

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-187278

(P2006-187278A)

(43) 公開日 平成18年7月20日(2006.7.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	4 B 0 5 0
C 3 0 B 29/54 (2006.01)	C 3 0 B 29/54	4 G 0 7 7

審査請求 未請求 請求項の数 52 O L (全 52 頁)

(21) 出願番号	特願2005-339302 (P2005-339302)	(71) 出願人	398051143
(22) 出願日	平成17年11月24日 (2005.11.24)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(62) 分割の表示	特願2001-504499 (P2001-504499)		ティ オブ カリフォルニア
	の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6
原出願日	平成12年6月7日 (2000.6.7)		0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フラ
(31) 優先権主張番号	09/336, 134		ンクリン ストリート 1 1 1 1, 1 2
(32) 優先日	平成11年6月18日 (1999.6.18)		ティーエイチ フロア
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100059959
			弁理士 中村 稔
		(74) 代理人	100067013
			弁理士 大塚 文昭
		(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189
			弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレイ微小結晶化を行う方法及び装置

(57) 【要約】

【課題】分子の適切な結晶化条件を決定するためにアレイ微小結晶化を行う方法を提供する。

【解決手段】微小結晶化物アレイを形成する工程であって、各微小結晶化物は、結晶化させる分子を含むドロップを含んでおり、該ドロップは1 μL未満の容量を有している工程、該微小結晶化物アレイを、該アレイ内のドロップ中で分子結晶を形成させるのに適切な条件下で格納する工程、及び、該ドロップ中の分子結晶形成を検出する工程、を含む方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分子の適切な結晶化条件を決定するためにアレイ微結晶化を行う方法であって、微結晶化物アレイを形成する工程であって、各微結晶化物は、アレイ内に变化した組成を有する母液溶液及び結晶化させる分子を含むドロップを含んでおり、該ドロップは1 μ L未満の容量を有している工程、

該微結晶化物アレイを、該アレイ内のドロップ中で分子結晶を形成させるのに適切な条件下で格納する工程、及び、

該ドロップ中の分子結晶形成を検出する工程、

を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

前記分子が高分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記分子がタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記高分子が少なくとも500ダルトンの分子量を有している、請求項 1 に記載の方法

【請求項 5】

前記ドロップが約750 nL未満の容量を有している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ドロップが約500 nL未満の容量を有している、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記ドロップが約250 nL未満の容量を有している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ドロップが約1 nL ~ 750 nLの容量を有している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ドロップが約1 nL ~ 500 nLの容量を有している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ドロップが約1 nL ~ 250 nLの容量を有している、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記ウェルが、約500 μ L未満の母液溶液を含んでいる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ウェルが、約250 μ L未満の母液溶液を含んでいる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ウェルが、前記アレイ内で变化する少なくとも4つの成分を有する母液溶液を含んでいる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記ウェルが、前記アレイ内で变化する少なくとも5つの成分を有する母液溶液を含んでいる、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記アレイが、96よりも多い微結晶化物を含んでいる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記アレイが、192よりも多い微結晶化物を含んでいる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記微結晶化物アレイを形成する工程が、48をこえるストック溶液を使用して、前記アレイ内で使用される母液溶液を形成する工程を含んでいる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記微結晶化物アレイを形成する工程が、96をこえるストック溶液を使用して、前記アレイ内で使用される母液溶液を形成する工程を含んでいる、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 19】

前記微結晶化物アレイを形成する工程が、192をこえるストック溶液を使用して、前記アレイ内で使用される母液溶液を形成する工程を含んでいる、請求項1に記載の方法。

【請求項 20】

前記微結晶化物アレイを形成する工程が、約25 nL未満の容量範囲内にあるドロップを形成する工程を含んでいる、請求項1に記載の方法。

【請求項 21】

前記微結晶化物アレイを形成する工程が、約20 nL未満の容量範囲内にあるドロップを形成する工程を含んでいる、請求項1に記載の方法。

【請求項 22】

前記微結晶化物アレイを形成する工程が、約15 nL未満の容量範囲内にあるドロップを形成する工程を含んでいる、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 23】

分子の適切な結晶化条件を決定するためにアレイ微結晶化を行う方法であって、
微結晶化物アレイを形成する工程であって、各微結晶化物は、アレイ内に变化した組成を有する母液溶液及び結晶化させる分子を含むハンギングドロップを含んでおり、該ドロップは1 μL未満の容量を有している工程、

該微結晶化物アレイを、該アレイ内のドロップ中で分子結晶を形成させるのに適切な条件下で格納する工程、及び、

該ドロップ中の分子結晶形成を検出する工程、
を含むことを特徴とする方法。

20

【請求項 24】

分子の適切な結晶化条件を決定するためにアレイ微結晶化を行う方法であって、
微結晶化物アレイを形成する工程であって、各微結晶化物は、アレイ内に变化した組成を有する母液溶液及び結晶化させる分子を含むシッティングドロップを含んでおり、該ドロップは1 μL未満の容量を有している工程、

該微結晶化物アレイを、該アレイ内のドロップ中で分子結晶を形成させるのに適切な条件下で格納する工程、及び、

該ドロップ中の分子結晶形成を検出する工程、
を含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 25】

分子の適切な結晶化条件を決定するためにアレイ微結晶化を行う方法であって、
第一の微結晶化物アレイを形成する工程であって、各微結晶化物は、アレイ内に变化した組成を有する母液溶液及び結晶化させる分子を含むドロップを含んでおり、該ドロップは1 μL未満の容量を有している工程、

該第一の微結晶化物アレイを、該アレイ内のドロップ中で分子結晶を形成させるのに適切な条件下で格納する工程、

該ドロップ中の分子結晶形成を検出する工程、

第二の微結晶化物アレイを形成する工程であって、各微結晶化物は、結晶化させる分子、及び、アレイ内に变化した組成を有し、かつ、分子結晶が検出された第一のアレイで使用した1以上の母液溶液に基づく母液溶液を含むドロップを含んでいる工程、

40

該第二の微結晶化物アレイを、該アレイ内のドロップ中で分子結晶を形成させるのに適切な条件下で格納する工程、及び、

該ドロップ中の分子結晶形成を検出する工程、
を含むことを特徴とする方法。

【請求項 26】

前記ドロップがハンギングドロップである、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

前記ドロップがシッティングドロップである、請求項25に記載の方法。

【請求項 28】

50

前記第二のアレイ内に形成したドロップが1 μ L未満の容量を有している、請求項25に記載の方法。

【請求項29】

分子の適切な結晶化条件を決定するためのアレイ微結晶化において μ L以下のドロップを形成する装置であって、

マルチウェルプレートが位置することが可能なプラットフォーム、

母液ドロップステーションであって、マルチウェルプレートの複数のウェルから母液を取り去り、かつ、 μ L以下の容量の母液を、約25 nL未満の容量範囲内にあるマルチウェルプレートのドロップ領域へ送達することができるステーション、及び、

分子ドロップステーションであって、結晶化させる分子を含む溶液の μ L以下の容量を、約25 nL未満の容量範囲内で、ドロップ領域へ送達することができるステーション、を含むことを特徴とする装置。

10

【請求項30】

前記母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションが、それぞれ、約20 nL未満の容量範囲内にある、 μ L以下の容量を送達することができる、請求項29に記載の装置。

【請求項31】

前記母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションが、それぞれ、約15 nL未満の容量範囲内にある、 μ L以下の容量を送達することができる、請求項29に記載の装置。

20

【請求項32】

前記母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションが、それぞれ、圧電バルブ又はソレノイドバルブを含んでいる、請求項29に記載の装置。

【請求項33】

分子の適切な結晶化条件を決定するためのアレイ微結晶化における使用において、 μ L以下のハンギングドロップをカバースリップ上に形成する装置であって、

マルチウェルプレートが位置することが可能なプラットフォーム、

複数のカバースリップが位置することが可能なカバースリップステーション、

母液ドロップステーションであって、マルチウェルプレートの複数のウェルから母液を取り去り、かつ、 μ L以下の容量の母液を、約25 nL未満の容量範囲内で、複数のカバースリップへ送達することができるステーション、及び、

30

分子ドロップステーションであって、結晶化させる分子を含む溶液の μ L以下容量を、約25 nL未満の容量範囲内で、該複数のカバースリップへ送達することができるステーション、を含むことを特徴とする装置。

【請求項34】

前記母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションが、それぞれ、約20 nL未満の容量範囲内にある、 μ L以下の容量を送達することができる、請求項33に記載の装置。

【請求項35】

前記母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションが、それぞれ、約15 nL未満の容量範囲内にある、 μ L以下の容量を送達することができる、請求項33に記載の装置。

40

【請求項36】

前記母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションが、それぞれ、 μ L以下の容量を、少なくとも4つのカバースリップへ同時に送達することができる、請求項33に記載の装置。

【請求項37】

前記母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションが、それぞれ、 μ L以下の容量を、少なくとも8つのカバースリップへ同時に送達することができる、請求項33

50

に記載の装置。

【請求項 38】

分子の適切な結晶化条件を決定するためのアレイ微結晶化において、 μL 以下のドロップを形成する装置であって、

マルチウェルプレートが位置することが可能なプラットフォーム、

母液ドロップステーションであって、マルチウェルプレートの複数のウェルから母液を取り去り、かつ、 μL 以下の容量の母液を、約25 nL未満の容量範囲内で、マルチウェルプレート上のシッティングドロップ領域へ送達することができるステーション、及び、

分子ドロップステーションであって、結晶化させる分子を含む溶液の μL 以下容量を、約25 nL未満の容量範囲内で、該シッティングドロップ領域へ送達することができるステーション、

を含むことを特徴とする装置。

10

【請求項 39】

前記母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションが、それぞれ、約20 nL未満の容量範囲内にある、 μL 以下の容量を送達することができる、請求項38に記載の装置。

【請求項 40】

前記母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションが、それぞれ、約15 nL未満の容量範囲内にある、 μL 以下の容量を送達することができる、請求項38に記載の装置。

20

【請求項 41】

前記母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションが、それぞれ、約10 nL未満の容量範囲内にある、 μL 以下の容量を送達することができる、請求項38に記載の装置。

【請求項 42】

分子の適切な結晶化条件を決定するためのアレイ微結晶化における使用のために、 μL 以下のドロップを形成する方法であって、

アレイ内に变化した組成を有する母液溶液の μL 以下の容量を、約25 nL未満の容量範囲内で、複数のドロップ領域に送達する工程、及び、

該複数のドロップ領域に、結晶化させる分子を含む溶液の μL 以下の容量を、約25 nL未満の容量範囲内で送達する工程、

を含み、各ドロップ領域に送達される μL 以下の容量の総量が1 μL 未満であることを特徴とする方法。

30

【請求項 43】

前記各ドロップ領域に送達される μL 以下の容量が約750 nL未満である、請求項42に記載の方法。

【請求項 44】

前記各ドロップ領域に送達される μL 以下の容量が約500 nL未満である、請求項42に記載の方法。

【請求項 45】

前記各ドロップ領域に送達される μL 以下の容量が約250 nL未満である、請求項42に記載の方法。

40

【請求項 46】

前記各ドロップ領域に送達される μL 以下の容量が約1 nL ~ 750 nLである、請求項42に記載の方法。

【請求項 47】

前記各ドロップ領域に送達される μL 以下の容量が約1 nL ~ 500 nLである、請求項42に記載の方法。

【請求項 48】

前記各ドロップ領域に送達される μL 以下の容量が約1 nL ~ 250 nLである、請求

50

項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記各ドロップ領域に送達される μL 以下の容量が約 20 nL 未満の容量範囲内にある、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記各ドロップ領域に送達される μL 以下の容量が約 15 nL 未満の容量範囲内にある、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 1】

分子の適切な結晶化条件を決定するためのアレイ微結晶化における使用のために、 μL 以下のハンギングドロップをカバースリップ上に形成する方法であって、

10

複数のカバースリップを取る工程、

マルチウェルプレートの複数のウェルから母液を取り去る工程、

μL 以下の容量の母液を、約 25 nL 未満の容量範囲内で、該複数のカバースリップへ送達する工程、及び、

結晶化させる分子を含む溶液の μL 以下の容量を、約 25 nL 未満の容量範囲内で、該複数のカバースリップへ送達する工程、

を含み、各カバースリップに送達される μL 以下の容量の総量が 1 μL 未満であることを特徴とする方法。

【請求項 5 2】

分子の適切な結晶化条件を決定するためのアレイ微結晶化における使用のために、 μL 以下のシッティングドロップを形成する方法であって、

20

複数の領域を含むマルチウェルプレートを取る工程であって、各領域がシッティングドロップ領域、及び、該マルチウェルプレートの領域内で組成が変化する母液溶液を含むウェルを含んでいる工程、

μL 以下の容量の母液溶液を、約 25 nL 未満の容量範囲内で、ウェルからシッティングドロップ領域へ送達する工程、及び、

結晶化させる分子を含む溶液の μL 以下の容量を、約 25 nL 未満の容量範囲内で、該シッティングドロップ領域へ送達する工程、

を含み、各シッティングドロップ領域に送達される μL 以下の容量の総量が 1 μL 未満であることを特徴とする方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の属する技術分野

本発明は、分子を結晶化する方法及び装置、より詳細には、分子、特に高分子、例えばタンパク質の結晶化を自動化する方法及び装置に関する。

【背景技術】

【0002】

関連技術の説明

ゲノミクス分野における急速な進歩は、ヒト及びその他の生物のゲノムに関する地図作製、配列決定及び分析による遺伝子情報のデータベースの爆発的な成長を提供した。特定の疾患、例えば癌になりやすい人の同定にとって決定的な多数の遺伝子が発見され、それらの生物学的機能が *in vitro* 及び/又は *in vivo* で評価されてきた。最近、ゲノミクスの新しい分野である機能的ゲノミクスが開発された。これは、ゲノム解析に由来する情報及び試薬を使用し、かつ、種々の生物、例えば酵母において遺伝子を発現させることにより、遺伝子機能の広範囲なゲノム分析を行うことを含んでいる。機能的ゲノミクスは、高スループットスクリーニング技術、例えば特定の遺伝子に対する DNA オリゴヌクレオチドチップ又は高密度マイクロアレイを使用することにより、発現パターンに関する重要な情報を生み出す。細胞中の標的遺伝子により発現したタンパク質とその他の高分子との相互作用のネットワークについての理解は、効率的なスクリーニング法、例えば酵母ハイ

40

50

ブリッド系などを使用することにより、前例のない速度で拡大している。

【0003】

これらのゲノムプロジェクトの最終目的の1つは、疾患遺伝子により発現するタンパク質に対しての有効な治療法の開発である。薬剤の発見及び開発のための種々の方法の中で、構造に基づく (structure-based) 薬剤開発は、計算技術の急速な進歩により、最も重要なアプローチの1つになっている。タンパク質の詳細な三次元構造についての理解は、合理的な薬剤デザイン及び研究所での開発を援助するだけでなく、コンピュータ支援ドッキング (docking) 分析の使用による高スループット薬剤スクリーニングにおける十分に定義された標的を提供する。

【0004】

高スループット様式におけるタンパク質構造の高解像度解析は、一連のゲノミクス及び薬剤開発において主要なボトルネックを提供する。タンパク質の高解像度構造は、X線結晶法により、最近では、小タンパク質又はペプチドに対する強磁界NMR装置における多次元NMR分光法を使用することにより解析される。

X線結晶法用の種々の方法が開発されてきている。これらの方法には、自由界面拡散法 (Salemme, F.R. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 151:533-539)、ハンギングドロップ又はシッティングドロップにおける蒸気拡散法 (McPherson, A. (1982) Preparation and Analysis of Protein Crystals, John Wiley and Son, New York, pp82-127) 及び液体透析 (Bailey, K. (1940) Nature 145:934-935) が含まれる。

【0005】

現在、ハンギングドロップ法が、溶液からの高分子結晶、特にタンパク質結晶を成長させるために最も一般的に用いられている方法である。一般的には、タンパク質溶液を含むドロップでカバースリップ上に斑点を付け (spot)、高濃度の沈殿剤を有するリザーバーを含む封止されたチャンパー中に吊す。時間がたつと、ドロップ中の溶液は、ドロップからの水蒸気の拡散によりリザーバーと平衡になる。これにより、ドロップ内のタンパク質濃度がゆっくりと増加し、次には、タンパク質の沈殿又は結晶化が起こる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

高い回折品質の結晶を成長させる方法は時間がかかり、複数の溶液変数、例えばpH、温度、イオン強度並びに塩、有機添加物及び界面活性剤の特定の濃度などについての試行錯誤の実験を含んでいる。更に、高度に精製されたタンパク質の量は通常制限されるので、これらの溶液条件における多次元の試験は、非現実的であり、労働集約的であり、かつ費用がかかるものである。

【0007】

幾つかの自動化結晶化システムが、ハンギングドロップ法に基づいて開発された (例えば、Cox, M.J. 及び Weber, P.C. (1987), J. Appl. Cryst. 20:366 及び Ward, K.B.ら (1988) J. Crystal Growth 90:325-339)。タンパク質及びその他の高分子に対する改善された自動化結晶化システムに対するニーズが存在している。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の要約

本発明は、分子の適切な結晶化条件を決定するためのアレイ微結晶化を行う方法に関する。分子は、X線結晶構造が必要とされる分子であろう。高スループット法、例えば本発明の方法の1つにより分子の高解像度構造の決定を使用して、薬剤開発を促進することができる。結晶化させる分子は、分子の結晶化形態が必要とされる分子であってもよい。例えば、分子の結晶化形態を作成すること及び分子の新規な結晶化形態を同定することが望ましいだろう。ある場合において、分子の特定の結晶化形態は、より生理活性が高く、高速に溶解し、容易に分解しにくく、及び/又は精製しやすいだろう。

【0009】

10

20

30

40

50

分子は一般的には高分子、例えばタンパク質であるが、その他のタイプの高分子であってもよい。分子は、好ましくは少なくとも500ダルトン、より好ましくは少なくとも1000ダルトンの分子量を有しているが、低分子量の分子を結晶化させてもよい。

【0010】

一つの態様において、本発明の方法は、

微結晶化物アレイ (array of microcrystallization) を形成する工程であって、各微結晶化物が、結晶化させる分子及び該アレイ内に变化した組成を有する母液溶液を含むドロップ (drop) を含んでおり、該ドロップは1 μ M未満の容量を有している工程、

該微結晶化物アレイを、該アレイ内のドロップ中で分子結晶を形成させるのに適切な条件下で格納 (store) する工程、及び、

10

該ドロップ中での分子結晶の形成を検出する工程、
を含んでいる。

【0011】

一つのバリエーションにおいて、本発明の方法は、

微結晶化物アレイを形成する工程であって、各微結晶化が、該アレイ内に变化した組成を有する母液溶液を含むウェル及び結晶化させる分子を含むドロップを含んでおり、該ドロップは1 μ L未満の容量を有している工程、

該微結晶化物アレイを、該アレイ内のドロップ中で分子結晶を形成させるのに適切な条件下で格納する工程、及び、

20

該ドロップ中での分子結晶の形成を検出する工程、
を含んでいる。

【0012】

別のバリエーションにおいて、本発明の方法は、

微結晶化物アレイを形成する工程であって、各微結晶化が、該アレイ内に变化した組成を有する母液溶液を含むウェル及び結晶化させる分子を含むドロップを含むカバースリップを含んでおり、該ドロップは1 μ L未満の容量を有している工程、

該微結晶化物アレイを、該アレイ内のドロップ中で分子結晶を形成させるのに適切な条件下で格納する工程、及び、

該ドロップ中での分子結晶の形成を検出する工程、
を含んでいる。

30

【0013】

更に別のバリエーションにおいて、本発明の方法は、

微結晶化物アレイを形成する工程であって、各微結晶化が、該アレイ内に变化した組成を有する母液溶液を含むウェル及び結晶化させる分子を含むドロップを含むシッティングドロップ領域を含んでおり、該ドロップは1 μ L未満の容量を有している工程、

該微結晶化物アレイを、該アレイ内のドロップ中で分子結晶を形成させるのに適切な条件下で格納する工程、及び、

該ドロップ中での分子結晶の形成を検出する工程、
を含んでいる。

40

【0014】

前記の方法のいずれにおいても、結晶化させる分子を含むドロップの容量は、約1 μ L未満、好ましくは約750 nL未満、より好ましくは約500 nL未満、特に好ましくは約250 nL未満である。一つのバリエーションにおいて、ドロップの容量は1 nL ~ 1000 nL、好ましくは1 nL ~ 750 nL、より好ましくは1 nL ~ 500 nLであり、更に好ましくは1 nL ~ 250 nLであり、特に好ましくは10 nL ~ 250 nLである。

【0015】

更に本発明は、分子の適切な結晶化条件を決定するためのアレイ微結晶化を行うためのプレートに関する。一つの態様にしたと、本発明のプレートは、母液溶液を保持するための少なくとも36のウェルを含み、各ウェルは、約500 μ L未満、好ましくは約4

50

00 μL 未満、より好ましくは約300 μL 未満、適宜約250 μL 未満のリザーバー容量を有している。使用するウェルの容量範囲は、25 μL ~ 500 μL 及び25 μL ~ 300 μL であるが、これに限定されるものではない。一つのバリエーションにおいて、プレートはハンギングドロップ結晶化を行うように設計される。別のバリエーションにおいて、プレートは、シッティングドロップ結晶化を行うように設計され、母液及び隣接するシッティングドロップウェルを含んでいる。

【0016】

更に本発明は、分子の適切な結晶化条件を決定するためのアレイ微結晶化において使用する、 μL 以下 (submicroliter) のドロップを形成する種々の装置に関する。

一つの態様において、本発明の装置は、

マルチウェルプレートが位置することが可能なプラットフォーム、

母液ドロップステーションであって、マルチウェルプレートの複数のウェルから母液を取り去り (remove)、かつ、 μL 以下の容量の母液を、約25 nL未満の容量範囲内で、マルチウェルプレートのドロップ領域へ送達することができるステーション、及び、

分子ドロップステーションであって、結晶化させる分子を含む溶液の μL 以下の容量を、約25 nL未満の容量範囲内で、ドロップ領域へ送達することができるステーション、を含んでいる。

【0017】

別の態様において、本発明の装置は、アレイ微結晶化に使用するカバースリップ上に μL 以下のハンギングドロップを作成するように設計されており、前記装置は、

マルチウェルプレートが位置することが可能なプラットフォーム、

複数のカバースリップが位置することが可能なカバースリップステーション、

母液ドロップステーションであって、前記マルチウェルプレートの複数のウェルから母液を取り去り、かつ、 μL 以下の容量の母液を、約25 nL未満の容量範囲内で、複数のカバースリップへ送達することができるステーション、及び、

分子ドロップステーションであって、結晶化させる分子を含む溶液の μL 以下の容量を、約25 nL未満の容量範囲内で、複数のカバースリップへ送達することができるステーション、

を含んでいる。

【0018】

更に別の態様において、本発明の装置は、アレイ微結晶化に使用する μL 以下のシッティングドロップを作成するように設計されており、前記装置は、

マルチウェルプレートが位置することが可能なプラットフォーム、

母液ドロップステーションであって、前記マルチウェルプレートの複数のウェルから母液を取り去り、かつ、 μL 以下の容量の母液を、約25 nL未満の容量範囲内で、マルチウェルプレートのドロップ領域へ送達することができるステーション、及び、

分子ドロップステーションであって、結晶化させる分子を含む溶液の μL 以下の容量を、約25 nL未満の容量範囲内で、前記ドロップ領域へ送達することができるステーション、

を含んでいる。

【0019】

前記の態様のいずれにもしたがうと、母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションは、それぞれ、 μL 以下の容量を、約20 nL未満、より好ましくは15 nL、特に好ましくは10 nL未満の容量範囲内で、送達することができる。

