

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4456117号
(P4456117)

(45) 発行日 平成22年4月28日 (2010. 4. 28)

(24) 登録日 平成22年2月12日 (2010. 2. 12)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 27/447 (2006. 01)

G O 1 N 27/26 3 1 5 Z

請求項の数 7 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2006-526325 (P2006-526325)
 (86) (22) 出願日 平成16年9月10日 (2004. 9. 10)
 (65) 公表番号 特表2007-505321 (P2007-505321A)
 (43) 公表日 平成19年3月8日 (2007. 3. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/029633
 (87) 国際公開番号 W02005/026693
 (87) 国際公開日 平成17年3月24日 (2005. 3. 24)
 審査請求日 平成19年4月6日 (2007. 4. 6)
 (31) 優先権主張番号 60/502, 424
 (32) 優先日 平成15年9月11日 (2003. 9. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505270887
 バイオーラッド ラボラトリーズ インコ
 ーポレーティッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヘラ
 クレス アルフレッド ノベル ドライブ
 1 0 0 0
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 プロボスト ロジャー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ナパ
 ドライ クリーク ロード 6 4 0 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゲル電気泳動用標準物質の貯蔵および送達装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む、ゲル電気泳動において標準物質源として使用されるゲルプラグカートリッジ：

所定の分離線に沿って手動で分離可能な複数の区画；

標準物質として使用される溶質の予め選択された混合物が包埋されているゲルで満たされる、全ての区画に行き渡る内部空洞；および

該カートリッジから分離されたどの一区画についても、該区画から外へ押し出し、そしてスラブゲルのウェル内へとゲルを押し出すための手段。

【請求項 2】

複数の区画が、カートリッジに沿って直線的に配置される、請求項1のゲルプラグカートリッジ。

【請求項 3】

区画を分離する刻み目線を持つ連続成形品を含む、請求項2のゲルプラグカートリッジ。

【請求項 4】

上半分および下半分として形成された連続成形品を含み、各半分が区画を分離する刻み目線を含有している、請求項2のゲルプラグカートリッジ。

【請求項 5】

押し出すための手段が区画に添付された平坦なブレードであり、かつ刻み目線に沿って

10

20

そこから手動で分離可能である、請求項1のゲルプラグカートリッジ。

【請求項6】

どの一区画についても、手で握ることができる取っ手をさらに含む、請求項1のゲルプラグカートリッジ。

【請求項7】

内部空洞の対向する両端に位置する孔、および該孔の内側に適合し、それによって内部空洞を密封するような大きさの末端栓をさらに含む、請求項1のゲルプラグカートリッジ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、スラブゲル電気泳動を行なう際に用いられる材料および機器にあり、特に電気泳動によって分離された溶質の混合物の解析を容易にするための標準物質の使用にある。

【0002】

関連出願の相互参照

本願は、2003年9月11日に出願された米国仮特許出願第60/502,424号に基づく恩典を主張し、その内容は参照により完全な形で本明細書に組み入れられる。

20

【背景技術】

【0003】

2. 先行技術の説明

臨床検査室および研究実験室で行なわれる調査において生化学的混合物を解析する方法として最も効果的であり、便利であり、経済的であり、よく用いられるものの一つは、スラブゲル電気泳動である。この技術では、一連の試料を同時に解析し、結果を目視によって定性的に検出するか、計器を使用して定量的に検出することができる。そのため、スラブゲル電気泳動は、細胞溶解物および他の生物学的試料中のタンパク質混合物の解析、DNA配列決定操作における核酸混合物の解析、ならびに生物学者および生化学者によってよく行なわれるこの種の広範囲にわたる多様な任意の解析に広く用いられている。スラブゲルは二次元的形状を持つので、例えばBio-Rad Laboratories, Inc. (米国カリフォルニア州ハーキュリーズ)のCHEF (登録商標) システムなどの水平パルスフィールド電気泳動分離や、直線的な一次元目の分離 (これは典型的には固定化pH勾配 (IPG) ストリップゲルにおける等電点電気泳動によって行なわれる) を行なった後で二次元目の分離にスラブゲルを用いる二次元電気泳動分離に役立つ。これらは一例に過ぎず、スラブゲル電気泳動の他の応用例は、熟練した生化学者にはすぐにわかるだろう。

