

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7015109号
(P7015109)

(45)発行日 令和4年2月2日(2022.2.2)

(24)登録日 令和4年1月25日(2022.1.25)

(51)国際特許分類

G 0 1 N	35/08 (2006.01)	G 0 1 N	35/08	A
G 0 1 N	27/447 (2006.01)	G 0 1 N	27/447	3 3 1 D
G 0 1 N	37/00 (2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 1
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68	
G 0 1 N	21/64 (2006.01)	G 0 1 N	21/64	B

請求項の数 17 (全65頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2016-530880(P2016-530880)
 (86)(22)出願日 平成26年11月14日(2014.11.14)
 (65)公表番号 特表2017-502262(P2017-502262)
 A)
 (43)公表日 平成29年1月19日(2017.1.19)
 (86)国際出願番号 PCT/GB2014/053385
 (87)国際公開番号 WO2015/071683
 (87)国際公開日 平成27年5月21日(2015.5.21)
 審査請求日 平成29年10月17日(2017.10.17)
 審判番号 不服2021-2680(P2021-2680/J1)
 審判請求日 令和3年3月1日(2021.3.1)
 (31)優先権主張番号 1320146.2
 (32)優先日 平成25年11月14日(2013.11.14)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 英国(GB)

(73)特許権者 508311226
 ケンブリッジ・エンタープライズ・リミ
 テッド
 イギリス国 ケンブリッジ シービー 2
 1ティーエヌ, トリニティ・レイン, ジ
 ・オールド・スクールズ
 (74)代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74)代理人 100106208
 弁理士 宮前 徹
 (74)代理人 100106080
 弁理士 山口 晶子
 (72)発明者 イエーツ, エマ
 イギリス国ケンブリッジシャー シービ
 - 2 1イーダブリュー, ケンブリッジ
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 流体の分離および検出

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ネイティブ状態の複数のタンパク質成分を分析する方法であって、
 (i i i) ネイティブ状態の成分の拡散または電気泳動による移動によって、互いに接觸
 している第1および第2流体流れ、ここで、第1および第2流体流れは層流型流体流れで
 ある、を横切るような当該成分の分布を提供する工程；

(i v) 上記流れを横切るように分布した当該成分を複数の流体流れに分岐させる、その
 際、分岐した各流体流れは当該成分を含む工程；

(v) その後、分岐した各流体流れ中の当該成分を標識化する工程；ならびに

(v i) 分岐した各流体流れ中の当該分布された成分を分析する工程を含む方法。

【請求項2】

(i) 第1の層流型流体流れ中にネイティブ状態の成分を供給する；

(i i) その第1の層流型流体流れを層流型流体流れが発生するように第2の層流型流体
 流れと接觸させる予備工程を含み；そして

工程(i i i)により成分を第2流体流れに合流させ、それにより第1および第2流体流
 れを横切るネイティブ状態の成分の分布を得る、
 請求項1に記載の方法。

【請求項3】

工程(v)が定量的標識化である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

第1および第2流体流れを横切るネイティブ状態の成分の分布が均一ではない、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

工程(i i i)がネイティブ状態の成分を第2流体流れ中へ拡散させることを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

工程(i i i)がネイティブ状態の成分を第2流体流れ中へ電気泳動により移動させることを含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

工程(i v)の分岐した流体流れの一つが第2流体流れの一部分を含み、その際、分岐した流体流れの一つはネイティブ状態の成分を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項8】

標識が潜在性標識、たとえばOPAである、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

工程(v)が成分の蛍光標識化である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

成分が多成分混合物の成分である、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

前記成分がモノマーであるか、または凝集物であり、多成分混合物中の他の成分類がモノマーおよび凝集物から選択され、その際、これら他の成分は前記成分と同一ではない、請求項10に記載の方法。

20

【請求項12】

成分を変性状態で工程(v i)において分析する、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

工程(v i)が分岐した各流体流れ中の成分の乾燥質量を決定することを含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

ネイティブ状態の複数のタンパク質成分を検出するための流動装置であって、当該流動装置は、互いに接触している第1および第2の層流型流れのための分離チャネル、ここで、当該分離チャネルは、下流の流れ分離器と流体連通している、と、当該流れ分離器の下流にある検出ゾーン、ここで、当該検出ゾーンは、当該流れ分離器と流体連通している、とを含む流動装置であり、当該分離チャネルは、ネイティブ状態での当該成分の互いに接触している第1層流型流れと第2層流型流れを横切る動作を許容し、下流の流れ分離器は第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1流体流れおよび第2流体流れのそれぞれの一部分が当該分離チャネルから分岐することを可能とし、当該検出ゾーンは、当該流れ分離器から分岐した流れを受け取るための検出チャネルと、標識チャネルを備えており、当該標識チャネルは、当該流れ分離器からの分岐した流れの各々を標識するように構成され、当該流動装置が、分岐した流れの各々からのすべての分析シグナルを記録するように構成された観察ゾーンをさらに含む流動装置。

30

【請求項15】

検出ゾーンが、さらに、検出チャネルに第1ジャンクションで変性剤を供給するための変性チャネルを備えている、請求項14に記載の流動装置。

【請求項16】

検出ゾーンが、さらに、検出チャネルに第2ジャンクションで標識を供給するための標識チャネルを備えており、第2ジャンクションが第1ジャンクションの下流にある、請求項15に記載の流動装置。

40

【請求項17】

検出ゾーンが、さらに、検出チャネルに第2ジャンクションで標識を供給するための標識

50

チャネルを備えている、請求項 1 4 に記載の流動装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、GB 1320146.2, 2013年11月14日(14.11.2013)出願の優先権を主張し、その内容を全体として本明細書に援用する。

【0002】

発明の分野

本発明は、成分混合物、たとえばポリペプチドの混合物を分析するための流動法、たとえば流動拡散法、および流動装置に関する。

10

【背景技術】

【0003】

タンパク質 - タンパク質相互作用の研究はかなりの関心がもたれている領域である。しかし、タンパク質相互作用は一般に伝統的な測定および検出スキームによって混乱する。タンパク質 - タンパク質相互作用を調べるための既存の方法には、FRET、NMR、EPR、SPR、ESI-MS、サイズ排除クロマトグラフィー、およびネイティブ(native) PAGEが含まれる。これらの各方法は、相互作用性パートナーのうちの1つを何らかの方法で、たとえば蛍光標識の付与または表面上への固定化により修飾すること、あるいは複合体全体をマトリックスによりふるい分けすることを必要とする。これらの工程は観察している一過性相互作用を攪乱し、凝集したある種が分離および標識化のプロセスで破壊されるリスクがある。

20

【0004】

流体流れ、たとえばマイクロ流体流れ内の成分の分離および検出には多数の難点がある。成分の反応、分離および検出のための流体技術における関心が最近高まっているので、成分を連続フローシステムで分離および分析できる方法およびデバイスの開発に関心がもたれている。

【0005】

本発明者らは、多成分混合物中の成分を含めて、成分を流体デバイス中の層流を横切って分布させるための改良法を最近記載した(参照: PCT/GB2013/052757 (WO2014/064438))。層流全体への成分の分布を複数の流れ時点で蛍光分光分析により測定する。これらの測定から、その流れ中の異なるサイズの成分を同定できる。その作業例は、元のモノマー種からのオリゴマーおよびフィブリルクラスターの形成を含めた A (1 - 4 2) 凝集事象の同定のために記載されたその方法の使用を示す。

30

【0006】

しかし、この作業は蛍光活性であるかあるいは蛍光標識を備えた成分の使用を必然的に要求する。後者の場合、標識を備えた成分の挙動はその標識により影響を受ける可能性がある。この本発明者らの初期の報文には複合層流からの成分の精製を記載しておらず、いかにしてこれを達成できるかも示唆されていない。よって、モノマーおよびオリゴマータンパク質種は同定されるけれども、それらはその流れから分離されない。

40

【0007】

インフロー標識化および分離法は当技術分野で知られており、Ramseyグループ(たとえば、Liu et al. Anal. Chem. 2000, 72, 4608; Jacobson et al. Anal. Chem. 1994, 66, 4127; Jacobson et al. Anal. Chem. 1994, 66, 3472)によって十分に記載されている。たとえば、このグループは共有結合および非共有結合標識したタンパク質をフローデバイスで電気泳動分離することを記載している(Liu et al.)。ここで、そのグループは、特に電気泳動分離実験においてタンパク質を分離前に標識することの問題点を認めている。そのグループは、フローデバイス内で分離前に上流で標識化するよりむしろ成分を分離後に下流で標識することを示唆している。成分をデバイスに貫流するために電気泳動法が用いられている。ここで、電気泳動法は成分がキャピラリーを通る移動速度に基づいて時

50

間的に(temporally)成分を分離する。この方法で、異なる電荷 - 対 - サイズ比をもつ成分が流体流れに沿って分布する。例として、そのグループは - ラクトアルブミン、 - ラクトグロブリン B および - ラクトグロブリン A の分離を示している。標識法の効率は考観されておらず、成分が定量的に標識されたことはどこにも示唆されていない。

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、成分、たとえばタンパク質をネイティブ状態で分離し、次いでその後、分離された成分を検出に最適な条件下で分析するための、別の流体法を今回確立した。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 9 】

【文献】PCT/GB2013/052757(WO2014/064438)

【非特許文献】

【 0 0 1 0 】

【文献】Liu et al. Anal. Chem. 2000, 72, 4608

Jacobson et al. Anal. Chem. 1994, 66, 4127

Jacobson et al. Anal. Chem. 1994, 66, 3472

【発明の概要】

【 0 0 1 1 】

本発明は流体技術を用いて成分を分析するための方法を提供する。本方法は、接触している流体流れ、たとえば層流型流体流れを横切って成分を分布させ、その分布の一部分を分析のために分離する。成分の分布は、1つの流体流れから隣接する流体流れ、たとえば層流型流体流れ中への、成分の拡散または電気泳動移動により得ることができる。成分を分布させることにより、その成分を流体流れ内で他の成分から分離することができる。分析は、検出を容易にするために成分を標識する工程を含むことができる。

すなわち、本明細書は以下の発明の開示を包含する：

[1] 成分を分析する方法であって、

(i i i) 接触している第1および第2流体流れ、たとえば層流型流体流れを横切って成分を分布させる；

(i v) 第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1流体流れおよび第2流体流れの一部分(複数)を分岐させ、その際、分岐した部分は成分を含む；

(v) 分岐した部分の流体流れ中の成分を場合により標識する；ならびに

(v i) 分岐した部分の流体流れ中の成分を分析する工程を含む方法。

[2] (i) 第1流体流れ中に成分を供給する；

(i i) その流体流れを層流が発生するように第2流体流れと接触させる
予備工程を含み；そして

工程(i i i)により成分を第2流体流れに合流させ、それにより第1および第2流体流れを横切る成分分布を得る；

(i v) 第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1流体流れおよび第2流体流れの一部分(複数)を分岐させ、その際、分岐した部分は成分を含む；

(v) 分岐した部分の流体流れ中の成分を場合により標識する；そして

(v i) 分岐した部分の流体流れ中の成分を分析する、

[1] に記載の方法。

[3] 工程(v)が存在する、[1] または[2] に記載の方法。

[4] 第1および第2流体流れを横切る横方向の成分分布が均一ではない、[1] ~ [3] のいずれかに記載の方法。

[5] 工程(i i i)が成分を第2流体流れ中へ拡散させることを含む、[1] ~ [4] のいずれかに記載の方法。

[6] 工程(i i i)が成分を第2流体流れ中へ電気泳動により移動させることを含む、[1] ~ [5] のいずれかに記載の方法。

[7] 工程(i v)が第2流体流れの一部分を分岐させ、その際、分岐した部分は成分を

10

20

30

40

50

含む、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

[8] 標識が潜在性標識、たとえばOPAである、[1]～[7]のいずれかに記載の方法。

[9] 工程(v)が成分の蛍光標識化である、[1]～[8]のいずれかに記載の方法。

[10] 成分がポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは多糖であるか、あるいはそれを含む、[1]～[9]のいずれかに記載の方法。

[11] 成分がポリペプチドであるか、あるいはそれを含む、[1]～[10]のいずれかに記載の方法。

[12] 成分がタンパク質であるか、あるいはそれを含む、[1]～[11]のいずれかに記載の方法。

[13] 成分が多成分混合物の成分である、[1]～[12]のいずれかに記載の方法。

[14] 前記成分がモノマーであるか、または凝集物であり、多成分混合物中の他の成分類がモノマーおよび凝集物から選択され、その際、これら他の成分は前記成分と同一ではない、[13]に記載の方法。

[15] 成分がネイティブ状態で工程(ii)において第2流体流れに合流する、[2]に記載の方法。

[16] 成分がネイティブ状態で工程(iii)において第2流体流れに合流する、[15]に記載の方法。

[17] 成分を変性状態で工程(vi)において分析する、[1]～[16]のいずれかに記載の方法。

[18] 工程(vi)が分岐流中の成分の乾燥質量を決定することを含む、[1]～[17]のいずれかに記載の方法。

[19] 接触している第1および第2流れのための分離チャネルであって下流の流れ分離器と流体連通した分離チャネル、および流れ分離器の下流にあってそれと流体連通した検出ゾーンを含む、混合物中の成分を検出するための流動装置であって、分離チャネルは接触している第1流れと第2流れの間での成分の横方向移動が可能であるように適応させてあり、流れ分離器は第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1流体流れおよび第2流体流れの一部分(複数)を分離チャネルから分岐させるように適応させてある流動装置。

[20] 検出ゾーンが、流れ分離器の下流にあって流れ分離器から分岐した流れを受け取るための検出チャネルを備えており、検出ゾーンがさらに、検出チャネルに第1ジャンクションで変性剤を供給するための変性チャネルを備えている、[19]に記載の流動装置。

[21] さらに、検出チャネルに第2ジャンクションで標識を供給するための標識チャネルを備えており、第2ジャンクションが第1ジャンクションの下流にある、[20]に記載の流動装置。

[22] 検出ゾーンが、流れ分離器の下流にあって流れ分離器から分岐した流れを受け取るための検出チャネルを備えており、検出ゾーンがさらに、検出チャネルに第2ジャンクションで標識を供給するための標識チャネルを備えている、[19]に記載の流動装置。

【0012】

本発明の方法は、成分分離と成分分析の工程を独立してそれぞれに最適な条件下で行なうことができる定量法である。分離工程はネイティブ条件下で実施でき、その成分と多成分混合物中の他の成分との関係を含めて、成分およびその環境を理解することができる。その後の分析は、分離した成分の正確な同定および特性分析が可能になるように変性工程および標識工程を含むことができる。したがって、成分をその分離前に処理および標識する必要はない。

【0013】

分離工程は、流体流れを横切って目的成分を他の成分から空間的に分離することができる。成分の分離は、サイズまたは電荷を含めた各成分の固有特性に基づく。適切に分離された成分を流れ分岐工程で採取し、その分岐流を流動条件下で、有利にはすべて1つの流体基板 (fluidic substrate) 上で分析する。本発明により成分を定常状態で分離すること

10

20

30

40

50

ができ、低濃度試料の効率的検出のための長い曝露時間が可能になる。

【0014】

本発明の流動技術は、分岐した成分を分析用に調製するための分離後処理を含むことができる。定量標識化処理、たとえば本明細書に記載する蛍光標識化処理により、記録された分析シグナルから成分の濃度を直接決定することができる。

【0015】

本発明の方法および装置は、多成分混合物中の成分を分析するために使用できる。さらに、本方法および装置は、混合物内の成分の会合および解離を分析するのに適切である。本明細書に記載する手法により、一過性のタンパク質-タンパク質相互作用、ならびにタンパク質および可能性がある多数の結合物質により形成される回避可能な(non-obligatory)タンパク質複合体の挙動を含めて、ポリペプチド成分間の凝集事象を調べることができる。したがって、伝統的な破壊的検出スキームと比較して、本発明は凝集および解離事象を分析するための別の戦略を提供する。凝集および解離事象の分析は、相対結合反応速度を攪乱せずに定量する機会を提供する。

10

【0016】

例として、本事例はインスリン凝集事象を経時にモニターできることを示す。本発明の方法はインスリン凝集反応におけるモノマーおよび小分子オリゴマーの枯渇についての情報を提供し、そのような情報はこれまで直接には入手できなかったものである。本発明の方法は、本明細書に示すように、刺激、たとえばpH変化に応答した凝集事象を調べるためにも使用できる。実施例は、拡散法を用いて - ラクトグロブリンのダイマー化を実施できることをも示す。

20

【0017】

本発明の方法は、不均質多成分混合物の成分集団の流体力学的半径を含めて、成分の流体力学的半径を決定することもできる。

したがって、本発明の一般的側面において、接触している第1および第2流体流れ、たとえば第1および第2の層流を横切って分布した成分を分析する方法を提供し、その方法は、第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1流体流れおよび第2流体流れの一部分(複数)を分岐させ、その際、分岐した部分は成分を含む工程、そして分岐した部分の流体流れ中の成分を分析する工程を含む。

30

【0018】

本発明の第一の側面において、成分を分析する方法が提供され、その方法は下記の工程を含む：

- (i i i) 接触している第1および第2流体流れ、たとえば層流型流体流れを横切って成分を分布させる；
- (i v) 第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1流体流れおよび第2流体流れの一部分(複数)を分岐させ、その際、分岐した部分は成分を含む；
- (v) 分岐した部分の流体流れ中の成分を場合により標識する；ならびに
- (v i) 分岐した部分の流体流れ中の成分を分析する。

【0019】

1態様において、本方法は、

40

- (i) 第1流体流れ中に成分を供給する；

(i i) その流体流れを層流が発生するように第2流体流れと接触させる
予備工程を含み；そして

工程(i i i)により成分を第2流体流れに合流させ、それにより第1および第2流体流れを横切る成分分布を得る；

1態様において、工程(i i)は、その流体流れを、第1流体流れのいずれの側にも第2流体流れの層流が発生するように、複数の第2流体流れと接触させることを含む。

【0020】

1態様において、工程(i i i)は、成分を第2流体流れ中へ拡散させること、または成分を第2流体流れ中へ電気泳動移動させることを含む。

50

1 態様において、工程 (i v) は、第 2 流体流れの一部分を 分岐させることを含み、その際、分岐した部分は成分を含む。

【 0 0 2 1 】

1 態様において、工程 (v) が存在する。1 態様において、工程 (v) は成分の蛍光標識化である。

1 態様において、成分はポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは多糖であるか、あるいはそれを含む。1 態様において、成分はタンパク質である。

【 0 0 2 2 】

1 態様において、成分は多成分混合物の成分である。

本発明はまた、本発明の第一の側面の方法を含めた本発明方法に使用するように適応させた流動装置を提供する。

10

【 0 0 2 3 】

よって、本発明のさらなる側面において、接触している第 1 および第 2 流れのための分離チャネルであって下流の流れ分離器と流体連通した分離チャネル、および流れ分離器の下流にあってそれと流体連通した検出ゾーンを含む、混合物中の成分を検出するための流動装置が提供され、その際、分離チャネルは接触している第 1 流れと第 2 流れの間での成分の横方向移動が可能であるように適応させてあり、流れ分離器は第 1 流体流れの一部分、第 2 流体流れの一部分、または第 1 流体流れおよび第 2 流体流れの一部分（複数）を分離チャネルから 分岐させるように適応させてある。

【 0 0 2 4 】

本発明のさらなる側面において、成分を標識する方法が提供され、その方法は下記の工程を含む：

(i i i) 接触している第 1 および第 2 流体流れ、たとえば層流型流体流れ(laminar flow)を横切って成分を分布させる；

(i v) 第 1 流体流れの少なくとも一部分、第 2 流体流れの少なくとも一部分、または第 1 流体流れおよび第 2 流体流れの少なくとも一部分を 分岐させ、その際、分岐した部分は成分を含む；

(v) 分岐した部分の流体流れ中の成分を標識する；ならびに場合により

(v i) 分岐した部分の流体流れ中の成分を分析する。

20

【 0 0 2 5 】

30

1 態様において、本方法は、

(i) 第 1 流体流れ中に成分を供給する；

(i i) その流体流れを層流が発生するように第 2 流体流れと接触させる
予備工程を含み；そして

工程 (i i i) により成分を第 2 流体流れに合流させ、それにより第 1 および第 2 流体流れを横切る成分分布を得る；

1 態様において、工程 (i v) は、第 2 流体流れの少なくとも一部分を 分岐させる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 6 】

【図 1】図 1 は、(A) 本発明の態様による流体デバイス（挿入図として示す）で測定したウシ血清アルブミン濃度の変化に伴なう蛍光強度の変化を示す。流体を横切る拡散および流れ分離の後に、 B S A を標識した。タンパク質と標識化溶液が互いに接触するのに伴なう蛍光強度の形成を示す。バックグラウンド補正した蛍光強度を測定し、タンパク質濃度の関数としてプロットした。およそ 1 5 n M の検出限界が観察された；(B) ウシ血清アルブミン濃度の変化に伴なう A 2 8 0 における吸光強度の変化を示す。赤い点は、試料が緩衝液ブランクより低い吸光度を与えた測定に対応する。およそ 6 0 0 n M の検出限界が得られた。

40

【図 2】図 2 は、 B S A 、リゾチームおよび - ラクトグロブリンについて、有効第一級アミン濃度の変化に伴なう蛍光強度の変化を示す。種々の濃度の B S A 、リゾチームおよび - ラクトグロブリンを、アルカリ性緩衝液中の S D S (ドデシル硫酸ナトリウム) 、

50

O P A (オルト - フタルアルデヒド) および B M E (ベータ - メルカプトエタノール) を用いて変性および標識した。タンパク質濃度を第一級アミン濃度に換算すると、第一級アミン濃度と O P A 蛍光強度の間に直線関係が示される。このセットの変性条件について、第一級アミン濃度と O P A 蛍光強度の関係は、60 nM タンパク質濃度まで線形回帰によつて良好に記述される。

【図 3】図 3 は、(A) 既知濃度の - ラクトグロブリンの希釈系列について確立された第一級アミン濃度と O P A 蛍光強度の間の直線関係を示し、次いでこれを用いて未知濃度の A (1 - 42) 希釈系列中の第一級アミン濃度を決定する；および (B) 強度データから系列中のそれぞれの - ラクトグロブリン試料の希釈度を説明するタンパク質濃度への換算を示し、これにより 27 μM 付近の一貫したペプチド濃度計算値が得られる。

【図 4】図 4 は、10 mg / mL の B S A を図 6 および図 7 (A) に示す拡散デバイスの両方の入口にロードしたことを示す。これらの流れは分離チャネル内で接触することができ、その層流の一部分が採取された。その分岐流を標識化用の流れと接触させ、この合流した流れは図 6 および図 7 (A) の曲がりくねったチャネルパス (sinuous channel path) により示す混合ループを通って移動する (約 1.05 秒間)。試料が混合ループを出る時点までに、蛍光強度は一定になる。代表的トレースを重ねてあるが、デバイスの長手に沿って蛍光強度は一定のままであった。これは標識化が約 1 秒間の混合時間内に完了することの指標となる。

【図 5】図 5 は、(A) 本発明の態様による電気泳動型マイクロ流体デバイスの模式図；(B) 電気泳動型マイクロ流体デバイスの模式図であつて、下流の流れ分離器と流体結合した分離チャネルの一部、および流れ分離器の出口と連結した標識チャネルを示すもの；ならびに (C) 分離チャネルを横切って pH 7 で印加した電圧の変化に伴なつて偏向した B S A およびリソソームについての正規化蛍光強度の変化を示す。B S A とリゾチームはそれらの等電点が異なるため、pH 7 で反対電荷をもつ。

【図 6】図 6 は、本発明の態様による拡散型マイクロ流体デバイスの模式図を示す。

【図 7】図 7 は、本発明のさらなる態様による拡散型マイクロ流体デバイスの模式図を示す。

【図 8】図 8 は、異なる流体力学的半径をもつ粒子について拡散チャネルを横切るシミュレーションした粒子数を示す。このシミュレーションでは、既知の流体力学的半径をもつ粒子を図 6 に示すような拡散デバイスの一方または両方の入口にロードした。このシミュレーション戦略は本文に記載されており、シミュレーション結果は拡散チャネルの終端でチャネルを横切る水平距離の関数としての定常状態粒子強度分布に対応する。流体力学的半径を比色法により示す。粒子を両方の入口にロードした場合、それらの定常状態分布は流体力学的半径の関数として変化することはない (この図中の黒い水平の線) が、粒子を一方の入口にロードした場合、それらは予測されるように流体力学的半径に伴なつて変動する (ハット関数 (hat function) を展開する)。

【図 9】図 9 は、図 6 のデバイスの分離チャネル中で少なくとも 33 μm 拡散した粒子について、流体力学的半径 (nm) と観察した強度比の相関性を示す。よつて、分岐工程は最小の流体力学的半径をもつ (したがつて、第 2 流れのチャネル壁における境界に向かつて最も速やかに拡散する) 成分を捕獲する。挿入グラフは、自然 (非対数) 目盛での強度比と流体力学的半径の再プロットである。

【図 10】図 10 は、(A) 本発明の態様による拡散型マイクロ流体デバイスの模式図を示し、その際、デバイスは第 1 および第 2 流体流れの複数部分を分岐させ、さらにそれらの分岐流中の成分が分岐後に標識され、その後に分析される；および (B) 観察された強度比について予想した流体力学的半径を示す。

【図 11】図 11 は、図 7 (C) に示した pH 誘導によるインスリンヘキサマー化データに対応する原イメージを示す。それらは pH およびタイプに従つてアノーテーションされている。pH 2 のイメージは、pH 2 のインスリンが高イオン強度 pH 10.5 の標識化溶液に接触した際にいかにタンパク質が破壊されて 2 つの流体流間の層流界面で沈積するかを示す。最終的に下流で再び可溶化されるが、このタンパク質の沈積は流速変動を引き

起こす可能性がある。

【図12】図12は、(A)本発明の態様による拡散型マイクロ流体デバイスの模式図を示す；(B)溶媒であるSDS(上パネル)およびEtOH(下パネル)についての(A)のチャネルのポイント1、2および3におけるイメージを示す；(C)EtOH溶媒による標識化に関してBSA、リゾチームおよび-ラクトグロブリンについての第一級アミン濃度の変化に伴なう蛍光強度のプロットを示し、EtOHは必ずしもすべてのタンパク質を可溶化せず、または定量的に標識しないことを示す；および(D)(A)のノズルおよび分配地点で記録されたある範囲の異なる流速について、ピクセル位置の変化に伴なう蛍光強度のプロットを示し、拡散チャネルに伴なう予測不可能な流れを示す。

【図13】図13は、図1(A)の拡散型マイクロ流体デバイスの拡大模式図を示す。

10

【図14】図14は、図5(A)の電気泳動型マイクロ流体デバイスの拡大模式図を示す。

【図15】図15は、(D)に模式的に示す、処理済みPDMsチャネル表面をもつマイクロ流体デバイス内のチャネルの明視野イメージ(A)、(B)および(C)、ならびに蛍光イメージ(E)および(F)を含む；(A)は収束チャネルの上流末端におけるジャンクションのイメージである；(B)は収束チャネルの下流末端におけるジャンクションのイメージである；(C)は下流検出ゾーンのイメージである；(E)は収束チャネルの下流末端におけるジャンクションのイメージである；(F)は下流検出ゾーンのイメージである；(G)は経時的に(秒)記録された正規化蛍光強度(AU)尺度を示し、チャネル内に安定な流れが得られることを示す。

【図16】図16は、(a)動的光散乱および(b)本明細書に記載する拡散ベースの流動法により測定した、-ラクトグロブリン濃度(μM)の増大に伴なう流体力学的半径RH(nm)測定値の変化を示す。このデータは、流体力学的半径を決定するための動的光散乱法は本発明の方法と比較して信頼性がないことを示す。

