(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3613032号
(P3613032)
(45)発行日　平成17年1月26日(2005.1.26)　(24)登録日　平成16年11月5日(2004.11.5)

(51)Int.Cl.[7]　F I
G01N 27/447　G01N 27/26　３２５Ａ
G01N 21/64　G01N 21/64　Ｂ
G01N 27/26　３１５Ｋ
G01N 27/26　３３１Ｋ

請求項の数 8　(全 16 頁)

(21)出願番号　特願平10-303614
(22)出願日　平成10年10月26日(1998.10.26)
(65)公開番号　特開2000-131282(P2000-131282A)
(43)公開日　平成12年5月12日(2000.5.12)
審査請求日　平成14年12月17日(2002.12.17)

(73)特許権者　000005108
株式会社日立製作所
東京都千代田区丸の内一丁目６番６号
(74)代理人　100075096
弁理士　作田　康夫
(72)発明者　穴沢　隆
東京都国分寺市東恋ケ窪一丁目２８０番地
株式会社日立製作所中央研究所内
(72)発明者　永井　啓一
東京都国分寺市東恋ケ窪一丁目２８０番地
株式会社日立製作所中央研究所内

審査官　野村　伸雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】キャピラリーアレイ電気泳動装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

蛍光標識された試料を泳動分離する、同一の平面上に配列された複数キャピラリーと、
前記複数キャピラリーを走査するレーザビームを生じるレーザ光源と、
前記蛍光標識された試料から発する蛍光を検出する蛍光検出系とを具備し、
前記レーザビームは、前記レーザビームと前記平面とのなす角度であるθ_0の最大値が９０°以下となる方向から照射されるものであり、
前記蛍光検出系は、前記平面となす角度であるθ_3が９０°以下となる方向から、前記蛍光を検出するものであり、
前記蛍光検出系の有効開口径をＤ、前記有効開口の中心位置と前記各キャピラリーに前記レーザビームが照射される位置との間の距離をｄとして、$\theta_0 < \theta_3 - tan^{-1}(D/2d)$の関係式が満たされることを特徴とするキャピラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項２】

前記蛍光検出系は対物レンズを具備し、前記対物レンズは、中心軸が前記平面と前記θ_3の角度をなし、かつ前記Dを前記対物レンズの有効開口径とし、前記対物レンズの焦点距離であるｆが前記ｄと同一であることを特徴とする請求項１に記載のキャピラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項３】

蛍光標識された試料を泳動分離する、同一の平面上に配列された複数キャピラリーと、
前記複数キャピラリーを走査するレーザビームを生じるレーザ光源と、

前記蛍光標識された試料から発する蛍光を検出する蛍光検出系とを具備し、
前記レーザビームは、前記レーザビームと前記平面とのなす角度であるθ_0の最大値が９０°以下となる方向から照射されるものであり、
前記蛍光検出系は、有効開口角をθ_2とする対物レンズを有し、かつ前記平面となす角度であるθ_3が９０°以下となる方向から、前記蛍光を検出するものであり、
前記蛍光検出系の有効開口径をＤ、前記有効開口の中心位置と前記各キャピラリーに前記レーザビームが照射される位置との間の距離をｄと等しい、前記対物レンズの焦点距離をｆとして、$\theta_0 < 180° - \theta_3 - tan^{-1}(D/2f)$の関係式が満たされ、前記レーザビームは、前記対物レンズを透過し、かつ$\theta_0 \sim \theta_3 - (\theta_2/2)$を満たすことを特徴とするキャピラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項４】
蛍光標識された試料を泳動分離する、同一の平面上に配列された複数キャピラリーと、
前記複数キャピラリーを走査するレーザビームを生じるレーザ光源と、
前記蛍光標識された試料から発する蛍光を検出する蛍光検出系とを具備し、
前記レーザビームは、前記レーザビームと前記平面とのなす角度であるθ_0の最大値が９０°以下となる方向から照射されるものであり、
前記蛍光検出系は、前記平面となす角度であるθ_3が９０°以下となる方向から、前記蛍光を検出するものであり、
前記蛍光検出系の有効開口径をＤ、前記有効開口の中心位置と前記各キャピラリーに前記レーザビームが照射される位置との間の距離をｄとして、$\theta_0 > \theta_3 + tan^{-1}(D/2d)$の関係式が満たされることを特徴とするキャピラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項５】
前記蛍光検出系は対物レンズを具備し、前記対物レンズは、中心軸が前記平面と前記θ_3の角度をなし、かつ前記Dを前記対物レンズの有効開口径とし、前記対物レンズの焦点距離であるｆが前記ｄと同一であることを特徴とする請求項４に記載のキャピラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項６】
前記複数キャピラリーの一部に設けられ、前記レーザビームが照射されて、かつ前記蛍光が検出される蛍光検出部が、透明液体、又は透明固体で満たされていることを特徴とする請求項１から請求項５の何れかに記載のキャピラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項７】
前記走査の一回の時間をt_1とし、
前記蛍光の検出の時間をt_2とし、
前記t_1は前記t_2以下となるものであることを特徴とする請求項１から請求項６の何れかに記載のキャピラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項８】
前記レーザビームの走査の幅と、前記複数キャピラリーの幅とが一致していることを特徴とする請求項１、請求項３、及び請求項４のいずれかに記載のキャピラリーアレイ電気泳動装置。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】
本発明は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、蛋白質等の分離分析装置に関し、特に、ＤＮＡ、ＲＮＡの塩基配列決定、個体の塩基配列の多様性に基づく制限酵素断片の多型性の計測に有効なキャピラリーアレイ電気泳動装置に関する。

【０００２】

【従来の技術】
ＤＮＡ、ＲＮＡ等の分析技術は、遺伝子解析、遺伝子診断を含む医学、生物学の分野でますます重要になってきている。特に最近では、ゲノム解析計画に関連して、高速、高スループットのＤＮＡ解析装置の開発が進んでいる。

【０００３】
ＤＮＡ解析は、蛍光標識された試料をゲル電気泳動により分子量分離し、蛍光標識をレーザで誘起される蛍光を検出して行う。ゲル電気泳動には、アクリルアミドを間隔０．３ｍｍ程度の２枚のガラス板の間に重合させた平板ゲルが広く使用されている（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　６、８１６（１９８８））。平板ゲルの上端に注入された試料は、平板ゲルの上下端に印加される電界により分子量分離されながら下端方向に泳動される。一定距離だけ泳動された位置をレーザで平板ゲルの側面より全泳動路を一度に照射し、レーザ照射部を通過する蛍光標識された試料の分離成分を励起する。一定時間間隔で、連続して周期的に蛍光標識から蛍光の計測を行う。この結果を解析してＤＮＡ塩基配列を決定している。

