(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3729859号
(P3729859)
(45)発行日　平成17年12月21日(2005.12.21)　(24)登録日　平成17年10月14日(2005.10.14)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
G01N 33/68	G01N	33/68	
C09B 23/00	C09B	23/00	L
G01N 27/447	G01N	33/48	P
G01N 33/48	G01N	33/58	Z
G01N 33/58	G01N	27/26	301B

請求項の数 18　(全 16 頁)　最終頁に続く

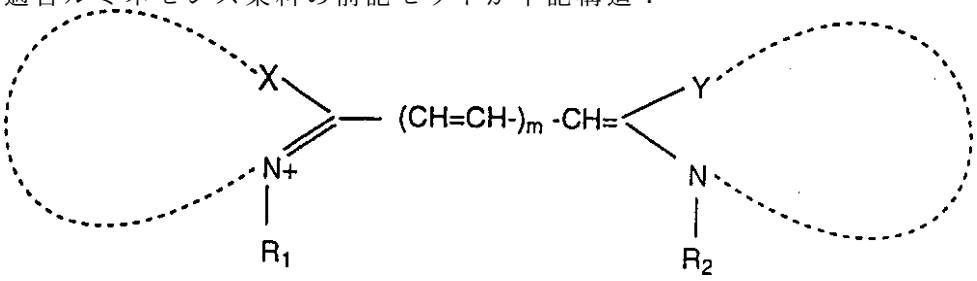
(21)出願番号　特願平8-531933
(86)(22)出願日　平成8年4月19日(1996.4.19)
(65)公表番号　特表平11-505324
(43)公表日　平成11年5月18日(1999.5.18)
(86)国際出願番号　PCT/US1996/005435
(87)国際公開番号　WO1996/033406
(87)国際公開日　平成8年10月24日(1996.10.24)
審査請求日　平成15年4月3日(2003.4.3)
(31)優先権主張番号　08/425,480
(32)優先日　平成7年4月20日(1995.4.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
カーネギー・メロン・ユニバーシティ
アメリカ合衆国ペンシルバニア州１５２１３－３８９０，ピッツバーグ，フォーブス・アベニュー　５０００
(74)代理人
弁理士　社本　一夫
(74)代理人
弁理士　今井　庄亮
(74)代理人
弁理士　増井　忠弐
(74)代理人
弁理士　栗田　忠彦
(74)代理人
弁理士　小林　泰
最終頁に続く

(54)【発明の名称】適合多重染料を用いる示差ゲル電気泳動

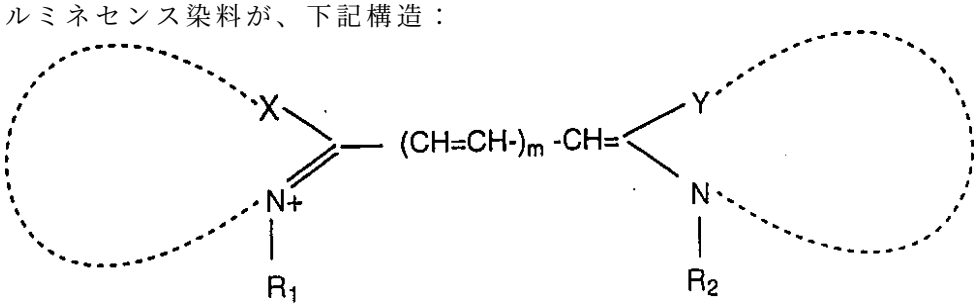
(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくとも２種類の異なるサンプルの、その上に共有結合部位を有するタンパク質成分の差異を検出する方法であって、
ａ）前記少なくとも２つのサンプルのそれぞれからタンパク質の抽出物を用意し；
ｂ）染料がタンパク質抽出物へ共有結合する条件下で、タンパク質抽出物の各別々のサンプルに、適合ルミネセンス染料のセットから選択された異なるルミネセンス染料を加え、ここにおいて、前記染料のセット内の各ルミネセンス染料はタンパク質に共有結合することができ、そして前記適合セット内の各染料が：
ｉ）そのような共有結合上のタンパク質の全体的な正味電荷を維持するであろう正味電荷を有し、そしてそれによって前記染料のいずれか１つで標識されたタンパク質の相対的電気泳動移動が、前記適合セットにおけるもう１つの染料で標識された前記タンパク質の相対的電気泳動移動が同じとなるようなイオン特徴及びｐＨ特徴を有し、
ｉｉ）前記適合セットにおける、残存染料のルミネセンス光の放出から十分異なる波長のルミネセンス光を放出して、検出できる異なった光シグナルを提供する；
ｃ）抽出物を一緒に混合して、混合物を形成し；
ｄ）混合物を単一ゲル上で電気泳動させて、電荷と質量との差異によって抽出物の成分を分離させ；そして
ｅ）ゲルの異なる領域から発せられるルミネセンスの色の差異を検出することによって、抽出物の混合物のタンパク質成分の差異を検出する、

ことを含む方法。
【請求項２】
前記少なくとも２種類の異なるサンプルが細胞を含んでなり、そして前記タンパク質の抽出物が前記細胞サンプルのそれぞれから用意される、請求項１の方法。
【請求項３】
前記染料がタンパク質中のリジンに共有結合し、そして前記適合ルミネセンス染料内の各前記染料が＋１電荷を有する、請求項１の方法。
【請求項４】
適合ルミネセンス染料の前記セットが下記構造：



［式中、点線はそれぞれ前記染料を形成するために必要な炭素原子を表し、ＸとＹはＯ、Ｓ又はCH_3-C-CH_3から成る群から選択され、ｍは１～３の整数であり、R_1とR_2の一方は反応基であり、他方はアルキルである］
で示されるシアニン染料である、請求項１記載の方法。
【請求項５】
前記反応基がイソチオシアネート、$(CH_2)_4COOH$及び$(CH_2)_4CON$－ヒドロキシスクシンイミジルエステルから成る群から選択される、請求項４記載の方法。
【請求項６】
適合ルミネセンス染料の前記セットが、染料を抽出物に結合させるための正に荷電したリンカー基を有するジピロメタンホウ素ジフルオリド染料の誘導体である、請求項１記載の方法。
【請求項７】
結合部位がリシン、カルボン酸及びスルフヒドリルの基から成る群から選択される、請求項１記載の方法。
【請求項８】
結合部位がリシン、カルボン酸及びスルフヒドリルの基から成る群から選択される部分の１つである、請求項１記載の方法。
【請求項９】
前記染料がタンパク質上のスルフヒドリル基に共有結合する、請求項１の方法。
【請求項１０】
前記染料がタンパク質上のカルボン酸の基に共有結合する、請求項１の方法。
【請求項１１】
発せられた色の差異を検出する工程が蛍光分光法によるものである、請求項１記載の方法。
【請求項１２】
発せられた色の差異を検出する工程が電子イメージングによるものである、請求項１記載の方法。
【請求項１３】
前記サンプルを混合する前に、抽出物上の結合部位に染料を結合させる反応をクエンチして、さらなる結合を阻止する工程をさらに含む、請求項１記載の方法。
【請求項１４】
少なくとも２種類の異なるサンプルのタンパク質含量の差異の存在の検出に用いるためのキットであって、
ルミネセンス染料の適合セットを含み、前記セット内の各染料がタンパク質に共有結合す