20

【図17】図17は、(A)本発明の態様による電気泳動型マイクロ流体デバイスの模式図を示す；および(B)電気泳動型マイクロ流体デバイスの分離チャネルを横切って印加した電圧(V)の変化に伴なう、5種類のタンパク質溶液についての正規化蛍光強度(AU)の変化を示し、その際、BSA溶液は4.0V付近に最大蛍光強度をもち、-ラクトグロブリン溶液は6.0V付近に最大蛍光強度をもち、リゾチーム溶液は-4.0V付近に最大蛍光強度をもち、BSAおよびリゾチームを含有する溶液は-7.0Vおよび5.0V付近に蛍光最大値をもち、BSA、-ラクトグロブリンおよびリゾチームを含有する溶液は-6.0V、-2.0V、5.0Vおよび6.0V付近に蛍光最大値をもつ。

30

【図18】図18は、ある範囲の異なるタンパク質濃度のタンパク質試料について経時的に(秒)記録された蛍光強度(AU)の変化を示す。タンパク質はBSA、Lysおよび-ラクトグロブリンであり、それらのタンパク質は本明細書に記載するようにOPA蛍光標識混合物で標識化されていた。

【図19】図19は、OPA蛍光標識混合物で30分間処理したある範囲のタンパク質試料について記録された第一級アミン濃度の変化に伴なう蛍光強度(AU)の変化を示す。タンパク質はBSA、Lysおよび-ラクトグロブリンであった。線形当てはめを示す。

【図20】図20は、既知濃度の保存試料から調製した一連のBSA溶液について、タンパク質濃度(nm)の変化に伴なうA₂₈₀で記録されたバルク吸光度の変化を示す。四角は記録された吸光度が緩衝液ブランクより低いデータ点であった。

40

【図21】図21は、流体デバイスにおいてそれのIEPを通過したウシインスリンについての経時的な(秒)正規化蛍光(AU)の変化を示す；(a)は本発明の態様による標準PDMs流体デバイスである；(b)は追加プラズマ処理を施した標準PDMs流体デバイスである；(c)は追加プラズマ処理を施した標準黒色PDMs流体デバイスである。

【図22】図22(a)は、既知の流体力学的半径RH(nm)をもつ基準成分についてのシミュレートした拡散勾配における時点t_Dでの粒子濃度(AU)を示し、その際、成分は幅200 μm をもつモデルチャネル内で第1流体流れ(破線の左)から第2流体流れ(破線の右)へ拡散し、拡散チャネルを横切って横方向に成分集団を見ている；(b)は、流体力学的半径RH(nm)の成分について観察した強度比を示し、その際、これらの

50

成分は第2流体流れの一部分から分岐し、その部分は図22(a)に示されている；(c)および(d)はサイジングラダー(sizing ladder)実験であり、リジン、インスリンモノマーおよびダイマーの不均質混合物、-ラクトグロブリンダイマー、-シヌクリイン、BSA、BSAダイマー、および-ガラクトシダーゼについて、拡散ベースの方法により決定した流体力学的半径 R_H 値(“n μ -サイズ”；nm)を、AUCおよびPG-NMRにより決定した値(c)および成分分子量に基づいて予測した最小半径(d)と対比している。

【図23】図23(a)は、定量的標識試験に用いたタンパク質の構造の模式図を示す；(b)は、OPA標識混合物に曝露した120秒後のタンパク質について、第一級アミン濃度の変化に伴なう記録された蛍光強度(AU)の変化を示す；(c)は、時点0においてOPA標識混合物で処理したBSAタンパク質について、正規化蛍光強度(AU)の経時的な(秒)増大を示す；(d)は、OPA標識混合物に曝露した3秒後のタンパク質について、第一級アミン濃度の変化に伴なう記録された蛍光強度(AU)の変化を示す；(e)は、BSAタンパク質について、タンパク質濃度(nM)と記録された蛍光強度(AU)の関係を示し、タンパク質濃度nMが線形当てはめを固守することを示す。

【図24】図24は、本発明の態様による拡散型マイクロ流体デバイスの模式図であり、図13に示すデバイスの適応を示す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明は、多成分混合物中の成分を含めて、流体中の成分を分析するための方法および装置を提供する。本発明の方法は、接触している第1および第2流体流れの一部分を分岐させ、分岐した流れを分析する工程を含む。流れの分岐した部分は、第1および第2流体流れを横切る横方向の成分分布の一部分である。分析工程は、有利には分岐工程および存在する場合には分離工程と共にインラインで実施される。

【0028】

一般に、第1および第2流れを横切る成分分布は、第1流体流れから第2流体流れ中への成分の拡散輸送より得ることができる。しかし、第1流体流れから第2流体流れへの横方向移動を可能にする他の手法を用いてもよい。たとえば、電気泳動法を用いて第1および第2流体流れを横切る成分分布を得ることができる。

【0029】

本発明は、成分をネイティブ状態で、たとえば同様にそれらのネイティブ状態である他の成分と一緒に、分離および分岐させることができる。よって、1成分または複数成分の横方向分布は、ネイティブ状態のそれらの成分の拡散特性または電気泳動特性を表わしている。その成分が多成分混合物の一部である場合、横方向分布中の各成分の割合はネイティブ状態のそれらの成分の相対割合を表わす。

【0030】

本発明の方法は、きわめて低い濃度の成分の分析にも適する。本発明の方法はきわめて小さい試料サイズを使用し、それは成分をアトモル(attomol)レベルの感度で検出できることを意味する。成分の分子サイズを4桁の濃度範囲にわたって決定でき、一方では未標識種の不均質混合物が許容される。

【0031】

本明細書に記載するように、本発明の方法は凝集事象および解離事象を分析するために使用できる。

横方向分布の一部分を分岐させた後は、成分をそのネイティブ状態に保持する必要はない。後続の分析工程は、同定および定量に最適な条件下で実施できる。

【0032】

成分を分析するためのマイクロデバイスは知られているが、そのようなデバイスはチャネルを横切る1以上の成分の分離には適応されていない。本発明者らは、流れを横切る成分分布の開発が目的成分の分析の前駆工程として使用できる有用な分離戦略であることを見出した。マイクロ流体デバイスにおける分離工程と分析工程の組合せは、成分、複雑な

10

20

30

40

50

多成分混合物内に存在する特定のそれらの成分を調べるための改良法を提供する。

【 0 0 3 3 】

一般的方法

本発明の第一の側面の方法は、全般的に、溶液中の成分を分析すること、たとえば特性分析または定量分析に注目する。

【 0 0 3 4 】

1 以上の成分を含む第 1 流体流れを分離チャネル内で、層流が発生するように第 2 流体流れと接触させる。接触したそれらの流れは分離チャネルに沿って流れることができ、第 1 流体流れ中の成分は第 2 流体流れ中へ移動して第 1 および第 2 流体流れを横切る成分分布を得ることができる。第 1 流体流れの一部分、第 2 流体流れの一部分、または第 1 および第 2 流体流れの一部分（複数）が分岐チャネル内へ分岐し、次いで分析のために分析チャネルに流入することができる。分岐チャネル内の分岐した流れは、試薬チャネルから供給される試薬流と分析前に接触することができる。試薬流は、成分との混合および場合により反応のための試薬を供給し、それにより成分の検出および特性分析を改善することができる。

10

【 0 0 3 5 】

分離チャネル、分岐チャネルおよび分析チャネル、ならびに存在する場合には試薬チャネルは、流体デバイスのパートである。流体デバイス、特に分析チャネルは、成分の検出器と共に使用するように適応させてある。

【 0 0 3 6 】

それぞれの流れの流速は、分離、分岐および分析の工程中、実質的に一定レベルに維持される。分離、分岐および分析の工程は、各セクションのチャネルに安定した流れが樹立された場合にのみ行なうことができる。

20

【 0 0 3 7 】

成分は、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは多糖であるか、あるいはそれを含むことができる。1 態様において、成分はポリペプチドであるか、あるいはそれを含む。1 態様において、成分はタンパク質であるか、あるいはそれを含む。

【 0 0 3 8 】

成分は多成分混合物の一部分であってもよい。したがって、分離工程はその成分を他の成分から少なくとも部分的に分離するために用いられる。たとえば、本明細書に記載する手法は、特にサイズまたは電荷 - 対 - サイズ比に基づく分離を可能にする。

30

【 0 0 3 9 】

1 態様において、多成分混合物は、タンパク質、たとえばモノマー、ダイマーおよびトリマー種、または他のより高次の凝集物を含めた成分の凝集物を含む。よって、本明細書に記載する手法を用いてタンパク質 - タンパク質相互作用を分離および分析することができる。これをタンパク質インスリンについて実施例に示す。

【 0 0 4 0 】

流体流れ

本発明は、流体流れ中に供給された成分の分離および分析方法を提供する。1 態様において、流体流れという表記は液体流れの表記である。

40

【 0 0 4 1 】

流体流れは水性流であってもよい。水性流は他の溶媒、たとえば D M S O 、アルキルアルコールなどを含有してもよい。

本発明のデバイスは流体流れについての使用に適応させることができ、水性流体流れについての使用に適応させることができる。

【 0 0 4 2 】

本発明の態様において、成分はまず第 1 流体流れ中に供給される。成分は好ましくは第 1 流体に溶解される。

1 態様において、第 1 流体は 1 成分または複数成分をそのネイティブ状態に維持することができる。成分が生体分子、たとえばタンパク質である場合、流体流れは適切な緩衝液

50

であってもよい。よって、特に塩含量およびpHは成分をそのネイティブ状態に維持するように選択できる。

【0043】

第2流体流れは第1流体流れと同一であってもよく、ただし第2流体流れは成分を含有しない。

第1および第2流体流れを接触させ、第1流れ中の成分は第2流れ中へ移動でき、第1および第2流体流れを横切る成分分布を生じる。接触している流れは第1流れと第2流れの層流であってもよい。

【0044】

ある態様において、標識流を分岐流と接触させる。標識流は一般に、成分を標識するのに適した試薬を含有する液体流、たとえば水性流である。 10

ある態様において、変性流を分岐流と接触させる。変性流は一般に、成分を変性させるのに適した試薬を含有する液体流、たとえば水性流である。

【0045】

分離

本発明の方法は、第1および第2流体流れを横切って成分を分布させる工程を含む。この分布は一般に第1および第2流体流れを横切る不均一な成分分布である。

【0046】

本発明の方法は、流体流れを横切って成分を分布させる予備工程を含むことができる。よって、成分を第1流体流れ中に供給し、成分を第2流体流れに合流させ、それにより第1および第2流体流れを横切る横方向の成分分布が得られる。本明細書に記載するように、分布は第2流体流れ中への成分の拡散、または第2流体流れ中への成分の電気泳動移動を含むことができる。他の横方向分布法も使用できる。 20

【0047】

分布は、成分の、または成分を含む多成分混合物の、横方向分布である。

横方向分布は、流体流れに沿った成分分布と対比できる。たとえば、流体法を用いて流体チャネル内で種のティラー (Talyor) 分散に基づき流体流れ中の成分を分離できることが当技術分野で知られている。たとえば、US 2011/264380には、多分散種の流体力学的半径を決定する方法が記載されている。分析すべき種を単分散標準品と混合する。得られた混合物を毛管に沿って流れているキャリヤー流体流れに添加し、混合物が毛管から出るのに伴なってそのティラープロファイルを記録する。 30

【0048】

先に指摘したように、Ramseyグループはタンパク質を分離するための電気泳動法を記載しているが、タンパク質は流体流れに沿って (along) 分離され、流れを横切る (across) 不均一な成分分布はない。これは空間 (spatial) 分布よりむしろ時間 (temporal) 分布とみなすことができる。先に指摘したように、対照的に、本発明は成分を定常状態で空間的に分離させ、低濃度試料の効率的検出のための長い曝露時間を可能にする。

【0049】

本明細書に記載する分離法は、流れ中に用いる溶媒条件の性質に対して大部分は非感受性である。よって、生体分子、たとえばタンパク質をそれらのネイティブ状態で調べることができる。この方法では、分離工程における成分の挙動はその成分のネイティブ状態における特徴である。外因性条件下での成分の挙動を自然条件下での予想挙動に換算するための検量工程を分析に含める必要がない。 40

【0050】

成分が混合物 (多成分混合物) の一部である場合、その成分および混合物の他の成分はチャネルを横切って攪乱され、それによりすべての成分について第1および第2流体流れを横切る分布プロファイルが得られる。

【0051】

分岐工程は成分が第2流体流れの境界 (すなわち、チャネル壁) に到達する前に行なうことができる。成分が多成分混合物の一部である場合、分岐工程は多成分混合物中のいずれ

10

20

30

40

50

かの成分が第2流体流れの境界に到達する前に行なうことができる。

【0052】

分布プロファイルは成分を分布させるための手法、および分布のために許容される時間に依存する。一般に、分布のために許容される時間は、前記に指摘したように、第1流体流れ中の成分が第2流体流れの境界に到達していない時間である。分離チャネル内での第1および第2流れの流れ滞留時間は、採用する分離条件下で第1流体流れ中の成分が境界に到達する時間がないように選択できる。

【0053】

1態様において、成分の分布は第1流れから第2流れへの拡散であってもよい。拡散輸送の速度は成分の拡散係数Dに比例し、流体力学的半径R_Hに反比例する。よって、より小さい成分はより大きい成分より大きい速度で第2流体流れを横切って拡散すると予想される。したがって、分岐工程において、第2流体流れの壁の境界に近接した第2流体流れの一部分の分岐は、より小さいサイズをもつそれらの成分を採集するであろう。第1流体流れとの層流境界に近接した第2流体流れの一部分の分岐は、より大きいサイズをもつそれらの成分を採集することができるであろう。層流境界とチャネル境界の間にある第2流体流れの一部分の分岐は、中間サイズのそれらの成分を採集できるであろうということになる。

10

【0054】

分岐した成分のサイズは分離チャネル内の流れ分離器の位置に依存するであろう。分岐する成分の範囲は、第1または第2流体流れの総幅と比較した分岐部分の相対サイズ、および分岐する流れの部分に依存するであろう。

20

【0055】

分岐工程は第1流体流れの一部分を採集することができる。拡散分離法を用いると、より小さい成分はより大きい速度で第2流体流れ中へ拡散するので、第1流体流れ中のより小さい成分はより大きい成分より速やかに枯渇すると予想される。

【0056】

1態様において、成分の分布は第1流れから第2流れへの電気泳動移動であってもよい。電気泳動輸送の速度は成分の電荷-対-サイズ比に比例する。よって、大きい電荷および/または小さいサイズをもつ成分は、より小さい電荷および/またはサイズをもつそれらの成分と比較して、より大きい電気泳動移動をもつと予想される。

30

【0057】

成分を分離するために電気泳動を用いる場合、第2流体流れは一般に第1流体流れの両側に供給される。電気泳動に際して、負に荷電した種は一方の第2流体流れ中へ偏向されることができ、これに対し正に荷電した種は他方の流体流れ中へ偏向される。

【0058】

よって、高い電荷-対-サイズ比をもつ成分は、低い電荷-対-サイズ比をもつ成分より大きい速度で第2流体流れを横切って移動する(分岐または偏向する)と予想される。したがって、分岐工程において、第2流体流れの壁の境界に近接した第2流体流れの一部分の分岐は、高い電荷-対-サイズ比をもつそれらの成分を採集することができるであろう。第1流体流れとの層流境界に近接した第2流体流れの一部分の分岐は、低い電荷-対-サイズ比をもつそれらの成分を採集することができるであろう。層流境界とチャネル境界の間にある第2流体流れの一部分の分岐は、中間的な電荷-対-サイズ比のそれらの成分を採集できるであろうということになる。

40

【0059】

分岐した成分の電荷-対-サイズ比は、分離チャネル内の流れ分離器の位置に依存するであろう。分岐する成分の範囲は、第1または第2流体流れの総幅と比較した分岐部分の相対サイズ、および分岐する流れの部分に依存するであろう。第2流体流れの一部分の分岐は負または正の電荷をもつそれらの種のみを採集できることは認識されるであろう。

【0060】

流れ分離器は、一方の第2流体流れの一部分を採集し、それにより正または負のいずれか

50

に荷電した成分を採取するように配置することもできる。

以上に述べたのは、第1および第2流体流れを横切って成分を分布させるための拡散法および電気泳動法である。成分を分布させるための別法を使用できる。例には、等電点決定法、超遠心分離法、およびメタロプロテインの例のための磁気分離法が含まれる。

【0061】

本発明の方法は、第1または第2流れの一部分を分岐させるか、あるいは第1および第2流れの一部分（複数）を分岐させる工程を含む。

分岐工程は、第1流体流れの全部または第2流体流れの全部を分岐させる工程を含まない。

【0062】

US 2006/0263903には、1つの流体流れから他の流体流れへの成分の拡散を測定するのに適した流動装置が記載されている。成分は第1流体流れ中に供給され、それは第2流体流れと交差地点で接触することができる。第1および第2流体流れは層流を形成し、成分は第1流体流れから第2流体流れへ拡散することができる。第1流体流れと第2流体流れの接触時間は一般に短く、第1流れと第2流れはその後、分離される。第2流体流れを分析して、存在する成分の量を決定する。

10

【0063】

US 2006/0263903に記載された方法と対照的に、本発明は第2または第1流体流れの全部を分岐させるのではない。そうではなく、本発明の方法は第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1および第2流体流れの一部分（複数）を分岐させる。

20

【0064】

流体流れの一部分の分析により、ユーザーは拡散プロファイルの一部分において材料の量および素性を決定することができる。この情報はUS 2006/0263903のデバイスのユーザーには得られない。

【0065】

US 6,468,761には、分離工程の前または後に潜在性蛍光で生成物を標識することが述べられている。成分の定量的標識化を可能にする変性剤の使用については述べられていない。

30

【0066】

Kamholz et al. は、1つの流体流れから他の流体流れへの成分の拡散を測定するのに適した流動装置を記載している。そのデバイスは当技術分野で一般的であり、Brody et al. および Hatch et al. にも記載されている。そのような装置を用いて、成分流体流れとブランク流体流れを一緒にする。成分流体流れとブランク流体流れは層流を形成し、成分は成分流体流れからブランク流体流れへ拡散することができる。成分流体流れとブランク流体流れはその後に分離されず、ブランク流体流れ全体にわたって成分の拡散が測定される（たとえば、蛍光により）。

【0067】

分離工程は、クロマトグラフィーおよびティラー分離法、ならびに流体流れに沿って成分を分離するRamseyグループの別の電気泳動法（キャピラリー電気泳動）と区別することができる。そのような手法は成分を時間的に分離するものとみなすことができる。対照的に、本事例に用いる分離法は、成分を空間的に分離する。

40

【0068】

1態様において、成分は流体流れを横切って、たとえば1つの流れから他の流れへ、部分的に拡散することができる。

1態様において、2つの層流型の第2流体流れの間に第1流体流れを中心流として供給する。よって、第1流体流れ中の成分は一方または両方の第2流体流れ中へ分布することができる。

【0069】

1態様において、流れを横切る1成分または複数成分の分布を測定する。1成分または複数成分を、流体流れに沿った複数の位置で測定することができる。測定は層流を分岐させる前に行なう。拡散分布法を用いる場合、各位置は特定の拡散時間を表わす。そのような測定は、成分が検出を可能にする固有の官能基をもつ場合にのみ行なうことができる。成

50

分がそのような官能基をもたない場合、その後の標識工程で官能基を付与することができる。

【0070】

本明細書に記載するように、本発明において成分の分布に関する情報は分岐流から記録できるので、前記工程は必ずしも必要ではない。

分岐

本発明の方法は、第1および/または第2流体流れの一部分を分岐させる工程を含む。流体流れの分岐部分は成分を含有し、その成分の分析は、第1および第2流体流れの残りの部分から分離された流体流れのこの分岐部分において行なわれる。

【0071】

分岐工程は、第1流体流れの一部分、または第2流体流れの一部分、または第1および第2流体流れの一部分(複数)を採取する。1態様において、分岐工程は第2流体流れの一部分を採取する。

【0072】

分岐工程は第1流体流れの全部または第2流体流れの全部を採取することはない。第1および第2流体流れの一部分(複数)の分岐と表記する場合、これは第1流体流れの一部分および第2流体流れの一部分の分岐を表わす。層流のこの部分の分岐には、第1流体流れと第2流体流れが接触する境界が含まれる。

【0073】

分岐工程は流体流れの一部分を後続の分析のために分離する。流体流れの採取された部分は、分離工程において横方向分布プロファイルが樹立した部分である。分岐工程は、流体流れの総幅の一画分、または第1もしくは第2流体流れの幅の一画分の分離である。流体流れの分岐させる画分は特に制限がなく、分析のための成分、および存在する場合には多成分混合物中の他の成分に基づいて選択される。

【0074】

分岐工程は、第1流体流れおよび/または第2流体流れの一部分に対応する流れの部分の分離を表わす。第1および第2流体流れが最初に接触した時点では、第1および第2流体流れの間に明瞭な区別がある。前者は成分を保有し、後者は成分を保有しない。分離チャネルの下流末端では、第1流体流れからの成分が第2流体流れを横切ってその中へ移動して、第1および第2流体流れを横切る成分分布を生じている。

【0075】

本事例において、流体流れの分岐という表記は、接触している第1および第2流体流れの特定の断面部分、たとえばチャネル内の特定の領域について述べたものである。チャネルのその部分は、それがチャネルの上流部分のチャネル領域、たとえば第1流体流れが最初に第2流体流れに接触するジャンクションに相当するならば、第1流体流れの一部分であると言われる。

【0076】

たとえば、第1および第2流れが最初に接触した時点では、接触している流れはチャネルの上流部分に樹立され、そこでは第1流体流れがチャネル幅の半分を占め、第2流体流れが残り半分のチャネル幅を占めている可能性がある。流体流れの分岐部分は、第1流体流れが本来占めていたチャネル幅の半分からその部分が採取されたならば、第1流体流れの分岐部分と呼ぶことができる。この状況で、第1および第2流体流れの間の分界(demarcation)は、単純にチャネル内の中心線である。

【0077】

接触している流れの下流末端における第1および第2流体の位置は、第1流体流れで保持されている成分の分布から決定できる。たとえば、拡散分布において、きわめて大きい成分は第2流体流れ中への拡散を無視できるであろう。下流末端で、きわめて大きい成分は主に第1流体流れ中に保持されているであろう(たとえば、図8を参照;これは、本発明の態様による分離工程では第2流れ中への大きい流体力学的半径をもつ成分の拡散は最小であることを示す)。電気泳動分離では、非荷電成分は印加した電界に応答した偏向を無

10

20

30

40

50

視でき、したがって実質的に第1流体流れから外へ移動しないであろう。

【0078】

1態様において、分岐工程は少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%の第1流体流れ、第2流体流れ、または第1および第2流体流れを分岐させる。

【0079】

1態様において、分岐工程は最大で40%、最大で50%、最大で60%、最大で75%、最大で85%の第1流体流れ、第2流体流れ、または第1および第2流体流れを分岐させる。

【0080】

1態様において、分岐工程はある範囲からある量の第1流体流れ、第2流体流れ、または第1および第2流体流れを分岐させ、その際、その範囲の下および上の値は前記の最小値および最大値から選択される。

【0081】

1態様において、分岐工程は第2流体流れの一部分を分岐させる。

1態様において、第2流体流れの分岐させる部分は、第2流体流れと第1流体流れの境界から最大で第2流体流れの幅の5%、10%、15%、25%、50%または75%を横切って広がる部分であってもよい。

【0082】

1態様において、第2流体流れの分岐させる部分は、第2流体流れとチャネル壁の境界から最大で第2流体流れの幅の5%、10%、15%、25%、50%または75%を横切って広がる部分であってもよい。

【0083】

1態様において、第2流体流れの分岐させる部分は、第2流体流れと第1流体流れの境界から広がる部分、または第2流体流れとチャネル壁の境界から広がる部分を含まない。よって、分岐部分は第2流体流れの中間部分である。この中間部分は、最大で第2流体流れの幅の5%、10%、15%、25%、50%または75%であってもよい。

【0084】

流体流れの方向づけられる部分は、検出すべき成分の素性および分離工程の性質に依存するであろう。

前記の分離セクションに指摘したように、拡散および電気泳動分離法を用いて第1および第2流体流れを横切る1成分または複数成分の分布を得ることができる。流体流れの分岐させる部分は、目的の特性、たとえば特定のサイズまたは特定の電荷-対-サイズ比をもつ成分を分析するために選択することができる。

【0085】

本発明の方法は、目的の特性の異なる成分を採取するために使用できる。別の成分を分岐させるために、第1または第2流体流れの採取部分を変化させることができる。流れを分岐させる地点における成分の分布を変更するように分離法を適応させることもできる。たとえば、拡散分離における拡散時間を、流速の変化、または分離チャネルの長さの変化によって変更することができる(PCT/GB2013/052757に記載されるように)。電気泳動分離における成分の偏向は、流速の変化または印加電界の変化によって変更することができる(たとえば、Herling et al.により記載されるように)。

【0086】

結合流を流れの高さ(または深さ)の画分として分離する必要はない。本発明のデバイスにおいて、分離チャネルの下流末端に出口チャネルを適宜配置することにより流体流れを分離することができる。分岐チャネルを適宜な側部に配置して、分離チャネルからの第1または第2流体流れ(または複数の流れ)の必要部分からの流れを分岐させることができる。

【0087】

分岐しなかった残りの部分の層流を採集し、あるいはさらに詳細に後記に述べるようにそ

10

20

30

40

50

れらの部分を分析することができる。

分離チャネル内の流体流れの一部分が分岐チャネルに流入することができる。分岐チャネル内の流体は検出ゾーンと、たとえば検出ゾーンの検出チャネルと流体連通しており、そこで分離チャネルから分岐チャネル内へ送達された成分を分析することができる。

【0088】

本発明の1態様において、流体流れの複数部分を分岐させる。層流型流体流れの分岐部分のうち少なくとも1つを分析する。層流の分岐部分が第2流体流れの一部分を含有する場合、その分岐部分を分析する。

【0089】

それぞれの分岐流は、第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1流体流れおよび第2流体流れの一部分（複数）である。分岐部分のうちの1つは成分を含む。第1流体流れが複数の成分を含む場合、流体流れの複数部分のそれぞれが成分を含有してもよい。

10

【0090】

分岐流はその後、後記に述べるように下流で分析される。

本発明の1態様において、第1および第2流れの分岐部分を、分析後に流れの他の部分と再結合させる。よって、元の第1および第2流体流れ中のすべての成分をさらなる分析および使用のために採集することができる。

【0091】

流れ(flow stream)を分岐させるための流体デバイスは当技術分野で知られているが、これらのデバイスはその流れを横切る成分分布を含有する流れの一部分を分岐させる際に用いるのには適応されていない。

20

【0092】

たとえば、US 2002/0186263には、フローチャネルに沿って直列に配列された複数のフラクションコレクターをもつマイクロ流体デバイスが記載されている。そのデバイスは、各フラクションコレクター（それは単純にバルブである）がチャネル内のすべての流れをサイドチャネル内へ方向づけることができるよう設計されている。流体流れの一部分を分岐させるという示唆はない。チャネルを横切る不均一な成分分布のような成分分布も述べられておらず、拡散法または電気泳動法についても述べられていない。

30

【0093】

US 2010/0032349には、流体流れから液滴を作製するための流体デバイスが記載されている。拡散分離または電気泳動分離については述べられていない。その文書には形成された液滴をデバイスの下流末端で分離することが記載されているが、分離は流体流れの方向に沿って行なわれ、本事例の方法に要求されるように流体流れを横切って行なわれるのではない。US 2010/0032349は、層流型流体流れ、または流体を横切る成分分布には言及しておらず、流体流れの一部分を他から分岐させる工程の明確な記載はない。

