

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3928073号

(P3928073)

(45) 発行日 平成19年6月13日(2007.6.13)

(24) 登録日 平成19年3月16日(2007.3.16)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 21/33 (2006.01)	GO 1 N 21/33	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	
GO 1 N 21/27 (2006.01)	GO 1 N 21/27	A
GO 1 N 21/75 (2006.01)	GO 1 N 21/75	Z
請求項の数 25 (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平8-533882	(73) 特許権者	デルタドット リミテッド
(86) (22) 出願日	平成8年5月10日(1996.5.10)		イギリス エスタブリッシュ 2 ビービー
(65) 公表番号	特表平11-505612		ロンドン サウス ケンジントン プリ
(43) 公表日	平成11年5月21日(1999.5.21)		ンス コンソート ロード ペッセマー
(86) 国際出願番号	PCT/GB1996/001121		ビルディング (アールエスエム)
(87) 国際公開番号	W01996/035945	(74) 代理人	弁理士 谷 義一
(87) 国際公開日	平成8年11月14日(1996.11.14)		
審査請求日	平成15年5月12日(2003.5.12)	(74) 代理人	弁理士 阿部 和夫
(31) 優先権主張番号	9509410.8	(72) 発明者	ハッサード, ジョン, フランシス
(32) 優先日	平成7年5月10日(1995.5.10)		英国 エスタブリッシュ 2 エイゼット ロ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		ンドン プリンセス ガーデンス セルカ
			ーク ホール (番地なし)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 分子画像化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物分子を配列決定する方法であって、
配列決定される生物分子を含有する試料に配列決定反応を適用して、反応試料を作出する工程と；

電気泳動材料上に前記反応試料を載せる工程と；

前記材料に沿って電位差をかけ、それによって間隔を置いた複数の検出器を通して前記試料を移動させ、各検出器 I_k は、前記試料が検出器 I_k を通るとき、その分子 UV 吸収を代表するシグナル S_k を生成するように配置される工程と；

各検出器 I_k で、複数の時間 $t = t_1, t_2, t_3, \dots$ において、シグナル $S_k(t)$ を反 10
復測定する工程と；

公称速度 $V_k(t)$ (移動混合物中の分子性物質が時間 t に検出器 I_k に達するために必要な速度) によってシグナル $S_k(t)$ をグループ化する工程と；

グループ化したシグナルのコレクション中のピークによって、生物分子の配列を同定する工程と

を含む方法。

【請求項 2】

前記配列決定反応は UV 吸収性標識分子を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の生物分子を配列決定する方法。

【請求項 3】

前記生物分子は核酸を含むことを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の生物分子を配列決定する方法。

【請求項 4】

前記生物分子はペプチドを含むことを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の生物分子を配列決定する方法。

【請求項 5】

前記生物分子は蛋白質を含むことを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の生物分子を配列決定する方法。

【請求項 6】

前記生物分子はウィルスを含むことを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の生物分子を配列決定する方法。 10

【請求項 7】

シグナル $S_k(t)$ は収集されるときにグループ化されることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

公称速度 $V_k(t)$ は、起点から検出器 I_k までの移動距離および経過時間の知見から定められることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

公称速度は Z_k/t として計算され、 Z_k は起点から検出器 I_k までの距離および t は経過時間であることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 6 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 10】

シグナル $S_k(t)$ は複数の公称速度のビン内の値を合計することによってグループ化されることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

シグナル S_k は同定される分子性物質による光吸収の結果として検出器によって受信される光の減少を代表すること特徴とする請求項 1 ないし請求項 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

配列決定される生物分子の配列決定反応の生成物を含有する試料上を照射するように配列される UV 光源；電気泳動材料および前記材料に沿って電位差をかけて前記試料を前記材料に沿って移動させる手段を含む分子配列決定システムであって、 30

間隔を置いた複数の検出器（各検出器 I_k は、前記試料が検出器 I_k を通るとき、その分子 UV 吸収を代表するシグナル S_k を生成するように配置される）と；

各検出器 I_k で、複数の時間 $t = t_1, t_2, t_3, \dots$ において、シグナル $S_k(t)$ を反復測定する手段と；

公称速度 $V_k(t)$ （移動混合物中の分子性物質が時間 t に検出器 I_k に達するために必要な速度）によってシグナル $S_k(t)$ をグループ化する手段と；

グループ化したシグナルのコレクション中のピークによって、生物分子の配列を同定する手段と

をさらに含むシステム。 40

【請求項 13】

前記検出器が静止していることを特徴とする請求項 12 に記載の分子配列決定システム。

【請求項 14】

前記 UV 光源が検出器の向かい側に置かれることを特徴とする請求項 13 に記載の分子配列決定システム。

【請求項 15】

前記検出器がダイヤモンド製であることを特徴とする請求項 12 ないし請求項 14 のいずれか一項に記載の分子配列決定システム。

【請求項 16】

前記検出器が UV 増強シリコン製であることを特徴とする請求項 12 ないし請求項 14 の 50

いずれか一項に記載の分子配列決定システム。

【請求項 17】

前記検出器が、検出器材料からなる 1 枚の薄片を含み、その薄片の表面には複数の平行した両側を有する溝があり、それによってその溝と溝との間に複数の平行した両側を有する検出器要素を定め、各要素の向かい合う側面には相対する読み出し電極があり、および各要素の相対する電極間に電位差をかけて、前記要素を通る電場を作り出すための手段を含むことを特徴とする請求項 12 ないし請求項 16 のいずれか一項に記載の分子配列決定システム。

【請求項 18】

前記光源が UV レーザーであることを特徴とする請求項 12 ないし請求項 17 のいずれか一項に記載の分子配列決定システム。 10

【請求項 19】

前記光源が重水素ランプであることを特徴とする請求項 12 ないし請求項 17 のいずれか一項に記載の分子配列決定システム。

【請求項 20】

前記光源がヘリウム放電管であることを特徴とする請求項 12 ないし請求項 17 のいずれか一項に記載の分子配列決定システム。

【請求項 21】

前記検出器が前記配列決定反応の生成物の分子光吸収によって低下した入力光を記録するときに、前記生成物が前記検出器のうちの 1 つに隣接することを同定するように配列されていることを特徴とする請求項 12 ないし請求項 20 のいずれか一項に記載の分子配列決定システム。 20

