

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年11月27日(27.11.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/189085 A1

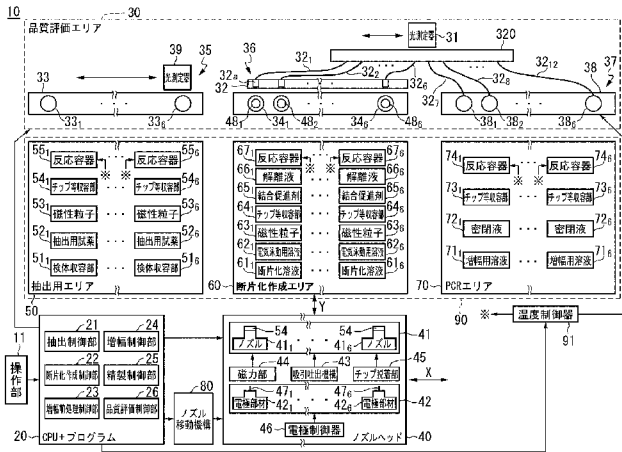
- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/063498
- (22) 国際出願日: 2014年5月21日(21.05.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-107514 2013年5月21日(21.05.2013) JP
- (71) 出願人: ユニバーサル・バイオ・リサーチ株式会社 (UNIVERSAL BIO RESEARCH CO., LTD.) [JP/JP]; 〒2710064 千葉県松戸市上本郷88番地 Chiba (JP).
- (72) 発明者: 田島 秀二(TAJIMA Hideji); 〒2710064 千葉県松戸市上本郷88番地 ユニバーサル・バイオ・リサーチ株式会社内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 土橋 皓(DOBASHI Akira); 〒1050001 東京都港区虎ノ門1丁目16番4号 アーバン虎ノ門ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR PRETREATING SEQUENCER

(54) 発明の名称: シーケンサ前処理装置およびその方法



- 30 Quality evaluation area
- 39, 31 Light measuring instrument
- 55₁, 55₂, 67₁, 67₂, 74₁, 74₂ Reaction container
- 54₁, 54₂, 64₁, 64₂, 73₁, 73₂ Holder for chip and the like
- 53₁, 53₂, 63₁, 63₂ Magnetic particles
- 52₁, 52₂ Extraction reagent
- 51₁, 51₂ Sample holder
- 50 Extraction area
- 66₁, 66₂ Dissociation solution
- 65₁, 65₂ Bonding accelerator
- 62₁, 62₂ Electrophoresis solution
- 61₁, 61₂ Fragmentation solution
- 60 Fragmentation production area
- 72₁, 72₂ Sealing solution
- 71₁, 71₂ Amplification solution
- 70 PCR area
- 11 Operation Section
- 21 Extraction control section
- 22 Fragmentation production control section
- 23 Amplification pretreatment control section
- 24 Amplification control section
- 25 Purification control section
- 26 Quality evaluation control section
- 20 CPU + program
- 80 Nozzle movement mechanism
- 41₁, 41₂ Nozzle
- 44 Magnetic force section
- 43 Suction/ejection mechanism
- 45 Chip detachment section
- 42₁, 42₂ Electrode member
- 48 Electrode control section
- 40 Nozzle head
- 91 Temperature controller

(57) Abstract: The present invention relates to a device and a method for pretreating a sequencer, and addresses the problem of providing a highly reliable pretreatment for analyzing a large-scale nucleotide sequence. A method for pretreating a sequencer comprises: an extraction step of mixing a sample, an extraction reagent solution and a magnetic particle suspension together using a sequencer pretreatment device to extract a nucleic acid, wherein the sequencer pretreatment device is equipped with a suction/ejection mechanism, a nozzle head equipped with a nozzle onto which a dispenser chip is to be mounted in a detachable manner, containers in which various solutions including the magnetic particle suspension are respectively placed, a movement mechanism which can cause the relative movement of the nozzle between the containers, and a magnetic force section which can apply a magnetic field to the inside of the mounted dispenser chip, and wherein the sample, the extraction reagent solution and the magnetic particle suspension are respectively placed in the containers; a fragmentation production step of mixing the nucleic acid with a fragmentation solution placed in some of the containers using the sequencer pretreatment device to fragment the nucleic acid and then producing a fragment having a nucleotide sequence length suitable for the sequencer from the fragmented nucleic acid products using the magnetic particle suspension; and an amplification pretreatment step of dispensing a predetermined volume of a solution containing the produced fragment into each of the reaction containers using the sequencer pretreatment device.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2014/189085 A1



シーケンサ前処理装置及び方法に関し、大規模な塩基配列を解析するための信頼性の高い前処理を提供することを目的とする。吸引吐出機構、分注チップが着脱可能に装着されるノズルを有するノズルヘッド、磁性粒子懸濁液を含む各種液を収容する容器群、ノズルを容器群との間で相対的に移動可能とする移動機構、及び装着された分注チップ内に磁場を及ぼすことが可能な磁力部を有するシーケンサ前処理装置を用いて、容器群に収容された検体、抽出用試薬溶液および磁性粒子懸濁液を混合して、核酸を抽出する抽出工程と、シーケンサ前処理装置を用いて、核酸を容器群に収容された断片化溶液と混合して断片化し、断片化された核酸から磁性粒子懸濁液を用いてシーケンサに応じた塩基配列数の断片を作成する断片化作成工程と、シーケンサ前処理装置を用いて、作成した断片を含有する溶液の所定量を前記反応容器内に分注する増幅前処理工程と、を有するように構成する。

明 細 書

発明の名称：シーケンサ前処理装置およびその方法

技術分野

[0001] 本発明は、シーケンサ前処理装置およびその方法に関するものである。

背景技術

[0002] 核酸（DNA，RNA等）やその断片（オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド等）の塩基配列を決定するために、従来では、しばしばジデオキシ法によるキャピラリーシーケンシングが用いられていた。この方法では、4つの通常のDNA合成系を用意し、そこに低濃度の鎖停止ヌクレオチド（ターミネーター）を加えて反応させるようにしたものである。ターミネーターは4種のジデオキシヌクレオチド（ddATP・ddGTP・ddCTP・ddTTP）のうちそれぞれ1種類だけを用いる。DNAポリメラーゼは鋳型配列に対応するデオキシリボヌクレオチドを取り込みながらDNAを合成していくが、ときどき対応するターミネーターを取り込んで反応がそこで止まってしまうことが起きる。結果的に使ったターミネーターの塩基に対応する様々な長さのDNA断片が生じることになる。例えばターミネーターとしてddATPを加えた系では、生じたDNA断片の3'末端の塩基はアデニンになるという具合である。これによって、最初に単なるDNA合成をする必要がなく、4つの反応系だけできちんと配列が確定できる。この方法では、高い精度が得られるものの、1回の解析でできる解析数など、処理能力に限界があった。

[0003] 現在、シーケンシングの解析処理能力の大幅な向上が図られ、塩基配列数が、メガまたはギガのオーダーの大規模な塩基配列をもつDNAまたはその断片に対して解析処理を行なうことを可能にするDNAシーケンサが登場している（イルミナ社、ロシュ社）。

[0004] この方法では、塩基配列を決定しようとする目的の抽出した核酸またはその断片について、所定の塩基配列数（例えば、数10bから1000b程度）をもつようにほぼ均等な大きさに断片化することが必要となり、さらに、

これらの多数の塩基からなる断片化された断片を、該核酸を鋳型DNAとして、種々の試薬、プライマー、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド及び反応バッファ等とともに反応容器内に、収容して温度制御による増幅を行なうことが前提となる。

[0005] ところが、このような多数の塩基配列の解析を行なう場合には、解析の対象となる核酸について、高精度の増幅処理が求められることになる。特に、目的とする核酸以外の核酸が混じっていたために、増幅することによって誤った結論を導いたり、増幅処理を行なった後に、何回も最初から増幅までの処理を繰り返したり、目的とする核酸の塩基配列を解析するためには、特に核酸またはその断片についての所定塩基配列数に均等に分断させることが、大規模塩基配列の解析の成功に特に必要となる。

[0006] したがって、抽出し、断片化し、さらに増幅した目的核酸や断片が、処理目的に合致しているかどうかを見るには、抽出したり断片化した核酸やその断片から、人手を用いて一部抜き出して、蛍光等で標識化し、電気泳動法を用いて分子量のサイズを監視することは、手間がかかるとともに、クロスコンタミネーションのおそれがあり、また電気泳動の実施に高度の技術を要求されるために、核酸に関する専門の研究者や技術者を必要とするのが現状であり、この分野の専門外の医師等が簡単に臨床応用に用いることができるものではなかった。

[0007] このようなことが、大規模シーケンサを用いた遺伝子解析の汎用化や、病院等における臨床応用の拡大を妨げることになっている。そこで、臨床時等において、クロスコンタミネーションを防止しかつユーザの手間を軽減して、大規模シーケンサに適した増幅処理を可能とする、信頼性の高い高精度の核酸の増幅を行なうことができる高精度な前処理を提供することが重要である。さらに、核酸の抽出から増幅さらには測定までを一貫して自動化する全自動化が必要であるとともに、装置の小型化と、安価で高精度の装置を提供することが重要である。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：特許第2622327号公報
特許文献2：特表2000-511435公報
特許文献3：米国特許5,958,349号公報
特許文献4：特開2002-10777公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] そこで、本発明は以上の問題点を解決するためになされたものであり、第1の目的は、多数の塩基からなる核酸またはその断片の大規模な塩基配列を読み取ることができるシーケンサの前処理として、少なくとも核酸またはその断片の抽出から増幅前処理に至るまでを一貫して自動化し、ユーザの手を経ることなく迅速かつ効率的に処理を実行することができるシーケンサ前処理装置およびその方法を提供することである。
- [0010] 第2の目的は、少なくとも核酸の抽出を含むシーケンサの前処理を手動によらず、一貫して行なうことを可能にすることによって、外部から異物の進入、コンタミネーションを確実に防止し、信頼性が高くかつ高い品質の生成物を得ることができるシーケンサ前処理装置およびその方法を提供することである。
- [0011] 第3の目的は、分注装置を組み込んだ装置を用いることで、装置規模を拡大することなく安価に製造し使用することができるシーケンサ前処理装置およびその方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0012] 第1の発明は、気体の吸引および吐出を行なう吸引吐出機構、該吸引吐出機構と連通し液体の吸引および吐出が可能な1または2以上の分注チップが着脱可能に装着されるノズルを有するノズルヘッド、磁性粒子懸濁液を含む各種液を収容する液収容部および反応容器を少なくとも有する容器群、前記ノズルを容器群との間で相対的に移動可能とする移動機構、および、前記ノズル

ルに装着された分注チップ内に磁場を及ぼすことが可能な磁力部を有するシーケンサ前処理装置を用いて、前記容器群に收容された検体、抽出用試薬溶液および磁性粒子懸濁液を混合して、検体から核酸を抽出する抽出工程と、該シーケンサ前処理装置を用いて、抽出した前記核酸を前記容器群に收容された断片化溶液と混合して断片化し、断片化された前記核酸から磁性粒子懸濁液を用いてシーケンサに応じた所定範囲の塩基配列数をもつ断片を作成する断片化作成工程と、前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記作成した断片を含有する溶液の所定量を、増幅用溶液とともに前記反応容器内に分注する増幅前処理工程と、を有するシーケンサ前処理方法である。

[0013] ここで、前記容器群は、通常ステージ上に設け、前記反応容器、検体、試薬等の液体、を收容する複数の液收容部、および、前記分注チップの他、前記容器群の開口部を被覆するように設けられたフィルムを穿孔するための穿孔用チップ等のチップを收容するチップ收容部を設けることが好ましい。また、容器群には、複数の液收容部としてのウェルがマトリクス状または列（行）状に配列されたマイクロプレートや複数の液收容部としてのウェルが列状に配列されたカートリッジ状容器を含む。

[0014] 前記容器群は、具体的には、少なくとも検体を收容する1または2以上の液收容部、前記検体から核酸を抽出するための抽出用試薬溶液を收容する1または2以上の液收容部、前記断片化溶液を收容する1または2以上の液收容部、各核酸またはその断片と結合可能な磁性粒子を懸濁する磁性粒子懸濁液を收容する1または2以上の液收容部、前記核酸またはその断片と磁性粒子との結合を促進する結合促進剤溶液を收容する1または2以上の液收容部、結合した前記核酸またはその断片と磁性粒子との間の乖離を行なう乖離液を收容する1または2以上の液收容部、増幅用溶液を收容する1または2以上の液收容部、1または2以上の温度制御可能な反応容器、および、1または2以上の分注チップを前記ノズルに装着可能に收容または保持する1または2以上のチップ收容部を有するのが好ましい。また、シーケンサ前処理として増幅までも要求される場合には、増幅工程を必要とし、分子量の合否を判定するには、後述する電

気泳動用溶液を収容する1または2以上の液収容部を必要とする。

[0015] 「磁性粒子懸濁液」とは、核酸またはその断片を捕獲可能となるように加工された磁性粒子を水に懸濁した液であって、例えば、物理的吸着、分子間力、静電気力等によって目的物を捕獲させる場合には、シリカ、ガラスの他、繊維物質のような多孔性物質で被覆したものがある。繊維物質には、例えば、セルロース、ナイロンの他、ポリビニルアルコールやポリエチレングリコール等の親水性高分子等がある。1の磁性粒子のサイズは、例えば、 $0.1\mu\text{m}$ ~ $10\mu\text{m}$ である。より好ましくは、 $0.5\mu\text{m}$ ~ $5\mu\text{m}$ である。

[0016] 共有結合によって目的物を捕獲する場合には、前記磁性粒子の表面に、例えば、ナイロン等で被覆した被覆物質が有するペプチド結合を加水分解することで、生体物質の固定に用いる官能基を生成させる。この場合、生体物質と結合可能な官能基としては、カルボキシル基-COOH、アミノ基-NH₂、チオール基等またはその誘導基による同種官能基同士または異種官能基同士によるものがある。なお、共有結合を行う場合に、架橋剤としてEDCを用いるのが好ましい。

[0017] 水素結合によって目的物を捕獲する場合には、水素原子より電氣的に陰性な原子XとY（窒素、酸素、リン、硫黄、ハロゲン等）を有するような物質で磁性粒子の表面に被覆させて、水素原子を介して結合させる必要がある。また、静電的結合を行うには、イオン結晶物質で磁性粒子を被覆する必要がある。

その他、所定の目的核酸もしくはその断片またはそれらの一部と相補性を有する塩基配列をもつ核酸若しくはその断片を磁性粒子に結合させる場合もある。これらの内の少なくとも2種類の磁性粒子が、組み合わせられて用いられることもある。

[0018] 「増幅用溶液」とは、例えばPCR法による増幅を行なう場合には、増幅対象の鋳型DNA溶液、プライマー溶液、DNAポリメラーゼ溶液、ヌクレオチド溶液、反応バッファ溶液等である。また、標識化のための溶液を含めることもある。

[0019] 「抽出用試薬液」とは、検体に含有する細胞壁等を形成するタンパク質を分解または溶解して核酸またはその断片を細菌や細胞外に流出させて、磁性粒子への結合を促進する溶液であって、例えば、タンパク質分解酵素であるプロテアーゼ、カオトロピックイオン、例えば、グアニジンイオン溶液、尿素イオンまたはヨウ化イオン等、および／または、タンパク質の変性を促す界面活性剤を含有する水溶液と、前記磁性粒子への核酸またはその断片の捕獲を容易化するバッファ液、さらに前記磁性粒子への核酸または核酸の断片の捕獲を促進する結合促進剤との混合溶液である。なお、洗浄液をも含むことがある。

[0020] 前記核酸の抽出を促進するためには、分注チップを用いて前記混合溶液の吸引吐出を繰り返して捕獲させ、さらに磁力部によって磁場を該分注チップ内に及ぼすことでその内壁に磁性粒子を吸着させることによって行なうのが好ましい。

[0021] 核酸の断片化及び断片の作成には、以下に示すように「断片化溶液」の他、「結合促進剤」、および「乖離液」を必要とすることがある。なお、「シーケンサに応じた所定範囲の塩基配列数をもつ」は、DNAまたはその断片に対する遺伝子解析を行うシーケンサの内容に応じて指定された範囲の塩基配列数であって、例えば断片化された断片の全範囲の場合もありうる。塩基配列数の範囲の指定は、例えば、該シーケンサ前処理装置に設けられた後述するCPUを有する情報処理を行う要素（CPU＋プログラム）に対し、データの入力や指示を行う操作部を介して予め設定し又はユーザがその都度行う。「断片化溶液」とは、核酸に対してその切断を行なう化学物質であって、例えば、遷移金属誘導酸化的DNA切断物質を含有する水溶液である。具体的には、遷移金属とは、例えば、銅イオン、鉄イオン、ニッケルイオン等であって、例えば、硫酸銅を用い、還元剤としては、例えば、アスコルビン酸、DTT、メルカプトエタノール等であって、例えば、アスコルビン酸ナトリウムを含有する水溶液を用いる。前者の濃度は、1m mol/L（リットル）～10m mol/Lであり、後者の濃度は、0.1m mol/L～4 m mol/Lである。この