更に前記の態様のいずれにもしたがうと、 μL 以下のドロップを形成するための装置には、母液ドロップ及び/又は分子ドロップが形成しているか否かを検出するセンサーが含まれていてもよい。

母液ドロップステーション及び分子ドロップステーションは、それぞれ独立して、 μL 以下の容量を、少なくとも4つのカバースリップへ同時に、より好ましくは少なくとも8つのカバースリップへ同時に送達することができる。

10

20

30

40

50

【0020】

更に本発明は、分子の適切な結晶化条件を決定するためのアレイ微結晶化における使用のための μL 以下のドロップを形成する方法に関する。一つの態様にしたがうと、本発明の方法は、

マルチウェルプレートの複数のウェルから母液を取り去る工程、

μL 以下の容量の母液を、約 25 nL 未満の容量範囲内で、マルチウェルプレートのドロップ領域へ送達する工程、及び、

結晶化させる分子を含む溶液の μL 以下の容量を、 25 nL 未満の容量範囲内で、マルチウェルプレートのドロップ領域へ送達する工程、

を含み、各ドロップ領域に送達される μL 以下の容量の総量が $1\ \mu\text{L}$ 未満であることを特徴としている。 10

【0021】

更に別の態様にしたがうと、本発明の方法は、ハンギングドロップ結晶化法であって、以下の工程、

複数のカバースリップを取る (take) 工程、

マルチウェルプレートの複数のウェルから母液を取り去る工程、

μL 以下の容量の母液を、約 25 nL 未満の容量範囲内で、複数のカバースリップへ送達する工程、及び、

結晶化させる分子を含む溶液の μL 以下の容量を、約 25 nL 未満の容量範囲内で、該複数のカバースリップへ送達する工程、 20

を含み、各カバースリップに送達される μL 以下の容量の総量が $1\ \mu\text{L}$ 未満であることを特徴としている。

【0022】

更に別の態様にしたがうと、本発明は、シッティングドロップ結晶化法であって、以下の工程、

マルチウェルプレートの複数のウェルから母液を取り去る工程、

μL 以下の容量の母液を、約 25 nL 未満の容量範囲内で、マルチウェルプレートのシッティングドロップ領域へ送達する工程、及び、

結晶化させる分子を含む溶液の μL 以下の容量を、約 25 nL 未満の容量範囲内で、該シッティングドロップ領域へ送達する工程、 30

を含み、各シッティングドロップ領域に送達される μL 以下の容量の総量が $1\ \mu\text{L}$ 未満であることを特徴としている。

【0023】

前記の方法態様のいずれにもしたがうと、送達される μL 以下の容量の総量は、好ましくは約 750 nL 未満、より好ましくは約 500 nL 未満、特に好ましくは約 250 nL 未満である。ドロップ容量は 380 pL という少量であってよいことに注意すべきである。送達される容量は、好ましくは $1\text{ nL} \sim 750\text{ nL}$ 、より好ましくは $1\text{ nL} \sim 500\text{ nL}$ であり、更に好ましくは $1\text{ nL} \sim 250\text{ nL}$ であり、特に好ましくは $10\text{ nL} \sim 250\text{ nL}$ の範囲である。 40

【0024】

前記の装置及び方法の態様のいずれにもしたがうと、送達される容量の精度は、好ましくは約 25 nL 未満、より好ましくは 20 nL 未満、更に好ましくは 15 nL 未満、特に好ましくは 10 nL 未満である。送達される容量の精度は、 $380\text{ pL} \sim 25\text{ nL}$ 、より好ましくは $380\text{ pL} \sim 20\text{ nL}$ 、更に好ましくは $380\text{ pL} \sim 15\text{ nL}$ 、特に好ましくは $380\text{ pL} \sim 10\text{ nL}$ である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

発明の詳細な説明

本発明は、分子の適切な結晶化条件を決定するためのアレイ微結晶化を行う方法に関する。分子は、好ましくは高分子、例えばタンパク質である。その他のタイプの分子及び高 50

分子を、本発明にしたがい結晶化してもよい。分子は、好ましくは少なくとも500ダルトン、より好ましくは少なくとも1000ダルトンの分子量を有しているが、本発明を低分子量の分子に適用することができることに注意すべきである。

【0026】

本発明の方法は、微結晶化物アレイを形成する工程であって、各微結晶化物が、結晶化させる分子及び該アレイ内に变化した組成を有する母液溶液を含むドロップを含んでおり、該アレイは1 μ M未満の容量を有している工程を含んでいる。微結晶化物アレイは、分子結晶がアレイのドロップ中で形成するのに適切な条件下で格納される。分子結晶の形成はドロップ中で検出される。本明細書に記載されるように、本発明の方法は、ドロップに関連する含むすべての結晶化法（ハンギングドロップ結晶化法及びシッティングドロップ結晶化法を含むが、これらに限定されるものではない）において用いることができる。シッティングドロップ結晶化法の例は、米国特許第5,096,676号（McPhersonら）及び第5,419,278号（Carter）に提供されている。

10

【0027】

本発明の重要な特徴は、小容量のドロップを利用することである。例えば、結晶化させる分子を含むドロップの容量は、約1 μ L未満、好ましくは約750nL未満、より好ましくは約500nL未満、特に好ましくは約250nL未満である。一つのバリエーションにおいて、ドロップの容量は1nL~1000nL、好ましくは1nL~750nL、より好ましくは1nL~500nL、更に好ましくは1nL~250nLであり、特に好ましくは10nL~250nLである。

20

【0028】

本願出願人は、結晶化速度はドロップの容量に依存し、小容量のドロップを使用したときに結晶が早く形成すると考えている。結果として、本発明で用いる、より小容量のドロップを使用することより、結晶をより高速に形成することができる。このことは、結晶化条件を決定するための方法のスループット速度を有意に増加させる。

【0029】

理論に束縛されるものではないが、小容量のドロップは大容量のドロップよりも早く平衡化し、これが結晶のより早い形成を引き起こすものと考えられる。平衡化速度は、ドロップの蒸発速度とドロップの容量との間の関係に関連すると考えられる。一方、ドロップの蒸発速度はドロップの表面積に依存する。ドロップの表面積は、ドロップの容量に対して直線的に減少しない。結果として、小容量のドロップの20倍の容量を有する大きなドロップ（例えば、1 μ L対50nL）は、小さいドロップの表面積の20倍よりも有意に小さい表面積を有するだろう。ドロップの容量を減少させることにより、ドロップの蒸発速度（表面積依存性）とドロップの容量との間の関係を改善し、平衡化及び結晶形成を促進することができる。

30

【0030】

本発明の更なる利点は、ドロップの小容量が、少ない分子を使用して各結晶化試験を行うことを許容することである。結果として、同量の分子を用いて多数の結晶化試験を行うことができる。結晶化させる分子を得ることが困難であるとき及び首尾よく分子を結晶化させるために多数の結晶化試験が必要とされるとき、このことは大きな意義を有する。

40

【0031】

結晶化させる分子を生成しかつ精製することはしばしば困難である。タンパク質の結晶化の場合、大きさが1 μ Lよりも大きいドロップを使用した48回の結晶化試験を行うのに十分なタンパク質を生成しかつ精製するためには、1~2週間の研究室作業が必要となる。ドロップの容量を減少させ、これにより、1回の結晶化試験に使用する分子の量を減少させることにより、実行することができる結晶化試験の回数を有意に増加させることが可能になる。結果として、分子の結晶化試験に対するよりコンビナトリアルなショットガンアプローチをとることが可能になる。なぜなら、分子の使用法（usage）を保存する圧力が減少するからである。対照的に、本発明の μ リットル以下のドロップ容量の使用の前には、利用可能な分子の不足により、1回に行うことができる試験の数を最小化する必要

50

性が存在していた。

【0032】

ドロップの容量を減少させることにより、アレイ中で行うことができる微小結晶化の数が増加する。アレイ内の微小結晶化の数は、典型的には48よりも多く、好ましくは96よりも多く、より好ましくは144よりも多く、特に好ましくは192よりも多い。アレイ内の微小結晶化の数は、288又は384をこえることができる。例えば、480の微小結晶化を含むアレイを調製する装置が本明細書中に記載される。

【0033】

アレイ中で行うことができる微小結晶化の数を増加させることは、多数の異なるストック溶液を、アレイ中で使用する母液溶液を形成するために使用することを許容する。例えば、微小結晶化物のアレイを形成する工程には、アレイ中で使用する母液溶液を形成するために48のストック溶液を使用する工程を含めることができる。適宜、96をこえる、好ましくは144をこえる、最も好ましくは192をこえる異なるストック溶液を使用されるだろう。ストック溶液の数は288又は344をこえることができることに注意すべきである。例えば、本命最初に記載される装置は480の異なるストック溶液を使用している。

10

【0034】

小容量の母液を、ウェル中で使用してもよい。ウェル中で使用する母液の容量は、好ましくは約500 μ L未満であり、好ましくは約400 μ L未満であり、より好ましくは約300 μ L未満であり、適宜約250 μ L未満である。使用する母液の容量の範囲は、25 μ L~500 μ L及び25 μ L~300 μ Lであるが、これに限定されるものではない。この点について、微小結晶化物のアレイを形成する工程には、容量が約500 μ L未満、好ましくは約400 μ L未満、より好ましくは約300 μ L未満のウェルを複数含むプレート中で微小結晶化物を形成する工程が含まれるだろう。

20

【0035】

小容量の母液の使用は、マルチウェルプレート中のウェルを小さくし、これにより、単位面積あたりのマルチウェル中により多くのウェルを位置づけることを許容する。例えば、約500 μ L未満のウェル容量を有する48ウェルプレートは、タンパク質結晶化を行うために典型的に使用される24ウェルプレートと同様のフットプリント (footprint) を有している。更に、母液容量の減少を、プレートの大きさを小さくするために用いてもよい。

30

小さいドロップ容量を利用することにより、同量の分子を使用して、有意に多い数の結晶化試験を行うことができる。結果として、多数の結晶化試験を行うことが可能になり、このことは組成物中の母液溶液をより後半に変化させることを許容する。このことは、母液溶液を、アレイ内で変化する1、2、3、4、5、6又はそれより多い数の成分から形成することを許容する。

【0036】

本発明の方法にしたがうと、微小結晶化物のアレイは、1以上のマルチウェルプレートから形成される。各プレートは、好ましくは少なくとも24のウェル、より好ましくは少なくとも36のウェル、特に好ましくは少なくとも48のウェルを有している。少量の母液を利用することにより、同一サイズのプレートにより多くのウェルを含ませることを許容する小さいウェルを使用することができる。

40

【0037】

本発明にしたがうと、結晶形成を検出する工程には、形成した結晶(針状、立方体状等)、結晶の大きさ及び結晶構造の品質を特徴付ける工程を含めることができる。結晶を特徴付ける工程は、手動により、又はドロップのイメージを撮影し、ドロップ内に含まれる結晶構造について当該イメージを分析することにより行うことができる。

本発明の方法には、結晶を検出する母液溶液の組成を同定する工程及び追加の結晶化試験を行い、結晶を検出する母液の組成 (formulation) を更に変化させる工程を含めることができる。

50

【0038】

図1は、結晶化試験を行うための結晶化システム10を示している。結晶化システム10は、以下に述べる種々のステーション12に分割することができる。結晶化システム10が動作している間、マルチウェルプレートはプレートトラック14に位置づけられる。運搬アセンブリ(transport assembly)(示さず)は、マルチウェルプレートをプレートトラック14に沿って種々のステーション12に移動させる。

【0039】

結晶化システム10には、種々のステーション12と電気通信する処理装置16が含まれる。結晶化システム10に使用するために適切な処理装置16には、PC及びコンピュータワークステーションが含まれるが、これらに限定されるものではない。処理装置16には、各ステーション及び運搬アセンブリの動作を制御するための工程管理ロジック(process control logic)が含まれる。オペレーターは、1以上のユーザーインターフェースを使用して、工程管理ロジックと相互作用、工程管理ロジックを解放(disengage)及び/又は工程管理ロジックを変化させることができる。適切なユーザーインターフェースには、コンピュータモニタ、キーボード、マウス及びトラックボールが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0040】

結晶化システム10が動作している間、運搬アセンブリは、マルチウェルプレートを、それぞれが特定の機能を発揮するステーション12を通り越して移動させる。例えば、結晶化システム10には、プレートローディング(loading)ステーション18が含まれ、ここではマルチウェルプレートがプレートトラック14へ連続的にロードされる。更に結晶化システム10は、マルチウェルプレート上のバーコードを読み取ることができるバーコード読み取りステーションを含んでいる。更に結晶化システム10は、シーリング手段(sealing medium)ステーション22を含んでいる。シーリング手段ステーション22は、シーリング手段をマルチウェルプレートへ適用するために使用することができる。具体的には、シーリング手段は、各マルチウェルプレート中に定義される液体受け入れウェル(liquid receiving well)の上端に適用することができる。シーリング手段は、各ウェルの上端とウェルカバー(一般にはカバースリップと呼ばれる)との間のシール形成に役立つ。カバースリップは、結晶化システム10の後段のステーションにおいて、各ウェルの上に位置づけられる。更に結晶化システム10は、プレートカバー除去ステーション24を含んでいる。プレートカバー除去ステーション24では、プレートカバー44はマルチウェルプレートに送達されるか、又はマルチウェルプレートから取り去られる。

【0041】

更に結晶化システム10は、母液送達ステーション26を含んでいる。母液送達ステーションでは、母液をマルチウェルプレート中に定義されたウェルへ送達する。異なる母液を異なるウェルに送達することができ、又は、同一の母液を1以上のウェルに送達することができる。更に、母液を、単一のマルチウェルプレートの一部のウェルに送達し、残りのウェルは空のままにしておくこともできる。

【0042】

更に結晶化システム10は、ドロップ形成ステーション28を含んでいる。ドロップ形成ステーションでは、種々のウェルに由来する母液を使用して、ウェル上に位置しているカバースリップの複数に1以上のドロップを形成する。更にドロップ形成ステーション28は、結晶化させる分子を含有する溶液をカバースリップへ添加する。母液及び結晶化させる分子を含有するドロップがカバースリップに形成すると、カバースリップは、1以上のドロップがカバースリップからウェルへ垂れ下がるように、各ウェルを覆うように位置づけられる。

【0043】

ドロップ形成ステーションは、種々のウェルに由来する母液及び結晶化させる分子を含む溶液をシッティングドロップ領域へ送達することにより、マルチウェルプレートのシッティングドロップ領域中でのシッティングドロップの形成に容易に適合させることができ

10

20

30

40

50

る。

【0044】

更に結晶化システム10は、プレートカバー送達ステーション29を含んでいる。プレートカバー送達ステーションでは、プレートカバー44を各マルチウェルプレートに位置づけることができる。次いでマルチウェルプレートは、プレートアンローディング(unloading)ステーション30に運搬することができる。プレートアンローディングステーションでは、マルチウェルプレートをプレートトラック14から取り外し、格納することができる。

【0045】

図1に示される結晶化システム10は、単一のプレートトラック14の周囲に位置づけられる種々のステーション12を有しているけれども、種々のステーション12を1以上のサブシステム(適宜、サブシステム自体のトラックを有する)に分割することができることに注意すべきである。更に、多数のステーション12が適宜結晶化システム10に含まれていてもよく、又は取り除かれていてもよいことに注意すべきである。更にステーション12を、図1に示される配列以外の配列で位置づけることができる。例えば、プレートカバー除去ステーション24は、バーコード読み取りステーション20の前に位置づけることができる。更に、本明細書に記載される機能の幾つかを単一のステーションで行うこともできる。例えば、プレートカバー送達ステーション29は、ドロップ形成ステーション28又はプレートアンローディングステーション30と一体のものとして形成することができる。

10

20

【0046】

前記のステーション12は、単一のシステム中に含めるか、又は、独立した異なるサブシステム中に含めることができる。例えば、トレイローディングステーション、バーコード読み取りステーション20、シーリング手段ステーション22及び母液送達ステーション26を、単一の母液送達システム31に含ませることができ、又は、ドロップ形成ステーション28及びプレートアンローディングステーション30を、独立したドロップ形成ステーション32中に含めることもできる。更に、特定のステーションに関連する機能は、結晶化システム10の動作の間に行う必要がない。例えば、母液は、マルチウェルプレートを結晶化システム10へ入れる前に、外部装置によりマルチウェルプレートのウェルへ送達することができる。そのような場合、既に母液を含んでいるマルチウェルプレートが母液送達ステーション26に到達するとき、母液送達ステーション26は、母液をウェルに送達しないように動作することができる。

30

40

【0047】

例えば図1に示される結晶化システム10を介してマルチウェルプレートを処理することにより微小結晶化物アレイを調製した後、微小結晶化物アレイ内のドロップを、結晶の形成について観察することができる。特定のウェルのドロップ中に結晶が形成するとき、ドロップ中の結晶の品質を、種々の特徴、例えば形状、大きさ又は結晶形成時間について等級付けすることができる。各ウェル中で使用する母液が異なるとき、結晶の等級を比較して、どの母液が最も望ましい結晶と関連しているかを決定することができる。したがって、各ウェルは、その他の結晶化実験の結果と比較することができる結果を生じる異なる結晶化実験として役立つ。

【0048】

結晶化試験には、特定の分子の結晶化に使用する母液の組成を最適化するために、幾つかの結晶化実験の結果を比較する工程が含まれる。図2は、結晶化試験を行うための技術を示している。粗スクリーニングは、試験の初期段階で行われる。図2において、粗スクリーニングに関連する結晶化試験は、 CS_1 、 CS_2 及び CS_3 と標識された、3つの異なるアレイ内の複数のボックスセットとして示される。各アレイでは、母液組成の2つの変数を、示されるように各アレイに関してx及びy軸にそって漸増的に変化させる。例えば、 CS_1 において、幾つかの結晶化実験が行われ、そこでは、pHを間隔2で2~8に変化させ、 $(NH_4)_2SO_4$ の%を20%間隔で20~80%に変化させる。

50

【0049】

粗スクリーニングにおける結晶化実験を分析して、最良の結晶を与える（結晶が形成しない場合は、最良の結晶様沈殿物を与えるもの）1以上の結晶化実験を選択する。有望な結晶又は結晶様沈殿物を生成するものとして選択された粗スクリーニング実験は、図2において黒色のボックスとして示される。次いで、粗スクリーニングにより選択された結晶化実験について緻密スクリーニングを行う。

【0050】

緻密スクリーニング結晶化実験は、図2においてFS₁として標識されるように、粗スクリーニングにより選択された結晶化実験において使用された母液組成に基づいて結晶化物アレイを設計することにより行われる。緻密スクリーニング結晶化物アレイにおいて使用される母液の組成は、粗スクリーニングにより選択された実験において使用した母液の組成にわずかな変化を作成することにより選択される。例えば、粗スクリーニングにおいて使用した母液が2～8のpHを有し、選択された結晶化の母液が4.0のpHを有している場合、緻密スクリーニング実験において使用する母液は3.4～4.6のpHを有するだろう。更に、約4のpHを有する母液周辺のアレイに集中することにより、緻密スクリーニングFS₁における値の漸増的变化を減少させることができる。例えば、図2に示す粗スクリーニングCS₂の間のpHの漸増的变化は2.0である。一方、図2に示す緻密スクリーニングの間のpHの漸増的变化は0.4である。

【0051】

緻密スクリーニングにおける各結晶化実験において形成した結晶を、最良の結晶又は結晶様沈殿物を与える1以上の結晶化実験を選択するために分析する。緻密スクリーニング実験で選択された結晶化実験は、図2においてx印を有するボックスとして示される。緻密スクリーニングの間に形成した結晶が十分に高品質である場合、実験において形成した結晶を分離し、分離した結晶についてX線回折を行い、分子の結晶構造を解明するだろう。代替として、選択された緻密スクリーニング実験において使用した母液を使用して、更に結晶を成長させてもよい。しかしながら、緻密スクリーニングの間に形成した結晶が十分な品質でない場合、選択された緻密スクリーニング実験において使用した母液を追加の緻密スクリーニングの出発点として採用することにより、母液を更に最適化することができる。図2は、緻密スクリーニング結晶化実験の内、FS₂と標識される第2のアレイを示している。緻密スクリーニング実験を選択し、選択された実験に基づいてより緻密スクリーニングを行う、この反復性の工程を、結晶の調製における使用のために母液が同定されるまで繰り返すことができることに注意すべきである。

【0052】

本発明の微小結晶化法及び装置を使用して、1μLよりも大きいドロップの大きさを有する可能性のあった従来の母液のラージセットを分析するために、図2に関して記載される粗スクリーニングアレイ実験を行ってもよい。緻密スクリーニングアレイ実験を、本発明の微小結晶化法及び装置を使用して行うか、又は、ドロップの大きさが1μLよりも大きくなる場合に行ってもよい。

【0053】

図3Aは、ハンギングドロップアレイ微小結晶化を行うために本発明の方法及び装置と共に使用されるマルチウェルプレート34の平面図を示している。図示されるように、マルチウェルプレート34は、6列（カラム）及び8行に並んでいるウェル38を定義する支持構造36を含んでいる。図3Aは、ウェル38をトータルで48有するマルチウェルプレート34を示しているが、マルチウェルプレート34は異なる数のウェル38を含むことができる。

【0054】

図3Bは、図3Aに示すマルチウェルプレート34の側面図を提供している。各ウェル38は、支持構造36の上部へ伸張する上端40を含んでいる。好ましくは、上端40は、シーリング手段、例えばグリスの層を上端40に適用することができるのに十分な幅を有している。好ましくは、支持構造36は、あるマルチウェルプレート34が、隣接する

10

20

30

40

50

マルチウェルプレート 3 4 のウェル内容物に干渉することなしに、マルチウェルプレート 3 4 が互いにその上部で積み重なることを許容するように幾何学性を有している。

【 0 0 5 5 】

図 3 C は、シッティングドロップアレイ微小結晶化を行うために本発明の方法及び装置と共に使用されるマルチウェルプレート 3 4 の平面図を示している。図示されるように、マルチウェルプレート 3 4 は、6 列及び 8 行に並んでいる 4 8 のウェル 3 8 を定義する支持構造 3 6 を含んでいる。ウェル 3 8 を 4 8 つ有するマルチウェルプレート 3 4 が示されるが、マルチウェルプレート 3 4 は異なる数のウェル 3 8 を含むことができる。ウェル領域 4 1 は、シッティングドロップ領域 4 2 に隣接している。シッティングドロップ領域 4 2 は、ウェル 3 8 内に中心的に位置するように示されているが、シッティングドロップ領域 4 2 はウェル 3 8 の一端 (one side) に位置づけることができる。

10

【 0 0 5 6 】

図 3 D は、図 3 C に示されるマルチウェルプレート 3 4 の側面図を提供する。シッティングドロップ領域 4 2 は、ウェル 3 8 の底面から上方へ伸張している。切断図により示されるように、シッティングドロップ領域 4 2 は、凹所 (recess) を含むことができる。凹所では、シッティングドロップを形成することができる。各ウェル 3 8 は、支持構造 3 6 の上部に伸張する上端 4 0 を含んでいる。上端 4 0 は、シーリング手段、例えばグリスの層を上端 4 0 に適用することができるのに十分な幅を有している。好ましくは、支持構造 3 6 は、あるマルチウェルプレート 3 4 が、隣接するマルチウェルプレート 3 4 のウェル 3 8 の内容物に干渉することなしに、マルチウェルプレート 3 4 が互いにその上部で積み

