

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第4143719号
(P4143719)

(45) 発行日 平成20年9月3日 (2008.9.3)

(24) 登録日 平成20年6月27日 (2008.6.27)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 27/447 (2006.01)

GO 1 N 27/26 3 3 1 D

BO 1 D 57/02 (2006.01)

BO 1 D 57/02

請求項の数 10 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2002-551574 (P2002-551574)	(73) 特許権者	595117091
(86) (22) 出願日	平成13年12月7日 (2001.12.7)		ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
(65) 公表番号	特表2004-516472 (P2004-516472A)		BECTON, DICKINSON AND COMPANY
(43) 公表日	平成16年6月3日 (2004.6.3)		アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O 7417-1880 フランクリン・レイクス
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/014408		ベクトン・ドライブ 1
(87) 国際公開番号	W02002/050524		1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY O7417-1880, UNITED STATES OF AMERICA
(87) 国際公開日	平成14年6月27日 (2002.6.27)		
審査請求日	平成16年11月5日 (2004.11.5)	(74) 代理人	100100561
(31) 優先権主張番号	100 63 097.9		弁理士 岡田 正広
(32) 優先日	平成12年12月18日 (2000.12.18)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キャリアレス電気泳動方法及びこの方法を実施する電気泳動装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル物質を検体に分離するキャリアレス電気泳動方法であって、第1段階で、前記サンプル物質の粗分別を行い、少なくとも1つの第2段階で、前記粗分別されたサンプル物質の精密分別を行うことを特徴とする方法であって、

前記第1段階では、前記第2段階よりも少ない数の分別サイトを用いる方法。

【請求項 2】

前記第1段階で、前記第2段階よりも大きな線流速、及び分離対象となる前記検体の前記第2段階よりも短い移動経路を用いることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

全段階を並列して同時に実行することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

段階の並列同時処理による実行と、少なくとも1つの段階の直列実行とを組み合わせることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 5】

分離チャンバと、電極と、分別部と、サンプル投入部とを備える電気泳動装置であって、前記分離チャンバが、独立した電極と独立した分別部と独立したサンプル投入部とをそれぞれ有する多数の独立した分離空間に分割され、前記独立した分別部が異なる数の分別サイトを有することを特徴とする装置。

【請求項 6】

隣接する分離空間が共通の電極を備えることを特徴とする請求項 5 に記載の装置。

【請求項 7】

媒体を同じ体積だけ導入し且つ放出するために、定量ポンプの 2 つの独立した移送チャンネルが、前記分離空間の、電極近くの分別出口の領域に接続されていることを特徴とする請求項 5 又は 6 に記載の装置。

【請求項 8】

前記分離チャンバは、それぞれ複数の独立した構造チャンバ要素から成る前部及び後部で構成されることを特徴とする請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 9】

前記後部が固体金属ブロックから成ることを特徴とする請求項 8 に記載の装置。

10

【請求項 10】

前記金属ブロックが冷却パイプを備えることを特徴とする請求項 9 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サンプル物質を検体に分離するキャリアレス電気泳動方法及びこの方法を実行する電気泳動装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

既知のキャリアレス F F E 電気泳動方法は、独立した電極空間をただ 2 つ、及びこの電極空間の間に分離空間をただ 1 つ備えた分離チャンバを有する電気泳動装置で行われるのが普通である。

20

【0003】

ところで、F F E をプロテオミクス研究の分野に用いる場合は、数多くの異なるサンプル物質を短時間で分離して、最大の分離量及びできるだけ高いサンプル物質のスループット率をあげる必要がある。

【0004】

しかし、大部分の分離処理におけるように、F F E の場合、電気泳動装置を分離性能とサンプルスループットとについて同時に最適化することは非常に狭い範囲でしか可能ではない。これは、サンプル物質の量が増加すると分離性能が低下するからである。