30

【0094】

US 2012/0135507は主に、流動装置に用いる基材の性質、および磁性ビーズを用いて細菌を選択的に捕獲するための流動装置の使用に関係する。その文書は、拡散分離または電気泳動分離について記載しておらず、層流を横切る不均一な成分分布があるという指摘はない。実際に、US 2012/0135507は層流型流体の使用を開示しているようには思われない。その文書が分離に言及している場合、これは流体流れ中で磁性ビーズを引き離すことのみを意味するように思われ、どの割合の流体流れを分岐させるかについては考察されてない。

40

【0095】

WO 2010/004236には、材料分離フローデバイスが記載されている。このフローデバイスは、材料が主チャネルから支流チャネルに進入するのを阻止するフローバリヤーを含む。よって、成分をその中に含む流れが供給される。この流れはチャネルに沿って移動することができ、そのチャネルは支流をもつ。支流は、たとえば目的成分を含有する、流れの一部分を分析デバイスへ採取することができる。

50

【0096】

WO 2010/004236は、成分が支流に進入するのを阻止することが時には有益であると説明している。これを行なうために、主チャネル中の成分が支流に进入するのを阻止するためのバリヤー流が主流の側部に支流を横切って供給される。よって、第2流れが供給される場合、それは成分が支流内へ交差进入するのを阻止することを意図している。そのように誘導した場合、たとえば支流側に電圧を印加して動電的に下流成分の流れを方向づけた場合、目的成分のみを支流内へ取り出すことができる。

【0097】

WO 2010/004236は、フロー・チャネルの長手に沿って分離された成分の採集に使用するためのものである。WO 2010/004236には、チャネルを横切って成分を分離および採集することは記載されていない。

10

【0098】

先に述べたように、US 2006/0263903には交差地点で層流型流体流れを発生させる工程およびその後その層流を分離することが記載されている。層流は成分含有流れおよびプランク流から発生する。交差地点で、成分はプランク流中へ拡散することができる。分離は、すべてのプランク流（その時点ではある少量の成分を含有する）を残りの成分含有流れから分岐させることを伴なう。US 2006/0263903には、成分流またはプランク流の一部分（のみ）を分岐させる工程は記載されていない。US 2006/0263903は単一成分に用いるのに適するにすぎないと思われ、それが多成分混合物を分離するのに適する可能性または予想は示唆されていない。

20

【0099】

分析

本発明の方法の工程（v）において、成分を含む流体流れの分岐部分を分析する。

分析工程は、成分を分析用に調製することを含めて、流体流れの分岐部分を調製する予備工程を含むことができる。

【0100】

ある態様において、本発明の方法は成分を第2流れに合流させる工程を含み、その際、成分はネイティブ状態である。この形態では、成分は分析に適さない可能性がある。よって、本発明の方法は成分を分析用に調製する工程を含むことができ、それは成分の変性を含むか、またはそれを伴なうことができる。有利には、1成分または複数成分の分布はネイティブ条件下で行なうことができ、後続の分析工程は成分の最適特性分析のために別の条件下で実施することができる。

30

【0101】

一般に、UV/vvisおよび蛍光分光分析を含めた分光分析により、好ましくは蛍光分光分析により、成分を分析する。蛍光分光分析は高いシグナル対ノイズ比をもたらすので、特に魅力的である。

【0102】

1態様において、分岐流を試薬流と接触させ、試薬流中の1以上の試薬を分岐流中の成分と混和させ、場合により反応させる。適切な混和および反応の後、分析を行なう。成分を流体流れ内で分析することができる。試薬は標識であってもよく、あるいは検出可能な標識を反応に際して生成してもよい。

40

【0103】

本発明の1態様において、成分を分離後に、たとえば分岐後に標識することができる。標識プロセスは成分の分析のための検出工程の一部である。

標識の付加は分離した成分を検出するため必要である可能性がある。たとえば、成分は分光分析によりそれを検出できるのに適切または十分な官能基をもたない可能性がある。たとえば、発色基を全くまたはわずかしかもたない場合、分析前に1以上の発色基で成分を標識することが有益である可能性がある。

【0104】

1態様において、分離後に成分に1以上の発色標識、たとえば蛍光標識を付与する。

50

1 態様において、標識は潜在性標識である。潜在性標識は、それが成分と会合した場合にのみ分光学的に活性、たとえば蛍光活性である標識である。他の場合には、その標識は分光学的に不活性である。よって、潜在性標識は成分と会合した場合にのみ検出でき、成分との会合を形成しなかった標識は分光学的に不活性なままである。反応しなかった標識を流体流れから分離する必要性、または記録された分光シグナルに対する標識の関与を割り引く必要性がないので、成分の検出が簡略化されることになる。

【 0 1 0 5 】

たとえば、本明細書に記載するように、成分との反応により標識上に存在するその蛍光を消光させる基が除かれ、それにより消光が除かれる場合がある。他の例では標識反応中に、たとえば伸長した共役系の形成により、蛍光基などの標識が形成される。

10

【 0 1 0 6 】

1 態様において、標識を成分に共有結合させる。よって、標識工程は標識と成分の間に 1 以上の共有結合を形成することを含む。共有結合は、成分上のアミノ、ヒドロキシまたはチオール基と形成することができる。成分がポリペプチド、たとえばタンパク質である場合、共有結合はアミノ酸残基側鎖官能基と形成することができる。

【 0 1 0 7 】

他の態様において、非共有結合標識を使用でき、それらは成分に対して特異的または非特異的であってよい。成分に対する非共有結合標識の例は、Ramsey グループが記載している（参照：たとえば、Liu et al. Anal. Chem. 2000, 72, 4068）。

20

【 0 1 0 8 】

1 態様において、成分の標識はアミノ官能基、たとえば第一級アミノ官能基 (- N H 2) と反応する。成分がポリペプチド、たとえばタンパク質であるか、あるいはそれを含む場合、標識はポリペプチドのリジン残基と反応することができる。ヒドロキシル (- O H) 、カルボキシル (- C O O H) およびチオール (- S H) 官能基との反応のための標識も使用できる。成分がポリペプチド、たとえばタンパク質であるか、あるいはそれを含む場合、標識は、たとえばポリペプチドのセリンもしくはトレオニン、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸、またはシステイン残基と反応することができる。

【 0 1 0 9 】

1 態様において、標識はオルト - フタルアルデヒドまたはオルト - フタルアルデヒド含有化合物に由来する。それらはアミノ官能基を標識するために特に有用であり、本明細書に記載するようにポリペプチドを標識するために特に有用である。

30

【 0 1 1 0 】

本発明者らは、オルト - フタルアルデヒド (O P A) を本発明の流動法において潜在性共有結合標識として好都合に使用できることを見出した。O P A は成分の 1 以上のアミノ基と反応して検出可能な蛍光標識を形成することができる。O P A を、好ましくはチオール含有試薬、たとえばアルキルチオール、たとえば - メルカプトエタノール (B M E) の存在下で成分のアミノ基と反応させる。

【 0 1 1 1 】

1 態様において、標識反応は実質的に定量反応である。よって、1 態様において、実質的にすべての分岐成分が標識される。さらに、成分が標識と反応しうる複数の基を含む場合、実質的にそれらの基のすべてが標識と反応する。よって、記録された分光シグナルを用いてその流れ中の成分を直接定量できる。さらに、高度の標識化（すなわち、全成分標識化、および / または多数の標識をもつ成分）は、一般に流体流れ中の成分の検出を改善する。これは、成分がきわめて低い濃度で存在する流れ条件下において特に重要である。

40

【 0 1 1 2 】

標識反応はフローシステムに使用するのに適切でなければならない。よって、デバイス内での流体の滞留時間は長くないので標識反応が比較的短い時間枠で起きることが重要である。本発明者らは、O P A 標識が速やかにタンパク質などの成分と反応し、したがって本明細書に記載する流動法に使用するのに適切であることを見出した。

【 0 1 1 3 】

50

1 態様において、標識反応時間は最大で 5 秒、最大で 2 秒、最大で 1.5 秒または最大で 1 秒である。標識反応時間は、少なくとも 50 モル%、少なくとも 80 モル%または少なくとも 90 モル%、好ましくは 90 モル%の成分を標識するのに要する時間を表わすことができる。1 態様において、標識反応時間を反応半減期と呼ぶことができる。

【 0114 】

本発明者らは、ある標識は本発明の方法に用いる流れ条件下で不安定である可能性があることを見出した。よって、標識は経時的に分解する可能性があり、それは分析工程に際して検出されるシグナル強度を低下させる影響をもつ。よって、記録された成分濃度は試料中の実際の成分濃度より低いというリスクがある。

【 0115 】

たとえば、オルト・フタルアルデヒド (O P A) とアミノ基、たとえばポリペプチドのアミノ酸残基中に存在するアミノ基との反応から形成された蛍光体は高い化学的安定性をもたないことが知られている（参照：Jacobs et al.; Daito et al. and Nakamura et al.）。

10

【 0116 】

本事例の方法は、標識工程が完了した後、標識された成分をきわめて速やかに分析することができる。標識された成分のシグナル強度が最大に達した時点で、標識工程は完了したとみなすことができる。ほぼシグナル強度が最大に達する時点またはその直後に成分を定量または同定するのに適した分析測定を行なうことができる。

【 0117 】

本発明の方法において、本発明者らは潜在性標識、たとえばオルト・フタルアルデヒド (O P A) が成分と速やかに反応して標識された成分を生成することを見出した。標識工程は、シグナル強度、たとえば蛍光強度により判定して 3 秒ほどの短い期間内に完了し、標識反応中に最大強度に達する可能性がある。成分の分析は標識反応の開始から 3 秒付近、または直後に行なわれることになる。そのような分析は本明細書に記載する流体システムを用いて十分に実施できる。

20

【 0118 】

1 態様において、本発明の方法は分析工程 (v i) の前に標識工程 (v) を含み、分析工程は標識工程の開始直後に実施される。たとえば、分析工程は標識工程の開始から最大で 1 秒、最大で 2 秒、最大で 3 秒、最大で 5 秒、最大で 10 秒、最大で 20 秒または最大で 30 秒以内に実施できる。

30

【 0119 】

標識工程の開始は、流体流れ中の成分が標識化試薬と、たとえば流体ジャンクションで最初に接触できた時点を表わすことができる。

ある態様において、成分は前記の分光法、たとえば蛍光分光分析を用いて検出できる官能基を本来保有するので、成分を標識する必要はない。たとえば、成分が蛍光活性基を保有する場合、これらをその成分の蛍光検出のために使用できる。

【 0120 】

ポリペプチドであるか、あるいはそれを含む成分は、アミノ酸であるトリプトファン、チロシンおよびフェニルアラニンをもつ可能性があり、それらの側鎖は蛍光活性をもつ。しかし、これらの残基の存在は成分を検出できるのに十分ではない可能性がある。たとえば、チロシンおよびフェニルアラニンの蛍光活性はきわめて弱く、したがって検出が困難である。ポリペプチド中にトリプトファン、チロシンおよびフェニルアラニンのアミノ酸残基がほとんどない場合、蛍光シグナルは弱い可能性がある。これらの場合、より大きい蛍光活性をもつ蛍光標識を供給することが好ましいであろう。O P A 由来の標識は使用できる標識の例である。

40

【 0121 】

本発明の方法が分岐成分を標識する工程を含む場合、標識を場合により標識反応のための関連試薬と共に含む流体流れ（標識流体流れ）と分岐流を接触させる。分岐流と標識流体流れを流れ分離器の下流のジャンクションで一緒にする。

【 0122 】

50

成分と標識が流体流れ中で混和し、それにより成分を標識することができる。デバイス内で標識するための適切な時間を確保するために、たとえば分光分析の前に標識するための適切な時間が得られるように、標識流と分岐流を混合チャネルに沿って流すことができる。

【0123】

一般的な1態様において、成分の二次、三次および／または四次構造、たとえば二次または三次構造、好ましくは三次構造が、分離工程の後、分析前に変化している。

本明細書に記載する標識法を用いると、適切に標識するために成分の二次構造を攪乱する必要はなく、三次および／または四次構造（存在する場合には）を変化させれば十分であることを本発明者らは見出した。

【0124】

1態様において、成分を分析前に変性させる。

変性工程は、成分上または成分内にある、成分の標識化および／または検出に役立つ可能性がある官能基を利用できるようにするためのものである。たとえば、成分がポリペプチド、たとえばタンパク質である場合、変性工程はアミノ、ヒドロキシおよびチオール官能基を標識との反応のために露出させることができる。

【0125】

成分の変性は、変性試薬を流体流れに添加することにより実施できる。たとえば、成分がポリペプチドである場合、SDSを変性試薬として使用できる。

変性工程は変性試薬の使用に限定されず、変性を達成するために環境、たとえば温度の変化を使用できる。

10

【0126】

成分を標識化の前に変性させることができる。変性工程と標識工程の分離を、連結した変性および標識工程に際して起きる可能性がある成分の沈殿を最小限にするために行なうことができる。

【0127】

変性工程に変性試薬を利用する場合、変性試薬を分岐流と接触している流体流れ（変性流）中に供給することができる。分岐流と変性流体流れは流れ分離器の下流のジャンクションで一緒になる。成分と変性試薬は流体流れ中で混和し、それにより成分を変性させることができる。変性流と分岐流は、デバイス内での変性のための適切な時間を確保できるように、たとえば標識流（用いる場合）と接触する前または分光分析の前に変性のための適切な時間が得られるように、混合チャネルに沿って流れることができる。

30

【0128】

本方法が成分を標識する工程をも含む場合、標識工程は変性工程の下流で行なわれる。あるいは、1つの組み合わせた工程で成分を変性および標識することができる。組み合わせた変性および標識工程は、成分の沈殿のリスクがほとんどない場合に使用できる。よって、1態様において、標識流体流れはさらに変性試薬を含むことができる。本明細書に示すように、分岐流と標識流（変性剤を含有）を接触させるジャンクションは、変性問題を処理するように適応させることができる。よって、ジャンクションでの流体チャネルの表面は、流れ中の成分をはじくものであり、たとえば疎水性成分がチャネル表面に付着するのを阻止するために親水性表面を使用できる。

40

【0129】

分岐流が標識流または変性流と接触する際、流れの含有物はそれが接触する流れの含有物と速やかに混合できることができが好ましい。速やかな混合は成分の速やかな標識化または変性を確実にするためである。これは、第1流体流れと第2流体流れを接触させる工程と対比すべきである；その場合は、第1および第2流れの両方を横切って成分を速やかに分布させが必要または望ましいわけではない。たとえば、拡散分離工程で分離チャネル内に均一な成分分布が早期に樹立するのは望ましくない；これは成分を分離できないからである。拡散分離のためには、第1および第2流体流れを横切る不均一分布プロファイルを樹立する必要がある。

【0130】

50

流動装置

本発明は、本発明の方法に使用するために適応させた流動装置を提供する。この流動装置は、第1流体流れと第2流体流れを接触させて層流を形成することができる。この流動装置は、第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1流体流れおよび第2流体流れの一部分（複数）を下流の分岐チャネル内へ分岐させるように適応させてある。分岐チャネルは分析チャネルと流体連通しており、その結果、分岐チャネルからの流れは分析のために分析チャネル内へ供給されることになる。場合により、分岐チャネルからの流体流れは、上流の試薬チャネルから供給される試薬流体流れと接触することができる。

【0131】

本発明のフローデバイスは、一体化したチャネルのネットワークをもつ一体デバイス、たとえばモノリシックデバイスであってもよい。よって、このデバイスはデッドボリュームをもたず、バンド幅拡大が制限される。

10

【0132】

流動装置は細い流体チャネル、特にマイクロ流体チャネルを利用し、したがってきわめて小さい試料体積を分析できる。よって、マイクロリットル未満の体積の流体中に供給される成分を本明細書に記載する方法により分析できる。さらに、測定時間を適宜延長することにより、流体流れ手法を用いてきわめて希薄な試料を分析できる。

【0133】

本明細書に記載するように、本発明の第二の側面の流動装置は、第1および第2流れのための分離チャネルを含み、分離チャネルは下流の流れ分離器および検出ゾーン（流れ分離器の下流にあってそれと流体連通している）と流体連通し、その際、分離チャネルは成分が第1流れと第2流れの間で成分が横方向移動できるように適応させ、流れ分離器は第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1流体流れおよび第2流体流れの一部分（複数）を分離チャネルから分岐させるように適応させてある。

20

【0134】

分離チャネル、分岐チャネルおよび検出チャネルの断面は一般にマイクロメートルの範囲であり、したがって本発明の第一の側面の方法に使用するための流体デバイスをマイクロ流体デバイスと呼ぶことができる。

【0135】

本発明はまた、本明細書に記載するマイクロ流体デバイスを提供する。

30

第1流体および第2流体流れを保持するためのマイクロ流体チャネルの使用は、低いレイノルズ数(Reynolds number)で流れが起きるのを確実にする。本明細書に記載する拡散分離工程下では、対流および拡散がシステム内での質量輸送の唯一の関連メカニズムである。したがって、本明細書にさらに詳細に記載するように、これによって特定サイズの各成分について正確な数値計算を行なうことができる。分離のために電気泳動法を用いる場合、対流および電気泳動がシステム内での質量輸送の唯一の関連メカニズムである。

【0136】

分離チャネルは、内部で2つ（または3つ）の流れの層流を発生させて維持することができる適切な寸法をもつ。2つの流れの層流は、それらの流れが平行であり、かつ安定であることを意味する。よって、一般に流体が再循環する領域がなく、乱流は最小限に抑えられる。一般に、そのような状態は細いチャネル、たとえばマイクロチャネルにより提供される。

40

【0137】

デバイス内のチャネルの一般的寸法は、妥当な移動速度および分析時間を提供するように選択される。デバイスの寸法も、十分な分析操作に必要な流体の量を減らすように選択できる。

【0138】

流体流れを横切る成分拡散に使用するための、たとえば分散測定に使用するためのデバイスは当技術分野で周知であり、たとえばKamholz et al. (Biophysical Journal 80(4):1967-1972, 2001)により記載されている。

50

【 0 1 3 9 】

流体流れを横切る電気泳動に使用するためのデバイスは当技術分野で周知であり、たとえばHerling et al. (Applied Physics Letters 102, 184102-4 (2013))により記載されている。よって、チャネルを横切って荷電成分を偏向させる(分布させる)ために、分離チャネルにチャネル長手に沿って並べて電極を備えることができる。これは、Ramseyグループにより記載されたチャネル長手に沿って成分を分布させるために電極をチャネル末端に配置するデバイスと区別できる。

【 0 1 4 0 】

分離チャネルは、安定な流体流れを発生させ、流れを横切って成分を適切に分離することができる適切な寸法をもつチャネルである。

分離チャネルは、第1流体流れを第2流体流れと接触させる領域である。

10

【 0 1 4 1 】

本明細書中で分離チャネルという表記は、実質的に長方形の断面をもつチャネルを表わす。よって、分離チャネルは実質的に平坦な底面と共にそれから実質的に垂直に伸びる壁で形成することができ、場合により上カバーを備えている。一般に、底面および壁はシリコーン基材に形成される。カバーはガラスカバー、たとえば標準的なスライドガラスまたはホウケイ酸ウェハーであってもよい。

【 0 1 4 2 】

一般に、デバイス内の他のチャネル、たとえば流れ分離器も、実質的に長方形である。

分離チャネルは、第1流体を供給するための1以上のリザーバーと流体連通している。分離チャネルは、第2流体を供給するための1以上のリザーバーと流体連通している。

20

【 0 1 4 3 】

一般に、流動装置は第1供給チャネルおよび第2供給チャネルを含み、それらのチャネルは下流の分離チャネルと流体連通している。第1供給チャネルは第1流体流れを保持するためのものであり、第2供給チャネルは第2流体流れを供給するためのものである。第1および第2供給チャネルは、第1および第2流体流れを層流状に保持するように適応させた下流の分離チャネルとのジャンクションで出会う。これらのチャネルはリザーバーと分離チャネルの間の流体連通を提供する。

【 0 1 4 4 】

1態様において、分離チャネルは第1大断面チャネル、および大断面チャネルの下流にあってそれと流体連通している第2小断面チャネルを含む。

30

本発明者らは、第1流体と第2流体が最初に接触するジャンクションに大断面チャネルを用いることにより流体停滞が最小限に抑えられることを見出した。そのようなチャネルはPCT/GB2013/052757に記載されている。

【 0 1 4 5 】

流体の流れは分離チャネルの縦軸に沿っている。第1流れから第2流れへの1成分または複数成分の移動、たとえば1成分または複数成分の拡散は、流れの縦軸に対してチャネル幅を横切る横断方向である。

【 0 1 4 6 】

本発明の流動装置は、PCT/GB2013/052757に記載した本発明者らの先の研究のフローデバイスを含むことができ、その内容を全体として本明細書に援用する。

40

流動装置は、分離チャネルから下流にあってそれと流体連通している流れ分離器を含む。流れ分離器は、層流の一部分を採集するために、特に第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1および第2流体流れの一部分(複数)を採集するために、分離チャネルの一部を横切って配置されたチャネルである。このチャネルの位置および幅は、採集すべき層流の部分および採集すべき流れの割合に応じて選択される。

【 0 1 4 7 】

流れ分離器は分離チャネルから流れの一部分を分岐させる。流れ分離器は下流の検出ゾーンへ分岐流を供給し、それと流体連通している。

検出ゾーンは、上流の流れ分離器からの流体流れを保持するための検出流体チャネルを含

50

む。検出ゾーンは、検出流体チャネル内に保持されている成分を分析するための分析デバイスを含むことができる。

【0148】

1態様において、検出流体チャネルは1以上の上流流れ供給チャネル、すなわち流れ分離器の下流にある流体チャネルと連通している。これらの流れ供給チャネルは標識および変性試薬を検出流体チャネル内へ供給するためのものである。それぞれの供給チャネルは、関連試薬、たとえば標識および変性試薬を保持するための上流のリザーバーと連通状態にあることができる。

【0149】

本明細書に記載するように、標識および変性試薬を一緒に1つの流体流れ中に供給することができる。よって、単一の供給チャネルを検出チャネルの上流に備えることができる。この供給チャネルはジャンクションで検出チャネルと接する。

10

【0150】

本明細書に記載するように、標識と変性試薬を別個の流体流れ中に供給することができる。よって、第1供給チャネルを、変性試薬を検出チャネル内へ送達するために備えることができる。第2供給チャネルを、標識を検出チャネル内へ送達するために備えることができる。第1および第2供給チャネルは、それぞれ第1および第2ジャンクションで検出チャネルと接する。第1ジャンクションは第2ジャンクションの上流に配置される。

【0151】

分岐流を検出チャネル内で標識流および/または変性流と混合させる場合、検出チャネルは、分岐流中の成分と標識および/または変性試薬との適切な混合を確実にするために混合ゾーンを備えていてもよい。混合ゾーンは単に、検出チャネルの延長部であって流体を混合して成分を反応させるのに十分な流れ滞留時間を提供するものを表わすことができる。混合ゾーンは混合を増強するための非直線のパスをもつことができる。そのようなチャネル構造の使用は当業者に周知である。

20

【0152】

分析デバイスは特に制限されず、流動装置、特にマイクロ流体デバイスと共に用いるのに適したデバイスを含む。成分の種々の物理的および化学的特性を決定するために複数の分析デバイスを備えててもよい。分析デバイスは連続的または並列に配列することができる。

30

【0153】

分析デバイスは意図する成分標識または意図する成分の固有分光特性との組合せで選択することができる。

1態様において、分析デバイスは蛍光光度計である。

【0154】

1態様において、分析デバイスは乾燥質量測定デバイス、たとえば石英結晶ミクロ天秤である。本発明の方法およびデバイスは、GB 1320127.2の乾燥質量方法および装置と一緒に使用できる。

【0155】

1態様において、デバイスは分析ゾーンからの排出流を採集するためのリザーバーを含む。

1態様において、デバイスは分離チャネルからの非分岐流を採集するためのリザーバーを含む。

40

【0156】

分析ゾーンからの排出流および分離チャネルからの非分岐流と一緒にリザーバーに採集してもよい。

リザーバー内の成分をさらなる使用および分析のために採集することができる。

【0157】

本発明のデバイスは、流体に分離チャネル、流れ分離器および検出ゾーンを貫流させる。流体デバイス、たとえばマイクロ流体デバイスを通り抜ける流れの樹立は当業者に周知である。たとえば、種々の流体チャネルのためのリザーバーであるシリンジポンプにより流体流れを供給することができる。あるいは、デバイス内への流体の重力供給により流体流

50

れを樹立することができる。他の別形態において、たとえばシリンジポンプを用いてデバイスを通り抜けた液体をデバイスの流体出口から吸引することにより流体流れを樹立することができる。

【0158】

本発明のデバイスは、1以上のこれらの異なるフローシステムを組み込みまたは使用することができる。

本発明のデバイスは、一部は、標準的なフォトリソグラフィー法、たとえば本明細書に記載するものを用いて作成できる。

【0159】

流体デバイスのチャネル表面は、成分が表面に付着するのを阻止するように適応させることができる。よって、1態様において、チャネル表面は成分が表面に吸収されるのを制限または阻止する。

【0160】

1態様において、流体デバイス内のチャネルは親水性または疎水性である。本発明者らは、特に検出ゾーンに親水性チャネル表面を用いることにより疎水性成分、たとえば疎水性タンパク質の吸収が阻止され、それによりデバイスにおける成分の分析が改善されることを見出した。同様に、親水性成分の吸収を阻止するために疎水性チャネルを使用できる。

【0161】

特に、本発明者らは、親水性または疎水性チャネル表面の使用は成分を標識化および変性する段階で有益であることを見出した。標識工程で生成する不溶性物質の量が最小限に抑えられる。

【0162】

親水性チャネルは、当業者によく知られている手法を用いて作成できる。たとえば、デバイス内のチャネルをP D M Sから作成する場合、その材料をプラズマ処理して表面を親水性にすることができる。この場合、プラズマ処理により親水性シラノール基がチャネルの表面に生成する。そのような手法は、Tan et al. (Biomicrofluidics 4, 032204 (2010))により記載されている。

【0163】

1態様において、マイクロ流体デバイス内のチャネル、たとえば検出ゾーン内のチャネルは親水性または疎水性の表面をもつ。

1態様において、マイクロ流体デバイス内のチャネル、たとえば検出ゾーン内のチャネルは、その表面にヒドロキシル基をもつ。1態様において、マイクロ流体デバイス内のチャネル、たとえば検出ゾーン内のチャネルは、その表面にシラノール基をもつ。

【0164】

インフロー標識化

本発明のさらなる側面において、本発明者らは、流体デバイス内で、より具体的には流体流れ内で成分を標識化するための方法を確立した。成分は層状の第1および第2流体流れを横切る不均一分布で得られる。先に記載したように、第1および第2流体流れを横切る成分の分離は、成分がそのネイティブ状態を保持している条件下で実施できる。分布すると、成分を次いで後続の分析のために標識することができる。