水溶液によって、前記遷移金属、及び還元剤の濃度、数分から数秒の間のインキュベーション（温度の範囲は、4℃～95℃の範囲であれば良い）の時間に応じて、50塩基対（bp）～1000塩基対の範囲で断片化が可能である。すなわち、前記遷移金属または前記還元剤の濃度が高く、かつ、インキュベーション時間が長ければ、断片化が促進されることになる。核酸またはその断片の切断は、還元剤と遷移金属との反応によって、ラジカル（遊離基）を発生させることによって行なわれる。

[0022] 該断片化溶液を用いた切断は、制限酵素を用いた切断に比較して、核酸の塩基配列の特異性を利用するのではないので、均等性が高く、超音波による切断に比較すると、余計なエネルギーがかからないので損傷が少ないことになる。

[0023] 「結合促進剤」とは、磁性粒子への結合を促進する試薬であって、例えば、前記磁性粒子に物理的吸着で前記核酸またはその断片を捕獲させる場合には、例えば、イソプロピルアルコール等のアルコール類またはポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール等の高分子アルコールである。結合した物質の磁性粒子からの乖離や溶出を促進する「乖離液」または溶出液としては、前記磁性粒子に物理的吸着で磁性粒子に捕獲された前記核酸またはその断片を乖離させる場合には水である。なお、イオン結合により捕獲する磁性粒子の場合には、結合促進剤及び乖離液は、所定の塩の水溶液又は所定のpHを持つ水溶液である。

[0024] 断片化された核酸の断片の作成を行なうには、一旦、その断片を、前記分注装置を用いて前記結合促進剤の下で前記シリカ、ガラスまたはセルロース等で被覆された磁性粒子に結合させて捕獲させる。次に、シーケンサに応じた所定範囲の分子量に応じて、前記乖離液である水を加えることによって前記結合促進剤の濃度を低下させることで、前記磁性粒子から前記断片を乖離させる。すると、分子量の小さい断片は、前記磁性粒子に対する結合力が弱いため、最初に乖離される。一方、分子量の大きい断片は、前記磁性粒子に対する結合力が大きいため、前記結合促進剤の濃度が相当下がった段階で乖

離されることになる。このことを利用して、予め分子量の範囲と結合促進剤の濃度とを関係付けておけば、希望する範囲（シーケンサに応じた所定範囲）の分子量（塩基配列数）をもつ断片を作成することができることになる。こうして該当する分子量を持つ乖離した断片は前記磁性粒子の除去後、他の磁性粒子を投入して捕獲させ該磁性粒子を前記磁力部によって前記内壁に吸着させて回収することができることになる。なお、その分子量と濃度との関係例について図7に例示した。「作成」には、「選択」が含まれるが、「選択」を行わずに分離または捕獲等により作成する場合も含まれる。

[0025] 前記「増幅前処理工程」は、反応容器内に、所定の増幅用溶液とともに、前記断片化し、かつ作成された断片を有する溶液を分注する工程であって、これによって、前記作成された断片の両末端にアダプタ（およびプライマ）を結合させることになる。なお、増幅させる量は、PCR用の反応容器内で操作できる量である $10\mu\text{L}$ ～ $200\mu\text{L}$ であり、この量を分注できるような小容量（例えば $100\mu\text{L}$ の容量）の増幅用の分注チップを用いることになる。そのためには、抽出等で用いた分注チップ（例えば、 1mL の容量）を除去して、新たに小容量の増幅用の分注チップを前記ノズルに装着することになる。

[0026] 「着脱可能に装着する」ためには、例えば、前記分注チップを前記ノズルから脱着する脱着機構をノズルヘッドまたは容器群が設けられたステージに設けるのが好ましい。「脱着機構」としては、例えば、前記ノズルの外径よりも大きい、前記分注チップの最も太い部分よりは小さい径をもつ孔、または切欠き部の開いたプレートをノズルヘッドまたはステージに設け、前記各孔を貫通するノズルの軸方向に沿って該プレートを相対的に下降または上昇させることによって、装着した分注チップを脱着させる機構がある。脱着は、例えば、前記プレートをノズルヘッドに設けた場合には、前記吸引吐出機構としてのシリンダ内を摺動するピストンの駆動機構と前記プレートとを連動させることによって行ない、前記プレートをステージに設けた場合には、上下移動機構によってプレートに対してノズルを相対的に上下方向に移動することによって行なう。

[0027] 「ノズルと容器群との間を相対的に移動可能とする」のであるから、容器群を固定してノズルを移動させる場合と、ノズルを固定して容器群を移動させる場合、およびその双方を組み合わせた場合がある。

前記ノズルまたはノズルに装着された分注チップは、前記移動機構によってこれらの容器に到達して、液体の吸引および吐出、または、チップの装着や脱着が可能である。なお、ノズルは、後述する吸引吐出機構と連通し、気体の吸引および吐出がなされる。該「吸引吐出機構」は、例えば、シリンダと、該シリンダ内を摺動するピストンと、該ピストンと連結したナット部と、該ナット部が螺合するボール螺子と、該ボール螺子を正逆両方向に回転駆動するモータとを有するものや、ポンプ機構である。

[0028] 前記反応容器を含む容器や蓋等の材料は、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、アクリル等の樹脂、ガラス、金属、金属化合物等がある。容器のサイズは、例えば、数 μL ～数100 μL の液体を収容可能であるとともに、分注チップの先端が挿入可能な大きさである。例えば、円筒状の場合には、例えば、1の容器の大きさの径が数 mm ～数10 mm 、深さが数 mm ～数10 mm である。

[0029] 「分注チップ」は、例えば、太管と、細管と、該太管と該細管とを連通する移行部とからなり、前記太管には、前記ノズルの下端が挿入されて前記ノズルに装着される装着用開口部を有し、前記細管には、前記吸引吐出機構による気体の吸引吐出によって液体が流入および流出可能な先端口部とを有する。分注チップおよびノズルは、例えば、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエステル、アクリル等の樹脂等の有機物、ガラス、セラミックス、ステンレススチール等の金属、金属化合物、半導体等の無機物によって製造される。

[0030] なお必要ならば、前記シーケンサ前処理装置には、「温度制御器」を設けることがある。該温度制御器は、温度制御の対象となる液体を収容する反応容器内の温度を、外部からの信号等に基づいて上昇または下降が可能な温度源を有するものであり、温度源としては、ブロック状部材に例えば、ペルチ

エ素子、ヒータ、冷却装置等を設けたものである。PCR等の処理を行なうには、温度制御器としては、ペルチェ素子を用いたサーマルサイクラーが好ましい。

[0031] 前記「移動機構」としては、例えば、前記反応容器、すなわち、該反応容器が設けられているステージとノズルとの間を相対的に、ノズルの軸方向および水平面内で移動可能とする機構があり、水平面内の移動としては、例えば、X軸およびY軸に沿ってステージまたはノズルについて、移動を行なうXY軸移動機構またはY軸もしくはX軸のみに沿って移動を行うY(X)軸移動機構があり、ノズルの軸方向の移動としては、前記ノズルをその軸線方向(Z軸方向)に移動させるノズルヘッドに設けた上下移動機構がある。

[0032] なお、シーケンサ前処理方法の前記断片化作成工程は、前記シーケンサに応じた所定範囲に基づいて、対応する結合促進剤の濃度の範囲を定め、少なくとも前記断片化された核酸、前記磁性粒子、前記容器群に収容された前記結合促進剤、および乖離液を混合して、該前記濃度の範囲を有する溶液を作成する選別工程を有することが好ましい。

[0033] すると、該選別工程において、前記濃度に応じた分子量の断片が前記溶液中の前記磁性粒子から乖離されることになる(それ以外の分子量の断片は磁性粒子に結合したままである)。該選別工程では、この乖離した断片を回収するために、さらに、前記ノズルに装着した分注チップ、および該分注チップ内に磁場を及ぼす磁力部を用いて、該磁力部で分注チップ内に磁場を及ぼした状態で、該溶液の吸引吐出を繰り返すことで、磁性粒子を分注チップの内壁に吸着させて除去し、残液内の前記所定範囲の塩基配列数の断片を得る。

[0034] ここで、塩基配列数の範囲と、結合促進剤の濃度の範囲との関係は、結合促進剤の濃度に応じて実験によって予め測定しておく。例えば、図7に、その一例が示されている。該関係に基づいて、少なくとも混合すべき前記断片化された核酸の溶液、前記磁性粒子懸濁液および前記結合促進剤溶液の量および濃度、並びに乖離液を前記濃度の範囲に合致するように、演算等で各混

合比を定めて、その混合比に応じて、前記シーケンサ前処理装置の前記吸引吐出機構及びノズルを有するノズルヘッド、分注チップ、移動機構、温度制御器および／または磁力部を制御して混合させ、かつ乖離した前記所定範囲の断片を得る。

[0035] したがって、この場合には、断片の塩基配列数のシーケンサに応じた所定範囲を指定することで、結合促進剤の濃度の範囲を定め、該当する濃度の混合液を定量的な分注を行うことで達成し、該磁性粒子を磁力部によって前記分注チップの内壁に吸着させることで該磁性粒子を除去し、残液中に断片を乖離させることで、種々のシーケンサに応じて指定された範囲の塩基配列数を持つ断片の作成を、簡単な制御で確実かつ容易に実現することができ、汎用性が高い。

[0036] 第2の発明は、前記反応容器内の温度制御が可能な温度制御器をさらに有する前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記シーケンサ前処理装置の該反応容器を温度制御することによって、前記作成した断片を増幅する増幅工程をさらに有するシーケンサ前処理方法である。

[0037] シーケンサの処理として、増幅工程を含まない場合には、作成した断片を増幅する増幅工程までがシーケンサの前処理に当たることになる。

[0038] 「温度制御」とは、その対象となる液体または容器について、1または2以上の設定された所定温度に、設定された時間維持することを、定められた順序に従って、定められた回数実行することである。前記温度制御器への指示は、プログラムに基づいて該当する信号を送ることによってなされる。

[0039] 「所定温度」とは、対象となる液体等の物が到達すべき目標とする温度であり、例えば、前記液体に含有するDNA等の核酸や核酸の断片であるオリゴヌクレオチド等をPCR法によって増幅する場合には、設定される所定温度としては、例えば、PCR法で行なわれる温度サイクル、すなわち、DNAの変性、アニーリング若しくはハイブリダイゼーション、伸長に各々必要な各温度、約94℃、50℃～60℃の間の温度、例えば、約50℃、および約72℃である。一方、SPLA法による場合には、一定温度、例えば、55℃等に設

定されることになる。

[0040] 第3の発明は、各種チップ内または前記反応容器内の光学的状態を測定する光測定器をさらに有する前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記各工程の少なくとも1において得られた生成物の品質評価を行なう品質評価工程をさらに有するシーケンサ前処理方法である。

[0041] 「各種チップ」には、分注チップの他に、キャピラリー型電気泳動用チップをも含まれる。

「キャピラリー型電気泳動用チップ」とは、ゲルが封入された透光性のある細管と、該細管と連通する太管と、該細管の下端に設けられた流体が進入可能な口部と、前記太管の上端に設けられた開口部とを有するものである。前記太管の開口部は、後述するノズルヘッドの電極支持部材によって装着等によって解除可能に支持可能であるとともに、該開口部から電気泳動溶液（バッファ液）を導入可能である。該太管内に電気泳動溶液を挿入した後に、該チップを該電極支持部材に支持された場合には、該電極支持部材に設けられた第1の電極が前記太管内に挿入されて太管内に收容される電気泳動溶液と接触可能である。一方、前記細管の口部は、第2の電極が設けられ收容される測定対象液と接触可能に設けられた電極付液收容部に挿入されると、前記測定対象液が口部から進入されることになる。第1の電極と第2の電極の間に所定の電圧を印加することによって前記キャピラリー型電気泳動用チップ内に電場を及ぼし、電荷を帯びた核酸または断片が電場から力を受けてゲル中を移動することができる。なお、細管は、例えば、0.05mm～0.5mm、好ましくは0.1mm～0.3mmの内径をもつ細径管であることが好ましい。キャピラリー型電気泳動用チップの支持または装着は、例えば、容器群に收容されたキャピラリー型電気泳動用チップに対して前記ノズルヘッドを下降することによって前記電極支持部材またはキャップを前記開口部に嵌合して装着することによって行なう。分注チップの装着についても同様にしてノズルヘッドを下降することによって前記ノズルを前記分注チップの装着用開口部に嵌合することで装着させる。脱着についても、前記分注チップと同様の形状をもつ

チップ脱着部を用いて脱着することも可能である。なお、前記第1の電極と第2の電極の間に電圧を印加する電源装置が必要である。

[0042] 「品質評価工程」とは、前記抽出工程、断片化作成工程、および増幅前処理工程、または増幅工程からなる基本的工程の各工程の結果生成された生成物の品質の評価を行うための工程であって、これによって、最終的に得られた結果が信頼性の高いものであることを保証し、または、どの工程での処理に誤りがあったかを確認することによって、その原因をより容易に突き止め、処理または工程の結果得られた生成物の品質の向上を図ることができる。

[0043] 品質の評価は、得られた核酸またはその断片の分子量や濃度を評価するために前記シーケンサ前処理装置に備えた光測定器を利用して各種チップまたは反応容器内の光学的状態を測定することによって行なう。例えば、キャピラリー型電気泳動用チップ内で行なわれる電気泳動法による標識化された核酸またはその断片を光測定することによって分子量の範囲を解析し、または吸光度を光測定することでその核酸またはその断片の濃度を測定することである。

[0044] 「光学的状態」には、発光、呈色、変色、変光を含み、「変光」には、光の反射、吸収、散乱を含む。

[0045] 第4の発明は、前記各工程の少なくとも1において、前記シーケンサ前処理装置を用いて前記工程の結果得られた前記生成物を所定の磁性粒子懸濁液と混合し、前記ノズルに装着した分注チップを介して前記混合液の吸引吐出を繰り返すことで前記磁性粒子に捕獲させ、前記磁力部を用いて分注チップの内壁に吸着させることで各工程の処理目的に合致するように核酸またはその断片を精製する工程をさらに有するシーケンサ前処理方法である。

[0046] 精製は、前記基本的工程を達成するためのシーケンサ前処理装置を利用して行われ単に前処理の各工程の繰り返しではなく、各工程とは異なる種類の溶液、異なる磁性粒子、または異なる器具を用いて行うのが好ましい。精製を行なうには、前記溶液は洗浄液、例えば、エタノール等のアルコール類を含有する水溶液が好ましい。

- [0047] 前記核酸若しくはその断片を分注チップの内壁に吸着させたまま、または液中に懸濁した状態で、液の吸引吐出を繰り返すことで、核酸若しくはその断片以外のタンパク質や夾雑物を除去することで行なう。また、増幅前処理工程や増幅工程において、核酸等に結合しなかったプライマー、アダプター等の夾雑物を除去することができる。
- [0048] 第5の発明は、前記品質評価工程として、前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記各工程の少なくとも1において、該工程の結果得られた生成物についてその分子量の評価を行うシーケンサ前処理方法である。
- [0049] 第6の発明によると、前記品質評価工程として、前記各工程の少なくとも1において、前記シーケンサ前処理装置を用いて前記核酸またはその断片の濃度の評価を行なうシーケンサ前処理方法である。
- [0050] 濃度の評価は、前記核酸またはその断片を含有する溶液の吸光度を測定することによって、該核酸またはその断片の濃度が該工程の処理目的に合致するか否かの評価を行う。このように、各工程を実施する該装置を用いて、各工程における不純物の存在について評価することができるので、処理を続行するか否かを早期に定めることによって、処理のやり直し、追加処理または中止を決めることができるので、信頼性の高い処理を高い効率性をもって行なうことが可能である。
- [0051] 本発明によると、抽出工程、断片化作成工程、および増幅前処理工程、または増幅工程の基本的工程を行なうシーケンサ前処理装置に組み込まれた装置を用いて、精製、または、分子量若しくは濃度の判定を簡単、かつ効率的に実行することができるので、品質の評価を処理に容易かつ効率的に反映させることができる。
- [0052] 第7の発明は、前記品質評価工程は、前記容器群にゲルが封入された細管および該細管と連通する太管からなる1または2以上の各キャピラリー型電気泳動用チップが收容され、前記ノズルヘッドには、前記キャピラリー型電気泳動用チップを前記太管側で支持可能であって前記太管に收容される電気泳動用溶液と接触可能な第1の電極が設けられ前記ノズル移動機構により前記