30

【0005】

また、分離性能を最適化するには、できるだけ狭くて精密な分離チャンバギャップを有する分離空間と、特定の分離境界条件、例えば比較的小さい線流速、できるだけ長い分離時間、並びに分離空間の全幅及び／又は分離空間の当該サンプル物質を分別する領域に渡ることができるだけの分別サイトなどが必要となる。しかし、線流速を自由に下げることが出来ないため、分離時間を延長するには電極の長さを相応に長くする必要がある。そしてこのことは、分離チャンバの外形寸法を同時に大きくする必要があることを意味するため、分離チャンバギャップを所望の精度で製造することが難しくなる。

【0006】

ドイツ特許出願公開公報第 2 2 1 5 7 6 1 A 1 号公報から、電気濾過処理によって作動する電気泳動装置が知られている。この既知の電気泳動装置は、分離チャンバと、分離チャンバの両側に配置された電極と、分別サイトと、サンプル投入サイトとを備える。分離チャンバ内には、分離チャンバを互いに接続された多数の分離空間に分割するいくつかのメンブレンが設けられる。メンブレンはフィルタとして機能し、いずれも分離対象となる種に対して透過性を有する。

40

【0007】

欧州特許出願公開公報第 0 2 0 3 7 1 3 A 2 号公報から、このような電気泳動装置において、メンブレンで区切られた分離空間の各々に対して、独立した 1 対の電極を設けることも知られている。

【0008】

50

【特許文献 1】

ドイツ特許出願公開公報第 2 2 1 5 7 6 1 A 1 号公報

【特許文献 2】

欧州特許出願公開公報第 0 2 0 3 7 1 3 A 2 号公報

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

このため、本発明の目的は、分離性能を向上し、分離時間を短縮し、高スループットを達成することが可能なキャリアレス電気泳動方法及びこの方法を実行する電気泳動装置を作成することにある。

【課題を解決するための手段】

この目的は、本発明によれば、請求項 1 に詳述のキャリアレス電気泳動方法によって達成される。

本発明に係る方法の特に好適な発展及び実施形態が、請求項 2 ～ 4 の主題である。

本発明に係る電気泳動装置が、請求項 5 の主題である。

本発明に係る電気泳動装置の特に好適な発展及び実施形態が、請求項 6 ～ 10 の主題である。

【0010】

本発明によれば、1 段階の分離処理でなく 2 段階の分離処理が用いられるため、分離性能とサンプルスループットが同時に最適化される。この処理では、できるだけ高いサンプルスループットを達成するために極めて高速な予備分離もしくは粗分別を行い、次いで少なくとも第 2 段階で、粗分別されたサンプル物質の部分流に対して所期の精密分別を行う。

【0011】

第 1 段階の粗分別におけるサンプルスループットの増大は、特に、線流速を大きくすると同時に分離対象となる検体の移動経路を短くして F F E による分離処理を行うことで達成される。このため、粗分別用の分別サイトの数をかなり少なくすることが可能であり、1 つのフラクションだけに注目するなら分別サイトを 1 つ設けるだけでもよい。この 2 段階処理を並列同時多重処理として実行することで、サンプルスループット率を更に上げることができる。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の好適な実施例を、対応する図面を用いて更に詳細に説明する。

図 1、図 2 及び図 3 に、本発明に係る分離チャンバの 3 つの例を、電気泳動装置の別々の実施例として図示する。分離チャンバが分離チャンバギャップを所要の精度で製造可能な外形寸法を有するように、いくつかの独立した分離空間を分離チャンバ内に設ける。図 1 では、4 つの独立した分離空間に、4 つの独立した媒体源と、それぞれ n 個 (n は 15 よりも小さい) の分別サイトを有する 4 つの独立した分別部とを設ける。図 2 は、2 つの独立した分離空間と、それぞれ n 個 (n は 50 よりも大きい) の分別サイトを有する 2 つの独立した分別部への 2 つの独立した媒体入口とを有する分離チャンバを示す。最後に、図 3 は、3 つの独立した分離空間と、3 つの独立した媒体入口と、 $n1$ 個及び $n3$ 個 ($n1$ は 15 よりも小さく、 $n3$ は 50 よりも大きい) の分別サイトを有する 2 つの独立した分別部と、更に、 $n2$ 個 ($n2$ は 15 よりも大きい) の分別サイトを有する独立した分別部を備えた分離チャンバを示す。