【０００４】
最近では、平板ゲルに替わり、溶融石英製毛細管内にゲルを重合させたキャピラリーゲルが使用されるようになった。キャピラリーゲル電気泳動は、スラブゲル電気泳動と比較して大きな電界を印加できるため、高速分析が可能な方法として注目を集めている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　６２、９００（１９９０））。通常、キャピラリーゲル電気泳動装置では、１本のキャピラリー管を用い、その下端近傍のキャピラリー中をレーザ照射し、蛍光検出するオンカラム計測を行っている。キャピラリーの外表面全体はポリイミドコーティングがされているので、蛍光を検出する位置のコーティングを除去してガラスが露出した窓にしておく（ＵＳＰ５３１２５３５）。この窓位置にレーザを照射することにより、キャピラリー内部を泳動する蛍光標識された試料の分離成分がビームを通過する際に励起され、蛍光標識からの蛍光を計測し、解析してＤＮＡ塩基配列を決定している。

【０００５】
しかし、上記のオンカラム計測装置では、レーザビームのキャピラリー表面での散乱が大きく、１度に１本のキャピラリーしか扱えず、スループットが上がらないという難点があった。最近、キャピラリー複数本をアレイ化して多くの試料を同時に高速分析する高スループットなキャピラリーアレイ電気泳動装置が複数例報告されている。

【０００６】
第１の報告例は、キャピラリーアレイスキャン方式（Ｎａｔｕｒｅ、３５９、１６７（１９９２））である。複数キャピラリーを１本毎に順番にレーザ照射し、オンカラム蛍光計測している。複数キャピラリーの蛍光検出位置を水平且つ平面状に並べ、平面と直交する方向からレンズで集光したレーザビームをキャピラリーアレイ中の１本のキャピラリーに照射し、蛍光をレーザビーム光源側より同じ集光レンズを用いて検出する。キャピラリーアレイの平面配置部分を、各キャピラリーの軸に垂直方向に往復繰り返し移動させて、各キャピラリーへのレーザ照射と蛍光検出を順次行う。レーザ照射系、及び蛍光受光光学系は固定である。レーザビームがキャピラリー中で最も絞られる位置と蛍光計測器に入射する光源位置が一致する共焦点構造とし、１本毎のキャピラリーを独立に計測してる。

【０００７】
第２の報告例は、マルチシースフロー方式（Ｎａｔｕｒｅ、３６１、５６５－５６６（１９９３）、特開平０６－１３８０３７号公報）である。平面状に並べられたキャピラリーアレイの下端を緩衝液中に鉛直に浸し、ゲル電気泳動により分離された試料成分を緩衝液中に溶出させ、キャピラリーの存在しない部分をレーザ照射して蛍光検出する。また、緩衝液を泳動方向にゆっくり流すことによって、異なるキャピラリーゲルから溶出された分離成分が緩衝液中で互いに混合したり、又は１本のキャピラリーゲルの中で分離されていた２つの成分が緩衝液中で混合しないようにしている。キャピラリーアレイの出口近傍の、キャピラリーの存在しない緩衝液部分をレーザ照射して、キャピラリー表面でのレーザビーム散乱の問題を回避し、複数キャピラリーから溶出された成分を一括して励起し、同時に蛍光検出できる。蛍光検出はキャピラリーアレイの平面に対して垂直方向より２次元カメラにより一括して行う。

【０００８】

第３の報告例は、レーザビーム拡大方式（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、６６、１４２４－１４３１（１９９４））である。複数キャピラリーの蛍光検出部を水平且つ平面状に並べ、キャピラリーの軸に対して４５°の角度の方向からレーザビームを照射する。この際、レーザビームをシリンドリカルレンズによりキャピラリーの軸に対して垂直方向に拡大し、全てのキャピラリーを同時に照射する。蛍光検出はキャピラリーアレイの平面に対して垂直方向より２次元カメラにより一括して行う。

【０００９】

第４の報告例はマルチフォーカス方式（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、６８、２６９９－２７０４（１９９６））である。複数キャピラリーの蛍光検出部を平面状に並べ、レーザビームを平面の側方より各キャピラリーの中心を透過するように照射する。レーザビームは、各キャピラリーの集光作用により繰り返し集光され、キャピラリーアレイから発散しないため、全キャピラリーを同時に照射できる。蛍光検出はキャピラリーアレイの平面に対して垂直方向より２次元カメラにより一括して行う。

【００１０】

【発明が解決しようとする課題】

キャピラリーにレーザビームを直接照射して蛍光検出を行うオンカラム計測では、レーザビームのキャピラリーの外表面、内表面での反射が蛍光検出系に入射し、蛍光計測の最も大きな背景光になる。十分絞ったレーザビームをキャピラリーの軸に対して垂直に入射し、レーザビームとキャピラリーの軸で形成される平面に対して垂直方向から蛍光計測する場合、蛍光検出系に入射するレーザ反射強度は、レーザ入射強度を１とした場合10^{-3}程度になる。レーザ入射と同一方向より蛍光計測する場合、蛍光検出系に入射するレーザ反射強度は10^{-2}程度になる。これに対して、キャピラリー内部に充填された分離媒体によるレーザ散乱の内、蛍光検出系に入射するレーザ散乱強度は10^{-5}程度である。即ち、レーザ反射強度はレーザ散乱強度と比較して２桁から３桁大きく、蛍光計測の背景光の最大要因である。

【００１１】

キャピラリーアレイスキャン方式では、レーザ照射と蛍光計測をキャピラリー１本毎に順番に行うため、１本あたりの蛍光検出時間が通常のオンカラム計測と比較して減少する。ｎ本のキャピラリーアレイを扱った場合、１本当りの蛍光検出時間は、最大で１／ｎ、実際には試料の分離成分が通過しないキャピラリーのガラス部分もスキャンされるので１／ｎ以下になる。試料の電気泳動パターンの隣接するピークの時間間隔は高速分析になる程小さくなるが、この時間間隔に対して、１回のスキャンに要する時間が無視できない程大となると、電気泳動パターンの分離能が低下する問題が生じる。

【００１２】

キャピラリーアレイスキャン方式では、スキャンするための可動部が大きく、その移動距離が大きいため、スキャン速度をあまり大きくできない上、故障が多発する構造となっている。また、各キャピラリーからの信号を独立して処理するため、即ち、１回の蛍光検出時間内に得られる信号が１本のキャピラリーからの信号に対応するため、スキャン速度をあまり大きくできない。これらの理由により、現状のスキャン速度は１Ｈｚ程度になっている。また、各キャピラリーの軸に対してレーザビームを垂直に入射し、入射方向と同一方向から蛍光検出するため、キャピラリー表面でのレーザ反射光の多くが蛍光検出系に入射する。上記で説明したように、そのレーザ反射強度は非常に大きいため、蛍光計測の背景光が上昇し検出感度が低下する問題が生じる。

【００１３】

マルチシースフロー方式の問題点は、分子量分離された成分から得られる蛍光強度が、オンカラム蛍光計測の場合と比較して、分子量が大となる程小さくなる点にある。この問題は次のような理由から生じる。キャピラリーゲルの下端より緩衝液中に溶出さた分離成分が緩衝液中で拡散等により、混合しないようにするためには、緩衝液を泳動方向に一定速度以上で定常的に流す必要がある。一方、キャピラリーゲル中を分子量分離されながら泳動する試料成分の泳動速度は、その分子量が大きい程、即ち、ＤＮＡの塩基長が大きい程

