

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4659748号
(P4659748)

(45) 発行日 平成23年3月30日(2011.3.30)

(24) 登録日 平成23年1月7日(2011.1.7)

| (51) Int. Cl. | | F I | |
|---------------|-----------|---------------|-------|
| GO 1 N 33/543 | (2006.01) | GO 1 N 33/543 | 5 9 5 |
| GO 1 N 37/00 | (2006.01) | GO 1 N 37/00 | 1 0 1 |
| GO 1 N 33/53 | (2006.01) | GO 1 N 33/53 | D |
| GO 1 N 27/62 | (2006.01) | GO 1 N 33/53 | M |
| C 1 2 Q 1/68 | (2006.01) | GO 1 N 27/62 | V |

請求項の数 9 (全 38 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2006-527437 (P2006-527437) | (73) 特許権者 | 500039360 コミサリア・ア・レネルジー・アトミック フランス国 エフー75015 パリ パ ティメン “ル ポナーン デ” リュ ルブラン 25 |
| (86) (22) 出願日 | 平成16年8月27日(2004.8.27) | (74) 代理人 | 100091351 弁理士 河野 哲 |
| (65) 公表番号 | 特表2007-506956 (P2007-506956A) | (74) 代理人 | 100088683 弁理士 中村 誠 |
| (43) 公表日 | 平成19年3月22日(2007.3.22) | (74) 代理人 | 100108855 弁理士 蔵田 昌俊 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/FR2004/002207 | (74) 代理人 | 100075672 弁理士 峰 隆司 |
| (87) 国際公開番号 | W02005/036170 | (74) 代理人 | 100109830 弁理士 福原 淑弘 |
| (87) 国際公開日 | 平成17年4月21日(2005.4.21) | | |
| 審査請求日 | 平成19年8月23日(2007.8.23) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 0311204 | | |
| (32) 優先日 | 平成15年9月24日(2003.9.24) | | |
| (33) 優先権主張国 | フランス (FR) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複合体混合物中に溶解されたいくつかの分子ターゲットを分離し、および、または解析する装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複合体混合物中に溶解された複数の分子ターゲットを分離し、および、または検出するための装置において、

(a) この装置中に導入された複合体混合物の移動を可能にする毛管のネットワークと、

(b) 前記毛管のネットワークのそれぞれの側に配置された2組の電極とを具備し、その2組の電極は、1組の機能的にされた電極と、1組の機能的でない電極とによって構成され、

前記1組の機能的にされた電極の各電極は、各プローブが特定のプローブ/ターゲット結合によって複合体混合物中に存在する特定の分子ターゲットを保持することができる毛管中のスポット中に組織化されたプローブにグラフトされており、

毛管は1端部が容器に接続され、その容器は容器電極を具備し、この容器電極は前記1組の機能的にされた電極と同じ平面に配置されており、

さらに、前記容器電極と機能的にされた電極との間に配置された接続電極を具備し、それにより前記接続電極と前記容器電極との間の最短距離が電極上の各地点で同じになるよう構成されている装置。

【請求項 2】

前記1組の機能的にされた電極は毛管のネットワークの上方に配置され、前記1組の機能的にされていない電極は毛管のネットワークの下方に配置されている請求項1記載の装

10

20

置。

【請求項 3】

毛管のネットワークの毛管の、前記容器に接続された側と反対側の端部は別の容器に接続されている請求項 1 記載の装置。

【請求項 4】

毛管のネットワークの毛管の、前記容器に接続された側と反対側の端部は横断チャンネルに接続されている請求項 1 記載の装置。

【請求項 5】

横断チャンネルは直線状の接続電極を含み、その接続電極はハイブリッド化期間中プローブに対する阻止電気バリアとして作用するように構成され、それによって検出ステップにおいてターゲット電極および接続電極により設定された電位を使用してターゲットを遅延システムに向けて導くことを可能にしている請求項 4 記載の装置。

10

【請求項 6】

機能的にされた各電極は直線状で、平行であり、機能的でない各電極も直線状で、平行であり、機能的にされた電極は機能的でない電極に対して平行または垂直である請求項 1 記載の装置。

【請求項 7】

機能的にされた電極または機能的でない電極は、平面状のグリッド状電極を形成するために第 1 の平行な水平電極と、それと重ねられて第 1 の平行な水平電極に対して垂直な第 2 の平行な垂直電極とを具備している請求項 6 記載の装置。

20

【請求項 8】

前記グリッド状電極の各メッシュの空間にハスポット電極と 1 個または 2 個の電界効果トングスタが配置されており、各電界効果トングスタのゲートは網目の 1 側部で水平電極の 1 つに接続され、ソース端子は網目の別の 1 側部で垂直電極の 1 つに接続され、ドレイン端子は網目中のスポット電極に接続されている請求項 7 記載の装置。

【請求項 9】

請求項 1 記載の装置を使用して複合体混合物中に含まれている分子ターゲットを分離し、分析する方法において、

(a) 分離される分子ターゲットを含んでいる複合体混合物を請求項 1 記載の装置中に導入し、

30

(b) ターゲットが毛管のネットワークの 1 つの端部から他方の端部に移動することができて、プローブと相補的なターゲットがハイブリッド化されることができるように請求項 1 記載の装置の電極の間に電位を与え、

(c) 検出器を使用して 1 つのプローブに対するハイブリッド化された各ターゲットを解析するステップを含んでいる分子ターゲットを分離し、分析する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、複合体混合物中に溶解している複数の分子ターゲット、とくに、核酸または蛋白質を分離し、および、または解析する装置に関する。本発明は、とくに、分子ターゲットの分離または解析用の生物ポリマープローブの組織化されたアレイまたはマトリックスを備えた装置に関する。このような装置は、複合体混合物中に溶解している複数の分子ターゲットを分離し、および、または検出する。本発明の第 1 の実施形態において、装置は、

40

(a) 同じ平面に配置されたマイクロカラムの N 個の行および P 個の列から構成され、本発明の 1 実施形態によると特定のプローブ/ターゲット結合により複合体混合物中に存在する特定の分子ターゲットを保持することのできる固定された分子タイププローブを各マイクロカラムが備えているマイクロカラムのマトリックスと、

(b) マイクロカラムマトリックスの上方においてそのマイクロカラムマトリックスの平面に平行な平面に配置され、前記装置中に導入された複合体混合物が (a) において規

50

定されたマトリックスの各マイクロカラムに向って移動することを可能にする毛管の第1のネットワークと、

(c) マイクロカラムマトリックスの下方においてそのマイクロカラムマトリックスの平面に平行な平面に配置され、分子ターゲットが溶離の後に1以上の検出器に向って移動することを可能にし、それらの再生および、または解析を可能にする毛管の第2のネットワークと、

(d) 必要である場合に、種々の分子ターゲットの再生および、または解析を可能にし、質量分光計であることが好ましい1つの検出器とを備えている。

【0002】

本発明はまた、複合体混合物中に溶解している複数の分子ターゲットを分離し、および、または検出する装置に関し、前記装置は、

複合体混合物中に溶解された複数の分子ターゲットを分離し、および、または検出するための装置において、

(a) この装置中に導入された複合体混合物の移動を可能にする毛管のネットワークと、

(b) 毛管のネットワークのそれぞれの側に配置された2組の電極：

・各プローブが特定のプローブ/ターゲット結合によって複合体混合物中に存在する特定の分子ターゲットを保持することができるスポット中に組織化されたプローブにグラフト(graft)された1組の機能的にされた電極と、

・1組の機能的にされていない電極とを備えている。

【0003】

本発明はまた、とくに、生物学的サンプル中に含まれているDNAまたはRNA分子を分離し、および、または解析するための前記装置の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

質量分光法の解析を使用してDNA、RNAまたは蛋白質のような高分子の質量を決定することが知られている。その方法を使用する解析が分子の制御された分解により行われた場合、それらの配列もまた決定されることができる。しかしながら、異なるサイズおよび配列を有する分子の混合物に対しては、その技術を使用して種々の分子を区別することは困難になり、あるいは不可能にさえなる。

【0005】

質量分光法に代わるものとして別の方法が使用されてもよい。

【0006】

表面プラズモン共振(SPR)は、自由電子を有する金またはプラチナのような金属の薄いシート(xnm)の表面から短い距離(200nm未満)だけ累積された材料の密度を決定することができる。金属シートの表面の1つからの反射は、他方の表面に近接した材料の密度および量に比例して変化される。しかしながら、実際には、その反射の変化に影響する分子の種々のタイプを区別することはできない。さらに、瞬間的に、その方法を使用したときの検出感度および生物アレイへのターゲットの結合は、標識された分子により蛍光中で行われる検出感度より低い。金属表面上にたとえプローブが存在していても、ターゲットと金属との間隔を隔てることにより検出感度は低下する。ターゲット/プローブの相互作用の動的測定中、自由なターゲット分子が表面に近接して存在することにより、その測定が誤ったものになる。効率的であるために、SPR方法による検出は一般に蛍光または放射性標識方法に対して要求されるより多くの計測装置を必要とする。そのために、SPR検出はとくに診断の分野におけるいくつかの実験と両立しないままである。

【0007】

さらに、異なった分子状態の間に存在するインピーダンスの変化が測定されてもよい。

【0008】

所定の配列を有する一本鎖のDNA分子は、対応した対の二本鎖の複合体と同じインピーダンスを有しない。その特性は、ハイブリッド化の程度および、したがって、生物アレ

10

20

30

40

50

イ (r e f) 上に形成されたプローブ-ターゲット複合体の数を評価するために DNA アレイに対して使用される。一般に、インピーダンス変化はそのレセプターへのリガンドの結合のような分子間相互作用だけでなく、DNA 分子または蛋白質と薬剤、イオン等との間の相互作用を研究するためにもまた使用される。しかしながら、生物アレイに対しては、この検出方法は制限される：

(1) 2 0 0 0 を超えるスポットを有する高密度アレイを生成するときの問題。インピーダンスアレイを生成するために使用された電極のサイズおよび接続の幾何学形状のために、ハイブリッド化表面は、スポットの数が 8 0 0 を超えると直ぐに非常に広くなる。しかしながら、広いハイブリッド化表面は、ハイブリッド化表面をカバーしなければならない大きいサンプル体積であることを意味し、したがって検出に対して最小の濃度に到達するために大量の生物学的材料が必要である。これは、少量の材料しか利用できない診断のような実験とは両立しない。

(2) 測定されたインピーダンス値が解釈されることを不可能にする測定アーティファクトを生じさせる研究分子 (プローブおよび、またはターゲット) の配座の変化。一例として、配列または分子間ハイブリッド化による DNA の変形は、ハイブリッド化と同程度の大きさのインピーダンスの変化を生じさせる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 9 】

従来技術においては DNA 分子 (r e f) のハイブリッド化にリンクされたインピーダンスの変化を測定するための電流増幅器として電界効果トランジスタが使用されている。プローブはトランジスタのゲートに結合される。ターゲットが結合したとき、それらはゲートのインピーダンスを変化させ、ソース (トランジスタの入口) とドレイン (トランジスタの出口) との間の電流の変化を生じさせる。しかしながら、そのタイプの検出器に対するネットワーク構成は未だに示されていない。電界効果トランジスタを電流増幅器として使用することにより、ハイブリッド化にリンクされたインピーダンスの変化を強調するために使用されることのできる交流電流の周波数が制限され、さらに検出器の感度 (r e f) が制限される。さらに、このような従来技術の説明において、ゲートは電流がトランジスタ中に通過するのを制御し、また、プローブをそこに設置することにより、トランジスタの種々の端子を電極として使用してターゲットの移動を制御し、したがってターゲットをプローブに集中することによってハイブリッド化を管理する可能性がなくなる。

【 0 0 1 0 】

生物ポリマープローブの組織化されたマトリックス (DNA アレイ、蛋白質アレイ等) は、理論上はそれらの数、配列および複雑性とは無関係に、混合物中に存在する生物ポリマーを質的および量的に分離する。しかしながら、核酸ネットワークは、たとえば、ハイブリッド化された分子の数を絶対的におよび正確にカウントすることができない。さらに、現在利用可能な技術を使用することによるマイクロアレイ上における生物ポリマーの検出は間接的であり、それらを標識するステップ (蛍光、放射性等) が必要である。放射性同位元素を使って識別された残留物とコールド残留物とを生物ポリマー中に組込む収量 (y i e l d) はほとんど同じであるが、蛍光標識の場合はそうではない [Martinez et al, Nucl Acids Res, 2003, 31:p.18; Hoen et al - Nucleic Acid Res, 2003, Mar1; 31(5); P20] 。標識に関するこのような問題は、蛍光マーカ C Y 3 および C Y 5 を含む c DNA 分子を合成するときを生じる。この最後のタイプの標識から結果的に生じる立体障害はまた、化学反応 (一般に、ハイブリッド化、抗体-抗原反応、ターゲット-リガンド反応) に対する運動論および化学量論的平衡を著しく変化させることができる。このような立体障害問題は、放射性同位体が使用されたときに解消される。しかしながら、放射性同位体は放射性廃棄物の管理を必要とする。さらに、放射性標識を与えられた分子を検出する技術、すなわち、放射能に対して本質的にフォスフォイメージャ (p h o s p h o i m a g e r) タイプのもの [Bertucci F et al - Hum Mol Genet 1999 Sep; 8(9):1715-22. Erratum in: Hum Mol Genet 1999 Oct; 8(11); p2129] および蛍光の検出用の種々のタイプのスキャナには

10

20

30

40

50

、検出しきい値に到達するためにアレイ上でハイブリッド化される生物学的材料の量および行われた測定に対する再現性要求に関するある定まった数の限界がある。実際、少数の細胞（～1000個の細胞）を有するサンプルからの細胞当たり1～2個のコピー量の中に存在する分子を検出することは不可能であるが、それにもかかわらず、それは臨床サンプルに対してよくある状況である。

【0011】

通常のDNAアレイの使用に代わる方法は、毛管に沿って全てがリングに配置されたプローブによりその毛管の内部を機能的なものにすることであり、各リングは1つの遺伝子に固有の1つのプローブタイプによって構成されている。理論上、毛管の小さい直径（～100μm）により、解析されるサンプルの体積を減少させることが可能となり、したがって、たとえば、さらに少ない量の標識を与えられた生物学的材料で蛍光により検出されることのできる濃度に到達することができる。しかしながら、反応体積が減少した場合でさえ、プローブの1つのリングにおいてハイブリッド化する各ターゲットの濃度は、毛管の体積全体に依存する。プローブの数が多くなると、それだけ一層毛管の長さは長くなければならず、検出可能な濃度を達成することを要求される材料（たとえば、解析されるサンプルの）の量（その長さに比例する毛管の体積）は多くなければならない。サンプルに標識を与えることにリンクした問題は、毛管を使用したとき同じである。さらに、非常に多くの異なったプローブにより機能的にされた毛管を製造することは複雑で高価である。

【0012】

最後に、従来技術において示されたDNAまたは蛋白質アレイは一般に、繰返し使用されることができないものであり、そのため各実験ポイントに対する操作コストが非常に高い。この使い捨てのために、診断目的のための研究および臨床テストに対するこのような技術の一般化が著しく制限される。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、複合体混合物中に存在する特定の分子ターゲット、とくに、RNA、DNAまたは蛋白質分子のような生物ポリマーを分離し、および、または解析する装置を提供する。本発明の装置は非常に多くの実験に対して再使用されることができ、アトモル（ 10^{-18} ）またはzeptomol（ 10^{-21} ）のオーダーの生成物濃度が測定されることを可能にする。これらの制限は、細胞当たり単一コピーとして存在する分子が、たとえば、1000個あるいはさらに少ない100個のような限られた数の細胞から識別されることを可能にする。さらに、本発明のある形態では、装置は比較解析を行うことが可能であり、したがっていくつかのサンプルを同時に解析することができる。別の形態においては、装置は、たとえば、マトリックスの各マイクロカラムまたはマトリックス上のハイブリッド化スポット中においてプローブにより保持された核酸配列または蛋白質を直接決定することができる。