容器群に対してノズルとともに相対的に移動可能な1または2以上の電極支持部材を有し、前記容器群には、収容した液と接触可能に設けられた第2の電極を有する1または2以上の電極付液収容部をさらに有する前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記容器群に設けられた電気泳動用溶液を収容する液収容部から電気泳動用溶液を前記太管内に分注し、該キャピラリー型電気泳動用チップを該太管側において前記電極支持部材に支持させて前記溶液と該電極とを接触させ、各工程の結果得られた生成物を抜き出して前記電極付液収容部に分注し、該生成物を標識化し、該電極付液収容部に前記細管の先端を挿入させ、前記電極を通して電場を前記チップ内に及ぼし、前記細管内を前記光測定器により測定することによって分子量の評価を行なうシーケンサ前処理方法である。

[0053] ここで、「電気泳動用溶液」とは、電気泳動に用いる、アガロースゲルおよび1×TAEバッファ液または1×TBEバッファ液である。また、標識化用試薬液をも含むことがある。「標識化」は、例えば、インターカレータにより、前記断片化された核酸またはその断片を蛍光で標識化する。インターカレータは、SYBR(登録商標)GREEN I、エチジウムブロマイド等の蛍光物質が二本鎖DNAに入り込み蛍光を発する特性を利用したものである。

前記電極間に印加する電圧は、例えば数ボルトから数1000ボルト程度である。

[0054] 各基本的工程を実施する前記シーケンサ前処理装置を用いて、該ノズルヘッドに設けた電極支持部材に、前記容器群に前記電極支持部材に装着可能であるように収容され、前記アガロースゲルが封入された前記キャピラリー型電気泳動用チップを、前記ノズルヘッドの下降移動によって、装着等によって支持して分子量の合否を判定することができるので、次の工程に直ちに適用することができ、効率的かつ迅速に高精度の処理を実行することができることになる。

[0055] 第8の発明は、前記品質評価工程として、前記増幅工程において、前記シーケンサ前処理装置を用いて前記核酸またはその断片に含有させた前記イン

ターナルコントロール用核酸若しくはその断片を測定するインターナルコントロール測定工程を有するシーケンサ前処理方法である。

[0056] ここで、「インターナルコントロール用核酸またはその断片」とは、PCR反応自体の阻害の有無を判断するために添加される核酸またはその断片である。インターナルコントロール核酸またはその断片を添加した場合には、インターナルコントロール核酸またはその断片の増幅が認められればPCR反応が正常であったと判断され、ターゲットおよびインターナルコントロール核酸またはその断片がともに増幅が認められなかった場合には、PCR反応自体に阻害があったものと判断される。

[0057] 第9の発明は、気体の吸引および吐出を行う吸引吐出機構と、該吸引吐出機構と連通し液体の吸引および吐出が可能な分注チップが着脱可能に装着される1または2以上のノズルを有するノズルヘッドと、磁性粒子懸濁液を含む各種液を収容する液収容部および反応容器を少なくとも有する容器群と、前記ノズルと前記容器群との間を相対的に移動可能とする移動機構と、前記ノズルに装着された分注チップに外部から磁場を及ぼしかつ除去することが可能な磁力部とを有するとともに、少なくとも、前記吸引吐出機構、前記移動機構、および前記磁力部を外部信号に基づいて制御する制御部を有し、該制御部は、前記容器群に収容された検体、抽出用試薬液および磁性粒子懸濁液を混合攪拌して、核酸を抽出する抽出制御部と、抽出した前記核酸を前記容器群に収容された断片化溶液と混合して断片化し、断片化された前記核酸から磁性粒子懸濁液を用いてシーケンサに応じた所定範囲の塩基配列数を持つ断片を作成する断片化作成制御部と、前記作成した断片を含有する溶液の所定量を、増幅用溶液とともに前記反応容器内に所定の分注チップで分注して混合するように制御する増幅前処理制御部と、を有するシーケンサ前処理装置である。

[0058] ここで、必要ならば、前記反応容器内の温度制御が可能な温度制御器を設ける。

制御部は、前記シーケンサ前処理装置に内蔵したコンピュータ（CPU）

および該コンピュータを駆動するプログラムからなり、例えば、D/A変換器およびA/D変換器を通して信号を前記吸引吐出機構、前記移動機構、および前記磁力部、または必要ならば温度制御器に対して制御が行われる。

[0059] 抽出制御部は、具体的には、前記検体と前記抽出用試薬溶液と磁性粒子懸濁液とをノズルに装着した分注チップ、吸引吐出機構、移動機構を用いて反応容器内に吸引吐出して混合攪拌し、必要ならば温度制御器を用いて該磁性粒子に検体から得られた核酸を結合させ、前記分注チップ内に前記磁力部によって磁場を及ぼすことによってその内壁に吸着させることで抽出を行なうように制御する。

[0060] 断片化作成制御部は、具体的には、前記抽出された核酸と断片化溶液とを、分注チップを通して吸引吐出機構によって吸引吐出を行なうことで反応容器内で混合させて、必要ならば温度制御器を用いて反応容器内で、所定インキュベーション時間反応させて断片化を行う。インキュベーション時間を長くしまたは断片化溶液の濃度を高くすると、切断箇所が増加し、断片化された分子量をより小さくする。次に、磁性粒子懸濁液と断片とを混合させ、さらに結合促進剤を混合させることで、磁性粒子に実質的に全断片を結合させた後、所定量の乖離液を分注してその結合促進剤の濃度を変化させると、その濃度に応じた塩基配列数の範囲の断片を乖離することができる。結合促進剤の濃度が低くなればなる程、塩基配列数の大きい断片が乖離されることになる。断片化作成制御部は、前述したように、例えば、図7に相当する、結合促進剤の濃度の範囲と核酸の断片の分子量（塩基配列数に対応）の範囲との関係を示すテーブル等のデータを内蔵していることになる。

[0061] 増幅前処理制御部は、前記作成した断片を含有する溶液の所定量、すなわち、PCR反応容器で操作できる量、例えば、総量が $10\mu\text{L}$ ～ $200\mu\text{L}$ となるように反応容器内に分注する。そのためには、いわゆる小容量（例えば、 $5\mu\text{L}$ ～ $500\mu\text{L}$ 、好ましくは $10\mu\text{L}$ ～ $100\mu\text{L}$ ）の容量をもつ分注チップが、ノズルに装着されて用いられることになる。

[0062] 前記容器群は、具体的には、少なくとも検体を収容する液収容部、前記検

体から核酸を抽出するための抽出用試薬溶液を収容する液収容部、抽出した核酸を所定の塩基配列数の範囲となるように断片化するために必要な断片化溶液を収容する液収容部、各核酸またはその断片と結合可能な磁性粒子を懸濁する磁性粒子懸濁液を収容する液収容部、前記核酸またはその断片と磁性粒子との結合を促進する結合促進剤溶液および乖離液を各々収容する液収容部、増幅用溶液を収容する液収容部、温度制御可能な反応容器、および、分注チップを前記ノズルに装着可能に収容または保持するチップ収容部を有するのが好ましい。また、分子量の合否を判定するには、後述する電気泳動用溶液を収容する液収容部を必要とする。

[0063] 2以上のノズルを用いる場合には、各ノズルに対応するように2以上の収容部を有する前記容器群が、1の前記ノズルが進入し他のノズルが進入しないよう各ノズルに対応した2以上の専用領域内に各々配列されることによって、各専用領域を、異なる検体毎に設定することで、クロスコンタミネーションを確実に防止することができる。

[0064] 第10の発明は、前記反応容器内の温度制御が可能な温度制御器をさらに有するとともに、前記制御部には、該反応容器を温度制御することによって、前記作成した断片を増幅する増幅制御部をさらに有するシーケンサ前処理装置である。

[0065] シーケンサの構成として、増幅制御部を含まない場合には、作成した断片を増幅する増幅工程までがシーケンサの前処理に当たることになる。

[0066] なお、前記シーケンサ前処理装置は、前記容器群には前記各種液として、結合促進剤溶液および乖離液が各々収容され、前記断片化作成制御部は、前記シーケンサに応じた塩基配列数の所定範囲に対応する結合促進剤の濃度の範囲に基づいて、前記断片化された核酸、前記磁性粒子、前記結合促進剤、及び乖離液を混合して溶液を作成するように前記吸引吐出機構、前記移動機構、温度制御器および／または前記磁力部を制御する選別制御部を有することが好ましい。

[0067] ここで、塩基配列数の範囲と、結合促進剤の濃度の範囲との関係は、結合

促進剤の濃度に応じて実験によって予め測定しておく。例えば、図7に、その一例が示されている。該断片化作成制御部として、このようなテーブル等からなるデータを、該シーケンサ前処理装置の情報処理を行う要素（CPU＋プログラム）が有するメモリ内に格納しておくことによって、結合促進剤の濃度の範囲が定められる）。すると、少なくとも混合すべき前記断片化された核酸の溶液、前記磁性粒子懸濁液および前記結合促進剤溶液の量および濃度、並びに乖離液を前記濃度の範囲に合致するように、演算等で各混合比を定めて、その混合比に応じて、前記シーケンサ前処理装置の前記吸引吐出機構及びノズルを有するノズルヘッド、移動機構、温度制御器および／または磁力部を制御して混合させ、かつ液中に乖離した前記所定範囲の断片を得る。したがって、種々のシーケンサに応じて指定された範囲の塩基配列数を持つ断片の作成を簡単な制御で確実にかつ容易に実現することができ、汎用性が高い。

[0068] 第11の発明は、前記各種チップ内または前記反応容器内の光学的状態を測定する光測定器をさらに有するとともに、前記制御部は、該光測定器をも外部信号に基づいて制御するとともに、前記各制御部の少なくとも1について、前記制御部の制御の結果得られた生成物の品質の評価を行なう品質評価制御部をさらに有するシーケンサ前処理装置である。

「各種チップ」とは、各種分注チップ（0.5mL～50mLの通常容量の分注チップ、または前記小容量の分注チップ等を含む）または前述したようにキャピラリー型電気泳動用チップである。

[0069] 第12の発明は、前記制御部は、前記核酸またはその断片を含む溶液を前記磁性粒子懸濁液と吸引吐出によって混合攪拌して、前記磁性粒子に目的とする核酸またはその断片を捕獲させ、捕獲した磁性粒子を前記分注チップ内に磁場を及ぼして内壁に吸着させて前記核酸またはその断片を精製するように制御する精製制御部を有するシーケンサ前処理装置である。

[0070] この精製制御部が使用する磁性粒子は、前記抽出制御部、断片化作成制御部、増幅前処理制御部、または増幅制御部が用いる磁性粒子とは異なる磁性

粒子であることが好ましい。その際、例えば、乖離液および結合促進剤の所定割合の溶液や、抽出用試薬溶液、断片化溶液、または洗浄液等とともに吸引吐出するように制御することがある。ここで、洗浄液は、例えば、エタノール等のアルコール類を含有する水溶液が好ましい。

[0071] 第13の発明は、前記容器群に、ゲルが封入された細管および該細管と連通する太管からなる1または2以上のキャピラリー型電気泳動用チップが收容され、前記ノズルヘッドには、前記キャピラリー型電気泳動用チップを前記太管側で支持可能であって前記太管に收容される電気泳動用溶液と接触可能な第1の電極が設けられ前記移動機構により前記容器群に対してノズルとともに相対的に移動可能な1または2以上の電極支持部材を有し、前記容器群には、收容した液と接触可能に設けられた第2の電極を有する1または2以上の電極付液收容部を有するシーケンサ前処理装置である。第1の電極と第2の電極の間には泳動用電源が接続されて、泳動用電圧を印加する。

[0072] 第14の発明は、前記光測定器は、前記容器群内に設けられ透光性を有する1または2以上の液收容部内の吸光度を測定可能に設けられ、前記品質評価制御部は、前記各制御部によって生成された生成物を含む溶液を前記各液收容部に收容して、前記光測定器によって各液收容部の吸光度を測定するシーケンサ前処理装置である。

[0073] 第15の発明は、前記品質評価制御部は、前記容器群に設けられた電気泳動用溶液を收容する液收容部から電気泳動用溶液を前記太管内に分注し、該キャピラリー型電気泳動用チップを該太管側において前記電極支持部材に支持させて前記溶液と該電極とを接触させ、各工程の結果得られた生成物を抜き出して前記電極付液收容部に分注し、該生成物を標識化し、該電極付液收容部に前記細管の先端を挿入させ、前記電極を通して電場を前記チップ内に及ぼし、前記細管内を前記光測定器により測定することによって分子量の評価を行なうように制御するシーケンサ前処理装置である。

[0074] 第16の発明は、前記第1の電極は、前記電極支持部材の電極取付部に電気伝導可能に取り付けられたシーケンサ前処理装置である。

- [0075] 第17の発明は、前記電極支持部材には、該電極支持部材の先端を被覆するキャップを有し、該キャップには、前記電極支持部材の前記第1の電極が貫くように突出するとともに、前記キャピラリー型電気泳動用チップが取り付けられて該チップの開口部を閉塞するシーケンサ前処理装置である。
- [0076] 第18の発明は、1または2以上の前記キャピラリー型電気泳動用チップの前記細管に近接または接触しかつ該細管に沿って移動可能に設けられ、または、1または2以上の透光性を有する反応容器の側面に近接または接触して設けられた1または2以上の先端および後端を有する可撓性のある導光路と、該後端が所定経路に沿って配列された配列体と、該配列体の前記所定経路に沿って相対的に移動可能であって、前記後端と順次光学的に接続可能な光測定器とを有するシーケンサ前処理装置である。
- [0077] 「相対的に移動可能」であるので、前記光測定器が、前記配列体に対して移動する場合と、前記配列体が、前記光測定器に対して移動する場合がある。また、光測定器および配列体が、ステージ上に設けられる場合と、光測定器及び前記配列体が前記ノズルヘッドに設けられる場合がある。
- [0078] 第19の発明は、ゲルが封入された透光性のある細管および該細管と連通する太管からなる1または2以上のキャピラリー型電気泳動用チップと、前記キャピラリー型電気泳動用チップを前記太管側で支持可能であって前記太管に收容される電気泳動用溶液と接触可能な第1の電極が設けられて前記キャピラリー型電気泳動用チップに対して相対的に移動可能な1または2以上の電極支持部材と、收容した液と接触可能に設けられた第2の電極を有する1または2以上の電極付液收容部とを有する電気泳動装置である。

なお、前記細管内の光学的状態を測定する光測定器があることが好ましい。また、前記電極支持部材は、ノズルヘッドにノズルとともに設けられることが好ましい。この発明によれば、キャピラリー型電極泳動チップを前記電極支持部材に対して使い捨てとして用いることができるので、操作が容易であって、クロスコンタミネーションを防止して信頼性が高い。

発明の効果

- [0079] 第1の発明、第2の発明、第9の発明または第10の発明によると、検体からの核酸の断片の抽出、該核酸の断片化およびシーケンサに応じた所定範囲の塩基配列数を持つ断片の作成、および増幅前処理、または増幅処理というシーケンサの前処理を、核酸またはその断片の結合性をもつ同種の磁性粒子、ノズルヘッド、吸引吐出機構、検体および必要な試薬を収容する容器群、移動機構、および磁力部、または温度制御器を用いることによって、装置規模を拡大することなく、効率的かつ容易にシーケンサの前処理を実行することができることになる。
- [0080] 第3の発明または第11の発明によると、磁性粒子を含む前記組合せにさらに光測定器を含めるだけで、前処理の品質の評価の制御をも行うことができる。したがって、装置規模をむやみに拡大することなく、簡単な構成で、信頼性の高いシーケンサの前処理を実行することができることになる。
- [0081] 第4の発明または第12の発明によると、シーケンサの前処理を、前記組み合わせを用いて、磁性粒子に目的の核酸やその断片を結合させた状態で吸引吐出を繰り返すことによって、夾雑物を除去する精製工程を各工程の少なくとも1において実行することによって、簡単かつ容易に前処理全体の信頼性を高めることができることになる。
- [0082] 第5の発明、第7の発明、第13の発明、第15の発明乃至第18の発明によると、磁性粒子を含む前記組合せを用いて、シーケンサの前処理の各工程または制御部で処理された結果生成された核酸またはその断片について、その分子量の評価を行うことによって、その品質を容易かつ簡単に評価して信頼性を高めることができることになる。
- [0083] 第6の発明または第14の発明によると、シーケンサ前処理に関する前記組合せを用いて、核酸またはその断片についての濃度の評価を行なうことによって、夾雑物の存在を各工程の少なくとも1において確認することによって、品質の向上を図り、信頼性を高めることができる。
- [0084] 第8の発明によると、シーケンサの前処理において、インターナルコントロールを測定することによって、PCR反応自体に阻害が生じたか否かの判

定を行うことができるので信頼性を高めることができる。

[0085] 第16の発明によると、検体や抽出された核酸またはその断片と接触する可能性のある電極を前記電極支持部材に対して除去可能に取り付けることによって、ノズルヘッド自体を付け替えることなく、電極だけの付け替えで、クロスコンタミネーションの防止や環境汚染を防止することができる。

