

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2009年3月5日 (05.03.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/028692 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/447 (2006.01) G01N 30/26 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/065602
- (22) 国際出願日: 2008年8月29日 (29.08.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-226301 2007年8月31日 (31.08.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人早稲田大学 (WASEDA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1698050 東京都新宿区戸塚町一丁目104番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 竜田 邦明 (TAT-SUTA, Kuniaki) [JP/JP]; 〒1698555 東京都新宿区大久

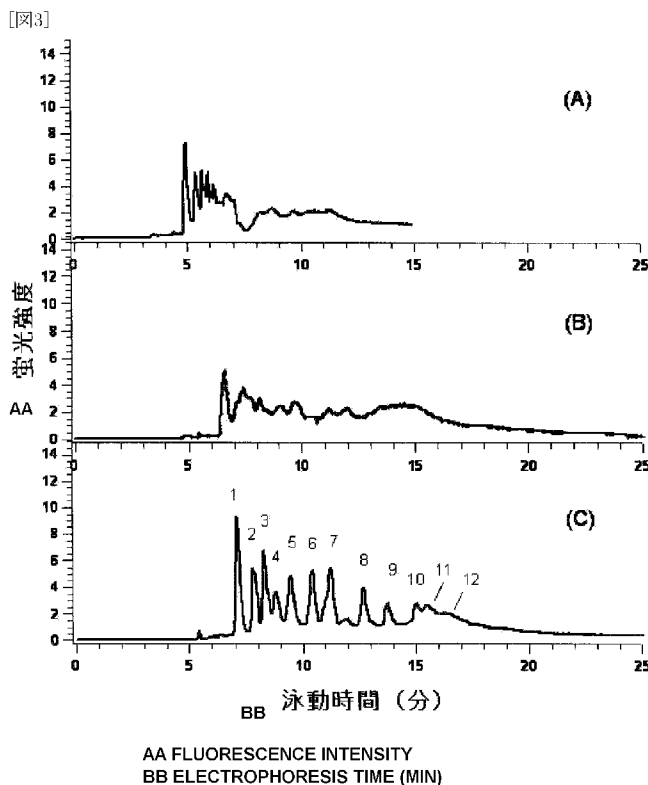
保三丁目4番1号 早稲田大学理工学術院内 Tokyo (JP). 山口 佳則 (YAMAGUCHI, Yoshinori) [JP/JP]; 〒1620041 東京都新宿区早稲田鶴巻町513 学校法人早稲田大学研究開発センター内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 牛木 護 (USHIKI, Mamoru); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目14番1号 郵政福祉琴平ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: BIOMOLECULAR SEPARATION AND ANALYSIS METHOD USING THIADIAZOLE

(54) 発明の名称: チアジアゾールを用いる生体分子の分離分析方法



(57) Abstract: To exhaustively separate and analyze a biomolecule while securing the reliability, it is intended to develop a separation solvent and a separation method capable of omitting a pretreatment of a biochemical sample and increasing the separation capability as much as possible and at the same time, increasing the detection sensitivity. The invention provides a biomolecular separation and analysis method characterized by comprising the step of solubilizing a biomolecule in a solvent containing thiadiazole, a liquid composition for biomolecular separation and analysis characterized by comprising thiadiazole, and a kit for biomolecular separation and analysis comprising the liquid composition for separation and analysis. The biomolecular separation and analysis method of the invention sometimes includes the step of separating the biomolecule solubilized in the solvent by electrophoresis. The biomolecular separation and analysis method of the invention sometimes includes the step of separating the biomolecule solubilized in the solvent by chromatography.

[続葉有]

WO 2009/028692 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,

SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(57) 要約: 生体分子を信頼性を確保したまま網羅的に分離分析するために、生化学サンプルの前処理を省略することができ、且つ、分離能をできるだけ高くすると同時に検出感度を高くできる分離溶媒及び分離方法を開発すること。本発明は、チアジアゾールを含む溶媒に生体分子を可溶化するステップを含むことを特徴とする生体分子の分離分析方法と、チアジアゾールを含むことを特徴とする生体分子の分離分析用液体組成物と、該分離分析用液体組成物を含む生体分子分離分析用キットとを提供する。本発明の生体分子の分離分析方法は、前記溶媒に可溶化された生体分子を電気泳動法で分離するステップを含む場合がある。本発明の生体分子の分離分析方法は、前記溶媒に可溶化された生体分子をクロマトグラフィー法で分離するステップを含む場合がある。

明 細 書

チアジアゾールを用いる生体分子の分離分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体分子の分離分析方法と、該分離分析方法に用いる溶媒と、該溶媒を含む分離分析用キットとに関する。

背景技術

[0002] 生物の機能を細胞レベルで明らかにするために、生体内のタンパク質、ペプチド、核酸、アミノ酸、糖質、神経伝達関連物質などの解析、分析が行われている。これらの生体内物質の分析で必要となる分離化学的要素は、検出感度と多成分を同時に網羅的に分析することである。これまで、その手段として、平板ゲルを利用したもの、高速液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動に代表されるように、カラムを利用した分析方法が使われてきた。

[0003] 分析対象物質を網羅的に分析する能力を示す分析化学的パラメーターに理論段数がある。理論段数はピークの広がりを持時間、もしくは泳動時間で割り算した商で与えられる。この値は大きいほど、その対象物質のピークのピーク幅が広がらないということを示しており、分離能、つまり、網羅的に分離する能力が優れていることになる。キャピラリー電気泳動では1, 000, 000、高速液体クロマトグラフィーでは30, 000程度である。

[0004] 理論段数が大きくなると、網羅的に分離できる物質の種類が多くなるだけでなく、それぞれの物質についての検出感度もよくなる傾向がある。ここで、傾向が有ると書いたのは、対象物質の絶対量との関係から、例えば、分子が数個程度しかない場合には、理論段数の増加による感度の向上は期待できないためである。絶対量が分子数にして1000個以上の場合には、分離の効果、理論段数の増加による検出感度の向上は期待できる。

[0005] 高い分離能が得られることは、検出感度のみならず、検出方法に関しても貢献できる。例えば、非特許文献1に説明されるとおり、マスマススペクトロスコピーを検出部分として使用する場合に、イオン化されやすさの程度が異なる複数の物質が混合された場

合でも、それぞれの物質を分離することによって検出が可能になるなどの効果が見られる。

非特許文献1:Takeshi Hara, Hiroshi Kobayashi, Tohru Ikegami, Kazuki Nakanishi, Nobuo Tanaka, Analytical Chemistry, 78, 7632-7642, (2006) ところで、生体物質の分析、特に、核酸やタンパク質のクロマトグラフィーや電気泳動を利用して網羅的に分析するには、最低でもサンプルを数 μ リットル用意し、さらに、核酸の場合にPCR法を用いる等何らかの増幅の方法でその量を増やして分析を行う。網羅的に分析を行うことは、例えば、非特許文献2及び3に説明されるとおり、キャピラリー電気泳動を用いた分析において、1本鎖DNAであれば50~1000まで、2本鎖のDNAであれば100bp~10000bpまでの範囲で、それぞれの分解能が1bpの塩基を分離することが可能であるとされている。しかし、2本鎖のDNAを分析する際にはその長さで5,000bpを超える長さを持つものを、分解能が1bpで、分離するのは困難である。