【請求項 22】

前記電気泳動材料が固相であることを特徴とする請求項 12 ないし請求項 21 のいずれか一項に記載の分子配列決定システム。

【請求項 23】

前記電気泳動材料が石英基板上に置かれていることを特徴とする請求項 22 に記載の分子配列決定システム。

【請求項 24】

前記電気泳動材料が再利用可能であることを特徴とする請求項 22 または請求項 23 に記載の分子配列決定システム。 30

【請求項 25】

前記検出器が光増倍管を備えることを特徴とする請求項 12 ないし請求項 14 のいずれか一項に記載の分子配列決定システム。

【発明の詳細な説明】

本発明は、分子画像化および遺伝子配列決定の一般的分野に関する。

現在行われている核酸の配列決定方法および地図作成方法、さらに蛋白質および組織画像化方法は、放射性発光体、生物発光体、化学発光体、フォトプレート、さらに何らかの電子技術に基づいている。実際のところ、これらのなかで完全に満足できるものは一つも見いだされていない。 40

フィルムおよび（または）乳剤と共に用いる蛍光画像化、放射性標識、生物発光体、および化学発光体マーカーは、高価なものであり、非常に遅く、制限があり、コンピューターと連携させることが困難である。関連する技術は難しく、実質的技術的専門家を必要とする危険な取り扱いや廃棄処理が要求される。使用する材料は手に入りにくく、高価であることが多く、貯蔵寿命が短い。しばしば用いられる写真・画像化は完成までに数日または時には数週間、数カ月もかかり、動態的領域が小さく、応答の直線性が比較的十分なために制限がある。

電子技術のうちで、蛍光体画像化／マルチワイヤー・プロポーショナル・チェンバー（multiwire proportional chamber）（MWPC）およびマイクロチャンネル・プレート／MWPC 法はそれらの限られた直線性およびコストのために、多くの分子生物学者には不人 50

気である。

背景として核酸画像化における現在の技術の状態を幾分詳細に述べることは有用であるかも知れない。現在一般に使用されている2つの異なる方法があり、これらの詳細を次に述べる。

先ず第1には、写真フィルムを用いて化学発光または放射性標識を可視化するというものであり、第2に、核酸に化学的に結合し、UV励起下でオレンジ色を発する臭化エチジウム等の発光体を使用するものである。第1の画像化法が核酸配列決定に一般に用いられている。この方法は配列決定反応の1成分（通常、プライマー）を放射性同位元素または化学発光マーカー、または標識で化学的に標識化することを含む。配列決定反応および電気泳動に続いて、乾燥した電気泳動ゲルに通常の写真用フィルムをさらすことによって、この標識を用いて核酸バンドの位置を可視化する。これは、用いる配列決定法のために時間がかかり、24時間から72時間を必要とする。核酸配列決定に用いる放射性マーカーの多くは非常に危険で、配列決定法に余計な複雑化要因をもちこむ。そのためこれらのマーカーを必要としない画像化系がもしあれば極めて好都合である。

10

第2の方法、すなわち発光体法は、一般にDNA制限分析およびプラスミド構造の設計に用いられる。この方法は発癌性の化学的臭化エチジウムを用いて簡単なアガロースゲルの核酸を画像化することに基づく。臭化エチジウムはUV励起後オレンジ色の光を発し、存在する核酸のサイズを可視化し、濃度を推定する。臭化エチジウムは危険な蓄積性という医学的結果をもたらし、この方法の非常に好ましくない成分である。画像化法からこれを除外することが、あらゆるアガロースゲル分析の応用に際して非常に好都合である。

20

核酸配列決定は、立体的画像化と比べて、通常はかなり異なるプロセスを使用する。このプロセスは配列決定反応の1成分（普通はプライマー）を放射性同位元素または生物発光マーカーまたは化学発光マーカー、または標識で化学的標識化することを含む。配列決定反応および電気泳動後、乾燥した電気泳動ゲルに写真フィルムをさらすことによって、この標識を用いて核酸バンドの位置を画像化する。これは配列決定を行うため、時間がかかる方法であり、24時間から72時間を必要とする。

DNA制限酵素分析（DNA地図作成）およびベクター作成は分子生物学の基礎的面である。これらの地図作成技術も臭化エチジウムを用いて簡単なアガロースゲルにおける核酸断片を写真・画像化することに基づく。このマーカーはUV励起後オレンジの光を発し、核酸のサイズを可視化し、濃度を推定する。臭化エチジウムは蓄積することによって発癌作用を示す危険をなものであり、この方法の好ましくない成分である。この画像化法からこれを除去することが、このようなアガロースゲル分析のあらゆる用途に極めて好都合である。

30

ペプチドおよび蛋白質の画像化は多くの遺伝子工学プロセスの最終目的であることが多い。しかし、それは一般的生物学、生化学、および医学的研究において大きく立ちはだかる分野でもある。実際、蛋白質分析に少しでも依存しない生物科学分野を考えることは難しい。この場合も分析は通常電気泳動法に基づいて行われ、マーカーの添加に依存する。化学発光および特殊な化学的染料も用いられるとはいえ、概してこれら（マーカー）は放射性である。

組織画像化分野は、薬剤開発領域、および医学的および分子診断学においては極めて重要である。伝統的にβ放射マーカーを用いて組織試料内の薬剤の分布を画像化する。このプロセスは普通は数週間または数カ月もかかり、潜在的危険物質の使用を必要とする。

40

上記のこれらの方法のすべては、放射性同位元素かその他の危険物質かどちらかを付加的に使用しなければならず、上記の方法の少なくともいくつかのものは高価でかつ不便な電気泳動ゲルの使用を必要とすることは理解される。要するに、主な問題は次のようなものである。

1. トレーニング。健康および安全基準は、あらゆる種類の放射能と接触するすべての作業者が放射能の取り扱い、使用および廃棄の広範なトレーニングを受けることを要求している。

2. 使用。システムに放射能を組み込むと、複雑な、時間のかかるプロセスになることが

50

多い。作業者は十分注意しなければならない、例えばDNA配列決定に一般的に使用される同位元素³²Pは、パースペクスによって研究者から遮断しなければならない。このことは、すでに複雑な実験をさらにずっと難しくする。最初の実験に続き、すでにこわれやすい電気泳動ゲルをさらに操作することは、放射能の存在によって複雑になる。放射能は化学発光または生物発光からなる画像化手段（imager）に置き換えることができる。しかし、これらはより安全ではあるが、その使用はまだ複雑である。

3. 時間。これらの画像化システムは、オートラジオグラフィーを使用して核酸または蛋白質を可視化することに基づく。これは1枚のフィルターペーパー上でゲルを乾燥し、それを1枚の写真フィルムにさらすことによって実現する。フィルムはどうあっても24時間ないし3カ月間さらさなければならない。そのため、実験がうまくいったかどうか分かるまでにさえ数日から数カ月はかかる。これは分子生物学においては大きい問題であり、研究プロジェクトの期間を著しく延長する。

