

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4620386号
(P4620386)

(45) 発行日 平成23年1月26日 (2011. 1. 26)

(24) 登録日 平成22年11月5日 (2010. 11. 5)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 27/447 (2006.01)

GO 1 N 27/26 3 1 5 A

GO 1 N 27/26 3 1 5 H

GO 1 N 27/26 3 1 5 Z

GO 1 N 27/26 3 3 1 Z

請求項の数 8 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2004-174779 (P2004-174779)
 (22) 出願日 平成16年6月11日 (2004. 6. 11)
 (65) 公開番号 特開2005-3685 (P2005-3685A)
 (43) 公開日 平成17年1月6日 (2005. 1. 6)
 審査請求日 平成19年6月7日 (2007. 6. 7)
 (31) 優先権主張番号 10/459, 799
 (32) 優先日 平成15年6月12日 (2003. 6. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502096543
 パロ・アルト・リサーチ・センター・イン
 コーポレーテッド
 Palo Alto Research
 Center Incorporated
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
 304、パロ・アルト、コヨーテ・ヒル・
 ロード 3333
 (74) 代理人 100075258
 弁理士 吉田 研二
 (74) 代理人 100096976
 弁理士 石田 純
 (72) 発明者 メング エイチ リーン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア サンタ
 クララ マーストン レーン 4174
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リンコンフィギュア可能な分散型マルチセグメント進行波グリッド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分散型マルチセグメント進行波グリッドを有するゲル電気泳動システムであって、
 生体分子のゲル電気泳動における使用に適したゲルの層と、
 前記ゲルに接触して配置され、互いに狭い間隔で平行に配置される複数の第 1 電極を含
 む、進行波グリッドの第 1 セグメントと、
 前記ゲルに接触して配置され、互いに狭い間隔で平行に配置される複数の第 2 電極を含
 む、進行波グリッドの第 2 セグメントと、
 前記進行波グリッドの前記第 1 セグメントおよび前記第 2 セグメントのうちの少なくと
 も一方に電気的に接続される電圧制御器と、を有し、
 前記電圧制御器が選択的に、(i) 前記進行波グリッドの前記第 1 セグメントおよび前
 記進行波グリッドの前記第 2 セグメントのうちの少なくとも一方に、第 1 の多相電気信号
 を供給し、(i i) 前記進行波グリッドの前記第 1 セグメントおよび前記進行波グリッド
 の前記第 2 セグメントのうちの少なくとも一方に、前記第 1 の電気信号とは異なる第 2 の
 多相電気信号を供給することを特徴とするゲル電気泳動システム。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のシステムにおいて、さらに、前記進行波グリッドの前記第 1 セグメン
 トおよび前記第 2 セグメントのうちの少なくとも一方に電気的に接続される第 2 の電圧制
 御器を有することを特徴とするゲル電気泳動システム。

【請求項 3】

10

20

請求項 2 に記載のシステムにおいて、前記第 2 の電圧制御器が、前記進行波グリッドの前記第 1 セグメントおよび前記進行波グリッドの前記第 2 セグメントのうちの少なくとも一方に、第 3 の多相電気信号を選択的に供給することを特徴とするゲル電気泳動システム。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のシステムにおいて、前記進行波グリッドの前記第 1 セグメントが、前記進行波グリッドの隣接する前記第 2 セグメントに接続されていることを特徴とするゲル電気泳動システム。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のシステムにおいて、前記ゲル層には、第 1 面と、前記第 1 面とは反対側の第 2 面とが形成されており、前記進行波グリッドの前記第 1 セグメントが、前記ゲル層の前記第 1 面に接触し、前記システムはさらに、

10

前記ゲル層の前記第 2 面に接触し、前記第 1 セグメントの反対側に配置される、進行波グリッドの第 3 セグメントを有することを特徴とするゲル電気泳動システム。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のシステムにおいて、前記ゲル層には、第 1 面と、前記第 1 面とは反対側の第 2 面とが形成されており、前記システムはさらに、

前記ゲルの前記第 1 面に沿って設けられた第 1 導電層と、

前記ゲルの前記第 2 面に沿って設けられた第 2 導電層と、

前記第 1 導電層および前記第 2 導電層に電氣的に接続する電圧源と、を有し、

20

前記電圧源を用いて、前記ゲル層にわたって電圧ポテンシャルを印加すると、前記ゲル内の生体分子が、前記進行波グリッドの前記第 1 セグメントおよび前記第 2 セグメントのうちの少なくとも一方に向かって進められることを特徴とするゲル電気泳動システム。

【請求項 7】

ゲル電気泳動システムを用いてサンプルから様々な生体分子を分離する方法であって、前記システムは、(i) 同一平面内に配置された 2 つの基板の間に位置する、電気泳動に適したゲルの層と、(i i) 前記ゲルの第 1 の面に接触して配置される進行波グリッドの第 1 セグメントであって、互いに狭い間隔で平行に配置された第 1 の複数の電極を有する第 1 セグメントと、前記ゲルの第 2 の面に接触して配置される進行波グリッドの第 2 セグメントであって、互いに狭い間隔で平行に配置された第 2 の複数の電極を有する第 2 セグメントと、(i i i) 前記第 1 セグメントおよび前記第 2 セグメントに選択的に電氣的接続され、少なくとも 1 つの多相電気信号を供給するよう構成される電圧制御器と、を有し、

30

前記ゲル層に前記サンプルを載置する工程と、

前記電圧制御器からの前記第 1 の多相電気信号を、前記第 1 セグメントおよび前記第 2 セグメントのうちの少なくとも一方に印加する工程であって、前記サンプル中の生体分子の少なくとも一部が前記ゲル内を移動する工程と、

前記電圧制御器からの第 2 の多相電気信号を、前記第 1 セグメントおよび前記第 2 セグメントのうちの少なくとも一方に印加する工程であって、(i) 生体分子の前記一部が前記ゲル内をさらに移動するか、あるいは(i i) 前記サンプル中の生体分子の他の一部が前記ゲル内を移動する工程と、を含む方法。

40

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法において、前記システムは、さらに前記ゲル層に電氣的に接続する電圧源を有し、