非特許文献2:A. S. Cohen, D. R. Nagerian, A. Paulus, A. Gutman, J. A. Smith, B. L. Karger, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 85, 9660 (1988)

非特許文献3:A. Gutman, A. S. Cohen, D. N. Heiger, B. L. Karger, Anal. Chem. 62, 137 (1990) 電気泳動を行う際に平板ゲルに長時間(少なくとも12時間以上)、矩形波を印加することによって分離分析を行うことがある。また、非特許文献4に説明されるとおり、キャピラリー電気泳動を利用した分離で、パルス波を利用し、40,000bpまでの長さのDNAまでを分離した例は見られるが、その場合には、分解能は100bp程度であり、1塩基の違い(例えば、10,000と10,001bpの違い)を分離することはできない。さらに、一本鎖のDNAやRNAを分離するためにはサンプルの前処理として、4M以上の高濃度の尿素を利用して変性を行い、一本鎖のDNA、またはRNAの分析を行うのが一般的である。

非特許文献4:Y. Kim, M. D. Morris, Electrophoresis 17, 152-160 (1996) サンプルの前処理を省略して分離を行うことが可能になれば、分析の速度及び正確性を向上することができる。特に、サンプルの処理から生まれる不確実

性を排除できるために、分離分析の信頼性が向上する。

- [0006] ところで、核酸やタンパク質の分析に通常利用される緩衝液に有機溶媒、ホルムアミドやジメチルスルホキシド(DMSO)を混合して分離を行った例は、例えば、特許文献1や非特許文献5に開示されるとおり、DNAのシーケンスを調べる際に、DMSOを混合することによって、7Mの尿素を混合した場合と比較して、DNAの分離がよくなった例は見られる。同様に、メタノールやエタノールなどを利用したもの、ホルムアミドを利用したものが見られるが、アルコール類はDNAに対して弱い変性の効果しかなく、静電的な不和が生じるために分析が安定しない、また、ホルムアミドについては、ホルムアミド自身が電解質溶液中で、特に温度安定性が悪いので、分離媒体としての使用には問題がある。

特許文献1:特開平9-145673号公報

非特許文献5:Lev Kotler, Hui He, Arthur W. Miller, Berry L. Karger, Electrophoresis 23, 3062-3070, (2002)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0007] 細胞内や組織内の核酸やタンパク質を信頼性を確保したまま網羅的に分離分析するためには、生化学サンプルの前処理を省略することができ、且つ、分離能をできるだけ高くすると同時に検出感度を高くできる分離溶媒及び分離方法を開発する必要がある。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明は、チアジアゾールを含む溶媒に生体分子を可溶化するステップを含むことを特徴とする生体分子の分離分析方法を提供する。
- [0009] 本発明の生体分子の分離分析方法は、前記溶媒に可溶化された生体分子を電気泳動法で分離するステップを含む場合がある。前記電気泳動法はキャピラリー電気泳動法の場合がある。
- [0010] 本発明の生体分子の分離分析方法は、前記電気泳動法で分離された生体分子を固体支持体に不動化させるステップを含む場合がある。
- [0011] 本発明の生体分子の分離分析方法は、前記溶媒に可溶化された生体分子をクロ

マトグラフィー法で分離するステップを含む場合がある。前記クロマトグラフィー法は液体クロマトグラフィー法の場合がある。前記液体クロマトグラフィー法は高速液体クロマトグラフィー法の場合がある。

[0012] 本発明の方法で分離分析される生体分子は、核酸、タンパク質、ペプチド、アミノ酸又はこれらの誘導体の場合がある。

[0013] 本発明の生体分子の分離分析方法に用いるチアジアゾールは、1, 2, 5-チアジアゾールの場合がある。

[0014] 本発明は、チアジアゾールを含むことを特徴とする生体分子の分離分析用液体組成物を提供する。

[0015] 本発明の液体組成物は、電気泳動法によって実施される分離分析に用いられる場合がある。前記電気泳動法はキャピラリー電気泳動法の場合がある。

[0016] 本発明の液体組成物は、クロマトグラフィー法によって実施される分離分析に用いられる場合がある。前記クロマトグラフィー法は液体クロマトグラフィー法の場合がある。前記液体クロマトグラフィー法は高速液体クロマトグラフィー法の場合がある。

[0017] 本発明の液体組成物が可溶化する生体分子は、核酸、タンパク質、アミノ酸又はこれらの誘導体の場合がある。本発明の液体組成物に含まれるチアジアゾールは1, 2, 5-チアジアゾールの場合がある。

[0018] 本発明は、本発明の分離分析用液体組成物を含む生体分子分離分析用キットを提供する。

[0019] 本明細書においてチアジアゾールとは、1, 2, 3-チアジアゾール(1, 2, 3-Thiadiazole)、1, 2, 4-チアジアゾール、1, 2, 5-チアジアゾールのうち少なくとも1つをいう。チアジアゾールは特開2005-211889号公報に開示されるとおり、有機溶媒と均一に混合するだけでなく、DMSO、ホルムアルデヒド等の試薬の存在下では水にも溶解するので、疎水性及び親水性の物質をよく抽出できる。加えて、ハロゲン系溶媒の代替溶媒としても優れている。また、チアジアゾールは、分離溶媒のpHの変化の影響をほとんど受けない。

[0020] 本発明の分離分析方法は、電気泳動法、クロマトグラフィー法のほか、核酸の雑種形成に基づく分離分析方法を含むが、これらに限られない。本発明の電気泳動法は

、平板ゲル電気泳動(スラブ電気泳動)、濾紙電気泳動法、ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)、未変性ポリアクリルアミド電気泳動(native-PAGE)、アガロースゲル電気泳動法、等電点電気泳動(クロマトフォーカシング)法、免疫電気泳動法及びキャピラリー電気泳動法を含むが、これらに限られない。本発明のキャピラリー電気泳動法は、キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)、キャピラリー等速電気泳動(CITP)、キャピラリー等電点電気泳動(CIEF)、ミセル導電電気泳動(MEKC)、キャピラリーゲル電気泳動(CGZE)、キャピラリーゲル等速電気泳動(CGITP)、キャピラリーゲル等電点電気泳動(CGIEF)及びキャピラリーゲルSDS電気泳動(SDS-CGE)法を含むが、これらに限られない。電気泳動の電流の向きは、一定の場合のほか、異なる向きに異なる電場を矩形波状に繰り返し印加するパルスフィールド電気泳動の場合がある。パルスフィールドキャピラリー電気泳動における電流の向きは順方向(F)及び逆方向(B)の2つの向きであるが、パルスフィールド平板ゲル電気泳動における電流の向きは2つまたは3つ以上の向きの場合がある。本発明のクロマトグラフィー法は、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー及びアフィニティクロマトグラフィーを含むが、これらに限られない。

[0021] 本明細書において、分子篩物質とは、ゲル電気泳動法における泳動ゲル、キャピラリー電気泳動法におけるキャピラリー内部に充填するゲル、ポリマー等のサンプルの泳動に篩い効果を出すための充填剤をいう。

[0022] 本明細書において、生体分子とは、自然界又は実験室の生物に存在する分子と、その誘導体とをいう。したがって、生体分子には、核酸、タンパク質、ペプチド及びアミノ酸の他、実験室で製造される放射能、蛍光色素その他の物質で標識された核酸、タンパク質及びアミノ酸と、モルフォリノオリゴヌクレオチドその他の修飾核酸と、糖タンパク質その他の修飾タンパク質と、アミノ酸数個が連結したペプチドと、ペプチド又はアミノ酸の水酸化、メチル化、リン酸化、エステル化等による誘導体とを含むが、これらに限られない。