4. 費用。これらの実験の種々の成分は高価である。放射能は自然崩壊するため貯蔵寿命が限られ、しかも高価である、³⁵Sは配列決定反応20回につき約250ポンドかかる。使用するフィルムも、そのいくつかは35×45cmの大きさのものを使用することになるので、非常に高価である。

5. 廃棄。これらのプロセスは大量の固体および液体廃棄物を発生し、そのすべてを合法的に、責任をもって廃棄しなければならない。これらに要する費用は非常に高く、さらに面倒である。

本発明の第1の態様は、試料にUV光を照射し、選択した群の分子の位置をその群の分子の分子UV吸収によって検出することを含んでなる、生物学的試料中の分子の画像化法を提供する。

本発明の第2の態様は、試験すべき試料を照射するように配置されたUV光源と、選択した群の分子の位置をその群の分子の分子UV吸収によって検出するように配置されたUV検出器とを含んでなる、生物学的試料内の分子を画像化する分子画像化装置を提供する。本発明の別の態様は、分析すべき試料を担う電気泳動材料、その材料に電位差をかけ、それによって試料をその材料に沿って動かす（移動、または漂流させる）手段、およびその材料の1部分に位置し、選択した群の分子がその検出器を通過して移動するときその分子を検出するように配置された固定検出器とを含む電気泳動装置を提供する。

さらにまた別の態様によって、分析すべき試料を担う電気泳動材料と、その材料に電位差をかけ、それによって試料をその材料上を動かす（移動、または漂流させる）手段と、その材料を照射するように配置された光源と、選択した群の分子の位置を、その群の分子の分子光吸収によって検出するように配置された検出器とを含む電気泳動装置が提供される。

本発明の好適な方法において、分子は、それらの固有のUV光吸収を検出することによって画像化される。本発明のこの態様においては、核酸断片であろうと、蛋白質、または実にポリペプチド鎖であろうと、分子そのものの固有の画像を用いる。光学的スペクトロメトリの公知の方法とは異なり、分子UV吸収スペクトロメトリを用い、画像は分子の吸収から生ずる。重要な利点は標識がないことである。

これは多くの重要な結果をもたらす。多分、最も明らかなことは危険な標識は、それが放射能であろうと公知の発癌物質様臭化エチジウムであろうと、もはや必要とされない。もう一つの問題は、配列決定反応では、標識がないため、配列決定し得る塩基数に関する大きな制約の一つ、すなわち試料内に挿入される放射エネルギーが除去されることである。

好適には、興味の対象である分子は、ダイヤモンド検出器上の核酸、蛋白質または組織地図の画像化により、それらの分子の吸収を検出することによって直接画像化される。これは画像化すべき物体を、核酸であれ、蛋白質または組織であれ、ヘリウム放電管のような広域スペクトル装置かまたは196nmのエキシマーレーザーのような単色レーザーからの一定輝度のUV光で照らすことによって実現する。画像化すべき物体の後に置かれた検出器に異なる量の光が達するのが認められる。二次元または三次元の画像化の場合は、影も同時に画像化され、それによって物体が同定される。これはピクセル・デバイスまたは

10

20

30

40

50

ピクセル化リッジ（隆起）デバイスのような二次元検出器を必要とする。

指向性レーザーのすぐれた場合には、同定すべき物体を平面（ストリップ電極）または隆起した二次元検出器上で走査し、二次元画像を作成する。後者の場合は別の方法で優れている。非平行レーザー・ビームで2回（またはそれ以上）走査することにより、立体的画像（3D）を再構成することができる。

本発明を核酸操作および定量に適用する場合、この方法によって透過エネルギーと吸収エネルギーとを量的に区別することができよう。これらの条件下におけるDNAの定量は、治療に用いる特殊の蛋白質の製造に使用する発現ベクターの作成に重要な用途を有する。本発明をペプチドおよび蛋白質の画像化に用いるとき、DNA制限酵素地図を画像化するために用いるものと同じ機器を用いることができる。本発明によってもたらされる画像化速度は、3カ月もかかることがある従来の技術にくらべて著しい利点を有する。

10

このような考えは、核酸のための最適範囲でもある波長230nm以下のUV光の、蛋白質による吸収に基づく。こうして同じ検出器が両タイプの分子を画像化することができる。この特徴の付加的利点は、脂質、炭水化物およびその他の小マクロ分子がこの範囲ではUVを（もし吸収するとしても）わずかしき吸収せず、そのため画像上の生物学的ノイズの固有の本質的濾去が可能になることである。

このスペクトル反応はダイヤモンドのそれに理想的にマッチする。ダイヤモンドは224nmで動作し（turn on）、それより大きい波長または小さいエネルギーの光には極端に不感受性である。これは検出器がもつべき非常に力強い特質である。ダイヤモンド検出器のための典型的波長領域は約180～224nmであるが、下限は検出器メジウムよりも材料および（または）光源によって与えられるから、より低い波長の検出はあらゆる事情において排除しなくてよい。いくつかの出願においてシリコン検出器が用いられた（検出領域190～300nm）。光電子増倍管を用いることもできる。

20

組織画像化にこれを応用する場合、ピクセル化検出器を用いるか、またはストリップを用いる（この場合光源がこのストリップに垂直に走査される）ことによって二次元画像が作り上げられる。本発明の好適実施態様において、ダイヤモンド検出器が使用され、そしてそのダイヤモンドをピクセル化するか、またはUV光源をストリップに垂直に走査することによって二次元画像が作り上げられる。非常に有用なことに、同じ検出器で画像化された、非平行レーザーからの画像を加えることによって、三次元立体画像を形成し得ることである。この場合には、三次元構造を決めるパララックスシフトによって読み出しする検出器とともに、レーザーを交互にストロボ照射することが提案される。高度に解析された三次元画像から、誘導すべき組織構造に関する詳細が与えられる。これは新薬の開発時間を著しく切り詰め、したがって全体的費用を減少させる。

30

1 実施態様において、本発明は例えばDNA配列決定のための電気泳動装置にも及ぶ。装置は好適には、光源からのシグナルの変化を、電気泳動ゲル上の光源と検出器との間を通過する核酸バンドとして定量的にモニターする。バンドが検出器を通過するとき、それらは直接データベースに数字で記録される。

この装置はさらに、電気泳動のために不活性の再利用可能な固相を用いるという概念を組み込むことができる。DNAシーケンサーでは、固相は石英基板（例えば管）上に被覆されるかまたはその他の方法で支持され、4塩基のためには4本の別々の管があるのが好ましい。

40

本発明の主な利点または本発明の従属的態様をまとめて以下に記す。

1. トレーニング。システムからの放射能の排除は健康および安全トレーニングの必要性をなくす。

2. 使用。実験プロセスからの放射能またはその他のあらゆる外部からの画像化成分の排除はこれらの反応効率および速度を劇的に高める。標識化段階（放射性マーカーを反応に加える場合）は複雑であることが多く、実験の最後までその失敗に気づくことができない。