【0013】

図 1 ～ 図 3 に示す分離空間は、設計によって、独立した電極を備えるか、又は隣接する電極空間で同一の媒体を用いることが出来る場合には当該分離空間に共通の電極を備える。

【0014】

図 1 ～ 図 3 に示す分離チャンバによると、キャリアレス F F E 電気泳動を行って、少なくとも 2 段階処理の形でサンプル物質を検体へ分離することができる。第 1 段階では、サンプル物質の粗分別が行われ、少なくとも 1 つの第 2 段階では、粗分別されたサンプル物質の精密分別が行われる。

【0015】

この処理は、並列同時処理として又は連続処理で行うことができる。並列同時処理においては、図1及び図2に示す分離空間を、粗分別のための分離空間（図1）及び精密分別のための分離空間（図2）として使用できる。図3は、3段階処理の形での連続処理用の分離空間を示す。ここでは、粗分別が、2段階の精密分別と直列に組み合わせられている。

【0016】

並列処理法の場合、1つのサンプル物質をいくつかの分離空間に同時に計量投入することが可能であり、異なるサンプル物質を独立した分離空間に適用することも可能である。並列同時処理でサンプル物質を分離することで、サンプル物質のスループット率またはサンプル物質数を増やすことができる。

10

【0017】

独立した分離空間の幅を小さくすることで、検体の移動経路を短くすることができ、分離媒体及びサンプル物質の流速が大きい状態で分離処理を行うことができる。分離空間の数が増えるのに伴い、分離空間の幅は十分に小さくなるが、その結果として、サンプルスループットははるかに高くなるものの粗分別は1度しか可能ではなくなる。

【0018】

分離空間を完全に独立した電極空間と直列に接続すると、1つの分離空間での分離で得られたフラクションが後続の分離空間において同じ分離条件で更に分別されるため、分離量を大きくすることができる。なお、直列接続された分離空間では、分離手法、分離媒体及び／又は使用する電気泳動分離パラメータ全体に関して別々の条件で分離操作を行うことも可能である。

20

【0019】

分離空間及び個々の分離空間の技術設計は、上述の構造を用いて後述するようにほぼ自由に組み合わせることができる。

【0020】

図4及び図5に示すように、分離チャンバは、2つのサブアセンブリ、すなわち分離チャンバの前部と分離チャンバの後部とから成るのが普通である。しかし、本発明に係る設計の場合、個々のサブアセンブリは、図4及び図5に図示するいくつかの独立した構造要素から成る。

【0021】

詳しくは、図4に示す場合、硬質合成樹脂シート2と軟質合成樹脂シート3とを有する合成樹脂ブロック1から成る分離チャンバ前部と、ガラスシート10と軟質合成樹脂シート11とを有する金属ブロック8から成る分離チャンバ後部とが、スペーサ5を介して互いに隣接して配置される。合成樹脂ブロック1は、いくつかの（図示の実施例では、4つの）電極空間4を備える。金属ブロック8は、冷却パイプ9を備える。更に、媒体入口7と多数の分別サイト6が設けられている。図5に、分別済みサンプルの移動12を示す。