【0014】

したがって、第1の特徴において、本発明は、複合体混合物中に溶解した複数の分子ターゲットを分離し、および、または解析する装置に関し、前記装置は、

(a) 同じ平面に配置されたマイクロカラムのN個の行およびP個の列から構成され、特定のプローブ/ターゲット結合によって複合体混合物中に存在する特定の分子ターゲットを保持することのできる固定された分子タイプのプローブを各マイクロカラムが備えているマイクロカラムのマトリックスと、

(b) マイクロカラムマトリックスの上方においてそのマイクロカラムマトリックスの平面に平行な平面に配置され、前記装置中に導入された複合体混合物が(a)において規定されたマトリックスの各マイクロカラムに向かって移動することを可能にする毛管の第1のネットワークと、

(c) マイクロカラムマトリックスの下方においてそのマイクロカラムマトリックスの平面に平行な平面に配置され、分子ターゲットが溶解の後に1以上の検出器に向かって移動することを可能にし、それらの再生および、または解析を可能にする毛管の第2のネット

10

20

30

40

50

ワークと、

(d) 必要である場合に、種々の分子ターゲットの再生および、または解析を可能にし、質量分光計であることが好ましい1つの検出器とを備えている。

【0015】

適切ならば、電極システムはネットワークにおいてターゲットを制御し、変位させることができる。

【0016】

“毛管”という用語は、流体の移動を可能にし、1ミリリットルより小さく、好ましくは1乃至100 μm の範囲の直径を有する任意の適切なチャンネルを意味している。

【0017】

本発明においては、“複合体混合物中での分子ターゲットの分離”という用語は複合体混合物中に最初には存在していた特定の分子または分子ターゲットで濃縮された溶液を異なった体積において得ることのできる動作を意味している。“濃縮された”という用語は、分子ターゲットが分離後に得られた溶液中に存在する分子の少なくとも50%、好ましくは80%、さらに好ましくは少なくとも90%に相当することを意味する。

【0018】

“分子ターゲット解析”という用語は、分子ターゲットの存在を識別(検出)し、および、または解析される複合体混合物中の前記分子ターゲットの相対量または絶対量を識別(分析)する動作を意味している。

【0019】

本発明において使用されている“複合体混合物”という表現は、異なった構造を有する非常に多くの分子を含む溶液、とくに、異なった構造を有する100個より多い分子の混合物を意味する。本発明の装置は、生物学的起源(origin)のサンプル中に含まれた生物学的分子(または生体分子)の分離および、または解析のためのものであることがさらに好ましい。

【0020】

とくに、それは、血液、血漿のような組織または生物学的流体、あるいはセファロラキディアン(cephalorachidian)液、尿または唾液からのサンプルであってもよい。サンプルは、動物(とくに、哺乳動物、好ましくは人間)から得られてもよい。とくに、サンプルは健康な個体または病気にかかっている患者から採取されてもよい。その病気は、とくに、癌、神経変性病、または伝染病、とくに、ウイルス、細菌性または寄生虫性の病気であってもよい。サンプルはまた、バクテリア、菌類または酵母からの真核細胞または単細胞、とくに、培養された細胞から、あるいは外部環境からサンプルとしてとられた細胞から得られた組織抽出物または細胞抽出物を含んでいてもよい。サンプルはまた、植物から得られてもよい。それはまた、農業・食物生産物、とくに、調理された食物からのサンプルであってもよいし、あるいは穀物、果物またはシリアルからのサンプルであってもよい。

【0021】

したがって、装置は、種々の用途において、とくに、医学的診断または農業・食物の品質制御のために、あるいはエコロジー、考古学または犯罪学の分野における任意の生物学的解析のために使用されることができる。

【0022】

本発明の装置の各マイクロカラムは任意の形態の、たとえば、形状が管状のセルを備え、そのセルは2乃至1000 μm の、好ましくは20乃至100 μm の直径と、2乃至2000 μm の、好ましくは40乃至200 μm の長さとを有していることが好ましい。

【0023】

各セルは、第1の末端部を介して第1の毛管ネットワークの1つの毛管に接続されると共にその反対側の末端部を介して第2の毛管ネットワークの1つの毛管に接続されており、その結果、流れが毛管のネットワーク中を移動することによって、セルのセットを横断することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

装置は一般に、同じ平面に配置されたセルのN個の行とP個の列のマトリックスによって構成されている。セルはこの平面に対して任意の角度で傾斜されることができ、しかしながら実用的な理由のためにマトリックスの平面に対して平行または垂直であることが好ましい。間隔を隔てる必要があるために、隣接した行がずらされて配置されるようにセルが配置されることができ。

【 0 0 2 5 】

セルは、とくに、ガラス、シリコン、プラスチック、カプトン、炭素、金その他のような本発明の装置を生成するのに適した材料またはマトリックスの平面を形成する任意の他の材料の表面に穴を設けてもよいし、あるいはその中にモールドされてもよい。

10

【 0 0 2 6 】

したがって、本発明の装置のマイクロカラムのマトリックスは、たとえば、1乃至100万個のセル、好ましくは100乃至100000個のセルのような非常に多くのセルから構成され、したがって単一のサンプル中に含まれている可能性のあるものと同数の特定の分子ターゲットの分離および、または解析を可能にする。

【 0 0 2 7 】

分子プローブは、好ましくは各セルにおいて特定の特異性 (s p e c i f i c i t y) の1つのプローブにより各セル中に配置されて固定され、それによってそれぞれが1つの特定の分子ターゲットを保持することのできるクロマトグラフマイクロカラムを形成している。

20

【 0 0 2 8 】

本発明において使用される“固定された”という用語は、とくに、電界または磁界が存在するとき、あるいは分子プローブを含むマイクロカラムを横断するとき装置に入る毛管ネットワーク中に注入された移動流が存在するときにプローブがセル中に維持されることを意味している。

【 0 0 2 9 】

したがって、装置は、各マイクロカラムが、適切な条件下で対応した分子ターゲットを結合することのできる同じ特異性であって固定された大量の(たとえば、 10^6 乃至 10^{10} 個の)プローブを含むマイクロカラムのマトリックスから構成されている。前記プローブは以降“分子プローブ”と呼ばれる。複合体混合物中に含まれているターゲットとのプローブの結合に関して使用された“特定の結合”という用語は、そのプローブが特定のターゲットと結合するが、別の分子、とくに、複合体混合物中に存在する別のターゲットのような分子とは明瞭な方法で結合しないことを意味する。

30

【 0 0 3 0 】

好ましいプローブ-ターゲット対は、メッセンジャーRNAのような相補的な配列とハイブリッド化した核酸、特定のオリゴヌクレオチドプローブによりハイブリッド化したRNAまたはcDNA分子、抗体またはそれらの機能断片により構成されたプローブを固有に認識する抗原、あるいは任意のレセプター-リガンドまたはリガンド-レセプターの対である。

【 0 0 3 1 】

当業者は、分子を固有に認識する実体とそれら分子とを関連づけ、分子プローブを構成することが可能である限り、任意のタイプの分子を分離し、および、または解析するために前記装置を構成することができる。ターゲット分子は、サポート上に固定されることのできる前記分子プローブに固有に結合されることができ。

40

【 0 0 3 2 】

プローブは、各セル中において、たとえば、そのセルを離れることのできない1つの元素との強い相互作用により固定されることができ。結合モードは、たとえば、とくに共有結合または任意の他の強い相互作用によりセルの内壁上にプローブを固定することである。

【 0 0 3 3 】

50

その代りとして、分子プローブは、それらがそれらのセルから逃げることをできないような構造の粒子に固定されることができ [Huang et al, Anal Chem; 2002, 74(14): p3362-3371; Ugolin et al-FR-A-0015398, November 2000]。平均粒子直径は、たとえば、各マイクロカラムの入口および出口における毛管の直径より大きい。粒子が磁気引力に耐えることができ、あるいは磁気吸引力を供給することができる場合、および、逆に、セルの壁の一部が磁気引力を発生し、あるいはその影響を受けている場合に、粒子はその粒子とセルの内壁の一部との間の磁気相互作用によってセル中に保持されることができる。

【0034】

特定の実施形態において、分子プローブは各セルに含まれているゲル中に固定され、前記分子プローブがマイクロカラムから移動しないようにしている。分子プローブは、たと

10

【0035】

好ましい実施形態において、各セルがゲルを満たされ、分子プローブがそのゲルのメッシュより大きい直径を有する粒子に結合されて、粒子をマイクロカラム中に固定し、したがってそれと結合された分子プローブを固定している。

【0036】

分子プローブを粒子またはセルの内壁に結合するために任意の適切な方法を使用することができる。とくに列挙できる例は、ビオチンに結合された分子プローブと、“Dyna

20

【0037】

l” (Dyna worldwide distributors、著作権所有 1996年、Dyna AS-Technical Handbook second edition) により販売されているもののような、アビジンにより機能的にされたビーズとの間における共有結合ではないビオチン-アビジンタイプの結合である。

【0038】

一般に、クロマトグラフカラムに対して示された任意のタイプの結合、化学結合または強い相互作用が適切である。

【0039】

プローブは、とくに、各マイクロカラム中に含まれているゲルのポリマーに直接固定されてもよい。

30

【0040】

別の実施形態においては、とくに、プローブが核酸である場合、1つの粒子へ前記プローブを共有結合するために、ポリピロール/核酸のようなポリX/プローブヘテロポリマーを合成することができる。実際に、5'または3'末端がピロールに結合された核酸分子プローブは、ピロールの自由分子と重合し、それによってヘテロポリマーを形成する能力を有し、十分なサイズのヘテロポリマーは上述した粒子として動作することができる。

40

【0041】

さらに別の方法は、5'および、または3'末端部がソラレンのようなブリッジ剤に結合された核酸プローブを使用することである。プローブの配列はソラレン5'(Y1)Xn(Y2)3'のような形であってもよい。Xnはプローブだけのものを表し、Y1およびY2は、相補性によって互いに無制限に連結するように選択された配列である。一例として、重合されるプローブは、m=5であるソラレン5'(T)mXn(A)m3'の等モル混合物によって構成されることができる。紫外線下において、プローブは高分子(ポリ5'(T)mXn(T)m3'ソラレン3'(A)m(X)n(A)m5'...)に重合され、それは各セル中において保持されることができる。

50

粒子またはセルの壁（これらの材料からその後生成された粒子または壁）に不可逆的に結合すると考えることができる。結合は直接的であってもよいし、あるいはナイロン粒子と分子プローブとの間のソラレンブリッジのようなブリッジによって行なわれてもよい。

【0042】

特定の実施形態において、セル中において粒子に結合された分子プローブはまた、十分に小さい直径（たとえば、濾過される粒子の直径より小さい直径）の孔を開けられたフィルタを使用することにより機械的に保持されることができる。このようなフィルタは慣例的に使用され、市販されている（Teflon（登録商標）フィルタ等）。

【0043】

分子プローブの、それらのサポート上への固定は、適用される種々の処理ならびにターゲットを操作するために使用される任意の電界に耐えるように十分に強くなければならない。

【0044】

本発明の装置が、解析されるターゲットの溶離および、または移動を制御することのできる電極に接続された1以上の毛管ネットワークを含んでいるとき、プローブを生物アレイサポートに固定するために説明された化学プロセスの任意のものを使用して、プローブが電極に固定されることができる。ITO（または任意の他の透明な合金、ATO、ZNO、FTO）の電極の場合、核酸の場合のように PO_3^- （ref参照）のような親水性のグループを有するプローブの直接的な配置を行なうことができる。

【0045】

プローブグラフトを受けていない電極の部分は、カプセル化プロセスによって隔離される必要がある。一例として、ポリピロールの薄膜が使用されてもよい。その薄膜は、ピロールの溶液が存在するときにグラフトされた電極を電圧（tension）下におくことによって生成される。ピロールは電流の作用の下に瞬間的に重合し、電極の自由部分を隔離する。プローブをグラフトした後、電極はまた、ターゲットによりハイブリッド化することのできないモノマーオリゴヌクレオチド（たとえば、ポリA）によって飽和されてもよい。

【0046】

本発明は直接的な吸着により核酸ポリマーをITO電極に結合するプロセスに関する。

この装置は、それが2つの毛管ネットワークを備えているとき、混合物がマイクロカラムのセットを通してさらに解析されることを可能にする。対応したターゲットは各マイクロカラム上に固有に保持される。その後、それらは溶離される。すなわち、それらが固有に結合されていた分子プローブから引き離され、その後マイクロカラムの出口における毛管のネットワークを介して1以上の検出器に向って移動する。

【0047】

非常に多数のマイクロカラムのために、ターゲットの逐次解析に対して、好ましい例において説明したように、各マイクロカラムで、あるいは、たとえば、 $N * P$ 個のマイクロカラムのマトリックスの場合では行単位等のマイクロカラムの少なくとも異なったグループで溶離および、または移動を別々に制御することができることが有効であることが容易に認識されるであろう。

【0048】

毛管のネットワークは、たとえば、シリカに対しては酸侵食技術を使用し、あるいはプラスチックに対してはレーザの機械加工を使用してシリカ、プラスチック（たとえば、プレキシガラス（登録商標））のような材料中の穴に配置されるか、あるいはモールドされ、これらは全て当業者に知られている。

【0049】

好ましい実施形態において、各毛管ネットワークは、適切な材料のある厚さのプレート中に穴を形成して配置される。それ故、装置はマイクロカラムのマトリックスと、毛管のネットワークが穴に配置された2つのプレートとを備え、これらのプレートはマトリック

10

20

30

40

50

スの各表面に接合されている (Kuo et al-Anal Chem,2003;75(10),p2224-2230;Kuo et al ,Anal Chem,2003;75(8),p1861-1867)。

【 0 0 5 0 】

特定の実施形態において、上述の本発明の装置は、分子ターゲットの溶離および、または検出器の方向へのそれらの移動および、または溶離後のマイクロカラム中におけるそれらの保持をマトリックスの1以上の特定のマイクロカラムにおいて制御する手段を備えていることを特徴とする。

【 0 0 5 1 】

“溶離”という用語は、ターゲットとプローブとの間に設定された特定の結合を切断する動作を意味している。

【 0 0 5 2 】

本発明の関係内において、特定のマイクロカラムにおける“溶離制御”および、または“ターゲット移動”という用語は、ターゲットが溶離され、あるいは検出器に向けて移動するマイクロカラムを装置が選択することができ、別のターゲットは溶離されず、前記マイクロカラムを横断する流れが存在する可能性があるにもかかわらずマイクロカラム中に保持されることを意味する。

【 0 0 5 3 】

したがって、同じ解析装置を使用して各マイクロカラムまたはマイクロカラムのグループから溶離されたターゲットを別々に解析することができると仮定すると、この1実施形態の装置はとくに使用される検出器の数を制限する可能性が高める。