30

【0004】

スラブゲル電気泳動によるタンパク質混合物または他の溶質の混合物の解析は、標準物質の使用によって助けられる。この標準物質は、タンパク質の混合物、核酸断片の混合物、またはその解析に適した任意のタイプの分子種の混合物からなることができ、各混合物は公知の組成を持っていて、解析すべき試料と並べて同じゲル中で分離して両者を比較することにより、試料中の成分を同定することができる。これらの標準物質は様々な形態をとることができる。例えば、電気泳動を鉛直方向に設置されたスラブゲルで行なう場合、すなわち泳動の方向が鉛直になるような向きにゲルが設置される場合には、紙標準物質が多用され、泳動の方向が水平になるような向きにスラブゲルが設置される場合は、ゲルプラグ標準物質が多用される。いずれの場合も標準物質は、通常、スラブゲル上の、解析すべき試料と隣接した位置に装填される。ゲルが二次元分離の二次元目である場合は、一次元目のゲルストリップをゲルの一辺に沿って置き、そのゲルストリップの一端に、同じ辺に沿って、標準物質を置く。

40

【0005】

50

市販されている様々な標準物質の一つに、Bio-Rad Laboratories, Inc.のプレキャストゲルプラグがある。この供給業者からは、アガロース中に包埋されたDNAサイズマーカーを含有する一組のアガロースプラグを、「DNA Size Marker, H. wingei」(カタログ番号170-3667)という製品名で入手することができる。この製品を使用するために、使用者は、プラグをかみそりの刃で所望の寸法に切断した後、切断されたプラグを「スパチュラ」と呼ばれる平刃の器具でスラブゲル内に挿入する。このように、これらのプラグの使用は、使用者によるプラグの個別的取扱を伴い、それがこの手法を、使用者の過失およびゲルプラグ材料による損失の可能性の影響を受けやすいものになっている。実験室で独自の標準物質を含有するアガロースプラグをキャストすることができるプラスチック製の鋳型を含んでいるプラグキットも、同じ供給業者から供給されている。これらのキットは「CHEF Mammalian Genomic DNA Plug Kit」(カタログ番号170-3591)、「CHEF Bacterial Genomic DNA Plug Kit」(カタログ番号170-3592)、および「CHEF Yeast Genomic DNA Plug Kit」(カタログ番号170-3593)という製品名で入手することができる。使用者によるこれらのプラグのキャストは、使用者が行なわなければならない作業を増やし、既製のプラグと同様に、使用者による個々のゲル材料片の取り扱いを必要とする。

10

【0006】

先行技術の他の標準物質には、New England Biolabs, Inc. (米国マサチューセッツ州ベバリー)のものがある。New England Biolabsの標準物質は、アガロースで満たされた変形シリンジからなり、そのアガロースには標準物質が包埋されている。これらの標準物質は、「Yeast Chromosome PFG Marker」(カタログ番号N0345S)、「Lambda Ladder PFG Marker」(カタログ番号N0340S)、および「Low Range PFG Marker」(カタログ番号N0350S)という製品名で販売されている。これらの標準物質を使用するために、使用者はシリンジのプランジャーを押し下げることによって、包埋された標準物質を含有するアガロースを押し出した後、ゲルに挿入するために所望の量を切り取る。先の段落で説明した製品と同様に、この場合も、使用者はむき出しのプラグを取り扱う必要がある。

20

【0007】

本発明は先行技術が持つこれらの制約および他の制約に対処するものである。

【発明の開示】

【0008】

発明の概要

30

本発明は、手動で分離して個別に使用することができる接合された複数の区画として構築されているゲルプラグカートリッジに属し、各区画は標準物質を構成する公知タンパク質または他の溶質の所定量が含まれる単一のゲルプラグを含有し、使用者がプラグを電気泳動ゲルに直接装填することができるようになっている。個々の区画およびカートリッジ全体はどちらもプラスチック材料または他の適切な保護囲い材料に包まれるので、カートリッジからの区画の分離および分離された区画からのゲルプラグの移動は、どちらも、使用者の指とゲルプラグ材料との接触を伴わずに行なうことができる。したがってゲルの汚染および使用者の指の汚損はどちらも回避される。

【0009】

本発明の好ましい態様では、カートリッジ中のゲルプラグが一体化して、当該カートリッジの全ての区画に行き渡るゲルプラグ材料の連続体を形成する。これにより、全てのプラグが同一の組成を持つように、ゲル形成液中の標準タンパク質、核酸、または他の溶質の同じ溶液から、全ての区画に充填することができる。さらに好ましい態様では、カートリッジからどの一区画を分離しても、その区画には、その区画が切り離された部位に、開口部が残る。これにより、ゲルプラグにアクセスできるようになり、プラグを取り出すために使用者がその区画を切断する必要または他の形で開口する必要がなくなる。