小さくなる。緩衝液のフロー速度に対して、成分のキャピラリーゲル中での泳動速度が小さい程、その試料成分は、キャピラリーゲルから緩衝液中に溶出する際に泳動方向に大きく引き伸ばされることになる。その結果、蛍光強度が小さくなり検出感度が低下する原因となる。

【００１４】

レーザビーム拡大方式では、各キャピラリーを均一なレーザ強度で照射するため、キャピラリーの軸と垂直方向へのレーザビームの拡大幅をキャピラリーアレイの幅に比較してずっと大きくする必要がある。この理由は、レーザビームの強度分布がビームの中心軸を中心としたガウス分布であるためである。例えば、レーザ拡大幅とキャピラリーアレイ幅が等しい場合、キャピラリーアレイの両端のキャピラリーのレーザ照射強度は中心のキャピラリーの１４％程度になる。各キャピラリー間の照射レーザ強度の変化を１０％以下にするには、レーザ拡大幅をキャピラリーアレイ幅の４倍以上にする必要がある。レーザ拡大幅を大とする程、各キャピラリーのレーザ照射強度は低下し、蛍光検出感度が低下する。これを防ぐため、通常用いられているレーザ光源よりも高出力なレーザ光源を用いる必要がある。これは装置の大型化、高価格化につながる。

【００１５】

マルチフォーカス方式では、レーザビームがキャピラリーアレイを透過する際、レーザビームが各キャピラリーの外表面、内表面で反射するが、これらの反射光の一部が蛍光検出系に入射する。上記で説明したように、そのレーザ反射強度は非常に大きいため、蛍光計測の背景光が上昇し検出感度が低下する問題が生じる。　本発明の目的は、レーザビームのみをスキャンして、蛍光検出系をスキャンすることなく全キャピラリーからの蛍光を一括して計測するオンカラム蛍光計測を行い、上記の種々の問題を解決可能なキャピラリーアレイ電気泳動装置を提供することにある。

【００１６】

【課題を解決するための手段】

本発明のキャピラリーアレイ電気泳動装置は、蛍光標識された試料を泳動分離する複数キャピラリーと、同一の平面上に配列された複数キャピラリーの一部に設けられ、複数キャピラリーの一部にレーザビームが走査されて照射され蛍光標識から発する蛍光が検出される蛍光検出部と、蛍光を検出する蛍光検出系とを具備する。

【００１７】

第１の構成では、レーザビームの蛍光検出部の１回の走査時間をt_1として、レーザビームを走査して蛍光検出部を複数回繰り返し照射して、蛍光を蛍光検出系により検出時間t_2（但し、$t_1 \leqq t_2$）で検出することに特徴があり、この構成に於いて、レーザビームと各キャピラリーが配列した平面とのなす角度の最大値が$\theta_0 \leqq 90°$となる方向からレーザビームを照射すること、蛍光検出系は対物レンズを含むことにも特徴がある。

【００１８】

第２の構成では、レーザビームと各キャピラリーが配列した平面とのなす角度の最大値が$\theta_0 \leqq 90°$となる方向からレーザビームを照射し、レーザビームの蛍光検出部の１回の走査時間をt_1として、レーザビームを走査して蛍光検出部を複数回繰り返し照射して、各キャピラリーが配列した平面となす角度が$\theta_3 \leqq 90°$となる方向から、蛍光を蛍光検出系により検出時間t_2で検出し、蛍光検出系の有効開口径をＤ、有効開口の中心位置と各キャピラリーにレーザビームが照射される位置との間の距離をｄとする時、関係式、$t_1 \leqq t_2$、及び、$\theta_0 < \theta_3 - \tan^{-1}(D/2d)$、が満足されることに特徴があり、この構成於いて、蛍光検出系は対物レンズを具備し、対物レンズの中心軸が、各キャピラリーが配列した平面と角度$\theta_3 \leqq 90°$だけなしており、対物レンズの有効開口径がＤであり、対物レンズの焦点距離をｆとする時、ｄ＝ｆであることにも特徴がある。

【００１９】

第３の構成では、レーザビームと各キャピラリーが配列した平面とのなす角度の最大値が$\theta_0 \leqq 90°$となる方向からレーザビームを照射し、レーザビームの蛍光検出部の１回の走査時間をt_1として、レーザビームを走査して蛍光検出部を複数回繰り返し照射して、

対物レンズの中心軸が各キャピラリーの軸と角度$\theta_3 \leqq 90°$だけなし、蛍光を蛍光検出系により検出時間t_2で検出し、有効開口の中心位置と各キャピラリーにレーザビームが照射される位置との間の距離をｄが、対物レンズの焦点距離をｆに等しく、対物レンズの有効口径をＤとする時、関係式、$t_1 \leqq t_2$、及び、$\theta_0 < 180° - \theta_3 - \tan^{-1}(D/2f)$、が満足されることに特徴がある。

【００２０】

第４の構成では、レーザビームと各キャピラリーが配列した平面とのなす角度の最大値が$\theta_0 \leqq 90°$となる方向からレーザビームを照射し、レーザビームの蛍光検出部の１回の走査時間をt_1として、レーザビームを走査して蛍光検出部を複数回繰り返し照射して、各キャピラリーが配列した平面となす角度が$\theta_3 \leqq 90°$となる方向から、蛍光を蛍光検出系により検出時間t_2で検出し、蛍光検出系の有効開口径をＤ、有効開口の中心位置と各キャピラリーにレーザビームが照射される位置との間の距離をｄとする時、関係式、$t_1 \leqq t_2$、及び、$\theta_0 > \theta_3 + \tan^{-1}(D/2d)$、が満足されることに特徴があり、この構成に於いて、蛍光検出系は対物レンズを具備し、対物レンズの中心軸が各キャピラリーが配列した平面と角度$\theta_3 \leqq 90°$だけなしており、対物レンズの有効開口径がＤであり、対物レンズの焦点距離をｆとする時、ｄ＝ｆであることにも特徴がある。

【００２１】

以上の何れかの構成於いて、蛍光検出部が、透明液体、又は透明固体で満たされていることにも特徴がある。

【００２２】

複数キャピラリーの蛍光検出部を平面状に並べ、レーザビームを絞って１本のキャピラリーに照射し、レーザビームを連続的にスキャン（走査）して、各キャピラリーの蛍光検出位置を順番に繰り返し照射する。各キャピラリーに照射されたレーザビームは、各キャピラリーの外表面、内表面で反射し、これらの反射ビームは全方位に進行せず、限定された範囲内に進行する。各キャピラリーを泳動する試料を標識する蛍光標識から発光する蛍光を一括して計測する蛍光検出系の有効開口を、上記の限定された範囲の外に配置することにより、これらの反射ビームが蛍光検出系に入射しないようになる。例えば、キャピラリーの軸に対して４５°の角度の方向からレーザビームを絞って連続的にスキャンし、各キャピラリーの蛍光検出位置を順番に繰り返し照射する。蛍光検出系は、キャピラリーアレイの平面に対して垂直方向より、全キャピラリーからの蛍光を一括して同時に計測する。