前記ゲル層にサンプルを載置した後、前記ゲル層の厚さ方向にわたって電圧ポテンシャルを印加する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、電気泳動による分子の分離と、ゲル電気泳動におけるタンパク質の初期急速

50

移送およびその後の集中または集束と、電界に応じた粒子の移動の観察結果に基づく分析方法とに関する。

【背景技術】

【0002】

電気泳動の典型的な手順の1つは、異なるpH値を有する溶液を電界の各端部に設け、それらの間がpHの勾配になっている状態を作成することである。特定のpHにおいて分子は等電点に達し、その分子の実効電荷がゼロになる。したがって、分子がpH勾配中を進行するにつれて、等電点に達し、それ以降は電界内で不動になる。このように、この電気泳動の手法では、異なる等電点に基づいて分子が分離される。

【0003】

詳細には、上述の方法は等電点電気泳動（IEF）と呼ばれ、pH勾配内の分子に電界を印加して、実効電荷がゼロになる位置、すなわち分子の等電点まで、分子を移動させる。

【0004】

ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）（ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$ ；ラウリル硫酸ナトリウムとしても知られている）と、サンプル処理と、ポリアクリルアミドゲル電気泳動との組み合わせは、1960年代後半に初めて開示されている。

【0005】

SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS - PAGE）によれば、分子が厳密にサイズ、すなわち分子量に基づいて分離される。SDSで処理したサンプルがゲル内を移動して電気泳動する際の主要な差異は、サイズまたは長さである。小さな分子は、より大きな分子に比べて、基質（matrix）内をより速く移動する。ポリアクリルアミドゲル内を分子が移動する速度は、分子量の対数に反比例する（inversely linear）。したがって、変性したサンプルを、既知の分子量の標準値に基づいて分析し、物質の物理的サイズを判断する手段とすることができる。

【0006】

二次元（2D）電気泳動は、再現可能かつ高感度な分析方法を提供するユニークな手法である。2Dと呼ばれる理由は、2つの異なる電気泳動方法を2つの異なる次元で用いて、1つの結果を得るからである。2D分析において通常使用される一対の電気泳動手法は、上述の等電点電気泳動（IEF）と、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS - PAGE）とである。IEFは、サンプル化合物を等電点に基づいて分離し、SDS - PAGEは、化合物を分子量に基づいて分離する。上述のとおり、多くのタンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）（分子量に基づく）、もしくは変性ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動（IEF）（分子電荷に基づく）によって、分離できる。その両方の手法を二次元的に連係させて用いることで、最高の分離能が得られる。

【0007】

粒子は、様々な構成の電極および電極アレイによって生成された不均一電界を用いて操作される。バイオテクノロジーの一般的なツールとして、誘電泳動は非常に強力である。粒子の移動速度の測定によって、粒子の誘電性を検出できる。誘電泳動分離の強力な拡張機能は、進行波誘電泳動（TWD）である。TWDでは、電極システムにおいて、時間変化電位を電極に順次印加することによって可変電界を生成する。このような進行波電界移動方法は、Parton et al.によって米国特許第5,653,859号に開示されている。その他、いくつかの従来技術がある（特許文献2から特許文献5）。

【0008】

【特許文献1】米国特許第5,653,859号明細書

【特許文献2】米国特許第4,473,452号明細書

【特許文献3】米国特許第4,647,179号明細書

【特許文献4】米国特許第4,737,251号明細書

【特許文献5】米国特許第6,272,296号明細書

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0009】

一態様において本発明は、分散型マルチセグメント進行波グリッドを有するゲル電気泳動システムを提供する。該システムは、生体分子のゲル電気泳動における使用に適したゲルの層を有する。該システムはさらに、ゲルに接触して配置される、進行波グリッドの第1セグメントを有する。第1セグメントは、互いに狭い間隔で平行に配置される複数の第1電極を含む。該システムはまた、ゲルに接触して配置される、進行波グリッドの第2セグメントを有する。第2セグメントは、互いに狭い間隔で平行に配置される複数の第2電極を含む。該システムはさらに、進行波グリッドの第1セグメントおよび第2セグメントのうちの少なくとも一方に電氣的に接続する電圧制御器を有する。その電圧制御器は選択的に、(i)グリッドの第1セグメントおよびグリッドの第2セグメントのうちの少なくとも一方に第1の多相電気信号を供給し、(ii)グリッドの第1セグメントおよびグリッドの第2セグメントのうちの少なくとも一方に、第1の電気信号とは異なる第2の多相電気信号を供給するよう構成される。

10

【0010】

他の態様において本発明は、ゲル電気泳動システムを用いてサンプルから様々な生体分子を分離する方法を提供する。該システムは、(i)同一平面内に配置された2つの基板の間に位置する、電気泳動に適したゲルの層と、(ii)前記ゲルの第1の面に接触して配置される進行波グリッドの第1セグメントであって、互いに狭い間隔で平行に配置された第1の複数の電極を有する第1セグメントと、前記ゲルの第2の面に接触して配置される進行波グリッドの第2セグメントであって、互いに狭い間隔で平行に配置された第2の複数の電極を有する第2セグメントと、(iii)前記第1セグメントおよび前記第2セグメントに選択的に電氣的接続され、少なくとも1つの多相電気信号を供給するよう構成される電圧制御器と、を有し、前記ゲル層に前記サンプルを載置する工程と、前記電圧制御器からの前記第1の多相電気信号を、前記第1セグメントおよび前記第2セグメントのうちの少なくとも一方に印加する工程であって、前記サンプル中の生体分子の少なくとも一部が前記ゲル内を移動する工程と、前記電圧制御器からの第2の多相電気信号を、前記第1セグメントおよび前記第2セグメントのうちの少なくとも一方に印加する工程であって、(i)生体分子の前記一部が前記ゲル内をさらに移動するか、あるいは(ii)前記サンプル中の生体分子の他の一部が前記ゲル内を移動する工程と、を含む方法である。