ることができ、そしてここにおいて前記適合セット内の各染料が
ｉ）そのような共有結合上のタンパク質の全体的な正味電荷を維持するであろう正味電荷を有し、そしてそれによって前記染料のいずれか１つで標識されたタンパク質の相対的電気泳動移動が、前記適合セットにおけるもう１つの染料で標識された前記タンパク質の相対的電気泳動移動が同じとなるようなイオン特徴及びｐＨ特徴を有し、
ｉｉ）前記適合セットにおける、残存染料のルミネセンス光の放出から十分異なる波長のルミネセンス光を放出して、検出できる異なった光シグナルを提供する；
前記キット。
【請求項１５】
少なくとも１種類の電気泳動ゲルをさらに含む、請求項１４記載のキット。
【請求項１６】
染料と供試サンプル中のタンパク質との間の標識反応をクエンチするための物質をさらに含む、請求項１４記載のキット。
【請求項１７】
ルミネセンス染料が、下記構造：



［式中、点線はそれぞれ前記染料の１つを形成するために必要な炭素原子を表し、ＸとＹはＳ、Ｏ又はＣＨ$_3$－ＣＨ－ＣＨ$_3$から成る群から選択され、ｍは１～３の整数であり、Ｒ$_1$とＲ$_2$の一方は反応基であり、他方はアルキルであり、前記染料セット内の異なる染料に関してはｍが異なるものであり、任意に、アルキル基の長さが前記染料セット内の異なる染料に関しては異なり、一般に前記染料セット内の異なる染料の総分子量に適合する長さである］
で示されるシアニン染料である、請求項１４記載のキット。
【請求項１８】
ルミネセンス染料が、染料を抽出物に結合させるための正に荷電したリンカー基を有するジピロメタンホウ素ジフルオリド染料の誘導体である、請求項１４記載のキット。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
発明の分野
本発明は細胞及び細胞抽出物のタンパク質組成の差異を検出する方法に関し、さらに詳しくは、このような差異を検出するための標識試薬の適合対(matched pair)を用いる方法に関する。
発明の背景
細胞生物学の種々な面を研究する研究者は細胞の構造、機能及び発達の差異を検出し、モニターするために種々なツールを用いる。細胞研究の重要な部分は異なる細胞種類、発達段階及び条件の間のタンパク質組成における差異及び類似性を研究することである。例えば、正常細胞と癌細胞の間又は野生型と突然変異細胞の間のタンパク質含量の差異を知ることは、貴重な情報源及び貴重な診断ツールでありうる。
タンパク質の混合物を変性条件下でのポリアクリルアミドゲル中での電気泳動によって質量の差異に応じて個々の成分に分離することができる。一次元と二次元のゲル電気泳動はタンパク質研究の標準的ツールになっている。円筒形又はスラブゲルによる一次元ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）電気泳動は供試サンプル中に存在する主要タンパク質のみを明らかにするにすぎない。タンパク質を等電点電気泳動によって、即ち電荷によって一次

元に分離し、サイズによって二次元に分離する二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（２Ｄ　ＰＡＧＥ）は、より高感度な分離方法であり、サンプル中のタンパク質の大部分の解像を与える。

タンパク質は一次元又は二次元ゲル中でそれぞれ帯又はスポットとして移動する。分離されたタンパク質は種々な方法によって：タンパク質特異的な染料による染色、タンパク質仲介銀沈殿、放射性標識タンパク質のオートラジオグラフィー検出、及び蛍光性化合物の共有結合付着によって可視化される。後者の方法は今までは２Ｄ　ＰＡＧＥの等電点電気泳動後におこなわれることができるにすぎなかった。電気泳動の直後に、生じたゲルパターンは、眼によって、写真によって又は電子イメージキャプチャー(electronic image capture)によって、例えば冷却式荷電結合デバイス（ＣＣＤ）を用いることによって可視化されることができる。

異なる細胞又は異なる細胞発達段階からのタンパク質サンプルを慣用的な方法によって比較するために、現在、異なる各サンプルを一次元ゲルの別々のレーン又は別々の二次元ゲル上に流している。比較は目視検査によって又は電子イメージングによって、例えばデジタル化した一次元又は二次元ゲルのコンピュータ利用イメージ分析によっておこなわれる。

二次元電気泳動は研究者によってしばしば用いられている。Ｏ’Ｆａｒｒｅｌｌ，Ｐ．Ｈ．，“タンパク質の高分解能二次元電気泳動”，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２５０：４００７～４０２１（１９７５）は、一次元においては現在周知の等電点電気泳動方法によりタンパク質のそれぞれの等電点によって、二次元では不連続ＳＤＳ電気泳動により分子量によってタンパク質を分離している。Ｇａｒｒｅｌｓ，Ｊ．Ｔ．，“クローン化細胞ラインによって合成されたタンパク質の二次元ゲル電気泳動とコンピュータ分析”Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２５４巻，１６号，７９６１～７９７７（１９７９）は、神経細胞とグリア細胞とにおけるタンパク質合成のパターンを研究するために二次元ゲル電気泳動系を用いている。Ｇａｒｒｅｌｓは多重サンプルからのデータを比較分析をおこなって、特定のタンパク質の存在を固有の機能と相関させている。コンピュータ化された走査装置を用いて、ゲルフルオログラム(gel fluorogram)のセクションを走査して、スポットを検出して、それらの密度を積分している。この情報を記憶し、数種類のスキャンの各々における強度に応じてプロットしている。

Ｕｒｗｉｎ，Ｖ．Ｅ．とＪａｃｋｓｏｎ，Ｐ．，“多重高解像度ミニ二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動システム：銀による染色又は発蛍光団による標識後の冷却式電荷結合デバイスを用いたイメージング二次元ゲル”，Ａｍａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９５：３０～３７（１９９１）は、幾つかの等電点電気泳動（ＩＥＦ）ゲルを用いて電荷によってタンパク質を分離し、次に、このＩＥＦゲルがスラブゲルの頂部に沿って端部から端部まで配置されるように勾配スラブゲル上に負荷させる技術を記憶する。次に、ゲルを電気泳動した。生じたタンパク質スポットを等電点電気泳動工程後の二次元スラブゲルの銀による染色又は蛍光標識によって可視化した。タンパク質上の蛍光標識の存在が電気泳動を受けるときのタンパク質の等電点を変化させるので、標識は第１電気泳動後に、即ち、等電点電気泳動後におこなわれなければならない。さらに、標識を電気泳動工程の前に付着させる場合には、標識がタンパク質の硫黄に結合して、等電点電気泳動中に破断する傾向がある不安定な結合を形成する。Ｓａｎｔａｒｅｎ，Ｊ．等による論文、“二次元ゲル分析とマイクロシークエンシングとによるＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ　Ｗｉｎｇ　Ｉｍａｇｉｎａｌ　Ｄｉｓｃタンパク質の同定”，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０６：２２０～２２６（１９９３）は、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ中のタンパク質を同定するための高分解能二次元ゲル電気泳動の使用を述べている。乾燥ゲルをＸ線フィルムに５日間暴露させている。現像したＸ線フィルムをコンピュータによって分析して、サンプルの差異を測定している。

二次元電気泳動はタンパク質の複雑な混合物を分解するための力強いツールであった。しかし、タンパク質間の差異はとらえにくいもの(subtle)である可能性がある。ゲルの不完

全状態(imperfection)は正確な観察を妨害する可能性がある。不完全さを最小にするために、商業的に入手可能な電気泳動系で形成されるゲルは厳密な正確さで製造されている。非常に細心な制御によっても、２種類のゲルが全く同じということはない。ゲルはｐＨ勾配又は均質性において相互に異なることがありうる。さらに、電気泳動条件が１回のランから次回のランへと異なることがありうる。異なるゲルを自動的に配列させるために、コンピュータソフトウェアが開発されている。しかし、ソフトウェアパッケージの全ては二次元ゲルの次元の１つ又は両方の線形拡大又は収縮に基づく。ソフトウェアはゲルの局部的な歪みを調節することができない。