【００２３】

この時、レーザビームのキャピラリー表面での反射光は、蛍光検出系を挟んだ反対側の、キャピラリーの軸と４５°の角度をなす方向に進行する。即ち、レーザの反射光が蛍光検出系に入射することがなくなる。また、複数キャピラリーの蛍光検出部をレーザビームで１回スキャンするに要する時間を、連続的な蛍光計測の信号（計測）取り込み間隔より小さくする。即ち、１回の蛍光検出（露光）時間内に、全キャピラリーが少なくとも１回のレーザ照射を受け、蛍光を発するようにする。このレーザスキャン方式により実現するキャピラリーアレイ電気泳動装置は、従来方式による装置と比較して以下のような長所がある。

【００２４】

キャピラリーアレイスキャン方式では、スキャン速度を１Ｈｚ以上に大とすることは物理的に困難であった。本発明の構成では、レーザビームのみをスキャンするので、スキャンのための可動部、移動距離は、例えば、ガルバノミラーのように非常に小さく、高速スキャンが可能である。蛍光検出は、全キャピラリーについて同時に行うので、信号処理速度は十分に速くできる。従って、電気泳動分析の分解能が低下することがない。また、本発明の構成では、レーザビームの反射光が蛍光検出系に入射することがないので、蛍光計測の背景光を非常に小さくができ、高感度な蛍光計測を実現できる。

【００２５】

本発明の構成では、レーザビームをキャピラリーに直接照射してオンカラム蛍光計測を行うので、マルチシースフロー方式で問題となる長塩基長での信号強度の低下は生じない。

【００２６】
レーザビーム拡大方式では、レーザビームの強度分布がガウス分布であるために、キャピラリー間でレーザ照射強度が異なるという問題があったが、本発明の構成では、レーザビームを一定速度でスキャンするので、どのキャピラリーも均一の強度でレーザ照射できる。また、レーザビームスキャンする幅とキャピラリーアレイの幅を一致させることにより、レーザ出力を無駄なく利用でき、通常の出力のレーザ光源で蛍光計測を実行できる。
【００２７】
マルチフォーカス方式では、レーザビームのキャピラリー表面での反射光の一部が蛍光検出系に入射して背景光が上昇する問題があるが、本発明の構成では、上述のように、レーザビームの反射光が蛍光検出系に入射しない構造を採用するので、背景光を低減し、高感度な蛍光計測を実現できる。
【００２８】
【発明の実施の形態】
図１から図８により、本発明の実施例のキャピラリー電気泳動装置の主要部分の構成を説明し、図９により本発明の実施例に於けるキャピラリー電気泳動装置の全体の構成を説明する。
【００２９】
（実施例１）
図１は、本発明の実施例１のキャピラリー電気泳動装置の主要部分の構成を示す図である。全長６０ｃｍ、有効長５０ｃｍの８本のキャピラリー１（外径３６０μｍ、内径５０μｍ）の、レーザがスキャンされ蛍光が検出される蛍光検出部（ポリイミド被覆除去済）を同一平面（以下、キャピラリーアレイ平面という）上に揃えて並べ、水平に配置する。蛍光検出部のキャピラリーアレイの配列幅は２．８８ｍｍになる。キャピラリー１の内部に電気泳動分離媒体である５％のリニアポリアクリルアミドを充填し、蛍光体標識された試料を電気泳動分離する。
【００３０】
図１に示す各キャピラリー１は、レーザビーム３が照射され蛍光が検出される蛍光検出部の付近のみを示し、他の部分は省略している（キャピラリー電気泳動装置の全体の構成に関しては図９で説明する）。図１に示すように、装置構成の配置を分かりやすく説明するために、キャピラリー１の一方向をＡ、他方向をＢとする。キャピラリーの本数、外径、内径、長さ、分離媒体等の条件は、以上に述べた条件以外でも問題なく本発明を適用できる。
【００３１】
蛍光を励起するアルゴンイオンレーザ（５１５ｎｍ、２０ｍＷ）光源２からのレーザビーム３を、集光レンズ４（ｆ＝１００ｍｍ）を透過させた後、ビーム偏向器であるガルバノミラー５で反射させる。ガルバノミラー５は回転軸６を中心とした回転運動７が可能である。ガルバノミラー５によりレーザビーム３の偏向方向を連続的に変化させ、全キャピラリー１の蛍光検出部を順番に照射する。
【００３２】
レーザビーム３の各キャピラリー１への照射は、レーザビーム３のキャピラリーアレイ平面への入射角度の最大値が４５°になるように設定する。また、レーザビーム３がキャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーを照射する時に、レーザビーム３のキャピラリーアレイ平面への入射角度が最大となるように設定する。即ち、レーザビーム３が中央に配置されたキャピラリーを照射する時、レーザビーム３上の一点からキャピラリーアレイ平面上に降ろした垂線が中央に配置されたキャピラリーの中心軸と交差するように設定する。
【００３３】
実施例１では、キャピラリーアレイが配列される幅（２．８８ｍｍ）と比較して、各キャピラリー１にレーザビームが照射される位置とガルバノミラー５上のレーザビーム３が反射される点との間の距離（１００ｍｍとする）が大きいので、レーザビーム３の各キャピ

ラリーの軸への入射角度は殆ど変わらずにＢ方向より４５°になる（両端のキャピラリーへの入射角度は、中央部のキャピラリーへの入射角度よりも僅かに小さくなるが、その差は非常に小さい）。

【００３４】

各キャピラリー１のレーザが照射される位置を結んで形成されるキャピラリーアレイ平面上の直線（スキャンライン）は、各キャピラリー１の中心軸と垂直とする。ガルバノミラー５の連続運動により、レーザビームは、直線（スキャンライン）上を連続的に往復運動し、繰り返しレーザ照射位置をスキャンする。レーザビーム３は、集光レンズ４により集光され、スキャンライン上で１００μｍ以下となる。１回のスキャンに要する時間は０．１秒とする。

【００３５】

各キャピラリー１に照射されたレーザビーム３は、各キャピラリー１の外表面、及び内表面で一部反射し、残りが屈折を受けて各キャピラリー１を透過する。キャピラリー１は円筒形状であるため、反射ビーム８、及び透過ビーム１１（但し、図１に透過ビーム１１は図示せず、図２に図示する）は、様々な方向に進行するが、反射ビーム８、及び透過ビーム１１は全て、図１に示す円錐状曲面９の上に乗る。円錐状曲面９の頂点は、各キャピラリー１のレーザ照射位置であり、円錐状曲面９の中心軸は各キャピラリー１の軸に一致し、円錐状曲面９の頂角はレーザ入射角度の２倍の９０°である。反射ビーム８が最大強度を示す方向は、図１に示す様に、