20

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

図1は、好適な実施形態のゲル電気泳動システム10を示す略図である。システム10は、ガラスプレート30とプレキシグラスのバックプレート40との間に設けられたポリアクリルアミドゲルの薄層20を含む。ゲル厚さは、テフロン(登録商標)のシムを用いて調節される。進行波グリッド50は、ガラス30上にプラチナ電極を設けることによって形成される。チタンの薄層を用いて、プラチナとガラスとの接着を向上させてもよい。他方のプレートにも、ガラス上にもう1つの同様の進行波グリッドを設けてもよく、それによって両側構造が備えられる。電極およびゲルアセンブリは、電圧源80に電氣的に接続される。代表的なアセンブリでは、電極およびゲルアセンブリは適切な導電性緩衝液中に浸漬される。それぞれ70および72で示す内部および外部チャンバは、緩衝液を収容する。以下から判るとおり、電極およびゲルアセンブリにおける電子の流れの唯一の経路が、電圧源80へおよび電圧源80から緩衝液を経由したものとなるように、電圧源80を用いて電気回路を形成する。さらに、外部チャンバ72内の緩衝液は、その中に浸漬された電極およびゲルアセンブリを冷却する機能も有する。ゲルの両側に進行波グリッドを用いることの利点は、同じゲル厚さにおいて面内電界を2倍にできること、あるいは、同じ電界を用いてゲル厚さを2倍にできることである。後者は、ゲル内のタンパク質充填(packing)容量が重要である場合に、サンプル検出において最小レベルを達成するために特に有用である。図1のチャンバ70および72内の2つの緩衝液などのイオン緩衝剤は

40

50

、互いの間に直流電界が印加される２つの電極として機能する。タンパク質サンプルは通常、ゲルの最上部に供給され、電気泳動電流がゲル内に流される。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ工程では、サンプル内のタンパク質または生体分子は、分子量に基づいてゲル内を移動し、最も軽い分子が最も長い距離を移動する。図１の略図では、移動するタンパク質は、ゲル層２０内を下に向かって流れる。

【００１２】

図２に示す他の好適な実施形態のシステムでは、プレキシグラスのバックプレート１４０の内面１４２に、２００オングストロームの薄層のプラチナが設けられ、ゲル１２０に接するようになっている。その電極およびゲルアセンブリに電氣的に接続するように、電圧源１８０が設けられる。プラチナは、進行波グリッド１５０に向けてタンパク質１６０を進行させ図２に示すタンパク質進行を促進させる静電圧力をもたらし、対向電極を形成する。厚さ１００μmのゲル層では、たった－０．１Vで、ＳＤＳ処理済みのマイナス電荷のタンパク質に必要な静電圧力が十分に得られる。この電圧は、ガスを有意に発生させる閾値より低い。グリッドに向けてタンパク質を「進行させる」図２の実施形態は、図１の実施形態と組み合わせて使用できると考えられる。

【００１３】

図３および図４はそれぞれ、片側および両側構成の進行波グリッドアセンブリの好適な実施形態を示す図である。各アセンブリは、密接な状態で設けられた有効量のゲルを含む。詳細には図３は、片面グリッドアセンブリ２００を示す。アセンブリ２００は、プレート２１０と、狭い間隔で平行に設けられた複数の電極２１２，２１４，２１６，および２１８と、それらの電極に電氣的に接続する有効量のゲル２２０とを有する。より好ましくは電極は、プラチナまたはその合金から成る。また、好ましくはガラスであるプレート上に、チタンの薄層を設けて、電極とプレートとの接着を向上させることが好ましい。本明細書で説明するとおり、好適な実施形態のシステム、アセンブリ、およびグリッドでは、４相電気信号を使用することが好ましい。したがって、たとえば電極２１２である第１の電極が、電気信号の第１相 N_1 に用いられることが好ましい。同様に、第１の電極に隣接する第２の電極（たとえば電極２１４）は、電気信号の第２相 N_2 に用いられることが好ましい。また、第２の電極に隣接する第３の電極（たとえば電極２１６）は、電気信号の第３相 N_3 に用いられることが好ましい。そして、第３の電極に隣接する第４の電極（たとえば電極２１８）は、電気信号の第４相 N_4 に用いられることが好ましい。本明細書でさらに詳述するとおり、隣接する電極の中心間の距離はピッチと呼ばれ、「 p 」で示される。電極の幅は、「 w 」で示す。隣接する電極同士の対面する側壁または縁部間の距離は、「 s 」で示す。

【００１４】

図４は、好適な両側グリッドアセンブリ３００を示す略図である。アセンブリ３００は、第１プレート３１０と、狭い間隔で平行に設けられた複数の第１電極３１２，３１４，３１６および３１８と、第２プレート３４０と、狭い間隔で平行に設けられた複数の第２電極３４２，３４４，３４６および３４８と、それらの複数の第１および第２電極に電氣的に接続する有効量のゲル３２０とを有する。

【００１５】

図５は、本発明の好適な実施形態のシステムおよび進行波グリッドで使用する、代表的な４相電圧パターンまたは波形を示す。詳細には図５は、各相が９０°ずれた４相電圧波形を表す。各相において生成される各波形は、方形波パルスである。各パルスを、隣接する電極に順次印加する。したがって、第１相 N_1 における第１パルスを、たとえば $T/4$ などの所望期間だけ第１電極に印加する。たとえば時点 $T/4$ などの、その第１パルスを完了した時点で、第２相 N_2 における第２パルスを、好ましくは第１電極に隣接する第２電極に印加する。たとえば時点 $T/2$ などの、第２パルスを完了した時点で、第３相 N_3 における第３パルスを、好ましくは第２電極に隣接する第３電極に印加する。たとえば時点 $3T/4$ などの、第３パルスを完了した時点で、第４相 N_4 における第４パルスを、好ましくは第３電極に隣接する第４電極に印加する。このような一連の順序付けられた順次

電圧パルス印加によって、ゲル内に分散した生体分子が、1つの電極の近辺から他の電極へ「ホップ」する（跳ぶ）。その伝搬の同期的モードを図6に示す。これは、生体分子またはタンパク質が電極から電極へ、パルス列の方向にホップする「ホッピング」モードであると説明できる。誘電空間の横断にかかる通過時間は、 $t_{\text{transit}} = s / \mu E$ によって与えられる。ここで、ピッチは $p = w + s$ であり、 w および s はそれぞれ電極幅および誘電空間である。電界および可動性はそれぞれ、 E および μ である。4相にわたる1周期の期間は $4 * t_{\text{transit}}$ であるため、最大掃引周波数は、 $f < \mu E / 4 s$ によって与えられる。