40

【0010】

便宜のために、カートリッジは、分離された区画からゲルプラグを押し出すためまたは他の形で引き出すために使用者が用いることのできるこてまたはブレードなどの器具と共に供給される。好ましいゲルプラグはその形状が平坦であり長方形なので、好ましい器具

50

は、分離された区画に挿入することができ、かついったん挿入すれば、ゲルプラグ全体を一回の動作で押し出すことのできるような、適切な大きさを持つ、平坦な長方形（スパチュラ状）装置である。また、そのような器具は、電気泳動ゲル中のウェルにおけるゲルプラグの位置決めを容易にするために使用することもできる。さらなる便宜のために、この器具もカートリッジに接合され、好ましくは、1つのカートリッジおよび1つの器具を1回の電気泳動実験に使用した後、それらを廃棄することができるように、各カートリッジに個別の器具を含める。本発明のこれらのおよび他の特徴、目的および利点ならびにその使用法は、以下の説明から明らかになるだろう。

【 0 0 1 1 】

本発明および好ましい態様の詳細な説明

10

本発明は広範囲にわたる構成および態様をとりうるが、本発明の基礎を成す概念および原理ならびにその新規な局面は、一つの態様を詳細に検討することによって、最もよく理解される。そのような一態様を図面に示し、以下に説明する。

【 0 0 1 2 】

図1の斜視図には、カートリッジに沿って直線的に配置された12個のプラグ区画12および2つの末端ブロック13、14を含有し、様々な位置に刻み目線（すなわち使用者がその線に沿ってカートリッジを手動で分離することのできる線）を持つ、カートリッジ11が示されている。2本の刻み目線15、16は、それぞれ2つの末端ブロック13、14とプラグ区画との境界を規定する位置にある。末端刻み目線15、16に平行な11本の内部刻み目線17は、隣接するプラグ区画の各対の間の境界を規定する。最後に、全てが互いに一線上にそろえられた12本のさらなる刻み目線18は、各区画からの器具19（「スパチュラ」）の分離を可能にする。後続の図面に示すと共に、以下にさらに説明するように、各区画はゲルプラグを保持するための内部空洞を持ち、全ての空洞の充填を共通の供給源から1回の操作で行い、そして全ての空洞内のゲルを同時にキャストすることができるように、隣接する区画の空洞の間には、流体連通のための連絡路がある。末端ブロック13、14は、空気を逃しながら標準物質の溶液でカートリッジを満たすことができるように、空洞およびそれらの連絡流路と連通しているそれぞれ流入孔および流出孔を持ち、各孔は、充填の完了時にカートリッジ内部のゲル材料を密封するための取り外し可能な蓋を持つ。

20

【 0 0 1 3 】

最初に使用すべき区画は、カートリッジ末端に隣接する区画の一つである。図1に記載する図の左側にある末端ブロック13に隣接する区画はその一例になる。この区画をカートリッジから分離するには、まず、末端ブロック13を、それと使用すべき区画との間の刻み目線15で、折り取った後、その区画の対向する辺に沿って刻み目線17で（すなわち第1区画と第2区画の間で）破断する。これらの刻み目線の破断により、第1区画中のゲルプラグの対向する二辺が露出し、第2区画中のゲルプラグの一边も露出する。次に、後者は、除去可能な薄膜またはテープなどの一時的閉鎖具で、第2区画が必要になるまで密封または他の形で閉鎖することができる。区画は必要に応じて順に使用され、各後続区画は最後に使用した区画が除去された末端から取られる。

30

【 0 0 1 4 】

図2の拡大図は、隣接部分から分離された後の一つの区画12の特徴を、より詳細に示している。このように分離された場合、区画の両側端21は、刻み目線17があった位置によって規定される。ゲルプラグそのものと厚さが等しい、これらの位置にある細隙（見えていない）によって、区画の内部空洞（そしてそれゆえにゲルプラグ）にアクセスできるようになる。図ではこれを破線22、23で描く。いったん分離された区画12はさらに、2つの部品、すなわち器具またはスパチュラ19およびゲルプラグホルダー24に、これらの部品を分ける刻み目線18に沿った破断によって分割される。ゲルプラグホルダー24は、ゲル囲い25、および使用者の親指と人差し指の間に把握することができる取っ手26からなる。器具19は、ブレード27、および使用者の他方の手の親指と人差し指の間に手で握ることができる器具取っ手28を含む。この時点でこれら2つの部品は離されており、個別に操作することができるので、囲いの2つの辺21の一方に沿った開口部にブレード27を挿入して、他方の

