泳動フローパス236から取出し、交差点237を通過して主電気泳動フローパス238の中に入れ、検出領域242に向かわせ、そこを通過させるために、電位をリザーバ239に与えることができる。

例えば第5、12図に示されたように、「注入クロス」において主電気泳動フローパスと2次電気泳動フローパスとが交差していることが、例えば、主電気泳動フローパスが電気泳動分離に使用される場合のように、試料プラグの精密な計測が望ましい場合に有利である。かかる注入クロスは、関心を引く画分からの試料成分の幾何学的に形成されたプラグを交差点から注入することを可能にする。

一方、試料プラグの精密な制御が望ましくなく、特に、全ての溶離試料が主電気泳動経路の中を通過することが望ましい場合、T字形交差点の方が好ましい。かかる構成は、例えば、ほぼ全ての全ての溶離試料に交差点の下流の一連の親和性ゾーンを通過させることにより成分の分析を行う場合に有利である。

例として、第16図には、直列配列の親和性ゾーン244、246、248、250を有する構成の中での流れを示した図が示されている。各親和性ゾーンは、関心を引く画分の選択された成分に対する特定の親和性を有する濃縮媒質を備えている。例えば、関心を引く画分が粗細胞溶解物中のDNAからなることがあり、しかも、溶解物は濃縮チャンネル230の上流で形成され、濃縮チャンネル230内で濃縮及び/又は精製されたものかもしれない。その結果、主電気泳動フローパス238の中に入る溶離画分は主として長さ及び基本組成が異なるDNA断片の複雑な混合物からなる。各ハイブリッド形成ゾーンはそれ自体が濃縮チャンネルであり、その内部の濃縮媒質は、標的DNA配列順に対して相補性の配列順を有する不動化オリゴヌクレオチドプローブを含む。溶離画分が親和性ゾーン244、246、248、250の中を逐次通過するにつれて、親和性ゾーンの1つの中のプローブに対して相補性の画分中に存在するあらゆる標的DNAがその親和性ゾーンの中で結合される。親和性ゾーンには、親和性ゾーン内で結合された関心を引く成分からの(蛍光又は電気化学ルミネセンスのような)信号を検出し、随意で、定量化するように形成された検出器243、245、247、249を備えている。当業者には理解されるであろうが、あらゆる形態の生体分子認識を親和性ゾーン内での捕獲原理として用いることができる

10

20

30

40

50



。有用なタイプと親和性としては、抗体・抗原相互作用と、ポリ d T とアデニル酸塩 R N A との結合と、R A N、D N A、P A N 用のオリゴヌクレオチドプローブと、ストレプトビジン・ビオチン結合と、D N A 結合蛋白質 G 又は蛋白質 A のような蛋白質・D N A 相互作用と、アルギニン、ベンザミジン、ヘパリン及びレクチンのような、グループ特定親和性を有する分子とがある。その他の例は当業者には明白であろう。

従って、例えば、捕獲原理は、受容体・配位子結合、抗体・抗原結合等を含むこともでき、その結果、本発明による方法及び素子は、免疫学的検定、受容体結合検定等の実施に、さらには、核酸ハイブリッド形検定の実施に役立てることができる。

代替的に、上記のように、2 次電気泳動フローパスとの交差点の下流において、主電気泳動フローパスを分岐させ、第 1 7 図に例が示されているように、主電気泳動フローパスを平行配列することができる。図示された電気泳動フローパス 2 3 8 は 2 つの二又にされており、その結果、4 つの主電気泳動フローパス分岐路が下流に各廃物リザーバ 2 6 2、2 6 4、2 6 6、2 6 8 までのびている。分岐路は、この例では、親和性ゾーン 2 5 4、2 5 6、2 5 8、2 6 0 と、検出器 2 4 3、2 4 5、2 4 7、2 4 9 とを備えている。第 2 2 図との関連で以下により詳細に示されているように、(例えば、温度、p H、緩衝剤条件等のような)環境の適用特性は、各フローパス分岐路内で、その他の分岐路から独立して効果的に制御することができる。

第 1 7 図の例のように、親和性ゾーンが並列に配置されている場合、各親和性ゾーンは、主電気泳動チャンネルに運ばれる全試料のアリコートを受取る。この実施の形態においては、親和性媒質の 2 つ以上により捕獲することができる試料成分は、各 2 つ以上の親和性ゾーンの中に現れることになる。例えば、プローブ配列順 2 つに対して相補性の 2 つの配列順の一方又は両方を含む核酸断片は、並列配置においては、これらの 2 つのプローブを含む 2 つの親和性ゾーンの中で捕獲される。一方、第 1 6 図の例のように、親和性ゾーンが直列に配置されている場合、各下流親和性ゾーンに達するのは、上流の親和性ゾーンにより捕獲されなかった試料成分だけである。この場合、例えば、親和性ゾーンの 2 つの中のプローブ配列順に対して相補性の 2 つの配列順の両方を含む核酸断片は、2 つの親和性ゾーンのより上流のものの中でしか捕獲されない。1 つの成分又は配列順を含むが、もう 1 つの成分又は配列順を含まない試料成分を識別することが望ましい場合、この配置が効果的であるかもしれない。

そして代替的に、上記のように、濃縮溶離試料の処理のために、複数の主電気泳動フローパスを備えることもできる。第 1 8 図の例により示したように、主電気泳動フローパス 2 7 0 は溶離試料を 2 次電気泳動フローパス 2 3 6 から一連の交差点 2 7 2 を通って運ぶことができる。各主電気泳動フローパス 2 7 0 は上流リザーバ (2 7 4) と下流リザーバ 2 7 6 を備え、それぞれ検出器 2 7 8 を備えている。この構成は、単一の濃縮試料画分のアリコートについて一連の試験又は検定又は測定を行うために用いることができ、上記のように、分析物の量の精密な測定を所望する場合、特に有用であろう。主電気泳動フローパス 2 7 0 の各々には、第 1 6、1 7 図との関連で上に記載されたように、1 つの親和性ゾーンを備えることも、(第 1 8 図には図示されていない)一連の親和性ゾーンを備えることもできる。