【0016】

持続的移動を達成するには、タンパク質は、十分な速度（ μE ）および適切な時間（ t_{transit} ）にて誘電空間 s の距離を横断しなければならない。このことはすなわち、持続的移動において、特定の可動性を有するタンパク質には、臨界周波数があることを示す。したがって、最大の運転周波数から開始して、該当の可動性を有するタンパク質が移動し始めるまで、周波数をだんだんと下げてスキャンすればよい。それにより、最速の（分子量が最も小さい）タンパク質から1つずつを、生体分子サンプルから分離することが可能である。

【0017】

下記の表1に、従来のゲル電気泳動と比較した場合の速度の向上を表す。本発明の目的の一つは、ガスを有意に発生させる閾値より低い電圧で運転することである。それは、測定によって検出され理論によって確認された値である、1.5 ~ 2 V未満で運転するということである。最大電圧は、システムパラメータや存在する生体分子などの多数の要因に依存すると理解される。図7は、ガラス電極上にプラチナを用いたシステムにおける、様々な電流および電圧レベルでの加水分解の発生を示す。グリッドにおけるデバイの二層遮蔽（Debye double-layer shielding）を防ぐために、進行波電極は、ゲルおよび緩衝剤中のイオンに直に接触した状態で運転される。加水分解がいくらかは発生し、非ゼロの正味電流が生じる。ゲルの2つの末端部の間に典型的に印加される通常の直流バイアスを用いて、最初にタンパク質をゲル内へ供給し、進行波グリッド上へ移動させることもできる。実際、それらの2つの電極を、ゲルから離れた予備の加水分解電極として機能させてもよく、それらにおいて必要レベルの電気泳動電流が得られる。

【0018】

10

20

30

【表 1】

進行波同期のパラメータ

| PAGE条件：8. 5 cmにわたって200 Vで65分間 有効 $\mu=0.9274 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}$ | | | | | | | | |
|--|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------|-----------|-------------------------------|
| パラメータ セット | p $\mu\text{m}/\text{秒}$ | s $\mu\text{m}/\text{秒}$ | ΔV V | 最大E V/ μm | 最小 t_{transit} 秒 | 最小T 秒 | 最大f Hz | 最大v $\mu\text{m}/\text{秒}$ |
| a | 200 | 100 | 0. 235 | 2. 350 $\times 10^{-3}$ | 9. 1743 | 36. 6972 | 0. 0273 | 21. 8 |
| b | 200 | 100 | 1. 0 | 10. 00 $\times 10^{-3}$ | 2. 1564 | 8. 6254 | 0. 1159 | 92. 75 |
| c | 200 | 100 | 2. 0 | 20. 00 $\times 10^{-3}$ | 1. 0782 | 4. 3127 | 0. 2319 | 185. 5 |
| d | 40 | 30 | 70. 50 $\times 10^{-3}$ | 2. 350 $\times 10^{-3}$ | 1. 8349 | 7. 3394 | 0. 1363 | 21. 8 |
| e | 40 | 30 | 1. 0 | 33. 33 $\times 10^{-3}$ | 0. 1294 | 0. 5176 | 1. 9319 | 309. 10 |

表 1 において、 p は電極グリッドのピッチである。符号 s は、電極間の間隔である。 V は、電極に印加される電気信号の電圧ポテンシャルである。最大 E は、電極に電圧信号を印加した結果生じた、その電極周辺に広がる最大の伝搬電界である。最小 t_{transit} は、1 ピッチの距離を生体分子が移動するのにかかる通過時間である。これは、電気信号の 1 周期の時間の $1/4$ に相当する。最小 T は、電気信号の 1 周期の時間である。最大 f は、電気信号の周波数である。最大 v は、システム内の生体分子の最大伝搬速度である。

【 0 0 2 0 】

表 1 はさらに、進行波グリッドの寸法、電圧バイアス、該当の掃引周波数、および予測理想最大速度の、いくつかの好適な組み合わせを明らかにしている。予測される速度の値は、電界が完全に平坦であるとの仮定に基づくものなので、最大予測値である。実際の速度値は、その $1/2$ から $1/3$ になる。第 1 のパラメータセット a は、Bio-Rad 社製の通常の市販の装置に従うものである。同じ処理時間を達成するには、ピッチが $200\ \mu\text{m}$ の進行波グリッドの場合、 $0.235\ \text{V}$ を、 $0.02373\ \text{Hz}$ 未満の掃引周波数でバイアスしなければならない。しかし、セット b のように電圧を $1\ \text{V}$ に上昇させると、周波数を $0.115\ \text{Hz}$ まで増大でき、最大速度は約 4 倍になる。セット d および e に示すようにより小さいピッチを使用した場合、局所電界がはるかに強くなり、 $1\ \text{V}$ バイアスでは、14 倍の速度まで達成可能である。PAGE は通常は 65 分間かかるので、進行波の使用によって、 $8.5\ \text{cm}$ の基準 2D ゲルにおける処理時間を数分程度までかなり短縮できる。

【 0 0 2 1 】

他の好適な実施形態において本発明は、分散型マルチセグメント進行波グリッドを有するゲル電気泳動システムを提供する。該システムは、生体分子のゲル電気泳動における使用に適したゲル層と、複数の進行波グリッドから成るマルチセグメントシステムと、それらのグリッドに電氣的に接続する電圧制御器とを有する。各グリッドセグメントは、ゲルに接触する状態で、狭い間隔で平行に設けられた複数の電極を含む。電圧制御器は、1 つ以上のグリッドセグメントに、1 つ以上の選択可能な多相電気信号を供給するよう構成される。特に好適な実施形態では、電圧制御器は、第 1 の多相電気信号を少なくとも 1 つのグリッドセグメントに供給し、第 2 の多相電気信号を全てまたはいくつかのみのグリッドセグメントに供給する。さらに別の好適な態様においてシステムは、2 つ、3 つ、またはそれ以上の電圧制御器を有し、それらの電圧制御器は、1 つ以上の特定の多相電気信号を、進行波グリッドの 1 つ以上のグリッドセグメントに供給するよう構成される。