【 0 0 5 4 】

特定の実施形態において、分子ターゲットが帯電された分子、たとえば、核酸であるとき、たとえば、各マイクロカラムの出口に接触して配置された1組の電極等によって電界を与えることによりこれらのターゲットの溶離および、または移動を制御することができる。各セル中の電極は互いに独立していてもよい(セル単位で多重化してもよい)し、あるいはセルの1グループに対して1つの電位ユニットをそれぞれ形成する電極のグループに分けられてもよい。

【 0 0 5 5 】

したがって、特定の実施形態において、本発明の装置は、各マイクロカラムと接触した状態で好ましくはそのマイクロカラムの中間に配置されたセル電極または中間電極と呼ばれる1つの電極と、1以上の特定のマイクロカラム中に保持された分子ターゲットの溶離および、または検出器へのそれらの移動または溶離後のそのマイクロカラム中におけるそれらの保持を制御するように各マイクロカラムの出口に配置された遠位置電極と呼ばれる別の第2の電極とを備えている。

【 0 0 5 6 】

セル電極は溶離後、帯電した分子をマイクロカラム中に電気的な相互作用によって保持し、その後それらが選択的に移動されることを可能にするように配置されている。セルの形状が管状であるとき、それらは、たとえば、セルの側壁に接触して配置される。

【 0 0 5 7 】

装置により別個の溶離および、または検出器への分子ターゲットの移動が可能になると仮定すると、その装置は、分子ターゲットが制限された数の検出器または単一の検出器へのマイクロカラムの出口に集中することを可能にする適切な毛管の1つのネットワークを備えることができる。

【 0 0 5 8 】

好ましい実施形態において、本発明の装置は、マイクロカラムへの入口として機能する毛管の第1のネットワークが以降上方横断チャンネルと呼ばれる第1の横断毛管を備え、この第1の横断毛管は、その中に複合体混合物が導入され、2乃至1000 μm の範囲の直径を有していることが好ましく、マトリックスのマイクロカラムとして機能する1組の毛管に接続されており、また、マイクロカラムの出口として機能する毛管の第2のネットワークが2乃至1000 μm の範囲の直径を有していることが好ましい下方横断チャンネル

10

20

30

40

50

ルと呼ばれる 1 以上の横断毛管にマイクロカラムを接続する 1 組の毛管を構成し、この下方横断チャンネルは 1 以上の検出器に接続されていることを特徴とする。

【 0 0 5 9 】

下方および上方横断チャンネルはそれぞれ 1 つの電極に接続され、解析される複合体混合物が導入される場所と検出器との間に与えられた電位差が装置全体への帯電した分子の移動を確保することを可能にし、とくに、複合体混合物中に含まれる核酸が電気泳動によって解析されることを可能にすることが好ましい。

【 0 0 6 0 】

とくに好ましい実施形態においては、本発明の装置は、マイクロカラムのマトリックスが同じ平面に配置された N 個の行と P 個の列のマイクロカラムから構成され、それが特定の行のマイクロカラム上に保持された分子ターゲットの溶離および、または検出器へのそれらの移動および、または溶離後のマイクロカラム中におけるそれらの保持を制御する手段を備え、1 つのマイクロカラムの出口と下方横断チャンネルとの間の距離がその別のネットワークの毛管ごとに異なり、好ましくは、1 つの行の第 1 のマイクロカラムを接続する毛管が前記の行の最後のマイクロカラムを接続する毛管より長くなるか、あるいは短くなるように別のネットワークの各毛管の長さが選択され、その結果マイクロカラムの出口から検出器までの分子ターゲットの滞留時間が同じ行の各マイクロカラムについて異なることを特徴とする。

10

【 0 0 6 1 】

一例として、同じ行の各マイクロカラムからのターゲットの移動時間を異なったものにするために、各マイクロカラムを下方横断チャンネルに接続する毛管のネットワークは、各毛管がマトリックスの同じ行の P 個のマイクロカラムを下方横断チャンネルに接続し、前記下部横断チャンネルと 90° 以外の角度をなす P 個の平行な毛管を備えていてもよい。遅延をさらに増加させるために、セルの最後の行と横断チャンネルとの間に配置された毛管の部分は非線形軌跡をたどる。

20

【 0 0 6 2 】

種々のターゲットの移動時間は、ターゲットが導出されたマイクロカラムが識別されることを可能にし、したがってこのターゲットがマイクロカラム中に含まれている分子プローブによって識別されることを可能にする。したがって、毛管の直径およびそれらの内部で使用される任意のゲルの密度は移動している分子をサイズで区別しないように選択され、その移動時間は、たどられた軌跡だけに依存する。しかしながら、ゲル密度は随意に、毛管電気泳動によるクロマトグラフィを行なうように選択されることができ、異なったサイズを有し、あるいはわずかな配列多形性を有しており、結果として同じプローブにハイブリッド化する分子は、それらの移動期間中に適切なゲルによって異なった長さだけ遅延される。

30

【 0 0 6 3 】

距離が異なった下方横断チャンネルと第 2 の毛管ネットワークの種々の部分はゲルを充填されていることが好ましい。このために、ターゲットは、それらがクロマトグラフを実施される第 2 のネットワークの毛管の異なった部分に迅速に移動する。

【 0 0 6 4 】

装置のマイクロカラムの各行に対するターゲットの溶離および、または移動を制御するために、1 つの行の P 個のマイクロカラムのセットは同じ電極に接続されることができ、それ故、本発明の装置は、マイクロカラムに対して中間であることが好ましい N 個の行電極（セル行電極）と、同じ行のマイクロカラムの出口において P 個の毛管のセットを接続する行電極に平行な別の第 2 の一連の電極（遠位置行電極）とを備えている。

40

【 0 0 6 5 】

このようにして、セル行電極または中間行電極の 1 つのネットワークが得られる：マイクロカラムマトリックスの 1 行当り 1 つの電極である。これらの電極は、各セル中でのターゲットのナノ操作を可能にすることに加えて、電界の影響の下で各プローブに結合するピロールに結合されたプローブのようなプローブ結合に触媒作用を与えることができる。

50

セル行電極の鏡像である遠位置行電極の第2のセットは、マイクロカラムマトリックスのセルの出口に配置される。行電極の対は、 $N * P$ 個のマイクロカラムのマトリックスの電位ユニットを規定する。これらの電極対は、所望の電位をマイクロカラムの各行に与えることができる。

【0066】

装置の好ましい実施形態において、毛管の第1および第2のネットワークは、マイクロカラムマトリックスの平面に平行な平面において、好ましくはマイクロカラムのマトリックスにより形成された平面のそれぞれ上方および下方に配置され、上方ネットワークと呼ばれる毛管の第1のネットワークは N 個の平行な毛管を備え、各毛管が上方横断チャンネルをそのマトリックスの単一の行の P 個のマイクロカラムに接続し、下方ネットワークと呼ばれる毛管の第2のネットワークは P 個の平行な毛管を備え、各毛管がそのマトリックスの1つの列の N 個のマイクロカラムを下方横断チャンネルに接続し、上方および下方の2つの毛管ネットワークの間に形成される角度は 0° 以外であり、それは 90° であることが好ましい。この理由のために、上方ネットワークの各毛管は、マイクロカラムマトリックスの P 個のセルの1つの行を介して下方ネットワークの全ての毛管に接続される。相互的に、下方ネットワークの各毛管は、マイクロカラムマトリックスの N 個のセルの1つの列を介して上方ネットワークの全ての毛管に接続される。

10

【0067】

$N * P$ 個のマイクロカラムのこのようなマトリックスを含む特定の実施形態においては、上方横断チャンネルと反対側の上方ネットワークの毛管の端部はマイクロカラムマトリックスの行の P 番目の最後のマイクロカラムとの最後の接続で終わることが好ましく、また、下方横断チャンネルと反対側の下方ネットワークの毛管の端部はマイクロカラムマトリックスのマイクロカラムの列の N 番目の最後のセルとの最後の接続で終わることが好ましい。

20

【0068】

別の実施形態において、横断チャンネルと反対側の毛管の下方ネットワークの毛管の端部は、別の横断毛管(2次的な下方横断チャンネル)に接続され、前記チャンネルは、上方および下方毛管の2つのネットワークの間においてマイクロカラムを通して流れが設定されることを可能にし、これは下方の毛管ネットワーク中への移動が加速され、さらに細かく制御されることを可能にする。毛管微量電気泳動法を行なうために下方の主横断チャンネルがゲルを充填されている場合、さらに、上方横断チャンネルと第2の下方横断チャンネルとの間に閉ループ流を設定することが可能である。

30

【0069】

一般に、毛管ネットワークは、ポリアクリルアミドゲルのようなゲル、または流れが調節されることを可能にすると共に分子の移動中のそれらの拡散が制御されることを可能にする任意の他のゲル、とくに、毛管電気泳動のために使用される液体ゲルを充填されることができる。

【0070】

$N * P$ 個のマイクロカラムのマトリックスを含む装置の特定の実施形態において、上方および下方横断チャンネルは、筋(thread)がつけられてよいし、あるいはつけられなくてもよいピストンを備え、このピストンはその流れが通過することのできるマイクロカラムの行の数が選択されることを可能にする。それが引き戻されるとき、ピストンはマトリックスのマイクロカラムのさらに多くの行に移動性をもたせる。

40

【0071】

スロットをつけられた中空ピストンを生成することによりマトリックスのマイクロカラムの行に1つずつ移動性をもたせることができる。

【0072】

特定の実施形態において、ハイブリッド化フェーズ中のターゲットの移動は、上方および下方横断チャンネルの電極と連続した行電極との間に交番電界を設定するにより流れなしに行なわれる。この電界により、ハイブリッド化されていないターゲットはハイブリッ

50

ド化溶液を均一にするために一様に混合されることが可能になる。さらに、電界強度を調節することにより、ハイブリッド化限定性を制御することができる (Cluzel P, 1996, Science, Vol 2071 (5250) pp792-794)。

【 0 0 7 3 】

重ねられた毛管の二重ネットワークの使用に代わるさらに簡単なものは、本発明の装置を構成するために単一のネットワークと、1組の行電極対とを使用することである。

【 0 0 7 4 】

その場合、装置は、その配列が1つの遺伝子に固有である、たとえば、拡散ポリマータイプ等の、分子プローブの1つのタイプ (蛋白質では、それは抗体の1つのタイプまたは1つの特定のリガンドであってもよい) により各スポットが構成されたスポットに組織化されたプローブのマトリックスの形態 (ハイブリッド化装置に対応した) である。そのマトリックスのスポットの各行は、1つの電極を規定する金またはITO (あるいは任意の他の適切な金属または合金) の表面上に付着され、したがってマトリックス全体が行の数 n に対応した n 個の電極によって構成され、各行電極はグラフトされたプローブの P 個のスポットを含んでいる (図7参照)。電極は、ガラス、カプトン、アルミニウム酸化物等のような絶縁材料上に薄い層としてエッチングされる (図を参照)。

【 0 0 7 5 】

第1の電極セットの鏡像である第2の電極セットが生成されるが、しかしこのときにこれらの電極はプローブとグラフトされない。これらの電極は機能的にされていないと呼ばれる。2つの電極セットは、1つの電極セットが上方に位置し、他方の電極セットがその下方に位置するように (図8および9)、 P 個の並列の毛管のネットワークのそれぞれの面に対向して配置される。機能的にされた電極の第1のセットは、スポットに組織化されたグラフトされたプローブ電極を有し、各プローブは、それが複合体混合物中に存在しているときに特定の分子ターゲットを特定のプローブ/ターゲット結合によって保持することができる。第2の電極セットは、機能的にされていない電極を有している。特定の例では、機能的にされた電極のセットは毛管ネットワークの上方に配置され、機能的にされていない電極のセットは毛管ネットワークの下方に配置される。各毛管は、機能的にされた電極セットの n 個の電極と機能的にされていない電極セットの n 個の電極とに対して垂直である (図9、10および11)。その構成は、 n 個の機能的にされた電極の第1のスポットが毛管のネットワークの第1の毛管内に位置し、 n 個の機能的にされた電極の第2のスポットが毛管のネットワークの第2の毛管内に位置し、以下同様に位置するように生成される (図11)。電極対は、毛管のネットワークの上方のスポットに組織化されたプローブの1つのグラフトされた電極と毛管のネットワークの下方の対向した機能的にされていない電極とによって構成される。これらの電極はSPRによる検出を可能にするように非常に薄くできる。毛管のネットワークの各端部において、毛管は1つの循環容器に向かって集まる。その容器は、機能的にされた電極のセットの平面と同じ平面に1つの電極 (容器電極) を備えている (図11)。1つの特定の例において、この電極は円形である。特定の例では、この電極は各容器の天井の中央に配置される。機能的にされた電極 (プローブのグラフトされた電極) のセットは2つの補足的な接続電極により完成される: 第1の湾曲した電極が第1の容器電極と第1の機能的にされた電極との間に配置され、第2の湾曲した電極が第2の容器電極と最後の機能的にされた電極との間に配置される。接続電極は湾曲しており、その曲率は、接続電極と容器 (容器電極) の中心との間の距離がその電極上の任意の地点で同じであるように規定されている。

【 0 0 7 6 】

接続電極と容器電極との間の最短距離が電極上の任意の地点で同じになるように、第1の補足的な電極は第1の容器電極と第1の機能的にされた電極との間に配置され、第2の補足的な電極は第2の容器電極と最後の機能的にされた電極との間に配置されている。

【 0 0 7 7 】

毛管の二重ネットワーク、毛管のようなネットワークの構成要素、電極、検出器等を備えた本発明の装置の上記の説明は、それが単一のネットワークを備えた装置の機能に適合

10

20

30

40

50

すると仮定すると、その単一ネットワークの装置の処理に置き換えられ、必要ならば、この構造に適応されることができる。

【0078】

同様に、解析される分子および使用されるプローブならびにそれらの使用および検出の特徴の説明は、それが単一のネットワークを備えた装置の機能に適合すると仮定すると、その単一ネットワークの装置の処理に置き換えられ、必要ならば、前記構造に適応されることができる。

【0079】

毛管の単一のネットワークを備えた装置の機能の原理は積極的ハイブリッド化(ha)を使用し、以下のように説明されることができる：

(1) 解析されるサンプル(図12)が第1の容器中に導入される。解析される分子が核酸であるとき、第1の接続電極(正)と第1の容器の電極(負)との間に電位が与えられる。その代わりに、蛋白質解析の場合には電位が逆にされることができる。以下の説明は核酸に対する機能に関する。解析される分子は各毛管中において等モルで移動し、接続電極において濃縮される。

(2) その後、容器電極と接続電極との間の電位が遮断され、機能的にされた第1の電極(+)と接続電極(-)との間に電位が与えられる。その後、毛管の各分子は、第1の電極のスポット(毛管当り1つのスポット)に対して相補的なターゲットがハイブリッド化することのできる(ハイブリッド化は電界によって加速される)機能的にされた第1の電極に移動する。各スポットにおける濃度は最大である(それは毛管の数だけに依存し、もはやチャンネルの全体的な体積には依存していない)。

(3) スポットにおいてターゲットを制御するために、第2の行電極(機能的にされていない)は負の電位にされてもよい；(-+-)電荷分布は、+電荷が各毛管の第1のスポットの中央に位置された場合に得られる。ハイブリッド化を改善するために、電位が遮断され、電位なしの状態では緩和時間に対応した時間が経過し、その期間中にターゲットは拘束なしにハイブリッド化することができる。解析されるターゲットの混合を増大させ、したがって少数存在しているターゲットのハイブリッド化を支援するために、緩和時間中、不連続な交番電位が毛管のネットワークの上方および下方の第1の電極対の間に設定されてもよい(これはハイブリッド化特異性をさらに増加させる)。