[0023] 本発明の分離分析方法における、電気泳動法で分離された生体分子を固体支持体に不動化させるステップとは、サザンブロット法及びノザンブロット法のように、電気

泳動法で分離された生体分子を毛管現象や電気泳動を利用して分子篩物質からフィルター膜その他の固体支持体に移動させて、生体分子の分離パターンを保持しつつ該固体支持体に不動化させることをいう場合がある。あるいは、固体支持体を移動させながら電気泳動によって分子篩物質から溶出した生体分子を一定体積ずつ、あるいは、連続的に固体支持体に付着させることによって生体分子の分離パターンを実質的に保持しつつ固体支持体に不動化させることをいう場合がある。生体分子が固体支持体に不動化される原理には、架橋反応による共有結合及び静電気力が含まれるが、これらに限られない。

図面の簡単な説明

[0024] [図1](A)はDMSOを添加して、(B)は1, 2, 5-チアジアゾールを添加して、それぞれDNAをキャピラリー電気泳動及びパルスフィールドによって分離した結果を示す波形図。

[図2](A)はDMSOを添加して、(B)は1, 2, 5-チアジアゾールを添加して、それぞれDNAをキャピラリー電気泳動及びパルスフィールドによって分離した結果を示す波形図。

[図3](A)は尿素を添加して、(B)はホルムアルデヒドを添加して、(C)は1, 2, 5-チアジアゾールを添加して、それぞれRNAをキャピラリーゲル電気泳動によって分離した結果を示す波形図。

[図4](A)はDMSOを添加して、(B)は1, 2, 5-チアジアゾールを添加して、それぞれRNAをキャピラリーゲル電気泳動によって分離した結果を示す波形図。

[図5](A)はテトラヒドロフラン(Tetrahydrofuran, THF)を添加して、(B)は1, 2, 5-チアジアゾールを添加して、それぞれRNAをキャピラリーゲル電気泳動によって分離した結果を示す波形図。

[図6](A)はアセトニトリルを添加して、(B)は1, 2, 5-チアジアゾールを添加して、それぞれRNAをキャピラリーゲル電気泳動によって分離した結果を示す波形図。

[図7](A)はアセトン添加して、(B)は1, 2, 5-チアジアゾールを添加して、それぞれRNAをキャピラリーゲル電気泳動によって分離した結果を示す波形図。

[図8A]標準溶媒を利用して、蛍光標識PTHアミノ酸を高速液体クロマトグラフィでグ

ラジエント溶離により分離した結果を示す波形図。

[図8B] 1, 2, 5-チアジアゾールを添加した標準溶媒を利用して、蛍光標識PTHアミノ酸を高速液体クロマトグラフィでグラジエント溶離により分離した結果を示す波形図。

[図9] (A)は標準組成のゲル及びランニングバッファーを利用して、(B)はDMSOのみを添加したゲル及びランニングバッファーを利用して、(C)は1, 2, 5-チアジアゾールを添加したゲル及びランニングバッファーを利用して、それぞれを15～150kDaの分子量マーカータンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した結果を示す波形図。

発明を実施するための最良の形態

[0025] 以下に示す実施例によって本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の詳細な説明のために一例として示すものであり、これらの実施例によって本発明の範囲が制限されると理解するべきではない。

実施例 1

[0026] 1kb以上のDNAのキャピラリー電気泳動による分析

1, 2, 5-チアジアゾールを含む緩衝液として0.5X TBE (pH 8, 1)に溶解し、下記の表1にあるような組成比で分離溶媒を調整し、キャピラリー電気泳動の方法によりDNAの分離分析を行った結果、DNAの長さが9,000と10,000bp及び、14,000と15,000bpにおいてチアジアゾールを添加した場合に優れた分離を示した。図1におけるDNAの長さの帰属は図中の数字で示す。

サンプル: 1kb Molecular Ruler, BioRad (1 kb - 15 kb)

使用した分離溶媒の組成比

[0027] [表1]

	1,300k HEC /0.5X TBE(w/w)	DMSO(v/v)	1,2,5-チアジアゾール (v/v)
分離溶媒(A)	0.3 %	150/500	0
分離溶媒(B)	0.3 %	100/500	50/500

[0028] (注)分離溶媒全体に対しての重量比(w/w)または体積比(v/v)

キャピラリー電気泳動条件:50mmX50mm角柱キャピラリー、内部ポリアクリルアミド処理、有効長8cm、電場強度200V/cm(F) -100V/cm(B) 50Hz (パルスフィールド)

HEC:ヒドロキシエチルセルロース

実施例 2

[0029] DNAのキャピラリーゲル電気泳動による分離

1, 2, 5-チアジアゾールを含む緩衝液として、0.5XTBE緩衝液を、以下の表2にあるような組成比で作成し、キャピラリー電気泳動の方法によって分離を行った。サンプルとしてTakara100bpラダー、DNA MW Standard Maker, CodeNo. 3407A (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500bp)を使用した。標識試薬として、DNAにインタカレートするSYBR-GREENIIを溶媒の全量に対して1%(v/v)、あらかじめ混合した。

[0030] [表2]

	1% 1,300k HEC/0.5X TBE(w/w)	DMSO(v/v)	1,2,5-チアジアゾール
分離溶媒(A) (1mL)	800/1000	200/500	0
分離溶媒(B) (1mL)	800/1000	150/500	50/500

[0031] 分離溶媒(A)及び(B)による電気泳動の結果の波形図を図2の(A)及び(B)にそれぞれ示す。以下の表3は、DMSOのみを含む分離溶媒(A)を用いる条件と、チアジアゾールを含む分離溶媒(B)を用いる条件(カッコ内)とにおける700、800、900、1000及び1500bpのバンドの泳動時間、理論段数及び分離度を比較した結果をまとめたものである。チアジアゾールを含む分離溶媒(B)を用いる条件のほうがDMSOのみを含む分離溶媒(A)を用いる条件より泳動時間は短く、理論段数及び分離度は上回っていた。

[0032] [表3]

	泳動時間(min)	理論段数	分離度
700 bp	11.31(12.04)	90,962(57,984)	
800 bp	11.67(12.32)	128,936(84,031)	2.57(1.513)
900 bp	11.92(12.53)	115,988(98,125)	1.85(1.272)
1000 bp	12.08(12.68)	138,155(75,164)	1.18(0.869)
1500 bp	12.41(13.00)	145,806(88,293)	2.53(1.778)

実施例 3

[0033] RNAのキャピラリーゲル電気泳動による分離(1)

分離溶液として4M尿素を含むの緩衝液を含むHECポリマー緩衝溶液を利用した分離分析(A)及びホルムアルデヒドを含むHECポリマー溶液(B)、及び、ホルムアルデヒドと1, 2, 5-チアジアゾールを含むHECポリマー緩衝液(C)を用いてRNAのサイズマーカー(表4の注を参照せよ。)を前処理を行わずに分離した結果を図3に示す。RNAの分離について、1, 2, 5-チアジアゾールを添加した分離溶媒を利用した場合に優れた分離結果を得た。加えて、検出強度は約2倍であった。

[0034] [表4]