20

【 0 0 5 7 】

プレートカバー 4 4 は、図 3 E に示されるように、各マルチウェルプレート 3 4 の上に位置づけられることができる。プレートカバー 4 4 は、カバーがウェル 3 8 の上端 4 0 に載る (rest on) ように設計される。図 3 E に示されるように、インサート 4 6 は、インサート 4 6 がウェル 3 8 の上端 4 0 に載るように、プレートカバー 4 4 とマルチウェルプレート 3 4 との間に位置づけることができる。インサート 4 6 は、カバー 4 4 から取り去ることができるものであるか、又は、プレートカバー 4 4 に永久的に付着しているものであることができる。インサート 4 6 は、ウェル 3 8 からの蒸発を減少させるために、インサート 4 6 がインサート 4 6 とウェル 3 8 の上端 4 0 との間にシールを提供するように、

30

【 0 0 5 8 】

図 3 A に示されるように、マルチウェルプレート 3 4 は、支持構造 3 6 上に形成されたバーコード 4 8 を含むことができる。更にマルチウェルプレート 3 4 は、バーコードステッカーを受け入れるための大きさに作られた表面 5 0 を含むことができる。代替として、バーコードをプレートカバー 4 4 上に形成し、当該プレートカバー 4 4 はバーコードステッカーを受け入れるための大きさに作られた表面を含むことができる。マルチウェルプレート 3 4 又はプレートカバー 4 4 がバーコードステッカーを受け入れるための表面を含むとき、バーコードステッカーは、好ましくはマルチウェルプレート 3 4 から取り外し可能

40

であり、そのため異なるバーコードを単一のマルチウェルプレートに固定することができる。後述するように、バーコードは、マルチウェルプレート 3 4 及び / 又はマルチウェルプレート 3 4 の内容物をシステム管理ロジックに対して同定するために使用することができる。

【 0 0 5 9 】

図 4 A ~ 4 J は、図 1 に示す母液送達システム 3 1 の種々のステーション 1 2 の態様を示している。図 4 A 及び 4 B は、マルチウェルプレート 3 4 をプレートトラック 1 4 に連続的にロードするプレートローディングステーション 1 8 を示している。図 4 A はプレートトラック 1 4 を横断的に見たプレートローディングステーション 1 8 の側面図であり、図 4 B はプレートトラック 1 4 の縦軸を見下ろしたプレートローディングステーション 1

50

8の側面図である。プレートローディングステーション18は、プレートトラック14上に位置するタワー52を含み、そのためプレートトラック14はタワー52の底部から外側に伸張している。タワー52は、別のマルチウェルプレート34の上部に配置されたマルチウェルプレート34からなるスタック(stack)を受け入れる大きさに作られたシュート(chute)54を含んでいる。

【0060】

更にプレートローディングステーション18は、スタックの底部のマルチウェルプレート34をプレートトラック14へ下降させることを保証することができるプレート下降装置(示さず)を含んでいる。重力の作用により、新しいマルチウェルプレート34は、プレートトラック14へ下降したマルチウェルプレート34の位置へ移動する。プレートタワー52とプレートトラック14との間隔は、図4Aに示されるように、プレート運搬アセンブリがマルチウェルプレート34をタワー52の下から外へ向かってプレートトラック14へと下方に移動させるのに十分なものである。マルチウェルプレート34がタワー52の真下から運搬されると、プレート下降装置は、シュート54の底部の新しいマルチウェルプレート34がプレートトラック14にロードされることを再保証する。プレートローディングステーション18は幾つかのマルチウェルプレート34を保持することができ、かつ、各マルチウェルプレート34をプレートトラック14へ連続的に位置づけることができるので、母液送達システム31は、オペレーターが各マルチウェルプレート34をプレートトラック14に手で位置づけることなしに、多数のマルチウェルプレート34を処理することができる。

10

20

【0061】

プレートローディングステーション18は、プレート下降装置を逆転動作することにより、プレート34アンローディング(unloading)ステーションへと容易に適合させることができる。この逆転動作により、タワー52の真下に位置するマルチウェルプレート34はプレートトラック14から上昇し、シュート54内に格納されるマルチウェルプレート34のスタックに追加される。

【0062】

図4Cはバーコード読み取りステーション20を示している。バーコードリーダー56はプレートトラック14のそばに位置している。バーコードリーダー56は、バーコードリーダー56がプレートトラック14上のマルチウェルプレート34のバーコード48を読み取ることを許容する角度で、プレートトラック14に向けられている。前述の通り、バーコードはマルチウェルプレート34上に形成するか、又は、マルチウェルプレート34上に位置づけられるバーコードステッカーに含めることができる。バーコードリーダー56はシステム管理ロジックによってモニターされ、各バーコードは特定のマルチウェルプレート34及び/又は特定のマルチウェルプレート34の特徴と関連づけられる。適切な特徴には、マルチウェルプレート34中のウェル38の数、マルチウェルプレート34中のウェル38の容量、マルチウェルプレート34がプレートカバー44を含むか否か等が含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

【0063】

マルチウェルプレート34に関する情報をシステム管理ロジックに示すために、マルチウェルプレート34の特徴は管理的(administratively)に入力されることができる。例えば、ユーザーは、マルチウェルプレート34上の特定のウェル38に送達される特定の母液の同定等の特徴を入力することができる。更に、オペレーターが、母液をマルチウェルプレート34のウェル38へ送達するための外的な方法を使用する場合、ユーザーはこの方法の使用をシステム管理ロジックに示すことができる。種々の母液がマルチウェルプレート34のウェル38内に既に存在しているので、システム管理ロジックは、マルチウェルプレート34のウェル38に更なる母液を送達することを回避するために、母液送達ステーションに優先することができる。

40

【0064】

マルチウェルプレート34は母液送達システム31、ドロップ形成システム32及び/

50

又は結晶化システムを通過して移動するので、マルチウェルプレート34に関連する特徴は、マルチウェルプレート34のステータスの変更を反映するために、システム管理ロジックによって適宜修正することができる。例えば、システム管理ロジックは、母液が添加された時刻又はドロップが形成した時刻を書き留める (note) することができる。

【0065】

図4Dはシーリング手段ステーション22を示している。シーリング手段ステーション22は、マルチウェルプレート34がシーリングメンバー60の下に移動することを許容する高さに、プレートトラック14上に吊されているシーリングメンバー60を含んでいる。シーリングメンバー60は、複数のシーリング手段インジェクター64を有するシーリング表面62を含んでいる。各シーリング手段インジェクターは、各マルチウェルプレート34中のウェル38に対して同時に配置されるように配置される。シーリング手段インジェクター64は、シーリング手段ソース66と水力的に連絡 (hydraulic communication) した状態で存在している。したがって、シーリング手段は、シーリング手段ソース66から、シーリング手段インジェクター64に隣接するシーリング表面62の一部へ送達されることができる。

10

【0066】

シーリングメンバー60は、マルチウェルプレート34中のウェル38に関連してシーリングメンバー60を移動させるためのアクチュエータと結びつけることができる。シーリングメンバー60は、矢印Aで示されるように、マルチウェルプレート34の上を垂直的に移動することができる。シーリングメンバー60は、矢印Bで示されるように、マルチウェルプレート34に対して横方向に移動することもできる。適切なアクチュエータには、空気圧ピストン、水圧ピストン及び電動モーターが含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0067】

シーリング手段ステーション22の動作において、プレート運搬アセンブリは、マルチウェルプレート34を、マルチウェルプレート34中のウェル38がシーリング手段インジェクター64の真下に位置づけられる場所へと運搬する。シーリングメンバー60は、シーリング表面62がマルチウェルプレート34中のウェル38の上端40と接触するまで下降する。マルチウェルプレート34中のウェル38は、シーリングメンバー60の下降動作の前にシーリング手段インジェクター64に対して整列しているため、各ウェル38の上端40は、シーリング手段インジェクターを取り囲んでいる。シーリング表面62がウェル38の上端40と接触すると、シーリングメンバー60は横方向に移動する。横方向の移動により、シーリングメンバー60はウェル38の端に沿って環状経路 (circular path) を追従する。ただし、ウェル38の外形に依存してその他の経路を使用してもよい。この横方向の移動は、シーリング表面62に送達されたシーリング手段を、各ウェル38の上端40へ移動させる。

30

【0068】

各ウェル38の上端40に移動させられるシーリング手段の量は、シーリング手段インジェクター64に隣接するシーリング表面62に存在するシーリング手段の量に依存する。ウェル38の上端40に送達されるシーリング手段の量は、カバースリップとウェル38の上端40との間に実質的に気密性のシールを作成するのに十分な量でなければならない。適切なシーリング手段にはグリス及びワセリンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

40

【0069】

シーリング手段ステーション22に関して、当該ステーションは、シッティングドロップアレイ結晶化だけでなくハンギングドロップアレイ結晶化についての使用と容易に適合させられるものであることに注意すべきである。各タイプのドロップアレイ結晶化に関して、気密シールは、ウェル38とカバースリップ又はウェル38を覆うように位置づけられるその他のカバーメンバー (covering member) との間に形成されなければならない。

【0070】

50

図 4 E は、プレートトラック 1 4 に隣接して位置するプレートカバー 4 4 除去ステーション 2 4 の側面図である。プレートカバー 4 4 除去ステーション 2 4 は、矢印 A により示されるように垂直的に動き、かつ、矢印 B に示されるように横方向に動くように構成されたキャリッジ (carriage) 6 8 を含んでいる。複数の真空フィッティング (vacuum fitting) 7 0 は、キャリッジ 6 8 と結合されており、かつリリース可能な真空ソースとの空氣的に連絡している。適切な真空フィッティングには、カップ形状を有しかつ真空ソースと空氣的に連絡している真空ポート (vacuum port) を含んでいるゴム製フィッティングが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 7 1 】

プレートカバー除去ステーション 2 4 の動作中、プレート運搬アセンブリは、マルチウェルプレート 3 4 をカバー除去ステーション 2 4 の近くの位置へ移動させる。マルチウェルプレート 3 4 がプレートカバー 4 4 を有する場合、キャリッジ 6 8 は、各真空フィッティング 7 0 がマルチウェルプレート 3 4 上に置かれるまで横方向に移動させられる。キャリッジ 6 8 は、真空フィッティング 7 0 の少なくとも一部がプレートカバー 4 4 と接触するまで下降する。真空ソースは、キャリッジ 6 8 に対してプレートカバー 4 4 を固定化するために作動する。キャリッジ 6 8 はその元の高さまで上昇する。キャリッジ 6 8 の垂直方向の動作は、プレートカバー 4 4 をマルチウェルプレート 3 4 から取り去る。次いでキャリッジ 6 8 は、キャリッジ 6 8 がプレートカバー格納コンポーネント 7 2 の上に置かれるまで横方向に移動させられる。キャリッジ 6 8 は、プレートカバー格納コンポーネント 7 2 内へ下降し、真空ソースは、プレートカバー 4 4 をプレートカバー格納コンポーネント 7 2 内へ落とすために離れる (disengage)。最後に、キャリッジ 6 8 は元の位置に戻される。

【 0 0 7 2 】

プレートカバー除去ステーション 2 4 は、プレートカバー除去ステーション 2 4 を逆作動させることにより、プレートカバー送達ステーション 2 9 に適合させることができる。

逆作動により、プレートカバー 4 4 は、プレート 2 4 カバー格納コンポーネント 7 2 から取り出され、次いでマルチウェルプレート 3 4 上に置かれる。結晶化システム 1 0 がプレートカバー除去ステーション 2 4 及びプレートカバー送達ステーション 2 9 を使用するとき、プレートカバー除去ステーション 2 4 とともに使用されるプレートカバー 4 4 は、プレートカバー送達ステーション 2 9 とともに使用されるプレートカバー 4 4 と同一又は異なっていることができる。

【 0 0 7 3 】

図 4 F は、母液送達ステーション 2 6 の平面図である。当該ステーションにおいて、母液はマルチウェルプレート 3 4 のウェル 3 8 へ送達される。母液送達ステーション 2 6 は、複数の送達シャトル 7 4 を含んでいる。各シャトルは、ブロック支持体 7 8 に沿ってスライドするように構成されている送達ブロック 7 6 を含んでいる。

矢印 A で示されるように、送達ブロック 7 6 は、ブロックアクチュエータ 8 0 と結び付いて、送達ブロックをプレートトラック 1 4 に対して横方向にスライドさせる。適切なブロックアクチュエータ 8 0 には、空気圧ピストン、水圧ピストン及び電気モーターが含まれるが、これに限定されるものではない。

【 0 0 7 4 】

図 4 G は、送達ブロック 7 6 の平面図を提供する。複数のルーメン 8 2 が送達ブロック 7 6 を通して伸張している。ルーメン 8 2 は、第一送達グループ 8 4 及び第二送達グループ 8 6 に分けられる。図 4 H に示されるように、液体インジェクター 8 8、例えばシリンジは、ルーメン 8 2 のそれぞれに取り外し可能な状態で位置づけられる。各送達グループ 8 4、8 6 におけるルーメン 8 2 は、液体インジェクター 8 8 がマルチウェルプレート 3 4 の異なるウェル 3 8 に対して同時に配置されるように送達ブロック 7 6 上に配置される。したがって、各送達グループ 8 4、8 6 におけるルーメンの数は、好ましくはマルチウェルプレート 3 4 中のウェル 3 8 の数と等しい。例えば、マルチウェルプレート 3 4 が 4 8 個のウェル 3 8 を含むとき、各送達グループ 8 4、8 6 は、好ましくは 4 8 個のルーメ

ン 8 2 を含む。

【 0 0 7 5 】

各液体インジェクター 8 8 は、母液ソースと液体的に連絡 (liquid communication) することができる。1 以上の液体インジェクター 8 8 が単一の母液ソースと液体的に連絡することができる。しかしながら、各液体インジェクター 8 8 は、好ましくは異なる母液ソースと液体的に連絡している。図 4 H は、5 つの第一送達グループ 8 4 及び 5 つの第二送達グループ 8 6 (各グループは 4 8 個の液体インジェクター 8 8 を含んでいる) を有する母液送達ステーション 2 6 を示している。したがって、各液体インジェクター 8 8 が異なる母液ソースと液体的に連絡しているとき、4 8 0 の母液ソースが要求される。

【 0 0 7 6 】

図 4 I は、異なる母液ソース 9 2 を保持する母液ソース格納バンク 9 0 の側面図である。バンク 9 0 は、5 列 4 行に配置されたソースホルダー 9 4 を含んでいる。各ソースホルダー 9 4 は複数の母液ソース 9 2 を保持ことができ、バンク 9 0 の内外にスライドして、単一のソースホルダー 9 4 により保持される母液ソース 9 2 への容易なアクセスを提供することができる。各マルチウェルプレート 3 4 が 4 8 個のウェル 3 8 を有するとき、各ソースホルダー 9 4 は、好ましくは 1 2 の異なる母液ソース 9 2 を保持している。したがって、各カラムは 4 8 個の母液ソース 9 2 を含み、各ソースは同一の送達グループ 8 4、8 6 に含まれる異なる液体インジェクター 8 8 と液体的に連絡することができる。結果として、母液ソース 9 2 の各カラムは、単一の送達グループ 8 4、8 6 に関連付けることができる。母液バンク 9 0 は、プレートトラック 1 4 のいずれかの側に含まれることができる。プレートトラック 1 4 の一方の側に位置づけられた母液ソース 9 2 は、トラックの最も近い側の送達グループ 8 4、8 6 と液体的に連絡することができる。一方、プレートトラック 1 4 の反対側に位置づけられた母液ソース 9 2 は、プレートトラック 1 4 の反対側にある送達グループ 8 4、8 6 と液体的に連絡することができる。

【 0 0 7 7 】

母液送達ステーション 2 6 の動作中、プレート運搬アセンブリは、マルチウェルプレート 3 4 を特定の 1 つの送達ブロック 7 6 の真下に移動させる。ブロックアクチュエータ 8 0 は、送達ブロック 7 6 を、特定の送達グループ 8 4、8 6 がマルチウェルプレート 3 4 中のウェル 3 8 について整列するように移動させることができる。特定の送達ブロック 7 6 及び特定の送達グループ 8 4、8 6 は、オペレーターがマルチウェルプレート 3 4 のウェル 3 8 に送達することを望む母液と関連させることができる。次いで母液は、母液ソース 9 2 から液体インジェクター 8 8 を通して、当該母液について整列したウェル 3 8 へと送達される。母液の各ウェル 3 8 への送達は同時に起こすことができ、好ましくは同容量の母液を各ウェル 3 8 へ送達する。

【 0 0 7 8 】

図 4 J は、母液を母液ソース 9 2 から液体インジェクター 8 8 を通してマルチウェルプレート 3 4 のウェル 3 8 へ送達するためのシリンジポンプを示している。母液は、母液ソース 9 2 から液体導管 9 6 を経て液体インジェクター 8 8 へ流れる。液体導管 9 6 は、母液ソース 9 2 と液体インジェクター 8 8 との間に位置するシリンジ 9 8 と液体的に連絡している。矢印 A にて示されるように、シリンジ 1 0 0 内の容量は機械的に圧縮し、かつ膨張させることができる。第一のピンチバー (pinch bar) 1 0 2 は、シリンジ 1 0 4 の入口側に位置づけられ、第二のピンチバー 1 0 6 はシリンジ 1 0 4 の出口側に位置づけられる。第一のピンチバー 1 0 2 及び第二のピンチバー 1 0 6 は、ロッカーバー 1 1 0 と結び付いている。図 4 J において、ロッカーバー 1 1 0 が第一の部位を占有すると、第一のピンチバー 1 0 2 は液体導管 9 6 を締め付けてシリンジの入口側を閉めるが、一方、シリンジ 1 0 8 の出口側は遮られない。ロッカーバー 1 1 0 は第二の部位を占有することができ、この場合、第二のピンチバー 1 0 6 は液体導管 9 6 を締め付けてシリンジ 1 0 8 の出口側を閉めるが、シリンジ 1 0 8 の出口側は遮られない。ロッカーバー 1 1 0 は、矢印 B で示されるように第一及び第二の部位を自動的に移動することができる。

【 0 0 7 9 】

10

20

30

40

50

シリンジポンプの動作中、ロッカーバー 110 は第一の部位を占有し、シリンジ 100 内の容量は、液体インジェクター 88 からウェル 38 へ送達される母液の量により膨張する。シリンジ 108 の出口側の液体導管 96 は締め付けられて閉じているので、シリンジ 100 内の容量の特定量の膨張は、母液ソース 92 からの特定量の引き出しを起こす。ロッカーバー 110 発意で第二の部位に移動し、シリンジ 100 内の容量は、液体インジェクター 88 を通してウェル 38 へと送達される母液の量により圧縮される。シリンジ 104 の入口側の液体導管 96 は閉じているので、シリンジ 100 内の容量の特定量の圧縮は、特定量が液体インジェクター 88 を通して関連するウェル 38 へ流れることを引き起こす。

【0080】

前記の母液送達セクションは例示目的であり、種々の改変が可能である。例えば、母液送達ステーション 26 は、5 つより多い又はわずか 1 つの送達シャトル 74 を含むことができる。更に、各送達シャトル 74 は、2 より多い又はわずか 1 つの送達グループを含むことができる。送達シャトル 74 が単一の送達グループを含むとき、ブロックアクチュエータ 80 を除去して、送達シャトル 74 はプレートトラック 14 に対して固定することができる。更に、プレートトラック 14 及び送達ブロック 76 の動作の組合せを使用して、特定の液体インジェクター 88 を特定のウェル 38 の上に位置付け、母液をウェル 38 へ連続的に送達することもできる。したがって、特定の母液を特定のウェルへ送達することができる。

【0081】

図 5 A ~ 5 E は、ドロップ形成システム 32 に含まれる種々のステーションを示している。図 5 A ~ 5 E に関して示されるドロップ形成システム 32 は、ハンギングドロップアレイ結晶化に適合していることに注意すべきである。ドロップ形成システム 32 は、例えば図 3 C に示されるように、母液ドロップ及び分子溶液ドロップを、カバースリップとは反対に、マルチウェルプレート 34 のシッティングドロップ領域 42 上に堆積させることにより、シッティングドロップアレイ結晶化に容易に修正することができる。

【0082】

図 5 A はドロップ形成ステーション 28 の平面図であり、図 5 B はドロップ形成ステーション 28 の側面図である。ドロップ形成ステーション 28 は、洗浄溶液が流れる洗浄ベースン (wash basin) 112 を含んでいる。

適切な洗浄溶液には、水が含まれるが、これに限定されるものではない。更にドロップ形成ステーション 28 は、結晶化させる分子を含む溶液を格納する 1 以上の分子溶液ウェル 116 を有する分子溶液格納コンポーネント 114 を含んでいる。ドロップ形成システム 32 が動作中でないとき、分子溶液ウェル 116 は、分子溶液を格納するためにキャップをすることができる。分子溶液格納コンポーネント 114 は、分子溶液ウェル 116 内の分子溶液を冷却するために冷蔵することができる。例えば、分子溶液がある分子溶液であるとき、ドロップ形成ステーション 28 が動作中又は動作していないときのいずれかであるとき、当該分子溶液を好ましくは 3 ~ 4 に維持する。更にドロップ形成ステーション 28 は、シリンジポンプ 118 及びカバースリップ格納用のカバースリップ格納コンポーネント 120 を含んでいる。

【0083】

更にドロップ形成ステーション 28 は、矢印 A で示されるように垂直方向に移動し、かつ矢印 B で示されるように横方向に移動するように構成されたピペットホルダー 122 を含んでいる。ピペットホルダー 122 の横方向の動作範囲は、ピペットホルダー 122 が洗浄ベースン上の部位及びカバースリップホルダー 124 上の部位を含む種々の部位に移動することを許容する。更にドロップ形成ステーション 28 は、矢印 C で示されるように反転するように構成されたカバースリップホルダー 124 を含んでいる。カバースリップホルダー 124 は、矢印 D で示されるように垂直方向に移動することができ、かつ矢印 E で示されるように横方向に移動することができる。ピペットホルダー 122 の横方向の動作範囲は、ピペットホルダー 122 が、カバースリップ格納コンポーネント 120 条の部

10

20

30

40

50

位及びプレートトラック14条の幾つかの部位を含む種々の部位に移動することを許容する。更にドロップ形成ステーション28は、分子送達ピペット126を含んでいる。分子送達ピペットは、矢印Fで示されるように垂直方向に移動し、矢印Gで示されるように横方向に移動し、かつ、矢印Hで示されるように長軸方向に移動するように構成されている。長軸方向及び横方向の動作範囲は、分子送達ピペット126が、各分子溶液ウェル上の部位及びカバースリップホルダー124上の複数の部位を含む種々の部位に移動することを許容する。

【0084】

上記の移動は、ピペットホルダー122、カバースリップホルダー124及び分子送達ピペット126を種々の異なるアクチュエータに結びつけることにより達成することができる。適切なアクチュエータには、空圧ピストン、水圧ピストン及び種々のモーターが含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

【0085】

図5Cは、ピペットホルダー122の側面図である。ピペットホルダー122はピペット支持フレーム128を含んでいる。ピペット支持フレーム128は、マルチウェルプレート34のカラム中のウェル数と同数のピペット130を保持している。ピペット130は、マルチウェルプレート34のカラム中のウェル38間の間隔に近い間隔で保持される。この間隔は、各ピペット130がカラム中の異なるウェル38に対して同時に整列することを許容する。

【0086】

各ピペット130は、バルブ132及びバルブ132からシリンジポンプ118へ伸張する導管134を含んでいる。シリンジポンプ118を使用して、液体をピペット130へ引き出し、かつ液体をピペット130の外へ押し流すことができる。バルブ132は、ピペット130から特定の大きさのドロップを送達するように構成することができる。これらのドロップは、所望の総容量がピペット130から送達されるまで、ピペット130から送達される。適切なバルブ132には、380 pLという少量のドロップを送達するように構成することができる圧電バルブ及びソレノイドバルブが含まれるが、これらに限定されるものではない。これにより、380 pLという少量の母液ドロップの生成が許容される。ピペット130により送達されるドロップの大きさを更に減少させることは、可能であり、好ましくあり、かつ、本発明の範囲内にあることが意図される。