キャピラリー平面に対してレーザビーム３と同じ側で、各キャピラリーの軸とＡ方向より４５°をなす方向である。透過ビーム１１が最大強度を示す方向は、キャピラリーアレイ平面に対して入射するレーザビーム３と反対側で、各キャピラリー１の軸に対してＡ方向より４５°をなす方向である。

【００３６】

各キャピラリー１のレーザ照射位置から発光する蛍光は、キャピラリーアレイ平面に対して垂直且つレーザビーム３と同じ側から、蛍光検出系により一括して検出される。蛍光検出系は、蛍光をほぼ平行光束にする対物レンズ１０、蛍光を波長分散させる回折格子、像を結像する結像レンズ、像を検出する２次元カメラより構成され、得られた画像はコンピュータにより処理、記録される。全キャピラリー１からの蛍光は、波長分散された後に同時に計測される。蛍光計測は、露光時間０．４秒、検出間隔０．５秒で連続的に行う。１回のレーザスキャン時間が０．１秒であるから、１回の蛍光検出（露光）の間に４回のレーザスキャンを行うことになる。即ち、１回の蛍光検出（露光）時間内に全キャピラリー１が必ず照射される。

【００３７】

蛍光検出系は、上記以外の構成でも良い。例えば、分光手段として、回折格子の代わりに、像を分割して結像させるプリズムや分光フィルターを用いても良いし、結像レンズを用いないで結像型の回折格子を利用しても良い。何れにしても、複数キャピラリー１からの発光蛍光を独立に、同時に検出できるものであれば良い。

【００３８】

図１は、対物レンズ１０を示すが、一般の蛍光検出系について考えれば、対物レンズ１０の有効口径は、蛍光検出系の有効開口を表わしている。即ち、蛍光検出系の有効開口は、どの角度範囲の発光が蛍光検出系の内部に入射して計測されるのかを示す。最も重要な点は、幾何光学から明らかなように、円錐状曲面９上の如何なる反射ビーム８、及び透過ビーム１１も、蛍光検出系の有効開口に入射していない点である。

【００３９】

図２は、本発明の実施例１のキャピラリー電気泳動装置の主要部分を示す図であり、キャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーの軸を含み、キャピラリーアレイ平面に垂直な断面図である。即ち、図２は図１のスキャンライン方向から見た断面図である。キャピラリー１の軸に対してＢ方向よりθ_0＝４５°の角度で入射したレーザビーム３がキャピラリー１に照射され、反射ビーム８と透過ビーム１１に分割される。ここで、０°

＜θ$_0$≦９０°とする（図２に於いて、θ$_0$が９０°を超える場合は、キャピラリー１の軸のＡ方向となす角とする）。

【００４０】

最大強度の反射ビーム８は、キャピラリー１の軸に対してＡ方向よりθ$_0$＝４５°の角度で進行する。最大強度の透過ビーム１１は、入射ビーム３の延長線上で、キャピラリー１の軸に対してＡ方向よりθ$_0$＝４５°の角度で進行する。その他の反射ビーム８、及び透過ビーム１１は、キャピラリー１の軸に対してＡ方向より４５°以下の範囲に収まる。蛍光検出系の対物レンズ１０は、有効開口径Ｄ＝４０ｍｍ、焦点距離ｆ＝５０ｍｍであり、明るさはＦ＝ｆ／Ｄ＝１．２５である。ここでは、対物レンズ１０により各キャピラリーからの蛍光をほぼ平行光にさせるため、各キャピラリーのレーザ照射位置と対物レンズの距離ｄは焦点距離ｆと一致させる。

【００４１】

また、対物レンズ１０の中心軸、即ち対物レンズの有効開口の中心軸１２とキャピラリー１の軸のなす角度をθ$_3$＝９０°とする。ここで、０°＜θ$_3$≦９０°とする。対物レンズの有効開口角は、θ$_2$＝２×ｔａｎ$^{-1}$（Ｄ／２ｄ）＝２×ｔａｎ$^{-1}$（Ｄ／２ｆ）＝２×ｔａｎ$^{-1}$（１／２Ｆ）＝４４°である。有効開口範囲の内、最もキャピラリー１の軸のＡ方向と近接する角度は、θ$_1$＝θ$_3$－（θ$_2$／２）＝６８°である。θ$_0$＜θ$_1$であるから、反射ビーム８は対物レンズ１０の有効開口に入射することがない。キャピラリーアレイの中央部からはずれたキャピラリーに於けるレーザビーム３の入射角度及び反射角度はθ$_0$より小さくなる方向なので、勿論、反射ビーム８が有効開口に入射することはない。

【００４２】

一般に、θ$_0$＜θ$_1$であれば、反射ビーム８が蛍光検出系の有効開口に入射しない。即ち、反射ビーム８が蛍光検出系の有効開口に入射しない条件は、θ$_0$＜θ$_3$－ｔａｎ$^{-1}$（Ｄ／２ｄ）である。以上の構成により、各キャピラリー１へ入射するレーザビーム３の反射ビーム８と透過ビーム１１が蛍光検出系に入射しないので、蛍光計測での背景光強度が飛躍的に減少する。従って、蛍光計測の検出感度が向上し、ダイナミックレンジが拡大する効果が生まれる。

【００４３】

（実施例２）

実施例１では、レーザビーム３と蛍光検出系が、キャピラリーアレイ平面に関して同じ側にあったが、実施例２ではレーザビーム３と蛍光検出系を反対側に配置する。

【００４４】

図３は、本発明の実施例２のキャピラリー電気泳動装置の主要部分を示す図であり、キャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーの軸を含み、キャピラリーアレイ平面に垂直な断面図である。図２に於いて、キャピラリー１、及び蛍光検出系はそのままにして、レーザビーム３を、キャピラリーアレイ平面に関して蛍光検出系と反対側に置いて、キャピラリー１へのレーザビーム３の入射角度を、キャピラリー１の軸に対してＢ方向よりθ$_0$＝４５°になるように設定する。その他の条件は、実施例１と同じとする。図３から明らかなように、この場合も、θ$_0$＜θ$_3$－ｔａｎ$^{-1}$（Ｄ／２ｄ）を満足すれば、レーザビーム３の反射ビーム８、及び透過ビーム１１は蛍光検出系（対物レンズ１０）の有効開口に入射することはなく、実施例１と同等の効果が得られる。

【００４５】

（実施例３）

図４は、本発明の実施例３のキャピラリー電気泳動装置の主要部分の構成を示す図である。実施例１は、レーザ光源２、集光レンズ４、ガルバノミラー５の順に配置する「後置対物鏡型」であるが、実施例３では、レーザ光源２、ガルバノミラー５、集光レンズ４の順に逆転する「前置対物鏡型」とする。一般に、前置対物鏡型は、後置対物鏡型と比較して光学系設計が困難になるが、レーザビーム３の集光径がスキャンライン上で均一になる効果がある。また、スキャンラインと集光レンズ４の距離を近接できるで、より短い焦点距