【 0 0 2 2 】

本発明は、タンパク質を集束、分離、および集中させる特定の波形の設計において、革新を図る重大な機会を提供するものである。好適な手法の一つは、各用途別にリコンフィギュア（再構成）するための最大の柔軟性を得られるよう、進行波グリッドのピッチを最小に形成することである。図 8 は、分散型でリコンフィギュア可能かつ再プログラム可能な進行波グリッドを用いた、好適な実施形態のゲル電気泳動システム 400 を示す略図である。詳細には図 8 は、好適なマルチセグメント型進行波グリッドシステムを表す。好適なマルチセグメント型進行波グリッドシステムは、第 1 グリッドセグメント 410 と、第 2 グリッドセグメント 420 と、第 3 グリッドセグメント 430 とを有する。以下から判るとおり各セグメントは、狭い間隔で平行に設けられた複数の電極を含む。両側に設けられた 2 つの連続的パッドが、1 つ以上のバス 440、450、および 460 を介して 4 回路への接続を実現する。システム 400 はさらに、たとえば図 8 に示す制御器 A、B、および C などの、1 つ以上のプログラム可能な電圧制御器を含むことが好ましい。以下から判るとおり制御器は、上述のバスを通じて進行波グリッド（またはそのセグメント）に電氣的に接続する。

【 0 0 2 3 】

好適な実施形態のシステム 400 を使用する際に特に好適な手法の一つでは、制御器 A を用いて、対象のタンパク質を、個々の局所的な進行波グリッドセグメントに移動させた後に、制御器 B や C などを用いて、それらのタンパク質にさらなる処理を施す。各制御器は、別個の PIC 装置であってもよいし、あるいは、事前にプログラムされた複数の指示

10

20

30

40

50

を有する1つのPICであってもよい。運転時にはたとえば以下に説明するとおり、図8の好適な実施形態のシステム400を使用して様々な生体分子を含むサンプルを分離することができる。サンプル470を、グリッドセグメント410上に載置する。サンプルは、領域472に移動し、隣接するグリッドセグメント420上へ移動し続ける。システム400の運転は、グリッドセグメント420上に、生体分子の領域474が形成されるまで継続される。生体分子と、グリッドのパラメータとによっては、領域474を構成する生体分子が、隣接するグリッドセグメント430へさらに移動して、生体分子の領域476を形成する。この手法では一般的に、第1制御器を用いて初期分離を実施し、他の制御器およびグリッドセグメントを用いて二次的精製またはさらなる分離を実施する。二次的精製には、移動後の生体分子をさらに集中させることと、バンドまたはパッチを集束させることとが含まれる。

10

【0024】

さらに別の好適な実施形態において本発明は、サンプルから様々な生体分子を分離する方法を提供する。該方法では、同一平面内に配置された2つの基板の間に位置する、電気泳動に適したゲル層を有する、ゲル電気泳動システムを用いる。システムはさらに、少なくとも第1のグリッドセグメントと第2のグリッドセグメントとを含む進行波グリッドを有する。システムはまた、第1グリッドセグメントおよび第2グリッドセグメントに選択的に接続する電圧制御器を有する。該方法は、生体分子のサンプルをゲル層上に載置する第1ステップを含む。続いて、4相電気信号などの第1の多相電気信号を、第1および第2グリッドセグメントのうち的一方または両方に印加する。それにより、サンプル中の生体分子の少なくとも一部が、ゲル内を移動する。第2の多相電気信号を第1および第2グリッドセグメントのうち的一方または両方に印加することで、生体分子の同じ一部がゲル内をさらに移動するか、あるいは、サンプル中の生体分子の他の一部がゲル内を移動する。適切な多相電気信号を一方または両方のグリッドセグメントに選択的に印加することによって、サンプルを選択的に分析または分離することができる。

20

【0025】

システムにおいて複数の電圧制御器を使用する場合には、該方法ではさらに、追加の制御器によって生成された1つ以上の多相電気信号を、様々なグリッドセグメントに必要に応じて印加することが考えられる。さらに、そのシステムで用いる様々な電圧制御器の各々は、変動または変化する多相電気信号を供給するよう構成されてもよい。その信号における変化には、電圧レベル、周波数、または他の電氣的パラメータの変化が含まれる。また本発明は、電圧制御器と1つ以上の進行波グリッドとの間のインタフェースを変化させることを含む方法を含む。たとえば、1つの多相電気信号をグリッド内の特定の電極アレイに印加することが考えられる。その際、分離工程において所望の段階を達成した後に、その多相電気信号が印加されている電極を変更する。この手法を用いることで、サンプル中の幅広い種類の生体分子を選択的に分析および分離することができる。

30

【0026】

移送速度は、ピッチの縮小に線形比例して増大するので、タンパク質が十分な量にて使用可能であって効率的に供給できれば、極めて迅速な移送が可能になる。図9は、ピッチが200 μm のグリッドと比較すると、ピッチが40 μm の進行波グリッドにおいて、電極間空間にかなりより強い平坦電界が生成されることを示す。すなわち、200 μm のピッチと比較して40 μm のピッチを使用した場合に、同じ電圧(1V)を用いてより強い電界が生成可能である。最適には、電極幅 w を最小にすることで、電極間空間 s における面内電界成分を最大にする。慎重な接続変更、および、適切な接点パッドの浮動状態を用いて、より目が粗い有効ピッチを実現することが可能である。たとえば、各4相グループ内の偶数相を飛ばすことによって、基本の空間ピッチを効果的に2倍にできる。その場合には、奇数パッドのみをアドレスし、偶数パッドは浮動状態にしておく。3グループのセットを考慮した場合には、有効ピッチを3倍にできる。本例では、電極1および4をグループ1、電極3をグループ2、そして電極2をグループ3として、新たな4相回路として駆動する。それ以外の電極は、浮動状態にしておく。寸法に関する最適化を図って、進行