【0080】

ターゲットがスポットの第1の行におけるターゲットになると、電位は1つの行だけオフセットされる。0が接続電極の位置であり、1、2、3がそれぞれプローブにグラフトされた第1、第2および第3の機能的にされた電極の位置である場合、与えられる電位シーケンスは次のように説明されることができる：(4) 第2の機能的にされた電極は正電位にされる；その電荷分布は(0-, 1+, 2+)であり(随意に、第3の電極は負の電位である)、電荷分布は(0-, 1+, 2+, 3-)である；

(5) 第1の機能的にされた電極は負の電位にされる；その電荷分布は(0-, 1-, 2+)であり、随意に(0-, 1-, 2+, 3-)である；

(6) 接続電極は、電荷分布(1-, 2+)、随意に(1-, 2+, 1-)に対して0にされる；

(7) 第2の機能的にされた電極と第2の機能的にされていない電極との間の不連続な交番電位。

【0081】

スポットの第1の行にハイブリッド化されないプローブのセットは、スポットの第2の行に移動する。解析されたサンプル中に相補的なターゲットを有する全ての行のスポットの全てをハイブリッド化するために移動、緩和および混合シーケンス(ポイント4乃至6)の全てが段階的に適用される。それらが第2の容器に到達すると、異なった毛管中を移動してきたターゲットは再び混合される。その後、1つの変形において、反対方向の電位のシーケンスを行って逆方向に毛管のネットワークをカバーすることができる。毛管を通過して2つの容器の間をターゲットが往来するようにすることにより、装置の検出感度を高

10

20

30

40

50

めることができる。

【 0 0 8 2 】

毛管の二重ネットワークを備えた装置に関して上述したように、毛管の単一のネットワークを備えた装置においてハイブリッド化されたターゲットを定量化するためにいくつかの検出可能性が予想される。

【 0 0 8 3 】

S P Rを使用する：

・ターゲットは機能的にされた電極のネットワーク上で定量化されてもよい。S P R測定を行うことができるように、三面体のプリズムが機能的にされた電極のネットワークの各行電極の後面にぴったり合わせられる（S P R検出に関する説明を参照）。

10

・背景雑音および検出感度に関する問題を軽減するために、各電極の毛管と反対側の表面が三面体のプリズムに結合された機能的にされていない電極のセットにおいてS P R測定が行われてもよい（S P R検出を参照）。この検出プロセスにおいて、機能的にされた電極のセットは、各スポットが小さいセルによって隔てられて境界を設定された構造に結合されてもよい（図13）。各セルは小さいカップであり、その底は機能的にされた電極によって構成され、このカップは機能的にされていない電極に面した毛管に通じている（セルは毛管ネットワークの毛管の一側だけに通じている）。セルの壁は、機能的にされた電極と機能的にされていない電極との間におけるターゲットの1つの移動期間中に1つのスポットのターゲットが別のスポットのターゲットと混合しないようにする。

【 0 0 8 4 】

20

一側だけに開くセルおよび毛管の単一のネットワークを使用することに関して、毛管のシステムへの横断チャンネルと、移動を遅延するシステムとを適合させることが可能である（二重ネットワークの毛管の下方ネットワークについて説明したように（そのセクションを参照））。単一の毛管ネットワークの使用に関しては、第2の容器なしですませるか、あるいは毛管システムを横断する1つのチャンネルおよび移動遅延システムによりそれを置換することができる（図14）。したがって、毛管の2つの重ねられたネットワークを有するシステムに関して説明された同じタイプの検出が簡単化されたシステムに適用される。

【 0 0 8 5 】

この構成において、第1の接続電極は、接続電極と容器の中心との間の距離が電極の任意の地点において同じであるように湾曲しており、第2の接続電極は湾曲していない。この電極は、ハイブリッド中にプローブが入り込むことのできないバリアとして作用する。その後、検出ステップは、ターゲット電極および接続電極により設定された電位を使用してターゲットが遅延システムに導かれることを可能にする。

30

【 0 0 8 6 】

そのエレメントが横断チャンネルに関して鋭角を有する場合、遅延効果は拡大される。

【 0 0 8 7 】

蛍光の使用：

・ターゲットが蛍光マーカで標識された場合、機能的にされた電極のセット上においてスキャナを使用してハイブリッド化されたターゲットを直接読取ることができる。同様に、S P Rと結合された蛍光（S P Rの減衰波による蛍光分子の励起）の使用が可能である。

40

・ターゲットに標識を付けずに、プローブ/ターゲット複合体の量は、ターゲットまたは複合体に対して蛍光リガンドを使用して評価されることができる。DNAアレイに対しては、アクリジン、とくに、正に帯電したDNAに対する挿入剤であるアクリジンオレンジを挙げることができる。アクリジンオレンジは一本鎖または二本鎖DNAに別々に標識を付けることができ、電極のシステムによって生成された電界の作用のために自由分子が除去される。帯電した分子のセットを操作することのできる電極セットによるハイブリッド化反応期間または合成反応の期間中に、1組の測定が行なわれてもよい。この方法を使用することにより、スポットを構成するプローブの分子の数とハイブリッド化されたター

50

ゲットの数を評価することができる；これら2つの測定値により、溶液中のターゲットの真の濃度が決定されることが可能になる。

【0088】

電極からの望ましくない蛍光を防ぐために、可視スペクトルで透明であるITOタイプの合金（インジウム酸化物および錫酸化物または任意の他の等価な合金）との接続が生成されてもよい。これらの合金は求電子性が高いため、それらに対して化学的隔離セクションにおいて説明された化学的な隔離処理が行なわれる。

【0089】

本発明の装置の特定の構成において、プローブは1組の機能的にされた電極の電極の間に配置されることができ（図7）。

10

【0090】

毛管の二重ネットワークの使用に関して、本発明の装置は、分子ターゲットを別々に収集し、および、または分子ターゲットを別々に解析するのに適した1以上の検出器を備えている。このような検出器は以降検出器と呼ばれる。

【0091】

好ましい実施形態において、検出器は、第2のネットワークの毛管を接続する下方横断チャンネルの出口に接続される。以下、検出器と、第2のネットワークの毛管のセットを接続する下方横断チャンネルとを備えた装置を詳細に説明する。他の変形が認識可能であることは明らかであり、とくに、いくつかの検出器が使用されてもよく、各検出器が第2のネットワークの毛管の一部を接続する下方横断チャンネルの出口に接続されている。

20

【0092】

任意の検出システムは、とくに、たとえば、種々のサンプル等から導出された分子ターゲットを区別するために使用された標識のタイプの機能として毛管の第2のネットワークからの出口に適合されてもよい。

【0093】

例示すると、ターゲットが蛍光によって、とくに、蛍光プローブによる標識を与えられた後に確認された場合、標識を付けられた分子からの蛍光または研究されている分子の本来備わっている蛍光の励起および獲得を可能にする分光計を使用して検出が行なわれることができる。したがって、特定の実施形態では、水晶に穴をあけられた毛管または蛍光の励起および獲得を可能にする任意の他の透明な材料（たとえば、プラスチック）に形成された毛管を下方横断チャンネルの出口に追加することができる。蛍光は励起され、水晶毛管を通過中に読取られる。研究されている分子の天然の蛍光が検出に対して使用されてもよい。同様に、NaClまたはKClの結晶を使用して、赤外線分光研究またはラマン分光研究を行なってもよい。

30

【0094】

その代わり、ターゲット検出および定量化は、ターゲットが常磁性マーカにより標識を与えられた場合には常磁性共鳴または電子共鳴を使用する。

【0095】

検出がSPRによって行なわれたとき、遠位置行電極または下方行電極は数十 μm の厚さの金（または別の自由電子金属）のシートにより構成される。各遠位置電極の外部表面（チャンネルと反対側）は、プリズム（ガラス、水晶、プラスチック、またはSPRに適切である可能性のある任意の他の透明な材料）の3つの表面の1つに接続されている。プリズムは三面体であり、その3つの方形の表面の1つが遠位置行電極の外部表面に結合され、三面体の長さは電極の長さに対応している（図15）。

40

【0096】

ターゲットハイブリッド化の後、マイクロカラム回路は濯がれ、全てのハイブリッド化されていないターゲットが除去され、ハイブリッド化されたターゲットは単純化された設計のために各セルまたは各スポット中に保持される。このシステムは、機能的にされた電極および機能的にされていない電極の設計において各行電極対における電位がそれぞれ中間電極で正になり、遠位置電極で負となるように電圧が与えられる。説明のために、機能

50

的にされた電極は中間電極と同じであり、機能的にされていない電極は遠位置電極と同じである。蛋白質アレイ、抗体アレイまたは分子レセプターアレイに対して、電位は研究されている分子の電荷の作用に適合される。プローブ-ターゲット複合体を破壊することのできるカオトロピックな薬品はその中間電極の中に導入される。プローブはターゲットから分離するが、しかし中間電極の負の電荷によって各セルまたは各スポット中に保持される(図16)。第1の電極対における電位は、遠位置電極で正であり、中間電極で負であるように反転される(図16)。電極対に依存するセルまたはスポットの行のターゲットは毛管のネットワーク中に移動して毛管のネットワークに対して垂直な遠位置電極(2つの重ねられたネットワークのシステムの下方向ネットワーク)に至り、その結果各セルまたはスポットのプローブが異なった毛管において見出される。

10

【0097】

本発明はまた、

- ・1つの電極上のターゲットのハイブリッド化し、
- ・カオトロピックな薬品によるデハイブリッド化し、
- ・電位によりターゲットを維持し、
- ・電位を反転させて機能的にされていない電極にターゲットを移動させ、
- ・機能的にされていない電極上でSPRを測定する各ステップを含むSPR解析方法に関する。

【0098】

SPR測定は、光を各電極上に配置されたプリズムを通して遠位置電極の外部表面上に反射させることにより行なわれる。測定されたSPR信号が時間と共に変化した割合を観察することによって解離定数を評価することができる。1対の行電極の間に交流電流を与えることにより、結合(association)および解離プローブ/ターゲット定数を測定することができる。変性剤なしに行なわれた実験の特定の場合においては、電界により誘導された局部濃度の変化はプローブおよびターゲットの結合および解離を生じさせることができる。

20

【0099】

電極に供給された電流はSPR信号を妨害する可能性がある。この乱れを制限するために、行電極対の間に与えられる電界は不連続的なものであってよい。SPR測定が電界の中断フェーズ中にのみ行なわれた場合、その電界の周波数に結合されたパルスSPR測定が行なわれる。その行電極対の間における電界の中断時間の関数としてSPR信号の変化率を解析することにより分子の拡散係数を決定することができる。各行電極対に対して同じ動作が繰返される。

30

【0100】

金属表面は機能的にされていないため、ターゲットはその金属と直接接触し、それによって検出感度を増加させる可能性がある。さらに、電界は金属の表面におけるターゲットの濃度を最大化し、それが検出感度をさらに増加させることができる。SPR検出は質量に依存するため、検出される分子が重くなると、それに応じて一層検出効率が高くなる。したがって、分子の質量の増加は検出しきい値を減少させることができる。重い同位体によって原子が置換されたターゲットを使用することにより分子質量を増加させることができ、したがって検出しきい値を低くすることができる。

40

【0101】

毛管の単一のネットワークの使用に対応した別の形態に関して、直接的な電気的検出によってターゲットに結合した分子のインピーダンスを直接測定することができる。

【0102】

電界によりプローブおよびターゲットを操作する役割に加えて、アレイ中に注入された電極のシステムは、ターゲットに結合した分子のインピーダンスが直接測定されることを可能にする。20cm²未満の表面上において10³乃至10⁶の高いスポット密度に到達するために、交差された電極のシステムが生成される。このシステムは、プローブのスポットのマトリックスの下方向および上方の2つの異なった平面に配置された2組の重ねられ

50

た電極から構成されている。機能的にされていない電極セットの方向は、機能的にされた電極セットの方向に対して垂直である（図17）。スポットは、たとえば、機能的にされた電極セット上における、機能的にされた電極と機能的にされていない電極セットの上方平面への突出部との各交差部分に注入される。プローブの固定は、電極の性質およびプローブ分子の性質に依存する（プローブの注入および電極の隔離に関する章を参照）。DNA分子に関して、ハイブリッド化に対するものと同じオーダーであるインピーダンスの変化を生じさせるDNAの湾曲および分子内ハイブリッド化による測定問題を最小にするために可能な限り強い応力を分子の配座に与えることが望ましい。DNAに応力を与えるための解決方法は、分子結合により電極上に吸着することである。電極上に伸ばされた分子はもはや曲がらず、それら自身とハイブリッド化しない。それとは対照的に、それらは溶液中の相補的な配列とハイブリッド化する機能（*faculty*）を維持する。別の解決方法は、機能的にされたセットの1つの電極と機能的にされていないセットの1つの電極との間のプローブ分子を、その末端をそれら電極に固定することにより伸ばすことである。使用されたオリゴヌクレオチドプローブは、5'および3'の2つの末端部において機能的にされる。5'の機能は3'の末端部における機能とは異なっている。2つのタイプの機能は異なった活性化および、または触媒作用を有する。それは、たとえば、Hsから選択され、NH₂は5'において化学的または光活性化の機能を行い、3'におけるピロールの機能は電気触媒である。機能的にされた電極および機能的にされていない電極のセット間の距離は、特定の湾曲を採用する必要なしに、あるいは分子内ハイブリッド化を生じることなしに分子が伸ばされるように選択される。別の形態は、プローブの5'末端部を機能的にして、それを機能的にされた電極にグラフトすると共に短い配列（10乃至20の塩基）を3'末端部に追加することである。3'配列は、ターゲットとのハイブリッド化が生じないように特有に選択される。3'付加物（*adjunct*）と相補的な配列は対向した機能的にされていない電極にグラフトされる。プローブは、それらの5'末端部が化学結合により機能的にされたセットの電極に固定され、付加物とその相補的な配列との間に形成された2連の10乃至20の塩基の対によって3'末端部を介して機能的にされていない電極に固定される。したがって、プローブは、2つの電極間において伸ばされ、それが分子内ハイブリッド化および湾曲を最小にする。

【0103】

グラフトされたプローブを有する電極アレイは、現在生物アレイに関して行なわれているように、各スポットにおけるターゲットの簡単な拡散によって消極的にハイブリッド化されてもよい。しかしながら、上述の方法を使用した積極的なハイブリッド化が好ましい。したがって、前のセクションにおいて説明したものに類似した毛管の1つのネットワークおよび2つの容器が、機能的にされた電極セットと機能的にされていない電極セットとの間に配置される。容器からの2つの電極と2つの接続電極が機能的にされた電極のセットに追加される（図面参照）。アレイがハイブリッド化されると、各スポットのインピーダンスの変化により、結合されたターゲットの量が決定されることが可能になる。機能的にされた電極と機能的にされていない電極の突出部（上方平面への）との交差は特有であり、単一のスポットに対応する。インピーダンス測定は、機能的にされていない電極と機能的にされた電極とにより形成された電極の全ての可能な対に電位差および電流を連続して与えることによりスポットごとに行なわれる。