	1,300k HEC / 0.5X TBE (w/w)	ホルムアルデヒド (w/w)	尿素 (w/w)	1,2,5-チアジアゾール (w/w)
分離溶媒(A)	0.8 %	0	6.6%(2M)	0
分離溶媒(B)	0.8 %	6.6% (2.2M)	0	0
分離溶媒(C)	0.8 %	6.6% (2.2M)	0	5%

[0035] (注)分離溶媒全体に対しての重量比(w/w)または体積比(v/v)

分離条件:50mmX50mm角柱キャピラリー、内部ポリアクリルアミド処理、電場強度100V/cm、有効長8cm、インジェクション1秒

図2におけるそれぞれのピークにおけるRNAの長さの帰属は1:100, 200 nt, 2: 300 nt, 3: 400nt, 4: 500nt, 5: 600 nt, 6: 800 nt, 7: 1,000 nt, 8: 1,500 nt, 9: 2,000 nt, 10: 3,000 nt, 11: 4

, 000 nt, 12: 6, 000 ntである。

RNAサンプル: Perfect RNA Markers 0.1–1 kb, Perfect RNA Markers 0.2–10 kb (Novagen, Merck Bioscience, USA)

実施例 4

[0036] RNAのキャピラリーゲル電気泳動による分離(2)

実施例3と同様の実験において、分離溶媒を以下の表5に示す組成比にし、RNAの分離実験を行った結果を図4に示す。1, 2, 5-チアジアゾールを添加した分離溶媒を利用した場合に明らかに優れた分離と検出感度を得た。

[0037] [表5]

	250 k HEC / 0.5X TBE (w/w)	DMSO (w/w)	1,2,5-チアジアゾール(w/w)
分離溶媒(A)	0.8 %	20 %	0
分離溶媒(B)	0.8 %	20 %	5%

[0038] (注) 分離溶媒全体に対しての重量比 (w/w) または体積比 (v/v)

実施例 5

[0039] RNAのキャピラリーゲル電気泳動による分離(3)

実施例3と同様の実験において、分離溶媒を以下の表6に示す組成比にし、RNAの分離実験を行った結果を図5に示す。1, 2, 5-チアジアゾールを添加した分離溶媒を利用した場合に明らかに優れた分離と検出感度を得た。

[0040] [表6]

	250 k HEC / 0.5X TBE (w/w)	テトラヒドロフラン(THF) (w/w)	1,2,5-チアジアゾール (w/w)
分離溶媒(A)	0.8%	20%	0
分離溶媒(B)	0.8 %	20%	5%

[0041] (注) 分離溶媒全体に対しての重量比 (w/w) または体積比 (v/v)

実施例 6

[0042] RNAのキャピラリーゲル電気泳動による分離(4)

実施例3と同様の実験において、分離溶媒を以下の表7に示す組成比にし、RNAの分離実験を行った結果を図6に示す。1, 2, 5-チアジアゾールを添加した分離溶媒を利用した場合に明らかに優れた分離と検出感度を得た。

[0043] [表7]

	250 k HEC / 0.5X TBE (w/w)	アセトニトリル (w/w)	1,2,5-チアジアゾール (w/w)
分離溶媒(A)	0.8 %	20%	0
分離溶媒(B)	0.8 %	20%	5%

実施例 7

[0044] RNAのキャピラリーゲル電気泳動による分離(5)

実施例3と同様の実験において、分離溶媒を以下の表8に示す組成比にし、RNAの分離実験を行った結果を図7に示す。1, 2, 5-チアジアゾールを添加した分離溶媒を利用した場合に明らかに優れた分離と検出感度を得た。

[0045] [表8]

	250 k HEC / 0.5X TBE (w/w)	アセトン(w/w)	1,2,5-チアジアゾール (w/w)
分離溶媒(A)	0.8 %	20%	0
分離溶媒(B)	0.8 %	20%	5%

実施例 8

[0046] 蛍光標識PTHアミノ酸の高速液体クロマトグラフィによる分離

高速液体クロマトグラフィー(HITACHI L-2200, L-2350, L-2400, L-2130)を使用して、サンプルとして和光ケミカルPTH-アミノ酸(アミノ酸分析用、169-12273 PTH-aminoAcids Mixture standard)を使用して、以下に示す溶出液を利用して分析を行った。

グラジエント: 溶離液A/B 0/100 → 45min 60/40 → 60min 60/40

Oven: 40°C

Injection: 5ul

Column: Xterra MS C18 2.5um 4.6x50mm

Detection: UV 254 nm

Flow Rate: 1 ml/min

標準溶媒(A)及び1, 2, 5-チアジアゾールを添加した標準溶媒(B)を利用して、それぞれ蛍光標識PTHアミノ酸を高速液体クロマトグラフィでグラジエント溶離により分離した結果を図8に示す。図8の波形図のピークの1ないし20の帰属は以下のとおりである。

- 1: PTH-Histidine, PTH-Asparagine
- 2: PTH-Serine
- 3: PTH-Glycine
- 4: PTH-Arginine
- 5: PTH-Glutamine
- 6: PTH-Threonine
- 7: PTH-Cysteine
- 8: PTH-Alanine, PTH-Glutamic Acid
- 9: PTH-Am-I
- 10: PTH-Am-II
- 11: PTH-Tyrosine
- 12: PTH-Aspartic Acid
- 13: PTH-Proline
- 14: PTH-Valine, PTH-Methionine
- 15: PTH-Norv
- 16: PTH-Tryptophan, PTH-Isoleucine
- 17: PTH-Phenylalanine
- 18: PTH-Leucine
- 19: PTH-Norl
- 20: PTH-Lysine

図8A及びBに示すとおり、PTHアミノ酸の保持時間は1, 2, 5-チアジアゾールを添加した標準溶媒のほうが標準溶媒よりも短く、ピークにおけるS/N比が優れていた。

実施例 9

[0047] タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離

1, 2, 5-チアジアゾールを含むゲルを、以下の表9にあるような組成比で作成し、1, 2, 5-チアジアゾールを含む緩衝液として、1X Tris-Glycine-SDS緩衝液を、以下の表10にあるような組成比で作成し、平板ゲル電気泳動の方法によって以下の表11に示す電気泳動条件で分離を行った。サンプルとしてProtein Molecular Marker Precise Ladder(amResco)を使用した。SDS-PAGEを行い、染色を行った画像をデジタルカメラ(FinePix F10、FUJI FILM)で取り込み、Matlabソフトウェアを利用して画像の強度を評価することによって定量化を行った。

[0048] [表9]

	Acrylamide gel (Running gel)	DMSO(v/v)	1,2,5-チアジアゾール
分離ゲル(A)	12.5%	0	0
分離ゲル(B)	12.5%	0.5ml/10.005ml	0
分離ゲル(C)	12.5%	0.5ml/10.005ml	0.05ml/10.005

[0049] [表10]

	DMSO(v/v)	1,2,5-チアジアゾール
泳動バッファー (A)	0	0
泳動バッファー(B)	20%	0
泳動バッファー(C)	20%	2%

[0050] [表11]

電気泳動条件

	電圧	泳動時間
分離ゲル(A)	100V	80 分
分離ゲル(B)	100V	150 分
分離ゲル(C)	100V	150 分

[0051] 泳動結果の波形図を図9に示し、(1)～(7)の各ピークの幅及び強度を以下の表12に泳動条件ごとに比較した結果を示す。これらの結果から、チアジアゾールを添加した緩衝液での各バンドの凝集及び絶対強度が優れ、高い分解能を得た。