離の集光レンズ４を使用して、より小さな集光径を得ることができる。即ち、前置対物鏡型により、均一、且つ高精度な光学系を構築できる。

【００４６】

図４の構成では、集光レンズ４は焦点距離ｆ＝５０ｍｍとし、スキャンライン上でのレーザビーム径を５０μｍ以下になるようにする。その他の条件は、実施例１と同等とすれば、同等の効果が得られる。

【００４７】

図５は、本発明の実施例３のキャピラリー電気泳動装置の主要部分の構成を示す図である。前置対物鏡型の別な構成として、対物レンズ１０が集光レンズ４を兼ねることができる。ガルバノミラー５（図示せず）を経由したレーザビーム３をダイクロイックミラー１３で反射させ、対物レンズ１０を透過させて集光してから各キャピラリー１を照射する。対物レンズ１０の焦点距離はｆ＝５０ｍｍなので、スキャンライン上でのレーザビーム径は５０μｍ以下になる。ガルバノミラー５を動作させ、レーザビームの照射位置をスキャンライン上で往復移動させ、各キャピラリー１を繰り返し順番にレーザビームで照射する。対物レンズ１０の中心軸１２とキャピラリーアレイ平面とのなす角をθ_3＝９０°とすると、必ず$\theta_0 > \theta_1$となるので、レーザ反射ビームは蛍光検出系（対物レンズ１０）の有効開口に入射してしまう。

【００４８】

図６は、本発明の実施例３のキャピラリー電気泳動装置の主要部分を示す図であり、キャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーの軸を含み、キャピラリーアレイ平面に垂直な断面図である。実施例１と同様に、レーザビーム３がキャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーを照射する時に、レーザビーム３のキャピラリーアレイ平面への入射角度が最大となるように設定する。図６に示すように、θ_3＝８０°＜９０°とする。この時、$\theta_1 = 180° - \theta_3 - (\theta_2 / 2)$＝７８°となる。

【００４９】

更に、できるだけθ_0を小さくするために、図６に示すように、レーザビーム３を対物レンズ１０の端部を透過させることで、$\theta_0 \sim \theta_3 - (\theta_2 / 2)$＝５８°とする。このようにすると、$\theta_0 < \theta_1$となるので、レーザ反射ビーム８は蛍光検出系（対物レンズ１０）の有効開口に入射せず、実施例１と同等の効果が得られる。一般に、対物レンズを通してレーザビームをキャピラリーに照射する場合、$\theta_0 < 180° - \theta_3 - \tan^{-1}(D/2d)$が満足されていれば、レーザ反射ビームが蛍光検出系に入射しない。ダイクロイックミラー１３は、レーザ波長は反射し、蛍光波長は透過するように設計されているので、上記以外の光学系は実施例１と同等で良い。

【００５０】

（実施例４）

実施例１に於いて、レーザビーム３のキャピラリーアレイ平面への入射角度の最大値がθ_0＝９０°である場合、入射ビーム３、反射ビーム８、透過ビーム１１は全て、キャピラリーアレイ平面及び各キャピラリー１の軸に垂直でレーザスキャンラインを含む平面内に収まる。

【００５１】

図７は、本発明の実施例４のキャピラリー電気泳動装置の主要部分を示す図であり、キャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーの軸を含み、キャピラリーアレイ平面に垂直な断面図である。実施例１と同様に、レーザビーム３が、キャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーを照射する時に、レーザビーム３のキャピラリーアレイ平面への入射角度が最大となるように設定する。

【００５２】

図７に示すように、蛍光検出系（対物レンズ１０）の有効開口をある程度傾ければ、レーザビーム３の反射ビーム８、及び透過ビーム１１は蛍光検出系に入射せず、実施例１と同等の効果が得られる。このための条件は、$\theta_0 > \theta_1 + \theta_2 = \theta_3 + (\theta_2 / 2) = \theta_3 + \tan^{-1}(D/2d) = \theta_3 + \tan^{-1}(D/2f)$である。ここで、$\theta_3$＝４０

°とすると右辺は６２°となって条件が満たされる。上記以外の光学系は実施例１と同等で良い。$\theta_0 < 90°$の場合であっても、上記の条件が満たされていれば同等の効果が得られる。

【００５３】

（実施例５）

以上の実施例では、照射するレーザビームの反射ビームが、蛍光検出系に直接入射しない構造となっているが、キャピラリー外表面でのレーザ散乱、及び反射ビームが、他の物体に衝突して発生する迷光が蛍光検出系に入射することは避けられない。そこで、以上の本発明の実施例では、各キャピラリー１のレーザビーム３の照射位置の周囲は空気で満たされていたが、レーザビーム３の照射位置を、透明な液体や固体で満たしてやれば、反射ビーム強度はもとより、上記のレーザ散乱や迷光が減少し、更に、蛍光検出の背景光強度を減少できる。

【００５４】

図８は、本発明の実施例５のキャピラリー電気泳動装置のを示す図であり、キャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーの軸を含み、キャピラリーアレイ平面に垂直な断面図である。図８に示すように、実施例１と同等の光学系に於いて、各キャピラリー１のレーザビーム３の照射位置を、純水１５で満たされた石英ガラスセル１４の中に配置する。純水１５の替わりに、他の透明溶液を満たしても良く、透明溶液の屈折率がキャピラリー材質のガラスの屈折率に近い程、レーザ散乱や迷光が減少し効果が高い。また、キャピラリー材質のガラスと屈折率が近い透明固体で、レーザビーム３の照射位置の部分を固めても同等の効果が得られる。

【００５５】

以上説明した各実施例では、キャピラリー電気泳動装置の主要部分の構成を説明したが、以下では本発明のキャピラリーアレイ電気泳動装置の全体の構成について説明する。

【００５６】

図９は、本発明の実施例に於けるキャピラリー電気泳動装置の全体の構成を示す図である。外径３６０μｍ、内径５０μｍ、全長５０ｃｍの４本のキャピラリー１に、それぞれ試料注入端より３０ｃｍの位置に蛍光検出の窓（レーザビーム３の照射位置であり蛍光検出部でもある）を設け、図９に示すように配置した。

【００５７】

各キャピラリー１の蛍光検出部は、同一平面上に水平に互いに密着して配列し、各キャピラリー１の両端に行くに従って、キャピラリー１同士の間隔を広げ、両端を別々の緩衝液槽２０、２１に浸す。試料注入端は緩衝液槽２１に浸して負極とし、泳動終端は緩衝液槽２０に浸して正極として、各キャピラリー１の両端に高電圧を印加し、緩衝液槽２１から緩衝液槽２０に向かって電気泳動を行う。