40

50

波グリッドのピッチに適合する最適なゲル厚さを検出する。本発明の範囲には、電極およびグリッド構成の、一連の様々な組み合わせが含まれる。

【 0 0 2 7 】

図 1 0 は、本発明による好適な進行波グリッドにおける、2つの隣接する電極間の電界または等電位線を示すグラフである。図 1 0 は、ピッチ 0 . 2 0 c m にて配置された2つの電極 5 1 2 および 5 1 4 の間の等電位線を表す。ゲルは、厚さが 0 . 1 1 c m である。したがって、図 1 0 に示すシミュレーションから判るとおり、この構成におけるゲル厚さ対ピッチの比率は、約 5 / 8 である。すなわち、最小厚さが 7 5 0 μ m である市販の典型的な規格品のゲルでは厚すぎて、一般的に不適當である。本発明に合わせて、極薄の 1 0 0 μ m のポリアクリルアミドゲルを形成したところ、タンパク質分離において良好に使用できた。対向プレートにバイアス電圧を用いることは、進行波グリッド上へタンパク質を効果的に進行させるのに特に重要である。より強い電界と、それに伴うより速いスピードとを達成するには、より小さいピッチと、それに応じたより薄いゲルとが必要である。薄いゲルは、少量の精製されたタンパク質サンプルについての特定の情報が必要であるという特殊なケースにおいて使用するとよいと推測される。1 0 μ m 程度の構成の場合、スピ

10

【 0 0 2 8 】

本発明の概念の最初の証明は、実験およびモデリングの両方によって達成された。I E F および S D S - P A G E による分離のための粒子モデルを作成し、2セットのサンプルタンパク質の実験室データに照らし合わせて検証した。その2セットのサンプルタンパク質とは、Bio - Rad社の基準タンパク質と、刊行物からの4つの基準タンパク質であった。分子量の関数としての移動距離に関する実験データを用いて有効可動性を抽出し、それをモデルにおいて使用する。そして、進行波フィールドをシミュレートし、可動性モデルに印加して、タンパク質の移動を予測する。図 1 1 は、I E F および S D S - P A G E 後の、2 D 基準ゲルにおけるタンパク質の位置を示す。Bio - Rad社の2 D 基準タンパク質を使用している。実験データは、塗りつぶさずに囲んだ「白」領域で示し、シミュレーション予測は、塗りつぶした領域で示す。移動を表す縦軸においては、比較的密接な相関関係が明白である。横方向の不一致は、ゲルの膨張と、取扱いと、固定化 p H 勾配 (I P G) ストリップにわたる p H 勾配の不均一性との組み合わせに起因すると考えられる。シミュレーションの結果、P A G E 分離では、マイナス電圧と比較すると、プラス電圧のほうがバンド拡大を起こしにくいことが立証された。

20

30

【 0 0 2 9 】

図 1 2 および図 1 3 はそれぞれ、マイナスおよびプラスの進行波電圧を用いた移送モードを表す。詳細には図 1 2 は、マイナス電圧波形によって、4相グループ内の3つの電極から生体分子がはじかれるよう作用させる、分散動作を表す。すなわちこの構成では、生体分子が1つの電極から他の3つへ放出され则认为られる。図 1 3 は、プラス電圧波形によって、生体分子がまずは、4相グループ内の上記電極群へ誘引されるよう作用させる、集束動作を表す。すなわちこの構成では、生体分子が実質的に集められることで、バンド拡大が低減され则认为られる。プラス電圧波形に対するワンステップのホップのほうが短いため、バンド分散が低減され、移送速度が速くなる。集束動作を採用することによ

40

【 0 0 3 0 】

図 1 4 は、無作為抽出のタンパク質が移動方向にホップする際の軌道を示す。図 1 4 および図 1 5 は、ピッチが約 2 0 0 μ m、幅が約 1 0 0 μ m、かつ運転電圧が 1 V の進行波グリッドを有する電極アセンブリに基づく。図 1 5 は、時間を関数としたタンパク質の移動を示す。図 1 5 でもまた、ホッピングのメカニズムが反映されている。図 1 5 の線の傾きは、タンパク質の伝搬速度の度合いを示す。

【 0 0 3 1 】

他の興味深い点は、電極から成る各 4 相グループにおいて、移送の際のタンパク質分布に独特の特徴が見られることである。図 1 6 は、4 相グループ内の2つの隣接電極間を通

50

過するタンパク質群をある時点でとらえたスナップショットを示す。それによれば、タンパク質の空間的分離能（または最小の分解可能な特徴）は、 $n p$ によって与えられ、ここで n は相の数である。したがって、この分離能を向上させるには、相の数を3に減らし、極めて細かいピッチを用いることが考えられる。

【0032】

本明細書で説明する電極および電極グリッドとして、様々な構造、構成、および寸法を用いることが可能であるが、いくつかの代表的な態様は以下のとおりである。電極のピッチは、約600～10 μ mの範囲であると好ましく、約200～40 μ mであるとさらに好ましい。隣接する電極同士の対向する縁部間の間隔は、約300～7.5 μ mであると好ましく、約100～30 μ mであるとさらに好ましい。グリッドおよび電極に印加される好適な電圧レベルは、約5～0.001Vであると好ましく、約2～0.10Vであるとさらに好ましい。電気信号の好適な周波数は、移動される生体分子にもよるが、約0.001～10Hzの範囲の周波数が有用であることが見いだされており、約2～0.020Hzが好適な周波数であると考えられる。

【0033】

数々の市販の電気泳動用機器を、本発明に合致するよう修正または改造することが可能である。

<付記>

（１）請求項7に記載の方法において、前記第1の多相電気信号を印加する工程は、前記第1の信号を前記第1グリッドセグメントおよび前記第2グリッドセグメントの両方に印加することによって実施される、方法。

（２）上記（１）に記載の方法において、前記第2の多相電気信号を印加する工程は、前記第2の信号を前記第2グリッドセグメントに印加することによって実施される、方法。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】本発明による好適なゲル電気泳動システムを示す略図である。