[0052] [表12]

Peak width

(A)

	Gel (A); (pixel)	Gel (B); (pixel)	Gel (C); (pixel)
(1) 15 kDa	33	31	28
(2) 25 kDa	38	38	37
(3) 35 kDa	25	18	17
(4) 50 kDa	29	35	27
(5) 75 kDa	20	25	15
(6) 100 kDa	27	28	20
(7) 150 kDa	22	26	13

Peak intensity

(B)

	Gel (A)	Gel (B)	Gel (C)
(1) 15 kDa	1396	851	3075
(2) 25 kDa	1928	812	2194
(3) 35 kDa	682	407	1036
(4) 50 kDa	3446	2524	4267
(5) 75 kDa	2404	1889	3449
(6) 100 kDa	1687	1575	3587
(7) 150 kDa	1506	1089	4576

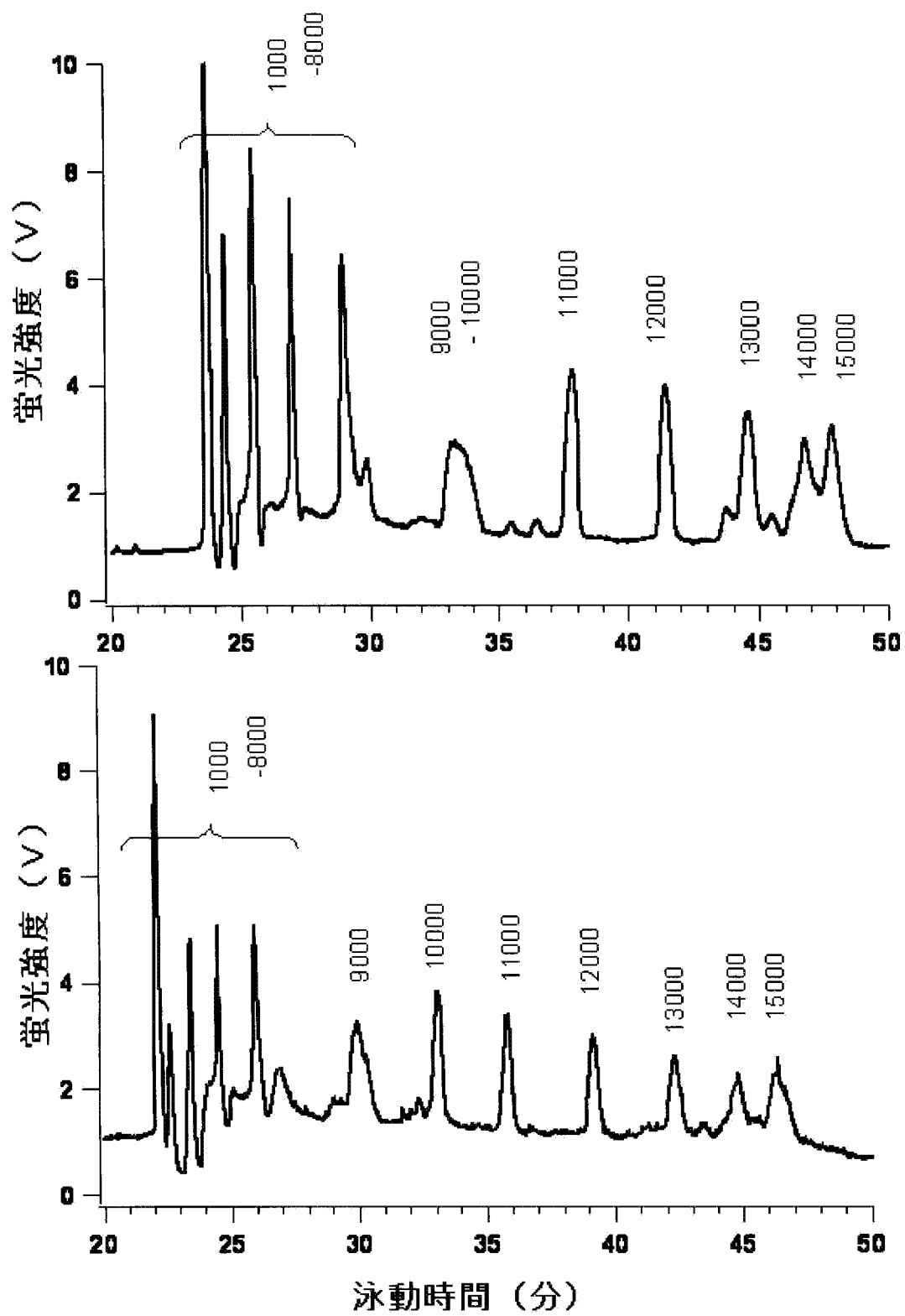
[0053] 以上の実施例から、本発明には以下の長所がある。すなわち、チアジアゾールを含む溶媒に生体分子を可溶化するステップを含む生体分子の分離分析方法及びチアジアゾールを含む生体分子の分離分析用液体組成物は、従来の分離分析方法及び生体分子の分離分析用液体組成物と比較するとより短時間に分析を実行することができ、理論段数及び／又は分離度が優れている。アミノ酸分析法においては、保持時間が短く、S/N比が優れており、タンパク質のSDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法においても各バンドの凝集及び絶対強度が優れ、高い分解能が得られた。

請求の範囲

- [1] チアジアゾールを含む溶媒に生体分子を可溶化するステップを含むことを特徴とする生体分子の分離分析方法。
- [2] 前記溶媒に可溶化された生体分子を電気泳動法で分離するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の分離分析方法。
- [3] 前記電気泳動法はキャピラリー電気泳動法であることを特徴とする請求項2に記載の分離分析方法。
- [4] 前記電気泳動法で分離された生体分子を固体支持体に不動化させるステップを含むことを特徴とする請求項2又は3に記載の分離分析方法。
- [5] 前記溶媒に可溶化された生体分子をクロマトグラフィー法で分離するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の分離分析方法。
- [6] 前記クロマトグラフィー法は液体クロマトグラフィー法であることを特徴とする請求項5に記載の分離分析方法。
- [7] 前記液体クロマトグラフィー法は高速液体クロマトグラフィー法であることを特徴とする請求項6に記載の分離分析方法。
- [8] 前記生体分子は核酸、タンパク質、ペプチド、アミノ酸又はこれらの誘導体であることを特徴とする請求項1ないし7のいずれかに記載の分離分析方法。
- [9] 前記チアジアゾールは、1, 2, 5-チアジアゾールであることを特徴とする請求項1ないし8のいずれかに記載の分離分析方法。
- [10] チアジアゾールを含むことを特徴とする生体分子の分離分析用液体組成物。
- [11] 前記分離分析は電気泳動法によって実施されることを特徴とする請求項10に記載の分離分析用液体組成物。
- [12] 前記分離分析はキャピラリー電気泳動法によって実施されることを特徴とする請求項11に記載の分離分析用液体組成物。
- [13] 前記分離分析はクロマトグラフィー法によって実施されることを特徴とする請求項10に記載の分離分析用液体組成物。
- [14] 前記クロマトグラフィー法は液体クロマトグラフィー法であることを特徴とする請求項13に記載の分離分析用液体組成物。