20

30

【0087】

分子送達ピペット126に使用するピペットの配列は、ピペットホルダー122内のピペット130に使用するピペットの配列と類似している。したがって、分子送達ピペット126は、バルブ132及びバルブ132からシリンジポンプ118へ伸張する導管134を含んでいる。分子送達ピペット126は、380 pLという少量の分子溶液ドロップを生成することができる。送達するドロップの大きさを更に減少させることは、可能であり、好ましくあり、かつ、本発明の範囲内にあることが意図される。

【0088】

図5Dは、カバースリップホルダー124の側面図である。カバースリップホルダー124は、マルチウェルプレート34のカラム中のウェル38間の間隔に近い間隔でカバースリップを取り外し可能に保持するために形成されている複数のサポートカップ138を支持するフレーム136を含んでいる。この間隔は、各カバースリップが、マルチウェルプレート34のカラム中の異なるウェル38に対して同時に整列することを許容する。

40

【0089】

サポートカップ138は、カバースリップをサポートカップ138に対して所定の位置に固定するためのアタッチメント機構140を含むことができる。カバースリップホルダー124が反転するとき、アタッチメント機構140は、カバースリップを所定の位置に維持するのに役立つ。しかしながら、アタッチメント機構140は、所望の時間にカバースリップを遊離することができる。適切なカバースリップホルダー124には、サポートカップ138中に位置する真空ポートと空氣的に連絡する真空ソースが含まれるが、これ

50

に限定されるものではない。真空ポートを通して真空吸引することは、カバースリップをカバースリップホルダー 1 2 4 上の適切な位置に維持するのに役立つ。しかしながら、カバースリップホルダー 1 2 4 が逆転するとき、真空は、真空ソースを解放することにより、又は真空を逆転することにより遊離することができる。真空の遊離により、カバースリップはカバースリップホルダー 1 2 4 から遊離する。

【 0 0 9 0 】

図 5 E は、互いに積み重ねられたカバースリップ 1 4 4 を保持する大きさにある複数のマガジン 1 4 2 を含むカバースリップ格納コンポーネント 1 2 0 の側面図である。マガジン 1 4 2 内のカバースリップ 1 4 4 の積み重ねは、積み重ねの上部のカバースリップ 1 4 4 がマガジン 1 4 2 の上部近くに存在するようになるまで、上向きにバイアス (bias) される。マガジン 1 4 2 間の間隔は、カバースリップホルダー 1 2 4 のサポートカップ 1 3 8 間の間隔に近い。この間隔は、各マガジン 1 4 2 が、カバースリップホルダー 1 2 4 の異なるサポートカップ 1 3 8 に対して動じに配列することを許容する。したがって、各マガジン 1 4 2 からのカバースリップ 1 4 4 は、異なるサポートカップ 1 3 8 に対して配列することができる。

10

【 0 0 9 1 】

図 6 A ~ 6 I は、マルチウェルプレート 3 4 の各ウェル 3 8 においてハンギングドロップを形成するためにドロップ形成ステーション 2 8 を操作する方法を示している。これらの図面は、タンパク質の結晶化に関して説明されているが、同様の方法をその他のタイプの分子の結晶化に使用することができる。図 6 A は、ドロップ形成ステーション 2 8 が未使用にあるか、又は、ドロップ形成ステーション 2 8 へ運搬されるマルチウェルプレート 3 4 の間にあるときに占有することができる静止ポジションにあるドロップ形成ステーション 2 8 を示している。静止ポジションにおいて、カバースリップ 1 4 4 は、プレートトラック 1 4 の一方の側に位置するカバースリップホルダー 1 2 4 に付着し、ピペットホルダー 1 2 2 は、プレートトラック 1 4 の他方の側に位置している。

20

【 0 0 9 2 】

図 6 B は、ドロップ形成のための位置に移動したマルチウェルプレート 3 4 及びピペット 1 3 0 のプライム (prime) のために洗浄ベースン上の位置に移動したピペットホルダー 1 2 2 を示している。ピペットホルダー 1 2 2 は、ピペットチップが洗浄ベースン 1 1 2 内の洗浄液内に存在するようになるまで下降する。

30

洗浄液は洗浄ベースン 1 1 2 から吸引され、ピペットホルダー 1 2 2 は上昇してピペットチップを洗浄液から取り出す。洗浄液はピペット 1 3 0 から排出される。吸引及び排出工程は、適切にプライムされたピペット 1 3 0 を達成する必要がある度に繰り返すことができる。

【 0 0 9 3 】

図 6 C は、プレート 3 4 のウェル 3 8 のカラム上の位置に移動したピペットホルダー 1 2 2 を示している。ピペットホルダー 1 2 2 は、各ピペットチップがカラム中の異なるウェル 3 8 に対して整列するように位置付けられる。したがって、各ピペット 1 3 0 は、特定のウェル 3 8 と関連している。ピペットホルダー 1 2 2 は、各ピペットチップが関連ウェル 3 8 中の母液内に位置するようになるまで下降する。母液の一部は、ピペットチップに関連する各ウェル 3 8 から吸引される。アクチュエータはピペット 1 3 0 を持ち上げて、ピペットチップをウェル 3 8 から取り出す。吸引された母液の一部は、各ピペット 1 3 0 から排出される。排出された母液は、関連ウェル 3 8 へ戻される。

40

【 0 0 9 4 】

図 6 D は、カバースリップホルダー 1 2 4 上に移動し、各ピペットチップが異なるサポートカップ 1 3 8 に対して整列するように位置付けられたピペットホルダー 1 2 2 を示している。サポートカップ 1 3 8 はカバースリップ 1 4 4 を逆さまに保持し、アタッチメント機構 1 4 0 はカバースリップ 1 4 4 をサポートカップ 1 3 8 に対して固定することを保証する。母液の 1 以上のドロップが、各ピペット 1 3 0 から関連するカバースリップ 1 4 4 へ排出される。結果として、特定のウェル 3 8 に由来する 1 以上の母液ドロップが、特

50

定のカバーリップ 144 に送達される。

【0095】

母液のドロップは、母液の所望の容量が各カバーリップ 144 へ送達されるまでカバーリップ 144 へ排出される。カバーリップ 144 に送達されるドロップの総容量は、厳密に制御される。前述の通り、本発明の特徴は、小さいドロップ容量を使用することを可能にする正確な小容量を送達することができることにある。380 pL という少容量を送達することができる装置を用いて、容量をきわめて正確に送達することができる。送達される容量の精度は、好ましくは約 25 nL 未満、より好ましくは 20 nL 未満、更に好ましくは 15 nL 未満、特に好ましくは 10 nL 未満である。送達される容量の精度は、380 pL ~ 25 nL、好ましくは 380 pL ~ 20 nL、さらに好ましくは 380 pL ~ 15 nL、特に好ましくは 380 pL ~ 10 nL である。

【0096】

図 6 E は、図 6 A に示される静止ポジションに戻ったピペットホルダー 122 を示している。分子送達ピペット 126 は、カバーリップ 144 上の位置に移動する。カバーリップ 144 上の位置に移動する前に、分子送達ピペット 126 は特定の分子溶液ウェルへ下降し、分子溶液の容量を吸引する。分子送達ピペット 126 がカバーリップ 144 上の位置に存在すると、分子溶液のドロップは、既にカバーリップ 144 に送達された母液へと送達される。分子溶液のドロップは、所望の容量の分子溶液がカバーリップ 144 上に達成されるまで送達される。送達される容量の精度は、好ましくは約 25 nL 未満、より好ましくは 20 nL 未満、更に好ましくは 15 nL 未満、特に好ましくは 10 nL 未満である。送達される容量の精度は、2 ~ 25 nL、好ましくは 2 ~ 20 nL、さらに好ましくは 2 ~ 15 nL、特に好ましくは 2 ~ 10 nL である。

【0097】

母液ドロップ及びタンパク質ドロップは、いずれの順番で送達してもよい。両方のドロップを送達すると、ドロップは組合わさり、結晶形成について研究するハンギングドロップを形成する。

カバーリップ 144 上にハンギングドロップを形成した後、分子送達ピペット 126 は、ハンギングドロップが各カバーリップ 144 上に形成するまで、次のカバーリップ 144 へと進む。分子送達ピペット 126 は、ハンギングドロップを作成するために使用する分子溶液用のソースであった分子溶液ウェル上の位置に戻される。分子送達ピペット 126 中に残る分子溶液は、分子溶液ウェルへ排出される。

【0098】

図 6 F は、図 6 A に示される静止ポジションに戻った分子送達ピペット 126 を示している。更に図 6 F は、カバーリップホルダー 124 が反転し、マルチウェルプレート 34 のウェル 38 のカラム上に移動したことを示している。カバーリップホルダー 124 は、各カバーリップ 144 がカラム中の異なるウェル 38 に対して整列するように位置付けられる。詳細には、与えられたカバーリップ 144 は、当該与えられたウェル 38 上にハンギングドロップを形成するために使用する母液のソースであるウェル 38 に対して整列する。

【0099】

カバーリップホルダー 124 は、カバーリップ 144 が関連ウェル 38 の上端 40 と接触するまで下降する。ウェル 38 の上端 40 にあらかじめ適用したシーリング手段は、カバーリップ 144 と関連ウェル 38 の上端 40 との間にシールの形成を引き起こす。アタッチメント機構 140 は遊離し、カバーリップホルダー 124 は上昇して、各カバーリップ 144 を関連ウェル 38 上の適当な位置に残す。図 6 G に示されるように、ハンギングドロップは、カバーリップ 144 からウェル 38 へと垂れ下がる。

【0100】

図 6 H は、カバーリップホルダー 124 がカバーリップ格納コンポーネント 120 上の位置に移動したことを示している。カバーリップホルダー 124 は、各サポートカップ 138 がカバーリップ格納コンポーネント 120 中のマガジン 142 に対して整列

10

20

30

40

50

するように位置付けられる。したがって、各サポートカップ 138 は、各マガジン 142 中のカバースリップ 144 と関連づけられる。カバースリップホルダー 124 は、各サポートカップ 138 が関連づけられたマガジン 142 と接触するまで下降する。アタッチメント機構 140 は、接触したカバースリップ 144 が関連づけられたサポートカップ 138 に対して固定されることを保証する。

【0101】

図 6 I は、カバースリップホルダー 124 が静止ポジションに戻ったことを示している。図 6 G に関して検討した各マガジン 142 に由来する上部のカバースリップ 144 は、関連づけられたサポートカップ 138 に付着している。

【0102】

工程 6 A ~ 6 I に関して記載した工程は、ウェル 38 の単一のカラムの各ウェル 38 中に形成するハンギングドロップを生じさせる。これらの工程は、ハンギングドロップがマルチウェルプレート 34 の各カラムのウェル 38 中に形成されるまで繰り返される。ウェル 38 のそれぞれにハンギングドロップが形成すると、マルチウェルプレート 34 は次のステーションへ移動させることができる。

【0103】

前述の結晶化システム 10 は、シッティングドロップの形成にて適合させることができる。この適用は、母液送達ステーション 26 及びドロップ形成ステーション 28 に対する変化を用いて行うことができる。例えば、母液送達ステーション 26 は、例えば図 3 C に示されるマルチウェルプレート 34 などのシッティングドロップアレイ微結晶化を行うために適合したマルチウェルプレート 34 のウェル領域 41 へ母液を送達するように適合させる。詳細には、母液送達ステーション 26 の液体インジェクター 88 は、母液がマルチウェルプレート 34 のウェル 38 へ送達される前に、ウェル領域 41 に対して整列しなければならない。この整列化は、母液を各ウェル 38 のシッティングドロップ領域 42 へ送達することなしに、母液を各ウェル 38 のウェル領域 41 へ送達することを許容する。

【0104】

結晶化システム 10 をシッティングドロップ形成に適合させることは、ドロップ形成ステーション 28 をシッティングドロップ形成に適合させることを含んでいる。ドロップ形成ステーション 28 は、図 5 A ~ 5 E に示される同一の空間的關係で配置された図 5 A ~ 5 E に示される各コンポーネントを含むことができる。しかしながら、これらのコンポーネントの操作法は、図 6 A ~ 6 I に説明される方法とは異なっている。図 7 A ~ 7 G は、シッティングドロップアレイ微結晶化を行うために適合したマルチウェルプレート 34 のウェル 38 のそれぞれにおいて、シッティングドロップを形成するためにドロップ形成ステーション 28 を操作する方法を示している。

【0105】

図面は、タンパク質の結晶化に関して記載されている。しかしながら、同様の方法を他の分子の結晶化のために使用することができる。図 7 A は、図 6 A に示されるのと同様の静止ポジションにあるドロップ形成ステーション 28 を示している。図 7 B は、シッティングドロップアレイ微結晶化を行うために適合したマルチウェルプレート 34 が、ドロップ形成のための位置へ移動したことを示している。したがって、マルチウェルプレート 34 のウェル 38 のそれぞれは、シッティングドロップ領域 42 に隣接するウェル領域 41 を含んでいる。更に図 7 B は、ピペットホルダー 122 が、ピペットをプライムするための洗浄ベース 112 上の位置へ移動したことを示している。ピペットは図 6 B で説明したようにプライムされる。

【0106】

図 7 C は、ピペットホルダー 122 が、マルチウェルプレート 34 のウェル 38 のカラム上に位置に移動したことを示している。ピペットホルダー 122 は、図 7 D に示されるように各ピペットチップがカラム中の異なるウェル 38 中のウェル領域 41 に対して整列するように位置付けられる。したがって、各ピペットは特定のウェル 38 に関連づけられる。ピペットホルダー 122 は、各ピペットのチップが、関連づけられたウェル 38 のウ

10

20

30

40

50

エル領域 4 1 へ既に送達されている母液中に位置するまで下降する。母液の一部は、ピペットチップに関連づけられた各ウェル領域 4 1 から吸引される。アクチュエータは、ピペットを上方向に上昇させ、ピペットをウェル 3 8 から取り出す。吸引された母液の一部は、各ピペットから排出される。排出された母液は関連づけられたウェル領域 4 1 へ戻される。

【 0 1 0 7 】

ピペットホルダー 1 2 2 は、図 7 E に示される各ピペットチップがカラム中の異なるウェル 3 8 中のシッティングドロップ領域 4 2 に対して整列するように位置付けられる。母液の 1 以上のドロップは、各ピペットから、シッティングドロップ領域 4 2 へと排出される。結果として、特定のウェル領域 4 1 に由来する母液の 1 以上のドロップは、同一のウェル 3 8 のシッティングドロップ領域 4 2 へ送達される。母液のドロップは、所望の容量の母液が各シッティングドロップ領域 4 2 へ送達されるまでシッティングドロップ領域 4 2 へ排出される。カバースリップ 1 4 4 へ送達されるドロップの総量は厳密に制限される。前記で検討したように、本発明の特徴は、小さいドロップ容量を使用することを可能にする正確な小容量を送達することができることにある。380 pL という少容量を送達することができる装置を用いて、容量をきわめて正確に送達することができる。送達される容量の精度は、好ましくは約 25 nL 未満、より好ましくは 20 nL 未満、更に好ましくは 15 nL 未満、特に好ましくは 10 nL 未満である。送達される容量の精度は、380 pL ~ 25 nL、好ましくは 380 pL ~ 20 nL、さらに好ましくは 380 pL ~ 15 nL、特に好ましくは 380 pL ~ 10 nL である。

10

20

【 0 1 0 8 】

図 7 F は、図 7 A に示される静止ポジションに戻ったピペットホルダー 1 2 2 を示している。分子送達ピペット 1 2 6 は、カラムのウェル 3 8 中のシッティングドロップ領域 4 2 上の位置に移動する。ウェル 3 8 上の位置へ移動する前に、分子送達ピペット 1 2 6 は、特定の分子溶液ウェルへ下降し、ある容量の分子溶液を吸引する。分子送達ピペット 1 2 6 がシッティングドロップ領域 4 2 上に存在すると、分子溶液のドロップは、既にカバースリップ 1 4 4 へ送達された母液へと送達される。分子溶液のドロップは、所望の容量の分子溶液がシッティングドロップ領域 4 2 上に達成されるまで送達される。送達される容量の精度は、好ましくは約 25 nL 未満、より好ましくは 20 nL 未満、更に好ましくは 15 nL 未満、特に好ましくは 10 nL 未満である。送達される容量の精度は、380 pL ~ 25 nL、好ましくは 380 pL ~ 20 nL、さらに好ましくは 380 pL ~ 15 nL、特に好ましくは 380 pL ~ 10 nL である。

30

【 0 1 0 9 】

母液ドロップ及びタンパク質ドロップは、いずれの順番で送達してもよい。両方のドロップを送達すると、ドロップは組合わさり、結晶形成について研究するシッティングドロップを形成する。図 7 G は、ウェル 3 8 のシッティングドロップ領域 4 2 上に形成したシッティングドロップを示す。ウェル 3 8 のシッティングドロップ領域 4 2 上にシッティングドロップを形成した後、分子送達ピペット 1 2 6 は、シッティングドロップが各カラムの各ウェル中に形成するまで、次のウェル 3 8 のシッティングドロップ領域 4 2 へと進む。分子送達ピペット 1 2 6 は、シッティングドロップを作成するために使用する分子溶液用のソースであった分子溶液ウェル上の位置に戻される。分子送達ピペット 1 2 6 中に残る分子溶液は、分子溶液ウェルへ排出される。

40

【 0 1 1 0 】

シッティングドロップを形成した後、カバースリップ 1 4 4 は、シッティングドロップを有するウェル 3 8 上に位置付けられ、新しいカバースリップがカバースリップホルダー 1 2 4 へロードされ、ドロップ形成ステーション 2 8 は、図 6 に関して前記で説明した静止ポジションに戻される。

【 0 1 1 1 】

図 7 A ~ 7 G に関して記載した工程は、ウェル 3 8 の単一カラムの各ウェル 3 8 中にシッティングドロップの形成を引き起こす。これらの工程は、ハンギングドロップがマルチ

50

ウェルプレート 34 の各カラムのウェル 38 に形成されるまで繰り返される。ハンギングドロップが各ウェル 38 に形成すると、マルチウェルプレート 34 を次のステーションへ移動させることができる。

【0112】

図 6A ~ 7G は、シッティングドロップ及びハンギングドロップを形成するためのドロップ形成ステーションの操作方を説明しているけれども、ハンギングドロップステーションは、その他の結晶化技術、その他のウェルジオメトリー及び/又はその他のマルチウェルプレートジオメトリーに容易に適合させることができる。

【0113】

図 6A ~ 7G に関して記載される装置は、母液ドロップ及び/又は分子ドロップが形成しているか否かを検出することができる 1 つ以上のセンサーを適宜含んでいてもよい。適切なセンサーの例は LED センサーである。

【0114】

多数のプレートトラック 14 及び運搬アセンブリを前記のステーション 12 とともに使用することができるが、図 8A ~ 8C は、マルチウェルプレート 34 を前記ステーション間について運搬するためのプレートトラック 14 の好ましい態様を示している。図 8A 及び 8B は、プレートトラック 14 の長軸を見下ろしたプレートトラック 14 の側面図である。プレートトラック 14 は 2 つの間隔を置いて離れたプレート支持体 158 を含んでいる。ピン 160 は、プレートトラック 14 の下に位置するピンキャリッジ 162 から上方に伸張している。キャリッジは、図 8A に示されるようにピン 160 がプレートトラック 14 の上に伸張する、又は、図 8B に示されるようにピン 160 をプレートトラック 14 の下に引き出すように作動させることができる機構を含んでいる。

【0115】

図 8C は、プレートトラック 14 並びに当該プレートトラック 14 上に存在する複数のマルチウェルプレート 34 を有する運搬アセンブリの側面図である。運搬アセンブリは、第一のピンキャリッジ 162A、第二のピンキャリッジ 162B 及び第三のピンキャリッジ 162C を含んでいる。ピンキャリッジ 162A、162B、163C のそれぞれは、矢印 A、B 及び C で示されるように、プレートトラック 14 の長軸に沿って移動するように構成されている。矢印の端におけるブラケットは、各ピンキャリッジ 162A、162B、163B の動作範囲を示している。

【0116】

第一のピンキャリッジ 162A 及び第三のピンキャリッジ 162C は、複数のピン 160 を含んでいる。ピンは、ピンキャリッジ 162A、162C に沿って、隣接するピン 162 の間がほぼ一定の変位 (displacement) で位置している。ピンキャリッジ 162A、162C は、ピンキャリッジ 162A、162C の動作の間、ピン 160 間の転置を維持するのに役立つ。

【0117】

各ピン 160 は伸張した位置にて説明されるが、1 つのピンキャリッジ 162 におけるピンが引き下がる間、他のピンキャリッジ 162 におけるピン 160 は伸張することができる。別の態様においては、単一のピンキャリッジ 162 内のピンの別の部分が引き下がる間、同一のピンキャリッジ 162 内のピンの一部が伸張することができる。

【0118】

空隙 166 がピンキャリッジ 162A、162B、162C とプレートトラック 14 上に位置づけられた各マルチウェルプレート 34 との間に形成されて、ピンキャリッジ 162A、162B、162C がマルチウェルプレート 34 の底面に接触しないようにする。結果として、ピン 160 が引き抜かれるとき、ピンキャリッジ 162A、162B、162C は、プレートトラック 14 上のマルチウェルプレート 34 を移動させることなしに、プレートトラック 14 の長軸に沿って移動することができる。ピン 160 が伸張し、ピンキャリッジ 162 がプレートトラック 14 の長軸に沿って移動するとき、ピン 160 は、プレートトラック 14 の長軸に沿ったピンの移動を妨げるすべてのマルチウェルプレート

10

20

30

40

50

34を押す。

【0119】

前述の通り、プレート運搬アセンブリを使用して、マルチウェルプレート34をステーションからステーションへプレートトラック14に沿って運搬する。プレートトラック14に沿った種々の位置を、結晶化システム10の特定のステーションと関連づけることができる。例えば、マルチウェルプレート34が位置 P_1 に位置するとき、マルチウェルプレート34上のバーコードをバーコードステーションにより読み取ることができ、マルチウェルプレート34が位置 P_2 に位置するとき、シーリング手段ステーション22を使用してシーリング手段をまるちのウェル38の上端40に適用することができる。更に、マルチウェルプレート34が P_3 に位置するとき、マルチウェルプレート34は、母液送達ステーション26の送達シャトル74の1つの真下に位置づけることができる。

10

【0120】

以下の説明は、 T_1 で示されるマルチウェルプレート34を、 P_1 で示される位置から P_2 で示される位置、更に P_3 で示される位置に進行させる、前記運搬アセンブリの使用方を記載している。マルチウェルプレート T_1 が位置 P_1 に位置すると、第一のピンキャリッジ162A中のピン160はプレートトラック14の下へ引き出される。図8Cに示されるように、第一のピンキャリッジ162Aは左に移動して、ピン160はプレートトラック14の上に伸張する。次いでマルチウェルプレート T_1 は、マルチウェルプレート T_1 が位置 P_2 に位置するまで第一のピンキャリッジ162Aを右に移動させることにより、位置 P_1 から位置 P_2 へ移動することができる。ピン160はプレートトラック14の下に引き出され第一のピンキャリッジ162Aは元の位置に戻り、ピン160は再びプレートトラック14の上に伸張する。第2のピンキャリッジ162B中のピン160はプレートトラック14の下に引き出され、第2のピンキャリッジ162Bはマルチウェルプレート T_1 の左に移動する。第2のピンキャリッジ162B中のピン160はプレートトラック14の上に伸張し、第2のピンキャリッジ162Bは、マルチウェルプレート T_1 が位置 P_3 に位置するまで右に移動する。