【0104】

重ねられた電極の2つのセットの間における垂直配置は、理論上、測定が行なわれることを可能にする。しかしながら、交流または不連続の電流を使用することと、1つの電極がいくつかのスポットに接続することによって望ましくないキャパシタンスに関する問題を発生させ、それが測定を乱す。電流および電圧を適切に測定して各スポットのインピーダンスを規定することは、不可能ではなくても、困難になる。この問題を克服するために、スポット単位の電圧および電流が設定されることを可能にするスイッチが導入されなければならない。生物アレイのディメンションに適合するスイッチを生成するために、機能的にされた電極のセット（または機能的にされていないセット）は、第1のセットの電極

10

20

30

40

50

の第2のセット（垂直な）から隔離されていてこれに対して垂直な第1の（水平な）電極セットにより構成された1つの平面において電極のグリッドによって置換される。そのグリッドのメッシュは、小さい電極（スポット電極）が配置される間隔を規定し、このスポット電極は一辺が10乃至500 μm であり、それはグリッドの寸法に依存する。トランジスタのゲートがメッシュの一辺の水平電極に接続され、トランジスタの入口端子（ソース）がメッシュの一辺の垂直電極に接続され、トランジスタの出口端子（ドレイン）がスポット電極に接続されるように、グリッドの各メッシュには1または2個の電界効果トランジスタが配置される。

【0105】

要約すると、水平および垂直電極により規定され、メッシュが小さいスポット電極によって占有されているグリッドが得られる。スポット電極は、1つまたは2つの電界効果トランジスタによってメッシュの4辺中の2辺に接続される（図17、18）。分子プローブは各スポット電極にグラフトされる。機能的にされていないセットの電極は、“スポット電極”の各列に対向して、また、機能的にされたグリッドの垂直電極に対して平行に配置される。機能的にされていないセットの各電極は接地される。機能的にされていない電極セットは、単一の接地されたプレートによって置換されてもよい。

【0106】

インピーダンスが不連続な電流（電流は常に同じ方向である）で測定されたとき、スイッチとして動作するためには“スポット電極”当り1つのトランジスタが必要である。水平電極に電圧を印加することにより、全てのトランジスタのゲートは付勢され、それが全てのトランジスタの入力とドレインとの間の電流を遮断し、それによって電極スポットが隔離される。単一の水平電極において電流を遮断し、その電流と断続的な電界を単一の垂直電極に与えることにより、2つの電極の交差部分のトランジスタだけが、その入力とそのドレインとの間を電流が通過することを可能にする。単一のスポットが電圧下に置かれ、そのスポット電極におけるインピーダンスの変化が別のスポットから妨害を受けることなく決定されることができ。

【0107】

インピーダンスが交流電流（電流は両方向に流れる）で決定されたとき、スポット電極は、電流の方向にかかわらず、供給されなければならない。したがって、逆の特性を有する2つの電界効果トランジスタがメッシュ中に配置されなければならない。すなわち、トランジスタのゲートにおける電圧がゼロまたは負のとき、電流は入力とドレインの間を、第1のトランジスタでは一方の方向に、第2のトランジスタでは他方の方向に通過することができる。電流の方向に関係なく、スポット電極は電流を供給される。電流が入力とドレインとの間を2つの方向に通過することを可能にする“nmos”または“pmos”型トランジスタのようなトランジスタを導入することが有効であるが、しかしこのようなトランジスタは付加的な端子を有しており、したがって接続を行なうためにメッシュ当り1つの水平電極を必要とし、これは小型化を制限する。

【0108】

蛍光およびインピーダンスまたは蛍光のみ（そのとき、上記の積極的ハイブリッド化（ha）の説明によると電極はハイブリッド化を制御するためにのみ使用される）の混合された検出を行なうことができる。プローブまたはターゲットによって放射された蛍光を台無しにしないために、ITOのような透明な合金を使用して回路と電極のセットが生成されてもよい。核酸に対する蛍光による検出に関しては、発色団によってターゲットを標識で示す代わりに、核酸に対する蛍光挿入剤が使用されることもできる。アクリジン、とくに、それが一本鎖のDNAまたは二本鎖のDNA/DNAと関連しているときに異なった方法で蛍光を発生する特徴を有するアクリジンオレンジはよい候補である。さらに、アクリジンオレンジは、正に帯電しており、これは、それが電界中において移動できることを意味する。各スポットにおけるプローブの密度は、アクリジンオレンジで標識を与えて放射された蛍光を測定することにより決定され、また、与えられる種々の電界により、DNAプローブに結合されていないアクリジンオレンジ分子が除去されることが可能になる。

10

20

30

40

50

電界を供給するシーケンスは上記の“h a”の章において説明したものに類似しているが、しかし電界の方向は、放電される分子の電荷に適合される。ターゲットがアレイ中に導入されると、DNA/DNA複合体の形成に関連した蛍光を測定することにより、それをプローブの蛍光と比較することによって各ターゲットタイプの濃度が決定されることが可能になる。この方法は、動的なハイブリッド化測定が行なわれることを可能にすると共に、解離定数(k_d)および結合定数(k_a)がターゲットとプローブとの間で決定されることを可能にする。ターゲットに対して測定されたk_dおよびk_aは、天然のシーケンスに対して得られた測定値と比較されることができ、これは、多形性が証明される可能性があることを意味する。さらに一般的に述べると、混合測定を行うことにより、たとえば、発色団と共にターゲットに対して挿入剤と蛍光マーカを使用するか、あるいはインピーダンス測定および挿入剤を使用する等によりターゲットに対するプローブの誤った対を証明することができる。

10

【0109】

とくに、本発明の装置において使用される検出器は質量分光計である。質量分光計は、ターゲット分子の数と、これらの分子の性質(分子量および、定まった条件下におけるこれらの分子式)とを同時にオペレータに知らせることができる。その装置は、たとえば、質量分光計の電子スプレーイオン化(ESI)(Kearle et al, Anal Chem;1993;65(22); p972-986)に隣接した下方横断チャンネルを備えていてもよい。下方横断チャンネルは、電子スプレー中への規則的な注入を可能にする圧電またはサーマルピペットを介して検出器に接続されていることが好ましい。マイクロスプレー(マイクロESI)、ナノスプレー(ナノESI)、ピコスプレー(ピコESI)のようなESIに対する任意の改良が適合されることができ(Smith et al, T Matsio et al, Editors 1995, John Wiley&Son: Baffins Lane, Chichester, W Sussex, UK, p41-74; Emmett et al, J Am Soc, Mass Spectrom 1994, 5, p605-613; Valaskovic et al, Anal Chem, 1995, 67(20), p3802-3805)。直交加速飛行時間または四重極解析装置(aoTOFまたはQTOF)(Chernushevich et al, Proceedings of the 43rd ASMS Conference on MS and Allied Topics, 1995, Atlanta, Georgia; Sanzone G-Rev Sci Instrum, 1970, 41(5)p741)のような別のタイプの検出器が本発明の装置において使用されてもよい。

20

【0110】

分子イオンの質量および電荷ならびに分子イオンの数に関するデータは、所定のマイクロカラム中に特有に保持されている各タイプの分子ターゲットの性質および数が推測されることを可能にする。各マイクロカラムにおいてプローブに特有にリンクされた分子に対する式は、とくに、MS/MS方法を使用するスペクトル捕捉期間中におけるターゲットの特有の標識付けおよび分子の分解により推測されることができ(Chernushevich et al-Proceedings of the 43rd ASMA conference on MS and allied topics, 1995, Atlanta, Georgia)。特定の実施形態において、蛍光解析を可能にする水晶毛管と電子スプレーを縦列に取付けることによる共同方式の蛍光検出および質量分光法もまた考えられる。同様に、複数の異なるタイプの検出器または解析装置が縦続的に取付けられることができる。

30

【0111】

本発明の装置の特定の実施形態においては、種々のサンプルの種々のトランスクリプトム(transcriptome)を並列に解析することができる。

40

【0112】

この装置の特定の実施形態では、その装置は、1つのトランスクリプトムを表す1組の核酸により構成された核酸(セル中に、または粒子上に固定された)を含んでいる。

【0113】

“1つのトランスクリプトムを表す”という用語は、セル中に固定された核酸が同じまたは相補的な配列を有しているか、あるいは厳しい条件下においてメッセンジャーRNAと特有にハイブリッド化し、また、1つの所定の細胞または細胞セットのゲノムからの核酸配列の転写生成物が、前記細胞または細胞セットに関する特定の条件下で得られた転写生成物と等量であることを意味する。

50

【0114】

以下の例で、1つのトランスクリプトムを表す核酸を処理する方法を説明する。

1つのトランスクリプトムを表す核酸のセットは粒子上に固定され、前記粒子は適切な手段によってマイクロカラム中に固定されることが好ましい。以下の例3において説明する方法を使用することにより、装置は種々のトランスクリプトムを並列に解析することができる。

【0115】

とくに、本発明では、1つのトランスクリプトムを表す1組の固定された核酸を本質的に含んでいる粒子が考慮されている。

【0116】

それはまた、例3において規定された基準にしたがって選択された1組の核酸分子に関する。この核酸分子のセットは、とくに、トランスクリプトムを表す核酸のセットを各マイクロカラム中に含んでいるマイクロカラムアレイにより使用される。

【0117】

別の実施形態においては、本発明の装置は、分子プローブがペプチドまたはポリペプチドであり、好ましくは抗体またはそれらの抗原-結合断片であることを特徴とする。

【0118】

当然ながら、本発明では、装置を使用して、生物学的サンプル、とくに、細胞抽出物に含まれている特定のRNAおよび、またはDNA分子を検出し、および、または分析することが考えられており、分子プローブは、それらが生物学的サンプル中に含まれているRNAまたはDNAの1つのタイプと特有にハイブリッド化するように選択される。このような装置の使用は、とくに、少なくとも2つの生物学的サンプル中に含まれている特定のRNAおよび、またはDNA分子の比較解析を、たとえば、例4において説明される方法を使用して可能にすることができる。

【0119】

たとえばエキソン当り1つの特定のプローブを選択するように遺伝子当りいくつかのプローブを適切に選択することにより、プローブは定量化されて1つの遺伝子のスプライシングの特定のシグナチャを提供することができる。

【0120】

本発明はまた、複合体混合物中に溶解している分子ターゲットを分離し、解析する方法に関し、その方法は、

(a) 分離される分子ターゲットを含む複合体混合物を上記された本発明による装置中に導入し、

(b) ターゲットがマイクロカラムのプローブに特定して結合することを可能にするのに適した条件下において装置のマイクロカラムマトリックスを通して複合体混合物を移動させ、

(c) マイクロカラムプローブ上に特有に保持されているターゲットを溶離し、

(d) マイクロカラムから溶離されたターゲットを検出器に向かって移動させ、

(e) 検出器を使用して各ターゲットを再生し、および、または解析するステップを含んでいる。

【0121】

特定の実施形態において、本発明は、2つの生物学的サンプル中に含まれている特定のDNAまたはRNA分子の少なくとも2つのポピュレーションの比較解析のための方法に関し、その方法は、

(a) 第1のサンプル中に含まれている標識付けされたDNAまたはRNA分子を、第2のサンプル中に含まれていて同じ構造を有するが標識付けされていないDNAまたはRNA分子に対して質量差を与えるために、たとえば、重い同位体等を有する第1のサンプルから得られたDNAまたはRNA分子に標識を付け、

(b) 比較される2つのDNAまたはRNAポピュレーションを等モルで混合し、

(c) 質量分光計により構成された検出器を備えた本発明の適切な装置中に等モルの混

10

20

30

40

50

合物を導入し、

(d) マイクロカラムプローブへのターゲットの特有の結合を可能にするのに適切な条件下で装置のマイクロカラムマトリックスを通してその等モルの混合物を移動させ、

(e) マイクロカラムのプローブ上に特有に保持されているターゲットを溶離し、

(f) マイクロカラムから溶離されたターゲットを質量分光計に向けて移動させ、

(g) 質量分光計を使用して標識を付けられた、あるいは標識を付けられていない各ターゲットを検出し、および、または分析するステップを含んでいる。

【0122】

この方法の特定の形態では、それを行なうために選択された装置は、とくに、マイクロカラムの各行での溶離および、または溶離されたターゲットの移動を制御するために上述した行電極の対により構成されている。この場合、方法の好ましい形態は、

(a) 分離されるDNAおよび、またはRNA分子を含む複合体混合物を本発明の適切なマイクロカラム装置中に導入し、

(b) 好ましくは閉回路中において、マイクロカラムのプローブへのターゲットの特有の結合を可能にするのに適切な条件下において装置のマイクロカラムマトリックスを通してその複合体混合物を移動させ、

(c) 適切ならば、開回路においてハイブリッド化されていない分子または特有にはハイブリッド化されていない分子を除去するためにマイクロカラムマトリックスを通して濯ぎ溶液を移動させ、

(d) セル電極では正であり、遠位置電極では負であるマイクロカラムの行電極の対の間に電位差を与え、また、下方横断チャンネルでは負であり、上方横断チャンネルでは正である横断チャンネル電極の対の間に電位差を与えてステップ(e)における変性後にDNAまたはRNA分子が各マイクロカラム中に保持されるようにし、

(e) プローブ/ターゲット複合体の変性を可能にし、したがってDNAまたはRNA分子の溶離を可能にするような条件下においてマイクロカラムマトリックスの1以上の行を通して変性溶液を移動させ、

(f) マトリックスのマイクロカラムの1つの行の行電極対に与えられる電位差を反転させ、あるいは抑制し、

(g) マトリックスの1つの行のマイクロカラムから変性されたターゲットを検出器に向けて移動させ、

(h) 検出器を使用して各ターゲットを再生し、および、または解析するステップを含んでいる。

【0123】

上述の方法に代わる好ましい別の実施形態は、分子ターゲットを変性して移動させるステップが1つの電界だけを使用して行なわれることを可能にする。このような方法は、

(a) 分離されるDNAおよび、またはRNA分子を含む複合体混合物を本発明による適切な装置中に導入し、

(b) 好ましくは閉回路中において、必要ならば、上述した横断チャンネルの電極と連続した行電極との間の交流電界の影響の下に、マイクロカラムプローブへのターゲットの特有の結合を可能にするのに適した条件下において装置のマイクロカラムマトリックスを通してその複合体混合物を移動させ、

(c) 必要ならば、開回路においてハイブリッド化されていない分子または特有にはハイブリッド化されていない分子を除去するためにマイクロカラムマトリックスを通して濯ぎ溶液を移動させ、

(d) 電界中で移動することのできる負イオンを含む変性溶液を含む第1の容器に下方横断チャンネルを接続し、同じ負イオンを含む変性溶液を含む第2の容器に上方横断チャンネルを接続し、

(e) 溶液の負イオンが正に帯電したマイクロカラムに向けて移動して分子ターゲットを変性させるように、下方および上方横断チャンネルならびに遠位置の行電極に負の電位を与えると共にセル行電極に正の電位を与え、このように変性された分子ターゲットは遠

10

20

30

40

50

位置行電極における負の電位のためにマイクロカラム中に固定され、

(f) 上方横断チャンネルでは負であり、下方の第2の横断チャンネルでは正であるように横断チャンネル電極の対の間に電位差を与え、

(g) 変性されたターゲットが電気泳動によってマトリックスの1つの行のマイクロカラムから検出器に向かって移動することを可能にするようにマトリックスの1つのマイクロカラム行の行電極対に与えられる電位差を反転させ、あるいは抑制し、