本発明の目的は、ゲルの歪みに関連した諸問題を解除し、異なるサンプルのタンパク質含量を比較し、対比する簡単で、比較的迅速な、信頼できる方法を提供することである。

発明の簡単な概要

上記目的は、例えば異なる細胞から抽出されたタンパク質の多重サンプル間に存在する場合の差異を、適合ルミネセンス染料セットの異なる染料によってこのようなタンパク質の各サンプルを標識することによって検出する本発明の方法によって達成されている。適合染料は一般に同じイオン特徴とｐＨ特徴を有するが、異なる波長において吸光し、及び／又は蛍光を発して、異なる色の蛍光を生じる。さらに、染料はサイズにおいて類似しているべきである。染料と、細胞抽出物中のタンパク質上の複数個の付着部位との間の共有結合の形成を可能にし、好ましくは、全ての有効結合部位の約２％までと反応するために充分なインキュベーション後に、遊離の反応性染料がタンパク質とさらに反応するのを阻止するためにクエンチし(quenched)、標識されたサンプルを一緒に混合して、単一ゲル上で同時電気泳動させる(co-electrophoresed)。各サンプルに共通なタンパク質は同じ位置に同時移動する(comigrate)。異なるタンパク質はゲル上の異なる位置に単独で移動して、異なる色の蛍光を発することによって、どの初期サンプルが他の初期サンプル（単数又は複数）とは異なる１種以上のタンパク質を有するかを同定する。

本発明はまた、本発明の方法をおこなうためのキットをも包含する。このキットは染料の適合セットを包含し、さらにタンパク質と染料との間の反応を停止させるためのクエンチ物質(quench material)と、電気泳動ゲルをも包含することができる。

【図面の簡単な説明】

図１は本発明の方法の概略図であり；

図２ａと２ｂは単一ＳＤＳポリアクリルアミドゲル上でランされる本発明の標識の好ましい適合対で標識されたタンパク質のイメージであり；

図３は本発明の方法による、染料の適合対の異なる１つの染料によって標識された細胞抽出物の２種類の異なるサンプル（一方はＩＰＴＧ誘導されたものであり、他方は誘導されないものである）を負荷した二次元ゲルの一部のイメージであり；

図４は本発明の方法による、染料の適合対の異なる１つの染料によってそれぞれ標識された細胞抽出物の２種類の異なるサンプル（一方は外因的に添加されたカルボニックアンヒドラーゼを有し、他方はカルボニックアンヒドラーゼを有さない）を負荷した二次元ゲルの一部のイメージである。

好ましい実施態様の詳細な説明

本発明の方法は染料の適合セットを用い、セット中の各染料は他の染料とイオン特徴及びｐＨ特徴並びにタンパク質への共有結合付着の化学反応性において一般に等しいが、異なる波長において蛍光を発するので、目視されたときに異なる色のルミネセンスを示す。染料は分子量においてほぼ等しいことが好ましいが、そうであることが必ずしも必要ではない。染料の適合セット中の各染料が、細胞抽出物の種々なサンプルのセットの異なる１つのサンプル中のタンパク質を標識するのに用いられるので、各細胞抽出物サンプルが染料セット中の異なる染料によって標識されることになる。標識後に、抽出物を混合し、同じゲル中で一次元又は二次元電気泳動によって電気泳動させる。

図１の概略図を参照すると、第１細胞抽出物を第１群の細胞から公知方法によって調製し（１）、次に例えばプロピル－シアニン（３）－ＮＨＳのような、染料の適合対の第１染料によって標識する。第２細胞抽出物を第２群の細胞から公知方法によって調製し（２）

、次に例えばメチルーシアニン（５）－ＮＨＳのような、染料の適合対の第２染料によって標識する。シアニン（３）及び（５）染料の構造と製造方法は以下に説明する。細胞抽出物混合物を標識するために、染料の反応性形とタンパク質抽出物とを例えば試験管（３）のような適当な容器中で染料の反応性形と抽出物中のタンパク質上の可能な付着若しくは結合部位との間の共有結合の形成を可能にするために充分な期間インキュベートする。この期間は温度に依存して一般に１５～３０分間である。温度範囲は一般に約０℃～２５℃である。タンパク質分子上の有効結合部位の充分な割合が染料と共有結合した後に、染料とタンパク質との反応をクエンチすることができる。任意の適当な公知クエンチ物質を用いることができる。

第１群及び第２群の細胞（１、２）は、それらのタンパク質含量を比較又は対比したいと望まれる任意の２セットの細胞であることができる。例えば、第１群の細胞は野生型の、又は通常の細胞であることができ、第２群の細胞は同じ種からの突然変異細胞であることができる。或いは、第１群の細胞が正常細胞であり、第２群の細胞が同じ個体からの癌細胞であることができる。異なる発達段階又は細胞サイクルの異なる相における同じ個体からの細胞を用いることもできる。発達中の胚から、例えば、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒの腹面くびれ(ventral furrow)からの細胞を第１群細胞として回収し、腹面くびれに隣接して発達する細胞を第２群細胞として回収することができる。異なる種からの同じ種類の細胞の間のタンパク質組成の差異も本発明の方法による研究の課題であることができる。さらに、本発明の方法を用いて、細胞が種々な刺激又は薬物にどのように反応するかをモニターすることができる。タンパク質変化によって表現される細胞挙動を変化させうるイベントの全てを、高度に正確な２Ｄ　ＰＡＧＥ系を必要とせずに、またその費用をかけずに検出することができる。当業者は、比較のためのタンパク質が例えば血清、尿又は脊髄液のような生物学的流体から得ることもできることを認識するであろう。

標識サンプルを混合し、図１に示すように、１つのゲル（４）に測定済みアリコートとして供給して、次に好ましくは２Ｄ　ＰＡＧＥに供する。２Ｄ　ＰＡＧＥの代わりに一次元ＳＤＳ電気泳動を用いることができる。一次元電気泳動と二次元電気泳動の実施方法は当業者に周知である。

２つの細胞群が共通に有するタンパク質が一致したスポット（６）を形成する。いずれの群からの同じタンパク質の間の蛍光強度の比も大部分のタンパク質に関して一定である。２群が共通に有さないタンパク質（８、９）は独立的に移動する。したがって、１つ群に特有であるか又は異なる相対的濃度であるタンパク質はタンパク質スポットの大部分とは異なる比の蛍光強度を有し、用いたラベルに依存して、タンパク質抽出物のいずれか一方に特有な色を生じる。例えば、第１サンプル中に存在するタンパク質は赤色に標識され、第２群は青色に標識される。各群からの正確に等しい量のタンパク質を混合し、同じゲル上でランする条件下で、蛍光強度の比はタンパク質の大部分に関して１である。いずれか一方の群に特有であるようなタンパク質は、順序(order)又は比率(ratioing)に依存して、１より小さい又は１より大きい蛍光強度を有する。