又は、第 1 9 図の例により示されたように、複数の濃縮チャンネル 2 8 0 が分岐試料供給マニホールドから 2 8 1 から試料を受取ることができる。各濃縮チャンネル 2 8 0 は、溶離段階中に、主電気泳動フローパス 2 8 4 との交差点 2 8 8 に濃縮画分を運ぶことができる。濃縮段階中に (及び、随意で、洗浄段階中に)、廃物画分が交差点 2 8 8 から分岐試料排出マニホールドから 2 8 3 を通り、排出口 2 4 0 から廃物リザーバ 2 4 1 に搬出される。例えば、関心を引く画分が D N A の混合物である場合、さらには、D N A の配列順情報とサイズ情報の両方を得ることを所望する場合、かかる配置を特に効果的に使用することができる。第 1 9 図の配置は、例えば、サーザンプロット分析に類似した貫流分析に使用することができる。従来のサーザンプロット分析では、D N A 断片は最初にゲル上で分離され、次に、プローブを相補性断片に結合することが可能な膜に運ばれる。サーザンプロット分析は主として手動ベンチトップ手順として行われ、非常に労働集約的であり、完了までに

10

20

30

40

50



数日を必要とする。本発明による貫流分析は実質的に自動化されており、はるかに迅速に分析を完了することができる。

貫流分析においては、濃縮チャンネルの1を除いた各々に、配置順特定不動態オリゴヌクレオチドプローブのような、配置順特定捕獲プローブが備えられ、濃縮チャンネルの最後の1つには、試料中の全てのDNA断片を結合する総括捕獲媒質が備えられる。これらの異なる濃縮画分は溶離段階中に交差点288に運ばれ、次に、それぞれ検出器286を備えた主電気泳動フローパスの中を電気泳動により動かされる。総括捕獲媒質を入れた濃縮チャンネルからの濃縮画分は、試料からの全てのサイズのDNAの混合物を含み、ある範囲の電気泳動移動度を有し、検出器を逐次的に通過し、結果として一連の信号ピークを形成する。その他の各濃縮チャンネルからの濃縮画分は、各濃縮チャンネル内の特定の捕獲媒質に対して相補性のDNAだけしか含んでいない。

10

いくつかの実施の形態においては、1つ又は複数の試薬を2次フローパスと主電気泳動フローパスとの交差点の下流の濃縮画分と結合することが望ましいことがある。第20図は、第15図に示されたものと類似した流れ図である。第20図では、試薬フローパス300が試薬（又は複数の試薬）をリザーバ301から主電気泳動フローパス238に運び、そこで、試薬は濃縮画分中の1つ又は複数の分析物と結合し、反応することができる。さらに、主電気泳動フローパスが2次電気泳動フローパスとの交差点の下流で分岐し、分岐路内に部分画分を形成する場合、各かかる下流分岐路には、試薬をリザーバから運ぶ試薬フローパスを備えることができる。かかる構成は、単一の試薬による部分画分の反復処理、又は異なる試薬による各部分画分の処理、又は2つ以上の試薬による部分画分の同時処理に対応することができ、いずれの場合も、濃縮部分画分中の分析物の相互作用により、特定の所望の結果が得られる。

20

第21及び22図は、第16及び17図に示されたものと類似した流れ図であり、複数の分岐主電気泳動フローパスを有し、各分岐路は親和性ゾーンを備えている。第21図では、試薬フローパス300が試薬（又は複数の試薬）をリザーバ301から主電気泳動フローパス238に運び、そこで、試薬は濃縮画分中の1つ又は複数の分析物と結合し、反応することができる。この実施の形態においては、試薬フローパス300が第1の二又の上流の地点で主電気泳動フローパス238と交差しているので、リザーバ301により供給される試薬は、下流分岐路で処理され、各親和性ゾーン内で検出される全ての部分画分の反復処理を行う。第22図では、主電気泳動フローパス238の下流分岐路の各々には、独立の試薬リザーバ（303、305、307、309）からそれぞれ試薬を運ぶ試薬フローパス（302、304、306、307）が備えられている。かかる構成は、例えば、平行なハイブリッド形成ゾーンの独立ストリンジェンシー制御の提供のように、部分画分の異なる処理に対応することができる。

30

例えば、第18～22図のいずれかに示されたようなフローパス又はそれらの組合せを提供する素子は、DNAプロファイリングに使用することができる。詳細には、例えば、制限断片多形性（“RFLP”）分析を、第22図に示されたようなりザーバ303、305、307、309内の複数の異なる単一座RFLPプローブを用いることにより行うことができる。多数のプローブを並列で行うことにより、結果としての対立因子の分布は、迅速かつ代表的DNAプロファイルをもたらすとともに、ランダムマッチの可能性を実質的に最小限に抑えるはずである。

40

対象素子は、媒質の中でエンティティを動かすために1つ又は複数の電界を媒質に対して適用する多種多様は用途において使用することができる。代表的な用途としては、電気泳動分離用途、核酸ハイブリッド形成、配位子結合、調剤用途、配列決定用途、合成用途、医療、環境、品質管理関連を含む分析物識別用途等がある。従って、特定の用途に応じて、多種多様な流体試料が対象素子の中に入れられることがあり、代表的な試料としては、体液と、例えば水等のような環境流体と、特定の分析物の識別及び/又は分離が所望されるその他の流体試料とがある。特定の用途に応じて、薬品、毒物、ペプチドや核酸のような自然生成化合物、蛋白質、糖蛋白質、有機及び無機イオン、ステロイド等を含む多種多様な分析物が関心を引くことがある。特に関心を引くのが、医療用途における対象素子の

50

使用であり、その際、分析されることがある試料としては、血液、尿、血漿、随液、涙、鼻又は耳分泌物、組織溶解物、唾液、眼球スクラッチ、細針生検材料等があり、しかも、素子の中に入れる前に、試料の再処理が必要なことも、必要でないこともある、すなわち、粘度を低下させる、イオン強度を低下させる、特定のpHに対する溶性又は緩衝性を高める等のために、溶剤と併用する必要があることも、ないこともある。医療用途の場合、関心を引く分析物としては、陰イオン、陽イオン、薬品又は生体異物の代謝産物を含む小さな有機分子、ペプチド、蛋白質、糖蛋白質、オリゴ糖類、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、脂質、ステロイド、コレステロール等がある。