【図2】本発明による他の好適なゲル電気泳動システムを示す略図である。

【図3】本発明による、ゲルを伴う進行波グリッドの好適な片側構成を示す略図である。

【図4】本発明による、ゲルを伴う進行波グリッドの好適な両側構成を示す略図である。

【図5】本発明による好適なシステムおよび進行波グリッドにおいて使用される、代表的な4相進行波電圧パターンを示す図である。

【図6】1つの電極から他の電極への生体分子の移動を示す略図である。

【図7】ガラス電極上にプラチナを用いたシステムにおける加水分解の発生を示すグラフである。

【図8】分散型であってリコンフィギュア可能かつリプログラム可能な進行波グリッドを用いたゲル電気泳動システムの、本発明による好適な実施形態を示す略図である。

【図9】面内電界と電極寸法との関係を示すグラフである。

【図10】本発明による好適な進行波グリッドにおける、2つの隣接する電極間の電位形状を示すグラフである。

【図11】本発明による好適な実施形態のシステムで分離された生体分子の、予測位置と実際位置との比較を示すグラフである。

【図12】本発明によって移動される生体分子の分散動作を示す図である。

【図13】本発明によって移動される生体分子の集束動作を示す図である。

【図14】本発明による好適なゲル電気泳動システムにおける、生体分子の軌跡を示すグラフである。

【図15】図14に示す軌跡を有する生体分子が移動した距離を、時間の関数として示すグラフである。

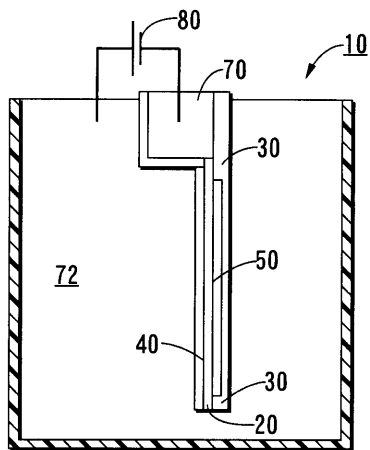
【図16】本発明による進行波グリッドを横断移動する生体分子群を示すグラフである。

【符号の説明】

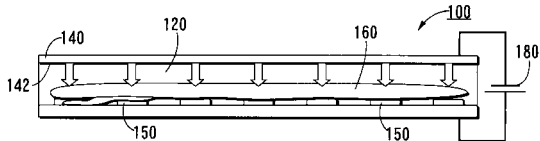
【 0 0 3 5 】

1 0 , 1 0 0 , 4 0 0 電気泳動システム、4 0 , 1 2 0 ゲル層、5 0 , 1 5 0 進行波グリッド、8 0 , 1 8 0 電圧源、3 1 2 , 3 1 4 , 3 1 6 , 3 1 8 , 3 4 2 , 3 4 4 , 3 4 6 , 3 4 8 電極、4 1 0 , 4 2 0 , 4 3 0 進行波グリッドセグメント、4 7 0 生体分子サンプル、A , B , C 電圧制御器。