【0165】

標識法は下記の工程を含む：

(i i i) 接触している第1および第2流体流れ、たとえば第1および第2層流型流体流れ (laminar flow) を横切って成分を分布させる；

(i v) 第1流体流れの一部分、第2流体流れの一部分、または第1流体流れおよび第2流体流れの一部分(複数)を分岐させ、その際、分岐した部分は成分を含む；

(v) 分岐した部分の流体流れ中の成分を標識する；ならびに場合により

(v i) 分岐した部分の流体流れ中の成分を分析する。

【0166】

1態様において、本方法は、

10

20

30

40

50

(i) 第 1 流体流れ中に成分を供給する；

(i i) その流体流れを層流が発生するように第 2 流体流れと接觸させる

予備工程を含み；そして

工程 (i i i) により成分を第 2 流体流れに合流させ、それにより第 1 および第 2 流体流れを横切る成分分布を得る。

【 0 1 6 7 】

1 態様において、工程 (i v) は、第 2 流体流れの一部分を分岐させる。

1 態様において、工程 (v i) が存在する。

本発明者らは、標識工程および分析工程は標識工程が目的成分に蛍光発生標識を導入する場合に最も効果的であることを見出した。標識化は、標識が共有結合標識である場合に同様に最も効果的である；これにより、色素結合親和性に対する成分濃度およびコンホメーションモチーフの変動の影響が除かれるからである。成分の配列、構造または濃度に関係なくすべての適切な反応基を標識することも有利である。標識化は、それが速やかであり、秒から分の時間規模のマイクロ流体実験で完了に達する（たとえば、定量的レベルで）場合に、同様に最も効果的である。

10

【 0 1 6 8 】

本事例には、標識された成分の生成のためにオルト - フタルアルデヒド (O P A) を使用することを記載する。

本発明のこの側面の他の態様は、成分を分析する方法について前記に述べたとおりである。

【 0 1 6 9 】

20

本発明の例示的な方法およびデバイス

本発明は、好ましくは本明細書に記載するマイクロ流体装置を用いて、流体流れ中の成分を分離および分析するための方法を提供する。添付の図面を参照して、本発明の多様な態様の記載を以下に述べる。

【 0 1 7 0 】

本発明のデバイスは、混合物中の成分を分離および検出するためのものである。この装置は第 1 および第 2 層流のための分離チャネルを含み、分離チャネルは下流の流れ分離器と流体連通している。検出ゾーンが備えられ、それは流れ分離器の下流にあってそれと流体連通している。分離チャネルは、接觸している流れ、たとえば層流間で成分が横方向移動できるように適応させてあり、流れ分離器は第 1 流体流れの一部分、第 2 流体流れの一部分、または第 1 流体流れおよび第 2 流体流れの一部分（複数）を分離チャネルから分岐させるように適応させてある。検出ゾーンは検出ゾーンの流体チャネル内の成分を分析できるように適応させてある。

30

【 0 1 7 1 】

図 1 (A) の挿入図に示すのは、本発明の 1 態様によるマイクロ流体デバイスの概略図である。このデバイスをさらに詳細に図 1 3 に示す。このデバイスは成分を拡散法により分離するのに適切である。このデバイスは、下流の流れ分離器 7 (それは下流の検出ゾーン 9 と流体連通している) と流体連通した分離チャネル 1 を含む。

【 0 1 7 2 】

40

このデバイスは分離チャネル 1 を備え、それは上流の第 1 流体流れチャネル 2 および上流の第 2 流体流れチャネル 3 により供給される。第 1 および第 2 流れチャネルはジャンクション 4 で合流する。第 1 および第 2 チャネルは、それぞれ上流のリザーバー 5 および 6 により供給される。第 1 リザーバー 5 は、成分を場合により他の成分と一緒に、たとえば多成分混合物の一部として含有する流体を供給する。第 1 流体はリザーバーを出て第 1 流体チャネルに沿って流れることができる。ジャンクション 4 において、第 1 流体流れは、第 2 リザーバー 6 から第 2 流体チャネルを経由して供給された第 2 流体流れと接觸することができる。

【 0 1 7 3 】

第 1 および第 2 流体流れは分離チャネル 1 内で層流になることができる。この流れが分離チャネル 1 を通過するのに伴なって、第 1 流体流れ中の成分は第 2 流体流れ中へ拡散する

50

ことができる。異なるサイズ（異なる流体力学的半径）の成分は異なる速度で拡散し、それにより第1および第2流体流れを横切る拡散プロファイルが生じる。より大きい成分と比較して、より小さい成分は第2流体流れのチャネル壁における境界へ向かってより速やかに拡散するであろう。

【0174】

本明細書に記載するように、第1および第2流体流れチャネルのジャンクション4が大きい断面をもつチャネルであってそれがその後に下流の小さい断面のチャネルになってもよい（これは図13に示されていないが、図5（A）に示すデバイスに見ることができる）。

【0175】

分離チャネル1の下流末端に、流れ分離器7が備えられている。流れ分離器は、第1もしくは第2流体流れの一部分、または第1および第2の両方の流体流れの一部分（複数）を分岐させる。図13の流れ分離器は第2流体流れの一部分、より具体的にはより小さいサイズ（すなわち、第2流体流れのチャネル壁における境界へ向かってより速やかに拡散したもの）の成分を随伴する第2流体流れの一部部分を分岐させることを意図している。

【0176】

流れ分離器7は、第2流体流れの一部分を採取するために第2流体流れの一部分を横切って配置される。分岐流は下流の検出ゾーン9の検出チャネル8内に入る。

分岐工程は一般に第1流体流れ中の成分が第2流体流れのチャネル壁における境界へ拡散してしまう前に行なわれる。よって、成分の拡散プロファイルは第1および第2流体流れを横切って不均一である（成分は第1および第2流体流れを横切る平衡分布に達していないからである）。

【0177】

層流の残りの部分を採取し、採取チャネル11を経由して下流の出口リザーバー10へ流す。

検出ゾーン9は、上流の流れ分離器7と流体連通した検出チャネル8を含む。検出チャネル8は、ジャンクション13で検出チャネル8と合流する上流の標識チャネル12とも流体連通している。標識チャネルは上流の標識リザーバー14から供給される。場合により変性剤を含有する標識混合物は、標識リザーバー14に供給され、ジャンクション13において標識チャネル12を経由して検出チャネル内の流れと合流できる。こうして、標識化剤を分離チャネル1から分岐した流れ（分岐流）中へ供給できる。

【0178】

標識流は検出チャネル8に合流して進入し、標識化剤が成分を標識する。標識流と分岐流を成分の標識化に十分な時間、混和することができる。検出チャネル8内の流体を次いで検出ゾーン9の分析領域15において、たとえば蛍光分光分析を用いて分析する。分析が完了すると、検出チャネル内の流体は検出ゾーン9を出て下流の出口リザーバー10に採取される。検出チャネル8は採取チャネル11と合流し、それにより分離チャネル1からの流体流れは再結合する。

【0179】

デバイスのさらに他の適応を図12に示す；そこでは検出チャネル8が上流の標識チャネル12および上流の変性チャネル18と流体連通している。標識化および変性の各チャネル12および18は、それぞれジャンクション13および19で検出チャネル8と合流する。変性チャネルのジャンクション19は、標識チャネル12と検出チャネル8のジャンクションの上流にある。検出チャネル8内の分岐流は最初に変性チャネル18から供給される変性剤と接触し、それにより分岐流中の成分が変性する。この流れをその後、標識チャネル12からの標識流と接触させ、それにより流れ中の（変性した）成分を標識する。ジャンクション13と19の間の距離は、流体流れ中の成分を完全に変性させるのに十分である。

【0180】

他の態様において、たとえば図7および13に示すように、変性剤と標識は一緒に標識流に供給される。

10

20

30

40

50

図1(A)および図13のデバイスの適応を図7(A)に示す。ここでは、検出チャネル8はジャンクション13の下流に混合ゾーンをもつ。混合ゾーンは、分析前に標識化するのに十分な時間、検出ゾーン9の分析チャネル15内で、標識化物質を分離ゾーンからの分岐流と混和させる。

【0181】

図1(A)および図13のデバイスのさらなる適応を図10に示す。このデバイスでは、分離チャネル1からの流れの一部分を前記のように分岐させ、別個の工程で変性および標識し、前記のように分析する。

【0182】

流れの残りの部分をさらに分割した複数の流れとして採集する。これらのさらに分岐させたそれぞれの流れ中の成分を、前記の分岐流に関する記載と同様に標識および分析する。こうして、分離チャネル1内の流体流れを3つの流れに分離し、その際、3つの流れはそれぞれ異なる成分混合物を含み、それは異なる拡散特性をもつ成分の代表である。その流れ中のすべての成分を、それらの分離した形態でその後分析する。よって、本発明のデバイスは第1流体流れ中に供給されたすべての成分の分離および完全な分析のためのものである。

10

【0183】

本発明の他のデバイスを図14に示す。このデバイスは成分を電気泳動法により分離するのに適切である。このデバイスは、下流の流れ分離器7(それは下流の検出ゾーン9と流体連通している)と流体連通した分離チャネル1を含む。

20

【0184】

このデバイスは、大きい断面の領域1aおよび小さい断面の領域1bをもつ分離チャネル1を備え、それは上流の第1流体流れチャネル2ならびに上流の第2流体流れチャネル3aおよび3bにより供給される。第1および第2チャネルはジャンクション4で合流する。第1および第2チャネルは、それぞれ上流のリザーバー5および6により供給される。第1リザーバー5は、ある成分を場合により他の成分と一緒に含有する流体を供給する。第1流体はリザーバーを出て第1流体チャネルに沿って流れることができる。ジャンクション4において、第1流体流れは、第2リザーバー6から第2流体チャネル3aおよび3bを経由して供給される第2流体流れに接触することができる。

30

【0185】

流体ジャンクションに大断面チャネルを用いるのは、ジャンクションにおける停滞を低減することと関連する。参照：たとえば、PCT/GB2013/052757。

第1および第2流体流れは分離チャネル1内で層流になることができる。第2流体流れは第1流体流れのいずれの側にも供給される。電極16および17が分離チャネル1のいずれの側にも備えられる。これらの電極は電源(図示していない)と電気的に接続している。使用に際して、電極は分離チャネル1、たとえば分離チャネル1の小さい断面の領域1aを横切る電界を供給する。

40

【0186】

流れが分離チャネル1を通過するのに伴なって、第1流体流れ中の成分は印加電界に応答して第2流体流れ中へ偏向する。偏向の方向および程度は、第1流体流れ中の1成分または複数成分の電荷および電荷-対-サイズ比に依存する。

【0187】

異なる電荷の成分は電極16または電極17のいずれかに向かって一定方向に偏向する。電荷-対-サイズ比が異なる(かつ同じ電荷をもつ)成分は異なる量が第2流体流れ中へ偏向する。

【0188】

より高い電荷および/またはより小さいサイズをもつ成分は、より小さい電荷および/またはより大きいサイズをもつ成分と比較して、第2流体流れのチャネル壁における境界の方へより大きく偏向するであろう。

【0189】

50

分離チャネル 1 の下流末端に、流れ分離器 7 が備えられている。流れ分離器は、第 1 もしくは第 2 流体流れの一部分、または第 1 および第 2 の両方の流体流れの一部分（複数）を分岐させる。図 1-4 の流れ分離器は、第 2 流体流れの一部分、より具体的には特定の電荷をもつ成分（すなわち、電極 1-6 の方へひきつけられるもの）であって、より小さい電荷および／またはより大きいサイズをもつ成分（すなわち、第 2 流体流れのチャネル壁における境界の方への偏向が最も急速でないもの）と関連する第 2 流体流れの一部分を偏向させることを意図する。

【 0190 】

流れ分離器 7 は、第 2 流体流れの一部分を横切って配置されて、第 2 流体流れの一部分を採集する。分岐流は下流の検出ゾーン 9 の検出チャネル 8 内に入る。流れ分離器 7 および検出チャネル 8 はより詳細に図 5 (B) に示されている。

10

【 0191 】

流れ分離器 7 は、第 2 流体流れの一部分を横切って配置されて、第 2 流体流れの一部分を採集する。分岐流は下流の検出ゾーン 9 の検出チャネル 8 内に入る。分岐工程は一般に第 1 流体流れ中の成分が第 2 流体流れのチャネル壁における境界の方へ偏向してしまう前に行なわれる。

【 0192 】

層流の残りの部分は採集されて下流の出口リザーバー 1-0 へ採集チャネル 1-1a および 1-1b を経由して流れることができる。

検出ゾーン 9 は、上流の流れ分離器 7 と流体連通している検出チャネル 8 を含む。検出チャネル 8 は、ジャンクション 1-3 において検出チャネル 8 と合流する上流の標識チャネル 1-2 とも流体連通している。標識チャネルは上流の標識リザーバー 1-4 から供給される。場合により変性剤を含有する標識混合物は標識リザーバー 1-4 に備えられ、標識チャネル 1-2 を経由してジャンクション 1-3 において検出チャネル内の流れに合流することができる。こうして、標識化剤を分離チャネル 1 から分岐した流れ（分岐流）中へ供給することができる。

20

【 0193 】

標識流は検出チャネル 8 に合流して進入し、標識化剤が成分を標識する。標識流および分岐流は、成分の標識化に十分な時間、混和することができる。この目的のために混合ゾーンが分析領域 1-5 の上流に備えられている。検出チャネル 8 内の流体は、次いで検出ゾーン 9 の分析領域 1-5 において、たとえば蛍光分光分析を用いて分析される。分析が完了すると、検出チャネル内の流体は検出ゾーン 9 を出ることができ、下流の出口リザーバー 1-0 に採集され、それにより分離チャネル 1 からの流体流れと再結合する。

30

【 0194 】

他の好ましい態様

前記態様のそれぞれおよび適合するあらゆる組合せは、それぞれおよびあらゆる組合せを個々にかつ明白に列挙したも同然に、明白に本明細書に開示される。

【 0195 】

本発明の多様なさらなる側面および態様は、本開示を考慮して当業者に認識されるであろう。

40

本明細書中で用いる“および／または”は、他方を含むかまたは含まない、2つの特定の特徴または成分のそれぞれの具体的な開示と解釈すべきである。たとえば、“A および／または B”は、それぞれ本明細書中に個々に述べられたも同然に、(i) A、(ii) B、および(iii) A および B のそれぞれの具体的な開示であると解釈すべきである。

【 0196 】

状況からそうではないと指示しない限り、前記に述べた特徴の記載および定義は本発明のいずれか特定の側面または態様に限定されず、記載したすべての側面および態様に適用される。

【 0197 】

本発明のある側面および態様を実施例により、かつ前記の図面を参照して説明する。

50

【実施例】

【0198】

バルク定量的標識実験

ウシ血清アルブミン（製品# A7906）、リゾチーム（# 62970）、-ラクトグロブリン（# L3908）、ドデシル硫酸ナトリウム（# 71725）、炭酸水素ナトリウム（# 8875）、HEPES（# H3375）、およびオルト-フタルアルデヒド（# 79760）を、Sigma Aldrich から入手した。炭酸ナトリウム・10水和物を、East Anglia Chemical Company から入手した（製品# 1353）。-メルカプトエタノールを、Thermo Scientific から入手した（製品# 35602）。

10

【0199】

多様なOPA:BME比を調べて1:1.5が最適であると証明された。多様な緩衝液条件も調べた。高イオン強度（100~500mM）の炭酸緩衝液を用いてpH9.5~10.5で最適定量検出感度が得られた。標識反応は多様な緩衝液に耐容である。当初は第一級アミンを含有する緩衝液、たとえばTrisは定量的標識反応を妨害すると考えられた。しかし、最近の研究によりTrisタイプの緩衝液は問題がないことが示唆された。

【0200】

多様な標識条件を調べた。初期の実験により、nM~高μMの範囲のタンパク質濃度を決定するためには6mM OPA、9mM BMEの最終OPA/BME濃度が最適であると判定された。20~40%のDMSO、30~40%のEtOH、2%のSDSの、単独または0.5~5%のTween（登録商標）-20との組合せを含めた、多様な変性剤および界面活性剤を試験した。

20

【0201】

12mMのOPA、18mMのBME、4%のSDS、および200mMカーボネート、pH9.5~10.5の標準的な標識溶液を、電気泳動および拡散による分離ならびに検出実験のために用いた。この溶液を一般に予め調製し、目的タンパク質溶液と1:1の体積比で混合した。この標識溶液は、遮光すれば、検出できるほどの性能損失なしに最大1週間保存できる。種々の濃度のBSA、リゾチーム、および-ラクトグロブリン溶液を5mM HEPES緩衝液、pH7中に調製し、前記の標識溶液と混合した。

30

【0202】

バルク検出および標識実験のために、各条件の3重検体を低タンパク質結合性のハーフエリア(half-area)96ウェルプレート（Corning, 製品# 3881）にロードし、接着性アルミニウムシーラントシート（Costar 製品# 6570）でカバーした。エンドポイント蛍光測定をBMG Labtech FLUOSTAR OPTIMAプレートリーダーで、350±10励起フィルターおよび440±10発光フィルターを用いて行なった。

【0203】

マイクロ流体デバイスの製作および操作

標準的リソグラフィー法を用いてマイクロ流体拡散デバイスを製作した（参照：Kim, P. et al. Biochip Journal 2, 1-11 (2008)）。簡単に述べると、デバイスをAutocadで設計し、バイナリーマスクをアセテートのシート（MicroLitho）上にプリントした；透明領域はマイクロ流体デバイス内の意図するチャネルに相当し、黒色領域はバッケグラウンドに相当する。25μmのMicroChem SU-8 3025パーマネントエポキシネガ型フォトレジストをシリコンウェハー上にスピンドルコートィングし、マスクをフォトレジスト上に乗せ、コリメートしたUV光で露光したエポキシを架橋させ、最後に非架橋ポリマーの領域をプロピレングリコールモノメチルエーテルアセテート（PGMEA）現像剤（MicroChem）で除去することにより、マスター-キャスティングすべきデバイスのポジ型インプレッションを作成した。

40

【0204】

デバイスをポリジメチルシロキサンにキャスティングした。PDMSエラストマーおよび

50

硬化剤 (Dow Corning, 製品 # 184) を 1 : 1 w/w で混合した。確実に混合を完了させることが重要である：適切な硬化エラストマー性能を得るためにには 2 ~ 5 分間の手動攪拌が重要である。黒色デバイスを希望する場合、およそ 20 mg のカーボンナノ粉末 (Sigma, 製品 # 633100) を添加して十分に混合した。ナノ粉末の大きな塊を Eppendorf 5804 R 遠心機で 3,000 rpm、10 分間の遠心により沈降させた。混合したエラストマーおよび硬化剤をマスター上に注ぎ、およそ 10 分間の真空乾燥により気泡を除去し、デバイスを 70 °で 60 ~ 75 分間ベーキングした。冷却した時点ではデバイスを切り出し、入口および出口に 0.75 mm Harris Uni-Core パンチャーで穴を開けた。粘着テープで屑を除去した後、それらを Thermo Scientific 76 x 26 mm スライドガラス (カタログ # 8037) に、Electronic Diener Femto Plasma bonder を用いてプラズマ接着した。接着したデバイスを 70 °で 10 分間ベーキングした。

【0205】

電気泳動ベースの分離実験のために、公開された方法に従って 1 工程で電極を製作した (参照 : Herling et al.)。簡単に述べると、電極チャネルを 25 μm P D M S ピラーで描いた。デバイスを接着した後、それらをホットプレート上で 78 °に加熱し、低融点はんだ (51 % の In、32.5 % の Bi、16.5 % の Sn からなる InBiSn 合金, Connro Electronics) を電極入口に押し込んだ。溶融はんだの高い表面張力により、それは電極チャネルに閉じ込められ、一方で電極と水性緩衝液の接触を確実にした。

【0206】

デバイス内の流れは n e M E S Y S シリンジポンプを用いて制御された。365 nm C aim OptoLED (Photometrics) および蛍光イメージ用の Chroomo 49000 DAPI フィルターを備えた Zeiss AxioObserver 顕微鏡を用いて、明視野イメージおよび蛍光イメージを取得した。2.5 x、5 x、10 x、および 20 x の対物レンズを用いた。100 ミリ秒 ~ 1000 ミリ秒の露光時間用いた。蛍光イメージは暗所で取得され、通常は 10 の別個のイメージを平均した結果である。ある場合には、シグナル対ノイズ比を高めるためにイメージをビニングした。同じ露光セッティングで取得したフラットフィールドイメージを差し引くことにより、イメージをバックグラウンド補正した。

【0207】

マイクロ流体実験

ウシインスリンを Seralab から購入した (製品 # GEM-700-112-P)。このインスリンは 0.6 % w/w の Zn²⁺ を含有し、それを受け取ったままの状態で用いた。残りの実験プロトコルを以下に詳細に記載する。

【0208】

電気泳動 P S L 実験 : 10 mg / mL の B S A および 10 mg / mL のリゾチームをそれぞれ 5 mM HEPES, pH 7 に溶解した。この溶液に、100 μM ローダミン 6 g (Sigma) を添加した。この溶液を次いで 0.22 μm シリンジフィルターにより濾過した。11 mM の O P A、16.4 mM の B M E および 3.63 % の S D S を 180 mM カーボネット, pH 9.5 中に含有する標識溶液を調製した。これらの溶液をそれぞれのデバイス入口にロードし、次いで電極をワイヤにはんだ付けし、それを次に D C 電圧源に接続した。ローダミン 6 g トレーサー (これは O P A 蛍光を妨害しない) の位置をデバイス整合の確認のために用いた。-5 V、0 V および 5 V におけるローダミンビームの位置の変化を調べることにより検出を確認した。検出の成功が確認されたので、電圧を -10 ~ 8 V で変動させるのに伴なう O P A 蛍光強度を観察領域で測定した。混合界面における蛍光形成も視覚化した。電極における電解による気泡形成を避けるために、ごく短期間でも高電圧の印加を避けることが重要であった。リゾチーム溶液をロードした別のデバイスについて同じ手順を繰り返した。

【0209】

10

20

30

40

50

標識化

本明細書に記載する成分の分離および検出には、マイクロフルイディクスの迅速空間セグリゲーションの可能性を利用する。この方法を用いると、修飾されていない成分、たとえば生体分子が、サイズまたは電荷のようなそれらの固有特性に従って空間的に分離される。これらの成分を次いで採取し、その後、検出することができる。検出工程は、分離した成分を、標識との迅速かつ完全な反応および後続の定量的な検出を促進する新たなセットの条件に曝露することを含むことができる。

【0210】

標識法に重要なことは、2つのこれまで無関係であったアイデアの融合である。第1は、成分と潜在性共有結合標識(latent covalent label)(LCL)、すなわち成分上の関連官能基と反応した時点でのみ速やかに蛍光性になる分子との反応である。第2は、すべての関連官能基を溶媒に曝露して潜在性標識との完全な反応を促進および保証する迅速な変性工程である。

10

【0211】

潜在性共有結合標識法は標識反応後の試料精製の必要性を排除するので、本発明においてきわめて重要である。標識された基質のみが蛍光性であるので、反応しなかった標識前駆体を除去する必要がない。これにより、標識および検出のプロセスの直後にマイクロフルイディクスチップ上での分離スキームを行なうことができる。さらに、標識反応の共有結合性により、すべての種を永続的に修飾することが確実になり、したがって相対検出感度がたとえば色素結合親和性の差に依存することはない。

20

【0212】

2クラスの潜在性共有結合標識を想定できる。第1に、基質部分との反応により、標識上に最初に存在していたその蛍光を消光する基が除かれる。第2に、標識反応中に蛍光体そのものが、たとえば伸長した共役系の形成により形成される。

【0213】

マイクロ流体法の制限のひとつは、マイクロ流体デバイスによる流体分析に要求される迅速な反応速度である。共役系の伸長による蛍光体形成は迅速なインデバイス反応に十分な駆動力として作用する可能性があると予想して、上記で考察した第1法を調査した。

【0214】

種々のそのような蛍光発生化合物を調べ、オルト-フタルアルデヒド(OPA)を用いて有望な結果が得られた。

30

OPAによる標識

1971年に、Rothらは、OPAをチオール、たとえば-メルカプトエタノール(BME)の存在下で単離アミノ酸と反応させると青色蛍光が形成されることを発見した(Roth, Analytical Chemistry 43, 880{882 (1971))。観察された迅速な反応速度は、次いで著者らをイオン交換カラムでの分離に続くオンラインアミノ酸修飾のための関連技術の開発に導いた(Roth et al. Journal of Chromatography 83, 353-356, (1973))。この修飾法はその後、検出感度および室温反応の迅速性に関して、より標準的なペプチド修飾方式、たとえばニンヒドリンを用いるものより優れていることが示された(Benson et al. PNAS 72, 619-622 (1975))。その後の試みは、キャピラリー電気泳動の前、途中または後にOPAをアミノ酸または生体分子の誘導体化試薬として用いることを記載している(Oguriet et al. Journal of Chromatography A 787, 253-260 (1997); Jacobson et al. Anal. Chem. 1994, 66, 3472)。本発明者らの知る限り、マイクロ流体空間分離後にOPAをインデバイス誘導体化試薬として用いる例は報告されていない。

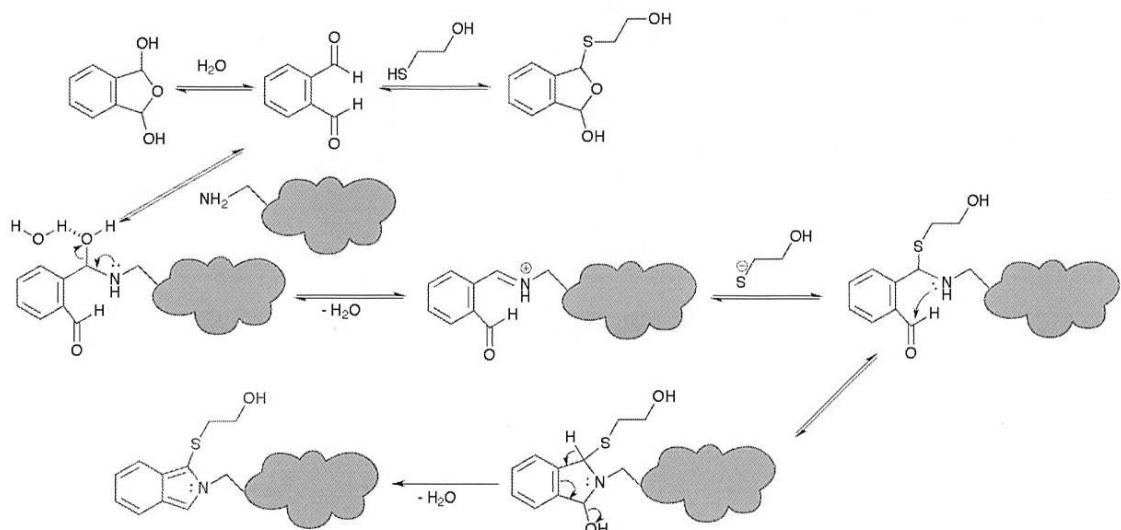
40

スキーム1-アルカリ性条件下での標識メカニズム; Sternson and Garcia-Alvarez-Coque (Sternson et al. Anal. Biochem. 144, 233-246 (1985); Garcia Alvarez-Coque et al. Anal Biochem 178, 1-7 (1989))より出典

【0215】

50

【化1】



10

【0216】

アルカリ性条件下でのOPA反応メカニズムをスキーム1に示す。OPAジアルデヒドはヘミアセタール形およびチオヘミアセタール形と平衡状態にある。ジアルデヒドはタンパク質表面に露出した第一級アミンと反応して水を喪失し、反応性の高いイミンを形成する。イミンに対するBMEチオレートの攻撃により、ペンドントアルデヒドに対する攻撃のための第二級アミンが放出されて、5員環が閉じる。この反応は共役の伸長および水の喪失に伴なって不可逆的になる。

20

【0217】

検出感度

タンパク質濃度についてOPAによるナノグラムの検出感度が文献に報告されている(Zawieja et al. Analytical Biochemistry 142, 182-188 (1984))。しかし、この文献の研究は $< n$ Lの試料体積中の μM のタンパク質濃度を用いてこのレベルの感度を得ており、かつ少なくとも30分間の反応時間を許容している。