(h) 検出器を使用して各ターゲットを再生し、および、または解析するステップを含んでいることを特徴とする。

【0124】

本発明はまた、

(a) 各マイクロカラムが1つのトランスクリプトムを表す割合でRNAまたはDNAターゲットを含んでいる本発明の装置を構成し、

(b) マトリックスの各マイクロカラム中に固定されたRNAまたはDNAターゲットに特有で相補的なプローブの化学量論的な混合物を導入し、1つのターゲットの各特定のプローブは別のプローブとは異なった分子量を有し、したがって質量分光計において他のものから区別可能であり、

(c) マイクロカラム上に固定されたターゲットへのプローブの特定の結合を可能にするのに適した条件下において装置のマイクロカラムマトリックスを通してプローブの混合物を移動させ、

(d) マイクロカラムにおいて固定されたターゲット上に特有に保持されたプローブを溶離し、

(e) マイクロカラムから溶離されたプローブを質量分光計により構成された検出器に向かって移動させ、

(f) 質量分光計を使用して各プローブを解析するステップを含んでいる方法に関する。

【0125】

上記の方法に代わる実施形態として、特定のプローブによって構成されたプローブのセットを使用することが可能であり、1つのターゲットに対する特定のプローブのそれぞれのサイズは他のプローブとは異なっており、および、または特定の蛍光マーカによって標識付けされ、検出は適切な分光光度計を使用してプローブの毛管電気泳動後に行なわれる。

【0126】

本発明はまた、複合体混合物中に含まれている分子ターゲットを分離し、分析する方法に関し、その方法は、

(a) 第1に複合体混合物が移動されることを可能にする毛管のネットワークおよび第2に上述された2組の電極を備えた本発明の装置中に分離されるべき分子ターゲットを含む複合体混合物を導入し、

(b) ターゲットが毛管のネットワークの1つの端部から他方の端部に移動することができるように、またプローブと相補的なターゲットがハイブリッド化されることができるよう本発明の装置の電極の間に電位を与え、

(c) 検出器を使用して1つのプローブに対するハイブリッド化された各ターゲットを解析するステップによって後続される本来の位置での解析または再生を行うステップを含んでいる。

この方法の実施形態は、実施例および図面に示されている。

【0127】

本発明はまた、

(a) 解析される1つのトランスクリプトムを表すターゲットのセットが固定される1組の磁気粒子と、

(b) プローブのセットの各プローブタイプが前記ターゲットと化学量論的な混合物を形成するように1つのターゲットタイプに特有であって相補的である1組の異なるタイプ

10

20

30

40

50

のプローブとを使用するステップを含んでいるトランスクリプトムを解析する方法に関する。

【0128】

本発明はまた、プローブのセットの各プローブタイプは、化学量論的な混合物を形成するように1つのターゲットタイプに特有であって相補的であることを特徴とするここに規定された方法に関する。

【0129】

本発明はまた、混合物中に存在する各プローブタイプがその分子質量によって明確な方法で識別可能であり、それは実験式、サイズ、および重い原子による任意の標識付けの3つの基準を組合せることによって行われることを特徴とする上述の方法に関する。

10

【0130】

本発明はまた、混合物中に存在する各プローブタイプがそのサイズおよび蛍光マーカによって明確な方法で規定されることを特徴とする上述の方法に関する。

【0131】

ここに記載されているトランスクリプトム解析方法は、プロテオーム (proteome) の解析、あるいは患者体内における1以上の遺伝子の増加または損失の解析適用されてもよい。これらの別の解析においても、所望のターゲットを表すプローブが決定され、プローブのセットの各プローブタイプが別のプローブタイプに関して明確な方法で識別可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0132】

以下の例には本発明の装置の好ましい実施形態が示され、これによってそれらの使用がさらによく認識されるが、これらの実施形態によって本発明の技術的範囲が制限されるものではない。

【0133】

図面について簡単に説明すると、図1の(a)は適切な材料中にモールドされたマイクロカラムのN個の行とP個の列のマトリックス1の上面図であり、図1の(b)は中間行電極21と遠い行電極22とを介して接続されたマイクロカラムの1つの行の斜視図である。

【0134】

図2はマイクロカラム2のマトリックスと、ピストン6を備えた上方横断チャンネル31に接続された上方毛管ネットワーク3と、下方横断チャンネル41および検出器5に接続された毛管の下方ネットワーク4とを備えた装置の概略図であり、装置はハイブリッド化および、または濯ぎステップ期間中の流れの動きを容易にするために別の横断チャンネル7を備えている。

30

【0135】

図3は下方チャンネル電極42と、圧電ピペット43と、電気スプレー44と、検出器とを備えた下方横断チャンネル41の接続の詳細図である。

【0136】

図4はピストンを備えた装置を使用して負に帯電した分子ターゲットを変性させるステップ期間中の電極の極性を表す概略図を示している。金属ピストン6は負に帯電した電極で被覆されている。変性溶液は上方横断チャンネル31の自由端部中に導入され、矢印が流動方向を示している。電極はマイクロカラム(+)では正であり、マイクロカラム出力部(-)では負である。

40

【0137】

図5は、第1の行からの分子ターゲットの移動ステップ期間中の電極の極性を示している。第1の行の電極における電位の差は除かれる。下方横断チャンネル41はゲルを充填されている。装置はまた別の横断チャンネル7を備えている。

【0138】

図6は、電界中で移動することのできるカオトロピックな薬品を含む緩衝液を変性させる容器8を使用して装置中に充填された分子ターゲットを変性させるステップを示してい

50

る。

【0139】

図7は、プローブを設置された1組のさらに機能的にされた電極の一例を示している。金またはITO電極がガラスシート上にエッチングされる。プローブ(スポットまたはハイブリッド化ユニット)は場合に応じて電極上に、あるいは電極の間に付着されている。この方法では、電極上への付着の使用だけを説明する。

【0140】

図8は、行電極の対のアセンブリを示している。この行電極対は2つのシートを配置することによって得られ、電極は向かい合わせになるようにエッチングされている。シートの1つはさらに機能的にされ、他方は機能的にされていない。

10

【0141】

図9は、機能的にされた電極と機能的にされていない電極の2つのセットの間に配置された毛管のネットワークを示している。

【0142】

図10は、湾曲された接続電極と容器電極により完成された1つのセットの機能的にされた電極の概略図を示している。

【0143】

図11は、毛管ネットワークの周囲における機能的にされた電極と機能的にされていない電極の2つのセットを示している。

【0144】

図12は、ターゲットを1つの電極から別の電極に順次移動させ、したがって1つのスポットから別のスポットに順次移動させるために電極に与えられる電荷のシーケンスを示している。

20

【0145】

図13は、底部が機能的にされた電極によって構成されているセミオープンセルを示している。それらは毛管ネットワークの毛管に対して開口されている。これらのセルは拡散によるターゲットの分散を防止する。

【0146】

図14は、単一の毛管ネットワークを備えた装置の変形を示している。第2の容器は、横断チャンネルおよび遅延システムのために除かれている。第2の接続電極Vは直線状である。それは、帯電したターゲットを通さない静電バリアを規定するように機能する。電極Vが横断チャンネルWに関して突出しているとき、遅延効果が増大される。第2の接続電極は、プローブが横断チャンネルにおいて選択的に移動されることを可能にしている。

30

【0147】

図15は、本来の位置におけるSPR検出のための装置を示している。三面体プリズムが機能的にされていない電極の後面に結合されている。

【0148】

図16は、機能的にされていない電極におけるSPR検出に対する原理を示している。

【0149】

- (1) デハイブリッド化されたターゲットは、電界によってその位置に保持される；
- (2) ターゲットはその電界の力によって機能的にされていない電極に移動する；
- (3) SPR検出が行われる；
- (4) 検出を改善するために電流が交互に遮断されてもよい。

40

【0150】

図17は、インピーダンス測定を行うために重ねられた電極の2つの交差したセットを有する装置を示している。

【0151】

図18は、不連続電流のインピーダンス測定のために機能的にされた電極のセットを置換するグリッドを示している。

【0152】

50

図19は、交流インピーダンス測定のために機能的にされた電極のセットを置換するグリッドを示している。

【0153】

例

1. 生物学的サンプル中に含まれるDNAまたはRNA分子を検出する装置の例

1A マイクロカラムマトリックス

マイクロカラムのマトリックス1は、ガラス、シリコンまたはプラスチックタイプの材料に孔が形成され、あるいはモールドされたマイクロカラムのN個の行とP個の列から構成され、マイクロカラムは直径が50 μ mであり、その長さが100 μ mである(図1のa)。セルはアレイの主平面に垂直である。各セルはポリアクリルアミドゲルを充填され、特定の分子プローブは、直径がゲルのメッシュ寸法より大きい粒子上に固定されている。マイクロカラムマトリックスの各行のセルは共通の電極を介して接続されて1つのセル行電極21を形成している。この電極はセルに対して中間の金の薄膜によって構成され、その薄膜がそれらをそれぞれ2つの半分のセルに分けている。電極の第2のセットは中間行電極の鏡像である。この中間行電極の鏡像である別の電極セットは、マイクロカラムのマトリックスのセルの出口に配置されており、すなわち、遠い行電極22である。各遠い行電極は中間行電極に平行であり、行電極の対を形成している(図1のb)。これらの電極の対は、所望の電位がセルの各行に与えられることを可能にする。遠い電極は、中間電極と同じ方法で生成される。

【0154】

1B 段階的な毛管ネットワーク

各セルは、セルの平面の上方および下方にそれぞれ配置された毛管の2つの段階的なネットワークに対して2つのチャンネルを介して接続され(図2参照)、毛管の上方ネットワークはN個の平行な毛管(上方毛管)3によって構成され、その下方ネットワークは、P個の平行な毛管(下方毛管)4によって構成され、このN/P配置は2つの毛管ステージの間で逆にされてもよいことが明らかである。上方ネットワークの1つの毛管はマイクロカラムマトリックスの1つの行のP個のセルに接続され、あるいは下方ネットワークのそれぞれ同じ毛管がマイクロカラムマトリックスの1つの列のN個のセルに接続される。接続は、上方および下方毛管の2つのネットワークの向きが垂直になるように、上述の接続チャンネルによって生成される。この理由のために、上方ネットワークの各毛管は、マイクロカラムマトリックスのP個のセルの1つの行によって下方ネットワークの全ての毛管と接続されている。対照的に、下方ネットワークの各毛管は、マイクロカラムマトリックスのN個のセルの1つの列によって上方ネットワークの全ての毛管に接続されている。

【0155】

毛管の直径は1乃至100 μ mである。上方ネットワークの全ての毛管は、2乃至1000 μ mの範囲の直径を有する横断毛管31(上方横断チャンネル)に連通している。したがって、上方横断チャンネルは上方ネットワークの全ての毛管を接続する。それは上方ネットワークの方向に対して垂直である。上方ネットワークの横断チャンネルと反対側の毛管の端部は、マイクロカラムマトリックスのセル行のP番目の最後のセルとの最後の接続で止まっている。下方ネットワークの全ての毛管は、2乃至1000 μ mの範囲の直径を有する横断毛管41(下方横断チャンネル)に連通している。したがって、下方横断チャンネルは下方ネットワークの全ての毛管を接続されている。下方ネットワークの毛管は、1つのセル列の第1のセルとの接続と下方横断チャンネルとの間の軌道が1つの下方毛管から別のものまでの異なった長さを有するように生成される。下方ネットワークの1つの毛管のこの部分は遅延と呼ばれる。この遅延は、下方毛管ネットワークと90°以外の角度をなす下方横断チャンネルを使用して得られる。選択された角度に応じて、下方毛管の間で遅延が連続的に増加し、あるいは減少する。

【0156】

横断チャンネルと反対側の毛管の下方ネットワークの毛管の端部は別の横断チャンネル7(別の下方横断チャンネル)に接続され、それによって2つの下方および上方毛管ネッ

10

20

30

40

50

トワークの間におけるセルマトリックスを通る流れが設定されることが可能になる。主下方横断チャンネルは、毛管の電気泳動をそこで生じさせるために液体毛管電気泳動ゲルを充填されている。したがって、上方横断チャンネルと別の第2の下方横断チャンネルとの間に閉じた循環した流れを設定することが可能である（図2）。

【0157】

上方および下方横断チャンネルには電極が配置されている。

【0158】

上方横断チャンネルは、筋がつけられてよいし、あるいはつけられなくてもよいピストン6を備え、このピストン6は、その流れが通過するセルの行の数が選択されることを可能にする。このピストンは、それが引き戻されると、マイクロカラムのセルのさらに多くの行に移動できるようにする。

10

【0159】

1C 検出器

下方横断チャンネルからの出口における分子の検出は、質量分光計5を使用して行われる。

【0160】

下方横断チャンネルは、質量分光計の電子スプレーイオン化検出器（ESI）44に隣接している（図3）。それは、電子スプレー中への規則的な注入を可能にする圧電またはサーマルピペット43を介して検出器に接続されている。

【0161】

20

2. 実施例2、ピストンのない装置

以下の例は、生物学的サンプル中に含まれている核酸分子を分離して解析するように構成された本発明の装置の別の実施形態を示しており、この実施形態は、電界を使用することによりマイクロカラム中に保持されている分子ターゲットの変性を可能にすると共にそれらが検出器だけに移動することを可能にする。

【0162】

マイクロカラムマトリックスおよび毛管ネットワークは、以下の例外点を除いて実質的に例1と同じである：すなわち、

装置はその上方横断チャンネルにピストンを備えていない。その代り、水酸化アンモニウム塩（ NH_4OH ）を含む緩衝液容器を変性させるために下方横断チャンネルおよび上

30

【0163】

3. 実施例3、トランスクリプトムを表す核酸のセットを含むマイクロカラムのプレパレーションの処理およびトランスクリプトムの解析におけるその使用

実施例1または2に示されているような本発明の装置の各マイクロカラムは、解析されるトランスクリプトムを表すその核酸セット（DNA、RNAまたはオリゴヌクレオチド等）が固定されたサポートまたは粒子を含んでいる。

【0164】

長いポリAテールの存在を回避するために、解析されるメッセンジャーRNAサンプルの逆転写が5' (T)₁₉X3'のようなプライマーから行われ、ここでXはA、CまたはGであることができる。したがって、逆転写はそのポリAテールの後に遭遇されるAではない最初のヌクレオチドから行われる。

40

【0165】

1つのサポートまたは1つの粒子上に固定されたゲノムを表すcDNAサンプルを獲得するために、上述したプライマーは、逆転写の前に、最初に前記サポートまたは前記粒子上に固定される。逆転写の生成物はまた逆転写の後にサポート上にグラフトされることができる。グラフトは5'末端部でビオチン標識（biotinylate）された5' (T)₁₉X3'プライマーを使用してビオチン-アビジン対によって確実なものにされることができる（粒子とターゲットとの間において化学的錯化を使用することも可能である）。

50

【 0 1 6 6 】

本発明は、複合体混合物中の溶液中の複数の分子ターゲットを分離し、および、または検出する装置に関し、その装置は、解析されるトランスクリプトムを表すターゲットが全て固定される1組の磁気粒子と、1組のプローブとを備えている。

【 0 1 6 7 】

このプローブセットの各プローブタイプは、化学量論的な混合物を形成するようにターゲットタイプに固有であると共に相補的なものである。

【 0 1 6 8 】

したがって、1つのゲノムを表すcDNAの全てを含むこれらの粒子またはサポートは、本発明の装置のマイクロカラム中に配置される。このようにして、マイクロカラムアレイが得られ、その各マイクロカラムは以下の方法を使用して1つのトランスクリプトムを解析することができる：