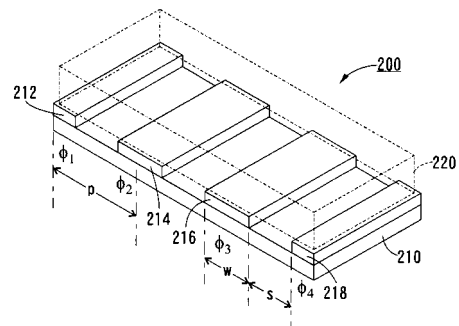
【 図 1 】



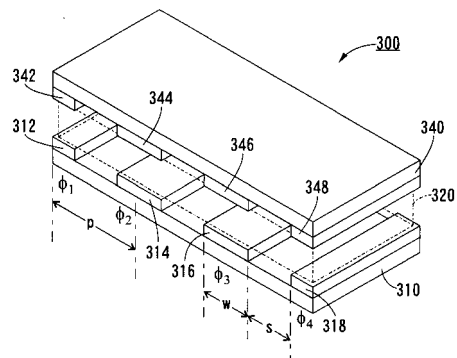
【 図 2 】



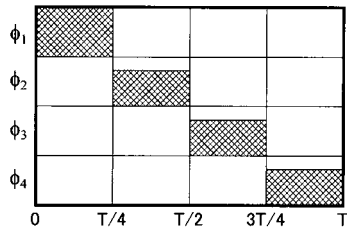
【 図 3 】



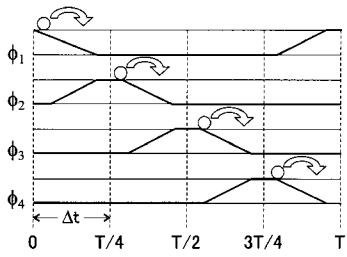
【 図 4 】



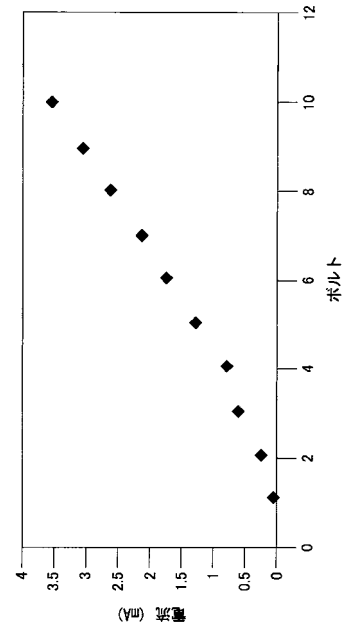
【図 5】



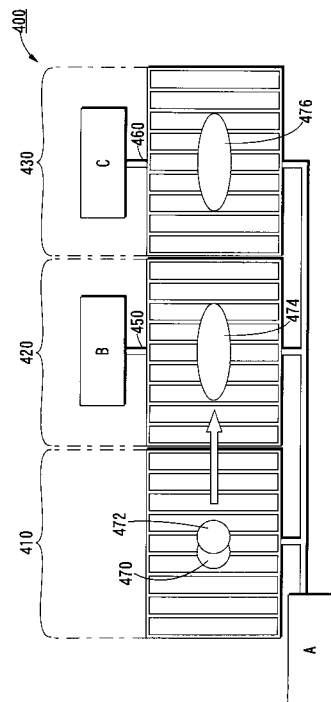
【図 6】



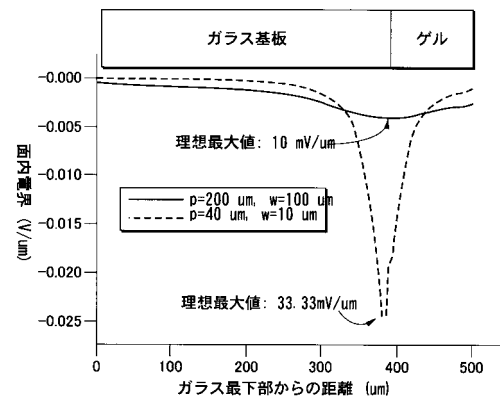
【図 7】



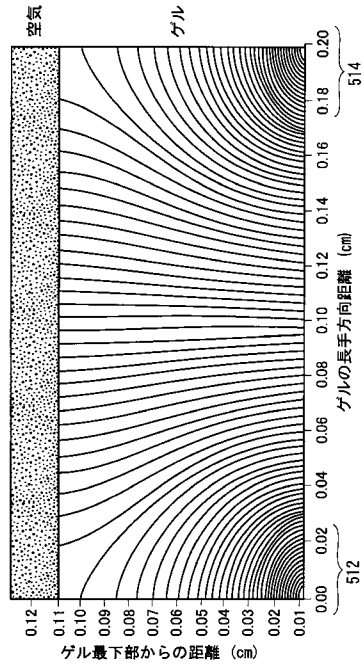
【図 8】



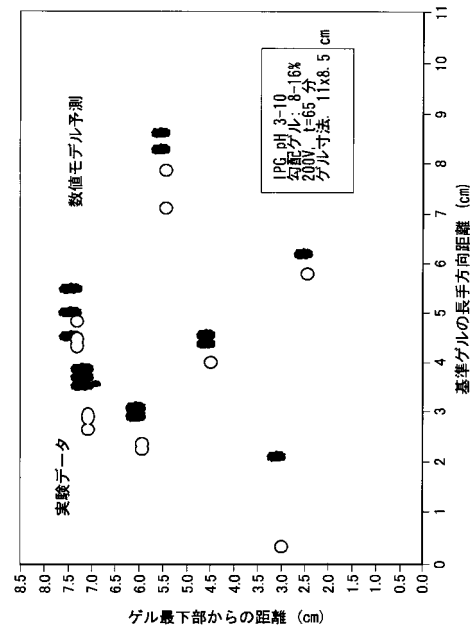
【図 9】



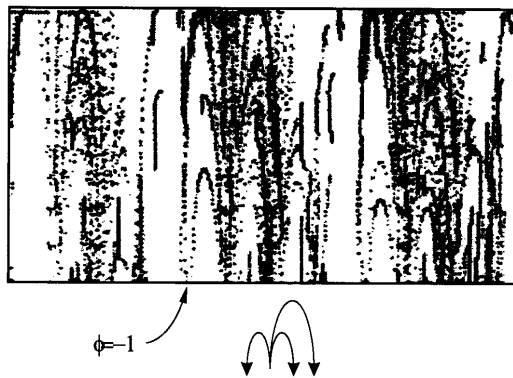
【図 10】



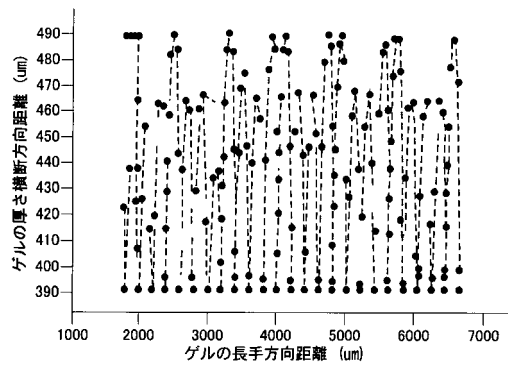
【図 11】



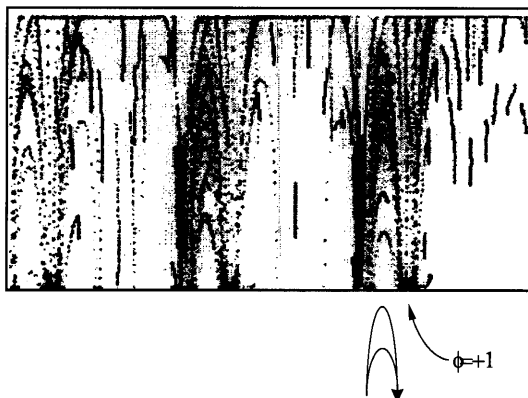
【図 12】



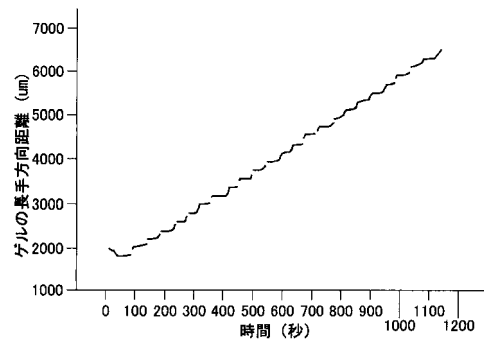
【図 14】



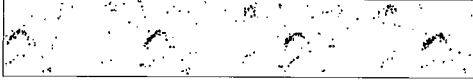
【図 13】



【図 15】



【図 16】



フロントページの続き

- (72)発明者 エイチ ベン シー
アメリカ合衆国 カリフォルニア マウンテン ビュー シャワーズ ドライブ 49 アパート
メント ダブリュ207
- (72)発明者 ジョン エス フィッチ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ロス アルトス エルムハースト ドライブ 1557
- (72)発明者 アーミン アール フォルケル
アメリカ合衆国 カリフォルニア マウンテン ビュー カレン ウェイ 1026
- (72)発明者 ブライアン ティ プリース
アメリカ合衆国 カリフォルニア パロ アルト カウパー ストリート 151
- (72)発明者 スコット エー エルロッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア ラ ホンダ シーニック ドライブ 401
- (72)発明者 リチャード エイチ ブルース
アメリカ合衆国 カリフォルニア ロス アルトス アルフォード アベニュー 1956
- (72)発明者 エリック ピーターズ
アメリカ合衆国 カリフォルニア フレモント ミモザ テラス 34287
- (72)発明者 フランシスコ イー トーレス
アメリカ合衆国 カリフォルニア サン ジョゼ ミーンスター ドライブ 5857
- (72)発明者 マイケル エル チャビニック
アメリカ合衆国 カリフォルニア マウンテン ビュー ブッシュ ストリート 245 アパー
トメント 7

審査官 大竹 秀紀

- (56)参考文献 特表2001-500252(JP,A)
特表2000-507695(JP,A)
特表平08-506179(JP,A)
特表平03-502136(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 27/447