以下の例は説明のためのものであり、限定のためのものではない。

例

10

#### 例 1

水性試料中の有機分析物の高効率分離

第4図に示されたようなカードが、水性試料中の有機分析物の分離において、以下のように、カードの各リザーバの中への電極の挿入により適正な電界の適用を行い、検出領域65を通過する時に分析物を検出する手段を提供する素子と組合せて使用される。カード50の中では、濃縮チャンネル62はC-18相により被覆された多孔性ビードを含み、リザーバ及びチャンネルは、廃物リザーバを除いて、20ミリモルのホウ酸塩緩衝剤を含む。10 $\mu$ lの水性試料がインタフェース66を通じて濃縮チャンネル62の中に注入される。試料中の有機分析物の実質的に全てがC-18被覆多孔性ビードと可逆性結合し、一方、残りの試料成分は濃縮チャンネル62から廃物リザーバ63の中に流入する。10 $\mu$ lの溶離緩衝剤(90%メタノール/10%20ミリモルホウ酸塩緩衝剤 pH8.3)が次にインタフェース66を通じて濃縮チャンネル62の中に注入され、これにより、可逆性結合有機分析物が溶離緩衝剤中で遊離する。使用される溶離緩衝剤が少量であるために、元の試料中の分析物濃度と比較した溶離緩衝剤中の分析物の濃度は100~1000倍になっている。リザーバ57および56の上のシールが次に除去され、電界が電極61と60の間に適用され、57中に存在する緩衝剤を56に向かって動かし、しかも、緩衝剤前面の動きが、濃縮された分析物を含む溶離プラグを交差点51に動かす。電圧勾配が次に電極58と59の間に適用され、溶離緩衝剤の容積中に存在する分析物の狭い帯域が分離チャンネル52の中を通過するようにし、有機分析物の高効率分離を実現する。

20

上記の実験は第4図に示された素子の変更形態においても行われる。変更された素子においては、リザーバ57に加えて、素子はやはり濃縮チャンネル62と流体連通している溶離緩衝剤リザーバを含む。この実験では、試料は濃縮チャンネル62の中に入れられ、これにより、溶離緩衝剤中に存在する有機分析物は、濃縮チャンネル内に存在するC-18相被覆ビードと可逆性結合する。溶離緩衝剤リザーバ内に存在する電極と、電極60との間に、10 $\mu$ lの溶離緩衝剤が濃縮チャンネルの中を通過し、あらゆる可逆性結合分析物を分離するのに十分だけの制限された時間にわたり、電界が与えられる。溶離緩衝剤が濃縮チャンネルの中に入った後に、電圧勾配が電極61と60の間に与えられ、上記のように、その結果として、緩衝剤が57から56に動き、定められた容積の有機分析物含有溶離緩衝剤が交差点51に運ばれる。

30

#### 例 2

40

統合マイクロフルイディック素子の内部での濃縮のために常磁性ビードを用いる試料濃縮生体磁気分離法に基づく実験手順が本発明の実施の形態として提供される。一般的に第23図に示され、それとの関連で記載されたように構成されたマイクロフルイディック素子においては、特定の親和性媒質に対する結合親和性を有する標的を捕獲するために、特定の標的からなる試料が、親和性媒質を被覆された磁性ビードを使用して処理される。かかる磁性ビードは、例えば、ニューヨークのDyna1社により、Dyna beads<sup>®</sup>の名前で販売されている。Dyna beadsは、細胞、遺伝子、バクテリア又はその他の生体分であることも、それらを含むこともある標的に選択的に結合する抗体又はその他の結合成分を被覆された超常磁性、単分散ポリスチレン微小球である。標的・Dyna bead複合体は次に磁石を使用して分離される。結果として得られる生体磁性分離手順

50

は簡単で、迅速で、信頼性があり、これにより、Dyna beads は、複雑な不均質生体混合物から特定の標的を分離するための総括的濃縮媒質としての役割を果たすことになる。かかる磁性濃縮媒質は、本発明によれば、例えば、細胞生物学、分子生物学、HLA 組織型別及び微生物学を含む、多種多様な用途に用いることができる。ここには、2つの実例が、特に、DNA 生成と細胞分離の方法が提供される。

まず最初に、マイクロチャンネルベース素子の一般的な説明が行われ、次に、生体磁性分離に Dynal 社製ビードを使用する方法の一般的な説明が行われる。

第22図の実例により示されたような統合マイクロフルイディック素子は、濃縮チャンネルに結合された主電気泳動フローパス394を含み、濃縮チャンネルは固体相抽出(SPE)室を含み、下流廃物リザーバ391に接続されている。濃縮試料検出領域393と液体出口リザーバ395とからなる主電気泳動フローパスはT字形交差点388において2次電気泳動フローパスとつながっている。この構成においては、洗浄用入口リザーバ373及び溶離緩衝剤溶入口リザーバ375と出口リザーバ391及び395との内部に配置された適切な電極を横断する電位を制御することにより、試料の界面動電操作が可能になる。Dyna beads が、次に、関心を引く試料が、それぞれ注入口ポート397及び377を通じて、素子の中に入れられる。濃縮室の内部においては、特定の標的に固有の試料とDyna beads との不均質懸濁液が低温放置され、ビードの表面上の特定の捕獲成分への固有吸着により、Dyna beads が標的と結合することを可能にする。濃縮室380の側面に対する標的・ビード複合体の不動化は磁力により行うことができる。これは、希土類永久磁石を濃縮室に隣接配置することにより、手動で行うことができる。本発明のもう1つの実施の形態においては、SPE室に作用する適用磁界を制御するために、電磁手段を用いる自動化手順が使用される。

磁気不動化段階が完了すると、洗浄緩衝剤リザーバ373の中に入れられた洗浄媒質を経路374を通して濃縮チャンネル380の中に移動させ、その中を通過させることができる。試料すすぎ中に、廃流体は濃縮チャンネル380から出て、電気泳動フローパス384を通り、次にT字形交差点388を通過し、排出口392から廃物リザーバ391に達する。従って、洗浄段階からの上澄みは、廃物が主電気泳動フローパスの中を通過する必要なしで、システムから除去される。本発明のこの実施の形態は、検出領域393をまず最初に汚染することなしで、粗試料から標的生体分子を分離及び濃縮する効果的な手段を提供する。