[0086] 第17の発明によると、キャップによってキャピラリー型電気泳動用チップを閉塞して電極支持部材について、核酸やその断片との接触を防止して再利用を容易にし、かつクロスコンタミネーションや環境汚染を防止することができる。

[0087] 第18の発明によると、所定間隔に配列されたキャピラリー型電気泳動用チップまたは反応容器と配列体とを可撓性のある導光路を介して光学的に連結している。そのため、光測定器との間で相対的に移動する前記所定経路は、前記所定間隔よりも短い間隔に導光路の後端を集積化して配列することができて光測定器の相対的な移動距離を短縮化することができる。また、分子量の測定と、反応容器内の増幅反応の測定とを同一の光測定器を用いて実行することによって、装置規模を拡大することなく効率的に品質評価を行うことができることになる。

図面の簡単な説明

[0088] [図1]本発明の実施の形態に係るシーケンサ前処理装置を示すブロック図である。

[図2]本発明の実施の形態に係るシーケンサ前処理装置を示す全体斜視図である。

[図3]図2に示すシーケンサ前処理装置のノズルヘッドおよび光測定器の一部を示す部分拡大斜視図である。

[図4]本発明の実施の形態に係るキャピラリー型電気泳動用チップおよび使用状態を示す一部断面斜視図である。

[図5]本発明の実施の形態に係る図2の液収容部および吸光度測定用の光測定器の一部を示す斜視図である。

[図6]本発明の実施の形態に係るPCR用反応容器を示す断面図である。

[図7]本発明の実施の形態に係る断片化作成制御の内容を示す実験結果図である。

[図8]本発明の他の実施の形態に係るノズルヘッド及び光測定器の一部を示す斜視図である。

発明を実施するための形態

[0089] 続いて、図面に基づいて本発明の実施の形態について説明する。なお、この実施の形態は特に指定のない限り本発明を制限するものと解釈してはならない。また、各実施の形態例において同一のものは同一の符号で表わし説明を省略した。

[0090] 図1は、本発明の実施の形態に係るシーケンサ前処理装置10を示すブロック図を示す。

本実施の形態に係るシーケンサ前処理装置10は、気体の吸引および吐出を行なう吸引吐出機構43によって液体の吸引および吐出が可能な複数（本例では、6本）の分注チップ49をその装着用開口部に着脱可能に装着する複数（本例では、6個）のノズル41₁～41₆を有するノズルヘッド40と、磁性粒子懸濁液53、63を含む各種液を収容する液収容部および反応容器を含有する収容部群90と、前記ノズルヘッド40に設けられたノズル41₁～41₆と前記収容部群90との間を相対的に移動可能とするノズル移動機構80と、前記反応容器内の温度制御が可能な温度制御器91と、処理の結果得られた生成物の品質の評価を行なう品質評価エリア30と、前記ノズルヘッド40に設けられ、ノズル41₁～41₆に装着された6本の分注チップ54に外部から磁場を及ぼしかつ除去することが可能な磁力部44と、前記吸引吐出機構、前記ノズル移動機構、および前記磁力部を外部信号によって制御するための情報処理を行うCPU及びプログラム20と、該CPU+プログラム20に対して指示を与え、データの入力を行なう操作部11とを有する。前記ノズル移動機構は、前記移動機構に相当する。また、前記収容部群90と品質評価エリア30とを合わせたものが容器群に相当する。

[0091] 前記ノズルヘッド40は、複数の（この例では6本の）前記ノズル41₁～41₆と、該ノズル41₁～41₆が所定間隔で1列状に配列されたノズル配列基板41と、前記磁力部44と、前記吸引吐出機構43と、前記ノズル41₁～41₆の先端部に装着された分注ノズル41₁～41₆を脱着するチップ脱着部45と、後述するキャピラリー型電気泳動用チップ64₁～64₆をその装着用開口部で装着されることで支持するとともに第1の電極47₁～47₆が先端から突出するように設けられた電極支持部材42₁～42₆と、該電極支持部材42₁～42₆が前記所定間隔で1列状に配列された支持部材配列板42と、前記第1の電極47₁～47₆と、後述する電極付液収容部34₁～34₆に設けられた第2の電極48₁～48₆との間に所定の電圧を印加して電場を発生させるように制御する電極制御器46を有する。

[0092] 前記収容部群90は、検体、検体から核酸を抽出するための抽出用試薬液、磁性粒子懸濁液、分注チップ等を収容する収容部及び反応容器の各々が、前記ノズルヘッド40のノズル41₁～41₆の配列方向（列方向）に沿って所定の列間隔で配列され、全体として行列状に配列されている抽出用エリア50と、抽出された核酸を断片化しかつ断片を作成するための断片化溶液、磁性粒子懸濁液、結合促進剤、乖離液、電気泳動用溶液等、キャピラリー型電気泳動用チップを収容する収容部及び反応容器の各々が、前記ノズルヘッド40の前記列間隔で配列方向に沿って配列され、全体として行列状に配列されている断片化作成エリア60と、断片化された断片の増幅前処理および増幅処理を行なうための増幅用溶液、密閉液、分注チップを収容する収容部及び反応容器の各々が、前記ノズルヘッド40の前記間隔で列方向に沿って配列され、全体として行列状に配列されているPCRエリア70とを有する。

[0093] 前記品質評価エリア30は、核酸またはその断片を含有する溶液の吸光度を測定するための吸光度測定エリア35と、キャピラリー型電気泳動用チップを用いて電気泳動法により核酸またはその断片の分子量の評価を行なうための分子量評価エリア36と、蛍光で標識化され増幅した断片中に含まれる

インターナルコントロール断片の増幅量を測定するインターナルコントロール測定エリア37とを有する。

- [0094] 前記CPU+プログラム20及び操作部11は、各々、情報処理装置の本体と、キーボード、タッチパネル、マウス、および液晶パネル等とに各々相当するものである。CPU+プログラム20は、前記吸引吐出機構43、前記ノズル移動機構80、前記磁力部44、及び温度制御器91に、前記操作部11からの指示によりDA変換器およびAD変換器を通して信号を送受することによって制御が行われるものである。
- [0095] さらに、図1に基づいて、前述した抽出用エリア50、断片化作成エリア60、PCRエリア70、吸光度測定エリア35、分子量評価エリア36、インターナルコントロール測定エリア37、CPU+プログラム20について具体的に説明する。
- [0096] 前記抽出用エリア50は、前記ノズル41₁~41₆の前記列方向に所定の前記列間隔で配列された6種類の検体51を収容する検体収容部51₁~51₆と、前記細胞を破壊して核酸を引き出すタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）、カオトロピックイオン溶液、ポリエチレングリコール等の磁性粒子に対する結合促進剤等からなる前記抽出用試薬液52を収容する抽出用試薬収容部52₁~52₆と、前記列方向に沿って前記列間隔で配列されたセルロースで被覆された磁性粒子が懸濁する磁性粒子懸濁液53を収容する磁性粒子懸濁液収容部53₁~53₆と、前記列方向に沿って前記列間隔で配列された前記ノズル41₁~41₆に装着可能となるように装着用開口部を上側にして収容された1mLの容量をもつ分注チップ54及びプレパックされたウェルのシールを穿孔するための穿孔用チップを収容するチップ等収容部54₁~54₆と、前記温度制御器91により温度制御可能であって、前記列方向に沿って前記列間隔で配列された透光性を持つ反応容器55₁~55₆とを有する。その他、エタノール等のアルコール類を有する洗浄液を同様に液収容部に収容して配列することが好ましい。前記抽出用試薬液52は、酵素等の各成分を別々に液収容部に収容しておき使用直前に抽出用試薬収容部で混合すること

がある。

[0097] 前記断片化作成エリア60には、核酸を断片化するための、例えば、硫酸銅及びアスコルビン酸ナトリウム水溶液からなる前記断片化溶液61を収容する断片化溶液収容部61₁~61₆と、電気泳動用溶液62を収容する電気泳動用溶液収容部62₁~62₆と、核酸の断片の中からシーケンサに応じた所定範囲（いわば、ユーザの希望する範囲）の塩基配列数の断片と結合するために用いる磁性粒子懸濁液63を収容する磁性粒子懸濁液収容部63₁~63₆と、前記キャピラリー型電気泳動用チップ64および分注チップ等を収容するチップ等収容部64₁~64₆と、前記磁性粒子への結合を促進するための、例えば、ポリエチレングリコール等の結合促進剤溶液65を収容する結合促進剤溶液収容部65₁~65₆と、例えば、水からなる乖離液66を収容する乖離液収容部66₁~66₆と、反応容器67₁~67₆とを有する。

[0098] 前記PCRエリア70には、プライマー溶液、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド溶液等からなる増幅用溶液71を収容する増幅用溶液収容部71₁~71₆と、反応容器密閉用の密閉液72を収容する密閉液収容部72₁~72₆と、小容量（例えば、100 μ L）の分注チップ73を収容する分注チップ等収容部73₁~73₆と、前記温度制御器91によって温度制御がなされる10 μ L程度の容量を持つ反応容器74₁~74₆とを有する。密閉液としては、例えば、ミネラルオイル、シリコンオイル等であり、「ミネラルオイル」とは石油由来のオイルであり、「シリコンオイル」とは、シロキサン結合が2000以下の直鎖構造の分子からなるオイル状物質である。なお、抽出用エリア50、断片化作成エリア60、およびPCRエリア70の液収容部の容量は、200 μ L~2mL程度が好ましい。

[0099] 前記品質評価エリア30の前記吸光度測定エリア35は、透光性をもつ液収容部33₁~33₆を有し、これらの液収容部33₁~33₆が前記列方向に前記所定間隔で、例えば、配列基板33上に配列され、各液収容部33₁~33₆に収容された液体の吸光度（OD値）を測定するように前記各液収容部33₁~33₆の側面近傍を通過するように移動可能な光測定器39が設けられ

ている。

[0100] 前記分子量評価エリア36には、前記第2の電極48₁~48₆が各底部に收容された液体と接触可能となるように各々設けられた透光性のある電極付液收容部34₁~34₆を有し、これらの電極付液收容部34₁~34₆が前記所定間隔で前記列方向に沿って、例えば、配列基板34に一系列に配列されている。

[0101] 該電極付液收容部34₁~34₆に前記キャピラリー型電気泳動用チップ64の先端が挿入された使用状態において、該電気泳動チップ64の軸方向に沿って、上下に移動可能に設けられた一端の測定端32_{1a}~32_{6a}及び他端の接続端を有する光ファイバからなる導光路32₁~32₆と、該測定端32_{1a}~32_{6a}を前記列方向に沿って前記所定間隔で配列し上下移動可能に支持する測定端配列体32と、前記接続端が前記所定間隔よりも短い間隔で配列された接続端配列体320と、配列された該接続端と順次光学的に接続して受光及び発光を行うように該接続端配列体320に沿って移動可能に設けられた光測定器31を有する。

[0102] 前記インターナルコントロール測定エリア37には、透光性のあるPCR増幅用の反応容器38₁~38₆が前記温度制御器91によって温度制御可能な温度制御ブロックによって囲まれ、該温度制御ブロックと接触するようにして前記列方向に沿って前記所定間隔で配列基板38に一系列に配列されている。

[0103] また、前記反応容器38₁~38₆に接触または近接して設けられた一端の測定端および他端の接続端を有する光ファイバからなる導光路32₇~32₁₂を有し、前記接続端は前記接続端配列体320に前述した複数（この例では6個）の接続端とともに、前記所定間隔よりも短い間隔で一系列に配列されて、合計12個の接続端は、前記光測定器31によって、順次光学的に接続されている。

[0104] 前記CPU+プログラム20は、前記抽出用エリア50に收容された検体51、抽出用試薬液52および磁性粒子懸濁液53を混合攪拌して核酸を抽

出する抽出制御部 21 と、抽出した前記核酸を、前記断片化作成エリア 60 に收容された断片化溶液 61 と混合して断片化し、磁性粒子懸濁液 63 を用いて、シーケンサに応じた所定範囲の塩基配列数をもつ断片を作成する断片化作成制御部 22 と、前記作成した断片を含有する溶液の所定量を、PCR エリア 70 に收容された増幅用溶液 71 とともに前記反応容器 74₁～74₆ に、前記ノズル 41₁～41₆ に該当する小容量（例えば、10 μ L のオーダー）の分注チップ 73 に付け替えることで分注して混合するように制御する増幅前処理制御部 23 と、前記反応容器 74₁～74₆ 内を前記温度制御器 91 によって温度制御することによって増幅させる増幅制御部 24 と、各制御部の制御によって得られた前記生成物を、所定の磁性粒子懸濁液 53、63 と混合し、前記ノズル 41₁～41₆ に装着した新たな分注チップ 54 を用いて分注チップの内壁に吸着させることで各処理目的に合致するように核酸またはその断片を精製する精製制御部 25 と、前記キャピラリー型電気泳動用チップ内または前記反応容器内の光学的状態を測定する光測定器を用いて、前記各制御部の少なくとも 1 について、該制御部による制御の結果得られた生成物の品質の評価を行なう品質評価制御部 26 とを有する。前記断片化作成制御部 22 は、前記選別制御部を有する。

[0105] 図 2 は、図 1 に示した本発明の実施の形態に係るシーケンサ前処理装置 10 の全体斜視図である。

本実施の形態に係るシーケンサ前処理装置 10 は、例えば、長さが 600mm（X 軸方向）、奥行きが 600mm（Y 軸方向）、高さが 500mm（Z 軸方向）程度の前面が取り外し可能な扉 13 が取り付けられ上面が天板 14 で覆われた筐体 12 に囲まれている。該筐体 12 内には、前述したように、該天板 14 にノズル移動機構 80 を介して吊り下げられるように設けられた前記ノズルヘッド 40、ステージ 15 には、前記容器群としての品質評価エリア 30 および收容部群 90 にそれぞれ属する吸光度測定エリア 35、分子量評価エリア 36、インターナルコントロール測定エリア 37、および、前記收容部群 90 に属する前記抽出用エリア 50、前記断片化作成エリア 60 および前記 PC

Rエリア70が設けられている。なお、前記操作部11およびCPU+プログラム20についても、該筐体12の側壁及びその内部に組み込まれている。

[0106] 前記抽出用エリア50には、6本のカートリッジ容器56をY軸方向に沿って並列に設けたものであって、隣接するカートリッジ容器56間には、分注チップの吸引吐出や移動の際の液の飛散による混入を防止するための隔壁16が設けられている。各カートリッジ容器56の12個の各ウェルやホールは、前述した検体収容部、抽出用試薬収容部、磁性粒子懸濁液収容部、チップ等収容部、および反応容器等に対応するものである。

[0107] 前記断片化作成エリア60は、断片化エリア60aと、作成エリア60bとからなり、断片化エリア60aには反応容器を含む6本のY軸方向に沿って並列に設けられたカートリッジ容器68を有し、作成エリア60bには、磁性粒子懸濁液収容部を含む6本のカートリッジ容器69がY軸方向に沿って並列に設けられている。前記カートリッジ容器68の各ウェルまたはホールは、前述した断片化溶液収容部、反応容器、キャピラリー型電気泳動用チップを収容するチップ等収容部、および電気泳動用溶液収容部に対応し、前記カートリッジ容器69の各ウェルまたはホールは、結合促進剤溶液収容部、乖離液収容部、前記分注チップを収容するチップ等収容部、および磁性粒子懸濁液収容部に対応するものである。前記カートリッジ容器68には、分子量評価のための断片を標識化する蛍光標識化溶液収容部をも有する。

[0108] 抽出用エリア50と同様に、隣接するカートリッジ容器68間には隔壁17が設けられ、隣接するカートリッジ容器69間には、隔壁18が設けられている。

[0109] 前記PCRエリア70は、6本の並列に設けられたカートリッジ容器75が並列に設けられたものであって、該カートリッジ容器75の各ウェルまたはホールは、前述した増幅用溶液収容部、密閉液収容部、小容量の分注チップを収容するチップ等収容部、PCRの増幅が可能な反応容器に対応するものである。また、隣接するカートリッジ容器75間には隔壁19が設けられて

いる。

[0110] 図2に示した本実施の形態に係るシーケンサ前処理装置10では、前記ステージ15上には、さらに、各患者から採取した親検体を収容する6本の親検体収容部57と、最終的に生成された生成物を収容し、シーケンサに移送されるべき6本の最終生成物収容部77と、分注チップ、穿孔用チップを収容するチップ収容部76とを有する。

[0111] 以上説明した前記カートリッジ容器56、68、69、75のウェルの容積は、例えば、200 μ L程度であり、反応容器は10 μ L~1mL程度であり、親検体を収容する容器56、最終生成物等を収容する容器56、77は2mL程度である。