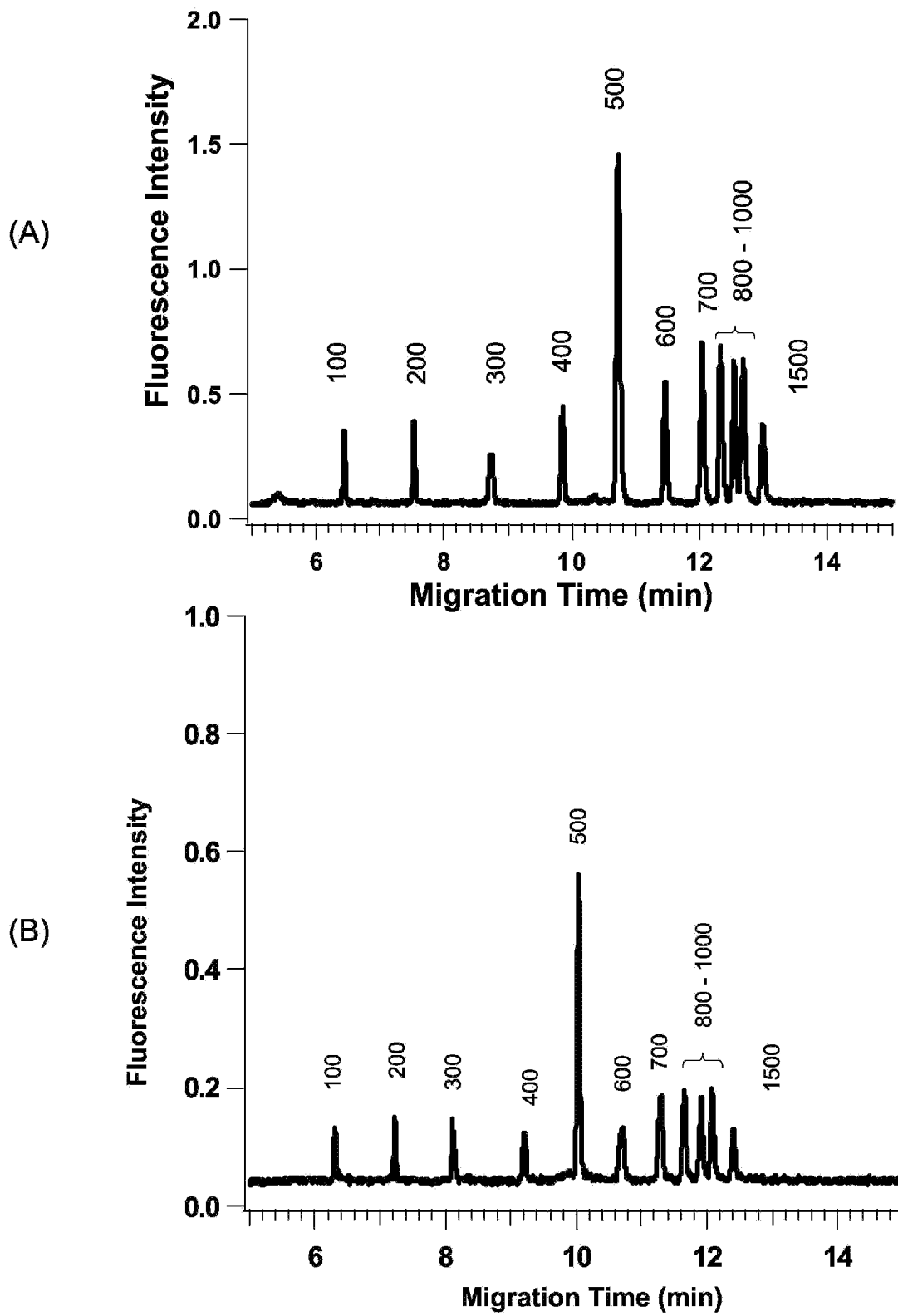
- [15] 前記液体クロマトグラフィー法は高速液体クロマトグラフィー法であることを特徴とする請求項14に記載の分離分析用液体組成物。
- [16] 前記生体分子は核酸核酸、タンパク質、ペプチド、アミノ酸又はこれらの誘導体であることを特徴とする請求項10ないし15のいずれかに記載の分離分析用液体組成物。
- [17] 前記チアジアゾールは、1, 2, 5-チアジアゾールであることを特徴とする請求項10ないし16のいずれかに記載の分離分析用液体組成物。
- [18] 請求項10ないし17のいずれかに記載の分離分析用液体組成物を含むことを特徴とする生体分子分離分析用キット。

[図1]

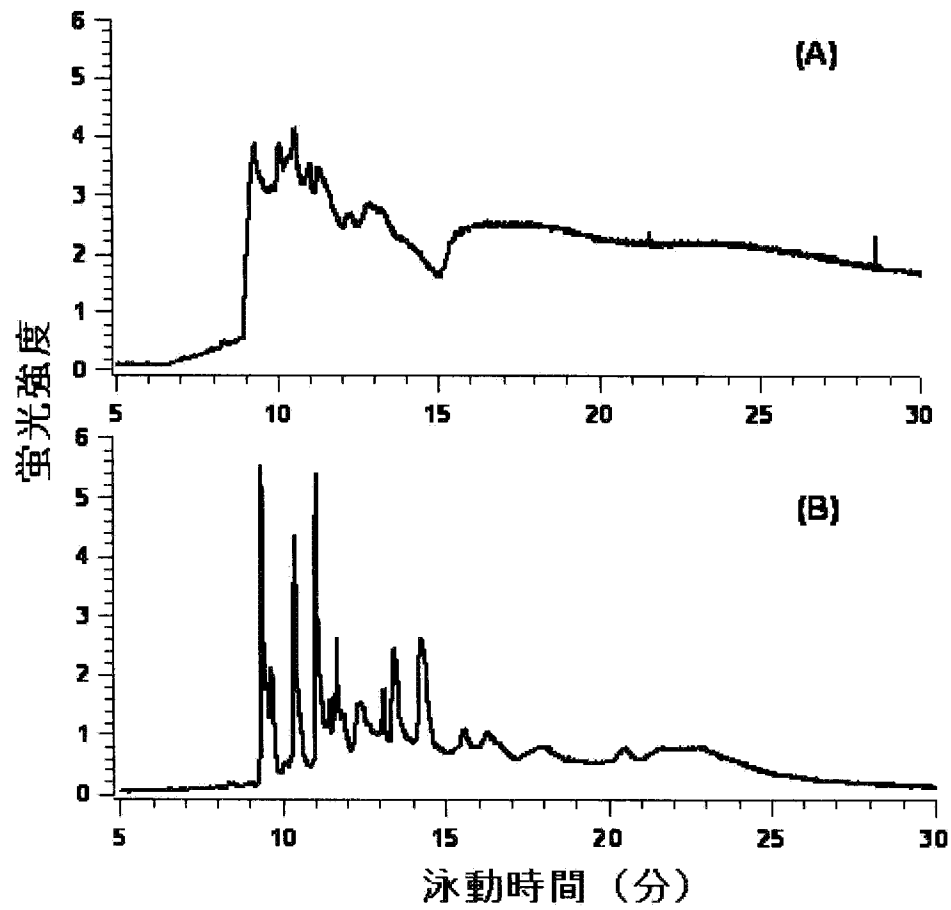


[図2]