3. 時間。分子生物学では実験が計画通りに行かなかったことを確認するまでに時間がかかるために、多くの時間が失われている。しかし、例えばシーケンシング・ゲルの結果を

50

時間単位でなく分単位で画像化することができれば、ヒト・ゲノム・プロジェクトのような大規模シーケンシング操作の効率を劇的に高めることができることが期待される。それは反応中の諸問題のより早い発見を可能にする。

4. 費用。この方法を基礎にしたハードウェアの応用はあらゆる研究グループの消費可能予算からの基金の大幅削減に導くかも知れない。最初の装置のコスト後、多くの分子生物学研究グループは彼らの放射能およびフィルム必要経費が実質的に低下することを期待できる。

5. 廃棄。環境的にこの方法の利益は大きい。システムから放射能がまるごと排除されるため、その廃棄の必要性はもちろなくなる。

本発明のもう一つの態様により、下記の段階を含んでなる物質混合物中の個々の物質を同定する方法が提供される。すなわち、

(a) 混合物を、間隔をおいた複数の検出器を通して移動させ、各検出器 I_k は混合物が検出器 I_k を通るとき、その混合物の特徴をあらわすシグナル S_k を生成するように配置し、

(b) 各検出器 I_k で、複数の時間 $t = t_1, t_2, t_3, \dots$ にシグナル $S_k(t)$ を反復測定し、

(c) 公称速度 $V_k(t)$ (移動混合物中の或る物質が時間 t に検出器に達するために必要な速度) によってシグナル $S_k(t)$ をグループ化し、

(d) 混合物中の個々の物質を、グループ化したシグナルのコレクション中のピークによって同定する。

もう一つの態様により、下記の段階を含んでなる物質混合物中の個々の物質の同定法が提供される。すなわち、

(a) 混合物を、間隔をおいた複数の検出器を移動させ、各検出器 I_k は、混合物が検出器 I_k を通るとき、その混合物の特徴をあらわすシグナル S_k を生じるように配置し、

(b) 各検出器 I_k で、複数の時間 $t = t_1, t_2, t_3, \dots$ にシグナル $S_k(t)$ を反復測定し、

(c) シグナル $S_k(t)$ を速度空間においてグループ化し、

(d) 混合物中の個々の物質を、速度空間においてグループ化したシグナル中のピークによって同定する。

速度空間に変換し、時間的に統合することによって、個々の物質(例えば生物分子)は速度空間における個々のスパイクまたはピークとして速やかに同定される。各ピークのサイズおよび(または)巾を用いて個々の各物質の量の測定値が得られる。

用語“物質”の使用は極めて広い意味で読まれねばならない、なぜならば最も一般的な形におけるこの方法は、生物分子の識別および同定以外の多くの用途に応用できるからである。同じ方法が例えば共通のパイプラインを流れる個々の物質の流れを同定するために用いられるし、トラフィック流の分析の場合のような個々の異なる物にも応用できるかも知れない。

速度空間への変換において、移動する混合物中の或る物質が或る検出器 I_k に、その検出器からのシグナルが記録される時間 t に、到達するために必要な速度が計算される。この公称速度は“ Z_k/t ”として計算される。ここで Z_k は起点から検出器 I_k までの距離であり、 t は経過した時間である。しかし公称速度を決める他の方法がある、例えば既知の物質が1つの検出器から次の検出器まで移動するのにかかる時間を測定するのである。バンドの特定配列を1検出器で同定し、そのバンド配列が平均して次の検出器に移動するためにかかる時間を測定することによって速度を決定することもできる。その方法で配列内の個々のバンドが同定され、2つの離れた検出器で正確に時間を記録する、それから速度を両検出器間の距離の知識から計算する。

本発明は多くの方法で実地に行われる。いくつかの特殊の実施態様を実施例の形で図を参照して説明する。

図1は、先行技術の検出器を示す。

図2は、本発明の方法および装置で使用するために適した検出器の断面図である。

図 3 は、図 2 の検出器の斜視図である。

図 4 a は、別の実施態様を示し、電極は二極性電圧構造で連結している。

図 4 b は、図 4 a の実施態様を示し、電極は抵抗鎖構造で連結している。

図 5 は、本発明の方法および装置で使用するのに適した検出器のまた別の実施態様を示す。

図 6 は、本発明の実施態様を含む分子画像化装置を示す。

図 7 は、図 6 の画像化装置の側面図である。

図 8 は、本発明の別の実施態様を構成する自動 DNA シーケンサーの略図である。

図 9 は、図 8 に示されるシーケンサーを通る略断面図である。

図 10 は、分離しつつある生物分子の好適実施態様の略図である。

図 11 は、好適分析の結果を速度－間隔のグラフとして示す。

先ず最初に図 6 および図 7 では、本発明の一つの形の好適実施態様を構成する分子画像化装置が示される。図 6 および 7 に示される装置は主として核酸／蛋白質イメージャーであり、大部分直線的なこの形において、概して平らな基底部分（710）、基底部分の 1 端に沿って固定されたボディ部分（715）および長いヒンジ（730）によってボディ部分にピボット状に固定された蓋（720）を含んでなる。蓋と基底部分の間には電気泳動ゲル・マウント（740）がある。基底部分（710）には走査 UV 検出器アセンブリーが組み込まれるが、必ずしもこの後で図 1 ないし図 5 を参照して説明するような形の検出器をもたなくてもよい。

このイメージャーを使用するために、最初に蓋（720）を持ち上げ、画像化すべき試料（示されていない）をマウント（740）上に置く。その試料は特に、電場を用いて一般的方法で分離した分子試料を含む電気泳動ゲル、生物学的組織の薄い切片、または適した平らなマウントの表面に増殖した細胞単層を含む。ひとたびその試料が正しい位置に置かれた後、蓋（720）を閉じ、蓋の下側に取り付けられた紫外線光ボックス（722）にスイッチが入れられる。これは試料に紫外光を浴びせ、検出器が試料を横切って走査するとき、UV 吸収量が、基底部分と一緒にになった検出器アセンブリーによって検出される。検出された試料表面の吸収パターンは数字化され、データポート（750）を介して、適切なグラフィックス プログラムを行う外部のコンピューター（示されていない）に伝達される。

光ボックス（722）は例えば重水素ランプなど、いかなる紫外線源を組み込んでもよい。スイッチ（723）により使用者は UV 波長間をスイッチすることができ、核酸も蛋白質も容易に画像化することができる。