[0112] 図2において、前記ノズルヘッド40の各ノズル41₁~41₆には、細管54a及び太管54bからなる分注チップ54が、太管54b側で装着されている。ノズル41₁~41₆は、ノズル配列基板41に一列状に配列されている。ノズル配列基板41の上側には、前記吸引吐出機構43としての6本のシリンダが設けられたシリンダ収納部を有している。該シリンダ内にはピストンが設けられ、ピストンを駆動するモータ、及び該モータによって回転可能に取り付けられたボール螺子が設けられている。符号42は、チップ脱着部45としての、ノズル41₁~41₆に装着した分注チップ54をノズル41₁~41₆から脱着させるための前記ノズル41₁~41₆の径よりも大きく前記チップの最も太い部分の外径よりも細いU字形の切り欠きが形成されたチップ脱着板である。該チップ脱着板は前記ピストンを駆動するモータによって駆動される。

[0113] 該ノズルヘッド40には、前記ノズル41₁~41₆に装着された分注チップ54の細管54aに対して磁力を及ぼしかつ除去することが可能となるように前記各細管54aに対して接離可能に設けた各磁石44aを有する磁力部44が設けられている。

[0114] 前記ノズルヘッド40の、前記磁力部44、吸引吐出機構43、チップ脱着部45、電極制御器は、X、Y軸方向に移動可能なヘッド基部に能けられ

、前記ノズル配列基板41と支持部材配列板42については前記ヘッド基部に対してZ軸方向に移動可能とするZ軸移動体に設けられている。

[0115] ノズル移動機構80は、前記容器群に相当する前記抽出用エリア50等の収容部群及び前記品質評価エリアに相当する吸光度測定エリア35、分子量評価エリア36、インターナルコントロール測定エリア37に対して、前記ヘッド基部をX、Y軸方向に移動可能とするX軸移動機構及びY軸移動機構を有し、かつ、前記Z軸移動体をZ軸方向に移動させる前記Z軸移動機構を有する。

[0116] X軸移動機構およびY軸移動機構は、例えば、前記ステージと連結して設けられたX軸モータによって回転駆動されX軸方向に延びるボール螺子等によってX軸方向に移動可能なX軸移動体と、該X軸移動体と連結し、X軸移動体に設けられたY軸モータによって回転駆動するY軸方向に延びボール螺子等によってY軸方向に移動可能に設けられ前記ヘッド基部と連結したY軸移動体とを有する。Z軸移動体は、前記ヘッド基部に設けられたZ軸モータと、該Z軸モータによって回転駆動されるボール螺子と、該ボール螺子と螺合し該ボール螺子の回転によって回転駆動されるナット部に連結して設けられている。

[0117] 図3は、本発明の実施の形態に係る前記ノズルヘッド40のノズル配列基板41と支持部材配列板42を示すものであり、各々ノズル41₁~41₆と、電極支持部材42₁~42₆がX軸方向に沿って、一列状に配列されている。該電極支持部材42₁~42₆が前記分子量評価エリア36の導光路32₁~32₆の一端にある測定端32₁aから32₆aに近接するようにノズルヘッド40が、前記ノズル移動機構80によって移動した状態を示す。符号42₁aは、前記電極支持部材42₁に取り付けられかつピン状の電極47₁が下端を貫いているキャップを示す。キャップ42₁a~42₆aには、前記キャピラリー型電気泳動用チップ64が装着されることになる。

[0118] 前記導光路32₁~32₆の一端は前記電極支持部材42₁に取り付けられ他前記キャピラリー型電気泳動用チップ64の細管に接近して位置するととも

にZ軸方向に移動可能に設けられた測定端 $32_1a \sim 32_6a$ であり、該導光路 $32_1 \sim 32_6$ は、2つの導光路 $320_1b \sim 320_6b$ 、 $320_1c \sim 320_6c$ からなっており、各導光路の他端の2つの接続端の組が前記接続端配列体 320 に前記電極支持部材 $42_1 \sim 42_6$ の所定間隔よりも短い間隔で列状に配列される。この導光路 320_1b は前記光測定器 31 の発生する蛍光励起用のトリガーを前記キャピラリー型電気泳動用チップに照射させるためのものであり、導光路 320_1c は前記キャピラリー型電気泳動用チップ内で発する蛍光を前記光測定器 31 に組み込まれたフォトセンサに伝達して電気信号に変換するためのものである。

[0119] 図4は、本発明の実施の形態に係る前記キャピラリー型電気泳動用チップ 64 、及び前記電極支持部材を示すものである。

電極支持部材 42_1 は、その先端部をキャップ 42_1a が装着され、該キャップ 42_1a の下端をピン状の第1の電極 47_1 が貫いている。該第1の電極 47_1 は、電極合体端子 42_1b を介して前記電極支持部材 42_1 に着脱可能に取り付けられている。

[0120] 前記キャピラリー型電気泳動用チップ 64 は、細管 $64a$ と、該細管 $64a$ と連通し該細管 $64a$ よりも太く形成されている太管 $64b$ とからなる。細管 $64a$ と太管 $64b$ とは好ましくは別体に形成され、細管 $64a$ の上端は前記太管 $64b$ の下端の嵌合部 $64d$ において、嵌合して取り付けられている。前記細管 $64a$ 内には、電気泳動のためのアガロースゲル $64c$ が封入され、前記太管 $64b$ には、使用時には、電気泳動用溶液 62 であるバッファ液が収容され、測定対象溶液、すなわち、測定対象の断片を含有する溶液、が前記電極付液収容部 34_1 内に収容され、前記細管 $64a$ の下端の口部 $64e$ が電極付液収容部 34_1 内に挿入される。前記第1の電極 47_1 は前記電気泳動用溶液 62 に漬けられ、前記第2の電極 48_1 は前記測定対象溶液に漬けられることになる。その後、前記第1の電極 47_1 と第2の電極 48_1 との間に所定の電圧を印加することで、電気泳動が行われることになる。

[0121] また、電気導光路 $32_1 \sim 32_6$ の測定端 $32_1a \sim 32_6a$ は、案内用シャ

フト32₁d~32₆dに沿って上下方向（Z軸方向）に前記細管64aに沿って移動可能に設けられている。これによって、蛍光で標識化された断片の位置を測定することによって、対象溶液に含有される断片の分子量を測定することができる。

[0122] 図5は、図2に示した前記抽出用エリア50とは異なる実施の形態に係る抽出用エリア150を示すものである。但し、移動可能な光測定器39と異なり、固定された光測定器139を用い、光測定器139と光学的に接続された導光路139b、139cの先端の照射端139a及び受光端139dを間隔を空けて対向するように配置した測定端139eが前記透光性をもつ液収容部33₁~33₆の側面を前記照射端と受光端が挟むように移動するものである。

[0123] 図5の例では、前記液収容部33₁~33₆は、前記抽出用エリア150の各検体収容部51₁~51₆、52₁~52₆、…と同一のカートリッジ容器156₁~156₆内に設けられている点でも図2の場合とは相違する。

[0124] 図6は、前記インターナルコントロール測定エリア37の各反応容器38₁~38₆内での蛍光を前記光測定器31で測定する場合の導光路32₇~32₁₂の先端の測定端としての照射端32₇aと受光端32₇dおよびこれらと前記光測定器31とを光学的に連結する照射用導光路32₇b、受光用導光路32₇cを示すものであり、図6(a)は、前記配列基板38に前記温度制御器91によって制御される温度制御ブロック91aが設けられている場合を示し、図6(b)は、温度制御ブロックが設けられていない場合を示す。符号38₁aは該反応容器38₁~38₆を密閉する密閉蓋を示す。符号91bは前記温度制御ブロック91aを前記温度制御器91と電氣的に接続するための導線である。

[0125] 続いて、本実施の形態に係るシーケンサ前処理装置または方法の動作について説明する。使用者により前記操作部11により指示を与えることにより、前記容器群の内、抽出用エリア50に収容された6人の患者から採取されて6個の親検体収容部57に収容された痰等を希釈させた検体溶液を、前記チッ

プ等収容部 5 4₁～5 4₆に収容された分注チップ 5 4 を前記ノズルヘッド 4 0 のノズルに装着させて、前記抽出用エリア 5 0 の所定の反応容器 5 5₁～5 5₆に収容し、該分注チップを換えて、前記抽出用試薬収容部 5 2₁～5 2₆、磁性粒子懸濁液収容部 5 3₁～5 3₆から順次必要な試薬を所定量、例えば、磁性粒子懸濁液の量は0.5mL～1mL程度を前記反応容器 5 5₁～5 5₆内に分注して、前記吸引吐出機構 4 3 を用いて混合攪拌して反応させ、細胞を破壊して目的とする核酸を水溶液中に溶け出させ、前記磁性粒子に捕獲させる。次に磁力部により磁場を前記分注チップ内部に及ぼした状態で、吸引吐出を繰り返して、分注チップ 5 4 の内壁に磁性粒子を吸着させ、残液を吐出し、該磁力部 4 4 により分注チップ 5 4 内部に磁場を及ぼした状態で、乖離液を吸引吐出することで、核酸の溶液を得ることで、核酸を抽出する。以上が抽出工程に相当する。

[0126] 得られた前記核酸は、前記分注チップ 5 4 内に吸引された状態で前記ノズルヘッド 4 0 を X 軸方向に移動することで、該断片化作成エリア 6 0 の反応容器 6 7₁～6 7₆内に吐出する。

[0127] 該反応容器 6 7₁～6 7₆には、該断片化作成エリア 6 0 の前記断片化溶液収容部 6 1₁～6 1₆に収容されている断片化溶液 6 1 が収容されており、前記分注チップを用いて前記反応容器 6 7₁～6 7₆内に分注して、前記核酸含有溶液と前記分注チップ 5 4 を用いて吸引吐出を繰り返すことで反応させる。断片化の程度は、該反応容器 6 7₁～6 7₆内のインキュベーションの時間及び前記断片化溶液の濃度に依存するものである。なお、インキュベーションの温度は室温であり、大気圧中で行われる。シーケンサが要求する断片化の程度に応じて、インキュベーション時間（例えば、「分」のオーダー）及び前記断片化溶液 6 1 の濃度を設定することになる。

[0128] 前記インキュベーションの時間が終了した後、前記分注チップ 5 4 をノズル 4 1₁～4 1₆に装着したノズルヘッド 4 0 を Y 軸方向に移動することによって、前記断片化された核酸による各種断片を含有する該溶液が収容されている前記反応容器 6 7₁～6 7₆に対して、前記磁性粒子懸濁液 6 3 を前記分

注チップ54内に吸引し、前記反応容器67₁～67₆内に分注する。分注した後、前記吸引吐出機構43によって吸引吐出を繰り返すことで、前記磁性粒子に前記核酸の断片化の結果得た各種断片を結合させて捕獲する。

[0129] 次に、前記分注チップ54内部に磁場を及ぼした状態で、前記断片を捕獲した前記磁性粒子が懸濁された液を吸引吐出を繰り返すことで、前記内壁に磁性粒子を吸着させた状態で反応容器67₁～67₆内にまで移動して、該分注チップ54の内部の磁場を除去して吸引吐出を繰り返すことで該磁性粒子懸濁液を吐出して收容する。次に、該分注チップ54を用いて前記結合促進剤溶液收容部65₁～65₆に收容された結合促進剤溶液65の所定量と、前記乖離液收容部66₁～66₆に收容されている乖離液66を前記分注チップ54を用いて前記反応容器67₁～67₆内に前記ノズルヘッド40を用いてY軸方向に移動させて、分注し、吸引吐出を繰り返すことでこれらの液を混合させる。

[0130] すると、図7の左側の表に示すように、結合促進剤の平均濃度が全溶液の例えば9.75%である場合には、152bpの分子量をもつ断片が前記磁性粒子から乖離して得られることになり、以下、同様に結合促進剤の平均濃度が低くなると、次第に大きな分子量を持つ断片が磁性粒子から乖離して得られることになる。前記磁性粒子懸濁液の分注からここまでは選別工程に相当する。

右側のグラフは、蛍光で標識化された断片を、前記表に記載された10の濃度の場合について、電気泳動法により乖離した断片の量を測定した実験結果を示すものである（Series 1では、結合促進剤濃度が10～7.5%の場合の乖離液の量を順次変更して、乖離した断片を回収しながら順次得られた一連の実験結果であり、Series 2では、結合促進剤濃度が7.5～5%となるように乖離液の量を順次変更して乖離した断片を回収しながら順次得られたSeries 1とは異なる溶液を用いた一連の実験結果を表す）。このグラフに示すように、前記表に記載された10の濃度の順（a～j）に対応する、10個の正規分布のグラフが得られ、各ピークの位置（a～j）が前記磁性粒子からの乖離によって得られる表に記載された各分子量に対応することが明瞭に示されている

。なお、グラフの横軸は、泳動時間すなわち泳動距離を表すものであって、分子量の大きさに対応している。

[0131] 次に、前記ノズルヘッド40のノズル41₁~41₆から、前記分注チップ54を除去して、代わりに、小容量の分注チップ73を装着し、前記ノズルヘッド40を前記PCRエリア70の前記チップ等収容部73₁~73₆にまで移動させ、Z軸方向に下降させることで前記小容量分注チップ73をノズルに装着させる。前記抽出工程後、前記選別工程を含め、以上が断片化作成工程に相当する。

[0132] 次に、該ノズルヘッド40を断片化作成エリア60の作成された前記断片が含有されている溶液の所定量が収容されている前記反応容器67₁~67₆にまで移動させて、前記反応容器67₁~67₆から、作成された前記断片が含有されている溶液を、前記PCR用の反応容器74₁~74₆の容量20 μ Lに収容可能な量を吸引して、該反応容器内に分注する。同様に前記分注チップ73を用いて前記増幅用溶液を該反応容器に分注して混合させる。以上が増幅前工程に相当する。

[0133] シーケンサが断片の増幅工程を含む場合には、この得られた溶液が前処理としての最終生成物ということになり、前記最終生成物収容部77に収容されることになる。一方、シーケンサが断片の増幅工程を含まない場合には、以下の増幅前工程によって得られた生成物が最終生成物ということになる。増幅工程は、前記反応容器74₁~74₆内にさらに前記分注チップ73を用いて、前記密閉液収容部72₁~72₆から前記密閉液を前記反応容器74₁~74₆内に分注した後、前記温度制御器91により増幅に必要な所定の温度制御を行なう。

[0134] 前記各工程の少なくとも1において、前記シーケンサ前処理装置10の前記ノズル41₁~41₆に装着した前記分注チップ54を用いて、前記工程の結果得られた前記生成物を前記磁性粒子懸濁液53と混合し、分注チップを介して前記混合液の吸引吐出を繰り返すことで前記磁性粒子に捕獲させ、前記磁力部44を用いて分注チップ54の内壁に吸着させることで各工程の処

理目的に合致するように核酸またはその断片を精製する工程をさらに有することがある。

[0135] また、前記品質評価工程として、前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記各工程の少なくとも1において、該工程の結果得られた生成物についてその分子量の評価を行うことがある。

[0136] 例えば、前記品質評価工程は、前記断片化作成エリア60内に、アガロースゲルが封入された細管64aおよび該細管64aと連通する太管64bからなる1または2以上のキャピラリー型電気泳動用チップ64を有し、前記ノズルヘッド40には、前記キャピラリー型電気泳動用チップ64を前記太管64b側で装着することで支持可能であって第1の電極47₁～47₆が設けられ前記ノズル移動機構80により前記容器群の断片化作成エリア60等に対してノズル41₁～41₆とともに相対的に移動可能な1または2以上の電極支持部材42₁～42₆を有する。

[0137] また、前記容器群の前記品質評価エリア30の前記分子量評価エリア36には、収容すべき液と接触可能に設けられた第2の電極48₁～48₆を有する複数（この例では6個）の電極付液収容部34₁～34₆を有する。操作部11からの指示があると、前記ノズルヘッド40は、前記ノズル41₁～41₆に前記分注チップ54を装着して、前記電極付液収容部34₁～34₆内に、分子量の評価をしようとする前記断片を含有する溶液を前記反応容器67₁～67₆から抜き出して分注する。前記溶液にインターカレータを分注して、前記断片を蛍光で標識化する。

[0138] 次に、分注チップ54を用いて前記断片化作成エリア60の前記電気泳動用溶液収容部62₁～62₆に収容されている電気泳動用溶液62を吸引して、前記ノズルヘッド40によって移動させて前記チップ等収容部64₁～64₆に収容されている6本のキャピラリー型電気泳動用チップ64の前記太管64b内に分注する。

[0139] 次に、前記分注チップ54を前記ノズルヘッド40をY軸方向に移動させることで前記チップ等収容部64₁～64₆の空き収容部において前記チップ

脱着部45を用いて脱着させる。その後、該ノズルヘッド40を移動させて、前記キャピラリー型電気泳動用チップ64の上方に位置させ、Z軸方向に沿って下降させることで前記キャピラリー型電気泳動用チップ64の太管64bを前記電極支持部材42₁~42₆の前記キャップ42_{1a}~42_{6a}の上側で装着により取り付けすることで、前記電極47₁~47₆は前記電気泳動用溶液62と接触することになる。