【００５８】

キャピラリー１の内部を電気泳動する試料を標識する蛍光標識を励起するため、レーザ光源２から出射したレーザビーム３をガルバノミラー５で反射させ、集光レンズ４で集光した後、各キャピラリーが配列した平面に対して４５°の方向から蛍光検出窓の位置を照射する。ガルバノミラー５の軸６を回転方向７に従って往復回転させ、レーザビーム３が反射する角度を変化させ、レーザビーム３をスキャンして、各キャピラリー１の蛍光検出位置を順番に繰り返し照射する。ガルバノミラー５の回転角度はコンピュータ１９により制御する。各キャピラリー１の蛍光検出位置から出射する蛍光は、各キャピラリー１の蛍光検出位置が並ぶ平面に対して垂直上方より、蛍光検出系１０～１８によって独立して且つ同時に検出される。

【００５９】

各キャピラリー１からの蛍光は、対物レンズ１０によりほぼ平行光束にされ、像分割プリズム及び組み合わせフィルター１６を透過し、結像レンズ１７により結像され、ＣＣＤカメラ１８によって検出される。像分割プリズム及び組み合わせフィルター１６は、１点からの発光をプリズムにより４点に分割して、分割された各点の光をそれぞれ、４種の異な

るバンドパスフィルターを透過させ、４点の蛍光強度をＣＣＤカメラ１８で同時に計測することにより、４種の蛍光体の蛍光強度を同時に計測する。コンピュータ１９はＣＣＤカメラ１８の繰り返し蛍光計測を制御し、得られたデータを記録し、所望の演算処理をする。

【００６０】

【発明の効果】

本発明によれば、レーザビームの１回のスキャン時間を、蛍光計測の１回の検出（露光）時間と比較して十分に短くして、レーザビームをスキャンして複数のキャピラリーを照射し、実質的に全キャピラリーを同時照射でき、全キャピラリーからの蛍光を一括して計測できる。各キャピラリーへ照射されたレーザの反射ビーム、及び透過ビームが蛍光検出系の有効開口に入射しない光学系にすることにより、蛍光計測の背景光強度を著しく減少させ、高感度な蛍光計測を可能し、高速、高スループットな分析をできる。

【図面の簡単な説明】

【図１】本発明の実施例１のキャピラリー電気泳動装置の主要部分の構成を示す図。

【図２】本発明の実施例１のキャピラリー電気泳動装置の主要部分を示し、キャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーの軸を含み、キャピラリーアレイ平面に垂直な断面図。

【図３】本発明の実施例２のキャピラリー電気泳動装置の主要部分を示し、キャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーの軸を含み、キャピラリーアレイ平面に垂直な断面図。

【図４】本発明の実施例３のキャピラリー電気泳動装置の主要部分の構成を示す図。

【図５】本発明の実施例３のキャピラリー電気泳動装置の主要部分の構成を示す図。

【図６】本発明の実施例３のキャピラリー電気泳動装置の主要部分を示し、キャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーの軸を含み、キャピラリーアレイ平面に垂直な断面図。

【図７】本発明の実施例４のキャピラリー電気泳動装置の主要部分を示し、キャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーの軸を含み、キャピラリーアレイ平面に垂直な断面図。

【図８】本発明の実施例５のキャピラリー電気泳動装置の主要部分を示し、キャピラリーアレイの中央部に配置されたキャピラリーの軸を含み、キャピラリーアレイ平面に垂直な断面図。

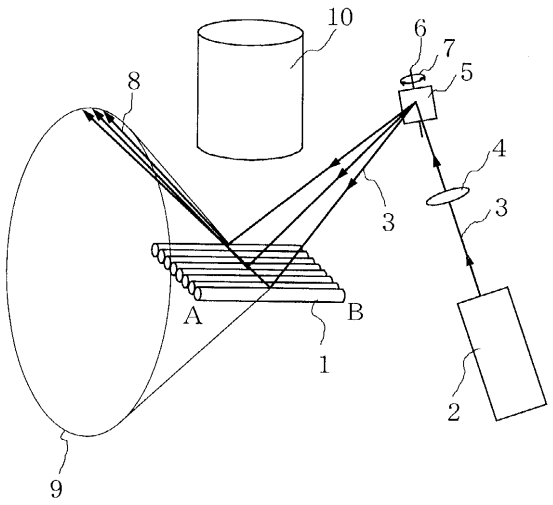
【図９】本発明の実施例に於けるキャピラリー電気泳動装置の全体の構成を示す図。

【符号の説明】

１…キャピラリー、２…レーザ光源、３…レーザビーム、４…集光レンズ、５…ガルバノミラー、６…ガルバノミラーの回転軸、７…ガルバノミラーの回転方向、８…レーザ反射ビーム、９…レーザ反射ビーム、及びレーザ透過ビームで形成される円錐形状曲面、１０…対物レンズ、１１…レーザ透過ビーム、１２…対物レンズの中心軸、１３…ダイクロイックミラー、１４…石英セル、１５…水、１６…像分割プリズム及び組み合わせフィルター、１７…結像レンズ、１８…ＣＣＤカメラ、１９…コンピュータ１９。