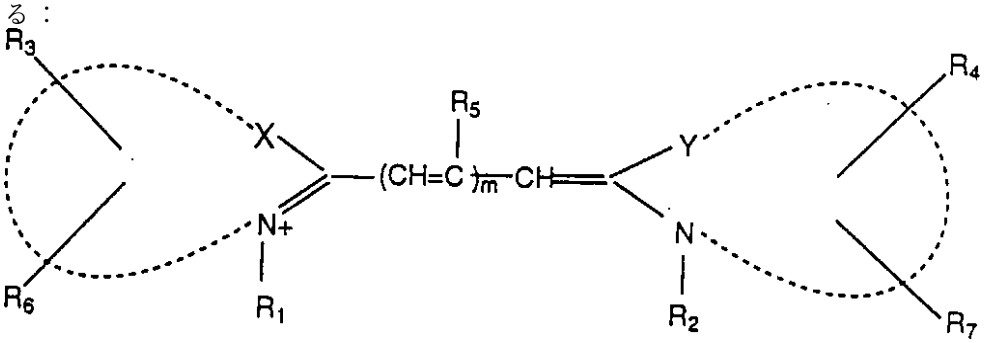
ゲルを二波長蛍光スキャナーによって、蛍光顕微鏡によって、又は蛍光を検出するための任意の公知手段によって分析することができる。ゲル分析はタンパク質差異のコンピュータ利用同定手段によって完全に自動化することができる。光電子増倍管又は電荷結合デバイス（ＣＣＤ）カメラと白色光源とを備えたレーザー走査系のような電子検出系を用いて、ラベルの異なるスペクトル特徴に適応できる異なる既知フィルターによって、２つの電子イメージが湿ったゲルから形成される。一方のイメージは第１染料の波長において放出される光以外の全ての光を濾過して除去するために適当な、第１フィルターを用いて第１染料の蛍光を調べ、他方のイメージは第２染料の波長において放出される光以外の全ての光を濾過して除去するために適当な、第２フィルターを用いて第２染料の蛍光を調べる。暴露は約５～５００秒間である。サンプルの差異は電気泳動中に又は電気泳動後の１／２時間以内に同定されることができる。第２イメージから第１イメージをサブトラクト(subtract)して、異なるスポットを同定する幾つかのソフトウェアパッケージが商業的に入手

可能である、或いは、両イメージに共通でないスポットのみを残すようにイメージを分割することができる。イメージのサブトラクトでは、同様のスポットは相互に相殺されて、異なるスポットのみを残す。比率分析(ratio analysis)では、同様のスポットは１の値を生じる。差異は１より大きいか又は１より小さい値を生じる。

慣用的な分析では、供試細胞種類についての既知タンパク質を有する対照を流す。サンプルゲル上の既知スポットを同定し、マーキングし、対照及び第２ゲルと比較し、２つのゲル間の差異を測定しなければならない。本発明では、１つのゲルのみが存在するので、マーキングは必要ない。さらに、タンパク質差異を比較し対比する前に異なるゲルを配列させるために慣用的方法で用いられるソフトウェアは、局部的歪みと、２つ以上のゲル間の不一致とを修正しない。本発明の方法は、全ての供試サンプルの抽出物が混合され、同一ゲル上で流されるので、このような修正の必要性を除去する。如何なるゲル歪みも各サンプルによって同じように経験される。

染料の適合セットの選択と合成は重要である。本発明の方法では、蛍光染料がタンパク質に、好ましくはタンパク質のリシン残基を介して、共有結合によってカップリングされるが、このカップリングはタンパク質のスルフヒドリル又はカルボン酸残基に対してであることもできる。他のアミノ酸を排除して、１つのアミノ酸残基にラベルを強制的に付着させるためのｐＨの調節は、Ｒ．Ｂａｋｅｒ、Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ（Ｐｒｅｎｔｉｃａ Ｈａｌｌ，１９７１年刊行）に述べられているように、周知の技術である。タンパク質の分析のために、複数個の付着部位を標識する。標識する付着部位の最適の割合は、選択した染料に依存する。以下で詳しく考察する好ましい染料を用いる場合には、タンパク質の不溶性化を避けるために、好ましくは付着部位の２％以下、より好ましくは１％よりやや少なくを標識する。したがって、典型的なタンパク質が約７％のリシンを含む場合には、千分の一未満の修飾アミノ酸が存在することになる。典型的なタンパク質は約４５０アミノ酸から成る。リシンが付着部位である場合には、共有結合がリシンの第１級アミノ酸の正電荷を消失させる。等電点電気泳動は電荷に依存するので、この電荷消失を補償することが重要である。塩基残基は塩基性に留まるべきである。タンパク質当たり１残基のｐＫａを３程度だけ変えることは、修飾された残基が塩基性であるか又は酸性であるかが状況に応じて変化しないかぎり、許容されうる。ローダミン及びフルオレセインのような染料は電荷の相違のために適切ではない。

評価された第１群の染料はＭｕｊｕｍｄａｒ，Ｒ．Ｂ．等，“イソチオシアネート基を含有するシアニン染料標識試薬”，Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ，１０：１１～１９（１９８９）及びＷａｇｇｏｎｅｒ等，米国特許第５，２６８，４８６号，名称“アリルスルホネートシアニン染料を用いた、物質の標識及び検出方法”（１９９３年発行）（本明細書に援用される）に述べられている蛍光シアニン染料であった。シアニン染料は下記一般構造を有する：

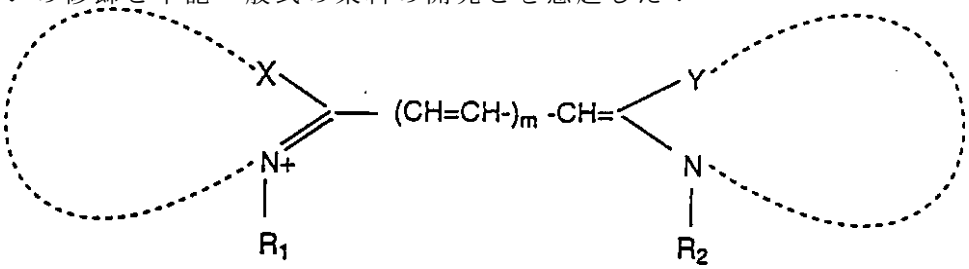


式中、ＸとＹはＯ、Ｓ又は（CH_3）$_2$－Ｃであることができ、ｍは１～３の整数であり、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6又はR_7の少なくとも１つはアミノ、ヒドロキシ又はスルフヒドリル求核試薬と反応する反応基である。点線はシアニン染料の形成のために必要な炭素原子を表し、好ましくは、これらの炭素原子は各環に５～６原子を有する３縮合環を形成する。R_3、R_4、R_6及びR_7は環に結合する。反応性部分は任意の公知の反応基であることができる。発色団に直接又は間接的に結合してR_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6又は

R_7基を形成することができる反応基は、例えばイソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、モノ－又はジ－ハロゲン置換ピリジン、モノ－又はジ－ハロゲン置換ジアジン、マレイミド、アジリジン、スルホニルハライド、酸ハライド、ヒドロキシスクシンイミドエステル、ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、３－（２－ピリジルジチオ）－プロプリオンアミド、グリオキサル及びアルデヒドを含有する基のような反応性部分を包含しうる。