別の配列では、蓋（720）に固定された横方向の走査アセンブリー（示されていない）に UV 光源を取り付けることができる。この配列では UV 光源は試料を横切って走査し、その間基底部分（710）内の検出器は一定の場所にとどまる。UV 光源も検出器も両方とも走査アセンブリーに取り付け、両アセンブリーが同じ速度でゲルを横切って走査することもできる。好適配列またはこれに代わる配列どちらにおいても、整調可能レーザーを光源として用いる。一つの特異な配列において、1 対のレーザー、またはそれに代わってツイン・ビーム・レーザー、が備えられ、これらビームが異なる方向から試料を照射する。これによって立体画像化を行うことができ、適切なビーム走査メカニズムの使用によって三次元ならびに 2 次元画像化ができる。そのような画像化は、研究者が試料の深さ内部の核酸および（または）蛋白質を研究できるため、非常に役に立つ。例えば、個々の細胞内の核酸および蛋白質の分布を検出することができるであろう。示差吸収標識を用いることができれば、薬剤が細胞内に蓄積する仕方を検出することができる。ウィルスが細胞内でどのように増えるかも検出することができる。

後で図 1 ないし図 5 を参照して説明するが、好適ダイヤモンド検出器を使用する利点は、その検出器が本来、特別関心のない生物学的構造、例えば脂質および炭水化物に起きる吸収にはかなり不感受性であるということである。特殊の用途に応じて、簡単な実験により適切な解析が行われる。合理的解析で核酸および蛋白質を検出するために、約 5 μm と 200 μm との間のリッジ・サイズ（巾）を用いる。

10

20

30

40

50

次に図8および図9を参照する。これらは本発明の別の形の実施態様による自動DNAシーケンサーの略図である。

図8および図9は、提案の配列決定機の1サブユニットを示す。機械は全体としてこのようなサブユニットを4または5個含む。各サブユニットは緩衝溶液(820)を含む頂上の緩衝液貯蔵器(810)、緩衝溶液(840)を含む下方の貯蔵器、UV光源(870)または複数のこのような光源、標準読み出し装置(865)に連結したUV検出器(860)、緩衝溶液(820)に結合した陰極(822)、緩衝溶液(840)に連結した陽極(842)を含む。装置は4本の固相基質管(850)も含み、これらは上方および下方貯蔵器間に延びる。

上方および下方貯蔵器(810)、(830)は両方とも透明なプラスチック材料から作られており、システムが過剰の酸性にならないように簡単な緩衝溶液(820)、(840)を含む。固相基質管(850)は頂上で緩衝溶液(820)に接触し、底部で緩衝溶液(840)に接触する。

光源(870)としては、例えばUVランプ、重水素ランプ、または放電ランプが挙げられる。さらに、220nmないし180nmの領域で働くことができるレーザー、またはダイオードであってもよい。

検出器(860)は光源(870)の波長にマッチするいかなる適した光検出器でもよい。その検出器は好適にはダイヤモンド・リッジ検出器を含んでなる。これは後で図1ないし5を参照してより詳細に説明する。リッジの巾は検出すべき波長および必要な解析に応じて、5ないし200μmである。リッジの狭さ、および実質上平面的照射が用いられるという事実が、高度の正確さおよび解析を可能とする。

検出器(860)は、出口(865)で数値的読み出しを提供する適切なエレクトロニクスに連結する。標準的読み出し装置、例えばラビュー(Labview、登録商標)などは、適切なデータベース・プロセッサ、例えばマクベクター(MacVector、登録商標)またはマックDNAシス(MacDNAsys、登録商標)などに直接インプットする。

固相基質管(850)は適した固相基質を含む4本の石英管を含んでなる。適した材料としてはシリコン・ベースの既存のゲル基質、例えばセファデックス(登録商標)群が含まれる。固相は比較的UV透過性であり、再利用可能である。管の長さは選択した固相の正確な性質によって決まるが、普通は15ないし20cm以下である。

使用に際して、電圧を陽極と陰極との間に加え、固相基質管(850)の長さに沿って電位差を生じさせる。検出すべき4つの個々の反応物が各々それらの別々のカラム上に置かれ、陽極に電気泳動する。バンドが光源(870)と検出器(860)の間を通過するとき各バンドの簡単な定性的画像がデータベースに数字として記録される。生成した数字情報は即時に読み出してもよいし、電気泳動が完了するまで検出システム・エレクトロニクス内に保存してもよい。すべての情報をその後一度に読み出すことができる。

シーケンシング混合物がカラムを通過した後、電場および緩衝溶液に連続的にさらすことによってDNAの痕跡をすべて除去することができる。徹底的に洗った後、その固相を再利用することができる。

本発明の装置の操作の簡単さおよび固相の再利用可能性は、少なくとも1部は放射性標識化をもはや必要としないという事実によってもたらされることは注目しなければならない。

もちろん、本発明はその大部分の一般的形では上記の特殊の特徴に制限されないことは当然である。適した同等の装置は熟練せる当業者によって容易に製作され、これら構造の正確な詳細は関心とする特殊領域に依存する。本発明の装置および方法が利用される特殊領域としては次ぎのものがある：組織画像化、例えば薬剤の標的化、パフォーマンスおよび細胞診断、核酸インターロゲーションおよび地図作成ー配列決定、制限酵素地図作成、定量、高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)およびオリゴヌクレオチド精製を含める、蛋白質画像化ーペプチド分析および核酸操作および医学的診断のモニターを含める。

適切な使用では、下に図1ないし5を参照して説明するようなUVセンサーが用いられる。このような使用は、画像化が大体220ないし190nmの範囲で行われるような使用

10

20

30

40

50

であるらしい。しかし詳細に記載されているような隆起した形状 (ridged topology) を用いる必要はなく、或る用途には平面ダイヤモンド検出器が非常に適している。ダイヤモンド検出器の長所はノイズがほとんど完全でないこと、そのすぐれた量子効率、およびその直線性である。

ダイヤモンド検出器を使用するには適さない領域、例えば220ないし290nm領域（ここではDNAが吸収する）では、ダイヤモンドでない半導体を使うことができる。適した検出器としてはUVを高めるシリコン検出器および光増倍管が含まれる。

本発明の好適実施態様は分子の本来の吸収特性（光にさらされたとき）を利用してもよいし、或いは関心とする分子に付着させた標識の吸収特性を利用してもよい。異なる分子付加物を有する特殊化分子吸収体を利用して感度を改良することができる。このような吸収体は無毒性である。

10

本発明のいくつかの実施態様において、立体UVレーザーを用いて、簡単なシャドウイング (shadowing) ソフトウェア技術によって、走査中の物体の複雑な構造の三次元画像を作成することができる。この場合も、これは、被検分子の固有の吸収特性を用いて、または特殊化された分子吸収体標識の使用によって実現する。