30

【0022】

図4の分離チャンバの前部のサブアセンブリは、結果として、基本構成ブロックすなわちプレキシグラス1の固体ブロックから成り、最大8つの電極空間4と、媒体フィーダ及び分別部の特定のメソッドモジュール用の開口とを収容している。この基本構成ブロック1に、硬質合成樹脂素材の薄いシート2が貼付される。後者は、当該用途に必要とされる合成樹脂ブロック1の電極空間領域のフローを搬送するための穴を有し、合成樹脂ブロック1の所要の電極空間を開口している。硬質合成樹脂シート2の、媒体フィーダ7及び分別部6の領域における設計についても同様である。分離空間に面する硬質合成樹脂シート2の表面は、直接化学的に変性しても良いし、図示のように合成樹脂シート3で覆っても良い。分離空間の直接の界面を形成する合成樹脂シート3の表面は、サンプル種の電気浸透及び吸着の影響が最小化される程度まで化学的に変性されている。

40

【0023】

先述のように基本構成ブロック、すなわち合成樹脂ブロック1を、特定の用途に合わせて変性された2つの合成樹脂シート2、3と組み合わせることにより、必要な分離段数、分

50

離空間の幾何学的配置、及び特殊な電気泳動境界条件に関する上述の全ての要件が、当該分離処理の段階で達成される。

【0024】

図6及び図7に、分離チャンバの前部及び分離チャンバの後部の構造を詳細に示す。図7に示すように、分離チャンバの後部は、いくつかの層、すなわち金属ブロック8と、ガラスシート10と、軟質合成樹脂シート11とから成る。これらの層は、分離装置を当該用途に応じて最適化するために、様々に組み合わせることができる。

【0025】

従って、分離チャンバの後部の基本構成ブロックである固体金属ブロック8は、外部冷却と組み合わせることで、電気泳動分離中に発生する熱を効果的に取り除くことができる。分離空間に面する金属ブロック8の表面は、ガラス製の薄い電気絶縁シート10又はセラミックシートで覆われる。この電気絶縁シートを覆う合成樹脂シート11の表面（分離空間との界面を直接形成する）は、分離処理を最適化するように化学的に変性されている。一般に、分離空間に面する合成樹脂シート、すなわちシート3及び11は、材料及び化学変性の種類が同一か又は類似していて良いが、特定の処理の組み合わせの場合には異なっても良い。

【0026】

図8、図9及び図10に、本発明に係る方法に用いることができる様々な分別モジュールを示す。標準的な設計では、図8に示す分別モジュールは、分別用の3つの出口を有する。特殊な用途においては、それぞれ図9及び図10に示すように、5つ又は7つの分別出口を設ける。これらの図では、分離媒体の流れの方向を矢印13で表すとともに、クロスフロー用の供給サイト14と、サンプル物質用の n 個の分別サイト15と、残りの媒体用の $n+1$ 個の出口16を示す。

【0027】

動作中、定量ポンプの移送速度が等しい2つの独立した移送チャンネルが、分離空間の、電極近くの分別出口の領域にそれぞれ接続される。移送ポンプの回転の方向によって、一方の接続部を介して媒体が電極近くの分離空間に導入されるとともに、第2の接続部を介して媒体が分離空間から同じ体積速度で放出される。電極近くの分離空間において媒体を同時に導入し放出することにより、サンプルの分別サイトの領域におけるフロープロファイルが、図11、図12及び図13に示すように変化する。

【0028】

図11は、2つの検体17及び18、クロスフロー用ポンプ21、クロスフロー用フィードライン20、及びフロープロファイル用マスク19を示す。図11に、クロスフロー無しのフロープロファイルを示す。図12は、クロスフローを開始した後のフロープロファイルを示す。図13は、ポンプ21の回転方向を逆にしてクロスフローを開始した場合のフロープロファイルを示す。

【0029】

以下に、予備長期試験、すなわち2つの典型的な応用例におけるフラクションモジュールの動作を説明する。

【0030】

所望の分離物質の予備分離中、2チャンネルポンプの移送速度を選択して、分離対象となる物質がこの目的のために設けられたサンプル出口を介して収集されるようにする。2チャンネルポンプの移送速度は、予備分離の時間中、変化しない。サンプル分別ライン内に放出された検体を僅かな時間遅れで量的に検出できる場合、分離処理を制御する検出信号を用いて、検体が最適な収率及び純度で分離できるようにすることが可能である。