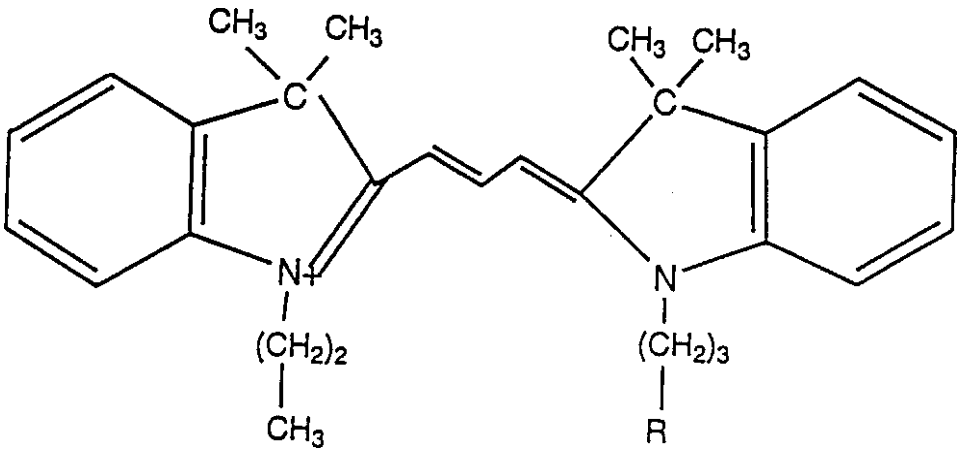
Ｗａｇｇｏｎｅｒ等の特許に述べられたシアニン染料は、それらの固有の正電荷のために選択される発蛍光団であった。シアニンはヘキサン酸の活性化エステルを介してタンパク質に結合する。このカップリングはリシン側鎖の電荷を消失させるが、染料中の固有の電荷は補償される。これは実際にタンパク質分子から電荷を移動させるが、電気泳動されるサンプル中に同じ総電荷が維持される。シアニン染料分子中では、２個の官能性化(functionalized)インドール環がポリエンリンカーを介して結合される。シアニン染料のスペクトル特徴は、染料のインドール環の間のリンカーの長さを単に変えることによって、容易に調節することができる。長い又は短いリンカー長さは異なる波長の蛍光を生じ、したがって、異なる色を生じる。しかし、リンカー長さの変化は染料の分子量を変えることになる。電気泳動はタンパク質の質量にも依存するので、タンパク質の質量に対する染料の影響も重要でありうる。電気泳動前にタンパク質を標識するので、タンパク質に結合した染料の質量が抽出物中の種々なタンパク質の分子量の相対的な差異を有意に変えてはならない。しかし、タンパク質上の比較的少数の部位のみが標識されるにすぎないので、分子量は重要ではない。上述したように、可能な付着部位の約２％まで、好ましくは１％未満が標識される。これより多くを標識する場合には、適合染料のセット中の染料の全体的に等しい分子量を維持することが重要な問題になる。

蛍光シアニン染料のリンカーの長さの変化によって生じる分子量の相違は染料のインドール環の１つに結合した脂肪族差R_1又はR_2のサイズを調節することによって相殺することができる。R_1又はR_2の１つは反応基でなければならない。これらの設計の制約はシアニンの修飾と下記一般式の染料の開発とを惹起した：

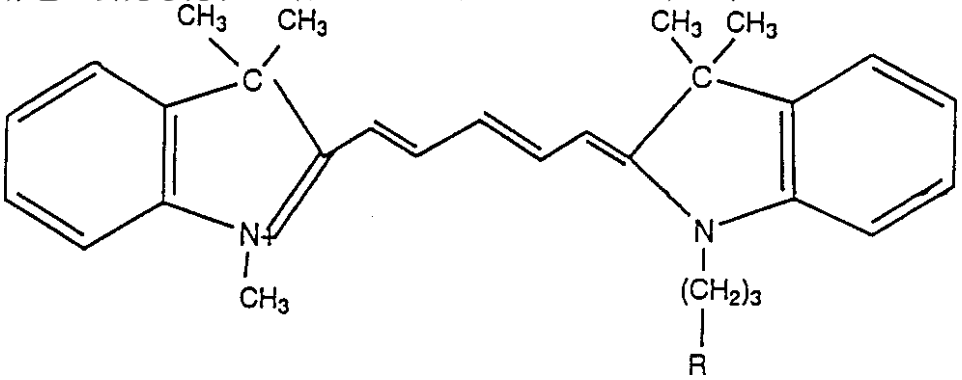


式中、ＸとＹはＳ、Ｏ又はＣＨ$_3$－Ｃ－ＣＨ$_3$に等しく、ｍは１～３の整数であり、R_1又はR_2の１つは例えば非修飾シアニン染料に関して上述した反応基のような、細胞抽出物中のタンパク質に共有結合することができる反応基である。点線は各環に５又は６炭素原子を有する１、２又は３縮合環を表す。各側は他方の側と均衡するべきである。

一般式に従って開発した、染料の適合対の例を下記に挙げる：



赤色の蛍光を発する（プロピルシアニン－ＮＨＳ）と、



スペクトル中で遠赤外部を発する（メチルシアニン　５－ＮＨＳ）（式中、Ｒは反応基である）。上述したように、Ｏ又はＳ又はこれらの組合せをＸとＹの位置に（CH_3）$_2$Ｃ－の代わりに配置することができる。

シアニン染料は本発明の染料の適合セットのための１つの選択である。シアニンの代わりに、例えばジピロメタンホウ素ジフルオリド染料、Ｈａｕｇｌａｎｄ等の米国特許第４，７７４，３３９号に述べられ、本明細書に援用され、商標ＢＯＤＩＰＹ（登録商標）でＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ社によって販売されている、誘導体化４，４－ジフルオロ－４－ボラ－３ａ，４ａ－ジアザ－Ｓ－インダンス染料のような、他の染料も使用可能である。正味の電荷を有さないＢＯＤＩＰＹ（登録商標）染料は、アミド結合を形成する活性化ｎ－ヒドロキシスクシンイミジルエステルを用いて、リシン側鎖に共有結合する。結果はリジン正電荷の消失である。それ故、正に電荷したリンカー基を本発明の適合染料に用いて、失われた第１級アミンの代わりにリンカーの第３級アミンを補充する。ＢＯＤＩＰＹ（登録商標）染料の製造方法は米国特許第４，７７４，３３９号に述べられている。正に荷電したリンカーの付加は、当業者に周知の方法によっておこなわれる。リンカーは（１）ＢＯＤＩＰＹ（登録商標）－ＮＨＳエステルと反応するため；（２）所望の電荷を有するため；及び（３）ＢＯＤＩＰＹ（登録商標）－リンカー構築体が抽出物中のタンパク質の特定のアミノ酸残基と反応するように活性化されるように、３官能基を用いて設計することができる。

染料の適合セットに関する主要な考察は、電荷と、固有の異なるスペクトル特徴との維持である。正の(positive)リンカーを有する中性染料、又は好ましくは各々が＋１電荷を有し、他の点では本明細書に述べる要件を満たす、任意の正に荷電した染料が本発明の染料の適合セットにおける染料として役立つことができる。標識タンパク質のサンプルの大体等しい分子量が望ましいが、上記で説明したように、このことは重要ではない。好ましい実施態様では、シアニン染料の固有の正電荷がリシンの正電荷と置換するために有利に用いられる。シアニンとリシンとのｐＫａはかなり異なるが、染料：タンパク質比が１未満になるように条件を選択した。この低レベルの標識は二次元電気泳動ゲル上でのタンパク質の移動の変化が無視できる程度であることを保証する。リシンのｐＫａにさらに密接に

一致する染料を用いることができる。或いは、他のアミノ酸残基を修飾する染料を、アミノ酸のイオン特徴がこの修飾によって保存されるかぎり、用いることができる。リシンの代わりに、タンパク質上の付着部位がスルフヒドリル又はカルボキシル基であることができる。スルフヒドリル基がタンパク質上の付着部位である場合には、染料上の対応付着部位はヨードアルキル基である。カルボン酸基がタンパク質上の付着部位である場合には、染料上の対応付着部位はクロロケトン又はカルボジイミドである。

本発明の方法が異なるサンプル中の異なる核酸の存在を検出するためにも使用可能であることが予想される。核酸の電荷は非常に負である。それ故、染料の添加が核酸の総電荷を変化させないので、核酸分析を考える場合に、染料の適合セットの選択は電荷消失を補償する必要がない。染料の付着を容易にするために、核酸の核に由来する遊離アミノ酸を有するように核酸を当業者に周知の方法によって修飾することができる。この場合にもリシンが適切であると考えられる。