### 例3

#### 全血からのDNA精製

第22図に略図が示されたような電気泳動マイクロ素子を用い、全血からゲノムDNAを抽出し、精製するための濃縮媒質として Dynal<sup>R</sup> 生体磁性ビードを使用する実験手順が提供される。血液源は、小さな乾燥法廷試料(例えば、1ナノグラム程度)でも、採取されたばかりの動脈血(わずか10µl)でも、骨髓(約5µl)でもよい。迅速なDNA分離及び溶離を可能にする実験手順が、増幅及び分析用の又は増幅なしの直接分析用のDNAのアリコートが得られるように、第23図の素子の内部で全血を処理するための自動化手順を実証する目的で提供される。作業は以下の段階を含む。

1. 試薬及び試料充填
2. 細胞溶解/DNA捕獲
3. 反復性DNA洗浄
4. DNA溶離

以下、これらの段階の各々について、さらに詳細に検討が行われる。

市販のパッケージ入り試薬が使用されるこの実施の形態の場合、生体磁性分離媒質、溶解溶液及び試料の充填は、試薬及び試料の違いに対応する特別設計の注入ポートから行うことができる。最初に、溶解溶液と磁性ビードとを含む Dynal 社製 DIRECT<sup>TM</sup> 試薬が手動注入ポート379を通じて固体相抽出室380の中に直接注入され、それに続いて、全血試料が注入ポート377を通じてSPE室の中に注入される。代替的に、細胞核とビードとがキットとして一緒にパッケージされておらず、別々に供給されるその他の市販

の試薬を使用することもできる。この場合、溶解溶液は入口リザーバ371からSPE室の中に界面動電により充填することができる。次に、例えば日本合成ゴム社により供給される磁性ビードが、注入ポート379から充填されるか、又は入口リザーバ369から界面動電により充填される。後者のアプローチの場合、ビードは、電磁捕獲、又はフローパス384内のSPE室のすぐ下流に配置された機械的手段（例えば、膜、メッシュスクリーン又はアガロースゲルプラグ）、又はその両方により、SPE室に閉込められる。SPE室にビードと溶解溶液とが充填されると、DNA試料が、注入ポート377を通じて添加されるか、又は、SPE室の下流の電極と対になった電極を備えた入口リザーバを通じて界面動電により添加される。

濃縮室の内部で、計液試料と溶解溶液とDyna beadsとは、細胞が溶解される5分間の間常温放置される。次に、分離された核酸が、微小粒子の表面上で不動化された捕獲成分に吸収され、DNA・ビード複合体を形成することができる。細胞溶解能力を高めるために、例えば、ビードと試料と溶解溶液との流れが合流するように、供給チャネルを配置することにより、混合を行うことができる。適用される電界をうまく制御することにより、混合度を界面動電により高めることができる。入口リザーバ371と出口リザーバ391との中に配置された電極の極性を周期的に逆転させることにより、血液・溶解緩衝材混合物をSPE室の内部で界面動電により振動させつつ動かすことが可能である。細胞に適用される機械的せん断力をさらに高めるために、アパーチャ状構造をSPE室ハウジングの中に形成することができる。

SPE室の側面におけるDNA・ビード複合体の磁力分離と捕獲とに続いて、リザーバ373内に入れられた洗浄緩衝材をSPE室を通して廃物リザーバ391まで界面動電運搬することにより、すすぎを行うことができる。この45秒間のすすぎの後に、ビードは磁界の適用により溶液中に再懸濁させられ、次に洗浄緩衝材中で1分間常温放置される。同じ手順の後に、すすぎがさらに2回繰返され、PCR阻害剤を含む廃物に主電気泳動フローパス394の中を通過させずに、各洗浄段階からの細胞lysateと上澄みとをシステムから除去することを可能にする。

精製過程の最終段階はDNA溶離である。再度、溶離緩衝剤が界面動電によりリザーバ373からSPE室の中に運ばれる前に、捕獲ビードが結合DNAとともに電磁的に不動化される。量的溶離を確保するために、緩衝剤がSPE室の中を通過し、その結果、精製されたDNAを適時よりも早期に洗流してしまうことがないように、電位の精密な操作が必要である。代替的に、1997年6月18日提出のD. Benegnu et al. アメリカ特許出願第\_\_ / \_\_, \_\_, 号（弁理士摘要書第A-64739 / RFT / BK号）に記載されたような（第23図には図示されていない）注入クロスを用いることにより、溶離緩衝剤のプラグをSPE室の中に移動させることもできる。溶離緩衝剤がSPE室内にある状態で、ビードは磁界の適用により再懸濁させられ、次に溶離緩衝剤中に2分間常温放置され、有限DNA脱着運動を可能にする。DNA溶離が完了すると、ビードはSPE室内で電磁的に不動化され、精製されたDNAは分析のために界面動電によりプラグとして主電気泳動チャネル394の中に注入される。検出領域395は、特に、制限酵素消化、サーザン及びスロット/ドットプロットを含むプロットハイブリッド形成、電気泳動断片サイジング、及び量的PCR分析用の複数のマイクロチャネルからなることもできる（第23図には図示されていない）精巧なマイクロ流体システムの代わりをすることができる。しかしながら、本発明のこれらの実施の形態については、この例ではこれ以上触れない。

要約すれば、上記の実験手順は、精製されたDNAのPCR対応アリコートをして10分未満で分離することを可能にし、しかも、いったん粗試料がマイクロ純流体素子の中に入れられた後には、ユーザーが介入する必要はない。この方法のその他の効果としては、比較的労働集約的な沈殿又は遠心分離段階が不要であることに加えて、実験において消費される試薬が微量なことがある。等々。

#### 例 4

免疫磁気分離を用いる細胞濃縮

Dyna<sup>1</sup> 生体磁気ビードが細胞標的を分離するための濃縮媒質として使用される

10

20

30

40

50

実験手順が提供される。手順は、上記のDNA精製のための手順と類似している。例3と同様に、標的は、常磁性微小粒子の表面上で不動化された特定の結合成分を被覆されたビードにより捕獲される。Dynabeadsは、以下のように、様々な形態に形成されたものが入手可能である。