20

【0121】

図8Cに示される複数のピンキャリッジ162は、ステーション上のマルチウェルプレート34が、結晶化システム10により処理される別のマルチウェルプレート34とは独立して、結晶化システム10により処理されることを許容する。例えば、第一のマルチウェルプレート34が P_1 から P_2 へ進行し、一方、第2のマルチウェルプレート34は P_3 に残ることができる。結果として、 P_1 、 P_2 及び P_3 が異なるステーション12と関連づけられるとき、マルチウェルプレート34を異なるステーション12により異なる速度で処理することができる。更に、運搬アセンブリを構成する異なるピンキャリッジ162を、一緒になってシステムを形成するためにアセンブルされる独立システム内に含めることができる。例えば、第一のピンキャリッジ162A及び第2のピンキャリッジ162Bを母液送達システム内に含め、第三のピンキャリッジ162Cをドロップ形成システム32内に含めることができる。

30

【0122】

結晶形成は、各ドロップを結晶形成について試験することにより検出することができる。好ましい態様において、結晶を検出し、結晶品質について種々のウェルに類別する。これは、手動又は自動化装置により行われるだろう。アラバマ、バーミングハムのDiversified Scientific, Inc.は、結晶形成のスコアリングを自動化するために使用するCRYSTALS CORE(登録商標)を製造している。

40

【0123】

前述の通り、システムを使用して、種々の母液について興味の対象となるタンパク質を結晶化する能力をスクリーニングする結晶化試験を行うことができる。結晶化試験は、1以上の緻密スクリーニングへと続く粗スクリーニングをしばしば含んでいる。緻密スクリーニングに使用する母液は、粗スクリーニングの結果にしばしば依存するが、粗スクリーニングに使用する母液は各結晶化試験に対する標準であることができる。

50

【 0 1 2 4 】

母液をタンパク質の結晶化に使用するとき、好ましい粗スクリーニングは、表 1 に示す 15 のサブスクリーニングから構成される。各サブスクリーニングに含まれる母液の数も表 1 に示される。各サブスクリーニングに含まれる母液の組成は図 9 に示される。示される組成を有する母液は、カリフォルニア、ラグーナナイゲル (Laguna Niguel) の Hampton Research から入手することができる。

【 0 1 2 5 】

表 1 に示すように、総数 480 の母液が、好ましい粗スクリーニングのサブスクリーニングに関連づけられる。480 の母液が粗スクリーニングに含まれ、各プレートは、好ましくは 48 のウェルを含んでいるので、粗スクリーニングはわずか 10 のプレートをシステムで処理することにより行うことができる。

したがって、各プレートは 1 ~ 2 のサブスクリーニングを含むことができる。

10

20

【 0 1 2 6 】

表 1

スクリーニング	母液の数
結晶スクリーニング I	48
結晶スクリーニング I I	48
Grid 硫酸アンモニウム	24
Grid MPD	24
Grid 塩化ナトリウム	24
Grid PEG6000	24
Grid PEG/塩化リチウム	24
ナトリウム/カリウム ホスフェート	24
PEG/イオンスクリーニング	48
膜タンパク質スクリーニング	48
界面活性剤スクリーニング I	24
界面活性剤スクリーニング I I	24
界面活性剤スクリーニング I I I	24
クライオスクリーニング	48
低イオン強度スクリーニング	24

30

40

【 0 1 2 7 】

粗スクリーニングに使用した各母液は、1 以上の母液格納バンク中で格納することがで

50

きる。しかしながら、異なる緻密スクリーニングに必要な母液の数は、これらの母液の格納が実行できないほど多い。したがって、システムは、ストック溶液から緻密スクリーニング母液を形成し、プレートのウェルへ送達するステーションを含むことができる。代替として、1以上の外部システムを使用して、ストック溶液から緻密スクリーニング母液を形成し、1以上のプレートのウェルへ送達することができる。これらのプレートは次いでシステムで処理することができる。

【0128】

外部システムを使用して、母液を形成しかつ送達するとき、システム管理ロジックは、母液送達ステーションに優先して、プレートのウェルへの母液の同時送達を回避する必要がある。結果として、システム管理ロジックは、既に母液を有しているプレートがシステム内にいつ存在するのかわ知らされている必要がある。オペレーターは、ユーザーインターフェースを使用して、どのプレートがウェルに送達された母液を既に有しているのかをシステム管理ロジックに知らせることができる。代替として、オペレーターは、母液がプレートのウェルに既に存在することを示すバーコードを有するプレートを使用することができる。

10

【0129】

実施例1

前記のシステムを、複数のリゾチーム結晶化実験に使用した。ここで、リゾチームは、100 mM 酢酸ナトリウム及び10%塩化ナトリウムをpH 4.6下に含む母液組成物において結晶化した。ドロップ形成ステーションにより形成したハンギングドロップの容量は、各実験で異なっていた。図10A~10Dはそれぞれ、40 nL、100 nL、200 nL及び1000 nLのハンギングドロップ中で形成した結晶を示している。ドロップの大きさを小さくしたにもかかわらず、結晶が形成した。結果として、システムは、 μ L以下のハンギングドロップ容量を用いて使用することができる。

20

【0130】

実施例2

前記のシステムを結晶化試験に使用した。ここで、リゾチームを結晶化するための母液を最適化した。粗スクリーニング実験の間、480の結晶化実験を、図9に示される480の母液のそれぞれを使用して行った。480の各実験の結果を互いに比較して、最も望ましい特性を有する結晶を提供する1以上の実験を同定した。同定された粗スクリーニング実験の1つは、30%MPD(+/-2-メチル-2,4-ペンタンジオール)、100 mM 酢酸ナトリウム、20 mM 塩化カルシウムから構成される母液(pH 4.6)と関連づけられた。

30

【0131】

次いで、24の結晶化実験から構成される緻密スクリーニングを行った。24の結晶化実験のそれぞれと関連づけられた母液組成物を、同定された粗スクリーニング実験に関連づけられた母液組成物に対して選択した。緻密スクリーニングの結晶化実験について選択された24の母液組成物を図11に示す。24の母液のそれぞれにおける特定成分の濃度は、同定された粗スクリーニング実験における当該成分の濃度と一致させた。例えば、同定された粗スクリーニング実験と関連づけられた母液及び緻密スクリーニングのそれぞれについての母液は、すべて約30%のMPD及び100 mM 酢酸ナトリウムであった。24の母液における他の成分の濃度は、同定された粗スクリーニング実験における同一成分についての濃度を含む範囲で変化した。例えば、同定された粗スクリーニング実験において塩化カルシウム濃度は20 mMであったが、24の母液においては12.5~27.5 mMの間で変化した。同様に、同定された粗スクリーニング実験においてpHは4.6であったが、24の母液においては4.1~5.1の間で変化した。

40

【0132】

24の緻密スクリーニング実験のそれぞれを互いに比較して、最も望ましい特性を与える1以上の結晶化実験を同定した。

本発明についての前記の実施例及び好ましい態様の説明は、説明目的で提供されるもの

50

である。しかしながら、実施例及び好ましい態様は、本発明が網羅的(exhaustive)であるか又は開示された詳細な形態に限定されることを意図するものではない。明らかなことに、多数の修正及び変形が当業者にとって明らかであろう。本発明の原理及び実地的な適用を最良に説明するために、態様が選択されかつ説明された。これにより他の当業者は、企図される特定の用途に適するような種々の修正を用いた本発明の種々の態様を理解するだろう。本発明の範囲は、請求の範囲及びこれと均等なものにより定義されることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0133】

【図1】図1は、本発明の結晶化システムのブロックダイアグラムである。

10

【図2】図2は、タンパク質結晶化試験を行うための、図1の結晶化システムの使用方法を示している。

【図3A】図3Aは、ハンギングドロップアレイ微結晶化を行うために使用するマルチウェルプレートの平面図を示している。

【図3B】図3Bは、図3Aで示されるマルチウェルプレートの側面図である。

【図3C】図3Cは、シッティングドロップアレイ微結晶化を行うために使用するマルチウェルプレートの平面図を示している。

【図3D】図3Dは、図3Cで示されるマルチウェルプレートの側面図である。

【図3E】図3Eは、プレートカバーを有するマルチウェルプレートの断面図である。

【図4A】図4A～4Jは、母液送達システムに含まれることができる種々のステーションを示している。図4Aは、プレートローディングステーションに隣接して位置するプレートトラックを横断的に見たプレートローディングステーションの側面図である。

20

【図4B】図4Bは、プレートトラックの縦軸を見下ろしたプレートローディングステーションの側面図である。

【図4C】図4Cは、マルチウェルプレートに含まれるバーコードを読み取るための、バーコード読み取りステーションの側面図である。

【図4D】図4Dは、シーリング手段をマルチウェルプレート中に定義されるウェルの上端に適用するための、シーリング手段ステーションの側面図である。

【図4E】図4Eは、プレートカバーをマルチウェルプレートから取り去るためのプレートカバー除去ステーションの側面図である。

30

【図4F】図4Fは、母液送達ステーションの平面図である。

【図4G】図4Gは、母液をマルチウェルプレートへ送達するための送達ブロックの平面図である。

【図4H】図4Hは、母液をマルチウェルプレートへ送達するための送達ブロックの断面図である。

【図4I】図4Iは、母液ソース格納バンクの側面図である。

【図4J】図4Jは、母液を母液ソースから液体インジェクターへ送達するためのシリンジポンプの側面図を示している。

【図5A】図5A～5Eは、ドロップ形成システム中に含まれることができる種々のステーションを示している。図5Aは、ドロップ形成ステーションの平面図である。

40

【図5B】図5Bは、ドロップ形成ステーションの側面図である。

【図5C】図5Cは、ピペットホルダーの側面図である。

【図5D】図5Dは、ウェルカバーホルダーの側面図である。

【図5E】図5Eは、マルチウェルプレート内のウェルの上に位置づけられるウェルカバーを格納するためのウェルカバーマガジンの側面図である。

【図6A】図6A～6Iは、ドロップ形成ステーションの動作を示している。図6Aは、静止ポジションにあるドロップ形成ステーションを示している。

【図6B】図6Bは、マルチウェルプレートに有するドロップ形成ステーションがドロップ形成ポジションに移動し、ピペットホルダーが洗浄ベースン上のポジションに移動することを示している。

50

【図 6 C】図 6 C は、ピペットホルダーが、マルチウェルプレート内のウェルのカラム上のポジションに移動したことを示している。

【図 6 D】図 6 D は、ピペットホルダーがウェルカバー上のポジションに移動したことを示している。

【図 6 E】図 6 D は、ピペットホルダーが静止ポジションに戻り、タンパク質送達ピペットがウェルカバー上のポジションに移動したことを示している。

【図 6 F】図 6 F は、タンパク質送達ピペットが静止ポジションに移動し、カバーホルダーが反転し、マルチウェルプレートのウェルのカラム上のポジションに移動したことを示している。

【図 6 G】図 6 G は、プレートのウェルを覆うウェルカバーから吊り下がったハンギングドロップを示している。 10

【図 6 H】図 6 H は、カバーホルダーが、ウェルカバー格納コンポーネント上のポジションに移動したことを示している。

【図 6 I】図 6 I は、カバーホルダーが静止ポジションに戻ったことを示している。

【図 7 A】図 7 A ~ 7 G は、シッティングドロップを形成するためのドロップ形成ステーションの動作を示している。図 7 A は、静止ポジションにあるドロップ形成ステーションを示している。

【図 7 B】図 7 B は、マルチウェルプレートを有するドロップ形成ステーションが、ドロップ形成のためのポジションでシッティングドロップアレイ微結晶化を行うために適合し、かつ、ピペットホルダーが洗浄ベースン上のポジションに移動したことを示している。 20

【図 7 C】図 7 C は、ピペットホルダーがマルチウェルプレート内のウェルのカラム上のポジションに移動したことを示している。

【図 7 D】図 7 D は、ピペットホルダー内のピペットが、プレートのカラム内のウェルのウェル領域に対して整列したことを示している。

【図 7 E】図 7 E は、ピペットホルダー内のピペットが、プレートのカラム内のウェルのシッティングドロップ領域に対して整列したことを示している。

【図 7 F】図 7 F は、タンパク質送達ピペットが、ウェルのカラム中のウェルのシッティングドロップ領域上のポジションへ移動したことを示している。

【図 7 G】図 7 G は、シッティングドロップが、ウェルのシッティングドロップ領域に形成したことを示している。 30

【図 8 A】図 8 A は、プレートトラックの下に位置するピンキャリッジからプレートトラックの上に伸張したピンを有するプレートトラックの側面図である。

【図 8 B】図 8 B は、プレートトラックの下に引き出された図 8 のピンを有するプレートトラックの側面図である。

【図 8 C】図 8 C は、複数のピンキャリッジを有する運搬アセンブリの側面図である。

【図 9】図 9 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 10 A】図 10 A は、40 nL ~ 1000 nL の大きさが異なるドロップ中での結晶形成を示している。

【図 10 B】図 10 B は、40 nL ~ 1000 nL の大きさが異なるドロップ中での結晶形成を示している。 40

【図 10 C】図 10 C は、40 nL ~ 1000 nL の大きさが異なるドロップ中での結晶形成を示している。

【図 10 D】図 10 D は、40 nL ~ 1000 nL の大きさが異なるドロップ中での結晶形成を示している。

【図 11】図 11 は、結晶化試験の緻密スクリーニング段階で使用した 24 の母液についての母液組成を示している。

【 図 1 】

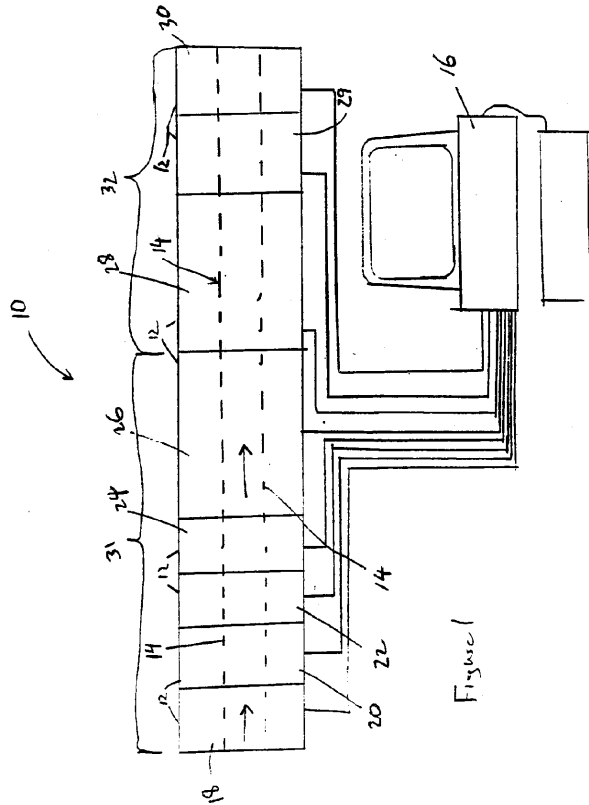


Figure 1

【 図 2 】

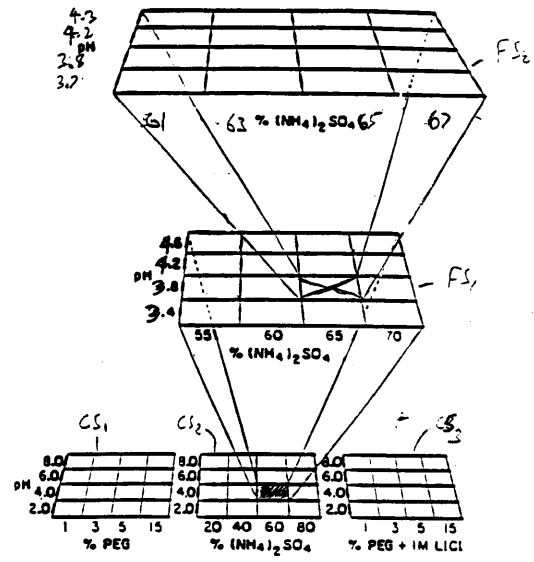


Figure 2

【 図 3 A 】

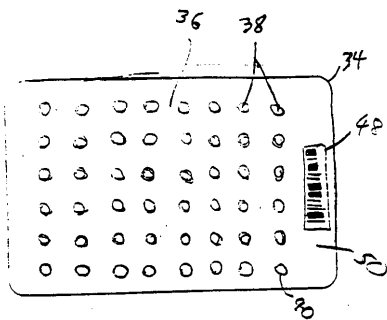


Figure 3A

【 図 3 C 】

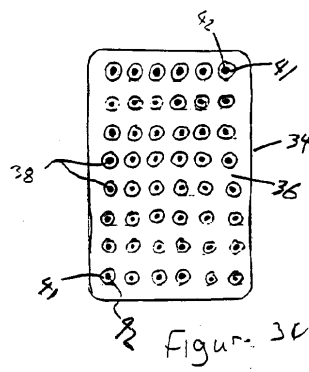


Figure 3C

【 図 3 B 】



Figure 3B

【 図 3 D 】

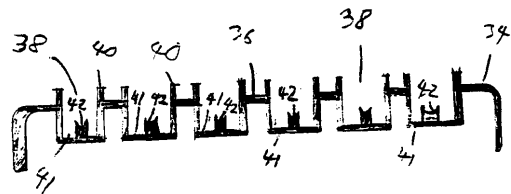
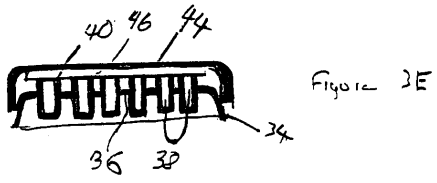
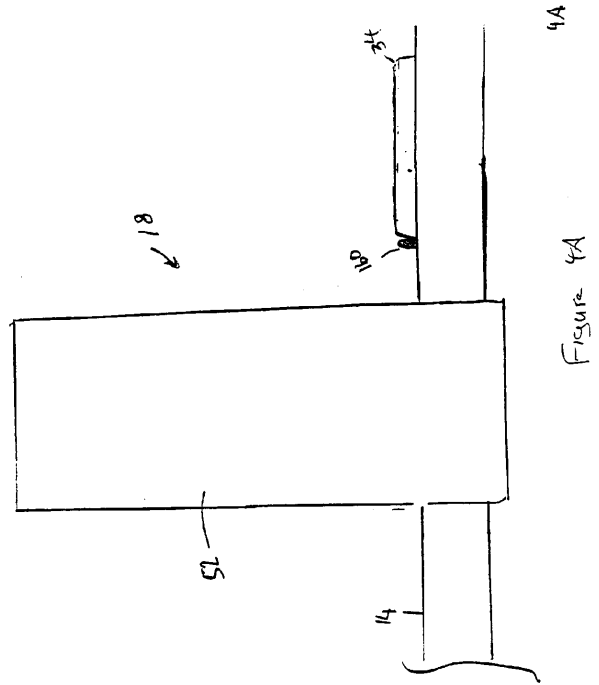