【0031】

一方、ポンプの移送速度が電気泳動分離処理中に連続的に変更される場合、次々と分離された物質がサンプル分別サイトを介して収集される。2チャンネルポンプの移送速度を変えることにより、また回転方向を変えることにより、全ての分離種を分別サイトを介して連続的に溶出し、続いて収集容器を時間制御またはピーク制御切替えしながら検出システ

10

20

30

40

50

ムとフラクション収集装置とに引き渡すことができる。

【0032】

サンプル分別サイトに向かって20mmを超えてサンプル帯を局所移動したい場合は、サンプル分別出口の数を増やすと良い。この数を自由に増やして分離空間の幅を大きくし、サンプルの最適な溶離性を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の一実施例における分離チャンバの設計の概略図である。

【図2】 本発明の一実施例における分離チャンバの設計の概略図である。

【図3】 本発明の一実施例における分離チャンバの設計の概略図である。

【図4】 本発明の一実施例における分離チャンバの概略断面図である。

10

【図5】 本発明の一実施例における分離チャンバの概略断面図である。

【図6】 分離チャンバの前部の、媒体源の領域における構造を示す。

【図7】 分離チャンバの後部の、分別部の領域における構造を示す。

【図8】 異なる分別サイト及びクロスフローフィーダラインの相対的な空間配置を示す。

。

【図9】 異なる分別サイト及びクロスフローフィーダラインの相対的な空間配置を示す。

。

【図10】 異なる分別サイト及びクロスフローフィーダラインの相対的な空間配置を示す。

【図11】 クロスフローによるフロープロファイルへの影響を示す。

20

【図12】 クロスフローによるフロープロファイルへの影響を示す。

【図13】 クロスフローによるフロープロファイルへの影響を示す。

【符号の説明】

1：合成樹脂ブロック

2：硬質合成樹脂シート

3：軟質合成樹脂シート

4：電極空間

5：スペーサ

6：分別サイト

7：媒体入口

30

8：金属ブロック

9：冷却パイプ

10：ガラスシート

11：軟質合成樹脂シート

12：分別済みサンプルの移動

13：分離媒体の流れ

14：クロスフロー用供給サイト

15：サンプル物質用分別サイト

16：媒体用出口

17：検体

40