40

50

辺に沿った開口部からプラグを外向きに押しやることにより、ゲルプラグをゲル囲い25から押し出すことができる。

【 0 0 1 5 】

カートリッジの内部は、図3に示す分解組み立て断面図（図1の線3-3に沿って描いたもの）に見ることができる。製造のために、この特定カートリッジは、2つに分けて、すなわち、一つに結合される上半分31および下半分32として作られ、そのどちらか一方（好ましくはそれぞれ）は連続成形品である。ゲル装填のために、カートリッジは、カートリッジの2つの末端ブロック13、14中の孔35、36の内側にそれぞれ適合することによってカートリッジの内部を密封するような大きさを持つ、左端栓33および右端栓34を含有する。左端栓33および右端栓34は取り外し可能であるが、空洞が満たされた後は各孔35、36の内面に結合させることもできる。この図では、図2の破線22、23によって示される輪郭を持つ内部空洞37を見ることができ、それは、一定した高さおよび幅でカートリッジの全長に及んでいる。したがって、空洞は均一な断面を持っていて死空間がなく、その結果、空洞の完全な充填によって大きさも組成も均一なゲルプラグを実現することが容易になる。この断面図に示すように、区画および末端ブロックの間の区切りを規定する種々の横断的刻み目線15、16、17は、上半分内の刻み目線15a、16a、17aおよび下半分内の対向する刻み目線15b、16b、17bからなる。カートリッジの任意の2区画または2区間の刻み目線に沿った分離は、それらの区画および区間を刻み目線の両側で把握し、それらを刻み目線で折り曲げて連結部を弱くし、次に、場合によっては完全に破断するために捻ることによって、容易に達成される。

【 0 0 1 6 】

カートリッジの一区画の使用法を図4に示す。電気泳動ゲル41は、一对の（この例では高さが異なる）ガラス板またはプラスチック板の間にある。これら2枚の板のうち、前面板の辺より高い辺を持つ背面板42だけが示されている。どちらの板もゲルより高く伸びていて、ゲルの上部に試料を装填するための空間を残している。二次元電気泳動の場合、この空間は、一次元目の分離が行なわれたIPGストリップを収容するのに十分な長さを持つ。ゲルの2つの側辺に沿ったスペーサー（この図では一方のスペーサー43だけが示されている）は、板の間に間隙を確立し、それ故にゲルの厚さを確立する。

【 0 0 1 7 】

二次元電気泳動分離法の第2段階を説明することにより、本発明のゲルプラグカートリッジの使用法を例示する。板の間隙にスラブゲルをキャストし、キャスティング段階中にゲルの上辺に沿って長形ウェル44を形成させる。そのウェルに、一次元目の分離を行なったIPGストリップ45を入れ、カートリッジ区画からの標準物質ゲルプラグ47も、ウェル内の、IPGストリップの一端に入れる。使用者は、ゲルホルダー25を、その取っ手26で、一方の手の親指51と人差し指52の間につかみ、かつ器具ブレード27を、その取っ手28で、他方の手の親指53と人差し指54の間につかむことにより、カートリッジ区画から当該ウェルに、ゲルを移動させる。使用者は、ウェル44の最上部にある開口部の入口近くにゲルホルダー25を置き、ブレード27をゲルホルダー25に挿入し、矢印48で示した方向に向かってゲルプラグをゲル内に押し下げる。IPGストリップおよびゲルプラグが適切な位置に配置されたら、融解したアガロース（または他のゲル）溶液をストリップおよびプラグの上から適用してウェル44の残りの部分を満たした後、それを固化させることにより、ストリップおよびプラグの両者とスラブゲルとの完全な電氣的接触を保証する。

【 0 0 1 8 】

カートリッジは、実験機器によく用いられるプラスチック、特に先行技術のゲル鋳型およびゲル囲いに用いられるものを含む通常の構築材料から製造することができる。材料の選択は、そのような機器の設計、製造、および/または使用に精通している者の能力で十分に可能である。手の加圧により刻み目線できれいに破断することができる任意のプラスチックまたは他の材料を使用することができる。プラスチック部品は通常の成形法によって形成させることができる。

【 0 0 1 9 】

上記は主として例示のために記載したものである。カートリッジの構成、形状ならびに製造方法および使用方法の変形、置換および変更であって、本発明を先行技術と区別する概念および特徴を、依然として体現するものは、当業者には明白であり、それらは本発明の範囲に含まれるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0020】