1. T細胞、T細胞サブセット、B細胞、単球、幹細胞、骨髄細胞、白血球及びHLAクラスII正細胞を含む多くのヒト細胞マーカーに対する親和性精製モノクローナル抗体を予被覆されたもの。

2. げっ歯動物B細胞、T細胞及びT細胞サブセットの分離用のマウス、ラット又はウサギ免疫グロブリンに対する2次抗体を被覆されたもの。

3. 何らかの生体分子をカスタム被覆するための未被覆又はトシラクト化形態のもの。 10

4. ビオチニレート化抗体とともに使用するためのストレプトアビジン被覆形態のもの。

一般的に第23図に図示されたように構成されたマイクロ純流体素子においては、さらなる加工及び分析用の細胞の精製アリコートを調製するために、細胞の不均質懸濁液が界面動電及び磁気操作法を用いて処理される。SPE室に適用される磁界の電磁制御を用いることにより、生体磁気分離が手動又は自動化形式で可能である。以下の4段階手順が本発明の代表的な実施の形態として提供される。

1. 生体磁気分離媒質を含む標的細胞及び試薬の充填

注入ポート379を通じて直接に、又は、特定の標的に固有のDynalビードの溶液の入った入り口リザーバ371から界面動電により、SPE室380の中に磁性ビードの溶液を充填する、あるいは又、Dynabeadsの溶液を満たされたSPE室に試料注入ポート377から直接に試料を添加する。 20

2. 特定の標的を結合することが可能なDynabeadsを用いる細胞捕獲

試料及びビードを2.5分間SPE室の内部に常温放置し、界面動電混合段階を用いて吸着性を高め、標的細胞をDynabeadsに結合させ、標的・ビード複合体を形成する。

3. ビード・標的細胞複合体の不動化による標的細胞洗浄

結合標的を含む捕獲ビードを電磁的に不動化し、界面動電操作により洗浄緩衝剤溶液をですすぎを行う。

洗浄緩衝剤が入り口リザーバ373からSP室を通過して廃物出口391に達するように電極電位を制御することにより、上澄みを除去する。 30

流れを45秒後に止め、磁界を適用することにより標的・ビード複合体を溶液の中に再懸濁させる。

標的・ビード複合体を洗浄緩衝剤中に1分間常温放置する。

上記の洗浄段階をさらに2回繰返す。

4. Dynal社製DETACHABEAD<sup>TM</sup>試薬を用いる標的細胞溶離

捕獲ビードを電磁的に不動化し、DETACHABEAD<sup>TM</sup>試薬をSP室の中に充填する。

溶離緩衝剤がSP室の中を通過しないですむようにするために、電極電位の操作により、界面動電でDynal抗体ベース試薬を溶離緩衝剤リザーバから移動させるか、又は、代替的に、(第22図には図示されていない)注入クロスを使用し、溶離緩衝剤のプラグをSP室の中に注入することができる。 40

磁界の適用によりビードを再懸濁させる。

有限脱着運動を可能にするために、ビード複合体を洗浄緩衝剤中に2分間常温放置する。

標的溶離が完了すると、ビードを電磁的に不動化する。

さらなる処理及び分析のために、分離された標的細胞を界面動電によりSPE室から主電気泳動チャンネルの中に運ぶことができる。

マイクロ純流体素子及びマイクロ純流体法を用いる細胞分離は、従来のフローサイトメトリ技術に代わる費用対効果の大きい技術を提供する。それに加えて、生体磁気分離技術と併用された場合、マイクロ流体式アプローチは、感度の向上及び暗騒音の減少をもたらす細胞濃縮及び検出を可能にする。マイクロ純流体ベース磁気分離法は標的物質に最小限 50

のストレスしか与えず、従って、細胞を無傷かつ生存可能な状態に保ち、ポリメラーゼ鎖反応増幅と組合された逆転写 ( R T - P C R ) における直接使用が可能である。マイクロ純流体ベース法は、フェノール抽出、エタノール沈殿、又は遠心分離を用いず、有毒試薬をほとんど用いることがない。分離は高価な装置の使用なしで行われ、高く評価される。

#### 例 5

費用対効果の大きい疾病管理のための手段

遺伝子治療が研究室段階から臨床段階に移行するにつれて、治療学と診断学の結びつきがより緊密になってくる。その結果、臨床における生物機器を使用した DNA ベース薬剤の効力のモニタリングが、これらの治療の成功を保証するために非常に重要になる。詳細には、細胞採集及び分離過程と新たに登場してきた分子的 DNA 増幅及び検出法とを統合するためのマイクロ純流体ベース素子は、この市場ニーズに応じられる見込みが非常に高い。従って、この用途において上記のような方法 ( 特に、例 3 と 4 ) を併用することにより、1つの分析機器が、費用対効果の大きい疾病診断能力と、医師が特定の遺伝子治療の適合性を評価するのを助けるモニタリングの能力とを有することが可能である。ゲノム後時代が急速に近づくにつれて、かかる効果的な疾病管理戦略は、その他の薬理遺伝学的アプローチに加えて、幅広く普及する潜在的可能性を有する。

本発明のこの実施の形態を説明する目的で、血液起因疾病を管理するためのシステムが提示される。

背景としては、遺伝血液障害が、ヒトがかかる最も多い遺伝疾患だということがある。世界保健機構は、世界の人口の約 5 % が様々なタイプのヘモグロビン障害のキャリアであり、約 300,000 の新しい症例が毎年診断されると推定している。鎌状赤血球貧血及び、 $\beta$ -タラセミアが、遺伝子治療により治療することができる 2 つの最も多いヘモグロビン異常症である。

ヘモグロビン異常症の治療と、その治療の過程のモニタリングにおいて特に関心を引くのが、造血幹細胞の収集及び分離である。第 22 図に示されたようなマイクロフルイディック素子の使用を、例 4 に記載されたようなヒト造血祖先細胞選択用の Dynal 試薬の使用と組合せることにより、所望の幹細胞分離を実現する迅速かつ使易い方法が可能である。例えば、1 ml の Dynabeads M-450 CD34 は約  $8 \times 10^7$  の細胞を分離する。 $8 \times 10^7$  (100  $\mu$ l) の Dynabeads M-450 CD34 を分離するために、100  $\mu$ l (1 単位) の DETACH A BEAD CD34 が使用される。この先祖細胞選択システムにより分離された細胞は純粋 (骨髓から 95 %、末梢及び臍帯血から 90 %) であり、表現型的に不変である。同じ素子により、幹細胞が分離され、次に溶解された後に、分子遺伝子法を用いて、遺伝子表現モニタリングを含む DNA 分析が可能である。従って、本発明のこの実施の形態に記載されたようなマイクロ流体ベース素子は、この新たに登場してきた分子薬剤と診断学とのインタフェースにおける疾病管理用の非常に貴重な手段であることが明らかになるはずである。