典型的先行技術の荷電粒子検出器を図1に示す。検出器は絶縁材料、例えばダイヤモンドなどの平らなシート(10)を含んでなり、この上面および下面には薄い金電極コーティング(12)、(14)がある。上方電極コーティング(12)はこの図では紙面に垂直方向に一列に並んだ複数の読み出しストリップを含み、下方電極コーティング(14)は紙面と平行方向に一列に並んださらに複数の読み出しストリップを含む。大きい電位差Vが電極コーティング間に維持される。頂上または底部電極のどちらかが一定で(continuous)、ストリップは交番極性を有する。

20

ダイヤモンドを通過する路(16)を辿る荷電粒子は電子孔対(18)、(20)を生じ、それら電場の影響下で分離し、読み出しストリップに電荷を誘起する。粒子のエネルギーは集められた電荷の量によって測定でき、その位置は最も大きい誘起電荷を受ける上方および下方ストリップの交差点によって決定される。

本発明の方法および装置で使用するのに適した好適検出器をここに図2および図3を特に参照して詳細に説明する。それはダイヤモンド検出器で、1面に複数の平行した、エッチングされたダイヤモンドリッジ(40)を有するダイヤモンド基板(30)を含んでなる。各リッジの1端には正の読み出し電極(50)があり、他端には負電極(60)がある。これらは導体であるのが好ましいが、代わりに、高伝導度を与えた半導体材料であってもよい。

30

使用中、基板が、検出すべき粒子または照射ビーム(70)に実質上垂直になるように、検出器が配置される。リッジの1つに入る個々の粒子はイオン化された担体を作り出し、それらは電極間に維持される大きい電位差のため、速やかに電極(50)、(60)に移動する。そのため電極には電荷が生じ、この電荷はリッジ末端の読み出し装置(示されていない)によって読み取られる。

基板およびリッジは好適にはダイヤモンドである。そのダイヤモンドは天然ものでも人工的に大きくしたものでもよい。リッジは基板とともに成長させてもよいし、それらはエッチングしてもよい(例えばエキシマーレーザーで)。電極(50)、(60)は、適した処理(例えばアブレーション、イオン・インプランテーションまたはアニーリングなど)でダイヤモンド表面にオーム接触を形成するいかなる材料またはいかなる材料の組み合わせ(例えばチタン、バナジウム、クロムおよび(または)金)でもよい。標準的付着法を用いてリッジの側面に金属を薄いコーティングとして塗布する。一般的にはこの装置は、リッジをエッチングし、金属を付着し、それから最上面をみがくことによって作られる。図2から、示される装置の感度はD値(またはリッジの高さ)を大きくすることによって高められることは理解できる。リッジの高さを高くすればするほど、粒子が通過しなければならない物質の量は大きくなり、そのため装置内におけるイオン化は大きくなる。リッジの高さは通常、検出すべき粒子または光子の予想される浸透深さに合わせる。読み出し速度および効率は各リッジの巾Lによって決まる。特殊の用途によってLの値は数マイク

40

50

ロメーターのように小さくても、約 $200\text{ }\mu\text{m}$ までの比較的大きい数値でもよく、D 値は $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上である。シグナル対ノイズ比は大きい、それは個々のリッジから発するシグナル間の漏話 (cross-talk) が無視し得る程だからである。典型的基板深さは約 $100\text{ }\mu\text{m}$ であり、リッジを支持し、付加的支持体の必要なく自立構造で立っているのに十分な厚さである。好適にはこの装置は、再結合長さが多分 $6\text{ }\mu\text{m}$ 程度の比較的低品質のダイヤモンドを使用する。

リッジ末端の読み出し装置 (示されていない) のインピーダンスは電極 (50)、(60) のインピーダンスとマッチングするのが好ましい、それによって読み出し速度を高め、シグナル損失を減らすことができる。

図 2 に示される電極 (50)、(60) 間に電位差をかける方法は多数ある。最も簡単な形では、電圧源を単に 2 電極間で連結する。或いは電極を抵抗鎖 (示されていない) に結合す、この場合、電極間の電位差は対応する抵抗の電位降下によって決まる。

その他の実施態様を図 4 に示す、ここでは電極は基板上およびダイヤモンドリッジ (40) 間の空間の両側に形成される。これは実際的には、次々にリッジ (40) の左側の各電極 (50') が次のリッジの右側の対応する電極 (60') と電気的に対になり、それらは一緒になって 1 つ U 型電極 (61) を形成することを意味する。図 4 a の実施態様において、U 型電極 (61) の第 1 の交互対は第 1 の電圧源 V_1 に結合し、第 2 の交互対は第 2 の電圧源 V_2 に結合する。このような二極電圧構造は、リッジ (40) の各々に定電位差 $V_1 - V_2$ が常に存在することを確実にする。

電圧を U 型電極 (61) にかける別の方法を図 4 b に示す。ここでは抵抗鎖を用いて、入力電圧 V を複数のシリーズ抵抗 R を経て降下される。各リッジ (40) を通る電圧は V および R の適切な数値を選択することによって決まる。

同様な二極性電圧構造または抵抗鎖電圧構造を図 2 の実施態様と組合わせて用いることができるのは当然である。

リッジ (40) にかかる典型的電位差は μm あたり 1 ボルトの領域である。所望ならば実質的により高い電圧を用いることもできる (ダイヤモンドは非常に高い破壊電圧を有するため)、しかしより大きい電圧では担体速度が急速に飽和するから、高電位差は概ね必要ない。

その他の実施態様 (示されていない) では、第 1 のリッジ組に直交するもう一つの平行なリッジ組が基板 (30) の下面に取り付けられる。これらの 2 つの垂直するリッジ組は検出すべき各粒子の正確な $x-y$ 位置決めを可能にする。

リッジ間の空間はプラスチック材料またはその他の吸収体で充填され、それによって中性粒子を検出する検出器能力は改良される。

もう一つの実施態様を図 5 に示す。ここではリッジ (40) 間の空間が極めて狭くなり、それらは各々別個の電極 (62) を含む。このような実施態様は、多くの状況に適する、なぜならばリッジ (40) 間の隙間が狭いため、図 2、図 3 およ図 4 の実施態様と比較してアクセプタンスロスが小さいからである。隙間の中、したがって電極 (62) の中は主としてダイヤモンド基板に如何に狭いスロットを切ることができるかにかかっている。電極 (62) は便利な方法、例えば図 4 a または図 4 b の方法を用いて対になり、リッジ (40) 間に適切な電位差を生じさせる。

例えばガンマ線などの高エネルギー電磁放射の検出は、シャワーリング層 (示されていない) をリッジ頂上に加えることによって改良することができる。入ってくる光子は最初にシャワーリング層にあたり、生成するシャワーがその後下のリッジの 1 つに浸透し、検出されるシグナルを与える。