Figure 3D

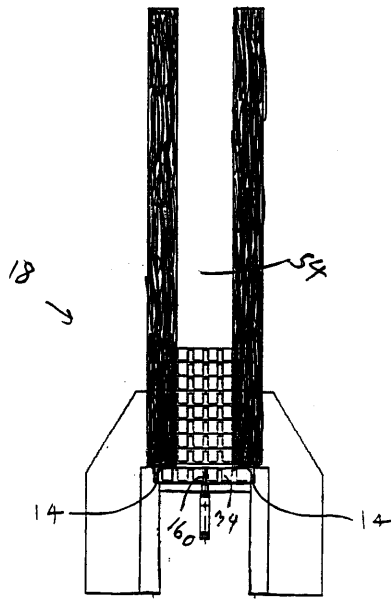
【 図 3 E 】



【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



【 図 4 C 】

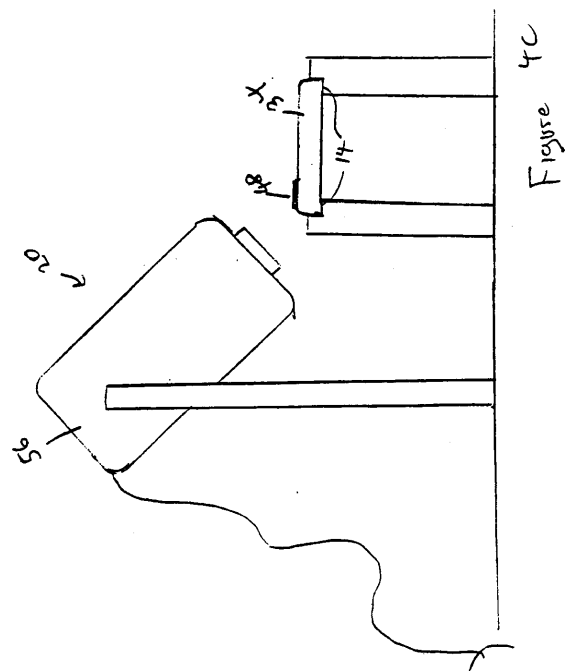


Figure 4B

【 図 4 D 】

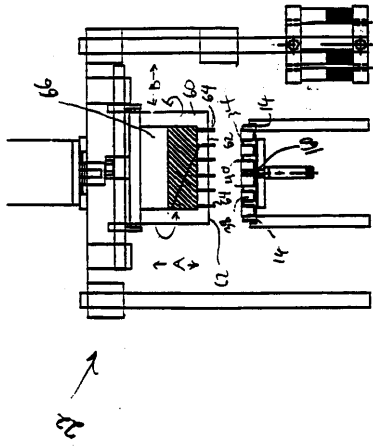


Figure 4D

【 図 4 E 】

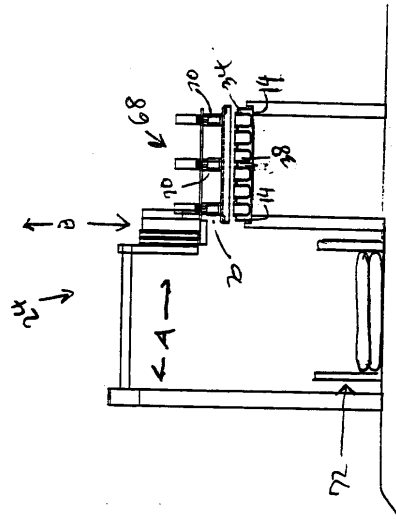


Figure 4E

【 図 4 F 】

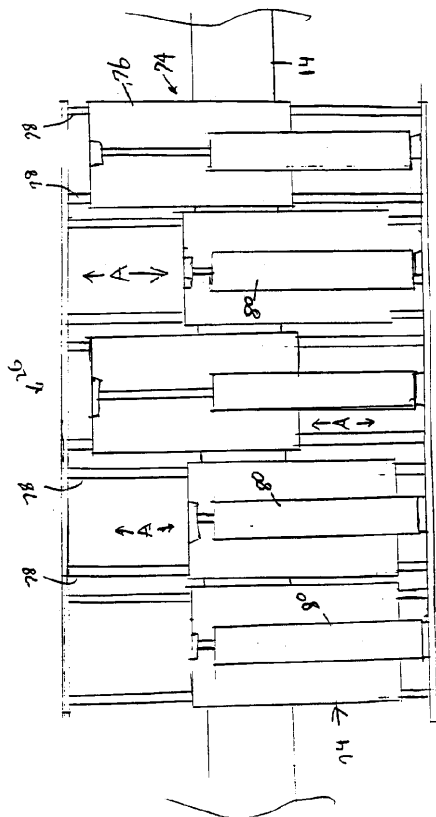


Figure 4F

【 図 4 G 】

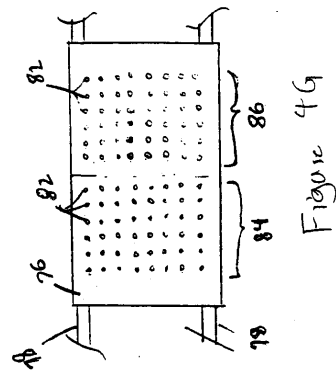


Figure 4G

【 図 4 H 】

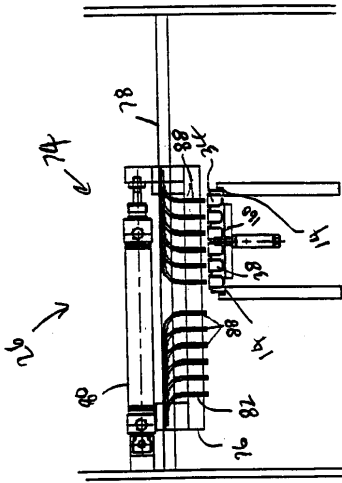


Figure 4H

【 図 4 I 】

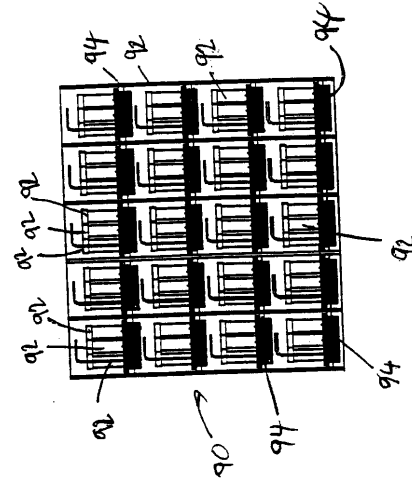


Figure 4I

【 図 4 J 】

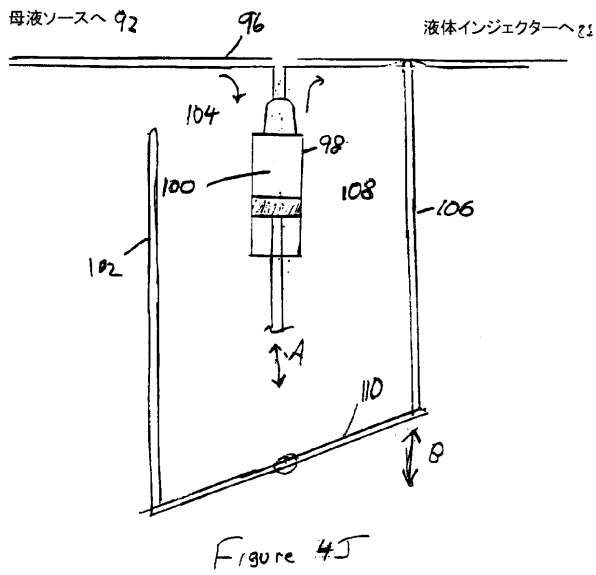


Figure 4J

【 図 5 A 】

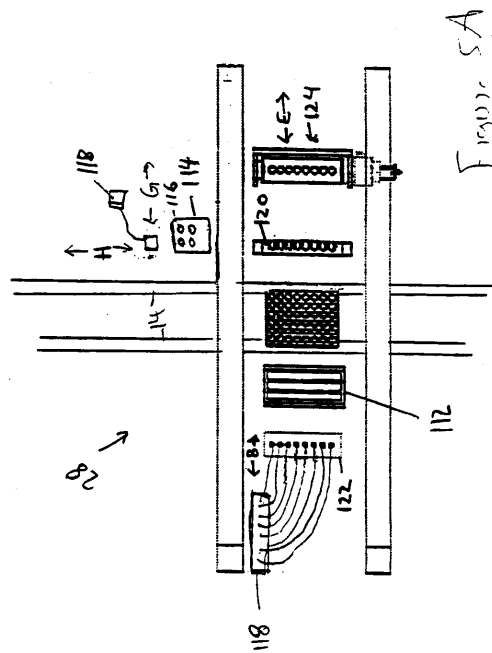


Figure 5A

【 5 B 】

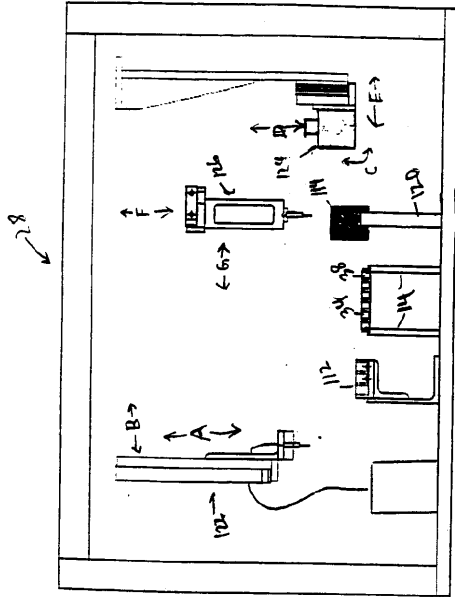


Figure 5B

【 5 C 】

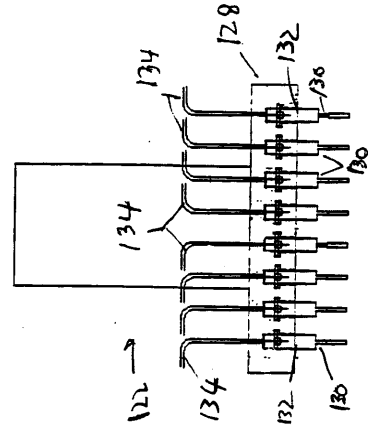


Figure 5C

【 5 D 】

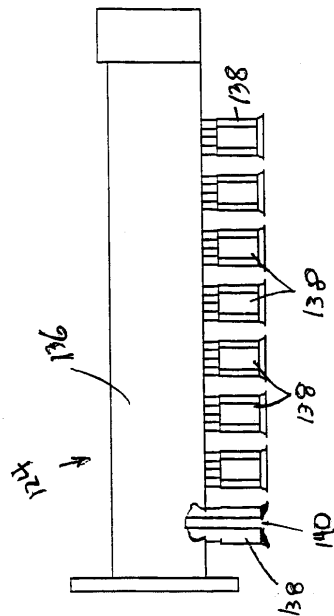


Figure 5D

【 5 E 】

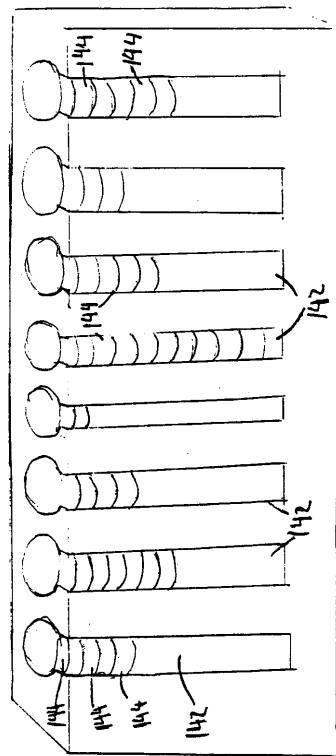


Figure 5E

【 図 6 A 】

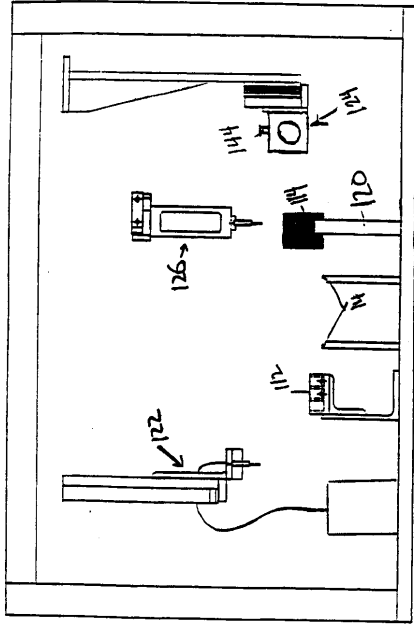


FIGURE 6A

【 図 6 B 】

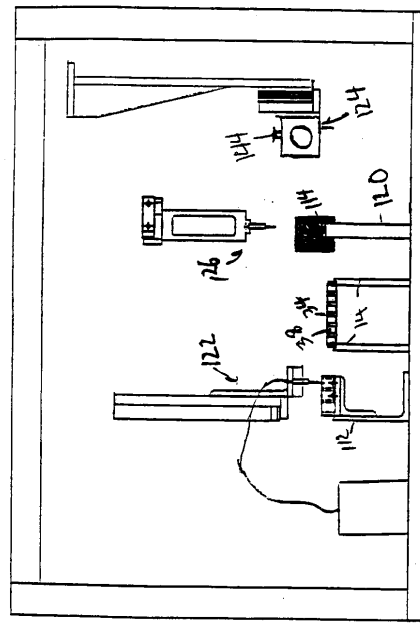


FIGURE 6B

【 図 6 C 】

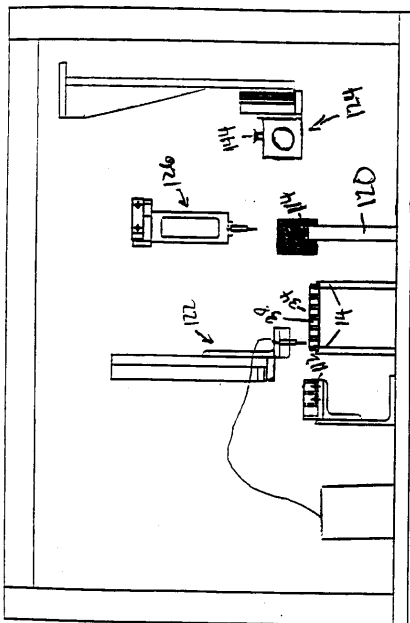


FIGURE 6C

【 図 6 D 】

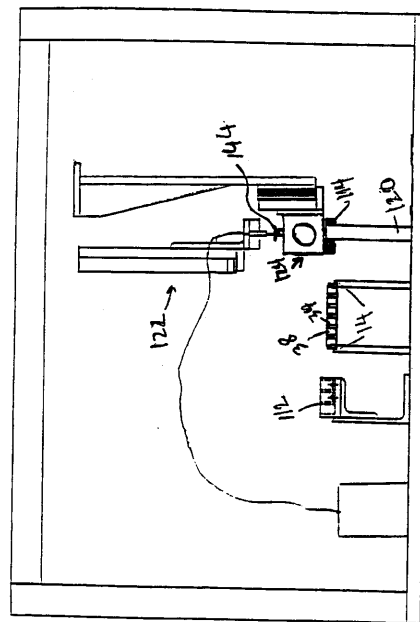


FIGURE 6D

【 図 6 E 】

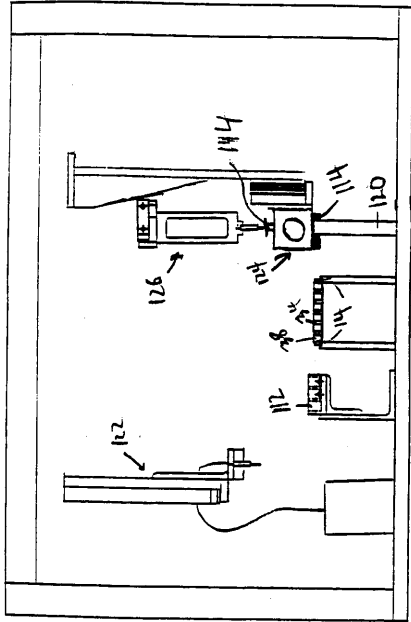


FIGURE 6E

【 図 6 F 】

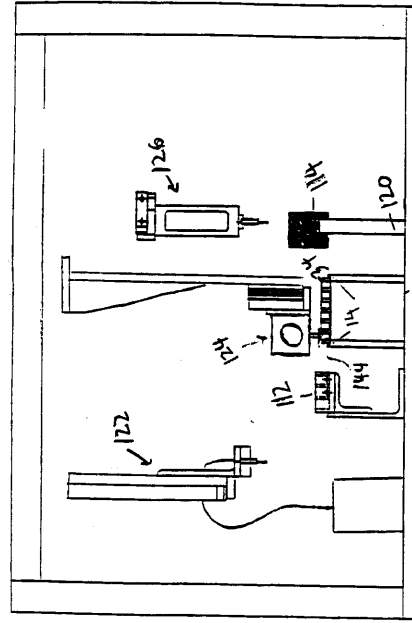


FIGURE 6F

【 図 6 G 】

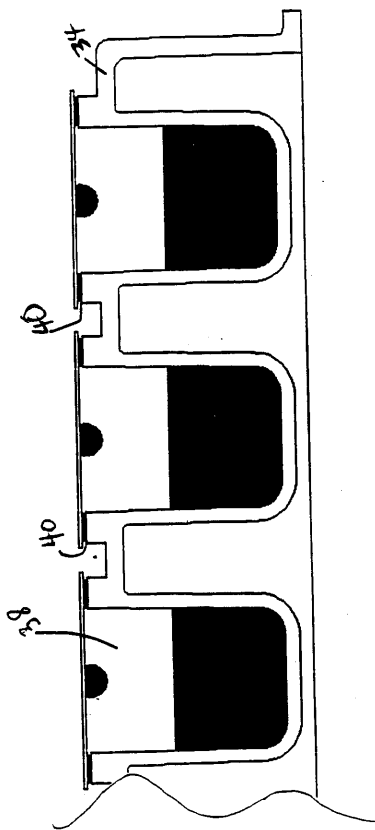


FIGURE 6G

【 図 6 H 】

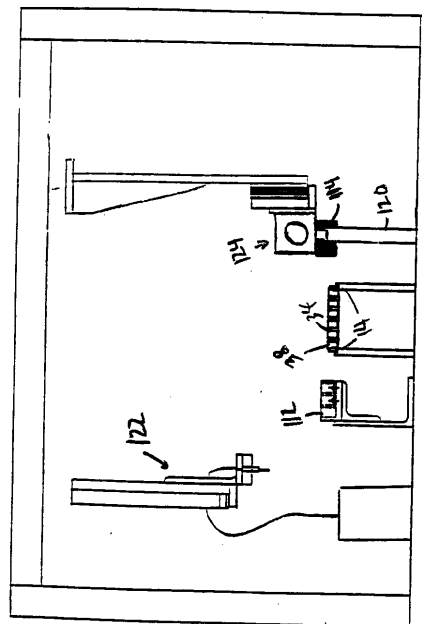


FIGURE 6H

【 図 6 I 】

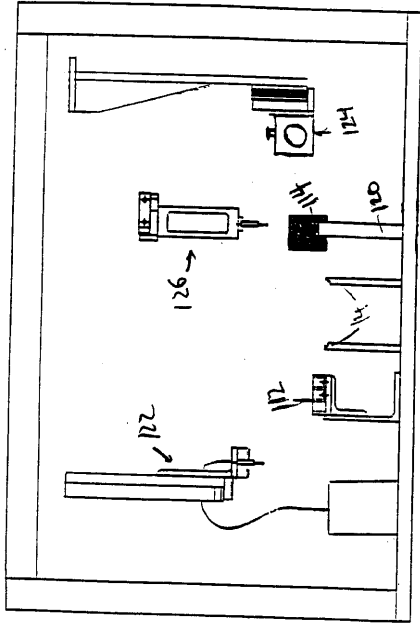


FIGURE 6I

【 図 7 A 】

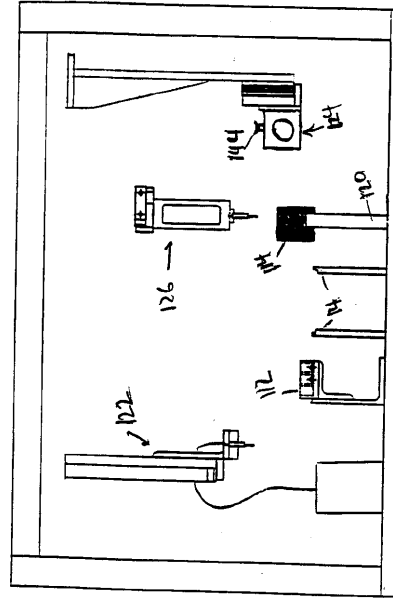


FIGURE 7A

【 図 7 B 】

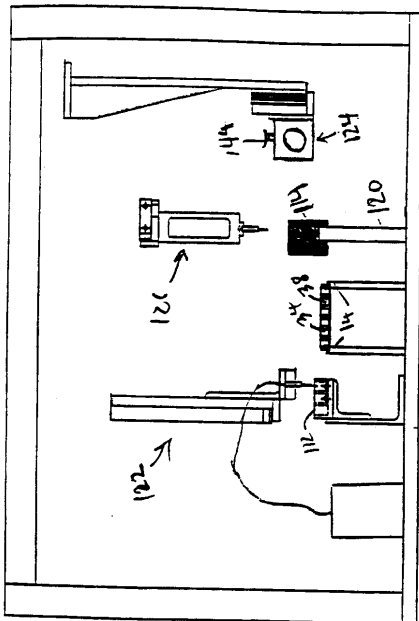


FIGURE 7B

【 図 7 C 】

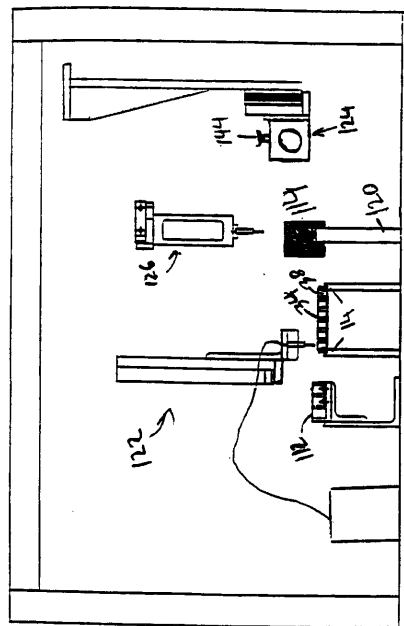


FIGURE 7C

【 図 7 D 】

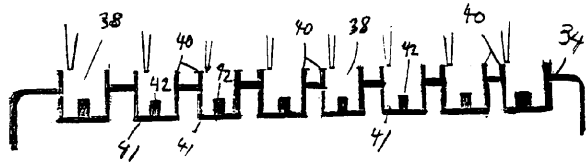


Figure 7D

【 図 7 E 】

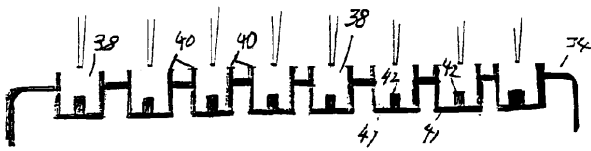


Figure 7E

【 図 7 F 】

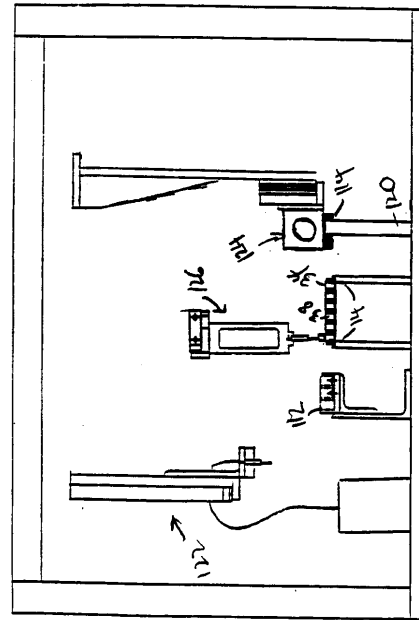


FIGURE 7F

【 図 7 G 】

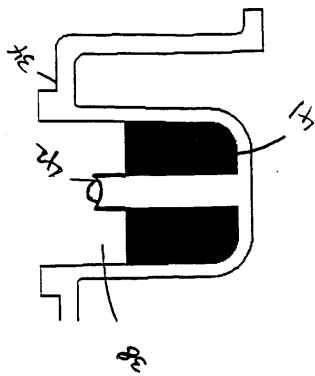


Figure 7G

【 図 8 B 】

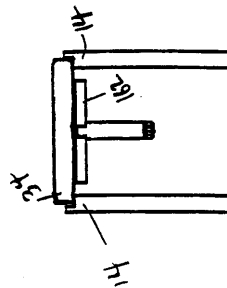


Figure 8B

【 図 8 A 】

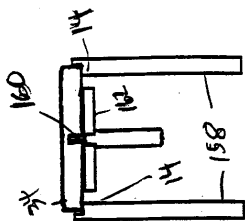


Figure 8A

【 図 8 C 】

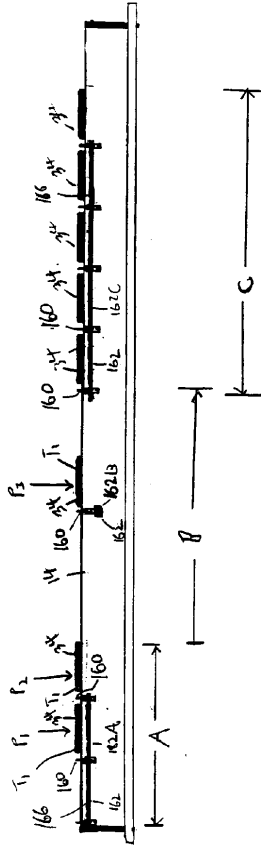


Figure 8C

【 図 9 】

Quikスクリーニング試薬製剤

- A1. 0.8M Na/K ホスフェート pH5.0
- B1. 1.0M Na/K ホスフェート pH5.0
- C1. 1.4M Na/K ホスフェート pH5.0
- D1. 1.8M Na/K ホスフェート pH5.0
- A2. 0.8M Na/K ホスフェート pH5.6
- B2. 1.0M Na/K ホスフェート pH5.6
- C2. 1.4M Na/K ホスフェート pH5.6
- D2. 1.8M Na/K ホスフェート pH5.6
- A3. 0.8M Na/K ホスフェート pH6.3
- B3. 1.0M Na/K ホスフェート pH6.3
- C3. 1.4M Na/K ホスフェート pH6.3
- D3. 1.8M Na/K ホスフェート pH6.3
- A4. 0.8M Na/K ホスフェート pH6.9
- B4. 1.0M Na/K ホスフェート pH6.9
- C4. 1.4M Na/K ホスフェート pH6.9
- D4. 1.8M Na/K ホスフェート pH6.9
- A5. 0.8M Na/K ホスフェート pH7.5
- B5. 1.0M Na/K ホスフェート pH7.5
- C5. 1.4M Na/K ホスフェート pH7.5
- D5. 1.8M Na/K ホスフェート pH7.5
- A6. 0.8M Na/K ホスフェート pH8.2
- B6. 1.0M Na/K ホスフェート pH8.2
- C6. 1.4M Na/K ホスフェート pH8.2
- D6. 1.8M Na/K ホスフェート pH8.2

Figure 9

【 図 9 - 1 】

界面活性剤2試薬製剤

- 1. 10% v/v Pluronic F-68
- 2. 10% v/v Anapoe 35
- 3. 10% v/v Anapoe 56
- 4. 10% v/v Anapoe 58
- 5. 10% v/v Anapoe X-114
- 6. 10% v/v Anapoe X-305
- 7. 10% v/v Anapoe X-405
- 8. 10% v/v Anapoe 20
- 9. 10% v/v Anapoe 80
- 10. 10% v/v Anapoe C₁₀E₈
- 11. 10% v/v Anapoe C₁₀E₉
- 12. 10% v/v Anapoe C₁₀E₁₀
- 13. 10% v/v Anapoe C₁₀E₈
- 14. 10% w/v IPTG
- 15. 1.5mM n-ドデシル-N,N-ジメチルグリシン
- 16. 7.0mM HEGA-10
- 17. 7.1mM C₈E₈
- 18. 8.0mM CHAPS
- 19. 8.0mM CHAPSO
- 20. 11.5mM C-HEGA 11
- 21. 39mM HEGA-9
- 22. 108mM C-HEGA 9
- 23. 109mM HEGA-8
- 24. 277mM C-HEGA-8