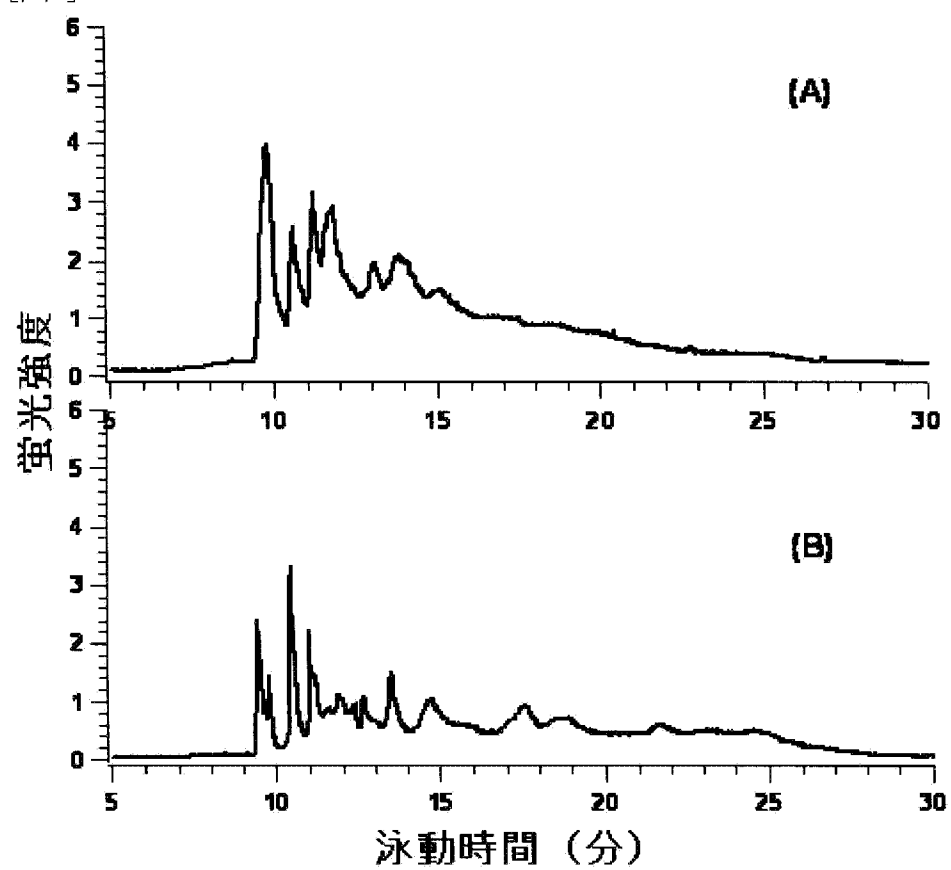
DNA Separation



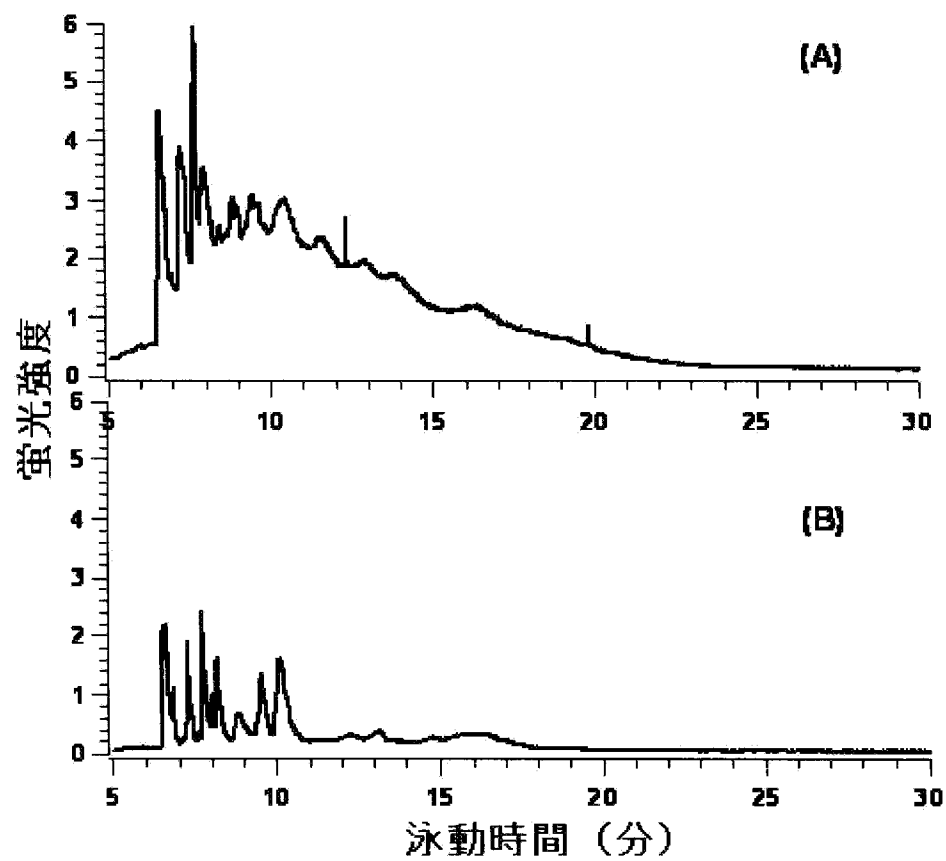
[図4]



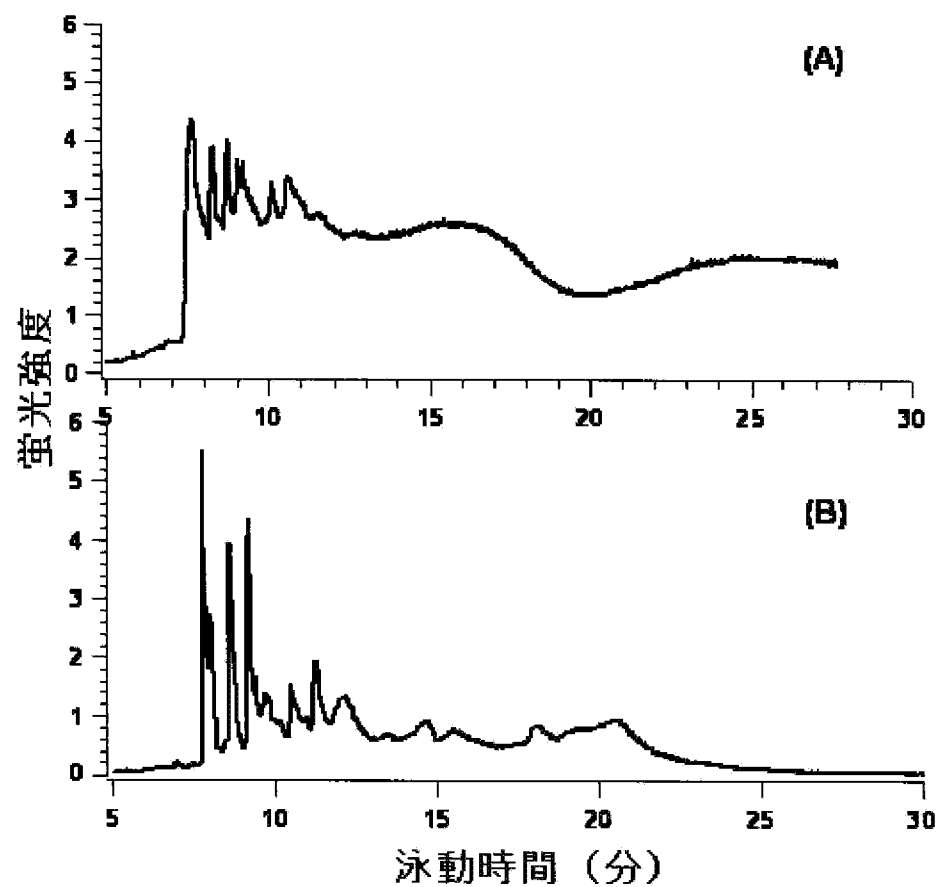
[図5]