30

【0218】

OPAを用いる線状タンパク質濃度決定についての検出感度を、マイクロ流体誘導体化の制約下で決定した。

マイクロ流体デバイスのデザインを図1(A)の挿入図に示し、例示的な方法およびデバイスに関連して前記に述べた。反応は流動状態で、よって定常状態で進行し、ただし、いずれかの時点で標識したタンパク質の総体積として定義した総反応体積は $0.38 \mu L$ である。図1(A)に長い長方形として示した検出ゾーンで蛍光強度を測定した。この実験において、蛍光強度を色素流とタンパク質流がY字形ジャンクションで最初に互いに接触した18秒後に測定した。

40

【0219】

図1(A)に示すように、マイクロ流体デバイス内でBSAをOPAで標識すると、OPA蛍光強度は $15 nM$ のBSA濃度まで直線的である。後記で考察するように標識反応の前または途中に適切な低バックグラウンド条件を用いてタンパク質を変性させることにより、あるいはデバイスパス長さを増大させることにより、この検出限界をさらに低下させることができた。

【0220】

これらの実験に用いたデバイスは $2.5 \mu m$ のパス長さをもち、製作法を変更せずに最大 $100 \mu m$ のパス長さを達成できる。 $100 \mu m$ のパス長さのデバイスについての感度は $3.75 nM$ になると予想される。対照的に、吸光検出感度を図1(B)に示す。A280

50

と B S A 濃度の直線関係は、1 mm のパス長さについて 5 8 5 n M より大きい B S A 濃度について得られたにすぎない。マイクロ流体デバイスに用いる 2 5 μ m のパス長さに変更することにより、2 3 . 4 μ M の検出限界が予想される。よって、インデバイス誘導体化法は、非修飾タンパク質の濃度を測定する吸光法より 1 , 5 0 0 倍以上の感度である。

【 0 2 2 1 】

現構成ですら、タンパク質濃度と蛍光強度の間に 0 . 3 8 n g のタンパク質まで直線関係がみられ、これは文献値(Zawieja et al. Analytical Biochemistry 142, 182-188 (1984))に匹敵する結果であるが、およそ 1 , 0 0 0 倍低い絶対タンパク質濃度およびおよそ 1 0 0 倍短い反応時間についてである。

【 0 2 2 2 】

定量的標識化

本明細書に記載する標識法の鍵となる他の要素は、目的成分(たとえば、タンパク質)を変性させ、すべての関連官能基(たとえば、アミノ基)を反応のために露出させることによって完全標識化を達成できるという認識である。O P A ベースの標識化を用いると、タンパク質濃度を決定するために蛍光強度を定量的に使用できる。変性は標識化の前または途中で行なうことができる。

【 0 2 2 3 】

多様な条件を調べて、幾つかの変性および標識混合物について、後記に考察するようにタンパク質濃度を O P A 蛍光強度に定量的に関連づけることができる。図 3 は、以下に記載する拡散分離および電気泳動分離ならびに検出法に用いた条件を示す。

【 0 2 2 4 】

図 2 に示すように、種々の濃度の B S A 、リゾチームおよび - ラクトグロブリン、すなわち広範に異なる等電点(I E P)、分子量および一次配列をもつ 3 種類のモデルタンパク質を、6 mM の O P A 、9 mM の B M E 、2 % のドデシル硫酸ナトリウム(S D S)および 1 0 0 mM のカーボネート、p H 1 0 . 1 の最終標識化濃度となるように標識混合物と混合した。タンパク質一次配列を用いてタンパク質濃度を第一級アミン濃度に換算し、O P A 蛍光強度と第一級アミン濃度の関係を 3 種類のタンパク質についてプロットした。線形回帰により 0 . 9 9 の相関係数が得られる。標識溶液中に S D S が存在することにより、反応しなかった色素からのバックグラウンドがわずかに増大する。この実験に用いた高いイオン強度で、S D S ミセルは複雑な多様な構造を形成し(Almgren et al. Journal of Colloid and Interface Science 202, 222-231 (1998))、そのうちのあるものは反応しなかった色素のバックグラウンド蛍光を散乱させると予想される。

【 0 2 2 5 】

定量的標識法を用いて未知ペプチド濃度を決定することができる。アミロイド - (1 - 4 2)(A (1 - 4 2))はトリプトファン残基をもたず、1 , 4 0 0 1 / M c m の低い吸光係数をもつ(Walsh et al. FEBS Journal 276, 1266-1281 (2009))。A - (1 - 4 2)の凝集に関する再現性のある反応速度データが得られることを示した唯一の文献記載された方法は、組換えペプチドの発現、精製、および前もって形成された凝集物を除去するための精製ペプチドの反応速度分析直前の S E C 濾過を伴なう(Walsh et al. FEBS Journal 276, 1266-1281 (2009); Hellstrand et al. ACS Chemical Neuroscience 1, 13-18 (2010))。しかし、これによりしばしば精製モノマーが低濃度になり、それらを吸光により検出するのは困難である。したがって、A (1 - 4 2)について再現性のある反応速度データが得られるのは、各試料が濃度において同じ相対誤差をもつように、さらに単一バッチの精製モノマーから調製した試料のみを比較することに依存する。

【 0 2 2 6 】

図 3 は、精製 A (1 - 4 2)ペプチドの濃度を決定するために、本明細書に提示する定量標識法をどのように使用できるかを示す。図 3 (A)において、第一級アミン濃度と O P A 蛍光強度の直線関係を、既知濃度の - ラクトグロブリンについて蛍光強度を測定することにより決定する。重要なことは、標識反応は定量的であるので特定セットの測定条件についてこの関係を 1 回決定するだけでよいということである。

10

20

30

40

50

【0227】

未知濃度の A (1-42) について同じ実験条件を用いて蛍光強度を測定する。両方の場合とも、誤差バーは 3 重測定の標準偏差である。タンパク質の第一級アミン濃度と OPA 蛍光強度の間に直線関係があるので、したがって A (1-42) 第一級アミン濃度は観察された蛍光強度から決定される。パネル B は、それぞれの系列希釈に関して決定した対応するタンパク質濃度を希釈係数について補正した後のものを示す。濃度系列全体にわたっておおよそ 27 μ M の安定した値が得られる。この方法は、さらなる生物物理学的試験の前に A (1-42) および A (1-40) 濃度を迅速かつ正確に決定するために使用できる。さらに、一次アミノ酸配列が分かっていれば、同様な方法を用いて流体流れ中のいかなるタンパク質の濃度も決定することができる。

10

【0228】

マイクロ流体実験において成分を迅速タイムスケールで定量的に標識できることが実証された。OPA 反応速度の報告は文献にわずかしかなく (Yoshimura et al. Anal. Biochem. 164, 132-137 (1987); Wong et al. J. Am. Chem. Soc. 107, 6421-6422 (1985))、全長タンパク質の修飾速度または変性剤の存在下での OPA 反応速度の報告は全くなない。図 7 (A) に示すデバイスを用いて、前記に示した SDS 含有変性条件の使用によりおおよそ 1 秒で BSA 修飾が完了まで進行することが見出された；タンパク質および定量的な潜在性共有結合標識溶液を混入し、待機ループ (waiting loop) を励起した後、蛍光強度は一定であった。代表的イメージを図 4 に示す；そこには蛍光強度の定常性を強度プロファイルと共に示す。

20

【0229】

前記に、流体デバイスにおける横方向分離および分岐の後に成分を蛍光発生色素で定量的に標識できる新規な定量的な潜在性共有結合標識法を記載した。標識化は定量的であるので、タンパク質濃度を蛍光強度から直接決定できる。この方法は、測定および検出のプロセスを分離しており、したがって標識の存在は測定および分析に影響を及ぼさない。以下に、電気泳動分離および拡散分離を用いる分離および検出の方法にこの標識化を適用することを考察する。

【0230】

拡散分離

流体をミリメートル長さのスケールに閉じ込めると、流れは対流ではなく層流になる。したがって、2 つの隣接する流体流れがたとえば Y 字形または T 字形ジャンクションで出会った場合、流体層間の唯一の混合は拡散によるものである (Whitesides Nature 442, 368-373 (2006); Squires et al. Reviews of Modern Physics 77, 977-1026 (2005))。目的種の拡散係数および流体力学的半径は、したがってその空間分布から入手できる。ここには、拡散により分離した種の誘導体化および定量のためのデバイスを記載する。代表的拡散デバイスを図 1 (A) に示す。このデバイスは 2 つの流れ入口をもつ。図 1 (A) を見ると、緩衝液は 1 つの入口 (下左) に、タンパク質はもうひとつの入口 (上左) にロードされる。緩衝液流中へ拡散できるタンパク質のみを分岐させて標識することができる。拡散チャネルの長手に沿って進んだ後、緩衝液とタンパク質の流れの間の層流境界から緩衝液流中へ少なくとも 33 μ m 拡散したタンパク質は隔離され (分岐し)、その後、流体デバイス内で標識混合物と混合される。標識混合物は標識 (別に指示しない限り、OPA) および変性剤 (別に指示しない限り、SDS) を含有する。

30

【0231】

標識されたタンパク質の蛍光強度を長方形の観察領域で測定する。標識されなかったタンパク質も可溶化され、したがってそれは不溶性凝集物を形成しない；たとえばそれがアルカリ性の標識された溶液と結合した際にタンパク質等電点を通過するかのように。

40

【0232】

精確な流体力学的半径を抽出するためには - 特に成分の不均質混合物について - 実験データを既知サイズの成分について作成されたシミュレートした空間拡散プロファイルと比較する必要がある。PCT/GB2013/052757 を参照して、そのような比較を本明細書に記載

50

する。

【0233】

インスリン

拡散法の最初の証明として、インスリン凝集反応からのモノマーおよび小分子オリゴマーの枯渇を調べた。インスリンヘキサマー化のpH誘導による変化も調べた。インスリンは *in vitro* でアミロイドフィブリルを形成することが観察された最初の系のひとつであった (Waugh J. Am. Chem. Soc. 68, 247-250 (1946))。インスリンはオリゴマー化およびアミロイド凝集についての好都合な生物物理学的モデル系として用いられてきた。インスリンは、pH変化に伴なって明確に規定されたダイマー、テトラマーおよびヘキサマーを形成する (Nettleton, E. J. et al. Biophysical Journal 79, 1053-1065 (2000); Whittingham et al. Journal of Molecular Biology 318, 479-490 (2002))。

【0234】

そのアミロイドフィブリルのプロトフィラメント構造は低温電子顕微鏡観察 (Jimenez et al. Molecular basis for insulin fibril assembly PNAS 99, 9196-9201 (2002)) により決定されており、クロススピンに重要なその中心セグメントの構造はX線結晶構造解析により決定された (Ivanova et al. PNAS (2009))。最近の研究 (Knowles et al. Science 326, 1533-1537 (2009); Cohen et al. Journal of Molecular Biology 421, 160-171 (2012)) により、成熟アミロイドフィブリルの形成を間接的にモニターする ThT 蛍光データ (LeVine et al. Protein Science 2, 404-410 (1993); Biancalana et al. Biochimica et Biophysica Acta 1804, 1405-1412 (2010)) から、凝集プロセスの個別の工程を反映する微視的な速度定数を抽出できる。アミロイド凝集反応において変化しつつあるモノマーおよび小分子オリゴマーの集団を直接追跡する既存の実験法は、気相内への移行 (Nettleton, E. J. et al. Biophysical Journal 79, 1053-1065 (2000))、外因性の標識化および希釈 (73)、または長い測定時間 (Schuck Anal. Biochem. 320, 104-124 (2003); Mok et al. Methods 54, 67-75 (2011)) のいずれかにより、観察している一過性のプロセスを攪乱する。

【0235】

本明細書に記載する拡散型の分離および検出法は、非攪乱的にモノマーおよび小分子オリゴマー枯渇を追跡できる最初の直接実験法である。

2 mg / mL のウシインスリンを 60 °C において静止状態でインキュベートすることによりインスリン凝集を開始した。図 7 (B) に示すように、ThT 蛍光の増大によりフィブリル化のプロセスをリアルタイムでモニターした。ThT を添加しない試料から $t = 0$ の非加熱モノマー、最初の検出可能な ThT 蛍光増大、ラグタイム、および平衡期に対応する時点でアリコートを取り出した。

【0236】

それらのアリコートを図 7 (A) に示す拡散デバイスのタンパク質入口にロードした。分離チャネルからの最小種を検出ゾーンへ分岐させた。分岐した後、分岐流は最初に潜在性標識混合物 (12 mM OPA, 18 mM BME, 4% SDS, 200 mM カーボネート pH 10.3) と混合された。標識されたインスリン種を次いで蛍光分光分析により検出した。

【0237】

図 7 (B) は、これらの時点についての正規化した蛍光強度値に、対応するフィブリル化曲線を重ねている。これは、アミロイド凝集反応におけるモノマーおよび小分子オリゴマーの枯渇の最初の非攪乱型の直接的な実験分析であると考えられる。

【0238】

本発明の分離および分析方法を、pH誘導によるインスリンオリゴマー化のためにも使用した。低いpHでは、インスリンは主にダイマーとして存在する(61)。中性およびアルカリ性pHでは、Zn²⁺の存在下で、インスリンはヘキサマーとして存在する(76)。したがって、2 mg / mL のウシインスリン溶液を pH 2.0 および 10.5 で調製した。これらの溶液を、図 7 A に示すデバイスの上のタンパク質入口にロードした。33.33 μ

10

20

30

40

50

m以上拡散した種を次いで分岐させ、その後、標識し、その流れの蛍光強度を測定した。インスリンを、前記で用いたO P A 標識混合物で標識した。分離、分岐、標識化および検出の工程をすべて單一デバイスで定常状態流れ条件下に実施した。

【0239】

p H 2 および p H 1 0 . 5 で観察した蛍光強度を図 7 (C) にプロットした。アルカリ性 p H における、より低い相対蛍光強度は、インスリンヘキサマーに対応すると推定したい。

【0240】

絶対流体力学的半径

図 7 (B) および (C) に記録したデータは、標識されるのに十分遠くへ拡散する小分子種の種々の割合を示すために相対蛍光強度の差を用いている。これらのデータは実際に試料セット間の相対差についての定性的情報を与えるが、既知の数値シミュレーションアルゴリズムを拡散分光分析の一部として適応させることにより、さらに拡散ベースの分離および検出方法を用いて絶対流体力学的半径を得ることが可能である(参照 : PCT/GB2013/052757)。

10

【0241】

このシミュレーションにより、既知の流体力学的半径をもつ球状粒子について予想した粒子密度プロファイル - “基底関数(basis function)と呼ぶ” - が作成される。このシミュレーションは、既知サイズの粒子を、理論的に予測しあつ実験的に観察した“ハット”関数に対応する初期分布で、“ノズル”を横切って(across)ランダムに分布させる。粒子は、拡散チャネルを通り、チャネル全体にわたる(throughout)不均一速度プロファイルの主な原因となるブラウン運動のランダム工程を取りながら伝搬することができ(Lauga et al. URL <http://arxiv.org/abs/cond-mat/0501557>)、最終的に検出ゾーンに到達する。

20

【0242】

次いで、各粒子が観察領域に到達する前の各時点で得られた分布の合計により、そのサイズの粒子の定常状態分布をシミュレートする。次いで、拡散分光分析において、これらの基底関数を用いて、実験により観察した空間拡散プロファイルへの既知サイズの粒子の相対的寄与を最小二乗当てはめアルゴリズムにより査定する。この既知アプローチを本明細書に記載する方法に適用する際に考慮すべき 2 つの関連事項がある。分離ゾーンでは空間拡散プロファイルを一般に測定しない。その理由は、成分が標識されていない可能性があり、したがって容易には検出できないためである。本発明のある態様において、成分は検出可能であり、したがって分離工程中に、たとえば分離チャネルにおいて拡散プロファイルを測定できる。

30

【0243】

拡散プロファイルを分離工程中に測定できない場合、のちに分岐させた後に成分を分析する。たとえば、分岐した成分を分岐後に蛍光標識することができ、実験観察できるのは検出ゾーン内の積分蛍光強度である。標識工程は定量的であるので、積分蛍光強度を観察ゾーン内の成分濃度に関連づけるのは可能である。次いで、用いたセッティングについて検量曲線が作成されると、その見掛け成分濃度を既知のロード成分濃度に関連づけることにより流体力学的半径を理論的に得ることができる(単一成分のみがロードされていれば)。実験により観察した比を、次いで、既知の流体力学的半径をもつ粒子を分離チャネル全体にわたって拡散させたシミュレーションから誘導された類似の粒子密度比と比較することができる。

40

【0244】

しかし、絶対蛍光強度、よって得られた見掛け濃度は、イメージングセッティングに応じて、また実際には光学的整合の厳密な差に応じてすら変動するので、絶対蛍光強度に依存するのは実験的に問題がある。そのような変動性は、図 6 に示すように、成分を両方の入口にロードした際に観察された蛍光強度(または粒子密度) を含めることによってこれらのファクターについて内部補正することにより排除できる。これらの数値の比は、総ロード成分の濃度のうち標識されるのに十分遠くへ拡散した割合を与え、それを対応するシミュレーション結果と比較して、試料の流体力学的半径に関する厳密な数値を得ることがで

50

きる。

【 0 2 4 5 】

これらのシミュレーションを図 8 および 9 に示す。図 8 には、既知の流体力学的半径をもつ粒子の拡散をシミュレートした。流体力学的半径は 0 . 5 ~ 5 0 . 0 n m、すなわち小分子と大型のタンパク質複合体または凝集物との間のサイズ範囲の種の検出に関するサイズ領域(size regime)に対数的に配置されていた。

【 0 2 4 6 】

拡散チャネル末端の成分の定常状態分布をシミュレートした（その後、目的種を場合により標識し、後続分析するために、分岐させる）。このシミュレーションは、図 6 に示すように、粒子を 1 つのデバイス入口にロードするシステムおよび粒子を両方のデバイス入口にロードする状況に基づいていた。これらのシミュレーションの結果を流体力学的半径に従ってカラーコード化し、図 9 に示す。予想どおり、成分（ここではタンパク質）を両方の流体入口に供給した場合には粒子の定常状態分布は流体力学的半径の関数としては変化しない：初期状態拡散の均一性は定常状態での粒子分布に正味変化をもたらさない。対照的に、成分を一方にのみ（図 6 の上の入口）供給した状況については、検出ゾーンにおける定常状態分布は予測どおり流体力学的半径に伴なって変動する。

10

【 0 2 4 7 】

図 6 に示すデバイスデザインに基づけば、下流の流れ分離器により分岐させるためには種は少なくとも 3 3 μ m 拡散しなければならない。分岐した後、成分は待機ループ内で標識溶液と混和し、標識された成分は次いで蛍光法により検出される。したがって、標識されるのに十分な距離に拡散した種の割合は、0 μ m をタンパク質入口の遠方の壁として、分離チャネルの末端で定常状態においてチャネル幅に沿って 1 3 3 ~ 2 0 0 μ m に位置するものの割合である。

20

【 0 2 4 8 】

この割合を求めるために、成分を両方の入口に供給する条件について、分布プロファイルの対応する領域を積分した。これらの強度の比は、既知の流体力学的半径のそれぞれについて、総ロード成分濃度のうち分岐させるのに十分遠くへ拡散した割合を与える。実験により観察した比をシミュレートした比と比較することにより、試料の絶対流体力学的半径を得ることができる。

30

【 0 2 4 9 】

図 9 において、実験により観察した拡散比に対する流体力学的半径の依存性が実証される。主図を両対数方式で示し、挿入図を線形方式で示す。最大の 4 つの流体力学的半径は拡散比（近似値に対する）0 を与えるので、これらの点は対数プロットから除かれている。一次近似のために、データを妥当な程度に良好に、べき乗則(power-law)に当てはめることができる：

【 0 2 5 0 】

【 数 1 】

$$f(x) = ax^b$$

40

【 0 2 5 1 】

$a = 1 . 1 3$ および $b = 0 . 2 2$ 、 R^2 は 0 . 9 7；シミュレーション結果の予測可能性は、実験により観察した拡散比をいかに明確に流体力学的半径に関連づけることができるかを実証する。

【 0 2 5 2 】

しかし、分析した試料が単分散でない限り、前記手法は平均流体力学的半径を与えると予想される。複雑なタンパク質混合物の多成分からの流体力学的半径は、種の拡散をモデリングする一連の実験条件を拡張することにより得ることができる。図 10 (A) に示すように、拡散する試料の多数部分を選択して定量的に標識する流体デバイスの変形を設計し

50

た。ここでは、分離チャネルからの流れは3つの等しい成分に分離（分岐）される。

【0253】

領域1は、成分流から最も遠くへ（少なくとも $33\text{ }\mu\text{m}$ ）拡散した成分に対応する。領域2は、中心の三分の一の成分を採集し、領域3は最後の三分の一の成分、すなわち遠方の成分壁の $66\text{ }\mu\text{m}$ 以内の拡散チャンバー末端において定常状態にある成分を採集する。それぞれの分岐流は、この構造において個別に変性され、次いで流れ中の変性した成分はOPA含有混合物で標識される。

【0254】

図10(B)は、拡散比1、2および3に対する基準試料の流体力学的半径の依存性を示す。拡散比は前記に従って計算された。多様な流速をカバーするように理論処理を拡大することにより（ここに示した基底関数は、拡散チャネル中における単一の取出し速度 $37.5\text{ }\mu\text{L}/\text{時}$ に対応する）、それぞれの流体力学的半径について、流速に対する拡散比1、2および3の依存性をプロットすることができる。観察した実験データに対するこれらの基底曲線の相対的寄与は、最小二乗当てはめ法で決定されるであろう。これにより、目的とする不均質試料内の流体力学的半径のリストが得られる。標識反応は定量的であるので、実験試料内のそれぞれの流体力学的半径の相対存在量を決定できる。

10

【0255】

溶解性

ここに提示するインスリン凝集およびヘキサマー化の予備データは定性的であり、それは強度の変化を試料の流体力学的半径の直接変化に関連づけない。この理由は、流速を選択値から不規則に偏移させる溶解性問題に関係する。たとえば成分の標識化に際して、成分を含有する流れが等電点を通過するように変異すれば、成分は成分と標識混合物が出会う層流界面に“滞留する(crash out)”。図7のパネルCに示すpH誘導によるインスリンヘキサマー化実験に対応する代表的イメージを図11に示す。凝集タンパク質のプラグは最終的には可溶化されるが、2つの流れの間の混合領域に沈殿したタンパク質の存在は流れを遮断して予測不能な流速変化を引き起こす；拡散プロファイルは流速に対して感受性であることを考えると、それは相対蛍光強度変化からの定量流体力学的半径の抽出を問題のあるものにするであろう。

20

【0256】

この問題はインスリンに固有ではなく、目的タンパク質が標識化に際してその等電点を通過する場合、同じ問題が多様な系について観察されている。

30

定量的な分離および検出法のための、目的とするいかなるタンパク質系についても作動する真に一般的な方法を提示するために、溶解性問題は多様な方法で対処してきた。

【0257】

インスリン標識反応をバルクで繰り返した場合、不溶性種は形成されない。たとえば、インスリンはpH2で等体積の12mMのOPA、18mMのBMEおよび4%のSDS、200mMバイカーボネット中、pH10.5と速やかに混合し、得られた溶液のpHは10.5であった。

【0258】

したがって、溶液は効果的に緩衝化されて、モノマー状インスリンが分離状態で可溶性であるpHになり、完全な混合によって可溶性混合物が生じる。これは、インスリンはそれが変性剤で効果的に可溶化されるpH付近で凝集に対して保護されることを示す。タンパク質がディタージェントミセルに結合できる前に界面におけるタンパク質溶液のpHが変化したであろうから、単にH⁺濃度およびミセル拡散係数の相異という理由でこのタイプの溶液は層流界面に滞留しつつあったという仮説が立てられる。

40

【0259】

インスリン溶液を室温に放置すると数日のタイムスケールで沈殿がみられるが、このタイムスケールは流体流れ標識実験とは無関係であることに注目されたい。

したがって、変性工程と標識工程を分けることを含む方法が開発された。その方法に使用するためのデバイスを図12(A)に示す。分岐させた後、標識すべき成分、たとえばタ

50

ンパク質をまず変性剤と完全に混合し、次いでその後、標識混合物と混合した。さらに、分岐させなかった流れ中に存在する標識しない成分を、その成分がその後にデバイス出口付近で分岐流と再び一緒になった際に沈殿するのを阻止するために変性剤と混合した。

【0260】

図12(B)は、9.1 mg/mLのインスリン、pH 2を2つの別個の変性溶液および標識溶液とオンチップ混合する際の結果を示す。界面1は未標識タンパク質と変性剤の混合に相当し、界面2は変性タンパク質と標識混合物の混合に相当し、界面3は標識されないタンパク質(それもその前に変性剤と混合されている)と標識された変性タンパク質混合物の混合に相当する。標識工程の前にSDSを変性剤として用いる場合、層流界面に大きな凝集物の形成がみられ、それはSDS変性および標識化を单一工程で進めた場合に形成される一時的な閉塞よりはるかに重大である。SDSはすべてのタンパク質を可溶化すると伝統的に考えられているが、それは正に荷電した残基、たとえばリジンおよびアルギニンと静電相互作用して疎水性イオン対を形成する可能性もある。この影響は特にそれらの等電点未満のタンパク質に関係があり、インスリンの水溶性を低下させるインスリン-SDS相互作用が具体的に報告されている(Powers et al. *Biopolymers* 33, 92-932 (1993))。

10

【0261】

多様なタンパク質変性メカニズムと一緒に、多様な他のイオン性および非イオン性界面活性剤(たとえば、Tween(登録商標)-20およびTriton(登録商標)-X)(Otzen *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 562-591 (2011); Otzen *Biophys. J.* 83, 2219-2230 (2002))、アルカリおよびアルカリ土類の塩(Ahmad *Can J. Biochem. Cell Biol.* 63, 1058-1063 (1985))、ならびにタンパク質を変性させると報告されている有機溶媒(Brandts et al. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 4826-4838 (1967); Hirota et al. *Protein Science* 6, 416-421 (1997))、ならびにその組合せ(Flockhart et al. *Journal of Colloid Science* 12, 557-565 (1957))が、共に分析工程に際してタンパク質を可溶化する能力について考慮された。界面活性剤および変性剤スペースを調べることにより、定量的標識化を確実にする多様な条件があることが明らかになった;それには、たとえば有機溶媒の混合物、たとえばEtOHおよびSDSが図2.4に示したものと類似のデータを与えることが含まれる。しかし、流れ中で等電点を通過するタンパク質を信頼性をもって可溶化するための1条件:標識化前に等しい体積分率のタンパク質および100% EtOHのみを示した。

20

【0262】

この条件で観察された溶解性の改善を図12(B)に示す。図12(C)に示すように、この条件により定量的標識化は得られない。第一級アミン濃度と蛍光強度の間に強い直線的相関関係はみられず、リゾチーム溶液はバルク標識実験で混濁する;それは、不完全標識化に加えて、検査した低等電点タンパク質にEtOH混合物が付与する溶解性が一般的ではないことを示す。

30

【0263】

最後に、別個の変性工程を組み込んだ拡散デバイスのスペース的に実際的な製作には、拡散混合が行なわれる待機ループとして用いられる数か所のきわめて長い狭いチャネルの使用が要求される。これらのチャネルの寸法(幅20 μm、高さ25 μm、および長さ30 mmの規模)は加工が難しく、かつ使用中にたとえば充填に際して濡れ性が好ましくない場合にマイクロバブルが形成される可能性がある(Monahan et al. *Analytical Chemistry* 73, 3193-3197 (2001))。マイクロバブルの存在は、達成される流速に著しい影響を及ぼす。チャネルは大気圧より低いため、マイクロバブルはデバイスを通る流れを犠牲にして生長し、変動する低い速度の原因となる(Kang et al. *Lab on a Chip* 8, 176-178 (2008))。