上記の電離放射線検出器は極めて速い電荷読み出しを、多分 35 ps 以内、確実に 50 ps 以内に行うことができる。これらの読み出し速度は、現在のところ匹敵する感度および位置的正確さを有するいかなる単一パルス検出器でも実現することはできない。

次ぎに、上記装置を実際に用いて混合物内の個々の分子を同定する方法について論ずる。図 10 はその配置を略図として示したものである。分子が移動する長い基板 (910) の片側に UV ランプ (920) があり、他の側に間隔をおいた一連の UV 検出器 I_1 、 I_2 、

10

20

30

40

50

$I_3, \dots, I_n$ がある。前に述べたように、検出器要素前方の生物分子のバンドの通過を検出することによって配列決定が行われる。生物分子は関心とする領域のUV光を吸収するから、検出器前のいかなるバンドの通過も、その検出器要素のUV光源(920)による絶え間ない照射(930)によって起きる公称DC電流をドロップさせる。電流のドロップは測定され、標識が付けられ、或る生物分子バンドに関連づけられる個々のシグナルとして処理される。名目上、電気泳動ゲルでは与えられたバンドの速度はバンドの核酸の塩基配列の量の根に逆比例する、塩基配列の電荷は、摩擦減速力によってその長さから分離され、その長さに比例するこの摩擦減速力によって生ずる“末端速度”が課される。個々の分子を同定するために、この系は時間 $t = t_1, t_2, t_3, \dots$ における検出器 S_k 配列のシグナル $S_k(t)$ の塩基配列を自動的に集める。

10

さて、各検出器要素の位置は既知であり、経過した時間も既知であるから、特定分子が与えられた経過時間に特定検出器に到達するために必要な速度を計算することができる。例えば、経過時間を $t_0 = 0$ から測定し、検出器 I_k が起点0から距離 Z_k のところにあったと仮定すれば、式 Z_k/t によって公称速度 $V_k(t)$ を計算することができる。

各シグナル $S_k(t)$ はその後、公称速度によってグループ化され重みづけされて作られているヒストグラム中の適切なビンに加えられる。個々のシグナルをいかなる便利な方法で適切なビンに加えてもよいが、好適実施態様においては重さ w が各シグナルごとにビンに加えられ、その重さはシグナルサイズ $S_k(t)$ に比例する。速度空間にプロットされた重さの対応するグラフまたはヒストグラムが図11に示される。

検出すべき異なる各生物分子は異なる長さをもつから、それは異なる速度で運搬され、したがって図11のヒストグラムの異なる場所にあらわれる。個々の分子はヒストグラムにおいて分離したスパイクまたはピークとしてあらわれる、示した実施例では分子A、B、Cが検出された。

20

1つの可能な配列では、シグナル S_k が時間 $t_1, t_2, t_3, \dots$ に反復して集められる。すべてのデータが集められたならば、それらをその後、図11に示すようにプロットし、分析する。だが別のより好適な配列では、データを集めたときにそれらをグループ化する。このような配列の利点は、図11に示すようなグラフを例えばコンピュータースクリーン上でプロットし、即時に最新の情報にすることができることである。データ収集が進むにつれて、検出分子をあらわすスパイクは徐々によりはっきりしてくる。

検出器の逐次のサンプリング間の時間間隔は用途によって選ぶことができるのは理解できる。好適実施態様では、サンプリングは100ミリ秒ごとに行われる、しかし他の用途ではその期間は数ミリ秒のように小さくても、数分または数時間と大きくなってもよい。読み出しエレクトロニクスがデータ流を処理できるならば、時間をだんだん短くしていくことに対して支払われる実際的代償はない。その上、次に時間間隔を置く必要がない、ただし実際には測定の次ぎに隣接時間(contiguous period)がある方がより便利であるかも知れない、特に期間が漂流速度、バンドのサイズおよび幾つかのその他の要因によって決まる本発明においてはこれが言える。

30

各検出器 I_k におけるシグナル S_k は、ビーム(930)の通路に分子が1つもないときに存在する公称DCレベルからの電流相殺をあらわすことを思い出してほしい。統計的変動がこのシグナルを負(平均DCレベルより上)または正(平均DCレベルより下)にするかも知れない。平均するとこれらは帳消しになる傾向があり、データをより多く集めるにつれてノイズは徐々に抑制される。個々の物体を追おうとしないで、その代わりに各段階で速度空間の数値を“盲目的”に合計することによって、その物体が自然に、非常に速く、ノイズが最小になるような仕方で自動的に見いだされる。必要なハードウェアは非常に単純であり、ソフトウェアおよび分析はさらに簡単である。ハードウェアは例えば容量性の要素にシグナル S_k に釣り合う量だけ電荷をかけることによって作られる。

40

この方法のその他の利点は、バックグラウンドの差し引きが自動的に行われるのみならず、得られる精度が個々の検出器要素からの情報を単純に使用することによって可能になる精度よりもはるかに大きいことである。全体として配列 S_k からの情報は、個々に検出器を考慮して得られるよりもより大きい情報を、したがってより大きい精度を提供する。

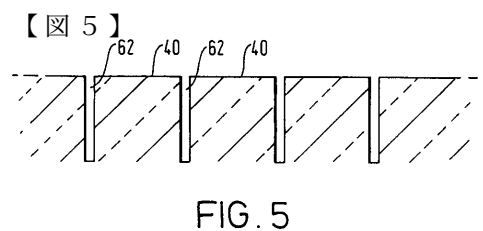
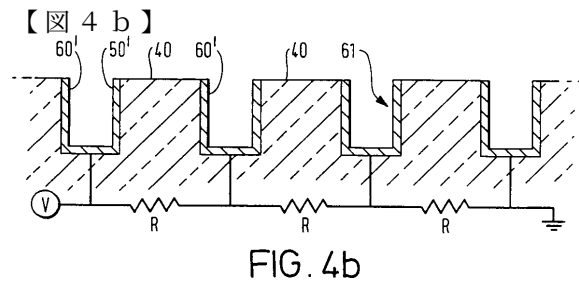
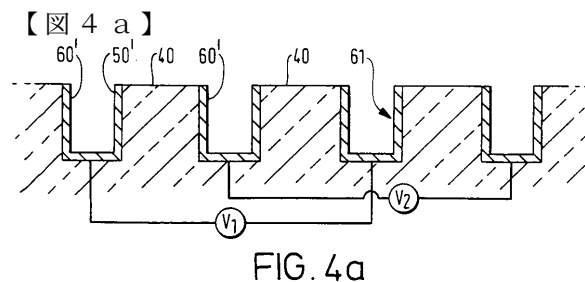
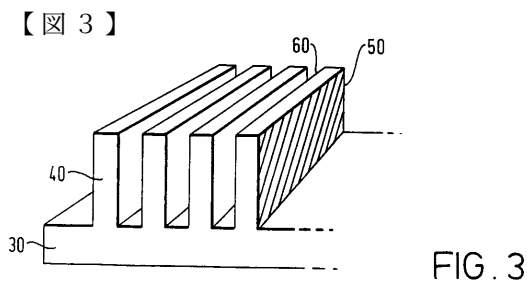
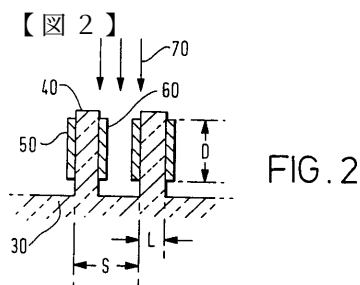
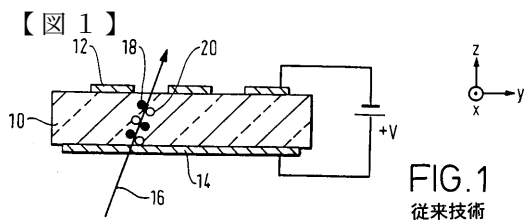
50