装置は、その混合物を構成する各プローブタイプが、化学量論的な混合物を形成するようにマイクロカラムにおいて固定されたそのターゲットタイプからの1つのものであるただ1つのターゲットタイプに特定されると共に相補的なものである1組のプローブにより使用される。

【 0 1 6 9 】

したがって、混合物中に存在する各プローブタイプは、その分子質量によって明確な方法で識別可能である。この分子質量の特定性は、実験式、サイズおよび重い原子による任意の標識の3つの基準を組合せることによって得られる。これら3つの基準の組合せは、膨大な数のプローブが生成されることを可能にする。 $M = n + m + l + j$ であるようなDNAポリマーサイズMでは、実験式に対して以下の数を生成することができる：

$$(A_n C_m T_l G_j) \text{ the } (n + m + l + j) ! / (n ! * m ! * l ! * j !)$$

【 0 1 7 0 】

相補的なプローブは、サポートまたは粒子上に保持されたターゲット分子に固有にハイブリッド化する。これが分離ステップである。システムが濯がれ、ハイブリッド化されていないプローブが除去されると、サポートまたは粒子においてハイブリッド化されたプローブ分子は、制御されたやり方で変性される。その後、固定されたターゲットを含むサポートまたは粒子上のハイブリッド化されたプローブ分子の各タイプの量を計ることができる。

【 0 1 7 1 】

不特定ハイブリッド化を最小にするために、その配列は、XがA、T、GまたはCを表し、nが3個のヌクレオチドから7個のヌクレオチドまで変化してn個のヌクレオチドの全ての可能な配列を形成する小さいヌクレオチドポリマー(X)nの存在においてハイブリッド化される。

【 0 1 7 2 】

この方法はまた、プロテオムの研究に関連した蛋白質に適用されてもよい。研究される蛋白質の混合物はサポートまたは粒子に固定される。ターゲットは、抗体または任意の別の特定の配位子によって構成されている。各プローブタイプの分子質量はそれらの識別を明確な方法で可能にする。

【 0 1 7 3 】

同じ分子質量を有するプローブの異なったタイプの間での区別ができないことを避けるために、プローブは、プローブの分子質量を修正する不活性分子と結合されてもよい。区別度および検出度をさらに高めるために、質量分光計への注入前に毛管クロマトグラフィーが行われる。この毛管クロマトグラフィーは、プローブがサイズにしたがって分離されることを可能にする。質量分光計および毛管電気泳動は圧電ピペットにより結合される。

【 0 1 7 4 】

上記とは別の実施形態は、蛍光マーカを使用してプローブを弁別するように構成されている。各プローブタイプは、そのサイズおよび蛍光マーカによって明確な方法で規定される。これら2つの基準の組合せは、5つの異なった蛍光マーカを、たとえば、そのサイズ

10

20

30

40

50

0乃至100bp)により構成されたプローブが同じサイズを有するターゲットに対するハイブリッド化効果を容易にするためである。

【0182】

ハイブリッド化が行われると、回路は開かれ、ハイブリッド化されていない分子または固有にハイブリッド化されていない分子を除去する溶液でよく濯がれる(濯ぎステップ)。

【0183】

その後、システムは質量分光計の電子スプレーに結合され、中間レベルでは正であり、遠位置レベルでは負であるマトリックスマイクロカラムの行電極の対の間に電位差が設定される。同様に、上方横断チャンネルでは負であり、下方横断チャンネルでは正である横断チャンネルの電極における電位差が設定される。電極の極性のために、ハイブリッド化された分子は各ハイブリッド化セル中に維持される。上方および下方の2つのネットワークの間においてマトリックスマイクロカラムの第1の行のマイクロカラムを介してのみ循環が行われるように、ピストンが配置される(図4)。その後、抵抗(たとえば、上方横断チャンネルに配置された)により温度が制御されている変性溶液は層流として注入され、下方転写チャンネルに最も近い第1の行のマイクロカラムを通して拡散し、ピストンがマイクロカラムの他の行へアクセスすることを阻止する。変性剤はプローブ-ターゲット複合体を変性させる。電界は、ターゲットがセルの外部に拡散するのを阻止する。

【0184】

温度変性もまた代替手段として考えられる。各マイクロカラム中の緩衝液の温度を増加させることにより、固定されたプローブとターゲットとの間に形成された重複部位(duplex)の変性が発生し、プローブがマトリックス上に固定されたままの状態である期間中にターゲットは溶液中を通過する。

【0185】

その後、第1の行の電極対の間の電界は反転され、あるいは単に遮断される。横断チャンネルの電極対の間の電位差は維持される(図5)。その後、第1の行の各マイクロカラムのターゲットは下方ネットワークの対応した毛管中に流れる。プローブは、電気泳動によってこれらの毛管を通して下方横断チャンネルに移送または移動される。種々のマイクロカラムからのターゲットは、下方ネットワークの毛管の各遅延の関数として異なった時間に下方横断チャンネルに到達する。実際に、種々のターゲットは解析のために異なった時間に下方横断チャンネルに結合された検出器(電子スプレー)の毛管に到達する。種々のマイクロカラムからのターゲットの間に混合物が存在しないように、一般に、非常に遅い層流を使用して動作させる必要がある。マイクロカラム当たりいくつかのプローブを使用することにより、遺伝子のスプライシング形の全てが決定されることが可能になる。

【0186】

5.例5:RNAサンプルを解析するための例2で説明されたマイクロカラムアレイの使用

以下の方法において、液体はターゲットを変性させてそれらを質量分光計に向って移動させるために毛管中を循環されない。

【0187】

この方法において、例2に示されている装置が使用される。ハイブリッド化および濯ぎステップの動作は、例4において説明されているものと同じである。ハイブリッド化および濯ぎの後、上方横断チャンネルは、緩衝液電界において移動することのできるカオトロピック(chao-tropic)薬品を含む緩衝液容器に接続され、下方横断チャンネルは、同じ緩衝液を含む第2の容器に接続される。上方および下方横断チャンネルの電極ならびに遠位置行電極は、正の電位に維持される中間行電極に関して負の電位に維持される。陽極および陰極へのイオンおよびカオトロピック薬品の移動は、緩衝液のpHならびに電位差によってプローブターゲット生物ポリマー複合体の変性を生じさせる(図6)。

【0188】

プローブは、マトリックスとの強い結合のためにその上に固定されたままである。負に帯電した自由ターゲットはまた、正に帯電した中間行電極のレベルのままである。プローブ/ターゲット複合体が変性されると、横断チャンネルの電極では電位差が生じ、上方横断チャンネルの電極に対しては負であり、下方チャンネルの電極に対しては正であり、電位は中間電極に対しては正に維持され、遠位置の電極に対しては負に維持される。したがって、ターゲットは各マイクロカラムにおいて静電室中に閉じ込められ、移動が阻止される。

【0189】

マイクロカラムマトリックスの行電極の間の電位差は行単位で取除かれ、電気泳動によって対応した下方ネットワークの毛管中への各行のターゲットの連続的な移動を生じさせる。ターゲットは、それらの毛管の各軌道距離の関数として下方横断チャンネルに移動する。解析は下方横断チャンネルの出口において行われる。

10

【0190】

6. 例6：各マイクロカラムにおいて分離され、隔離された生物ポリマーのマイクロシーケンシング

本発明の方法は、質量分光計において分離されて解析された核酸または蛋白質ターゲットが順次配列されることを可能にする。

【0191】

マイクロシーケンシングは、核酸配列においてランダムな分裂を行い、その後結果的に得られた生成物を質量分光計によって識別することからなる。ランダムな分裂は化学的なもの、物理的なもの、機械的なものまたは酵素によるものであってよい。一例として、酵素分裂は、マイクロカラム中に固定された酵素によって構成された酵素混合物の作用によって行われることができ、前記マイクロカラムは、たとえば、検出毛管と下方横断チャンネルとの間に配置される。生物ポリマーがこのマイクロカラムを横断したとき、それらは部分的に劣化される。劣化生成物を解析することにより、配列が推測されることができる。核酸に対するエクソヌクラーゼまたは蛋白質に対するエクソペプチダーゼのような酵素は、たとえば、これらの生物ポリマーにおいてランダムな分裂を生じさせることができる。核酸に対してエンドヌクラーゼを使用し、蛋白質に対してエンドペプチダーゼを使用することによって、部分的な消化が可能になる。前記作用の生成物を解析することにより、各マイクロカラム中に固有に保持された生物ポリマーの配列が生成されることができる。化学的分裂は、酸、塩基または任意の他の化学生成物を使用する生物ポリマーの制御された化学的劣化によって達成される。

20

30

【0192】

機械的劣化は、たとえば、生物ポリマーを分裂 (segment) させることのできる超音波、マイクロ波またはマイクロ周波数を使用して行われる。最後に、物理的分解は、電子流によって、あるいは生物ポリマーと相互作用する重い原子による衝撃によって行われることができる。これらの処理は、生物ポリマーが核酸では磷酸塩結合の破壊のような、また、蛋白質ではペプチド結合の破壊のような予測可能な組合せに分裂されることを可能にする。この処理は、分子当たり1つのランダム分裂だけを統計学的に導くように行われるであろう。生物ポリマーの配列を決定するために、それらの末端部の少なくとも1つにおいて利用可能なマーカを有している必要がある。このマーカを含む得られた分解イオンの全ての研究は、配列が確立されることを可能にする。末端部マーカは生物ポリマー中にもともと自然に存在しているか、あるいはそれは人工的に導入される。一例として、mRNAの3'末端部はポリAテールを系統的に含んでいる。このポリAテールは、末端部マーカとして作用することができる。cDNAは、XがA、CまたはGであってもよい5' (T)₁₉X3'のようなプライマーによる逆転写によって得られる。したがって、逆転写は、そのポリAテールの後に遭遇されるA以外である最初のヌクレオチドから行われる。何等かの分解生成物との混乱を回避するために、5' (T)₁₉X3'プライマーはその分子の残留物に対して使用されることのできるものとは異なる重い原子で標識を与えられる。マーカの正確な質量を知ることにより、分裂生成物からその配列中の残留物の連続が容

40

50

易に推測される。蛋白質の場合、フェニルイソチオシアネート、1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンまたは塩化ダンシルのような化合物によりNターミナル末端部に標識を設けることにより、配列が決定されることが可能になる。この方法の分解能を増加させるために生物ポリマーの両端部に二重に標識を付けることもできる。複雑な場合には、MSMS方法によって、分子イオンは解析されて、多重結合の蛋白質の場合のように別の第2のステップにおいて選択されることが可能になる。最後に、MSMS方法により可能にされるように、連続的な分解生成物を直接解析することによって生物ポリマーの配列を決定することが可能であり、その配列の末端部マーカは、たとえば、蛋白質に対してはNターミナルおよびCターミナル末端部を使用して決定される。

【0193】

7. ポリペプチドの混合物を解析するためのマイクロカラムアレイの使用

装置は、例1または2で説明された方法に類似した方法で生成される。マトリックスの各マイクロカラムは、1つのタイプのポリペプチドに特有の抗体で充填される。抗体は、本来のまたは変性された蛋白質に固有である。抗体はセルの壁に、あるいは各セル中に保持された粒子に直接固定される。核酸に対するように、ピロール分子に結合された抗体を使用することができる。核酸に対して説明されたピロールに結合されたプローブに対して適用された方法は全て、ピロールに結合された抗体に対して適用可能である。ポリペプチドの細胞抽出物は、マイクロカラムネットワークを有する閉回路を生成することによって複合化される。これによって、各マイクロカラム中において特有の抗原/抗体複合体が形成されることが可能になる。各マイクロカラム中に保持されたポリペプチドを溶離するために、蛋白質がそれらのサイズの関数としてのみ移動することを可能にする緩衝液を使用することが必要である。これらの緩衝液はまた、抗原/抗体複合体を破壊する。したがって、全ての蛋白質がそれらの等電点に関係なく正の極に向かって移動することを可能にするSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)に基づいた緩衝液を挙げることができる。

【0194】

図中の符号の説明

図面における参照符号は以下のように規定されている：

- A = 湾曲した接続電極(たとえば、透明なITO電極を有するガラスシート)
- B = 機能的にされた行電極(たとえば、透明なITO電極を有するガラスシート)
- C = 容器電極(たとえば、透明なITO電極を有するガラスシート)
- D = 底部または上部のない(たとえば、カプトン中にホローされた)毛管
- E = 底部はないが上部を備えた(たとえば、カプトン中に穴をあけられた)毛管：中間平面
- F = 底部または上部のない(たとえば、カプトン中に穴をあけられた)容器：中間平面
- G = 機能的でない行電極(たとえば、透明なITO電極を有するガラスシート)
- H = ハイブリッド化されていないターゲット
- I = 機能的にされた行電極
- J = 機能的にされていない行電極
- K = プローブのスポット：ハイブリッド化ユニット
- L = プリズム
- M = 水平ゲート電極
- N = 垂直ソース電極
- O = スポット電極
- P = ゲート
- Q = ソース
- R = ドレイン
- T = 底部または上部を有しないセル
- S = 電流の移動方向
- U = 遅延を有する毛管ネットワーク
- V = 解析用の接続行電極

10

20

30

40

50

W = 第 2 の横断チャンネル

【図面の簡単な説明】

【0195】

【図1】マイクロカラムのN個の行とP個の列のマトリックス1の上面図および中間行電極21と遠い行電極22とを介して接続されたマイクロカラムの1つの行の斜視図。

【図2】マイクロカラムのマトリックスと、上方横断チャンネルに接続された上方毛管ネットワークと、下方横断チャンネル41および検出器5に接続された毛管の下方ネットワークとを備え、また、別の横断チャンネル7を備えている装置の概略図。

【図3】下方横断チャンネルの接続の詳細図。

【図4】負に帯電した分子ターゲットを変性させるステップ期間中の電極の極性を表す概略図。

10

【図5】第1の行からの分子ターゲットの移動ステップ期間中の電極の極性を示す概略図。

【図6】装置中に充填された分子ターゲットを変性させるステップを示す概略図。

【図7】プローブを設置された1組のさらに機能的にされた電極の一例を示す概略図。

【図8】行電極の対のアセンブリを示す概略図。

【図9】電極の2つのセットの間に配置された毛管のネットワークの概略図。

【図10】湾曲接続電極と容器電極により完成された1つのセットの機能的にされた電極の概略図。

【図11】毛管ネットワークの周囲における機能的にされた電極と機能的にされていない電極の2つのセットを示す概略図。

20

【図12】1つのスポットから別のスポットに順次移動させるために電極に与えられる電荷のシーケンスを示す概略図。

【図13】底部が機能的にされた電極によって構成されているセミオープンセルの概略斜視図。

【図14】単一の毛管ネットワークを備えた装置の変形を示す概略図。

【図15】本来の位置におけるSPR検出のための装置の概略図。

【図16】機能的でない電極におけるSPR検出原理を示す概略図。

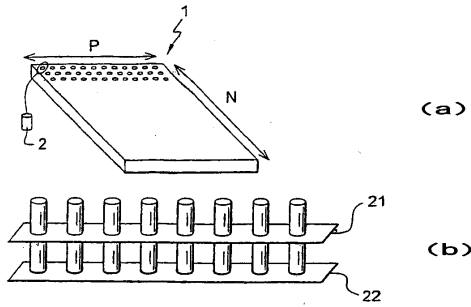
【図17】インピーダンス測定を行うために重ねられた電極の2つの交差したセットを有する装置の概略図。