注: [mM]は、界面活性剤のCMCの[mM]である。

Fig 9-1

【 図 9 - 2 】

界面活性剤3試薬製剤

- 1. 10% w/v BAM
 - 2. 0.006mM n-ヘキサデシル-b-D-マルトシド
 - 3. 0.1mM n-テトラデシル-b-D-マルトシド
 - 4. 0.33mM n-トリデシル-b-D-マルトシド
 - 5. 0.9mM Thesit
 - 6. 4.0mM Zwittergent 3-14
 - 7. 5.9mM n-ウンデシル-b-D-マルトシド
 - 8. 9.0mM n-デシル-b-D-チオマルトシド
 - 9. 15.0mM FOS-コリン-12
 - 10. 25mM n-デカノイルスクロース
 - 11. 29.0mM 1-S-ノニル-b-D-チオグルコシド
 - 12. 32.0mM n-ノニル-b-D-チオマルトシド
 - 13. 43.0mM DDMAb
 - 14. 60.0mM n-ノニル-b-D-マルトシド
 - 15. 76.0mM Cymal-4
 - 16. ◇
-
- 17. 130mM FOS-コリン-10
 - 18. 190mM FOS-コリン-9
 - 19. 250mM MEGA-9
 - 20. 290mM 1-S-ヘプチル-b-D-チオグルコシド
 - 21. 1.02M FOS-コリン-8
 - 22. 1.20M Cymal-2
 - 23. 3.30M Zwittergent 3-08
 - 24. 3.40M Cymal-1

注: [mM]は、界面活性剤のCMCの[mM]である。

Fig 9-2

【 図 9 - 3 】

Fig 9-3

結晶スクリーニング試薬製剤

1. 30% MPD, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.02M 塩化カルシウム
2. 0.4M K₂Naタートレート
3. 0.4M リン酸アンモニウム
4. 2.0M 硫酸アンモニウム, 0.1M Tris HCl pH8.5
5. 30% MPD, 0.1M Na HEPES pH7.5, 0.2M クエン酸ナトリウム
6. 30% PEG4000, 0.1M Tris HCl pH8.5, 0.2M Mgクロライド
7. 1.4M 酢酸ナトリウム, 0.1M カコジル酸ナトリウム pH6.5
8. 30% 2-プロパノール, 0.1M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.2M クエン酸ナトリウム
9. 30% PEG4000, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.2M 酢酸アンモニウム
10. 30% PEG4000, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.2M 酢酸アンモニウム
11. 1.0M リン酸アンモニウム, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6
12. 30% 2-プロパノール, 0.1M Na HEPES pH7.5, 0.2M Mgクロライド
13. 30% PEG4000, 0.1M Tris HCl pH8.5, 0.2M クエン酸ナトリウム
14. 28% PEG4000, 0.1M Na HEPES pH7.5, 0.2M Caクロライド
15. 30% PEG8000, 0.1M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.2M 硫酸アンモニウム
16. 1.5M Liサルフェート, 0.1M Na HEPES pH7.5
17. 30% PEG4000, 0.1M Tris HCl pH8.5, 0.2M Liサルフェート
18. 30% PEG8000, 0.1M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.2M Mgアセテート
19. 30% 2-プロパノール, 0.1M Tris HCl pH8.5, 0.2M 酢酸アンモニウム
20. 25% PEG4000, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.2M 硫酸アンモニウム
21. 30% MPD, 0.1M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.2M Mgアセテート
22. 30% PEG4000, 0.1M Tris HCl pH8.5, 0.2M 酢酸ナトリウム
23. 30% PEG4000, 0.1M Na HEPES pH7.5, 0.2M Mgクロライド
24. 20% 2-プロパノール, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.2M Caクロライド
25. 1.0 M 酢酸ナトリウム, 0.1M イミダゾール pH6.5
26. 30% MPD, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.2M 酢酸アンモニウム
27. 20% 2-プロパノール, 0.1M Na HEPES pH7.5, 0.2M クエン酸ナトリウム
28. 30% PEG8000, 0.1M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.2M 酢酸ナトリウム
29. 0.8M K₂Naタートレート, 0.1M Na HEPES pH7.5
30. 30% PEG8000, 0.2M 硫酸アンモニウム
31. 30% PEG4000, 0.2M 硫酸アンモニウム
32. 2.0M 硫酸アンモニウム
33. 4.0M Naホルメート
34. 2.0M Naホルメート, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6
35. 1.6M Na/K ホスフェート, 0.1M Na HEPES pH7.5
36. 8% PEG8000, 0.1M Tris HCl pH8.5
37. 8% PEG4000, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6
38. 1.4M クエン酸ナトリウム, 0.1M Na HEPES pH7.5
39. 2% PEG4000, 2.0M 硫酸アンモニウム, 0.1M Na HEPES pH7.5
40. 20% 2-プロパノール, 20% PEG4000, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6
41. 10% 2-プロパノール, 20% PEG4000, 0.1M Na HEPES pH7.5
42. 20% PEG8000, 0.05M リン酸カリウム
43. 30% PEG1500
44. 0.2M ギ酸マグネシウム
45. 18% PEG8000, 0.1M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.2M 酢酸亜鉛
46. 18% PEG8000, 0.1M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.2M 酢酸カルシウム

【 図 9 - 4 】

46. 18% PEG8000, 0.1M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.2M 酢酸カルシウム
47. 2.0M 硫酸アンモニウム, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6
48. 2.0M リン酸アンモニウム, 0.1M Tris HCl pH8.5

Fig 9-4

【 図 9 - 5 】

Gridスクリーニング硫酸アンモニウム試薬製剤

- A1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 0.8M 硫酸アンモニウム
- B1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 1.6M 硫酸アンモニウム
- C1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 2.4M 硫酸アンモニウム
- D1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 3.2M 硫酸アンモニウム
- A2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 0.8M 硫酸アンモニウム
- B2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 1.6M 硫酸アンモニウム
- C2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 2.4M 硫酸アンモニウム
- D2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 3.2M 硫酸アンモニウム
- A3. 0.1M MES pH6.0, 0.8M 硫酸アンモニウム
- B3. 0.1M MES pH6.0, 1.6M 硫酸アンモニウム
- C3. 0.1M MES pH6.0, 2.4M 硫酸アンモニウム
- D3. 0.1M MES pH6.0, 3.2M 硫酸アンモニウム
- A4. 0.1M HEPES pH7.0, 0.8M 硫酸アンモニウム
- B4. 0.1M HEPES pH7.0, 1.6M 硫酸アンモニウム
- C4. 0.1M HEPES pH7.0, 2.4M 硫酸アンモニウム
- D4. 0.1M HEPES pH7.0, 3.2M 硫酸アンモニウム
- A5. 0.1M Tris pH8.0, 0.8M 硫酸アンモニウム
- B5. 0.1M Tris pH8.0, 1.6M 硫酸アンモニウム
- C5. 0.1M Tris pH8.0, 2.4M 硫酸アンモニウム
- D5. 0.1M Tris pH8.0, 3.2M 硫酸アンモニウム
- A6. 0.1M Bicine pH9.0, 0.8M 硫酸アンモニウム
- B6. 0.1M Bicine pH9.0, 1.6M 硫酸アンモニウム
- C6. 0.1M Bicine pH9.0, 2.4M 硫酸アンモニウム
- D6. 0.1M Bicine pH9.0, 3.2M 硫酸アンモニウム

Fig 9-5

【 図 9 - 6 】

GridスクリーニングMPD試薬製剤

- A1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 10% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- B1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 20% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- C1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 40% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- D1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 65% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- A2. 0.1M 酢酸ナトリウム三水合物 pH5.0, 10% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- B2. 0.1M 酢酸ナトリウム三水合物 pH5.0, 20% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- C2. 0.1M 酢酸ナトリウム三水合物 pH5.0, 40% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- D2. 0.1M 酢酸ナトリウム三水合物 pH5.0, 65% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- A3. 0.1M MES pH6.0, 10% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- B3. 0.1M MES pH6.0, 20% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- C3. 0.1M MES pH6.0, 40% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- D3. 0.1M MES pH6.0, 65% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- A4. 0.1M HEPES pH7.0, 10% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- B4. 0.1M HEPES pH7.0, 20% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- C4. 0.1M HEPES pH7.0, 40% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- D4. 0.1M HEPES pH7.0, 65% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- A5. 0.1M Tris pH8.0, 10% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- B5. 0.1M Tris pH8.0, 20% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- C5. 0.1M Tris pH8.0, 40% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- D5. 0.1M Tris pH8.0, 65% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- A6. 0.1M Bicine pH9.0, 10% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- B6. 0.1M Bicine pH9.0, 20% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- C6. 0.1M Bicine pH9.0, 40% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール
- D6. 0.1M Bicine pH9.0, 65% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール

Fig 9-6

【 図 9 - 7 】

Gridスクリーニング塩化ナトリウム試薬製剤

- A1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 1.0M 塩化ナトリウム
- B1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 2.0M 塩化ナトリウム
- C1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 3.0M 塩化ナトリウム
- D1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 4.0M 塩化ナトリウム
- A2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 1.0M 塩化ナトリウム
- B2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 2.0M 塩化ナトリウム
- C2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 3.0M 塩化ナトリウム
- D2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 4.0M 塩化ナトリウム
- A3. 0.1M MES pH6.0, 1.0M 塩化ナトリウム
- B3. 0.1M MES pH6.0, 2.0M 塩化ナトリウム
- C3. 0.1M MES pH6.0, 3.0M 塩化ナトリウム
- D3. 0.1M MES pH6.0, 4.0M 塩化ナトリウム
- A4. 0.1M HEPES pH7.0, 1.0M 塩化ナトリウム
- B4. 0.1M HEPES pH7.0, 2.0M 塩化ナトリウム
- C4. 0.1M HEPES pH7.0, 3.0M 塩化ナトリウム
- D4. 0.1M HEPES pH7.0, 4.0M 塩化ナトリウム
- A5. 0.1M Tris pH8.0, 1.0M 塩化ナトリウム
- B5. 0.1M Tris pH8.0, 2.0M 塩化ナトリウム
- C5. 0.1M Tris pH8.0, 3.0M 塩化ナトリウム
- D5. 0.1M Tris pH8.0, 4.0M 塩化ナトリウム
- A6. 0.1M Bicine pH9.0, 1.0M 塩化ナトリウム
- B6. 0.1M Bicine pH9.0, 2.0M 塩化ナトリウム
- C6. 0.1M Bicine pH9.0, 3.0M 塩化ナトリウム
- D6. 0.1M Bicine pH9.0, 4.0M 塩化ナトリウム

Fig 9-7

【 図 9 - 8 】

GridスクリーニングPEG6000試薬製剤

- A1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 5% ポリエチレングリコール6000
- B1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 10% ポリエチレングリコール6000
- C1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 20% ポリエチレングリコール6000
- D1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 30% ポリエチレングリコール6000
- A2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 5% ポリエチレングリコール6000
- B2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 10% ポリエチレングリコール6000
- C2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 20% ポリエチレングリコール6000
- D2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 30% ポリエチレングリコール6000
- A3. 0.1M MES pH6.0, 5% ポリエチレングリコール6000
- B3. 0.1M MES pH6.0, 10% ポリエチレングリコール6000
- C3. 0.1M MES pH6.0, 20% ポリエチレングリコール6000
- D3. 0.1M MES pH6.0, 30% ポリエチレングリコール6000
- A4. 0.1M HEPES pH7.0, 5% ポリエチレングリコール6000
- B4. 0.1M HEPES pH7.0, 10% ポリエチレングリコール6000
- C4. 0.1M HEPES pH7.0, 20% ポリエチレングリコール6000
- D4. 0.1M HEPES pH7.0, 30% ポリエチレングリコール6000
- A5. 0.1M Tris pH8.0, 5% ポリエチレングリコール6000
- B5. 0.1M Tris pH8.0, 10% ポリエチレングリコール6000
- C5. 0.1M Tris pH8.0, 20% ポリエチレングリコール6000
- D5. 0.1M Tris pH8.0, 30% ポリエチレングリコール6000
- A6. 0.1M Bicine pH9.0, 5% ポリエチレングリコール6000
- B6. 0.1M Bicine pH9.0, 10% ポリエチレングリコール6000
- C6. 0.1M Bicine pH9.0, 20% ポリエチレングリコール6000
- D6. 0.1M Bicine pH9.0, 30% ポリエチレングリコール6000

Fig 9-8

【 図 9 - 9 】

GridスクリーニングPEG/LiCl試薬製剤

- A1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 1.0M 塩化リチウム
- B1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 10% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- C1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 20% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- D1. 0.1M クエン酸 pH4.0, 30% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- A2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 1.0M 塩化リチウム
- B2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 10% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- C2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 20% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- D2. 0.1M クエン酸 pH5.0, 30% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- A3. 0.1M MES pH6.0, 1.0M 塩化リチウム
- B3. 0.1M MES pH6.0, 10% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- C3. 0.1M MES pH6.0, 20% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- D3. 0.1M MES pH6.0, 30% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- A4. 0.1M HEPES pH7.0, 1.0M 塩化リチウム
- B4. 0.1M HEPES pH7.0, 10% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- C4. 0.1M HEPES pH7.0, 20% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- D4. 0.1M HEPES pH7.0, 30% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- A5. 0.1M Tris pH8.0, 1.0M 塩化リチウム
- B5. 0.1M Tris pH8.0, 10% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- C5. 0.1M Tris pH8.0, 20% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- D5. 0.1M Tris pH8.0, 30% ポリエチレングリコール6000
- A6. 0.1M Bicine pH9.0, 1.0M 塩化リチウム
- B6. 0.1M Bicine pH9.0, 10% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- C6. 0.1M Bicine pH9.0, 20% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム
- D6. 0.1M Bicine pH9.0, 30% ポリエチレングリコール6000, 1.0M 塩化リチウム

Fig 9-9

【 図 9 - 10 】

PEG/イオンスクリーニング試薬製剤

- 1. 0.2M フッ化ナトリウム, 20% PEG3350
- 2. 0.2M フッ化カリウム, 20% PEG3350
- 3. 0.2M フッ化アンモニウム, 20% PEG3350
- 4. 0.2M 塩化リチウム, 20% PEG3350
- 5. 0.2M 塩化マグネシウム, 20% PEG3350
- 6. 0.2M 塩化ナトリウム, 20% PEG3350
- 7. 0.2M 塩化カルシウム, 20% PEG3350
- 8. 0.2M 塩化カリウム, 20% PEG3350
- 9. 0.2M 塩化アンモニウム, 20% PEG3350
- 10. 0.2M ヨウ化ナトリウム, 20% PEG3350
- 11. 0.2M ヨウ化カリウム, 20% PEG3350
- 12. 0.2M ヨウ化アンモニウム, 20% PEG3350
- 13. 0.2M チオシアン酸ナトリウム, 20% PEG3350
- 14. 0.2M チオシアン酸カリウム, 20% PEG3350
- 15. 0.2M 硝酸リチウム, 20% PEG3350
- 16. 0.2M 硝酸マグネシウム, 20% PEG3350
- 17. 0.2M 硝酸ナトリウム, 20% PEG3350
- 18. 0.2M 硝酸カリウム, 20% PEG3350
- 19. 0.2M 硝酸アンモニウム, 20% PEG3350
- 20. 0.2M 硝酸マグネシウム, 20% PEG3350
- 21. 0.2M 硝酸ナトリウム, 20% PEG3350
- 22. 0.2M 硝酸カリウム, 20% PEG3350
- 23. 0.2M 硝酸アンモニウム, 20% PEG3350
- 24. 0.2M 酢酸リチウム, 20% PEG3350
- 25. 0.2M 酢酸マグネシウム, 20% PEG3350
- 26. 0.2M 酢酸亜鉛, 20% PEG3350
- 27. 0.2M 酢酸ナトリウム, 20% PEG3350
- 28. 0.2M 酢酸カルシウム, 20% PEG3350
- 29. 0.2M 酢酸カリウム, 20% PEG3350
- 30. 0.2M 酢酸アンモニウム, 20% PEG3350
- 31. 0.2M 硫酸リチウム, 20% PEG3350
- 32. 0.2M 硫酸マグネシウム, 20% PEG3350
- 33. 0.2M 硫酸ナトリウム, 20% PEG3350
- 34. 0.2M 硫酸カリウム, 20% PEG3350
- 35. 0.2M 硫酸アンモニウム, 20% PEG3350
- 36. 0.2M 酒石酸ナトリウム, 20% PEG3350
- 37. 0.2M 酒石酸カリウムナトリウム, 20% PEG3350
- 38. 0.2M 酒石酸アンモニウム, 20% PEG3350
- 39. 0.2M リン酸二水素ナトリウム, 20% PEG3350
- 40. 0.2M リン酸二水素ナトリウム, 20% PEG3350
- 41. 0.2M リン酸二水素カリウム, 20% PEG3350
- 42. 0.2M リン酸二水素ナトリウム, 20% PEG3350
- 43. 0.2M リン酸二水素アンモニウム, 20% PEG3350
- 44. 0.2M リン酸二水素アンモニウム, 20% PEG3350
- 45. 0.2M クエン酸トリチウム, 20% PEG3350
- 46. 0.2M クエン酸三ナトリウム, 20% PEG3350

Fig 9-10

【 図 9 - 1 1 】

46. 0.2M クエン酸三ナトリウム, 20% PEG3350
 47. 0.2M クエン酸三カリウム, 20% PEG3350
 48. 0.2M クエン酸水素二アンモニウム, 20% PEG3350

【 図 9 - 1 2 】

Fig 9-12

MembFac試薬製剤

1. 12% MPD, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.1M 塩化ナトリウム
2. 12% PEG4000, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.1M 酢酸亜鉛
3. 10% PEG4000, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.2M 硫酸アンモニウム
4. 12% イソプロパノール, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.1M 塩化ナトリウム
5. 12% PEG4000, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6
6. 1.0M 硫酸アンモニウム, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6
7. 1.0M 硫酸マグネシウム, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6
8. 18% PEG400, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.1M 塩化マグネシウム
9. 1.0M リン酸アンモニウム, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.1M 硫酸リチウム
10. 12% PEG6000, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.1M 塩化ナトリウム
11. 12% PEG6000, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.1M 塩化マグネシウム
12. 18% PEG400, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.1M 塩化ナトリウム
13. 12% PEG4000, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.1M 硫酸リチウム
14. 10% イソプロパノール, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.1M クエン酸ナトリウム
15. 12% MPD, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.1M 塩化ナトリウム
16. 1.0M 硫酸マグネシウム, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6
17. 12% PEG4000, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.1M 塩化ナトリウム
18. 12% PEG6000, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.1M 硫酸リチウム
19. 4% MPD, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.1M 塩化マグネシウム
20. 0.1M 塩化ナトリウム, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6
21. 4% PEG400, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.1M 硫酸リチウム
22. 1.0M 硫酸アンモニウム, 0.1M ADA pH6.5
23. 12% PEG4000, 2% イソプロパノール, 0.1M ADA pH6.5, 0.1M 硫酸リチウム
24. 1.0M リン酸二アンモニウム, 0.1M ADA pH6.5
25. 12% PEG6000, 0.1M ADA pH6.5, 0.1M 塩化マグネシウム
26. 12% MPD, 0.1M ADA pH6.5
27. 1.0M 硫酸マグネシウム, 0.1M ADA pH6.5, 0.1M 硫酸リチウム
28. 4% PEG400, 0.1M ADA pH6.5, 0.3M 硫酸リチウム
29. 1.0M ジ-Na/K ホスフェート, 0.1 Na HEPES pH7.5, 0.1M 硫酸アンモニウム
30. 10% PEG4000, 0.1 Na HEPES pH7.5, 0.1M 塩化ナトリウム
31. 18% PEG400, 0.1 Na HEPES pH7.5, 0.1M 塩化マグネシウム
32. 1.0M K/Na タートレート, 0.1 Na HEPES pH7.5
33. 18% PEG400, 0.1 Na HEPES pH7.5, 0.1M 硫酸アンモニウム
34. 10% PEG4000, 0.1 Na HEPES pH7.5, 0.1M 硫酸アンモニウム
35. 12% MPD, 0.1 Na HEPES pH7.5, 0.1M クエン酸ナトリウム
36. 1.0M クエン酸ナトリウム, 0.1 Na HEPES pH7.5
37. 4% PEG400, 0.1 Na HEPES pH7.5, 0.6M 硫酸マグネシウム
38. 4% MPD, 0.1 Na HEPES pH7.5, 0.6M 硫酸マグネシウム
39. 0.1M K/Na タートレート, 0.1 Na HEPES pH7.5, 0.1M 硫酸リチウム
40. 12% MPD, 0.1M Tris HCl pH8.5, 0.1M 硫酸リチウム
41. 0.5M ジ-Na/K ホスフェート, 0.1 Tris HCl pH8.5, 0.1M リン酸アンモニウム
42. 0.1M 酢酸ナトリウム, 0.1 Tris HCl pH8.5
43. 0.1M 塩化ナトリウム, 0.1 Tris HCl pH8.5
44. 12% PEG6000, 0.1 Tris HCl pH8.5, 0.1M リン酸アンモニウム

Fig 9-11

【 図 9 - 1 3 】

44. 12% PEG6000, 0.1 Tris HCl pH8.5, 0.1M リン酸アンモニウム
 45. 0.4M 硫酸マグネシウム, 0.1 Tris HCl pH8.5, 0.1M K/Na タートレート
 46. 0.2M 硫酸リチウム, 0.1 Tris HCl pH8.5
 47. 0.5M 硫酸アンモニウム, 0.1 Tris HCl pH8.5
 48. 5% PEG400, 0.1 Tris HCl pH8.5, 0.1M クエン酸ナトリウム

【 図 9 - 1 4 】

界面活性剤スクリーニング1試薬製剤

1. 0.08mM $C_{12}E_9$
2. 0.11mM $C_{12}E_9$
3. 0.17mM n-ドデシル-b-D-マルトシド
4. 0.20mM スクロースモノラウレート
5. 0.56mM CYMAL-6
6. 0.90mM TRITON X-100
7. 1.00mM CTAB
8. 1.40mM デオキシ BigChap
9. 1.80mM n-ドデシル-b-D-マルトシド
10. 2.00mM LDAO
11. 2.40mM CYMAL-5
12. 4.00mM ZWITTERGENT 3-12
13. 6.50mM ノニル-b-D-グルコシド
14. 9.00mM 1-S-オクチル-b-D-チオグルコシド
15. 10.4mM DDAO
16. 19.5mM HECAMEG
17. 24.4mM n-オクタノイルスクロース
18. 30.0mM ヘプチル-b-D-チオグルコシド
19. 24.5mM n-オクチル-b-D-グルコシド
20. 34.5mM CYMAL-3
21. 35.0mM C-HEGA-10
22. 40.0mM ZWITTERGENT 3-10
23. 79.0mM MEGA-8
24. 250.0mM n-ヘキシル-b-D-グルコシド