[0140] キャピラリー型電気泳動用チップ64が前記電極支持部材42₁~42₆に装着されたノズルヘッド40を前記分子量評価エリア36にまで移動し、前記電極付液収容部34₁から34₆内の前記溶液内に前記キャピラリー型電気泳動用チップ64の前記細管64aの先端の口部64eを挿入させる。この状態で、所定の電圧を前記第1の電極47₁~47₆と、前記第2の電極48₁~48₆の間に印加して電場を及ぼすことで、前記断片の電気泳動を行なわせる。所定時間後に前記測定端32_{1a}~32_{6a}を前記細管64aに沿って上下方向に移動させることで走査して、標識化された断片の蛍光を測定することによって、断片の分子量を判断する。

[0141] 本シーケンサ前処理装置10は、前記品質評価制御部26として、前記増幅工程において目的とする断片に挿入させた特定の塩基配列をもち、該塩基配列と結合する標識化したプライマーを用いて標識化される前記インターナルコントロール用断片を測定するインターナルコントロール測定制御部を有する。また、目的の断片については、標識化しないかまたは前記インターカレタによって標識化することで、該インターナルコントロール測定制御部は、前記インターナルコントロール断片、および、目的の断片の増幅結果の測定を行なう。

[0142] そのため、特定の塩基配列を有するインターナルコントロール用核酸またはその断片を挿入させた目的の核酸を前記断片化して得られた溶液から、前記磁性粒子懸濁液を用いて作成した断片を含有する溶液を前記断片化作成エリア60の所定液収容部に収容しておく。前記ノズルヘッド40の各ノズル41₁~41₆に小容量の分注チップ73を装着させて、前記液収容部から前

記断片が含有された溶液を所定量（10 μ L）PCR用の反応容器38₁～38₆に分注し、前記インターナルコントロール用核酸の特定の塩基配列と結合可能なプライマーを予め標識化した溶液を含有する前記増幅用溶液71を該反応容器38₁～38₆に分注し、温度制御器91を用いて温度制御により増幅を行なう。

[0143] そして、光測定器31を前記接続端配列体320に沿って移動させ、前記導光路32₇～32₁₂を介して励起光を照射しかつ蛍光を受光することによって、インターナルコントロール断片の測定を行なうことになる。

[0144] シーケンサ前処理装置10は、前記品質評価制御部26として、前記抽出工程の結果得られた生成物の吸光度を測定することで、目的の核酸の濃度を測定する。

前記操作部11より指示があると、前記ノズルヘッド40が前記抽出用エリア50の前記チップ等収容部54₁～54₆から分注チップ54をノズル41₁～41₆に装着し、前記反応容器55₁～55₆にまで移動して、抽出された核酸を含有する溶液の一部を吸引して、前記吸光度測定エリア35の前記透光性のある液収容部33₁～33₆に分注する。前記各液収容部33₁～33₆に収容された溶液に対して特定の波長の光、例えば、260nm、280nm、または200nmから可視光の範囲の波長、さらには、190nm～800nmの波長の光を照射してその吸光度を測定することで、断片の濃度を測定することができる。

[0145] 図5には、照射端139aと受光端139dを対向するように設けて、これらを移動させることで、該液収容部33₁～33₆を順次該照射端139aと受光端139dで挟むようにして、測定し導光路139b、139cを通して得られたデータから前記ステージに固定された光測定器139によって該各液収容部を透過する光の量の強度を測定することで吸光度を測定する。

[0146] 図8は、図3に対応する本発明の他の実施の形態に係る光測定器131aを示すものである。3台の3種類の波長の異なる蛍光に対応する光測定器131aをノズルヘッド140に固定して設けたものであり、励起光を照射する発光部131bと蛍光を受光する受光端131cとを有する。一方、導光

路132₁~132₆は、各々励起光照射用と蛍光受光用の2つの導光路132_{1b}~132_{6b}、132_{1c}~132_{6c}を有し、励起光照射用導光路132_{1b}~132_{6b}の後端の接続端が前記発光部131bと光学的に接続可能であり、蛍光受光用導光路132_{1c}~132_{6c}の後端の接続端が前記受光端131cと光学的に接続可能となるように接続端配列体1320が前記光測定器131aに対して移動可能に設けられている。なお、励起光照射用導光路132_{1b}~132_{6b}の先端（照射端）と蛍光受光用導光路132_{1c}~132_{6c}の先端（受光端）は、束ねられて測定端132_{1a}~132_{6a}として、前記各電極支持部材の下方に近接するようにかつ上下方向に移動可能に設けられている。また、前記接続端配列体の導光路132₇~132₁₂については、各照射用導光路132_{7b}~132_{12b}は前記反応容器38₁~38₆の側面に先端（照射端132_{7a}~132_{12a}）が設けられ、各受光用導光路132_{7c}~132_{12c}の先端（受光端132_{7d}~132_{12d}）は、前記反応容器38₁~38₆の底面に接するよう設けられている。

[0147] 以上の実施の形態例は、本発明をより良く理解させるために具体的に説明したものであって、別形態を制限するものではない。したがって、発明の主旨を変更しない範囲で変更可能である。例えば、ノズル、分注チップ、キャピラリー型電気泳動用チップ、容器群、収容部群、品質評価エリア、光測定器、測定端、吸引吐出機構、移動機構、磁力部、温度制御器、反応容器、密閉蓋、密閉液、抽出用試薬液、断片化溶液、結合促進剤、磁性粒子、増幅用溶液等の構成、形状、材料、配列、量、個数、および、使用した試薬、検体等についても実施の形態例に示した例に限られるものではない。また、ノズルをステージに対して移動させるようにしたが、ステージをノズルに対して移動させることも可能である。

[0148] また、本発明の各実施の形態例で説明した、前記部品またはこれらの部品を形成する部品は適宜を選んで適宜な変更を加えて相互に組み合わせることができる。

産業上の利用可能性

[0149] 本発明は、例えば、主としてDNA、RNA、mRNA、rRNA、tRNAを含む核酸についての処理、検査、解析が要求される分野、例えば、工業分野、食品、農産、水産加工等の農業分野、薬品分野、製剤分野、衛生、保険、疾病、遺伝等の医療分野、生化学若しくは生物学等の理学分野等に関係するものである。本発明は、特に、大規模シーケンサの前処理に用いることができる。

符号の説明

[0150] 10	シーケンサ前処理装置
20	CPU+プログラム
30	品質評価エリア
31、131	光測定器
32 ₁ ~32 ₁₂ 、132 ₁ ~132 ₁₂	導光路
32 _{1b} ~32 _{12b} 、132 _{1b} ~132 _{12b} 、	
32 _{1c} ~32 _{12c} 、132 _{1c} ~132 _{12c}	導光路
35	吸光度測定エリア
36	分子量評価エリア
37	インターナルコントロー
ル測定エリア	
40、140	ノズルヘッド
41	ノズル配列基板
41 ₁ ~41 ₆	ノズル
42	電極支持部材配列板
42 ₁ ~42 ₆	電極支持部材
50、150	抽出用エリア
53、63	磁性粒子懸濁液
54	分注チップ
55 ₁ ~55 ₆ 、67 ₁ ~67 ₆ 、74 ₁ ~74 ₆	反応容器
60	断片化作成エリア

6 1	断片化溶液
6 1 ₁ ~ 6 1 ₆	断片化溶液収容部
6 4	キャピラリー型電気泳動
用チップ	
6 5	結合促進剤溶液
6 5 ₁ ~ 6 5 ₆	結合促進剤溶液収容部
7 0	PCRエリア
7 3	小容量分注チップ
9 0	収容部群

請求の範囲

[請求項1] 気体の吸引および吐出を行なう吸引吐出機構、該吸引吐出機構と連通し液体の吸引および吐出が可能な1または2以上の分注チップが着脱可能に装着されるノズルを有するノズルヘッド、磁性粒子懸濁液を含む各種液を収容する液収容部および反応容器を少なくとも有する容器群、前記ノズルを容器群との間で相対的に移動可能とする移動機構、および、前記ノズルに装着された分注チップ内に磁場を及ぼすことが可能な磁力部を有するシーケンサ前処理装置を用いて、前記容器群に収容された検体、抽出用試薬溶液および磁性粒子懸濁液を混合して、検体から核酸を抽出する抽出工程と、

該シーケンサ前処理装置を用いて、抽出した前記核酸を前記容器群に収容された断片化溶液と混合して断片化し、断片化された前記核酸から磁性粒子懸濁液を用いて、シーケンサに応じた所定範囲の塩基配列数をもつ断片を作成する断片化作成工程と、

前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記作成した断片を含有する溶液の所定量を、増幅用溶液とともに前記反応容器内に分注する増幅前処理工程と、を有するシーケンサ前処理方法。

[請求項2] 前記反応容器内の温度制御が可能な温度制御器をさらに有する前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記シーケンサ前処理装置の該反応容器を温度制御することによって、前記作成した断片を増幅する増幅工程をさらに有する請求項1に記載のシーケンサ前処理方法。

[請求項3] 各種チップ内または前記反応容器内の光学的状態を測定する光測定器をさらに有する前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記各工程の少なくとも1において得られた生成物の品質評価を行なう品質評価工程をさらに有する請求項1または請求項2に記載のシーケンサ前処理方法。

[請求項4] 前記各工程の少なくとも1において、前記シーケンサ前処理装置を用いて前記工程の結果得られた前記生成物を所定の磁性粒子懸濁液と

混合し、前記ノズルに装着した分注チップを介して前記混合液の吸引吐出を繰り返すことで前記磁性粒子に捕獲させ、前記磁力部を用いて分注チップの内壁に吸着させることで各工程の処理目的に合致するように核酸またはその断片を精製する工程をさらに有する請求項1乃至請求項2に記載のシーケンサ前処理方法。

[請求項5] 前記品質評価工程として、前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記各工程の少なくとも1において、該工程の結果得られた生成物についてその分子量の評価を行う請求項3に記載のシーケンサ前処理方法。

[請求項6] 前記品質評価工程として、前記各工程の少なくとも1において、前記シーケンサ前処理装置を用いて前記核酸またはその断片の濃度の評価を行なう請求項3乃至ないし請求項5に記載のシーケンサ前処理方法。

[請求項7] 前記品質評価工程は、前記容器群にゲルが封入された細管および該細管と連通する太管からなる1または2以上のキャピラリー型電気泳動用チップが收容され、前記ノズルヘッドには、前記キャピラリー型電気泳動用チップを前記太管側で支持可能であって前記太管に收容される電気泳動用溶液と接触可能な第1の電極が設けられ前記ノズル移動機構により前記容器群に対してノズルとともに相対的に移動可能な1または2以上の電極支持部材を有し、前記容器群には、收容した液と接触可能に設けられた第2の電極を有する1または2以上の電極付液收容部をさらに有する前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記容器群に設けられた電気泳動用溶液を收容する液收容部から電気泳動用溶液を前記太管内に分注し、該キャピラリー型電気泳動用チップを該太管側において前記電極支持部材に支持させて前記電気泳動用溶液と該電極とを接触させ、各工程の結果得られた生成物を抜き出して前記電極付液收容部に分注し、該生成物を標識化し、該電極付液收容部に前記細管の先端を挿入させ、前記電極を通して電場を前記チップ内に及ぼ

し、前記細管内を前記光測定器により測定することによって分子量の評価を行なう請求項5に記載のシーケンサ前処理方法。

[請求項8] 前記品質評価工程として、前記増幅工程において、前記シーケンサ前処理装置を用いて前記核酸またはその断片に含有させた前記インターナルコントロール用核酸若しくはその断片を測定するインターナルコントロール測定工程を有する請求項2乃至請求項7のいずれかに記載のシーケンサ前処理方法。

[請求項9] 気体の吸引および吐出を行う吸引吐出機構と、該吸引吐出機構と連通し液体の吸引および吐出が可能な分注チップが着脱可能に装着される1または2以上のノズルを有するノズルヘッドと、磁性粒子懸濁液を含む各種液を収容する液収容部および反応容器を少なくとも有する容器群と、前記ノズルと前記容器群との間を相対的に移動可能とする移動機構と、前記ノズルに装着された分注チップに外部から磁場を及ぼしかつ除去することが可能な磁力部とを有するとともに、

少なくとも、前記吸引吐出機構、前記移動機構、および前記磁力部を外部信号に基づいて制御する制御部を有し、該制御部は、前記容器群に収容された検体、抽出用試薬溶液および磁性粒子懸濁液を混合攪拌して、核酸を抽出する抽出制御部と、抽出した前記核酸を前記容器群に収容された断片化溶液と混合して断片化し、断片化された前記核酸から磁性粒子懸濁液を用いてシーケンサに応じた所定範囲の塩基配列数を持つ断片を作成する断片化作成制御部と、前記作成された断片を含有する溶液の所定量を、増幅用溶液とともに前記反応容器内に所定の分注チップで分注して混合するように制御する増幅前処理制御部と、を有するシーケンサ前処理装置。

[請求項10] 前記反応容器内の温度制御が可能な温度制御器をさらに有するとともに、前記制御部には、該反応容器を温度制御することによって、前記作成した断片を増幅する増幅制御部をさらに有する請求項9に記載のシーケンサ前処理装置。

- [請求項11] 前記各種チップ内または前記反応容器内の光学的状態を測定する光測定器をさらに有するとともに、前記制御部は、該光測定器をも外部信号に基づいて制御するとともに、前記各制御部の少なくとも1について、前記制御部の制御の結果得られた生成物の品質の評価を行なう品質評価制御部をさらに有する請求項9又は請求項10に記載のシーケンサ前処理装置。
- [請求項12] 前記制御部は、前記核酸またはその断片を含む溶液を前記磁性粒子懸濁液と吸引吐出によって混合攪拌して、前記磁性粒子に目的とする核酸またはその断片を捕獲させ捕獲した磁性粒子を前記分注チップ内に磁場を及ぼして内壁に吸着させて前記核酸またはその断片を精製するように制御する精製制御部を有する請求項9又は請求項10に記載のシーケンサ前処理装置。
- [請求項13] 前記容器群に、ゲルが封入された透光性のある細管および該細管と連通する太管からなる1または2以上のキャピラリー型電気泳動用チップが收容され、前記ノズルヘッドには、前記キャピラリー型電気泳動用チップを前記太管側で支持可能であって前記太管に收容される電気泳動用溶液と接触可能な第1の電極が設けられ前記移動機構により前記容器群に対してノズルとともに相対的に移動可能な1または2以上の電極支持部材を有し、前記容器群には、收容した液と接触可能に設けられた第2の電極を有する1または2以上の電極付液收容部を有する請求項9又は請求項12に記載の核酸シーケンサ前処理装置
- [請求項14] 前記光測定器は、前記容器群内に設けられ透光性を有する1または2以上の液收容部内の吸光度を測定可能に設けられ、前記品質評価制御部は、前記各制御部によって生成された生成物を含む溶液を前記各液收容部に收容して、前記光測定器によって、各液收容部の吸光度を測定する請求項9乃至請求項13のいずれかに記載の核酸シーケンサ前処理装置。
- [請求項15] 前記品質評価制御部は、前記容器群に設けられた電気泳動用溶液を

収容する液収容部から電気泳動用溶液を前記太管内に分注し、該キャピラリー型電気泳動用チップを該太管側において前記電極支持部材に支持させて前記溶液と該電極とを接触させ、各工程の結果得られた生成物を抜き出して前記電極付液収容部に分注し、該生成物を標識化し、該電極付液収容部に前記細管の先端を挿入させ、前記電極を通して電場を前記チップ内に及ぼし、前記細管内を前記光測定器により測定することによって分子量の評価を行なうように制御する請求項13に記載のシーケンサ前処理装置。