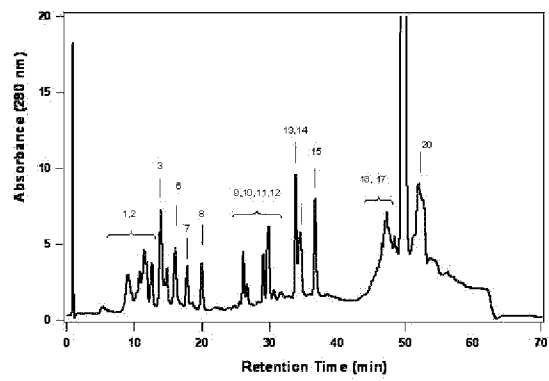
[図6]



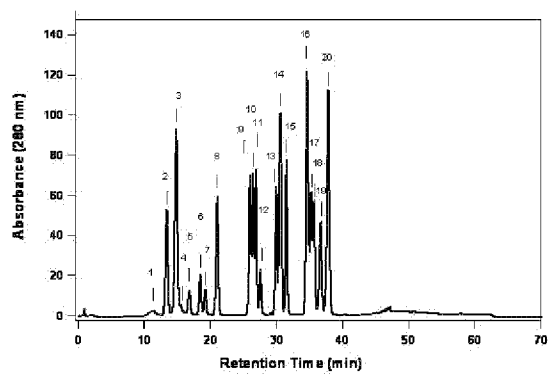
[図7]



[図8A]

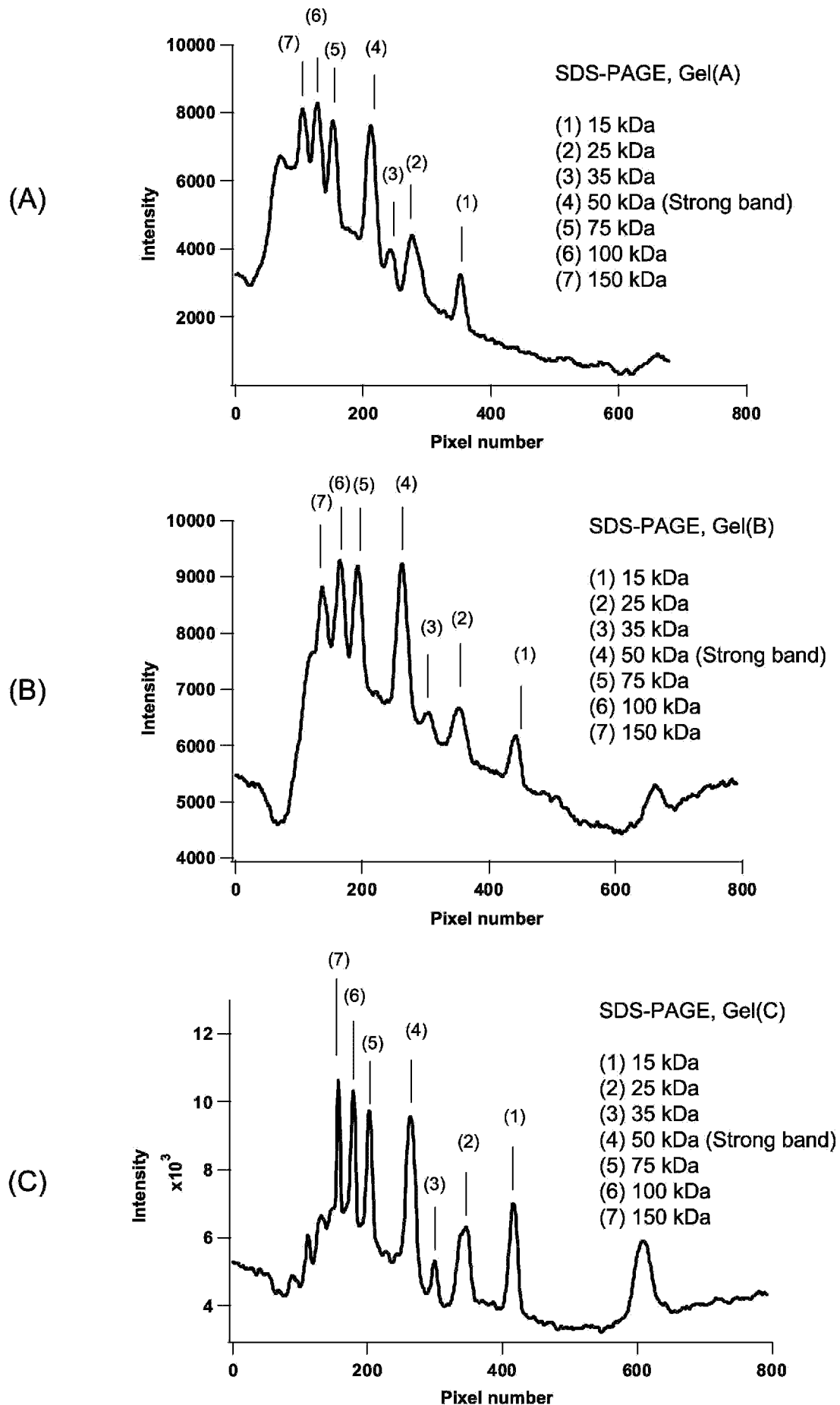


[図8B]



[図9]

Protein Separation



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/065602

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/447(2006.01) i, G01N30/26(2006.01) 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)

G01N27/447, G01N30/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), JSTPLUS (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2005-211889 A (Waseda University), 11 August, 2005 (11.08.05), Claims; Par. Nos. [0016] to [0022], [0026] to [0028], [0038], [0048] & US 2006/0287533 A1	1, 5-10, 13-18 2-4, 11-12
Y	JP 2005-003562 A (Hitachi High-technologies Corp.), 06 January, 2005 (06.01.05), Par. Nos. [0011] to [0018] (Family: none)	2-4, 11-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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 another 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
09 September, 2008 (09.09.08)

Date of mailing of the international search report
22 September, 2008 (22.09.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））
Int.Cl. G01N27/447 (2006.01) i, G01N30/26 (2006.01) i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N27/447, G01N30/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 8 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus (STN), JSTPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2005-211889 A（学校法人早稲田大学）2005.08.11, 【特許請求の範囲】, 段落【0016】－【0022】, 【0026】－【0028】, 【0038】, 【0048】 & US 2006/0287533 A1	1, 5-10, 13-18 2-4, 11-12
Y	JP 2005-003562 A（株式会社日立ハイテクノロジーズ）2005.01.06, 段落【0011】－【0018】 （ファミリーなし）	2-4, 11-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 9 . 0 9 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 9 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

河野 隆一郎

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J

3 7 0 8