実施例１

染料（メチルシアニン　５及びプロピルシアニン　３）の合成

１．インドール誘導体（両染料に共通）の合成：

４０ｍｌの１，２－ジクロロベンゼン中の４．８ｇ（３０ミリモル）の２，３，３－トリメチル－（３Ｈ）－インドールと３５ミリモルの所望のブロモアルキル試薬（６－ブロモヘキサン酸又は１－ブロモプロパン）とを窒素ガス下で１１０℃に加熱し、一晩還流加熱した。生成物（酸インドール、メチルインドール又はプロピルインドール）が橙色ガムとして沈殿した。この懸濁液をデカントし、ガムをエチルエーテルによって数回洗浄した。この中間体をそのまま用いた。

２．シアニン（３）（Ｃｙ－３）中間体：

１．５ｇ（７．５ミリモル）のプロピルインドールを２０ｍｌの氷酢酸中の１．６ｇ（７．６ミリモル）のＮ，Ｎ’－ジフェニルホルムアミドに加えて、４時間還流させた。溶媒を真空下で除去し、深橙色のシロップを残した。この中間体をそのまま用いた。

２ａ．シアニン（５）（Ｃｙ－５）中間体：

Ｃｙ－５中間体の合成は、２－メチレン－１，３，３－トリメチルインドリンをプロピルインドールの代わりに用い、リンカーがマロンアルデヒドジアニルであった以外は、染料合成の工程２におけるＣｙ－３中間体の合成と同じである。ガム状の青みを帯びた中間体をエチルエーテルによって２回洗浄した。

３．Ｃｙ－３：

２．５ｍｌのトリエチルアミンと１．８ｍｌの無水Ac_2Oとを工程２からの中間体に加え、この混合物を５分間沸騰させた。１．７０ｇ（５．０ミリモル）の酸インドールを加え、混合物を２時間還流させた。溶媒を真空下で除去し、生成物を１０ｍｌのＥｔＯＨ中に溶解した。

３ａ．Ｃｙ－５の製造は、工程２からの中間体の代わりに工程２ａからの中間体を用いたこと以外は、Ｃｙ－３の製造と同じである。

４．工程３及び３ａからの生成物の精製：

メチルＣｙ－５とプロピルＣｙ－３とをシリカゲル固相と、移動相としてのジクロロメタン中の４０％ＭｅＯＨとを用いるフラッシュクロマトグラフィーの実施によって汚染性副生成物から分離した。

５．カルボキシル基の活性化：

一定量の精製物質を５ｍｌの乾燥ジメチルホルムアミジン（ＤＭＦ）中に溶解することによって、各染料のカルボン酸部分をＮ－ヒドロキシスクシンイミジルエステルに転化させた。１．５当量のＮ，Ｎ’－ジスクシンイミジルカーボネート（ＤＳＣ）を０．１ｍｌの乾燥ピリジン／１００ｍｇ染料と共に加えた。この反応を窒素下、６０℃において９０分間還流させた。

実施例２

タンパク質標識：

１．細菌培養物：

Ｃｈａｓｍａｎ，Ｄ．Ｉ．等，“ｉｎ ｖｉｔｒｏでのヘルペスウイルスＶＰ１６とＧＡＬ４誘導体による酵母ポリメラーゼＩＩ転写の活性化”，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，９：４７４６～４７４９（１９８９）によって述べられているように、ｌａｃプロモータの制御下でキメラＧＡＬ４ＶＰ１６タンパク質を発現するＥ．ｃｏｌｉ上で初期実験をおこなった。２種類の細菌培養物を５０μｇ／ｍｌアンピシリンを含有する１２５ｍｌの標準ＬＢ培地中で３７℃において０．７のOD_{600}まで増殖させた。イソフェニルチオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）、ラクトースの非加水分解性類似体を１培養物に１ｍＭの最終濃度で加えた。両方の培養物をさらに２．５時間インキュベートした。

２．二次元ゲル電気泳動のためのタンパク質単離：

タンパク質単離を次のようにおこなった。細菌を遠心分離によって単離した。各細菌ペレットを５ｍＭ Ｈｅｐｅｓ ＫＯＨ ｐＨ８．４，５ｍＭ Ｍｇ（ＯＡｃ）$_2$を含有する音波処理緩衝剤(sonication buffer)で洗浄した。ペレットを５０μｇ／ｍｌ ＲＮアーゼを含有する音波処理緩衝剤中に１００μｌの最終量まで再懸濁させた。これを次に氷中で溶液が透明になるまで、通常は数分間音波処理した。ＤＮアーゼを５０μｇ／ｍｌまで加え、サンプルを０℃において３０分間インキュベートした。固体の尿素とＣＨＡＰＳとをそれぞれ８Ｍと５％の最終濃度まで加えた。サンプルを氷から取り出し、１倍量の溶菌緩衝剤(lysis buffer)を加えた。サンプルを直ちに標識するか、又は－８０℃において貯蔵した。

３．タンパク質標識：

５０μｇのタンパク質につき２ナノモリの染料の濃度で細胞抽出物の第１サンプルにプロピルＣｙ－３－ＮＨＳを加え、第２サンプルにメチルＣｙ－５－ＮＨＳを加えた。染料ストック溶液は典型的に、ジメチルホルムアミド中２ｍＭであった。反応を０℃において３０分間インキュベートした。温度と供試細胞の種類とに依存して、インキュベーション時間は約１５分間から約３０分間まで変動することができる。温度が約２５℃である場合には、インキュベーションは１５分間であることができる。温度はタンパク質を分解させる温度を越えるべきではない。標識サンプルは直ちに等電点電気泳動に供したか、又は－８０℃において貯蔵した。

４．ＳＤＳ－ゲル電気泳動のためのタンパク質単離と標識：

ＲＮアーゼもＤＮアーゼも加えなかった以外は、タンパク質標識方法の工程２におけると同様に、細菌を増殖させ、音波処理によって単離した。細胞抽出物をタンパク質標識方法の工程３におけると同様に、直接標識した。ＳＤＳ、グリセロール、Ｔｒｉｓ ＨＣｌ（ｐＨ６．８）及びブロモフェノールブルーをそれぞれ１％、１０％、６４ｍＭ及び５μｇ／ｍｌの最終濃度になるように加えた。次に、サンプルを沸騰水浴に２分間入れてから、電気泳動に供した。

５．染料のタンパク質に対する比の決定：

標識タンパク質に付随した溶解性問題を防止するために、細胞抽出物中のリシンの１～２％のみを標識するように条件を選択した。これは平均的タンパク質のアミノ酸の７％がリシンであるという想定に基づくものである。染料のタンパク質に対する比の決定の第１工程はＳＭ－２ビーズ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）への吸着による遊離染料の除去であった。タンパク質濃度は$OD_{260/280}$によって測定した。染料含量はそれぞれプロピルＣｙ－３及びメチルＣｙ－５に対してＯＤ５４８及びＯＤ６５０によって測定した（両方の染料に対してε＝１００，０００）。