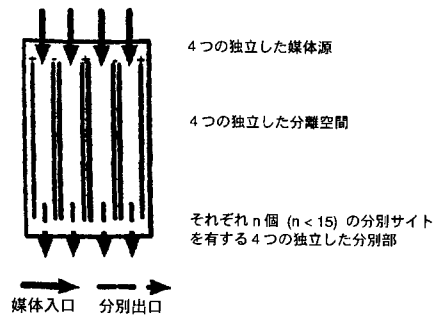
18：検体

19：フロープロファイル用マスク

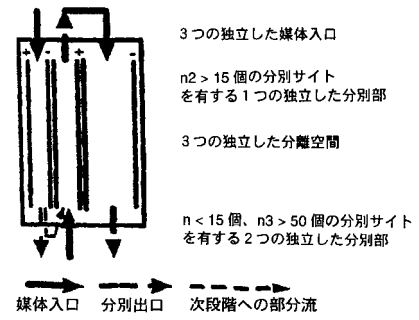
20：クロスフロー用フィーダライン

21：ポンプ

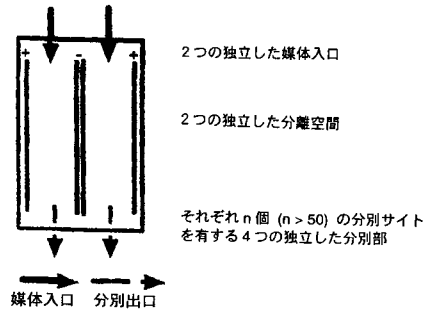
【図 1】



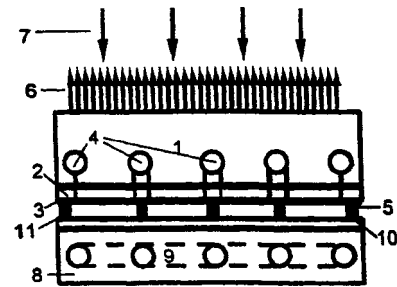
【図 3】



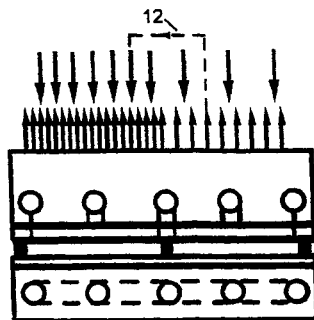
【図 2】



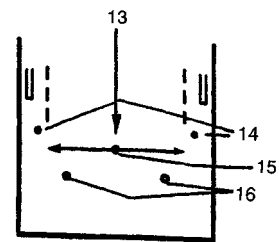
【図 4】



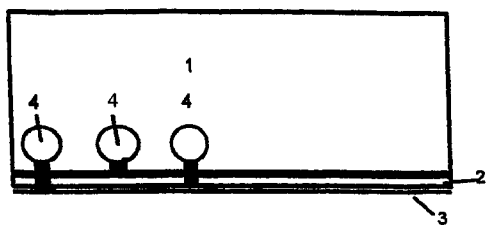
【図 5】



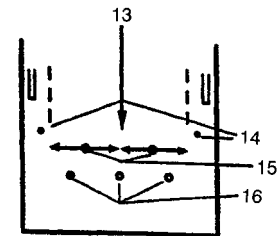
【図 8】



【図 6】



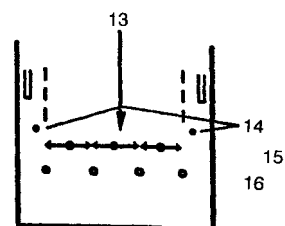
【図 9】



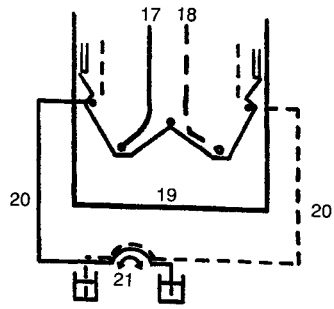
【図 7】



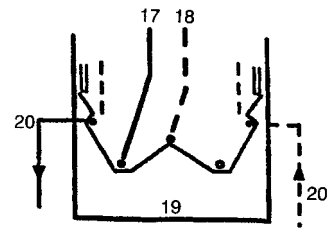
【図 10】



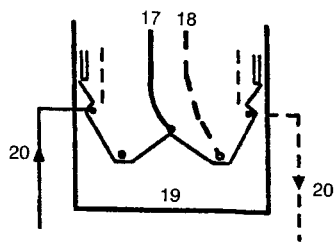
【図 1 1】



【図 1 3】



【図 1 2】



フロントページの続き

(72)発明者 ゲルハルト ヴェーバー

ドイツ連邦共和国 8 5 5 5 1 キルヒハイム マルガリーテンヴェーク 2 3

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 特開平04-233450 (JP, A)

特開平06-130035 (JP, A)

特開平03-162665 (JP, A)

特開昭63-191052 (JP, A)

特表平04-502516 (JP, A)

特開平05-080032 (JP, A)

特開昭63-117252 (JP, A)

特開昭63-067557 (JP, A)

特開昭63-196845 (JP, A)

特開昭62-070748 (JP, A)

特開昭61-215953 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/447

B01D 57/02