[請求項16] 前記第1の電極は、前記電極支持部材の電極取付部に電気伝導可能に取り付けられた請求項13又は請求項15に記載のシーケンサ前処理装置

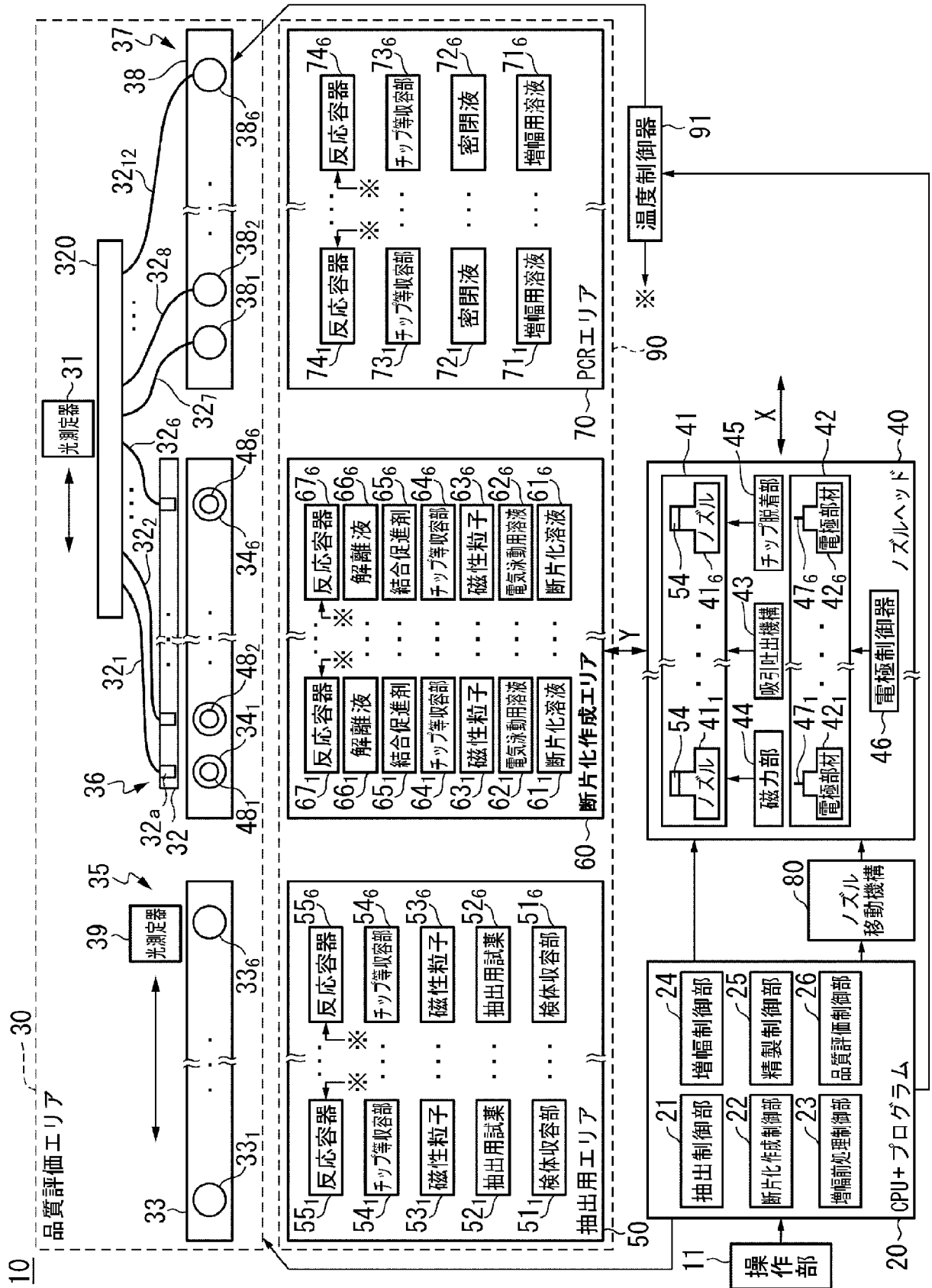
[請求項17] 前記電極支持部材には、該電極支持部材の先端を被覆するキャップを有し、該キャップには、前記電極支持部材の前記第1の電極が貫くように突出するとともに、前記キャピラリー型電気泳動用チップが取り付けられて該チップの開口部を閉塞する請求項11乃至請求項14いずれかに記載のシーケンサ前処理装置。

[請求項18] 1または2以上の前記キャピラリー型電気泳動用チップの前記細管に近接または接触しかつ該細管に沿って移動可能に設けられ、または、1または2以上の透光性を有する反応容器の側面に近接または接触して設けられた1または2以上の先端および後端を有する可撓性のある導光路と、該後端が所定経路に沿って配列された配列体と、該配列体の前記所定経路に沿って相対的に移動可能であって、前記後端と順次光学的に接続可能な光測定器とを有する請求項9乃至請求項17のいずれかに記載のシーケンサ前処理装置。

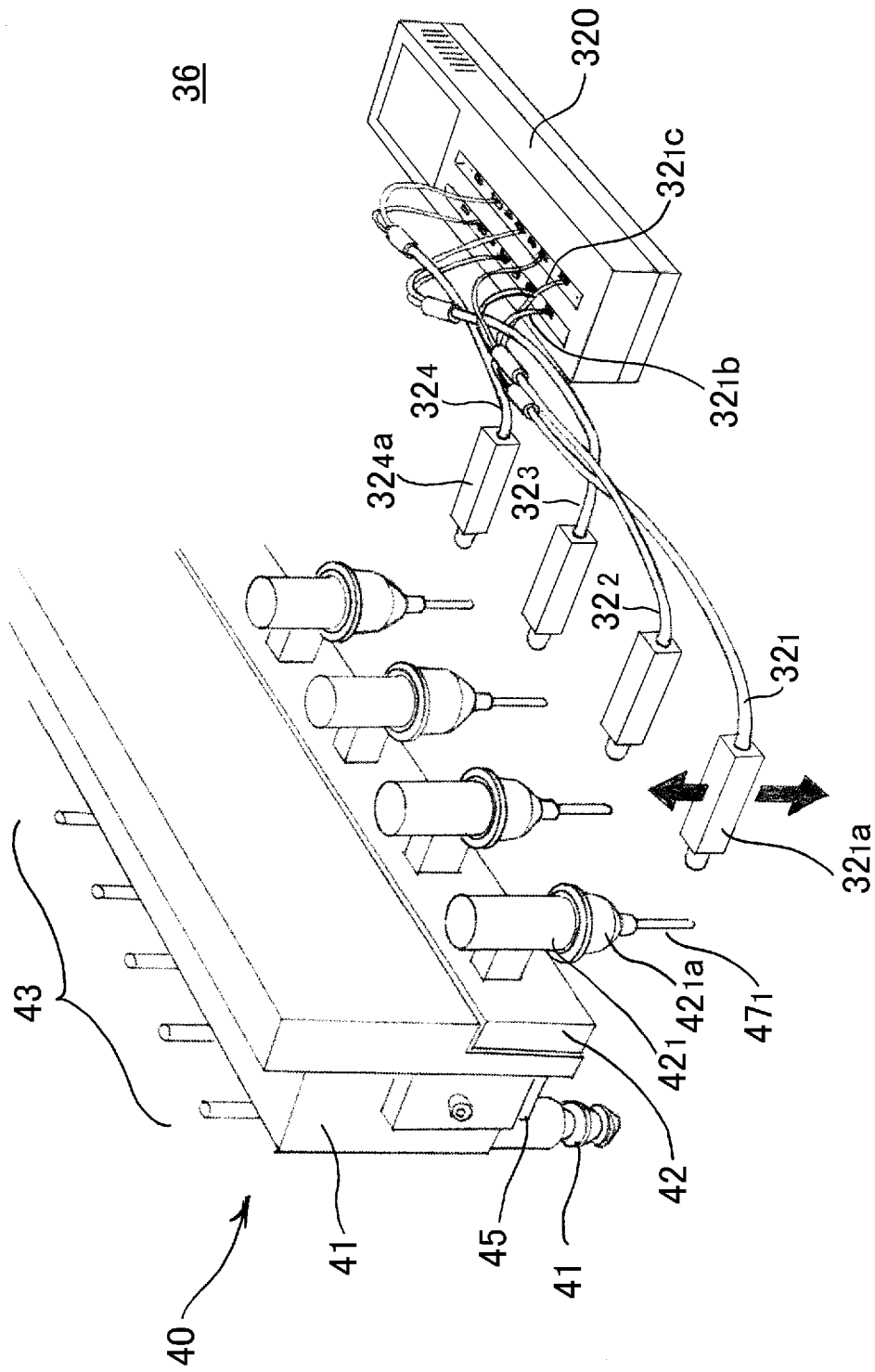
[請求項19] ゲルが封入された透光性のある細管および該細管と連通する太管からなる1または2以上のキャピラリー型電気泳動用チップと、前記キャピラリー型電気泳動用チップを前記太管側で支持可能であって前記太管に収容される電気泳動用溶液と接触可能な第1の電極が設けられて

前記キャピラリー型電気泳動用チップに対して相対的に移動可能な1
または2以上の電極支持部材と、収容した液と接触可能に設けられた
第2の電極を有する1または2以上の電極付液収容部とを有する電気泳
動装置。

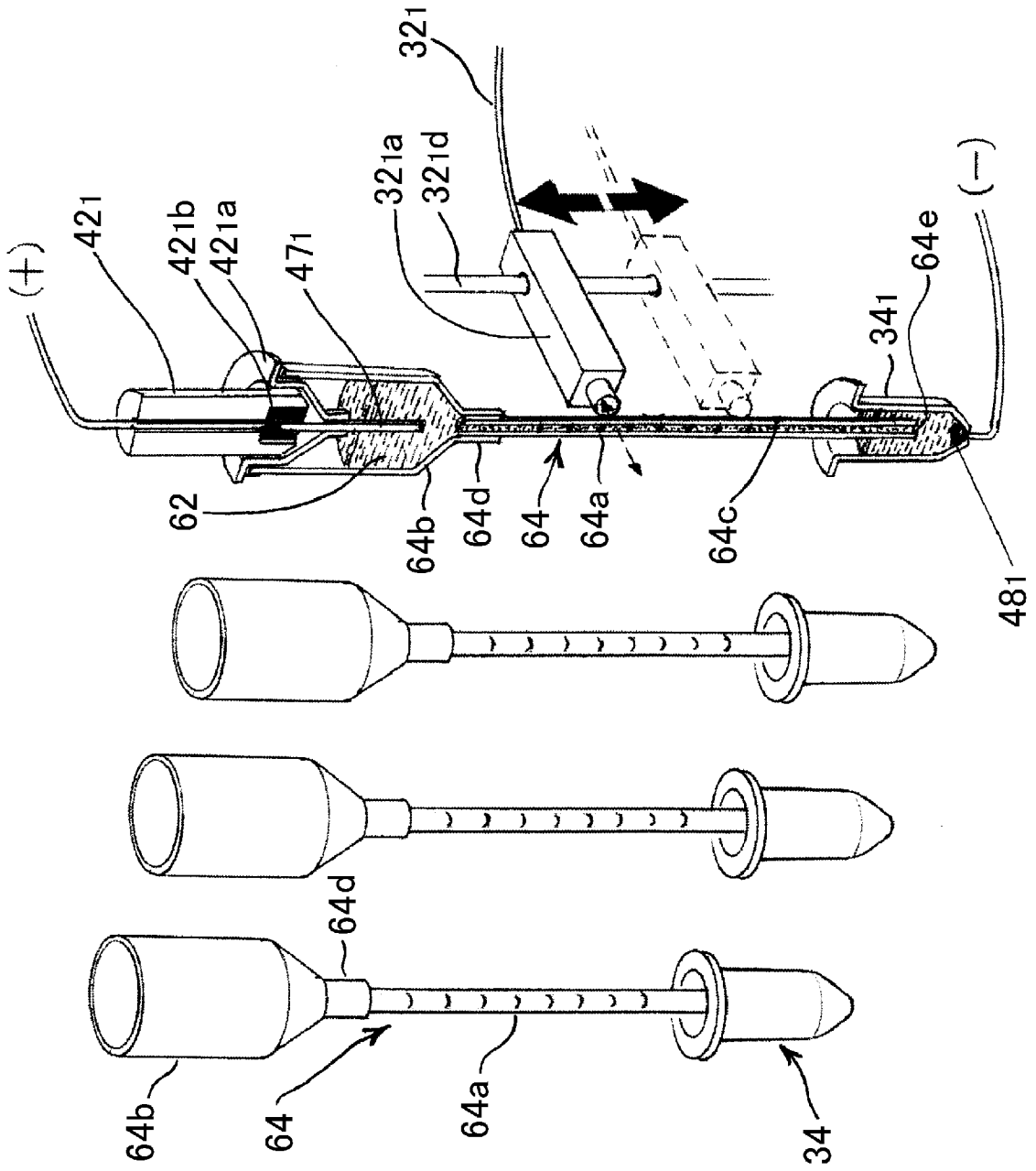
図1



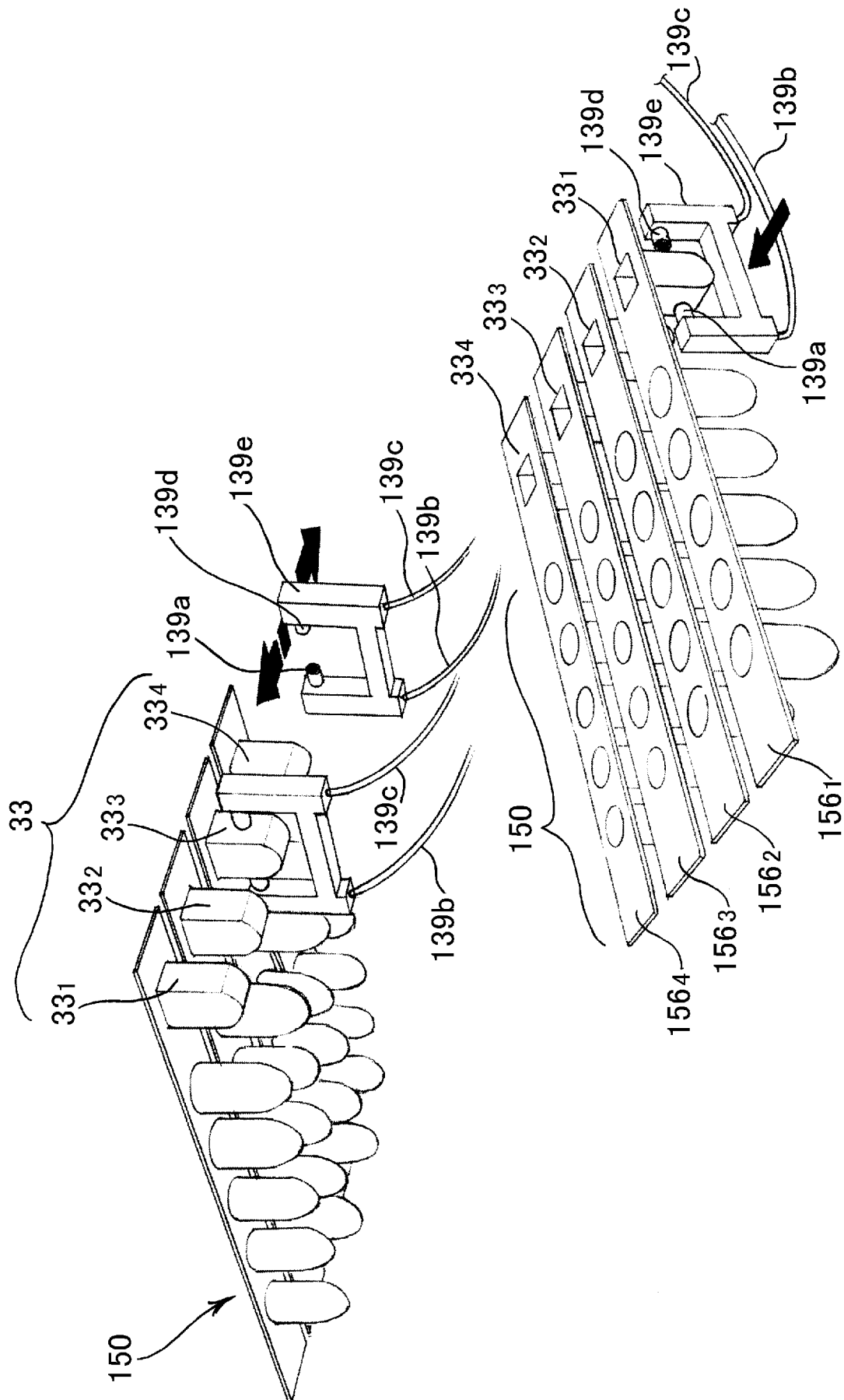
[図3]