30

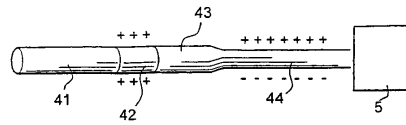
【図18】不連続電流のインピーダンス測定のために機能的にされた電極のセットを置換するグリッドを示す概略図。

【図19】交流インピーダンス測定のために機能的にされた電極のセットを置換するグリッドを示す概略図。

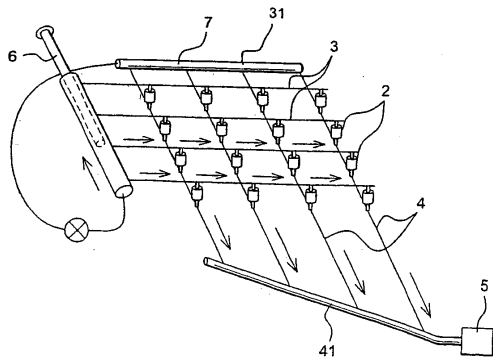
【図1】



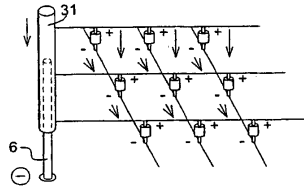
【図3】



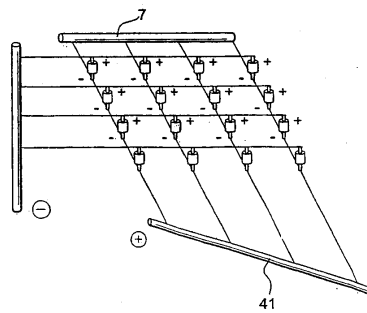
【図2】



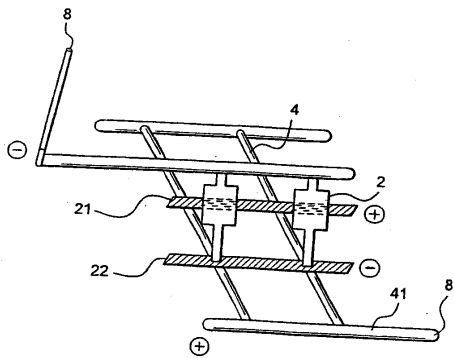
【図4】



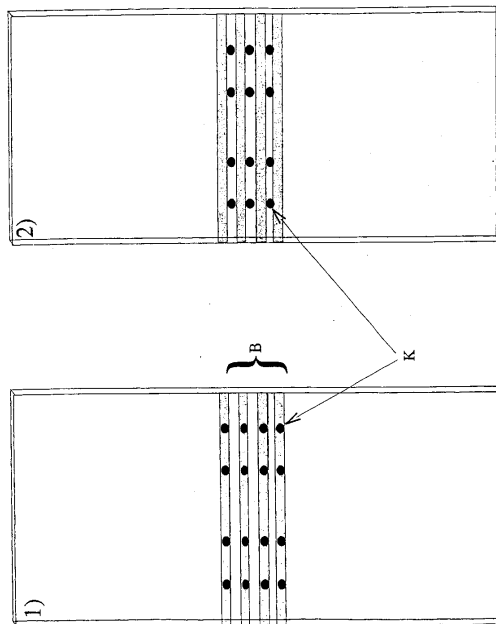
【図5】



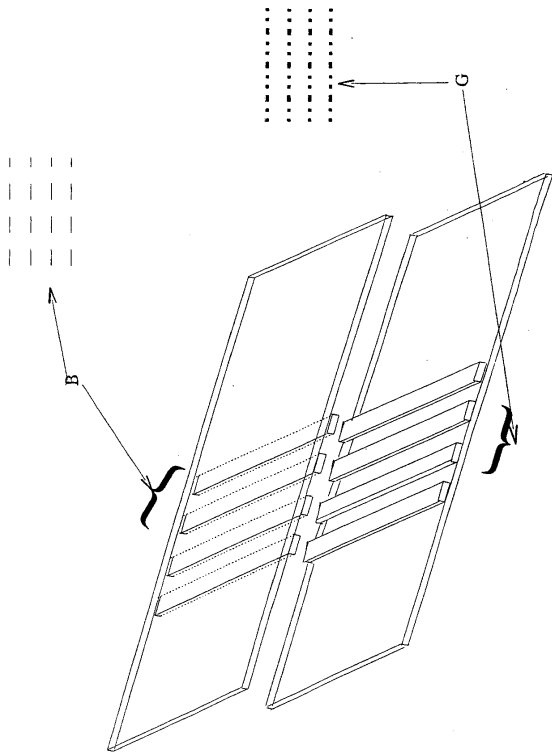
【図6】



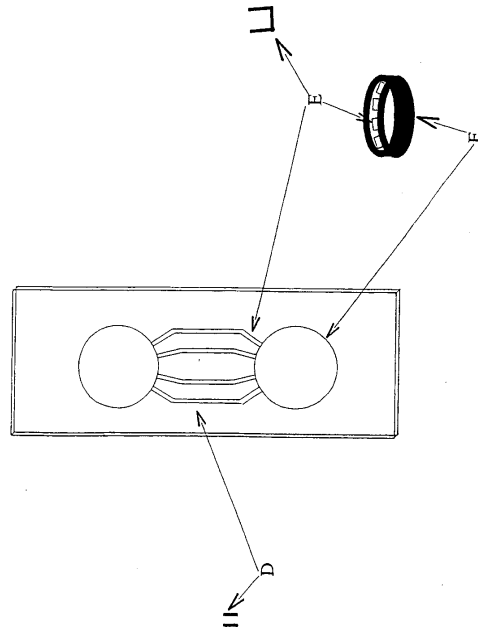
【図7】



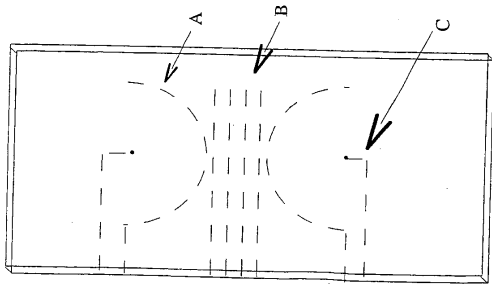
【図 8】



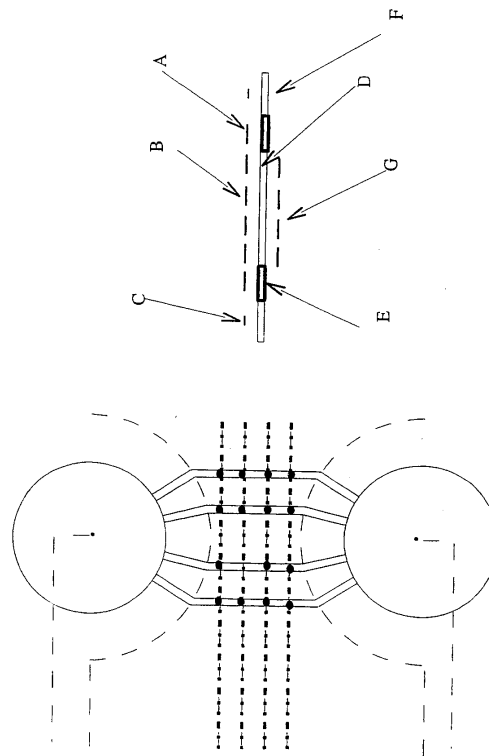
【図 9】



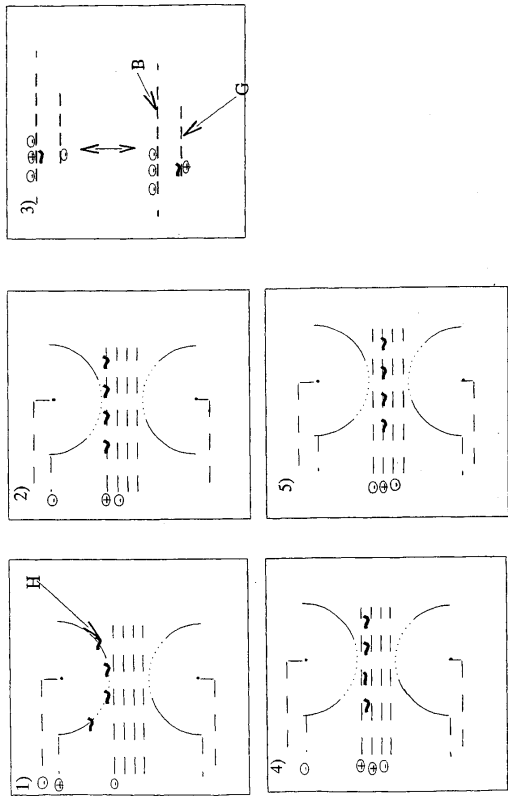
【図 10】



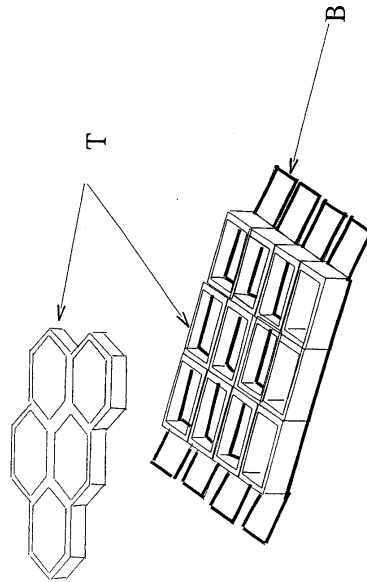
【図 11】



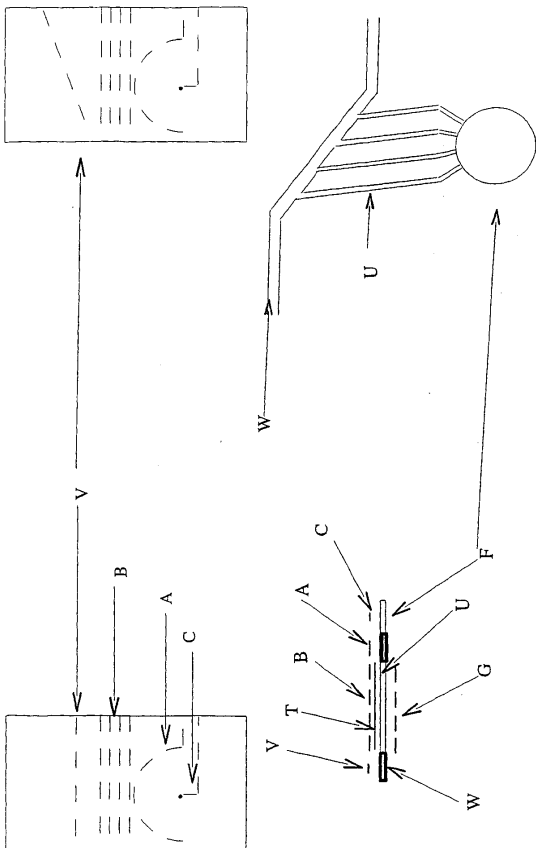
【 図 1 2 】



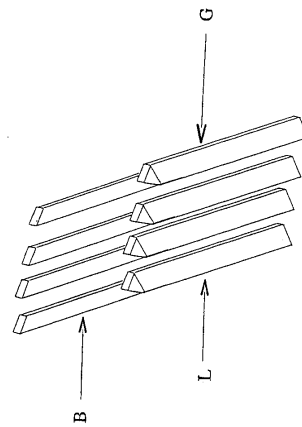
【 図 1 3 】



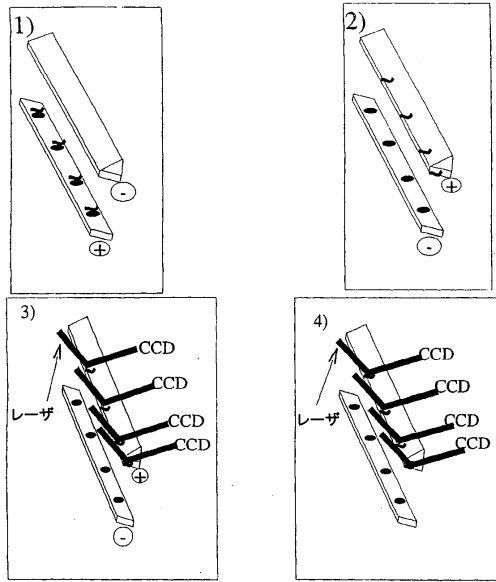
【 図 1 4 】



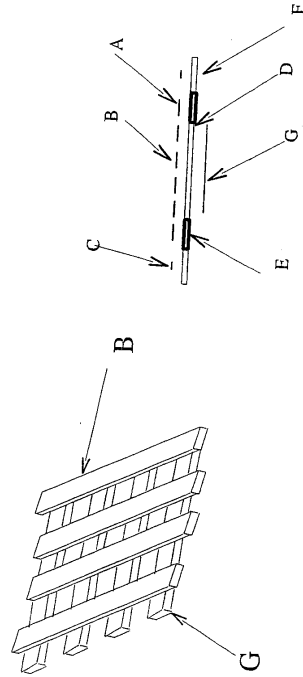
【 図 1 5 】



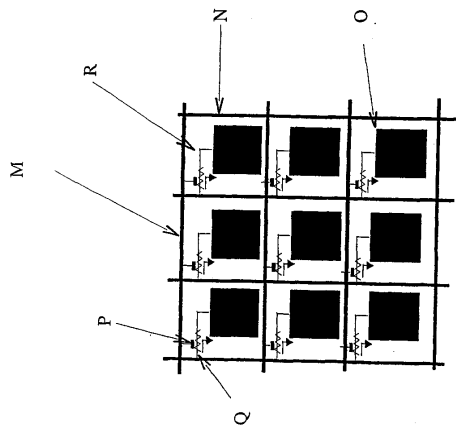
【図16】



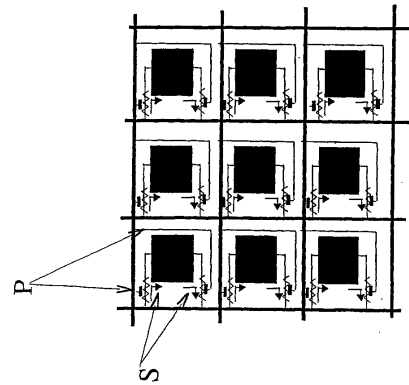
【図17】



【図18】



【図19】



フロントページの続き

| | | | |
|-------------------------------|--|---------------|---|
| (51)Int.Cl. | | F I | |
| C 1 2 M 1/34 (2006.01) | | C 1 2 Q 1/68 | A |
| G 0 1 N 21/27 (2006.01) | | C 1 2 M 1/34 | B |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | | G 0 1 N 21/27 | C |
| | | C 1 2 N 15/00 | A |

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(74)代理人 100100952

弁理士 風間 鉄也

(72)発明者 ウゴリン、ニコラ

フランス国、エフ - 7 5 0 0 2 パリ、リュ・レオムール 9 3

(72)発明者 シュピラルル、シルビー

フランス国、エフ - 9 4 2 7 0 ル・クルムリン - ビストル、リュ・ダントン 9

(72)発明者 オリ、カトリーヌ

フランス国、エフ - 7 5 0 1 8 パリ、リュ・ドゥ・ラ・シャペル 4 0

(72)発明者 ルポー、ジェローム

フランス国、エフ - 7 5 0 0 1 パリ、リュ・サン - ドゥニ 7 3

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 9 3 0 1 (W O , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 9 0 6 4 9 (U S , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/53-33/543

G01N 37/00