#### 例 6

固体相分離及び濃縮

不均質混合物からの特定の標的の固体相抽出 ( S P ) は、本発明の以下の実施の形態においては、標的特定微小粒子の選択的表面特性と、S P 室の内部にビードを保持するための機械的手段とを用いることにより実現される。たしかに、広範な生物研究用途について、市販の試薬の入手が簡単であることから、現在では生体磁気分離法が魅力的ではあるが、それに匹敵する分離を実現するために、その他の非磁気マイクロ流体アプローチが可能である。上記のものと類似した実施の形態においては、マイクロ流体形態による固体相濃縮が提示されている。濾過膜又はメッシュスクリーンを含む機械的手段を利用することにより、標的特定結合成分を有するビードを濃縮室の内部に保持することができる。それに加えて、洗浄及び溶離緩衝剤が高多孔性媒質の中を通過可能な状態を維持しつつ、ビードが外に出るのを防止するために、アガロースゲルを ( 実験の前に廃物リザーバ 391 から ) 濃縮室 380 の出口のチャンネル 380 の中に注入することもできる。従って、複雑な混合物からの標的分離及び精製のための例 2 に記載されたような各実施の形態を、少なくとも

概念的には、磁界の使用なしで実現することができる。

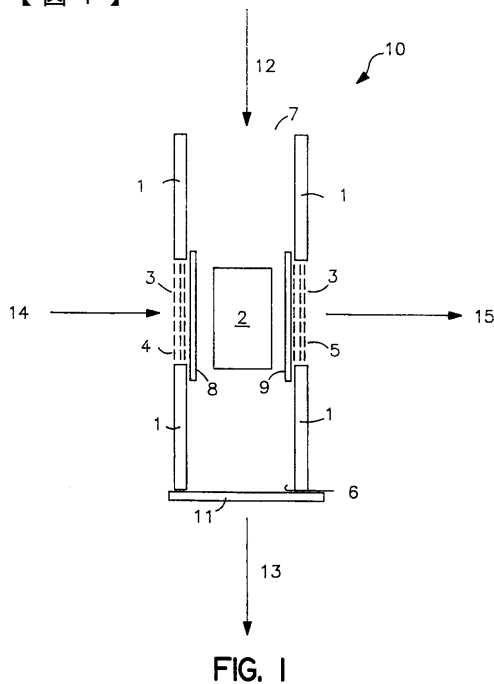
上記の結果及び検討から、現在入手可能なC E及びM C E素子に比べて非常に大きな効果をもたらす便利な統合マイクロチャンネル電気泳動素子が開示されていることは明白である。対象素子はフローパスとしてマイクロチャンネルを有するので、実行時間の短さ、小容積の試料の使用が可能、分離効率の高さ等の、C E及びM C E素子の利点の全てを提供する。対象統合素子は濃縮チャンネルを有するので、フェムトモルからナノモルの範囲の濃度の分析物を含む複雑な試料基質の分析に用いることができる。しかしながら、濃縮チャンネルと主電気泳動フローパスとの特定の位置関係から、帯域拡大等のような、オンライン構成の欠点は対象素子においては生じることがない。対象素子は統合されており、コンパクトであるので、取扱いが簡単で、自動化素子との併用も簡単に行うことができる。提供される融通性及び感度から、対象素子は、臨床電気泳動検査を含む多種多様な用途での使用に適している。

10

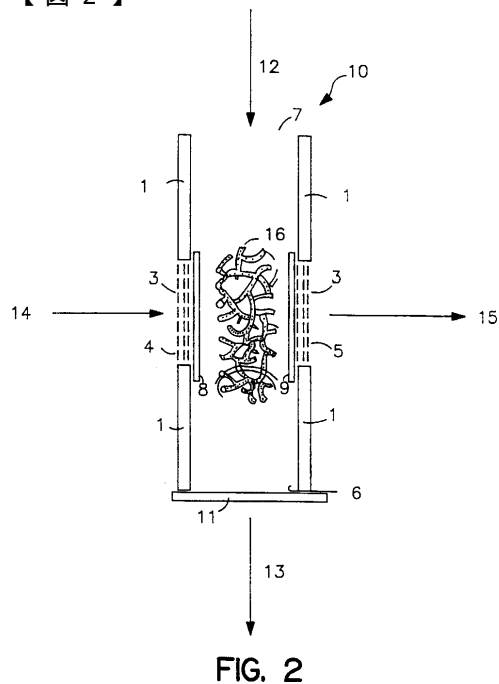
本明細書に挙げられた全ての刊行物及び特許出願は、各刊行物及び特許出願が引用により取入れられていることが特別かつ個別に指摘されているの同程度に、引用によりここに取入れられている。