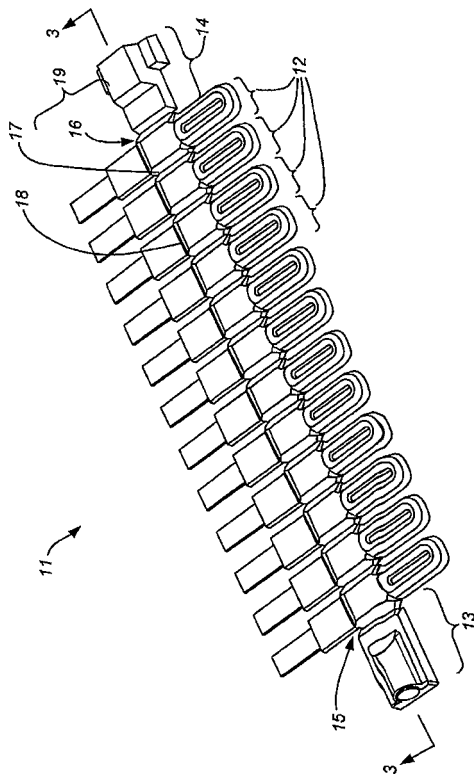
【図1】本発明の一例となるカートリッジの斜視図である。

【図2】カートリッジの残部から分離された図1のカートリッジの一区画の平面図である。

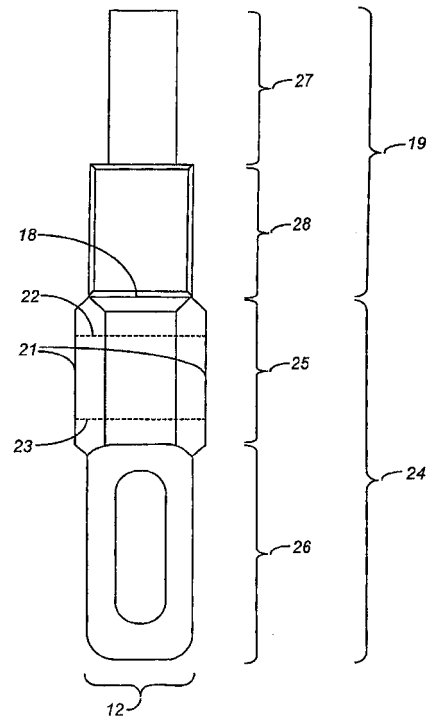
【図3】カートリッジの製造方法の1つを例示する、図1のカートリッジの分解組立図である。 10

【図4】図1のカートリッジの一区画からゲルを受け取りつつある、高さの異なる透明板の間に保持された電気泳動ゲルの平面図である。

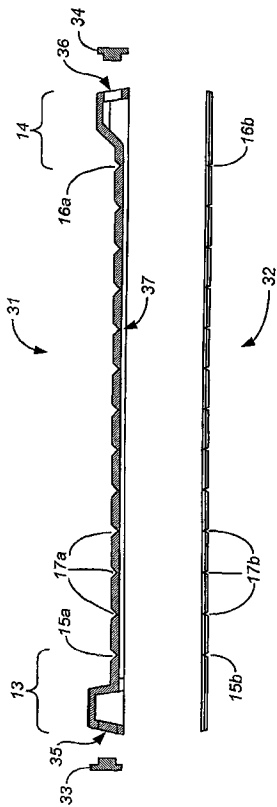
【図1】



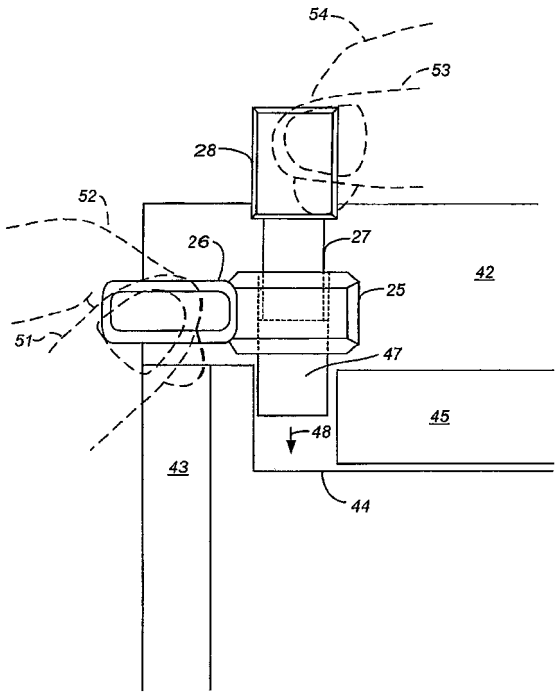
【図2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(72)発明者 ストロング ウィリアム

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 エル セリト ポモナ アベニュー 707

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 実開昭5-35749 (J P , U)

特開平5-126795 (J P , A)

特開平3-295462 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 27/447

G01N 33/561