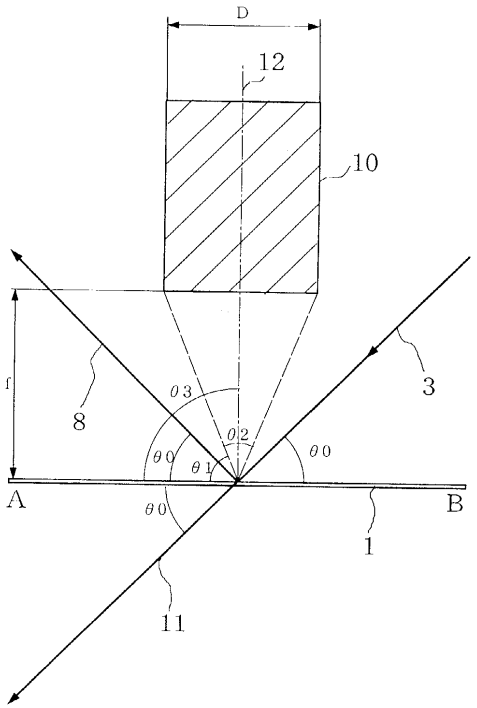
【図１】

図1



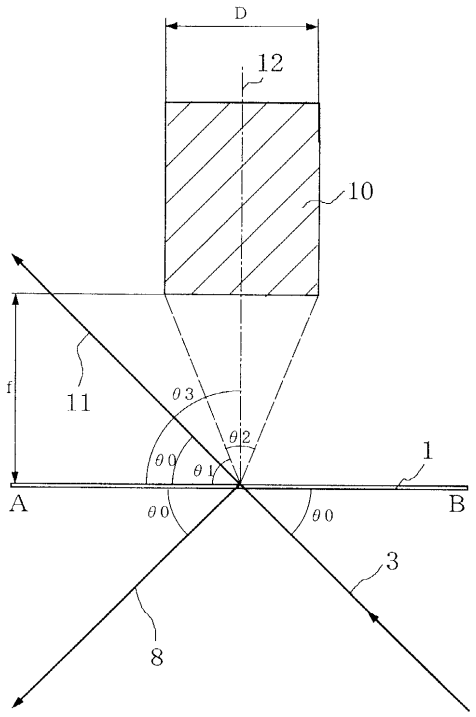
【図２】

図2



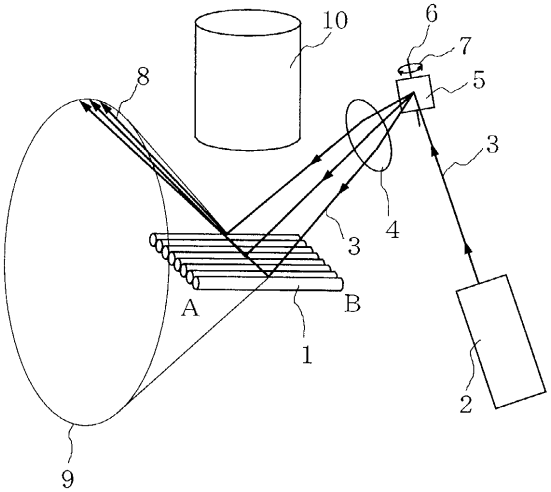
【図３】

図3



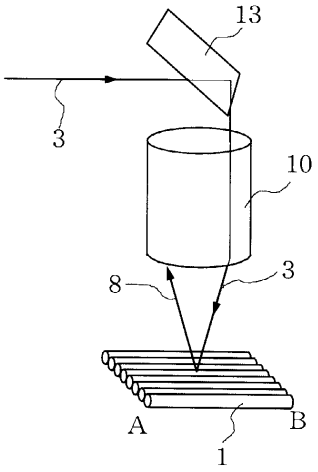
【図４】

図4



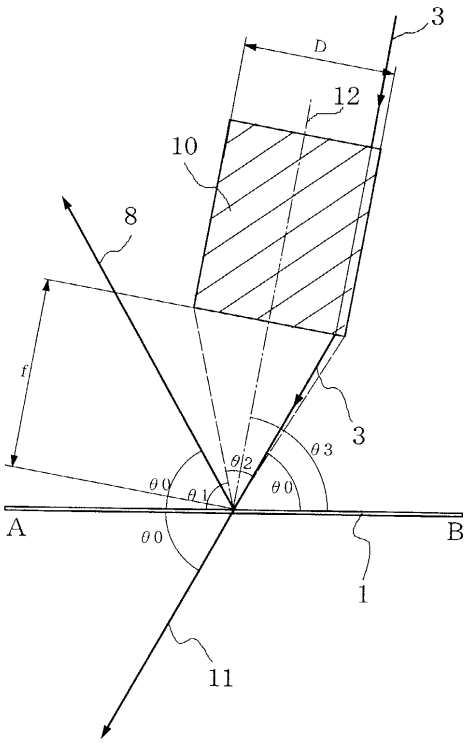
【図５】

図5



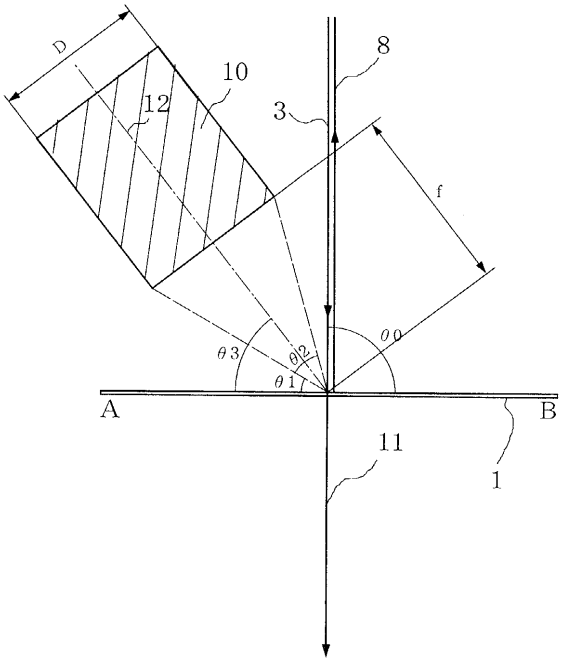
【図６】

図6



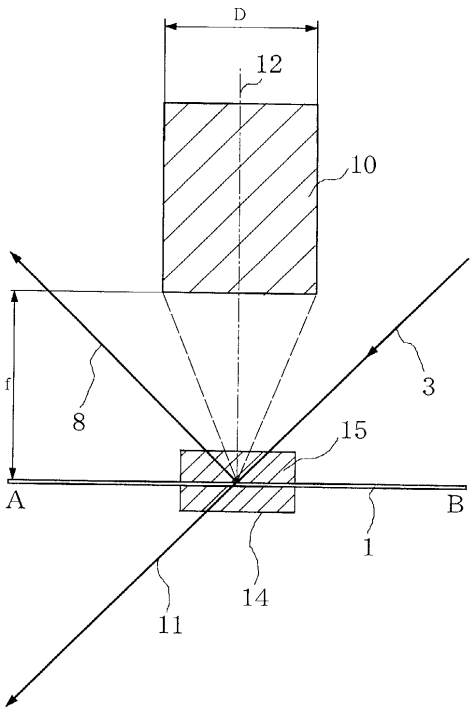
【図７】

図7



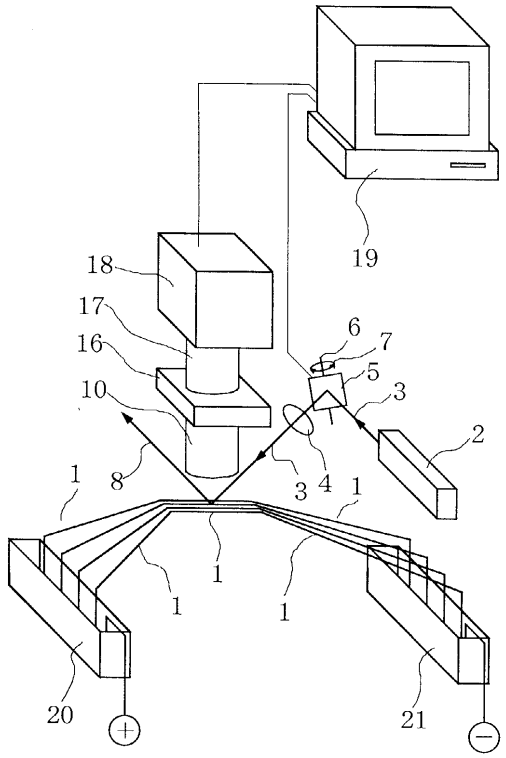
【図８】

図8



【図９】

図9



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平１０－１４８６２７（ＪＰ，Ａ）
特開平１０－１７６９９２（ＪＰ，Ａ）
特開平０７－１７４７０１（ＪＰ，Ａ）
特開平０９－２４３５９７（ＪＰ，Ａ）
特開平０９－２５１０００（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－２４３８７４（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
G01N 27/447
G01N 21/64