40

【0264】

図12(A)に示す別個の変性デバイスを用いてモデルタンパク質について絶対流体力学的半径を求める最初の試み(前記に述べたもの)により非物理的拡散比が得られた後、固

50

有蛍光性をもつ既知サイズの小分子（フルオレセイン）についての拡散プロファイルをある範囲の流速で調べた。図12（D）は、予想したとおり、ジャンクションにおける“ハット関数”初期分布は予想どおりであったが、拡散プロファイルは予想どおりに流速の関数としては変化しなかった。したがって、拡散チャネル内の予測不可能な流速 - この複雑なデバイス内でのマイクロバブル存在により引き起こされるものと同様に - の結果、予測した拡散比からの偏移が生じたと結論される。

【0265】

まとめると、図12は、検出感度など他の要因を犠牲にすることなく、成分、特にタンパク質の可溶化および変性という化学的要件と、予測可能な操作という物理的要件との両方を満たす化学的条件のセット（広範に調べた）は存在しないことを実証する。タイムコース試験（ここには示していない）は、層流界面に滞留するタンパク質は最終的に再び可溶化されることを実証する。したがって、図12（B）に示すように別個の変性条件のような永続的に低下した水溶性に関連する条件が存在しない状態では、問題は真の溶解性欠如ではなく、一時的に凝集したタンパク質が混合ジャンクションにおいて流れを遮断する場合に観察される変動性流速である。

10

【0266】

混合ジャンクションの多様な幾何学的構造を調べた後（データを示していない）、目詰まり(clogging)挙動に変化がみられなかったことにより、その影響はマイクロ流体状の流体挙動のより根本的な特性によるものであると考えられる。滑りのない(no-slip)境界状態はチャネル端におけるゼロ速度およびチャネル全体にわたる変動性の速度分布を生じる(Laugaa et al. URL <http://arxiv.org/abs/cond-mat/0501557>)。拡散混合が起きる前に層流界面にある不溶性タンパク質は低速度領域で沈殿してデバイスを目詰まりさせると考えられる。

20

【0267】

この仮説を試験し、理想的には前記の溶解性問題を軽減するために、本発明者らは、層流界面に低速度の領域がないように成分が縦方向に色素と変性剤の鞘で挟まれた三次元分離および検出デバイスを現在開発中である。さらに、タンパク質を最初の接触後に速やかに可溶化し、起きる可能性のある沈降を崩壊するために、能動混合成分、たとえば回転している磁性ビーズまたは粒子を含むマイクロ流体デバイスを試験中である(Stone et al. Annual Review of Fluid Mechanics 36, 381-411 (2004); Rida et al. Analytical Chemistry 76, 6239-6246 (2004); Lee et al. Lab on a Chip 9, 479-482 (2009))。

30

【0268】

本発明のデバイスおよび方法は、成分をそれらの電気泳動特性および拡散特性に基づいて分離し、その後、場合により標識工程と共に、それらの成分を検出することができる。拡散を分離法として用いる場合、実験による“拡散比”を既知の流体力学的半径の種についてシミュレートした類似の比と関連づけることにより絶対流体力学的半径を抽出し、多数の流速にわたる拡散種の多数の“値域（bins）”について拡散比を抽出し、そしてこれらを既知の流体力学的半径の種についてシミュレートした結果と比較することによりその分析を不均質混合物の種へ拡張することができる。

40

【0269】

本発明のデバイスおよび方法は、溶液の状態および等電点に関係なく、目的とするいずれかのタンパク質種の非攪乱型の検出および濃度決定に使用できる一般的技術を提供する。

【0270】

親水性チャネル

流体デバイスにおける親水性チャネルの使用を標識試験の一部として調べた。上流の第1および第2供給チャネルにより供給される収束型の混合チャネルをもつ流体デバイスを作成した（参照：図15（D））。デバイス中のこれらのチャネルは、チャネル表面に親水性シラノール基を生成するようにプラズマ処理した標準的なP D M S チャネルであった。これらのチャネルに次いで水を満たして、親水性表面を数日間維持した。プラズマ処理工程は、接着したばかりのマイクロ流体デバイスに実施された。

50

【0271】

第1供給チャネルは液体流れ中の成分（インスリン）を供給し、第2供給チャネルは液体流れ中の標識（OPA混合物）を供給した。第1および第2チャネルからの流体は収束型の混合チャネルの上流末端にあるジャンクションで接触することができた（参照：明視野イメージ図15（B））。流体は収束し（参照：明視野イメージ図15（B）および蛍光イメージ15（E））、のちに検出ゾーン（参照：明視野イメージ図15（C）および蛍光イメージ15（F））で検出された。

【0272】

インスリン含有流体は10mg/mLのインスリン、pH2を含有していた。標識流体は12mMのOPA、18mMのBME、4%のSDS、および200mMのカーボネート、pH10.5を含有していた。

10

【0273】

図15（A）、（B）および（C）は、界面を明瞭に目視できる（粘度の異なる溶液について予想された）けれどもインスリンは処理済みPDMsチャネルに粘着せずに下流で溶解することを示す。このデバイスに高濃度インスリン流体を用いているにもかかわらず、これが起きる。この場合、層流界面に、ある不溶性タンパク質がその等電点を通過しつつあるタンパク質として存在することを予想すべきである。不溶性タンパク質はPDMsチャネルに粘着せずに下流で溶解する。

ここにおけるイメージは、図11および12（B）のイメージにみられる不溶性物質と対照的である。

20

【0274】

図15（G）は、図15（D）のデバイス内に実質的に安定な流れが発生することを示す。これは、閉塞の最小化およびマイクロバブル形成の阻止（より良好な濡れによる）によるものである。

【0275】

親水性チャネルの使用は、本発明方法において別個の変性工程の必要性を排除すると考えられる。完全に混合する前に一時的に不溶性であるタンパク質はチャネル壁に粘着せず、のちに下流で可溶化されるであろう。

【0276】

電気泳動分離

30

電気泳動は、核酸、ペプチドおよび細胞を分離するための一般的な生物学的手法である。電界を印加した際の固体マトリックス中における遅滞により被検体の電荷-対-サイズ比を査定するゲル電気泳動は最も一般的な手法であるが、マトリックスふるい作用自体が相互作用を攪乱する可能性があるので、これは弱いタンパク質会合事象の試験には好適でない。キャピラリー電気泳動(Capillary Electrophoresis)（CE）は、チャネル全体にわたる被検体の電気泳動移動度および電気浸透流に基づいてそれらを時間的に分離することを伴なう。フリーフロー電気泳動(Free-Flow Electrophoresis)（FFE）においては、試料は平坦なチャネル全体にわたって圧力駆動流れにより移動し、電界を印加した際の分離は流れの方向に対して直角である。FFEは定常状態法であるので、インジェクションと分離は連続的に行なわれる。マイクロ流体フリーフロー電気泳動(μ FFE)、すなわちFFEのマイクロ流体用小型化は、ジュール加熱(Joule heating)の影響を低減することによる分離分解能の改善、および他の分離法とのオンライン統合の容易さという利点をもつ(Turgeon et al. Micro free-flow electrophoresis: theory and applications 394, 187-198 (2009). URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-2656-5>)。

40

【0277】

μ FFEの制約のひとつは、歴史的に電極がマイクロ流体デバイス内に組み込まれてきたことであり、それは電極と導電性水性媒体の直接接触を確実にするのに必要である困難な多工程プロセスを伴なう(Kohlheyer et al. Lab on a Chip 6, 374-380 (2006); Chen et al. Lab on a Chip 11, 2316-2318 (2011))。最近、本発明者らのある者が、電極をチャネルに沿って配置した、電気泳動に適したマイクロ流体デバイスを開発した(Her

50

ling, T. W. et al.)。

【 0 2 7 8 】

Herlingらは、三次元電極をマイクロ流体デバイス内に单一フォトリソグラフィー工程で組み込むことを記載し、著者らはそのマイクロ流体デバイスを小分子の正味溶媒和電荷の定量のために用いた(Herling, T. W. et al. Applied Physics Letters 102, 184102-4 (2013))。しかし、最初の研究では検出を可能にするために蛍光色素が用いられた。この手法を生体分子の分離に適用するには蛍光標識されている生体分子の使用が要求された。分子のサイズ、電荷および相互作用に影響を及ぼす外因性蛍光標識の存在は、観察しているプロセスに影響を及ぼす可能性をもつ。実際に、外因性標識は特に電気泳動分離において問題があることが証明された。

10

【 0 2 7 9 】

先に考察したように、好ましい態様において、本発明は、流体デバイス内で成分、たとえばタンパク質を分離および後続標識するための方法を提供する。分離後の標識化により、上記で考察した問題が避けられる。よって、標識が存在しないので、分離の前および途中の成分の挙動は影響を受けない。

【 0 2 8 0 】

本発明者らは、検出工程（この工程は分離後標識化を含む）と連結した電気泳動分離を開発した。図5（A）および（B）は、本発明の方法に使用できる本発明によるデバイスのデザインを示す。

20

【 0 2 8 1 】

タンパク質および緩衝液を図5（A）の左に示すデバイス入口ヘロードする。緩衝液流体流れはタンパク質流体流れのいずれの側にも供給される。これらの流体流れは大断面チャネル内で接触し、結合した層流型流体流れは小断面チャネル内へ通過する。本発明者らのうちある者は、大断面チャネルの使用によりジャンクションにおける流体停滞を最小限に抑えることを先に確立した。

【 0 2 8 2 】

電極は小断面チャネルのいずれの側にも備えられ、チャネルを横切って成分を偏向させるためのものである。大および小断面チャネルが分離チャネルを構成する。小断面チャネルの下流末端に流れ分離器が備えられ、それは結合した流体流れの一部分を分岐させる。図5（A）のデバイスにおいて、流れ分離器は緩衝液流の一部分を分岐させる。図5（B）は図5（A）のデバイスの流れ分離器を示す拡大図であり、それは小断面チャネルの縦中心線からはずれた位置にある。

30

【 0 2 8 3 】

流れ分離器内の分岐流は、標識混合物の流れと合流することができる。標識混合物の流れは図5（A）に示すリザーバーから供給される。分岐流中の成分は標識され、次いでその後、分析される。流れ分離器の下流にあるフローチャネルが検出ゾーンを構成する。

【 0 2 8 4 】

デバイスを取出しモードにおける圧力低下の適用により作動させる場合、緩衝液の体積流量はタンパク質の体積流量の10倍となるほどの抵抗であり、したがってタンパク質分布は緩衝液の鞘により挟まれた鋭い“ハット”関数の分布となる。中心流体流れである“ビーム状”のタンパク質は、チャネルのいずれの側にも電極を備えた分離チャネルを通過する。このチャネルに電圧を印加すると、タンパク質は緩衝液流中へ偏向し、その偏向度はタンパク質の電荷 - 対 - サイズ比に関係する。偏向により、タンパク質は緩衝液流体流れの一部分を分岐させる流れ分離器の方向またはそれから遠ざかる方向へ向かう。図5（A）および（B）に示す流れ分離器は、分離チャネルを出る総流れ体積の約10%を分岐させるよう設計されている。この流れは検出ゾーンへ分岐し、そこでタンパク質は標識され、その後、検出される。

40

【 0 2 8 5 】

分離チャネルからの分岐しなかった流れも採集され、検出ゾーンを出た分岐流体流れと再結合する（図5（A）に示すように）。

50

分岐したタンパク質は 1 : 1 の比で潜在性共有結合標識 (L C L) 溶液 (ここでは、11 mM の O P A、16 mM の B M E、180 mM のカーボネート, pH 9.5) と混合される。これらの溶液はチャネル (待機ループとしても知られる) 内で数秒間にわたって混和し、それによりタンパク質は変性され、かつ定量的に標識される。次いで流体流れの蛍光強度が測定される。

【 0 2 8 6 】

これらのデバイスは、蛍光バックグラウンドを低減するために硬化前におおよそ 0.2% w / v のカーボンナノ粉末の添加により黒色に着色されたポリジメチルシリコサン (P D M S) にキャスティングされた。この黒色デバイスを整合させ、タンパク質と一緒に、タンパク質標識 (たとえば、O P A 標識) の吸光、励起または発光を妨害しない励起および発光スペクトルをもつ蛍光色素をロードすることにより、ビーム偏向を確認した。ここではローダミン 6 G をトレーサー色素として選択した。デバイスを整合させ、トレーサー色素について適切な偏向を確認した後、印加電圧を変動させ、検出ゾーンで蛍光強度を測定した。標識化は一般に定量的である (たとえば、O P A について) ので、蛍光強度は偏向したタンパク質の濃度に正比例する。

【 0 2 8 7 】

このデバイスを用いて、分離チャネルにおけるある範囲の電圧にわたってタンパク質 B S A およびリゾチームを分離および検出した。図 5 (C) は、B S A およびリゾチームの電圧依存性偏向プロファイルを示す。B S A は 4.7 の等電点をもち (Ge et al. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 9, 131-150 (1998))、p H 7 で負に荷電しているはずである。

【 0 2 8 8 】

リゾチームは 11.4 の等電点をもち、p H 7 で正に荷電しているはずである (Wetter et al. Journal of Biological Chemistry 192, 237-242 (1951))。よって、B S A とりゾチームは分離チャネル内においてガウス様電圧偏向プロファイルで反対方向へ偏向する。電圧偏向プロファイルのタイトネス (tightness) は、検出のために空間的に分岐させたタンパク質の流速の増大または体積分率の低減によっておそらくさらに増大する可能性がある。

【 0 2 8 9 】

追加実験

本発明を支持する追加実験を以下に提示する。本発明者らは、成分相互作用、たとえばタンパク質 - タンパク質相互作用を特性分析するための拡散法の使用を調べた。本発明者らはそれらの流体デバイスのさらなる態様をも作成し、そのようなデバイスを用いて流体流れ内の成分を分離および標識した。

【 0 2 9 0 】

追加のバルク標識測定

蛍光分光計 (Varian, Cary Eclipse) および蛍光マイクロプレートリーダー (B M G Lab Tech) を用い、それぞれ石英蛍光キュベット (Hellma) またはハーフエリア非タンパク質結合性マイクロプレート (Corning, 製品 # 3881) で、多様な発蛍光団、化学量論、および変性条件を調べた。

【 0 2 9 1 】

追加試験に用いた定量標識混合物は下記のものを含有していた: 12 mM の O P A、18 mM の B M E、および 4% w / v の S D S、200 mM の炭酸緩衝液中, pH 10.5。標識溶液を室温で遮光し、調製から 3 日以内に使用し、あるいは凍結して調製から 14 日以内に使用した。この標識溶液を、一般に 1 : 1 v / v で目的試料と混合した。

【 0 2 9 2 】

別に記載しない限り、タンパク質溶液を 5 mM H E P E S, pH 7.0 中に調製し、それらの濃度を NanoDrop UV - Vis 分光光度計で分光光度法により決定した。

【 0 2 9 3 】

インジェクターモジュールを備えた C L A R I O s t a r マイクロプレートリーダー (B M G Lab Tech) を用いて時間制御蛍光測定を実施した。測定は ' ウェルモード (well

10

20

30

40

50

mode)’で実施された；これは、各ウェルを個別に処理したことを意味する。インジェクターモジュールは50 μ Lの色素を430 μ L/秒の速度で単一ウェルに注入し、プレートを1秒間攪拌し、次いで試料を0.25秒毎に125秒間測定した後、次のウェルへ移動した。各試料、および色素バックグラウンド溶液を、3重に調製した。

【0294】

追加のマイクロ流体設計および製作

以前のように、AutoCADソフトウェア(Autodesk, Inc.)を用いてマイクロ流体デバイスを設計した。次いで、マイクロ流体デバイスのチャネルに対応する透明領域、および背景に対応する黒色領域を備えた、アセテートバイナリーマスクを入手する(MicroLithography Services)。図24に示すデザインをもつデバイスが作成された。

10

【0295】

標準ソフト - リソグラフィー法を用いてマイクロ流体デバイスを製作した。キャスティングすべきデバイスのポジ型インプレッションを提示するシリコンマスターを作成した。デバイス高さは、目的の厚さのネガ型エポキシフォトレジスト(MicroChem, 製品# SU-8 3025, 目的の厚さに応じて)をシリコンウェハー上にスピンドルティングすることにより設定された。ここに記載する追加試験に用いたデバイスは25 μ mの高さであった。最終的にネガ型デバイスチャネルに対応するポジ型機構は、フォトレジストの一部をアセテートマスクでブロックし、露出領域をコリメートUV光で架橋させ、非架橋ポリマーをプロピレングリコールモノメチルエーテルアセテート(PGMEA)現像剤(MicroChem)で製造業者の指示に従って除去することにより作成された。

20

【0296】

マイクロ流体デバイスをポリジメチルシロキサン(PDMS)にキャスティングした。PDMSエラストマーと硬化剤(Dow Corning, 製品# 184)をそれぞれ1:1の重量比で混合した。混合は十分であることが重要であった：最適な硬化エラストマ - 性能のためには少なくとも5分間の手動攪拌が重要であった。黒色PDMSをキャスティングする場合、これはおよそ1mg/mLのカーボンナノ粉末(Sigma, 製品# 633100)をエラストマー / 硬化剤に添加し、十分に混合することにより製造された。

【0297】

このデバイスを出口における流体の取出しにより操作した。よってチャネルの寸法はデバイスを通る流体流れの相対速度を制御するように、流体回路と電気回路間の類似性に基づいて選択された。図24に示す代表的な拡散ベースのデバイスにおいて、タンパク質溶液と緩衝液は1:1の体積比で分離チャネルの上流末端において接触し、接觸しているタンパク質溶液と緩衝液の流れは分離チャネル内を下流へ25 μ L/時の速度で移動する。得られた流れの三分の一(最初のタンパク質含有流れから最も遠くへ拡散したタンパク質を含有する)を次いで結合流から分岐させる。緩衝液流の一部分(のみ)であるこの分岐部分を、次いでOPA蛍光標識混合物の流れと1:1の体積比でインフロー接觸させる。この体積比は目的とする系に応じて変更できる。

30

【0298】

図23に示す反応速度測定に基づいて、OPA蛍光標識流と分岐流が最初に接觸した後3.1秒間、蛍光検出を行なう。

40

インフロー標識反応に際して等電点を通過する成分、たとえばタンパク質は、フローデバイスの疎水性PDMSに付着する傾向をもつことが見出された。PDMSチャネルをより親水性にすると、この問題が除かれた(かつ全般的な流れ安定性が向上した)。

【0299】

この親水性増大を達成するために、以下に記載するように、シールしたPDMSチャネルに2回目の拡張プラズマ酸化工程を施して、チャネル表面にシラノール基を形成した。しかし、酸化型黒色デバイスは酸化型透明デバイスより非特異的タンパク質吸着に対して脆弱であった；これは、表面のカーボン欠損部の存在によってシラノール層が亀裂および疎水性復活をより生じやすくなるからであると思われる。

50

【0300】

したがって、チャネルを透明P D M Sの薄層にキャスティングし、次いでその頂部および側面を黒色P D M Sで覆って蛍光バックグラウンドを低減した‘サンドイッチ’デバイスを開発した。

【0301】

したがって、およそ2mm厚さの透明P D M S層をキャスティングし、60分間ベーキングした。透明P D M Sデバイスを切り取り、チャネル側を下にして、窒素で清浄化したペトリ皿に可逆的に接着した。透明P D M Sデバイスの周囲を確実にきれいに切断することが重要であった：端に沿った欠損部は接着不良の原因となり、黒色P D M Sが透明P D M Sの下およびチャネル機構内へ浸入する可能性のあることが分かった。

10

【0302】

浸入をさらに低減するために、室温で数時間硬化させて基材の粘度を高めた透明デバイスから黒色P D M Sを製造することが得策である。次いで、可逆的に接着した透明デバイスの上に黒色P D M Sを約3mmの総添加高さに注入することができる。このサンドイッチデバイスを75分間ベーキングする。

【0303】

ベーキングの後、このハイブリッドデバイスは容易にペトリ皿から取り出され、そしてデバイスを切り取った。直径0.75mmのUni-Coreパンチ(Harris)を用いて入口および出口に孔を開けた。接着前に‘マジックテープ(登録商標)’(Scotch)およびIPA超音波処理で屑を除去した。接着前に残留IPA(P D M S内に吸収されているもの)を除去することが重要であったので、接着工程前にデバイスに窒素を吹き付けて乾燥させ、15分間ベーキングした。

20

【0304】

最初の接着は10秒間の酸素プラズマ発生を伴なった。デバイスをシールした後、それを10分間ベーキングして、完全シールを形成させた。その後、シールしたデバイスを高電力での500秒間の酸素プラズマ発生により再び酸化した。酸化工程の直後にデバイスに水を充填し(1mLのプラスチック気密注射器に接続した内径0.38mm、外径1.09mmのprotectチューブを使用)、それによりチャネル内の疎水性復活を阻止した。入口および出口を水充填したゲルローディングチップで遮閉した。この処理で、デバイスは接着および酸化後少なくとも7日間は非特異的タンパク質吸着に抵抗することができた。

30

【0305】

マイクロ流体デバイスの使用

拡散ベースの分離法に使用するための本発明の例示的なデバイスを図24に示す。等割合のフォールディングした未標識ネイティブタンパク質分子および緩衝液をこのマイクロ流体デバイスにロードした。流体がミクロン規模に閉じ込められた場合、流れは対流ではなく層流になり、したがって成分および緩衝液の流れがマイクロ流体チャネル内で接触するといずれか規定した滞留時間後のチャネルを横切る成分の空間分布は完全に被検体の拡散係数により決定される。

【0306】

重要なことは、システムが明確な出発状態に達した時点で測定を開始することである。t₀ではマイクロ流体領域に乱流混合が存在しないので、すべてのRHの成分が同じ初期分布をもち、拡散チャネルの幅の半分を占めている。この状況は図24に、シミュレートした0.5および10nmの種について横方向濃度勾配の同等性により示される。このシステムを次いで拡散が行なわれるのに伴なって一定期間、展開させる。時間t_D-t₀にわたる拡散の後、より小さい0.5nmの種は10nmの種よりさらに遠くへ拡散した。

40

【0307】

定常状態で操作しているマイクロ流体システムについて観察された、流れの方向に対して直角の空間的分離・時間的な並行分離ではなく-により、分解能の損失なしに下流モジュールへ連続的に空間分布の画分を分岐させることができる。

50

【0308】

デバイス全体にわたる相対的な流体流れは、可能性のあるパスに沿った圧力差を変更することによって厳密に設定され、それは流体力学的抵抗をチャネル寸法で制御することにより達成される。こうして、時間 $t_D - t_0$ (長方形) でチャネル幅の少なくとも六分の一拡散した分布の画分が、時点 t_D で標識化モジュールへ向けられる。この位置において、標識溶液を並行流(co-flow)ジャンクション i_2 で導入することにより条件を変更して、すべての反応性タンパク質基を定量的に修飾できる。

【0309】

潜在性蛍光体そのものは蛍光性ではないので、精製工程は必要ない。タンパク質配列、よって反応基数が分かっていれば、蛍光強度の測定により絶対タンパク質濃度を決定できる。

10

【0310】

緩衝液およびロード試料を使用前に最初に $0.22 \mu\text{m}$ フィルター (Millipore) により濾過して、デバイスを目詰まりさせる可能性のある粒状物を排除した。その出口から適当なネイティブ緩衝液と共に充填することによりデバイスにロードした。

【0311】

一般に、 1mL Hamilton ガラス注射器または 1mL プラスチック気密注射器 (27ゲージ針により Portex チューブに接続) のいずれかを用いてデバイスを通る流体の流れを制御した。

20

【0312】

これらの実験に用いた流速で、ガラス注射器とプラスチック注射器の間に差は認められなかった。入口と注射器に同時に圧力をかけて、ローディングプロセス中に形成される気泡をいずれも除去し、試薬類をゲルローディングチップでデバイス入口に導入した。

【0313】

試薬ロード量を実験に応じて $10 \sim 200 \mu\text{L}$ で変更した。本発明の方法にはより小さい体積を使用できることを明記する。

先に記載した実験と同様に、nEMESYS シリンジポンプによりデバイスから流体を取り出す。最初に試薬類をデバイスから取り出してロード工程に際しての何らかの入口クロスフローの影響を最小限にするために、最初に $20 \mu\text{L}$ の流体を $300 \mu\text{L}$ / 時の流速で取り出した。実験に用いた拡散ベースのデバイスについて、分離チャネルにおいて $25 \mu\text{L}$ / 時の流速を用い、これはデバイスの出口における $33.3 \mu\text{L}$ / 時の取り出し速度に対応していた。イメージ取得の開始前に少なくとも 18 分間、流速を平衡化させた。

30

【0314】

Coolsnap MYO CCD カメラ (Photometrics)、 365nm Camera OptoLED (Photometrics)、および蛍光イメージ用 Chromo 49000 DAPI フィルター (Photometrics) を備えた Zeiss Axio Observer 顕微鏡を用いて、明視野および蛍光イメージを取得した。 $2.5\times$ 、 $5\times$ 、 $10\times$ 、および $20\times$ の対物レンズを用いた。10ミリ秒 ~ 10秒の露光時間を追加試験に用い、それぞれの取得に際して一般に $10 \sim 60$ のイメージを平均した。

【0315】

蛍光シグナルが低い場合、EM ゲインを用い、あるいは隣接ピクセルをビニングした。各セットの測定およびイメージングセッティングについて、反応しなかった色素の最小蛍光を明らかにするために少なくとも 1 つの色素バックグラウンドイメージを撮影した。フラットフィールドバックグラウンドイメージも取得した。測定を暗環境で行ない、分析に際しての温度を 25°C に維持した。

40

【0316】

イメージの解析および当てはめ

ジャンクション(たとえば、分離チャネルの上流領域)、チャネル(たとえば、標識流を分岐流と接触させる検出チャネル)および流れ分離器のイメージをルーティンに取得した。これらのイメージが目詰まりまたは他の異常による流れプロファイルの変化を示した場合、検出ゾーンで取得したイメージを廃棄した。

50

【0317】

基本的イメージ解析を ImageJ で行なった。フラットフィールドバックグラウンドイメージを、取得した各イメージから差し引いた。簡単に述べると、目的領域を滞留時間マーカーのすぐ上流に定めた（滑りのない境界状態のため流速が有意に低下するデバイス壁付近の領域を廃棄する）。この領域内の平均蛍光を計算し、これからチャネルのすぐ上および下のチップのフラットフィールド領域における平均蛍光を差し引き、それにより照明源の強度の経時変動および P D M S 上への試料吸着の影響を減らした。

【0318】

既知サイズの基準粒子についてシミュレートしたものに対する実験による強度の比を比較することにより、試料の流体力学的半径を計算した。よって、各試料について下記の比を計算した：

【0319】

【数2】

$$\phi = \frac{\gamma_1 - \gamma_d}{\gamma_2 - \gamma_d}$$

【0320】

ここで、 ϕ は後続分析に用いた拡散試料および均一に分布した試料を比較した強度比であり、 γ_1 は試料を 1 つのデバイス入口にロードした場合に観察される検出ゾーンにおけるバックグラウンド補正した蛍光強度であり、 γ_2 は試料を両方のデバイス入口にロードした場合に観察される検出ゾーンにおけるバックグラウンド補正した蛍光強度であり、 γ_d はバックグラウンド補正した O P A 標識混合物の強度である。 ϕ を用いて、基底関数についてみられたものからの内挿に基づいて各試料の流体力学的半径を決定する。

【0321】

オンチップ吸光

基準タンパク質 A 280 セッティングを用いて NanoDrop 分光光度計でバルク吸光測定を実施したが、Varian UV/VIS 分光光度計を用いた場合にも類似の結果が得られた。これを後記のバルク吸光セクションに記載する。

【0322】

市販の環状オレフィンコポリマーチップ (Thin X X S, チャネル断面 320 × 320 μm) および ActiPlex D100 UV 領域イメージング検出器 (Paraytec) を用いて、オンチップ UV 吸収測定を実施した。総デバイス厚さは 1.7 mm であり、すべての測定を暗環境で行なった。