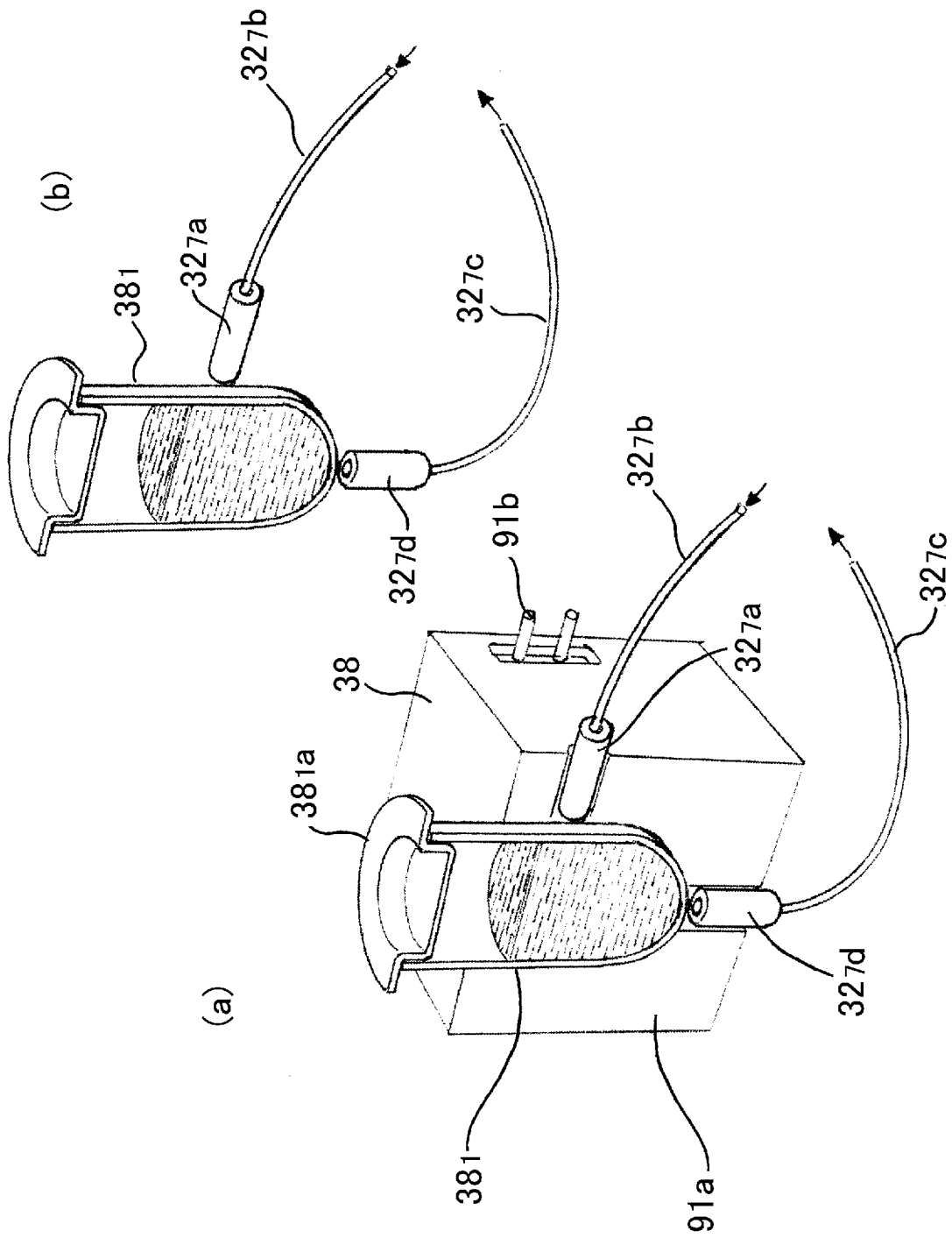
[図4]



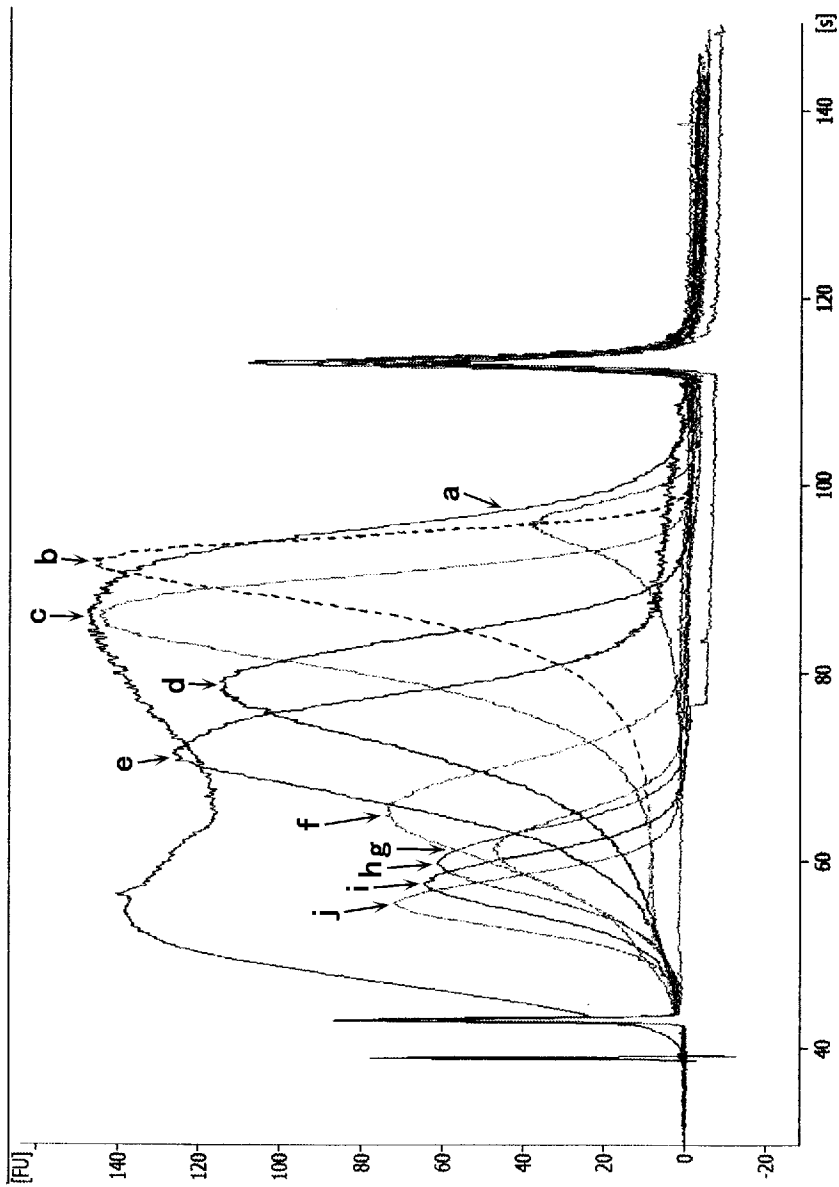
[図5]



[図6]

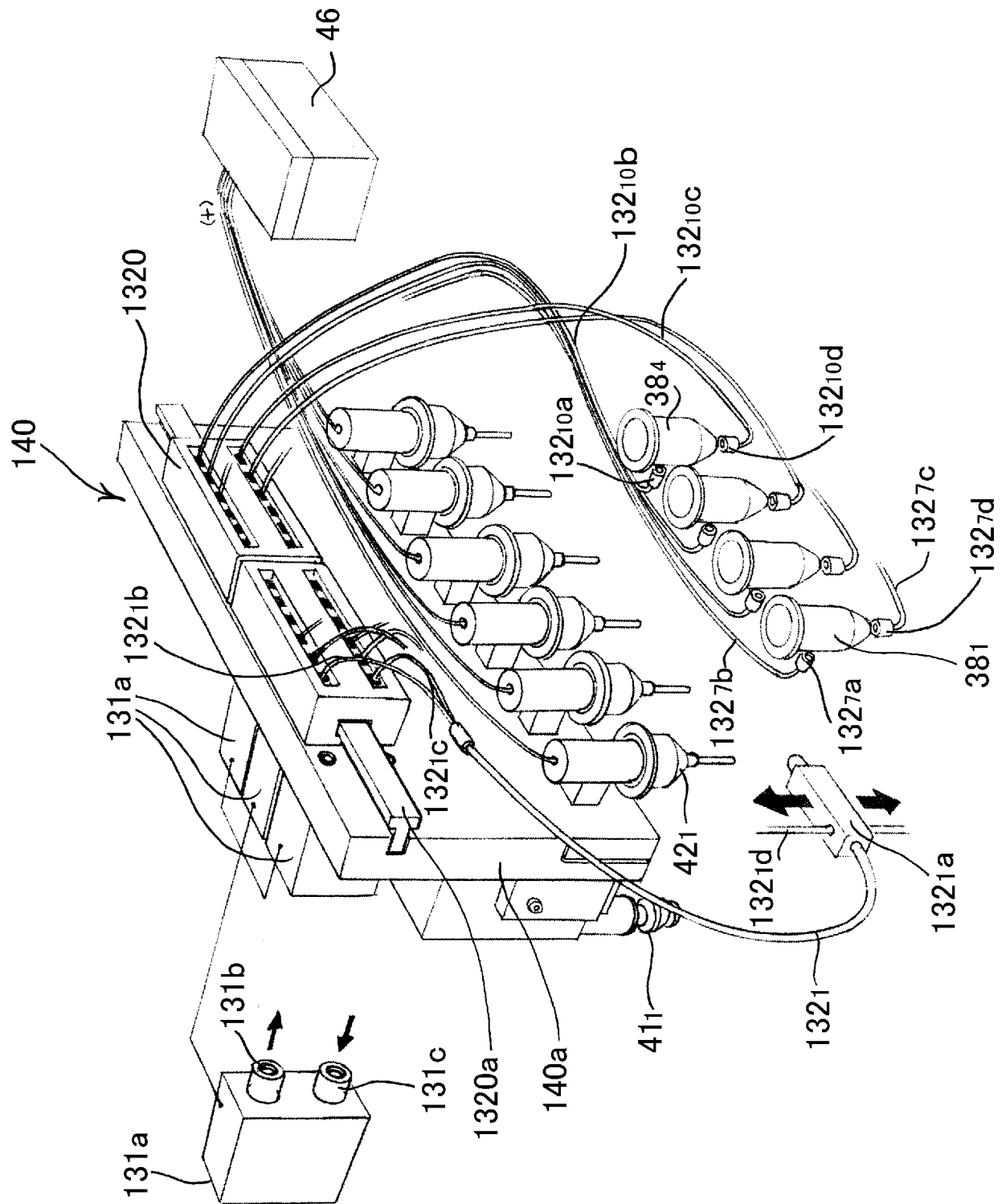


[7]



		%	Avg %	bp
a	Series 1	10-9.5	9.75	152
b		9.5-9.0	9.25	174
c		9.0-8.5	8.75	197
d		8.5-8.0	8.25	212
e		8.0-7.5	7.75	255
f	Series 2	7.5-7.0	7.25	270
g		7.0-6.5	6.75	356
h		6.5-6.0	6.25	494
i		6.0-5.5	5.75	656
j		5.5-5.0	5.25	810

[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/063498

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/68(2006.01) i, C12M1/00(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/68, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
*CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)*

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2012/050198 A1 (Universal Bio Research Co., Ltd.), 19 April 2012 (19.04.2012), claims 3, 4, 26 & US 2013/0288259 A1 & EP 2628786 A1 & CN 103237880 A & KR 10-2014-0006791 A	1-3, 6, 9-11 4, 5, 7, 8, 12-18
Y	WO 2001/011364 A1 (Precision System Science Co., Ltd.), 15 February 2001 (15.02.2001), claim 10 (Family: none)	4, 12, 13, 15-18

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 06 August, 2014 (06.08.14)	Date of mailing of the international search report 19 August, 2014 (19.08.14)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/063498

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-18

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/063498

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The invention of claim 1 and the invention of claim 19 have no common technical feature.

Therefore, there is no same or corresponding special technical feature among these inventions.

Accordingly, claims are classified into two inventions each of which has a special technical feature indicated below.

(Invention 1) claims 1-18

A sequencer preprocessing method comprising: an extraction step of using a sequencer preprocessing apparatus to extract nucleic acid from a specimen received in a container group after having mixed the specimen, an extraction reagent solution, and a magnetic particle suspension, the sequencer preprocessing apparatus including a suction and discharge mechanism for sucking and discharging a gas, a nozzle head with a nozzle which communicates with the suction and discharge mechanism and to which detachably attached are one or two or more dispensing chips capable of sucking and discharging a liquid, the container group which has at least a reaction container and a liquid receiver for receiving various liquids such as a magnetic particle suspension, a translation mechanism capable of translating the nozzle relative to the container group, and a magnetic force unit capable of applying a magnetic field to the one or two or more dispensing chips attached to the nozzle; a fragmentation inducing step of using the sequencer preprocessing apparatus to allow the extracted nucleic acid to be fragmented by being mixed with a fragmentation solution received in the container group and to use a magnetic particle suspension to create, from the fragmented nucleic acid, a fragment having a predetermined range of numbers of base sequences depending on a sequencer; and an amplification preprocessing step of using the sequencer preprocessing apparatus to dispense a predetermined amount of solution containing the created fragment into the reaction container in conjunction with an amplification solution.

(Invention 2) claim 19

An electrophoresis apparatus comprising: one or two or more capillary electrophoresis chips formed of a translucent reduced-diameter tube in which a gel is sealed and an increased-diameter tube communicating with the reduced-diameter tube; one or two or more electrode supports which are capable of supporting the one or two or more capillary electrophoresis chips on the increased-diameter tube side and which are provided with a first electrode capable of contacting an electrophoresis solution received in the increased-diameter tube, the one or two or more electrode supports being movable relative to the one or two or more capillary electrophoresis chips; and one or two or more electrode equipped liquid receivers having a second electrode provided so as to be capable of contacting the received liquid.

Claim 19 is not relevant to an invention which involves all of the matters to define the invention in claim 1 and which has a same category.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/063498

Further, as a result of the search which has been carried out with respect to claims classified into Invention 1, claim 19 is not relevant to an invention on which it is substantially possible to carry out a search without an additional prior-art search and judgment, and there is no other reason for that it can be considered that it is efficient to carry out a search on claim 19 together with claims 1-18, and consequently, it is impossible to classify claim 19 into Invention 1.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68, C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2014年
日本国実用新案登録公報	1996-2014年
日本国登録実用新案公報	1994-2014年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2012/050198 A1 (ユニバーサル・バイオ・リサーチ株式会社) 2012.04.19, 請求項 3, 4, 26 & US 2013/0288259 A1 & EP 2628786 A1 & CN 103237880 A & KR 10-2014-0006791 A	1-3, 6, 9-11 4, 5, 7, 8, 12-18
Y	WO 2001/011364 A1 (プレシジョン・システム・サイエンス株式会社) 2001.02.15, 請求項 10 (ファミリーなし)	4, 12, 13, 15-18

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.08.2014

国際調査報告の発送日

19.08.2014

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

一宮 里枝

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3441

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	AKUTSU, J., et al., Development of an integrated automation system with a magnetic bead-mediated nucleic acid purification device for genetic analysis and gene manipulation, Biotechnology and Bioengineering, 2004.06.20, vol. 86, no.6, p. 667-671	5, 7, 13, 15-18
Y	西岡 淳二, 外1名, DNA抽出法の評価と標準化, 臨床化学, 2008.08.29, vol. 37, 補冊1, p. 43-45	8, 14
A	JP 8-320274 A (プレシジョン・システム・サイエンス株式会社) 1996.12.03, 全文 & US 5895631 A & US 2002/0123156 A1 & EP 763739 A1 & EP 1519196 A2 & WO 1996/029602 A1 & DE 69634794 D & DE 69634794 T & CA 2183638 A & NZ 334807 A & KR 10-0211129 B & CN 1148892 A & CA 2183638 A1	1-18

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

1-18

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項 1 に係る発明、請求項 19 に係る発明は、共通の技術的特徴を有していない。
よって、これらの発明の間には、同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。
そして、請求の範囲は、各々下記の特典的な技術的特徴を有する 2 の発明に区分される。

(発明 1) 請求項 1～18

気体の吸引および吐出を行なう吸引吐出機構、該吸引吐出機構と連通し液体の吸引および吐出が可能な 1 または 2 以上の分注チップが着脱可能に装着されるノズルを有するノズルヘッド、磁性粒子懸濁液を含む各種液を収容する液収容部および反応容器を少なくとも有する容器群、前記ノズルを容器群との間で相対的に移動可能とする移動機構、および、前記ノズルに装着された分注チップ内に磁場を及ぼすことが可能な磁力部を有するシーケンサ前処理装置を用いて、前記容器群に収容された検体、抽出用試薬溶液および磁性粒子懸濁液を混合して、検体から核酸を抽出する抽出工程と、該シーケンサ前処理装置を用いて、抽出した前記核酸を前記容器群に収容された断片化溶液と混合して断片化し、断片化された前記核酸から磁性粒子懸濁液を用いて、シーケンサに応じた所定範囲の塩基配列数をもつ断片を作成する断片化作成工程と、前記シーケンサ前処理装置を用いて、前記作成した断片を含有する溶液の所定量を、増幅用溶液とともに前記反応容器内に分注する増幅前処理工程と、を有するシーケンサ前処理方法。

(発明 2) 請求項 19

ゲルが封入された透光性のある細管および該細管と連通する太管からなる 1 または 2 以上のキャピラリー型電気泳動用チップと、前記キャピラリー型電気泳動用チップを前記太管側で支持可能であって前記太管に収容される電気泳動用溶液と接触可能な第 1 の電極が設けられて前記キャピラリー型電気泳動用チップに対して相対的に移動可能な 1 または 2 以上の電極支持部材と、収容した液と接触可能に設けられた第 2 の電極を有する 1 または 2 以上の電極付液収容部とを有する電気泳動装置。

請求項 19 は、請求項 1 の発明特定事項を全て含む同一カテゴリーの発明ではない。

そして、請求項 19 は、発明 1 に区分された請求項について調査した結果、実質的に追加的な先行技術調査や判断を必要とすることなく調査を行うことが可能である発明ではなく、請求項 1～18 とまとめて調査を行うことが効率的であるといえる他の事情もないから、請求項 19 を発明 1 に区分することはできない。