実施例３

ゲル電気泳動：

１．二次元電気泳動：

高分解能二次元ゲル電気泳動を周知方法によっておこなった。

２．ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動：

ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動を公知方法によっておこなった。

実施例４

蛍光ゲルイメージング：
電気泳動の終了時に、ゲルを２５％メタノールと７％酢酸とから成る溶液中に浸漬した。ゲル中で蛍光標識タンパク質を次のようにイメージングさせた(imaged)。ゲルを陽極酸化処理済みアルミニウムの表面上に配置し、６０°の入射角度でスライドプロジェクター(slide projector)内に収容した３００Ｗハロゲンランプによって照射した。プロジェクターを出る光はＣｙ－３とＣｙ－５に対して、それぞれ、５４５±１０ｎｍと６３５±１５ｎｍの１’直径帯域通過フィルター（Ｃｈｒｏｍａ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｂｒａｔｔｌｅｂｏｒｏ ＶＴ）に通した。５０ｍｍレンズ（Ｎｉｋｏｎ）と、Ｃｙ－３とＣｙ－５に対して、それぞれ、５８７±１７．５ｎｍと６９５±３０ｎｍの二重帯域放出通過フィルター（Ｃｈｒｏｍａ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｂｒａｔｔｌｅｂｏｒｏ ＶＴ）とを備えた、冷却ＣＣＤカメラ（Ｐｈｏｔｏｍｅｔｒｉｃｓ社，Ｔｕｃｓｏｎ ＡＺ）に、イメージを集めた。このＣＣＤカメラをＭａｃｉｎｔｏｓｈ ＩＩ ｓｉ コンピュータ操作Ｐｈｏｔｏｍｅｔｒｉｃカメラコントローラーソフトウェアによって制御した。イメージ集積時間は十分の数秒から数分間までの範囲であった。プロジェクターに取り付けられたフィルターホイール(filter wheel)には励起フィルター(excitation filter)が内蔵された。ゲルを移動させずに、２つのフィルターからの照射によって、２つの連続イメージを記録した。

実施例５

イメージ処理：
イメージファイルをＰｅｒｓｏｎａｌ Ｉｒｉｓ４Ｄ／３５（Ｓｉｌｉｃｏｎ Ｇｒａｐｈｉｃｓ社，Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ ＣＡ）に移した。次に、イメージファイルをＤｅｌｔａＶｉｓｉｏｎ™ソフトウェア（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ，Ｍｅｒｃｅｒ Ｉｓｌａｎｄ ＷＡ）を用いて処理した。ゲル上の異なって標識されたサンプル間の差異を評価するために、２つのスキームを用いた。

１．サブトラクション：
各イメージはピクセル強度のグリッド様アレイと見なすことができる。数値のこれらのアレイは幾つかの演算方式で処理することができる。この場合に１つのイメージを他方のイメージからサブトラクトした(subtracted)。ゲル上に負荷された２種類のサンプルは総合的蛍光に関して完全には平衡を保たれていないので、１つのイメージに平衡定数(balancing constant)を乗じた。このファクターは、サンプル間の差異の数が小さく維持されるように任意に定められた。

２．比率イメージング：
この場合には、１つのイメージを他方のイメージによって除した。この操作をおこなう前に、イメージを最初に通常の強度範囲に標準化した。これは各イメージの最小及び最大ピクセル値を零と、任意の大きい値、４０９５、用いたＣＣＤカメラの最大に可能な出力値とに設定することによってなされた。中間のピクセル値はこれらの値の間で線形に目盛りを定められた。次に、１つのイメージを他方のイメージによって除した。この場合に、平均的商を１に維持するために平衡ファクターをも用いた。示差領域は１より大きい商を有する領域であった。

実施例６

１．細菌における誘導ＧＡＬ４ＶＰ１６発現の示差ＳＤＳゲル電気泳動：
図２は単一ＳＤＳポリアクリルアミドゲル上で流したプロピルＣｙ－３標識タンパク質とメチルＣｙ－５標識タンパク質とのイメージを示す。
レーン１～３はＣｙ－３標識タンパク質を示す。これらのレーンに負荷させたサンプルは次のようであった：
レーン１．プロピルＣｙ－３標識ＩＰＴＧ誘導細菌抽出物。
レーン２．プロピルＣｙ－３標識ＩＰＴＧ誘導細菌抽出物　プラス　メチルＣｙ－５標識非誘導抽出物。
レーン３．プロピルＣｙ－３標識精製ＧＡＬ４ＶＰ１６タンパク質。
レーン４～６はＣｙ－５標識タンパク質を示す。これらのレーンに負荷させたサンプルは

次のようであった：
レーン４．プロピルＣｙ－３標識ＩＰＴＧ誘導細菌抽出物。
レーン５．プロピルＣｙ－３標識ＩＰＴＧ誘導細菌抽出物　プラス　メチルＣｙ－５標識非誘導抽出物。
レーン６．プロピルＣｙ－３標識精製ＧＡＬ４ＶＰ１６タンパク質。
レーン５のみがＣｙ－５蛍光を示した。
レーン７と８はそれぞれレーン２－レーン５とレーン３－レーン６とのサブトラクトされた生成物(subtracted product)を示す。矢印は、レーン８における精製ＧＡＬ４ＶＰ１６帯の位置によって確認されたＧＡＬ４ＶＰ１６の位置を指摘する。上部帯の同定は不明である。しかし、β－ガラクトシダーゼを含めて、ＩＰＴＧによって誘導されると分かっている幾つかのタンパク質が存在する。
レーン９～１１はＣｙ－５標識タンパク質を示す。これらのレーンに負荷させたサンプルは次のようであった：
レーン９．　メチルＣｙ－５標識ＩＰＴＧ誘導細菌抽出物。
レーン１０．メチルＣｙ－５標識ＩＰＴＧ誘導細菌抽出物　プラス　プロピルＣｙ－３標識非誘導抽出物。
レーン１１．メチルＣｙ－５標識精製ＧＡＬ４ＶＰ１６タンパク質。
レーン１２～１５はＣｙ－５標識タンパク質を示す。これらのレーンに負荷されたサンプルは次のようであった：
レーン１２．メチルＣｙ－５標識ＩＰＴＧ誘導細菌抽出物。
レーン１３．メチルＣｙ－５標識ＩＰＴＧ誘導細菌抽出物　プラス　プロピルＣｙ－３標識非誘導抽出物。
レーン１４．メチルＣｙ－５標識精製ＧＡＬ４ＶＰ１６タンパク質。
レーン１２～１５のみが全て若干のＣｙ－３蛍光を示した。これは帯域通過フィルター間の軽度なクロスオーバーによるものである。これは、Ｃｙ－３光によって励起されたときにＣｙ－５標識物質を出現させる。この逆は見られない。Ｃｙ－３物質はＣｙ－５励起光によって可視化されない。クロスオーバー効果を除去するには２方法がある：より良好な帯域通過フィルターを設計すること、又はコンピュータ計算により、クロスオーバー定数(crossover constant)を知ることによってＣｙ－３イメージへのＣｙ－５寄与を除去すること。
レーン１５と１６とはそれぞれレーン２－レーン５とレーン３－レーン６とのサブトラクトされた生成物を示す。矢印は、レーン８における精製ＧＡＬ４ＶＰ１６帯の位置によって確認されたＧＡＬ４ＶＰ１６の位置を指摘する。上部帯の同定は不明である。しかし、β－ガラクトシダーゼを含めて、ＩＰＴＧによって誘導されると分かっている幾つかのタンパク質が存在する。
２．細菌における誘導ＧＡＬ４ＶＰ１６発現の示差二次元ゲル電気泳動：
図３はプロピルＣｙ－３標識ＩＰＴＧ誘導細菌抽出物　プラス　メチルＣｙ－５標識非誘導抽出物を負荷された二次元ゲルの一部のイメージを示す。
パネルＡ．Ｃｙ－３励起光によって撮影されたイメージ、ＩＰＴＧ誘導タンパク質を示す。
パネルＢ．Ｃｙ－５励起光によって撮影されたイメージ、非誘導タンパク質を示す。
パネルＣ．Ｃｙ－５イメージによって除されたＣｙ－３イメージの比率。
パネルＤ．パネルＣのイメージの重ね合わせ、赤色に着色、青色に着色したパネルＢからのイメージ上に配置。
３．外因的にタンパク質を添加した細菌抽出物の示差二次元ゲル電気泳動：
図４は、外因的にカルボニックアンヒドラーゼを加えたプロピルＣｙ－３標識細菌抽出物　プラス　カルボニックアンヒドラーゼを加えないメチルＣｙ－５標識抽出物を負荷された二次元ゲルの一部のイメージを示す。
パネルＡ．Ｃｙ－３励起光によって撮影されたイメージ、細菌タンパク質　プラス　カルボニックアンヒドラーゼを示す。