本発明についての記載はこれで終了するが、当業者には、添付の請求の範囲の精神又は範囲から逸脱しない限りは、多くの変更及び修正が可能であることは明白であろう。

【図 1】



【図 2】



【 図 3 A 】

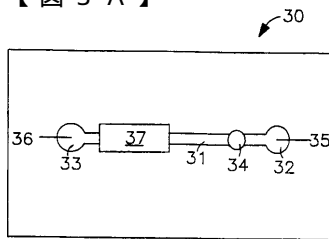


FIG. 3A

【 図 3 B 】

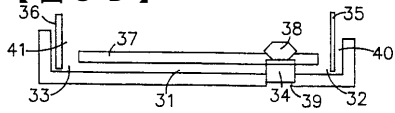


FIG. 3B

【 図 4 】

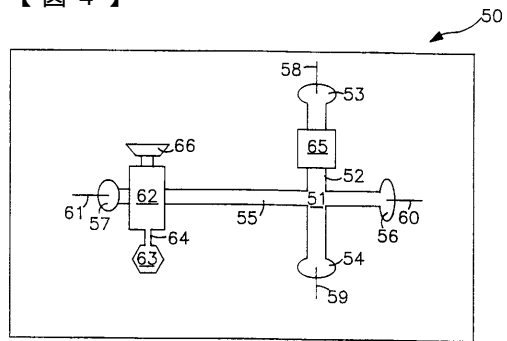


FIG. 4

【 図 5 】

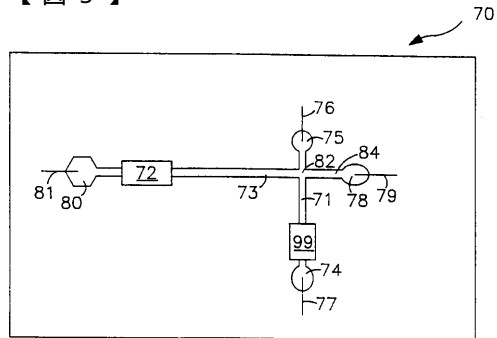


FIG. 5

【 図 6 】

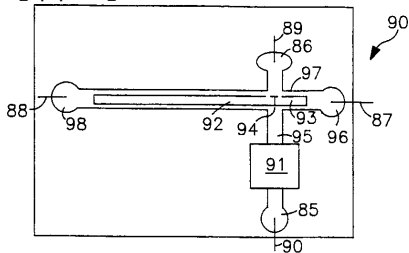


FIG. 6

【 図 7 】

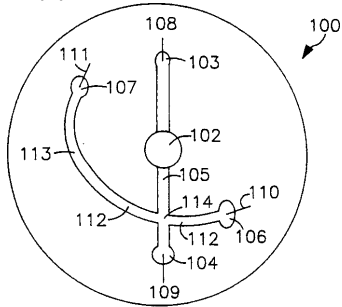


FIG. 7

【 図 8 】

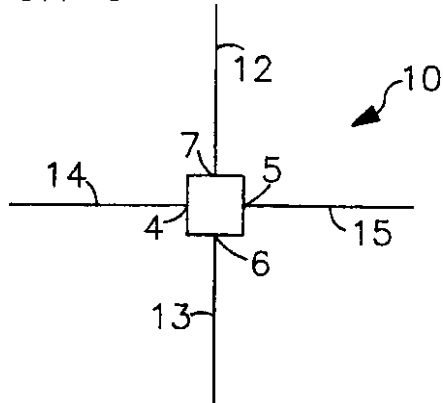


FIG. 8

【 図 9 】

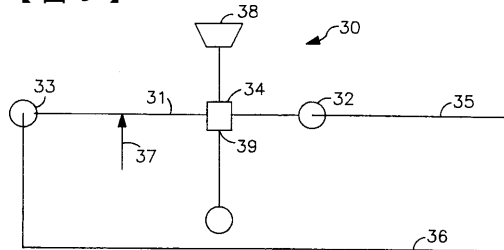


FIG. 9



【図 10】

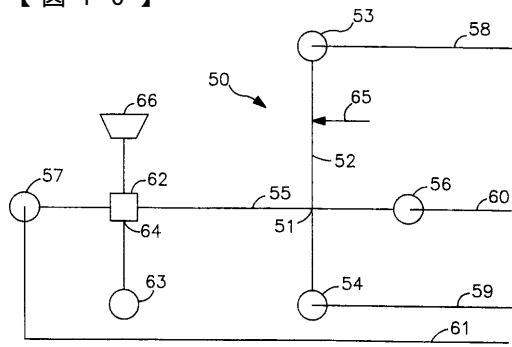


FIG. 10

【図 11】

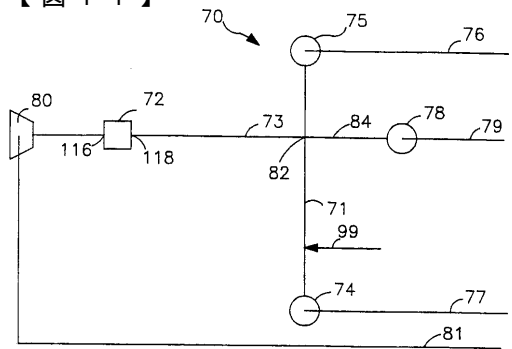


FIG. 11

【図 13】

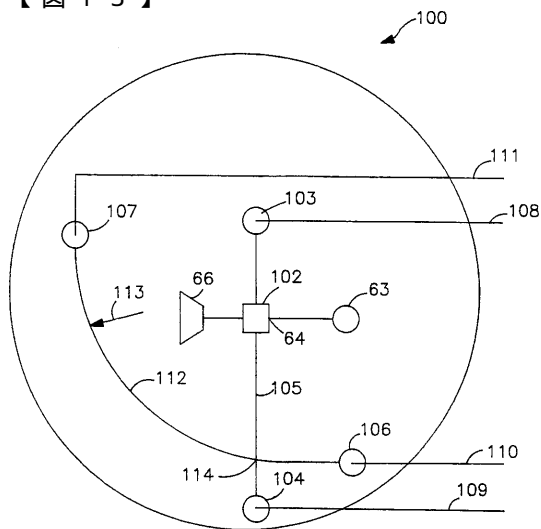


FIG. 13

【図 14】

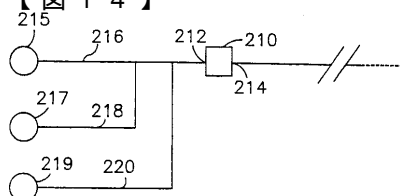


FIG. 14

【図 12】

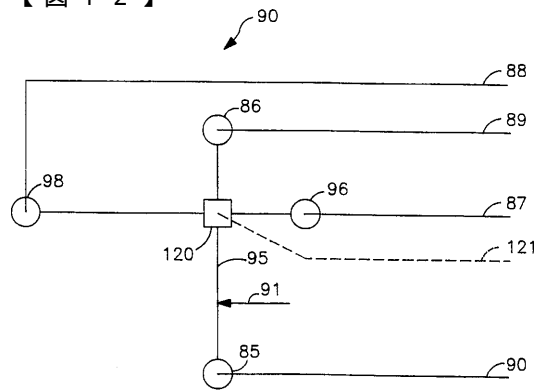


FIG. 12

【図 15】

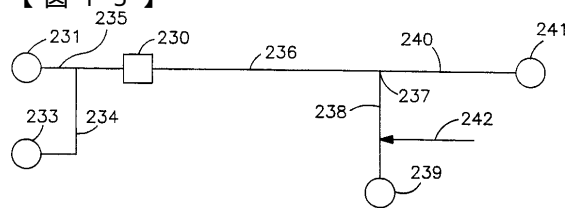


FIG. 15

【図 16】

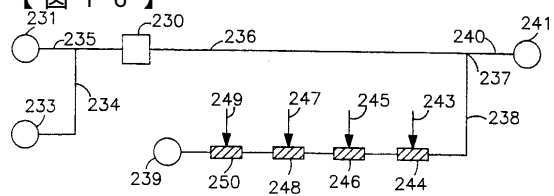


FIG. 16

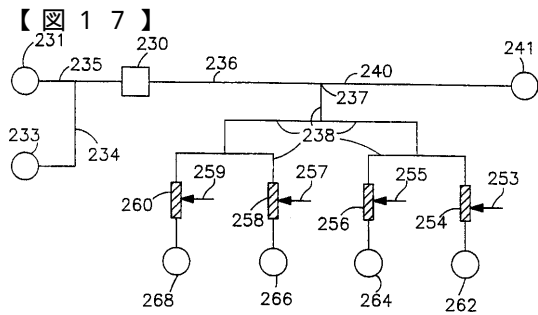