さらに、本方法では定量もできる。図11の各スパイクの高さおよび巾を考慮することによって、各検出物質が元の混合物中にどのくらいの量含まれていたかを或る程度正確に測定することができる。

実質上平面の光ビーム（930）、および指向性検出器の使用は、分子が検出器を通過するときに、その分子がそこに位置することを極めて正確に確実にする。検出すべきシグナル、例えば放射能またはUV光、を放射する分子でここに記載の方法を使用することはもちろん可能であるが、精度は、付加的散乱によって、および同じシグナルを生成するためには分子濃度はより高くなければならないという事実（なぜならば放射される光または放射能の大部分は、全方向に放射されるため無駄になるからである）によって、低くなりそうである。シグナルを生成するためにUV吸収を利用することによって、より速く動き、より速く分離する非常に小さい分子を使用することができる。これは読み取り時間を従来の数時間から多分数分に著しく短くすることができる。

ここに述べた方法は生物分子の塩基配列決定以外の用途にも使用できる。このような技術が使われるその他の用途は、例えば供給パイプの個々のアイテムの追跡またはトラフィック流のモニターにおけるオンライン・プロセス・コントロールを含める。より一般的には、本発明の方法は時間変化—多次元密度分布におけるアイテムの分布の評価に用いてもよい。本発明の一般的方法は物質混合物中の個々の物質を同定するのみならず、それらの比率も計算することができる。

10



【図 6】

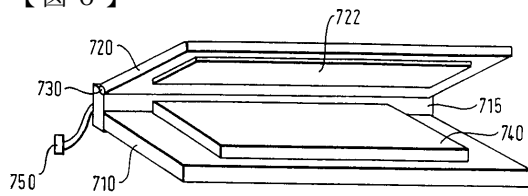


FIG. 6

【図 7】

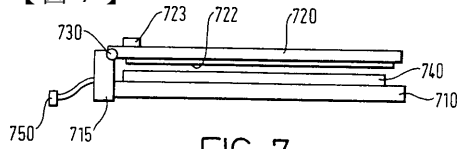


FIG. 7

【図 8】

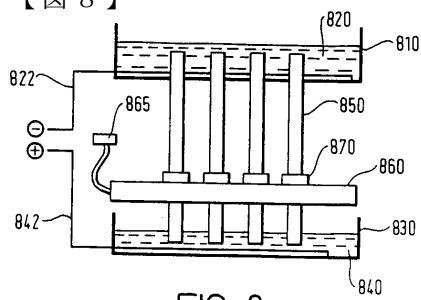


FIG. 8

【図 9】

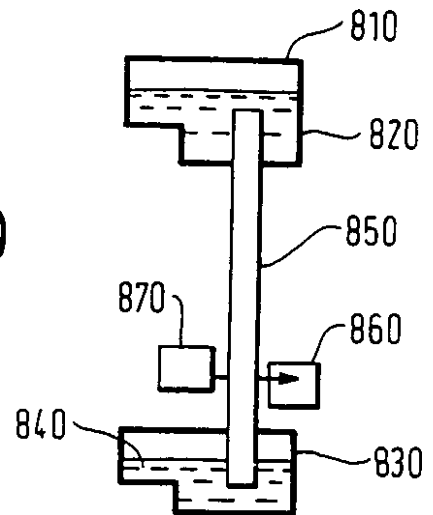


FIG. 9

【図 10】

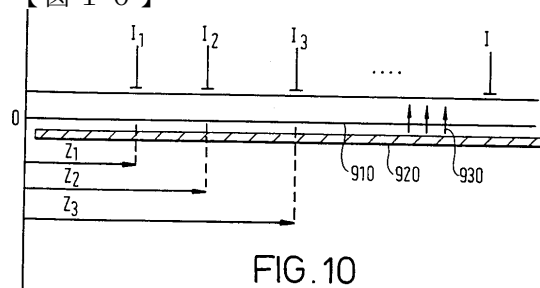


FIG. 10

【図 11】

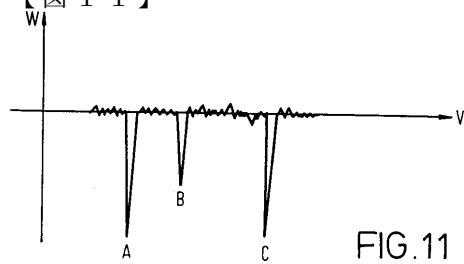


FIG. 11

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 27/447 (2006.01) G 0 1 N 27/26 3 2 5 B
G 0 1 N 33/483 (2006.01) G 0 1 N 33/483 C

(72)発明者 ハッサード, スチュアート
 英国 ダブリュ1エイチ 1ジェイイー ロンドン クロウフォード プレイス 22
 (72)発明者 メインウッド, アリソン, メリー
 英国 エイエール1 3ピーピー ハーツ セント オールバンズ レムズフォード ロード 31

審査官 ▲高▼場 正光

(56)参考文献 特開平05-296977 (JP, A)
 特開昭61-140844 (JP, A)
 特開昭62-012837 (JP, A)
 特開平04-204240 (JP, A)
 特開平04-069548 (JP, A)
 W. Thormann, "AUTOMATION OF ANALYTICAL ISOTACHOPHORESIS", Journal of Chromatography,
 1985年, Vol.334, pp.83-94

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G01N 21/00 - 21/83
 G01N 27/26, 27/447
 JICSTファイル(JDreamII)