パネルＢ．Ｃｙ－５励起光によって撮影されたイメージ、細菌タンパク質のみを示す。
パネルＣ．Ｃｙ－５イメージによって除されたＣｙ－３イメージの比率。
パネルＤ．パネルＣのイメージの重ね合わせ、赤色に着色、青色に着色したパネルＢからのイメージ上に配置。
本発明の方法は、異なる細胞のタンパク質含量の差異を分析するための簡単で、安価な方法を提供する。この方法は、別々に電気泳動しなければならない２種類の別々のゲルを用いた場合に生じうる問題を解消する。異なる細胞抽出物を標識するために用いられる適合染料は単独ゲルにおける細胞抽出物の２種類以上の異なるサンプルの同時電気泳動を可能にする。本発明を細胞抽出物の２種類のサンプルと染料の適合対に関して説明してきたが、３種類以上のサンプルを等しい数の適合染料を用いて同時に試験することができることを当業者は理解するであろう。染料のスペクトル特徴が幾つかの異なる波長で蛍光を生じて、目視的に固有のイメージを生じるように処理されることができ、染料のｐＨ特徴及びイオン特徴が、染料への共有結合によってタンパク質に生じた変化を補償するように一般的に等しくされるかぎり、多重の染料が使用可能である。

【図１】

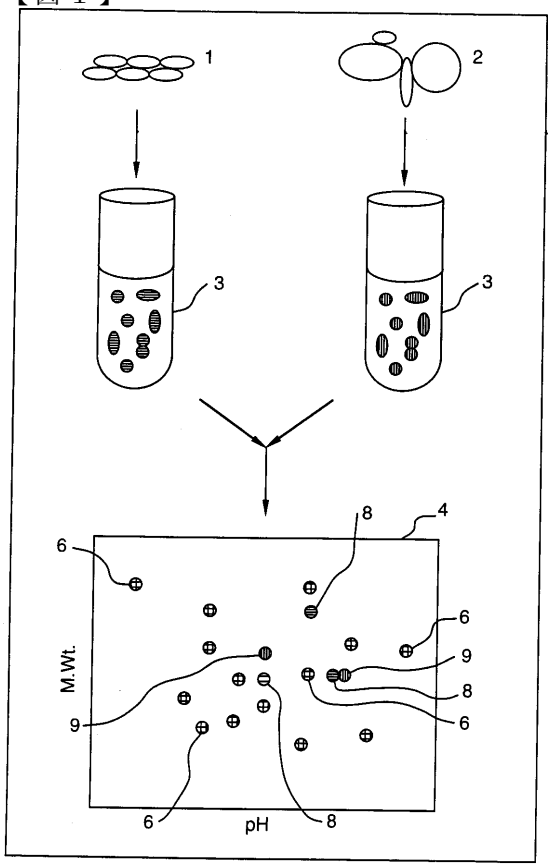


FIG. 1

【図２】

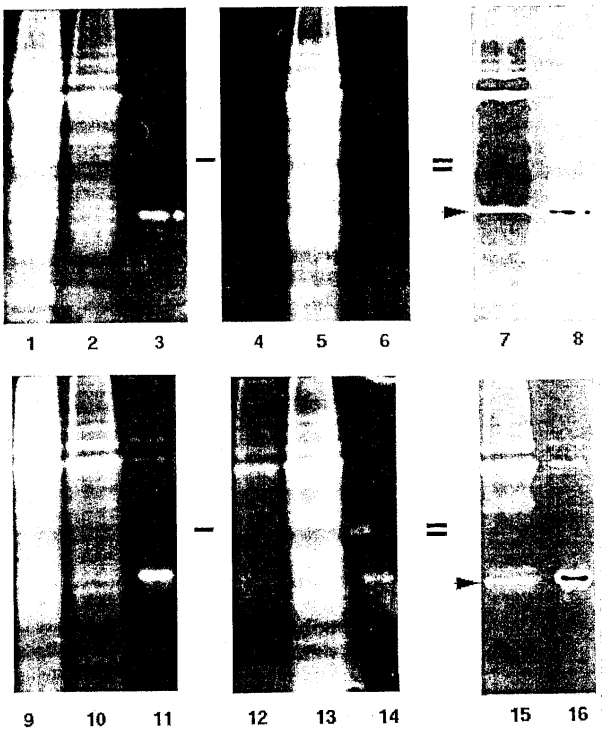


FIG. 2

【図３】

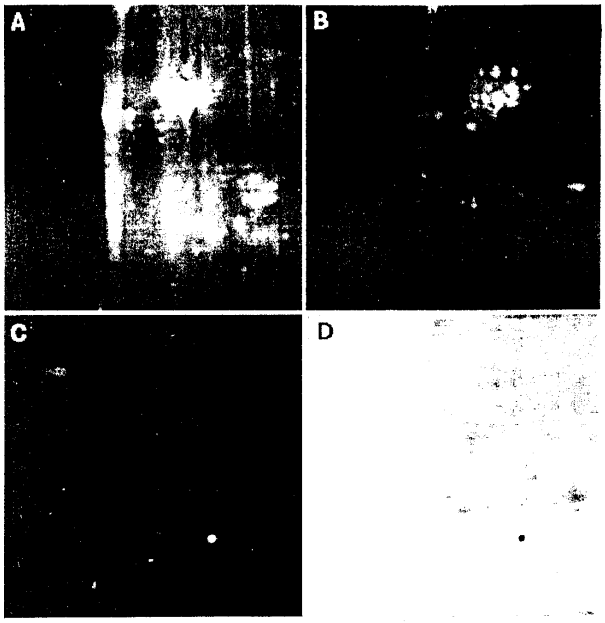


FIG. 3

【図４】

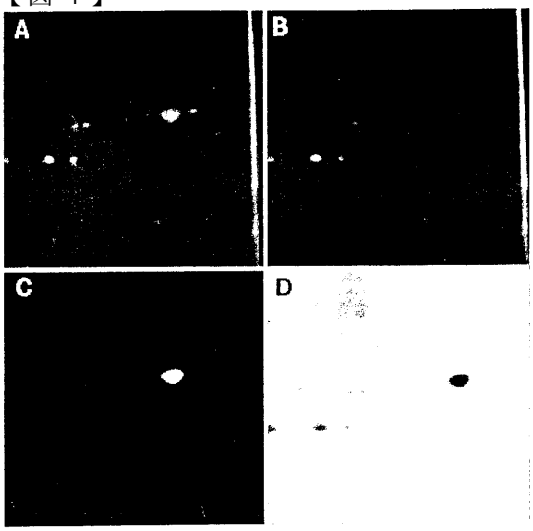


FIG. 4

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]　　FI
　　G01N 27/26　315H

(74)代理人
　　弁理士　田中　玲子
(72)発明者　ミンデン，ジョナサン
　　アメリカ合衆国ペンシルバニア州１５２０６，ピッツバーグ，カローヒル・ストリート　５８２１
(72)発明者　ワゴナー，アラン
　　アメリカ合衆国ペンシルバニア州１５２０８，ピッツバーグ，サウス・レキシントン・アベニュー　１２１

審査官　宮澤　浩

(56)参考文献　特開平０５－３２２７７０（ＪＰ，Ａ）
　　特開平０２－１９１６７４（ＪＰ，Ａ）
　　特開平５－３２２７７１（ＪＰ，Ａ）
　　特開平３－２９３５５７（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
　　G01N 33/68
　　C09B 23/00
　　G01N 27/447
　　G01N 33/48
　　G01N 33/58