FIG. 17

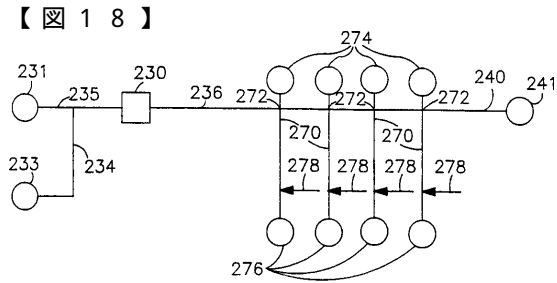


FIG. 18

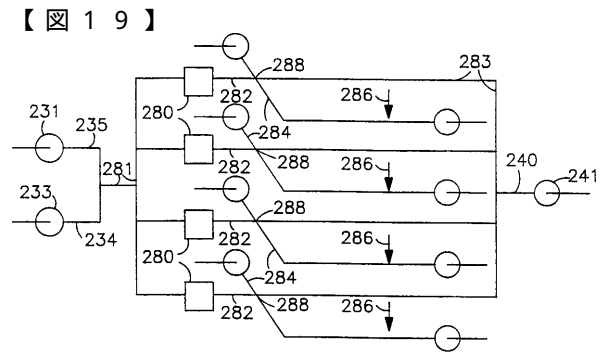


FIG. 19

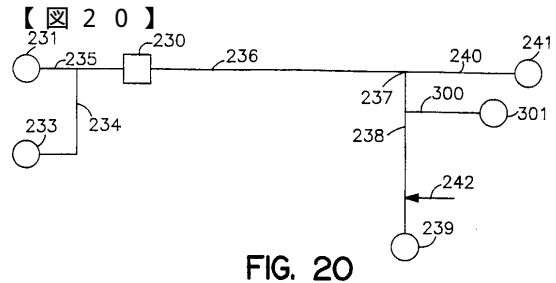


FIG. 20

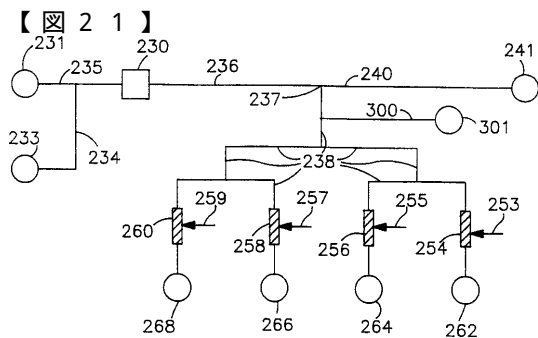


FIG. 21

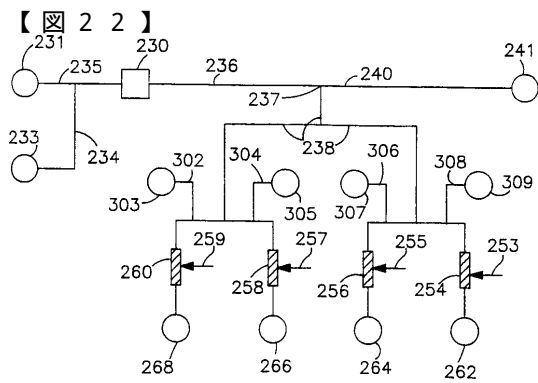


FIG. 22

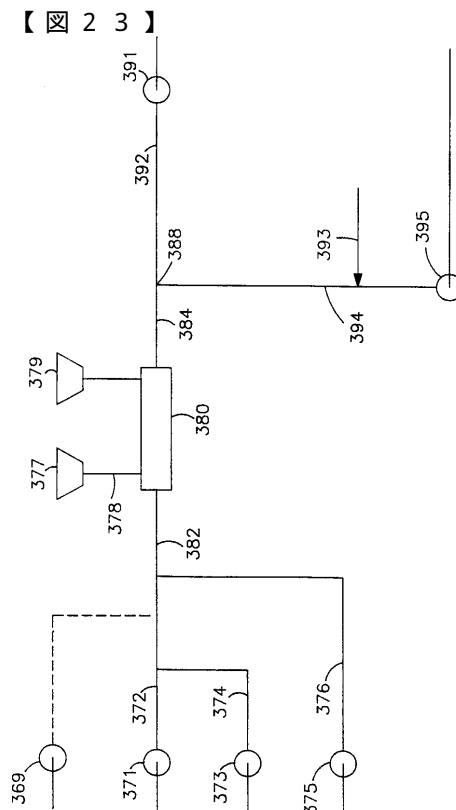


FIG. 23

## フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人

弁理士 小川 信夫

(74)代理人

弁理士 村社 厚夫

(72)発明者 ネルソン ロバート ジェイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94501 アラメーダ #145 マリナ ヴィレッジ  
パークウェイ 909

(72)発明者 フーバー ハーバート エイチ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94002 ベルモント コーヴィングトン ストリート  
823

(72)発明者 ハウザー アレン ケイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94301 パロ アルト ハミルトン アベニュー 63  
2

(72)発明者 サッシー アレクサンダー ピー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94704 パークレイ #12 カレッジ アベニュー  
2617

審査官 柏木 一浩

(56)参考文献 特開平8-178897(JP,A)

特開平5-302912(JP,A)

特開平7-198680(JP,A)

特開平8-5608(JP,A)

特開平3-81659(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/447