注: [mM]は、界面活性剤のCMCの[mM]である。

Fig. 9-13

Fig 9-14

【 図 9 - 1 5 】

Fig 9-15

結晶スクリーニングクライオ試薬製剤

1. 30% MPD, 0.1M 酢酸ナトリウム, pH4.6, 0.02M 塩化カルシウム
2. 0.26M K₂Na タートレート, 35% グリセロール
3. 0.26M リン酸アンモニウム, 3.5% グリセロール
4. 1.5M 硫酸アンモニウム, 0.075M Tris HCl pH8.5, 25% グリセロール
5. 30% MPD, 0.1M Na HEPES pH7.5, 0.2M クエン酸ナトリウム
6. 24% PEG4000, 0.08M Tris HCl pH8.5, 0.16M 塩化マグネシウム, 20% グリセロール
7. 0.98M 酢酸ナトリウム, 0.07M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 30% グリセロール
8. 21% イソプロパノール, 0.07M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.14M クエン酸ナトリウム, 30% グリセロール
9. 25.5% PEG4000, 0.085M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.17M 酢酸アンモニウム, 15% グリセロール
10. 25.5% PEG4000, 0.085M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.17M 酢酸アンモニウム, 15% グリセロール
11. 0.7M リン酸アンモニウム, 0.07M クエン酸ナトリウム pH5.6, 30% グリセロール
12. 27% イソプロパノール, 0.09M Na HEPES pH7.5, 0.18M 塩化マグネシウム, 10% グリセロール
13. 30% PEG400, 0.1M Tris HCl pH8.5, 0.2M クエン酸ナトリウム
14. 26.6% PEG400, 0.095M Na HEPES pH7.5, 0.19M 塩化カルシウム, 5% グリセロール
15. 25.5% PEG8000, 0.085M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.17M 硫酸アンモニウム, 15% グリセロール
16. 1.125M 硫酸リチウム, 0.075M Na HEPES pH7.5, 25% グリセロール
17. 25.5% PEG4000, 0.085M Tris HCl pH8.5, 0.17M 硫酸リチウム, 15% グリセロール
18. 16% PEG8000, 0.08M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.16M 酢酸マグネシウム, 20% グリセロール
19. 24% イソプロパノール, 0.08M Tris HCl pH8.5, 0.16M 酢酸アンモニウム, 20% グリセロール
20. 20% PEG4000, 0.08M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.16M 硫酸アンモニウム, 20% グリセロール
21. 30% MPD, 0.1M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.2M 酢酸マグネシウム
22. 25.5% PEG4000, 0.085M Tris HCl pH8.5, 0.17M 酢酸ナトリウム, 15% グリセロール
23. 30% PEG400, 0.1M Na HEPES pH7.5, 0.2M 塩化マグネシウム
24. 14% イソプロパノール, 0.07M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.14M 塩化カルシウム, 30% グリセロール
25. 0.7M 酢酸ナトリウム, 0.07M イミダゾール pH6.5, 30% グリセロール
26. 30% MPD, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.2M 酢酸アンモニウム
27. 14% イソプロパノール, 0.07M Na HEPES pH7.5, 0.14M クエン酸ナトリウム, 30% グリセロール
28. 25.5% PEG8000, 0.085M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.17M 酢酸ナトリウム, 15% グリセロール
29. 0.52M K₂Na タートレート, 0.065M Na HEPES pH7.5, 35% グリセロール
30. 25.5% PEG8000, 0.17M 硫酸アンモニウム, 15% グリセロール

【 図 9 - 1 6 】

31. 25.5% PEG4000, 0.17M 硫酸アンモニウム, 15% グリセロール
32. 1.5M 硫酸アンモニウム, 25% グリセロール
33. 3.6M 酢酸ナトリウム, 10% グリセロール
34. 1.4M 酢酸ナトリウム, 0.07M 酢酸ナトリウム, pH4.6, 30% グリセロール
35. 1.2M Na₂K ホスフェート, 0.075M Na HEPES pH7.5, 25% グリセロール
36. 5.2% PEG8000, 0.065M Tris HCl pH8.5, 35% グリセロール
37. 5.6% PEG4000, 0.07M 酢酸ナトリウム, pH4.6, 30% グリセロール
38. 1.26M クエン酸ナトリウム, 0.09M Na HEPES pH7.5, 10% グリセロール
39. 1.7% PEG400, 0.085M Na HEPES pH7.5, 1.7M 硫酸アンモニウム, 15% グリセロール
40. 19% イソプロパノール, 0.095M クエン酸ナトリウム pH5.6, 19% PEG4000, 5% グリセロール
41. 8.5% イソプロパノール, 0.085M Na HEPES pH7.5, 17% PEG4000, 15% グリセロール
42. 16% PEG8000, 0.04M リン酸カリウム, 20% グリセロール
43. 24% PEG1500, 20% グリセロール
44. 0.1M 酢酸マグネシウム, 50% グリセロール
45. 14.4% PEG8000, 0.08M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.16M 酢酸亜鉛, 20% グリセロール
46. 14.4% PEG8000, 0.08M カコジル酸ナトリウム pH6.5, 0.16M 酢酸カルシウム, 20% グリセロール
47. 1.6M 硫酸アンモニウム, 0.08M 酢酸ナトリウム, pH4.6, 20% グリセロール
48. 1.6M リン酸アンモニウム, 0.08M Tris HCl pH8.5, 20% グリセロール

Fig 9-16

【 図 9 - 1 7 】

低イオン強度スクリーニング試薬製剤

緩衝液

1. 0.05M 塩化カリウム pH2.0
2. 0.05M クエン酸 pH3.0
3. 0.05M クエン酸 pH3.5
4. 0.05M クエン酸 pH4.0
5. 0.05M クエン酸 pH4.5
6. 0.05M クエン酸 pH5.0
7. 0.05M クエン酸 pH5.5
8. 0.05M MES pH6.0
9. 0.05M Bis-Tris pH6.5
10. 0.05M イミダゾール pH7.0
11. 0.05M HEPES pH7.5
12. 0.05M Tris pH8.0
13. 0.05M Tris pH8.5
14. 0.05M グリシン pH9.0
15. 0.05M グリシン pH9.5
16. 0.05M グリシン pH 10.0
17. 0.05M リン酸水素二ナトリウム pH11.0
18. 0.05M リン酸水素二ナトリウム pH12.0

沈殿剤

- A. 4% w/v ポリエチレングリコール3350
- B. 8% w/v ポリエチレングリコール3350
- C. 12% w/v ポリエチレングリコール3350
- D. 16% w/v ポリエチレングリコール3350
- E. 20% w/v ポリエチレングリコール3350
- F. 24% w/v ポリエチレングリコール3350

脱水剤(Dehydrant)

- 24% w/v ポリエチレングリコール3350

Fig 9-17

【 図 1 0 A 】

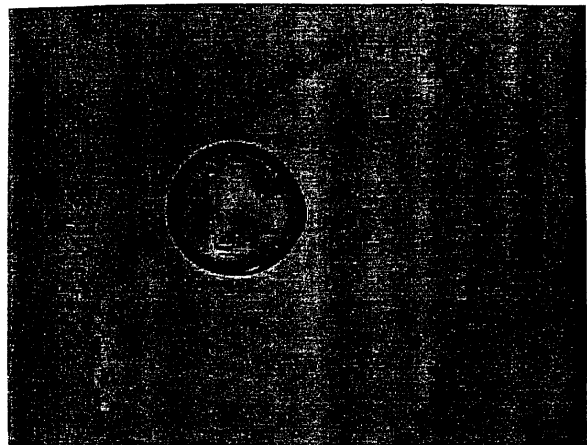


Figure 10A

【 図 1 0 B 】



Figure 10B

【 図 1 0 C 】

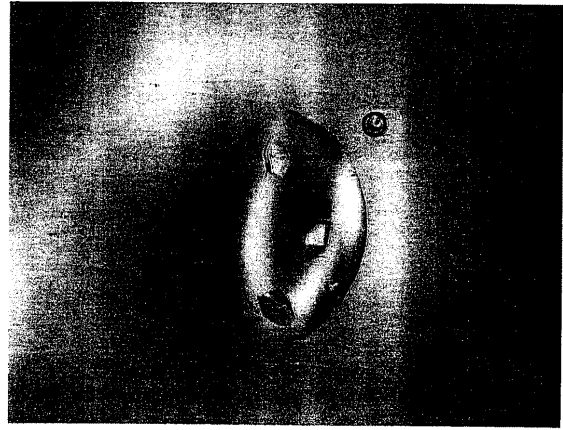


Figure 10C

【 図 1 0 D 】

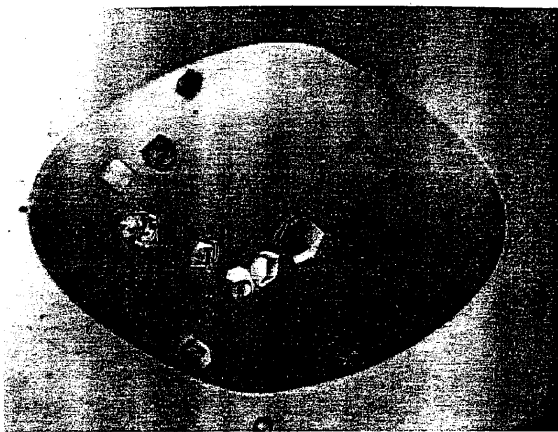


Figure 10D

【 図 1 1 】

CaCl ₂ 濃度 (mM)	pH					
	4.1	4.3	4.5	4.7	4.9	5.1
12.5	1.6 A 8.3 B 75.0 C 19.3 D 143.8 W	1.6 A 8.3 B 75.0 C 16.9 D 148.3 W	1.6 A 8.3 B 75.0 C 14.1 D 151.0 W	1.6 A 8.3 B 75.0 C 11.4 D 153.7 W	1.6 A 8.3 B 75.0 C 8.7 D 156.4 W	1.6 A 8.3 B 75.0 C 6.3 D 158.8 W
17.5	2.2 A 8.3 B 75.0 C 19.3 D 143.2 W	2.2 A 8.3 B 75.0 C 16.9 D 147.6 W	2.2 A 8.3 B 75.0 C 14.1 D 150.3 W	2.2 A 8.3 B 75.0 C 11.4 D 153.1 W	2.2 A 8.3 B 75.0 C 8.7 D 155.8 W	2.2 A 8.3 B 75.0 C 6.3 D 158.2 W
22.5	2.8 A 8.3 B 75.0 C 19.3 D 144.6 W	2.8 A 8.3 B 75.0 C 16.9 D 147.0 W	2.8 A 8.3 B 75.0 C 14.1 D 149.7 W	2.8 A 8.3 B 75.0 C 11.4 D 152.5 W	2.8 A 8.3 B 75.0 C 8.7 D 155.2 W	2.8 A 8.3 B 75.0 C 6.3 D 157.6 W
27.5	3.4 A 8.3 B 75.0 C 19.3 D 143.9 W	3.4 A 8.3 B 75.0 C 16.9 D 146.4 W	3.4 A 8.3 B 75.0 C 14.1 D 149.1 W	3.4 A 8.3 B 75.0 C 11.4 D 151.9 W	3.4 A 8.3 B 75.0 C 8.7 D 154.5 W	3.4 A 8.3 B 75.0 C 6.3 D 157.0 W

A = 2M CaCl₂の容量
 B = 3M NaOAcの容量
 C = 100% MPDの容量
 D = 1M HClの容量
 W = 100% 水の容量

FIGURE 11

【 図 1 1 - 1 】

Fig 11-1

結晶スクリーニング2試薬製剤

1. 10% PEG6000, 2.0M 塩化ナトリウム
2. 0.5M NaCl, 0.01M CTAB, 0.01MMg chloride
3. 25% Ethylene glycol
4. 35% Dioxane
5. 5% Isopropanol, 2.0M 硫酸アンモニウム
6. 1.0M Imidazole pH7.0
7. 10% PEG1000, 10% PEG8000
8. 1.0% エタノール, 1.5M 塩化ナトリウム
9. 2.0M 塩化ナトリウム, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6
10. 30% MPD, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.69, 0.2M NaCl
11. 1.0M 1,6 ヘキサンジオール, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.01M 塩化コバルト
12. 30% PEG400, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.1M 塩化カドミウム
13. 30% PEG MME 2000, 0.1M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.2M 硫酸アンモニウム
14. 2.0M 硫酸アンモニウム, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.2M K/Na タートレート
15. 1.0M 硫酸リチウム, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.5M 硫酸アンモニウム
16. 2% ポリエチレングリコール, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.5M 塩化ナトリウム
17. 35% t-ブタノール, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6
18. 10% Jeffamine M-600, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6, 0.01M 塩化第2鉄
19. 2.5M 1,6 ヘキサンジオール, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.6
20. 1.6M 硫酸マグネシウム, 0.1M MES pH6.5
21. 2.0M 塩化ナトリウム, 0.1M MES pH6.5, 0.2M Na/K ホスフェート
22. 12% PEG2000, 0.1M MES pH6.5
23. 10% ジオキサン, 0.1M MES pH6.5, 1.6M 硫酸アンモニウム
24. 30% Jeffamine M-600, 0.1M MES pH6.5, 0.05M 塩化セシウム
25. 1.8M 硫酸アンモニウム, 0.1M MES pH6.5, 0.01M 塩化コバルト
26. 30% PEG MME 5000, 0.1M MES pH6.5, 0.2M 硫酸アンモニウム
27. 25% PEG MME 550, 0.1M MES pH6.5, 0.01M 硫酸亜鉛
28. 1.6M クエン酸ナトリウム pH6.5
29. 30% MPD, 0.1M Hepes pH7.5, 0.5M 硫酸アンモニウム
30. 10% PEG6000, 0.1M Hepes pH7.5, 5% MPD
31. 20% Jeffamine M-600, 0.1M Hepes pH7.5
32. 1.6M 硫酸アンモニウム, 0.1M Hepes pH7.5, 0.1M 塩化ナトリウム
33. 2.0M 硫酸アンモニウム, 0.1M Hepes pH7.5
34. 1.0M 酢酸ナトリウム, 0.1M Hepes pH7.5, 0.05M 硫酸カドミウム
35. 70% MPD, 0.1M Hepes pH7.5
36. 4.3M 塩化ナトリウム, 0.1M Hepes pH7.5
37. 10% PEG8000, 0.1M Hepes pH7.5, 8% エチレングリコール
38. 20% PEG10000, 0.1M Hepes pH7.5
39. 3.4M 1,6 ヘキサンジオール, 0.1M Tris pH8.5, 0.2M 塩化マグネシウム
40. 25% t-ブタノール, 0.1M Tris pH8.5, 0.1M 塩化カルシウム
41. 1.0M 硫酸リチウム, 0.1M Tris pH8.5, 0.01M 塩化ニッケル
42. 12% グリセロール, 0.1M Tris pH8.5, 1.5M 硫酸アンモニウム
43. 50% MPD, 0.1M Tris pH8.5, 0.2M リン酸アンモニウム
44. 20% エタノール, 0.1M Tris pH8.5
45. 20% PEG MME 2000, 0.1M Tris pH8.5, 0.01M 塩化ニッケル

【 図 1 1 - 2 】

45. 20% PEG MME 2000, 0.1M Tris pH8.5, 0.01M 塩化ニッケル
46. 30% PEG MME 550, 0.1M Bicine pH9.0, 0.1M 塩化ナトリウム
47. 2.0M 塩化マグネシウム, 0.1M Bicine pH9.0
48. 10% PEG20000, 0.1M Bicine pH9.0, 2% ジオキサン

Fig 11-2

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成18年5月22日 (2006.5.22)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 1 3 3

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 1 3 3 】

【 図 1 】図 1 は、本発明の結晶化システムのブロックダイヤグラムである。

【 図 2 】図 2 は、タンパク質結晶化試験を行うための、図 1 の結晶化システムの使用方法を示している。

【 図 3 A 】図 3 A は、ハンギングドロップアレイ微結晶化を行うために使用するマルチウェルプレートの平面図を示している。

【 図 3 B 】図 3 B は、図 3 A で示されるマルチウェルプレートの側面図である。

【 図 3 C 】図 3 C は、シッティングドロップアレイ微結晶化を行うために使用するマルチウェルプレートの平面図を示している。

【 図 3 D 】図 3 D は、図 3 C で示されるマルチウェルプレートの側面図である。

【 図 3 E 】図 3 E は、プレートカバーを有するマルチウェルプレートの断面図である。

【 図 4 A 】図 4 A ~ 4 J は、母液送達システムに含まれることができる種々のステーションを示している。図 4 A は、プレートローディングステーションに隣接して位置するプレートトラックを横断的に見たプレートローディングステーションの側面図である。

【 図 4 B 】図 4 B は、プレートトラックの縦軸を見下ろしたプレートローディングステーションの側面図である。

【 図 4 C 】図 4 C は、マルチウェルプレートに含まれるバーコードを読み取るための、バーコード読み取りステーションの側面図である。

【図 4 D】図 4 D は、シーリング手段をマルチウェルプレート中に定義されるウェルの上端に適用するための、シーリング手段ステーションの側面図である。

【図 4 E】図 4 E は、プレートカバーをマルチウェルプレートから取り去るためのプレートカバー除去ステーションの側面図である。

【図 4 F】図 4 F は、母液送達ステーションの平面図である。

【図 4 G】図 4 G は、母液をマルチウェルプレートへ送達するための送達ブロックの平面図である。

【図 4 H】図 4 H は、母液をマルチウェルプレートへ送達するための送達ブロックの断面図である。

【図 4 I】図 4 I は、母液ソース格納バンクの側面図である。

【図 4 J】図 4 J は、母液を母液ソースから液体インジェクターへ送達するためのシリンジポンプの側面図を示している。

【図 5 A】図 5 A ~ 5 E は、ドロップ形成システム中に含まれることができる種々のステーションを示している。図 5 A は、ドロップ形成ステーションの平面図である。

【図 5 B】図 5 B は、ドロップ形成ステーションの側面図である。

【図 5 C】図 5 C は、ピペットホルダーの側面図である。

【図 5 D】図 5 D は、ウェルカバーホルダーの側面図である。

【図 5 E】図 5 E は、マルチウェルプレート内のウェルの上に位置づけられるウェルカバーを格納するためのウェルカバーマガジンの側面図である。

【図 6 A】図 6 A ~ 6 I は、ドロップ形成ステーションの動作を示している。図 6 A は、静止ポジションにあるドロップ形成ステーションを示している。

【図 6 B】図 6 B は、マルチウェルプレートを有するドロップ形成ステーションがドロップ形成ポジションに移動し、ピペットホルダーが洗浄ベースン上のポジションに移動することを示している。

【図 6 C】図 6 C は、ピペットホルダーが、マルチウェルプレート内のウェルのカラム上のポジションに移動したことを示している。

【図 6 D】図 6 D は、ピペットホルダーがウェルカバー上のポジションに移動したことを示している。

【図 6 E】図 6 E は、ピペットホルダーが静止ポジションに戻り、タンパク質送達ピペットがウェルカバー上のポジションに移動したことを示している。

【図 6 F】図 6 F は、タンパク質送達ピペットが静止ポジションに移動し、カバーホルダーが反転し、マルチウェルプレートのウェルのカラム上のポジションに移動したことを示している。

【図 6 G】図 6 G は、プレートのウェルを覆うウェルカバーから吊り下がったハンギングドロップを示している。

【図 6 H】図 6 H は、カバーホルダーが、ウェルカバー格納コンポーネント上のポジションに移動したことを示している。

【図 6 I】図 6 I は、カバーホルダーが静止ポジションに戻ったことを示している。

【図 7 A】図 7 A ~ 7 G は、シッティングドロップを形成するためのドロップ形成ステーションの動作を示している。図 7 A は、静止ポジションにあるドロップ形成ステーションを示している。

【図 7 B】図 7 B は、マルチウェルプレートを有するドロップ形成ステーションが、ドロップ形成のためのポジションでシッティングドロップアレイ微結晶化を行うために適合し、かつ、ピペットホルダーが洗浄ベースン上のポジションに移動したことを示している。

【図 7 C】図 7 C は、ピペットホルダーがマルチウェルプレート内のウェルのカラム上のポジションに移動したことを示している。

【図 7 D】図 7 D は、ピペットホルダー内のピペットが、プレートのカラム内のウェルのウェル領域に対して整列したことを示している。

【図 7 E】図 7 E は、ピペットホルダー内のピペットが、プレートのカラム内のウェルのシッティングドロップ領域に対して整列したことを示している。

【図 7 F】図 7 F は、タンパク質送達ピペットが、ウェルのカラム中のウェルのシッティングドロップ領域上のポジションへ移動したことを示している。

【図 7 G】図 7 G は、シッティングドロップが、ウェルのシッティングドロップ領域に形成したことを示している。

【図 8 A】図 8 A は、プレートトラックの下に位置するピンキャリッジからプレートトラックの上に伸張したピンを有するプレートトラックの側面図である。

【図 8 B】図 8 B は、プレートトラックの下に引き出された図 8 のピンを有するプレートトラックの側面図である。

【図 8 C】図 8 C は、複数のピンキャリッジを有する運搬アセンブリの側面図である。

【図 9】図 9 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 1】図 9 - 1 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 2】図 9 - 2 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 3】図 9 - 3 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 4】図 9 - 4 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 5】図 9 - 5 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 6】図 9 - 6 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 7】図 9 - 7 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 8】図 9 - 8 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 9】図 9 - 9 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 10】図 9 - 10 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 11】図 9 - 11 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 12】図 9 - 12 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 13】図 9 - 13 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 14】図 9 - 14 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 15】図 9 - 15 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 16】図 9 - 16 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 9 - 17】図 9 - 17 は、好ましい粗スクリーニング用の 480 の母液溶液の組成を示している。

【図 10 A】図 10 A は、40 nL ~ 1000 nL の大きさが異なるドロップ中での結晶形成を示している。

【図 10 B】図 10 B は、40 nL ~ 1000 nL の大きさが異なるドロップ中での結晶形成を示している。

【図 10 C】図 10 C は、40 nL ~ 1000 nL の大きさが異なるドロップ中での結晶形成を示している。

【図10D】図10Dは、40 nL ~ 1000 nLの大きさが異なるドロップ中での結晶形成を示している。

【図11】図11は、結晶化試験の緻密スクリーニング段階で使用した24の母液についての母液組成を示している。

【図11-1】図1-1は、結晶化試験の緻密スクリーニング段階で使用した24の母液についての母液組成を示している。

【図11-2】図1-2は、結晶化試験の緻密スクリーニング段階で使用した24の母液についての母液組成を示している。

フロントページの続き

- (74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
- (74)代理人 100086771
弁理士 西島 孝喜
- (74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
- (72)発明者 サントルシエロ バーナード ディー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 1 1 - 7 7 0 7 サン ディエゴ ウェスト フォック
クス ラン ウェイ 3 8 2 4
- (72)発明者 シュルツ ピーター ジー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 3 7 ラ ジョラ ラ ジョラ ランチ ロード 1
6 5 0
- (72)発明者 イェジアン デレック ティー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 2 オークランド バックリー コート 2
- (72)発明者 ノードメイヤー ロバート エイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 7 8 サン レアンドロ アルタモント ロード 2
0 6 1
- (72)発明者 コルベ ウィリアム エフ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 5 6 モラガ アスコット ドライヴ 2 0 3 2
- (72)発明者 アバー ドナルド シー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 2 3 プレザント ヒル リッジビュー コート 4
8 3
- (72)発明者 スティーヴンス レイモンド シー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 3 7 ラ ジョラ カミニト ヴァルヴァード 7 0
9 6
- (72)発明者 ジャクレヴィック ジョセフ エム
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 4 9 ラファイエット スカイウッド ロード 8 2
5
- (72)発明者 コーネル アール
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 0 9 アンティオッチ ダンデライオン コート 2
8 2 7
- (72)発明者 ジン ジアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 7 0 3 バークリー カリフォルニア ストリート 2
1 3 7
- (72)発明者 ジョーンズ アーサー エル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 5 オークランド ウィンスローブ ストリート
7 9 2 5
- Fターム(参考) 4B029 AA27 BB15 BB16
4B050 EE10 FF17C
4G077 AA01 BF05 EC01 EG25 EG26 HA20