【0323】

150 μM BSA を含有する溶液をデバイスの一方の入口から、Millili-Q 水を他方から、それぞれ 50 μL / 時の速度で流入させて、界面を形成させた。計測器のパルスキセノンランプ (280 nm でバンドパスフィルター処理) によりバースト間の遅れ 10 ミリ秒で、チャネルを 8 回の連続シグナルバーストにより照射した。その結果生じる光強度を 100 ミリ秒の期間にわたって統合した。水のみを充填したチャネルについて取得した測定値によるバックグラウンド補正により、約 120 のシグナル対ノイズ比が得られる。その結果、このデバイスセットアップについて検出限界は数 μM となる。

【0324】

フューズドシリカキャピラリーにおいて約 100 nM までの濃度の BSA が検出されたことに注目すべきである。

バルク吸光

バルク吸光測定について観察された感度を本事例の方法と比較した。

【0325】

タンパク質濃度をバルク吸光によって正確に決定するためにはおよそ 600 nM のタン

パク質が必要であることが認められ（参照：図20）、それに対しO P A - 標識化法を利用する本事例の方法ではnM未満のタンパク質濃度をバルクで正確に決定できた。

【0326】

濃厚な原液からの希釈により種々の濃度の多数のB S A 試料を調製し、それらの濃度を分光光度法により決定した。図20に示すように、A₂₈₀をタンパク質濃度（nM）の関数としてプロットした。マーカーが四角内にある場合、これはその試料が緩衝液ブランクより少ない光を吸収したことを示す。A₂₈₀からタンパク質濃度を正確に決定するためにはおよそ600nMのB S A が必要であった。

【0327】

非特異的タンパク質吸着および流れ安定性

10

本発明のマイクロ流体デバイスは、一般にポリジメチルシロキサン（P D M S）中に製作される。P D M S ソフトリソグラフィー法の利点は十分に認識されており、最も顕著なものは他のリソグラフィー法と比較して迅速なプロトタイピング、低いコスト、および高いスループットである。しかし、タンパク質などの成分をその成分の等電点より低いp Hで流体デバイス内を輸送する場合、問題が生じる。

【0328】

本事例の好ましい標識工程において、標識混合物は流体流れのアルカリ度をp H 10.5付近にまで高める。

タンパク質などの成分がチップ上でその等電点（I E P）を通過する際、成分を含有する流れ（たとえば、分岐流中に存在する可能性がある）と標識流の間の層流界面に存在する成分は一時的に非荷電状態になり、その成分はP D M S チャネル表面に付着すると思われる。そのような付着はマイクロ流体ジャンクションを遮閉して流れの途絶を引き起こす。これは検出ゾーンで経時に発生する蛍光の著しい変動を引き起こす可能性がある。これにより、記録された結果の定量的解釈が困難になり、時には不可能になる。

20

【0329】

この問題に対処するためには、既にガラス表面に接着されたP D M S デバイスに追加のプラズマ酸化工程を実施することが有益である。この追加酸化処理によって親水性のガラス質シロキサン層がP D M S チャネルの露出表面に形成され、それにより非特異的な成分吸着が低減し、流れ安定性が著しく改善される。

【0330】

30

しかし、チャネルを黒色P D M S にキャスティングするとこれらの有益な特性は失われ、それはシロキサン表面のカーボン欠損部の存在下で促進された疎水性復活によるものである可能性が最も大きい。この研究において本発明者らは、効果的なチャネル酸化と蛍光バックグラウンド低減の有益性を組み合わせたサンドイッチデバイスを開発した。

【0331】

図21は、流体デバイスにおいてI E P を通過するウシインスリンについて、正規化した蛍光（A U）の経時的な（秒）変化を示し、そこで（a）は本発明の態様による標準的なP D M S 流体デバイスであり；（b）は追加プラズマ処理を施した標準的なP D M S 流体デバイスであり；（c）は追加プラズマ処理を施した標準的な黒色P D M S 流体デバイスである。

40

【0332】

標準的デバイス（追加プラズマ処理を施していないもの）には、流体チャネル内に著しい凝集物沈積がみられる。正規化した蛍光シグナルに経時的に有意の変化があるということになる（図21（a）にみられるように）。P D M S 表面の広範なプラズマ酸化は、タンパク質吸着に抵抗するシラノールに富む親水性の層を形成する。透明P D M S チャネルをこの方法で酸化した場合、それらは層流界面におけるタンパク質沈積に抵抗し、それにより流れ安定性が有意に改善される（図21（b）にみられるように）。しかし、黒色チャネルを酸化した場合、非特異的タンパク質吸着に対する抵抗性が若干失われて、透明デバイスと比較して流れ安定性がわずかに低下する（図21（c）を図21（b）と比較されたい）。これに対処するために、本発明者らは、効果的かつ持続的な酸化を容易にするた

50

めに透明 P D M S からチャネルを形成し、一方で黒色 P D M S で頂部および側面を覆うことにより蛍光バックグラウンドを低減する、ハイブリッド ' サンドイッチ ' デバイスを用いた。

【 0 3 3 3 】

R H 決定

本事例のフローシステムにおいて、このシステムは定常状態で作動する。検出ゾーンにおける下流の成分濃度の測定により、標識化のために分岐させた成分の総濃度が明らかになる。空間分布は分析データに直接には見えないが、さらに測定を行うと成分の R H が得られる。

【 0 3 3 4 】

図 2 2 (a) は、時点 t_D における既知濃度の成分の均一な基準分布を示す (1 . 0 粒子濃度における線)。実際に、成分を第 1 および第 2 の両方の流体流れ中に供給することにより、この分布を容易に達成できる。

【 0 3 3 5 】

各 R H の種 (図 2 2 (a) に比色法により示す) は、標識化のために分岐させた拡散種 - 対 - 均一分布種の特徴的な画分をもつ (分岐工程は第 2 流れ中へ最も遠くまで拡散した種を分岐させる)。標識化は本質的に定量的であるので、これはこれらの種について検出ゾーンで観察された蛍光強度を比較することによって容易に査定できる (図 2 2 (b))。予想どおり、より小さい種は分離工程に際して最も遠くまで拡散したので優勢である。

【 0 3 3 6 】

図 2 2 (a) および (b) のデータは図 8 および 9 のデータのバリエーションであり、それと調和する。

拡散分離および標識化を用いて成分をサイジングする方法および装置の性能を試験するために、サイジングラダーを開発して試験した。このラダーは分子量 (M W) が 3 枠以上異なる生体分子を含んでいた。サイジングラダーはさらに、二次および三次構造が異なるタンパク質、アンフォールディングしたタンパク質およびフォールディングしたタンパク質、ならびにタンパク質複合体を含んでいた。

【 0 3 3 7 】

図 2 2 (c) は、分析用超遠心法 (analytical ultracentrifugation) (A U C) およびパルス磁場勾配 N M R (pulsed-field gradient N M R) (P F G - N M R) により決定したものとして種々の生体分子についてレポートされた文献の流体力学的半径値と、本事例の拡散ベースの方法から実験により得られた値との比較を示す。特に、 P F G - N M R は低い吸光係数をもつ低い M W 重量の種に用いられ、 A U C はより高い M W 重量の種に用いられた。可能な場合は両方の値をレポートした。重要なことは、 A U C も P F G - N M R も調べた全分子量範囲にわたって適切なものではなかったことである。

【 0 3 3 8 】

対照的に、本事例の方法で得られた流体力学的半径は、調べた全 M W 範囲にわたって、 A U C 法と N M R 法の組合せで得られたものと近似していた。

高い分子量範囲における不確実さは、たとえばより高い濃度のより高い分子量の種を含む異なる部分の第 2 流れを採集することにより、あるいは第 1 流れの一部分 (より低い分子量の種が枯渇しているであろう) を採集することにより、分布の異なる画分を標識化することによって低減できる。

【 0 3 3 9 】

拡散ベースの R H 値と予測 ' ナイーブ ' 拡散流体力学値との比較をさらに行なった：これは、示した分子量のタンパク質を含む可能性のある最小球体の流体力学的半径 (R m i n) である。その比較を図 2 2 (d) に示す。

【 0 3 4 0 】

R m i n 予測値の正確さは M W の増大に伴なって系統的に (systematically) 低下し、これはより長い配列をもつタンパク質が取りやすい非球体コンホメーションを反映している可能性がある。

10

20

30

40

50

【0341】

このサイジングラダーは、伝統的なサイジング法を用いて特性分析するのが困難な可能性のあるタンパク質およびタンパク質複合体を含む。タンパク質 - シヌクレインはパーキンソン病において本質的な役割をもつ。ネイティブ状態でアンフォールディングしている - シヌクレインの構造はコンパクトではないので、計算した R_{min} 、および AUC 測定から得られた R_H は、PEG - NMR または本事例の拡散法で得られたものよりかなり小さい。

【0342】

本発明の拡散ベースの方法を用いてタンパク質の不均質混合物を分析した。Zn²⁺を含まないウシインスリンを含有する水性試料を調製し、そこではモノマー形とダイマー形が平衡状態にある。拡散法から決定した R_H 値は $1.64 \pm 0.16 \text{ nm}$ であり、それは試料中に存在するモノマーおよびダイマーの割合を反映する。

10

【0343】

成分相互作用

本事例の方法は、成分、たとえばタンパク質の、成分濃度の変化に伴なうアセンブリーを調べるために使用できる。たとえば、拡散分離法を用いて溶液内の種について流体力学的半径の変化を研究することができる。

【0344】

混成流体力学的半径は、その混成種の相対存在量、および純粋な成分の半径に基づいて計算できる。一般的な場合、単一成分を分析する際には：

20

【0345】

【数3】

$$r_H = f_s(\phi)$$

【0346】

ここで、 R_H は観察された流体力学的半径であり、 f_s は実験により観察された、均一に分布した粒子に対する拡散粒子の強度比であり、 f_s は ϕ と基底関数をシミュレートしたものとの比較に基づいて未知試料のサイズを内挿するサイジング関数である；本明細書中に WO 2014/064438 に関連して記載。不均質混合物の場合は：

30

【0347】

【数4】

$$r_H = \sum_{i=1}^n f_s(\phi_i P_i)$$

【0348】

強度比 ϕ_i と、 n 種類の混合物成分の各 i の割合 P_i との線形組合せにより、 R_H が得られる。 P_i は第一級アミンの割合を表わし、成分 i は総タンパク質濃度ではなく総第一級アミン濃度に寄与することが注目される。

40

【0349】

タンパク質 - タンパク質相互作用の定量特性分析について、混成 R_H を用いて純粋な混合物成分の結合定数およびサイズを抽出できるかを調べるために、一連の実験を行なった。本発明の拡散分離法からの結果を、一般に用いられる拡散サイジング法である動的光散乱により得られた結果と比較した。

【0350】

- ラクトグロブリンのオリゴマー化を調べた。 - ラクトグロブリンは一般に用いられる生物物理学的モデルタンパク質であるが、平衡定数が 1 術より大きく変動することが文

50

献に報告されており、生理的濃度下でのオリゴマー化によりダイマーのみが得られるか、あるいはテトラマーおよびオクタマーも集団内に存在するかについての不一致がある。

【0351】

中性pHおよび5mMのイオン強度で、2μMから40μMまでの範囲の-D-ラクトグロブリン濃度の一連の-D-ラクトグロブリン溶液を調製した。これらの溶液を、DLSおよび本明細書に記載する拡散分離法により分析した。オリゴマー化の結果を図16に示す；そこには、種々の濃度の-D-ラクトグロブリン溶液(μM)に関して計算した流体力学的半径RH(nm)を、DLS実験(a)および拡散実験(b)について示す。データをZave値として提示する。

【0352】

DLS実験では、それらの数値を連想させるサイズが、得られたタンパク質ダイマーをレポートしたのは、最高タンパク質濃度においてのみであった。しかし、データにはなお著しい変動があり、データにはなお著しい変動があった。DLSにより集団中のタンパク質モノマーを観察することはできなかった。

【0353】

本事例の拡散法により得られた混成RHを図16(b)に示す。流体力学的半径は調べた濃度範囲にわたって1.83および2.60nm増大し、それは1.4のサイズ増大に相当する。これはダイマー化事象と一致する。オリゴマー化メカニズムにさらなる光を当てるために、前記のように純粋なモノマーおよびダイマーについての*i*および*P_i*が得られるようにデータを当てはめた。古典的には、ホモダイマー化事象において：

【0354】

【数5】

$$K_d = \frac{[M][M]}{[D]}$$

$$[M] + 2[D] = C_T$$

10

20

30

【0355】

ここで、MおよびDはそれぞれモノマーおよびダイマーのモル濃度であり、C_Tは混合物中に存在するすべての種の総濃度であり、K_dはダイマー化定数である。この結合二次方程式を解くことによりモノマー濃度が得られ、化学量論を考慮に入れるとモノマーが寄与する第一級アミンの割合M_{pa}は

【0356】

【数6】

$$[M_{pa}] = \frac{K_d}{4} \left\{ \left(1 + \frac{8C_T}{K_d} \right)^{\frac{1}{2}} - 1 \right\}$$

40

【0357】

同様に、ダイマーの第一級アミン濃度は容易に決定でき：

【0358】

【数7】

50

$$[D_{pa}] = [C_T] - [M_{pa}]$$

$$P_m = \frac{M_{pa}}{M_{pa} + D_{pa}}$$

$$P_d = \frac{D_{pa}}{M_{pa} + D_{pa}}$$

【0359】

関連の P_i 当てはめパラメーターが得られる。データをこのように当てはめることにより、 $4.1 \mu M$ の解離定数が、それぞれ純粋なモノマーおよびダイマーについて外挿したサイズ 1.34 および 3.21 nm と共に得られた。

【0360】

本事例の方法を用いて、測定した流体力学値は試験した濃度範囲（約 $1 \mu M$ から $40 \mu M$ まで）にわたって 1.42 nm 増大していることが観察された。提示された半径は、すべての混合物成分を考慮に入れた混成値である。

【0361】

タンパク質 - タンパク質相互作用の定量分析を容易にするために、本発明者らは以前にそのような混成データから純粋な混合物成分の平衡定数およびサイズを抽出する方法を開発した；たとえば、本明細書に記載し、WO 2014/064438 に記載したもの。

【0362】

前記に指摘したように、この試験で得られたデータはダイマー化モデルに良好に当てはまり、 $4.1 \mu M$ の解離定数が明らかになり、 - ラクトグロブリンダイマー化事象の矛盾する文献報告に新たな光が当てられた。

【0363】

したがって、本発明の方法を用いてモノマーおよび混合物中の集合成分を同定することができる。

タンパク質三元混合物の分離

複雑な混合物種の成分の分離においてフリーフロー電気泳動分離は拡散分離より効果的である。拡散分離を用いると、低分子量種を高分子量種から分離できるが、高分子量種は低分子量種のバックグラウンドと共に溶出する。対照的に、フリーフロー電気泳動分離を用いると、デバイスの幾何学的形状を変更することによって高い分解能を得ることができ、純粋な成分を単離できる (Herling et al. も参照)。

【0364】

電気泳動分離チャネルを下流の流れ分離器および検出ゾーンと共に組み込んだ流体デバイスを作成した。流れ分離器と検出ゾーンの間の流体接続を提供するのは標識チャネルであった。そのデバイスの概略図を図 17 (a) に示す。このデバイスは図 5 および 14 の適応である。このデバイスは、定常状態での分離後標識工程をフリーフロー電気泳動分離および分岐の後に組み込んでいる。このデバイスは、前記のデバイス製作セクションに記載したような標準的な P D M S ソフトリソグラフィー法を用いて作成された。

【0365】

成分流のいずれの側にも緩衝液の流れを供給することにより、成分、たとえばタンパク質の明確な ‘ビーム’ が樹立する。層流が樹立する。分離チャネル内の成分流の幅は、成分流と緩衝液流の相対流速を変更することに基づいて調整できる。

【0366】

10

20

30

40

50

分離チャネルを横切る（層流の幅を横切る）電圧を印加しない場合、成分は隣接する緩衝液流中へ分岐しない。したがって、印加電界の存在しない状態では成分流内の成分が標識チャネルおよび検出ゾーンへ分岐することはない。流れ分離器は、分離チャネルの下流末端で緩衝液流の一部分（のみ）を分岐させるために備えられる。分離チャネルの下流末端で成分流中に存在する成分は、単純に廃液チャネルに採取される。

【0367】

分離チャネルを横切って電界を印加した場合、成分は成分流から緩衝液流中へ偏向することができ、挟んでいる2つの緩衝液流のどちらであるかは成分の電荷および印加する電界の方向に依存するであろう。緩衝液流中へ偏向した成分は流れ分離器により分岐することができ、その分岐流は下流で採取される。下流領域で、分岐成分を検出ゾーンにおける検出のために標識、たとえば蛍光標識することができる。

10

【0368】

5種類の異なるタンパク質溶液を用いて流れ分離デバイスを試験した。B S A、-ラクトグロブリン、およびリゾチーム（1.0 mg / mL）のうちの1つを含有する3種類のタンパク質溶液を調製し、B S Aおよびリゾチームを含有する二元溶液（1.0 mg / mLの総タンパク質濃度；各タンパク質につき0.5 mg / mL）、ならびにB S A、-ラクトグロブリンおよびリゾチームを含有する三元溶液（1.0 mg / mLの総タンパク質濃度；各タンパク質につき0.33 mg / mL）も調製した。リゾチーム含有溶液は、標識工程におけるリゾチームの沈降を最小限にするために、さらに1% v / vのTween（登録商標）界面活性剤を含んでいた。

20

【0369】

流体デバイスにおいて各タンパク質溶液の流れを樹立し、そのタンパク質流を分離チャネルに沿って通した。チャネルを横切る印加電界を変動させ、印加電界に応答した各タンパク質の偏向をモニターした。緩衝液流中へ偏向したタンパク質を、分離チャネルの下流末端で緩衝液流の一部分を分岐することにより採取できた。タンパク質を含有する分岐した緩衝液流を、タンパク質を検出用に蛍光標識するために、次いで標識流と接触させた。標識流は変性剤、および本明細書の記載に従って用いる潜在性標識OPAを含有していた。標識した後、タンパク質を蛍光分光分析により検出した。記録されたシグナルの強度は、分離チャネルの下流末端で緩衝液流の一部分から分岐したタンパク質の濃度に正比例していた。

30

【0370】

図17（b）は、前記の5種類の溶液それぞれについて、分離チャネルを横切って印加した電界（V）の変化に伴なう正規化蛍光強度（AU）の変化を示す。

B S Aを含有する流れについて、検出ゾーンで記録された蛍光強度は、分離チャネルを横切る印加電界が約4.0 Vのとき最大であった。

【0371】

-ラクトグロブリンを含有する流れについての蛍光強度は、分離チャネルを横切る印加電界が約6.0 Vのとき最大であった。リゾチームを含有する流れについての蛍光強度は、分離チャネルを横切る印加電界が約-6.0 Vのとき最大であった。これらの偏向プロファイルは電圧依存性であり、実験pH（各溶液についてpH 7.0）におけるそのタンパク質の電荷に基づいて予想したタンパク質の偏向に対応していた。

40

【0372】

分離チャネルを横切る特定の電圧の印加を用いて、多成分流中の目的成分を優先的に偏向させることができる。こうして、多成分混合物中の1成分を他の成分から分離することができる。前記の二元および三元混合物を用いて、他の1以上の成分からの1成分のフリー・フロー電気泳動分離および標識化を評価した。二元および三元混合物には、個々のタンパク質にみられたピークに対応する明瞭なピークがみられた。

【0373】

特に興味深いのは、類似の等電点をもつB S Aと-ラクトグロブリンの間の明らかな分解能である。

50

三元試料についてみられたゼロ電圧付近で幅広いピークは、反対の電荷をもつタンパク質間の静電相互作用から生じるオリゴマー分布を反映する。これを調べるためにさらなる研究を現在行っている。

【 0 3 7 4 】

定量標識化：反応速度

本発明者らは、定量標識化を達成するために多様な戦略を調べた。O P A - 標識反応中に形成された蛍光体は化学的安定性を欠如するので、成分標識化の程度を査定するのに質量分析のような手法は理想的に適切ではない。

【 0 3 7 5 】

混合後の特定時点における定量標識化を直接査定できるアッセイ法を設計した。タンパク質を被検成分として用いた。異なる二次および三次構造をもつ十分に特性解明されたタンパク質について、蛍光強度を反応基の濃度（タンパク質濃度 × タンパク質配列中の第一級アミンの数）と比較した。

【 0 3 7 6 】

基準セットは、ウシ血清アルブミン (B S A) 、 α -ラクトグロブリン (α -l a c) , pH 2 および pH 7 、リゾチーム (L y s) 、カルモジュリン (C a M) 、およびミオシンキナーゼペプチド (P 7) を含有していた。基準セットは、標識反応に際してそれらの等電点を通過するかあるいはそれらに近づくタンパク質を含有していた。

【 0 3 7 7 】

このセット中のタンパク質についての標識反応を、遊離グリシンおよびリジンの標識反応と比較した；これらは標識反応に際して修飾されるものと同様な反応性第一級アミン基をもつが、それらには溶媒が完全にアクセスできる（参照：図 2 3 (a) ）。

【 0 3 7 8 】

組合わせ変性戦略 - それは、4 % のドデシル硫酸ナトリウム (S D S) 、過剰の B M E 、および高アルカリ性の反応混合物の添加を含んでいた - により、混合後 1 2 0 秒間、バルクで蛍光強度を測定した場合、第一級アミン濃度と蛍光強度の間に直線関係が生じることが見出された（図 2 3 (b) ）。

【 0 3 7 9 】

ただし、このデータは、それぞれ低濃度および高濃度の第一級アミンの混合物について予想より高い蛍光強度およびより低い蛍光強度をもつ S 字特性を示した。さらに、グリシンとリジンの標識化効率には、これらの範囲内で個々のタンパク質にみられる傾向を備えた系統的な相異がある。

【 0 3 8 0 】

O P A 修飾アミンについてレポートされた低い化学的安定性のため、これらの影響は部分的に反応速度に由来する可能性があるという仮説を立てた。図 2 3 (c) に示すように最大蛍光強度の発生に要した時間をマイクロ流体混合デバイス内で測定して、標識反応が 3 秒以内に完了に達することを観察した。その後の時点では、複合基質および濃度に依存した様式で蛍光強度が一般に低下した。

【 0 3 8 1 】

蛍光を発生する O P A 標識反応中に形成される置換イソインドールは化学的安定性を欠如することがレポートされているため、本発明者らは蛍光種の形成および分解の反応速度を詳細に調べた。

【 0 3 8 2 】

分解メカニズムが著しい影響を及ぼす前に蛍光強度を測定することを目標として、同様な定量標識化アッセイを 3 秒の時点で構築した（参照：図 2 3 (d) ）。重要なことは、蛍光強度を反応完了後に速やかに測定すると、配列依存性の変動は崩壊し、4 衍に及ぶ第一級アミン濃度範囲全体に直線性が拡大して、n M 未満のタンパク質濃度の測定が可能になることである。参考として、バルク吸光測定によりルーティンに到達できる濃度範囲を灰色の長方形で強調してある。マイクロ流体システムの短いパス長さの特徴を考えて、この検出限界を本発明に使用するための 3 秒反応ループを組み込んだデバイスにおいて証明し

10

20

30

40

50

た。

【0383】

3.75 nM ~ 15 uM の値について BSA の濃度を蛍光強度から定量決定できることが認められた。マイクロ流体デバイスにおいて蛍光強度を定量する検出領域の部分の体積はわずか 2.25 nL であるので、この結果は 9 アトモル未満の BSA をフローデバイスで定量できることを示す。

【0384】

種々の濃度の BSA、-1ac およびリゾチームを OPA - 標識混合物と混合し、平均蛍光強度 (AU) を経時的に (秒) 測定した。結果を図 18 に示す。各タンパク質について、平均蛍光強度は経時的に低下するのがみられ、60 秒を超えると平均蛍光強度の低下が顕著になった。

10

【0385】

経時的にわずかな蛍光強度の低下がみられ、これは形成されたイソインドールの化学的安定性の欠如によるものである可能性がある。さらに、低タンパク質濃度について 40 ~ 60 秒付近で蛍光強度の増大がみられ、これはおそらく強制的条件下で作動する可能性のある競合経路によるものであろう。本事例において考察したように、タンパク質を標識と反応させた後に速やかに蛍光強度を測定することによりこれらの影響は最小限に抑えられる。

【0386】

より長い時間枠にわたる平均蛍光強度の変化を調べることにより、経時的なダイナミックレンジの縮小をさらに明らかにした。よって、標識反応の開始から 30 分間後に平均蛍光強度を測定した。この実験では、色素およびタンパク質の溶液を混合後に室温に静置した。結果を図 19 に示す；ここには、平均蛍光強度 (AU) を溶液内の第一級アミン濃度 (nM) の関数として示す。データの両対数を方程式 $f(x) = 0.99x$ に当てはめて、0.67 の r^2 が示された。

20

【0387】

低タンパク質濃度における直線性からの偏移は、より長い反応時間後にはより著しい。30 分後の蛍光測定について、蛍光強度からタンパク質濃度を正確に決定するためには 1 uM を超える第一級アミン濃度が要求される。1 uM 未満の第一級アミン濃度およびきわめて高いアミン濃度では、記録された平均蛍光強度はアミン濃度との直線関係から偏移する。この偏移は競合反応経路から生じ、この場合はより著しいと考えられる。

30

【0388】

これらの結果から、成分、たとえばタンパク質を蛍光標識した直後に蛍光強度を測定するのが有益であると本発明者らは現在理解している。

参考文献

本明細書中に述べるすべての文献を全体として本明細書に援用する。

Ahmad Can J. Biochem. Cell Biol. 63, 1058-1063 (1985)

Almgren et al. Journal of Colloid and Interface Science 202, 222-231 (1998)

Benson et al. PNAS 72, 619-622 (1975)

Biancalana et al. Biochimica et Biophysica Acta 1804, 1405-1412 (2010)

Brandts et al. J. Am. Chem. Soc. 89, 4826-4838 (1967)

40

Brody et al. Sensors and Actuators A: Physical, 58(1):13-18, 1997

Cheng et al. Lab on a Chip 11, 2316-2318 (2011)

Cohen et al. Journal of Molecular Biology 421, 160-171 (2012)

Flockhart et al. Journal of Colloid Science 12, 557-565 (1957)

Garcia Alvarez Coque et al. Anal Biochem 178, 1-7 (1989)

GB 1320127.2

Ge et al. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 9, 131-150 (1998)

Hatch et al. Nature Biotechnology, 19(5):461-465, 2001

Hellstrand et al. ACS Chemical Neuroscience 1, 13-18 (2010)

Herling, T. W. et al. Applied Physics Letters 102, 184102-4 (2013)

50

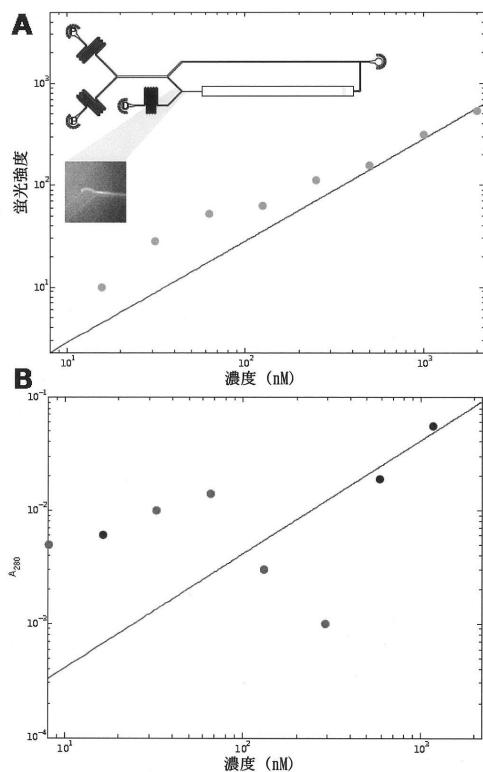
- Hirota et al. *Protein Science* 6, 416-421 (1997)
 Ivanova et al. *PNAS* (2009), 106 (45), 18990-18995
 Jacobs et al. *Analytical Biochemistry* 1986, 156, 334
 Jacobson et al. *Anal. Chem.* 1994, 66, 4127
 Jacobson et al. *Anal. Chem.* 1994, 66, 3472
 Jimenez et al. *PNAS* 99, 9196-9201 (2002)
 Kamholz et al. *Biophysical Journal* 80(4):1967-1972, 2001
 Kang et al. *Lab on a Chip* 8, 176-178 (2008))
 Kim, P. et al. *Biochip Journal* 2, 1-11 (2008)
 Knowles et al. *Science* 326, 1533-1537 (2009) 10
 Kohlheyer et al. *Lab on a Chip* 6, 374-380 (2006)
 Lauga et al. URL <http://arxiv.org/abs/cond-mat/0501557>
 LeVine et al. *Protein Science* 2, 404-410 (1993)
 Lee et al. *Lab on a Chip* 9, 479-482 (2009)
 Liu et al. *Anal. Chem.* 2000, 72, 4608
 Mok et al. *Methods* 54, 67-75 (2011)
 Monahan et al. *Analytical Chemistry* 73, 3193-3197 (2001)
 Nakamura et al. *Analytical Letters* 1982, 15, 1393-1410
 Nettleton, E. J. et al. *Biophysical Journal* 79, 1053-1065 (2000)
 Oguriet et al. *Journal of Chromatography A* 787, 253-260 (1997) 20
 Otzen *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 562-591 (2011)
 Otzen *Biophys. J.* 83, 2219-2230 (2002)
 PCT/GB2013/052757 (WO 2014/064438)
 Powers et al. *Biopolymers* 33, 92-932 (1993)
 Rida et al. *Analytical Chemistry* 76, 6239-6246 (2004)
 Roth et al. *Analytical Chemistry* 43, 880-882 (1971)
 Roth et al. *Journal of Chromatography* 83, 353-356, (1973)
 Saito et al. *Analytical Chemistry* 1994, 66, 134-138
 Schuck *Anal. Biochem.* 320, 104-124 (2003)
 Squires et al. *Reviews of Modern Physics* 77, 977-1026 (2005) 30
 Sternson et al. *Anal. Biochem.* 144, 233-246 (1985)
 Stone et al. *Annual Review of Fluid Mechanics* 36, 381-411 (2004)
 Tan et al. *Biomicrofluidics* 4, 032204 (2010)
 Turgeon et al. *Micro free-flow electrophoresis: theory and applications* 394, 187-198 (2009). URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-2656-5>
 US 2002/0186263
 US 2006/0263903
 US 2010/0032349
 US 2011/264380
 US 2012/0135507 40
 Walsh et al. *FEBS Journal* 276, 1266-1281 (2009)
 Waugh J. Am. Chem. Soc. 68, 247-250 (1946)
 Wetter et al. *Journal of Biological Chemistry* 192, 237-242 (1951)
 Whitesides *Nature* 442, 368-373 (2006)
 Whittingham et al. *Journal of Molecular Biology* 318, 479-490 (2002)
 Wong et al. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 6421-6422 (1985)
 Yoshimura et al. *Anal. Biochem.* 164, 132-137 (1987)
 Zawieja et al. *Analytical Biochemistry* 142, 182-188 (1984)
 【符号の説明】
 【0 3 8 9】 50

- 1 分離チャネル
 1 a 大きい断面の領域
 1 b 小さい断面の領域
 2 第1流体流れチャネル
 3 第2流体流れチャネル
 3 a 第2流体流れチャネル
 3 b 第2流体流れチャネル
 4 ジャンクション
 5 第1リザーバー
 6 第2リザーバー
 7 流れ分離器
 8 検出チャネル
 9 検出ゾーン
 10 出口リザーバー
 11 採集チャネル
 11 a 採集チャネル
 11 b 採集チャネル
 12 標識チャネル
 13 ジャンクション
 14 標識リザーバー
 15 分析領域
 16 電極
 17 電極
 18 変性チャネル
 19 ジャンクション

【図面】

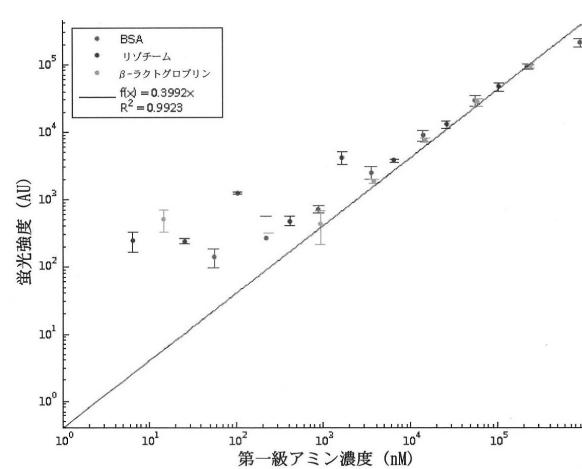
【図1】

Figure 1



【図2】

Figure 2



10

20

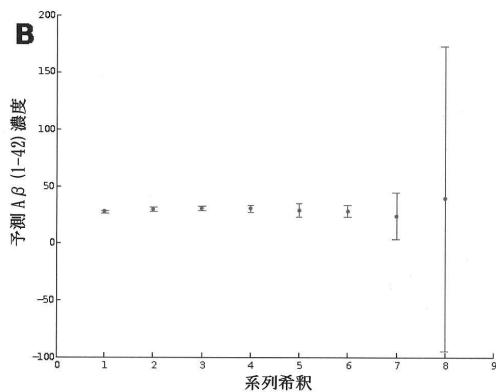
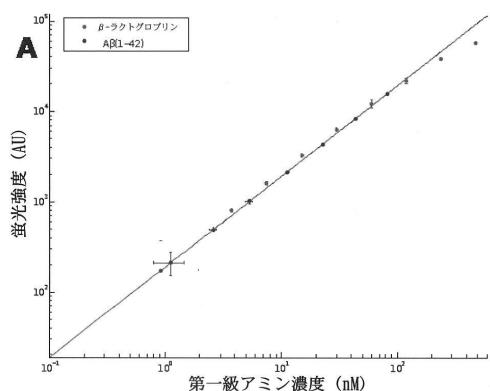
30

40

50

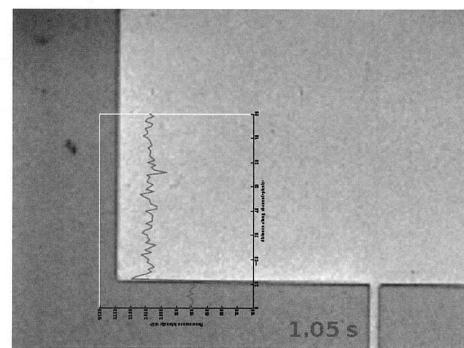
【図3】

Figure 3



【図4】

Figure 4

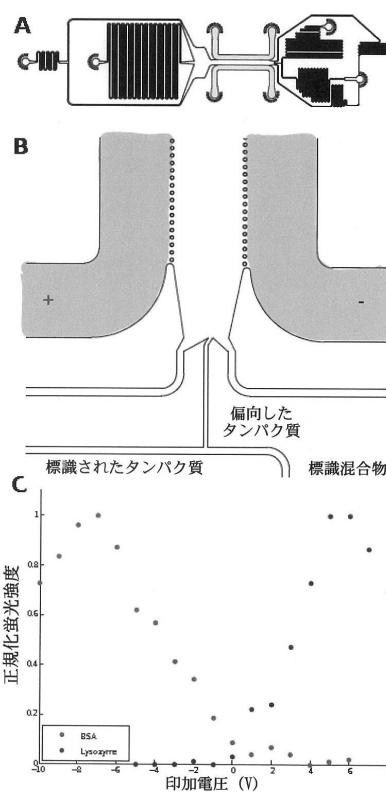


10

20

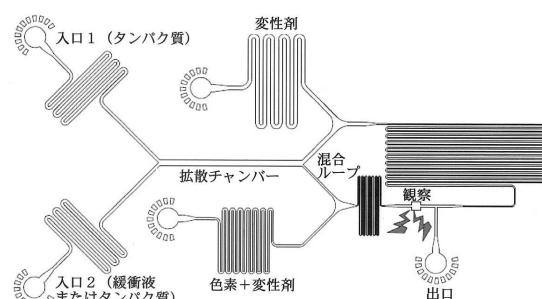
【図5】

Figure 5



【図6】

Figure 6



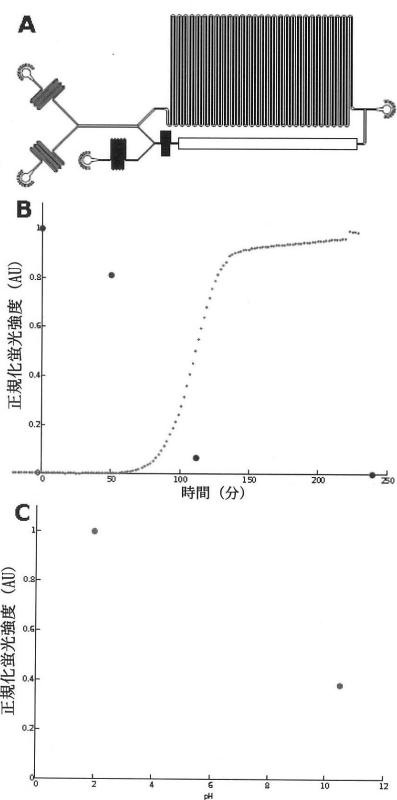
30

40

50

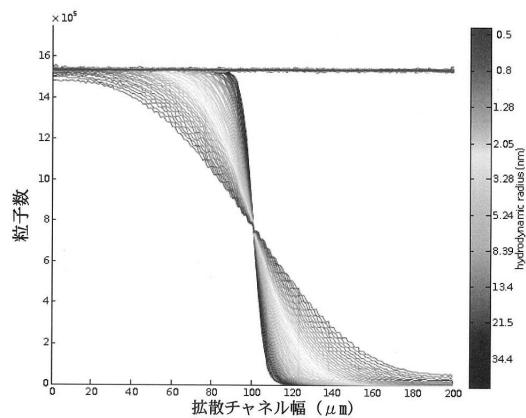
【図 7】

Figure 7



【図 8】

Figure 8

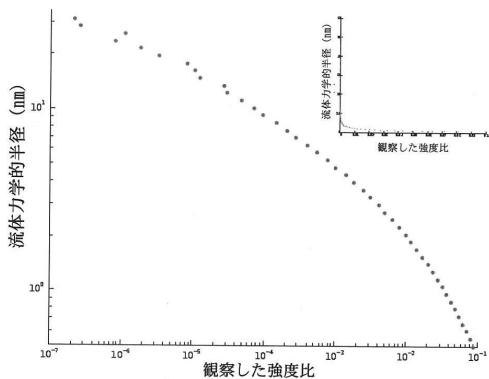


10

20

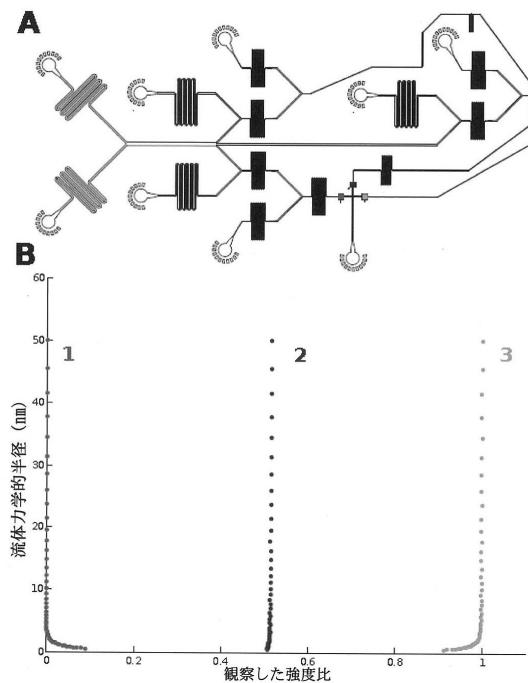
【図 9】

Figure 9



【図 10】

Figure 10



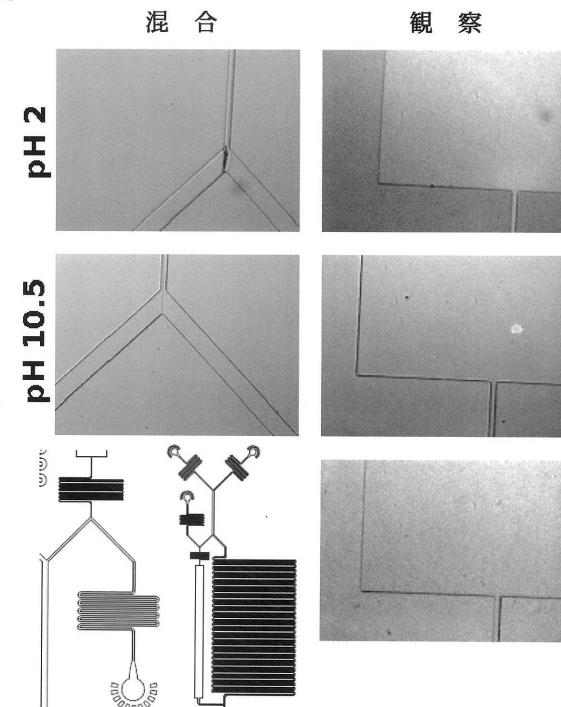
30

40

50

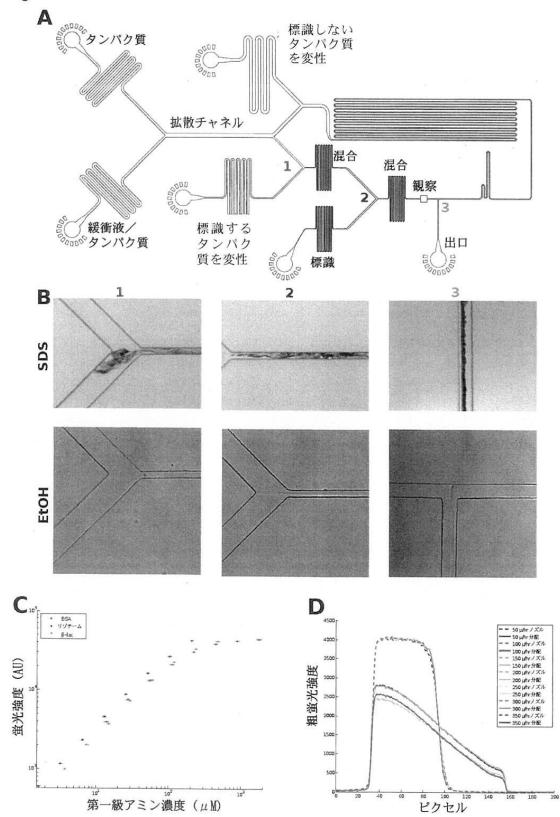
【図 1 1】

Figure 11



【図 1 2】

Figure 12



10

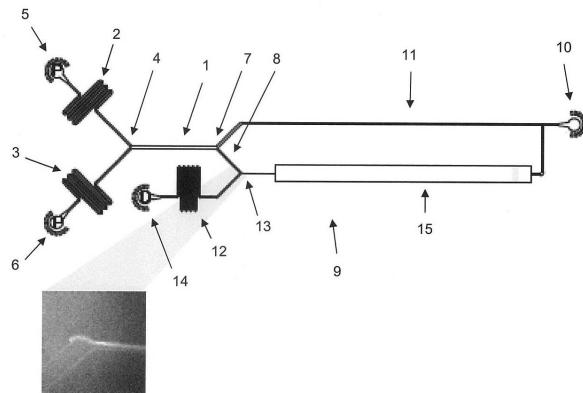
20

30

40

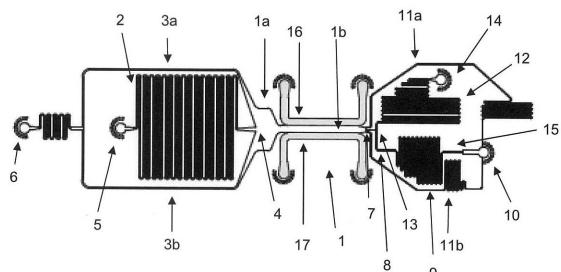
【図 1 3】

Figure 13



【図 1 4】

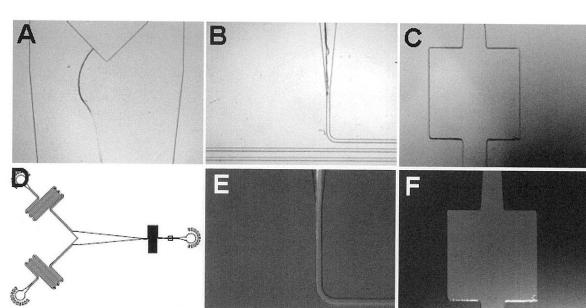
Figure 14



50

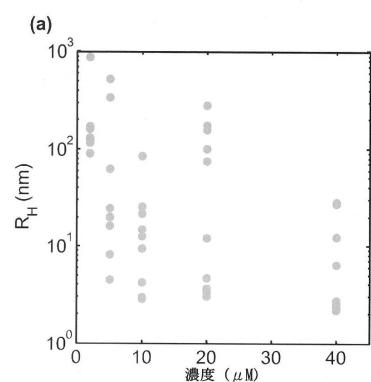
【図 1 5】

Figure 15

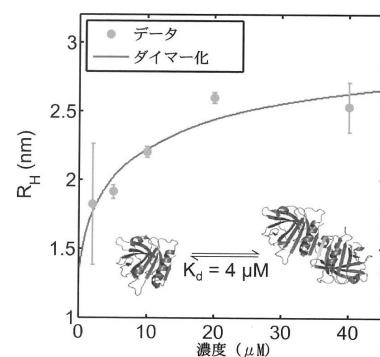


【図 1 6】

Figure 16



(b)



10

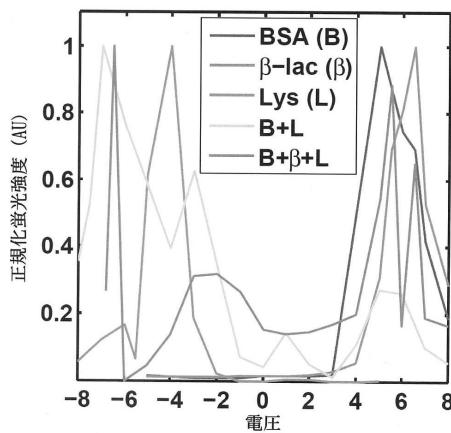
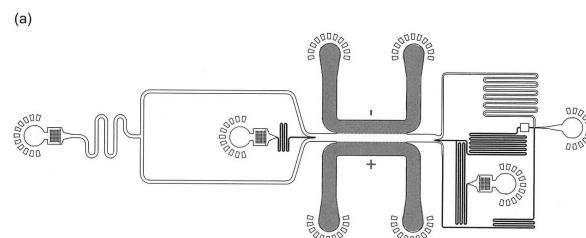
20

30

40

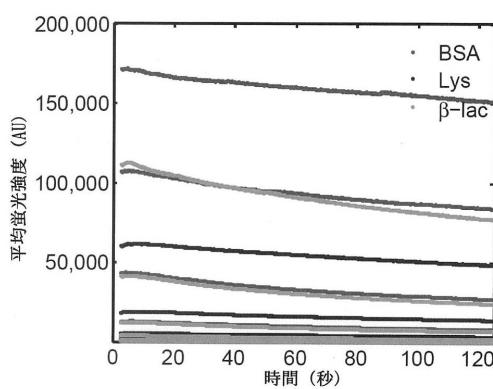
【図 1 7】

Figure 17



【図 1 8】

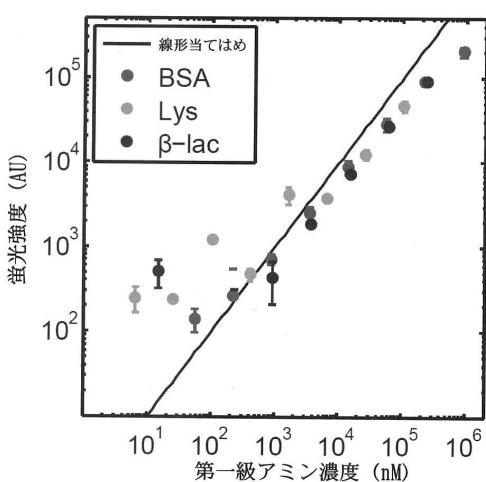
Figure 18



50

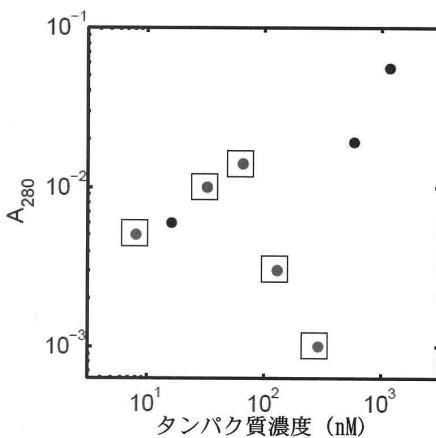
【図 19】

Figure 19



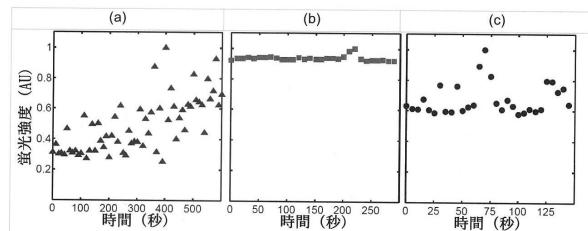
【図 20】

Figure 20



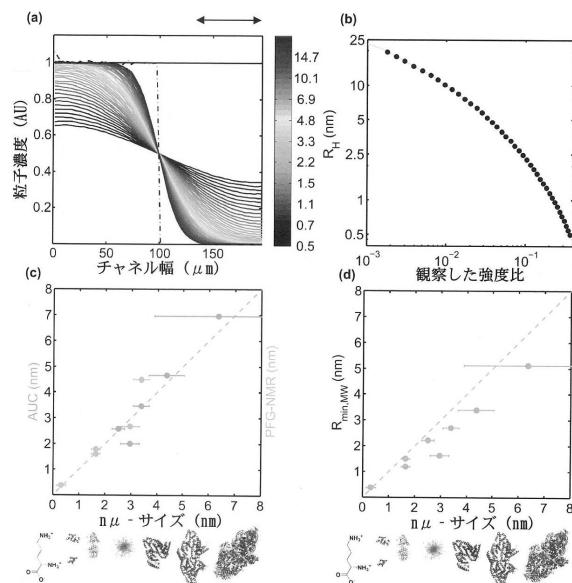
【図 21】

Figure 21



【図 22】

Figure 22



10

20

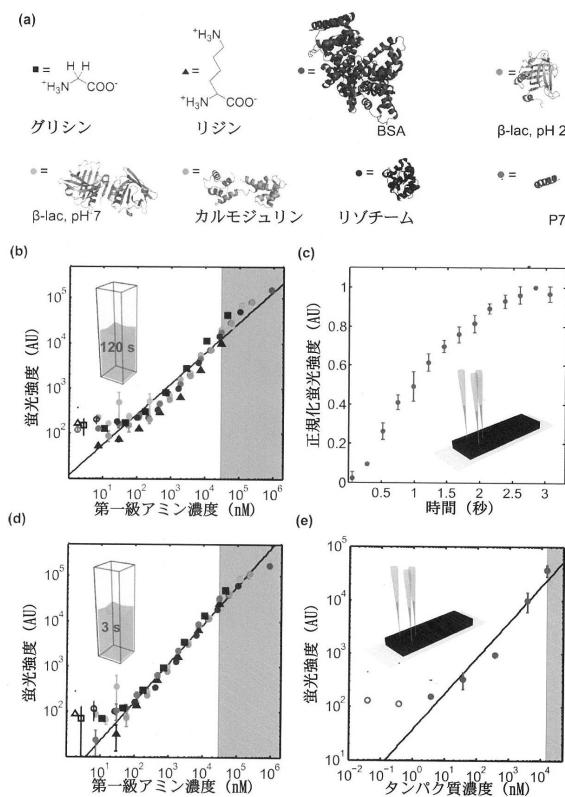
30

40

50

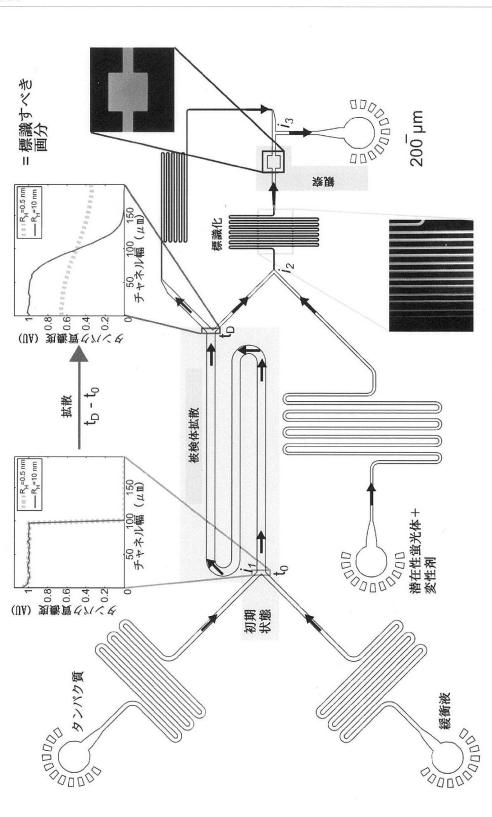
【図 2 3】

Figure 23



【図 2 4】

Figure 24



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

G 01 N 21/78 (2006.01)

F I

G 01 N 21/64

F

G 01 N 21/78

C

, レンズフィールド・ロード, ユニバーシティ・オブ・ケンブリッジ, デパートメント・オブ・ケミストリー

(72)発明者

ドブソン, クリストファー

イギリス国ケンブリッジシャー シービー2 1イーダブリュー, ケンブリッジ, レンズフィールド・ロード, ユニバーシティ・オブ・ケンブリッジ, デパートメント・オブ・ケミストリー

(72)発明者

ハーリング, テレーズ

イギリス国ケンブリッジシャー シービー2 1イーダブリュー, ケンブリッジ, レンズフィールド・ロード, ユニバーシティ・オブ・ケンブリッジ, デパートメント・オブ・ケミストリー

(72)発明者

ノウルズ, ツオーマス

イギリス国ケンブリッジシャー シービー2 1イーダブリュー, ケンブリッジ, レンズフィールド・ロード, ユニバーシティ・オブ・ケンブリッジ, デパートメント・オブ・ケミストリー

合議体

審判長 三崎 仁

審判官 渡戸 正義

高 見 重雄

(56)参考文献

米国特許出願公開第2003/0159999(US, A1)

特開2012-127696(JP, A)

国際公開第2012/056334(WO, A1)

特表2013-545095(JP, A)

国際公開第03/066191(WO, A1)

Yingjie Liu, et al., 'Electrophoretic Separation of Proteins on a Microchip with Noncovalent, Postcolumn Labeling', Analytical Chemistry, 2000年, Vol. 72, No. 19, p. 4608 - p. 4613

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G01N35/00-37/00

B01J19/00