



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105772122 B

(45)授权公告日 2017. 11. 03

(21)申请号 201610224316.8

(22)申请日 2011.07.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105772122 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(30)优先权数据
2010-285210 2010.12.21 JP

(62)分案原申请数据
201180062156.7 2011.07.13

(73)专利权人 株式会社岛津制作所
地址 日本京都府

(72)发明人 大桥铁雄

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.
B01L 3/00(2006.01)

(56)对比文件
US 6121055 A,2000.09.19,全文.
CN 101430334 A,2009.05.13,全文.
US 4487700 A,1984.12.11,全文.
CN 101838702 A,2010.09.22,全文.
US 2008/0160630 A1,2008.07.03,全文.

审查员 师琪

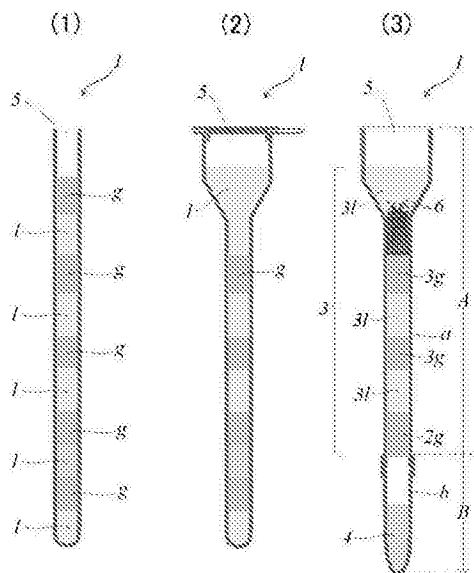
权利要求书2页 说明书27页
序列表2页 附图8页

(54)发明名称

用于在管内操作对象成分的器件和方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于在管内操作对象成分的器件和方法。本发明提供一种小型且低运行成本的器件,其能够极力抑制污染源的产生,同时能够进行所期望的一系列的的全部操作。一种器件,其为用于在操作管内操作对象成分的器件,所述器件包括:操作管,所述操作管包括管和操作作用介质,所述管在一侧具有用于供给包含对象成分的试样的任选能够封闭的开口端,在另一侧具有闭口端,所述操作作用介质收纳于所述管内并且是由凝胶层和水系液体层在管的长度方向层叠而成的;用于搬运对象成分磁性体颗粒;以及磁场施加单元,其能够通过所述操作管施加磁场而使所述磁性体颗粒在管的长度方向移动。



1. 一种操作管,其为用于操作对象成分的操作管,所述操作管包括:
管,其在一侧具有用于供给包含对象成分的试样的任选能够封闭的开口端,在另一侧具有闭口端;
操作介质,其收纳于所述管内并且是由凝胶层和水系液体层在所述管的长度方向交替层叠而成的;以及,
磁性体颗粒,其用于捕捉并搬运对象成分,
所述操作管通过施加磁场而使所述磁性体颗粒在所述操作管的长度方向上进行通过凝胶状态的所述凝胶层的移动。
2. 根据权利要求1所述的操作管,其中,所述管的内径为0.1mm~5mm。
3. 根据权利要求1所述的操作管,其中,所述磁性体颗粒对作为对象成分的核酸具有结合力或吸附力,所述操作介质包含:含有用于使核酸游离并与所述磁性体颗粒结合或吸附的液体的水系液体层和/或含有所述磁性体颗粒的清洗液的水系液体层。
4. 根据权利要求3所述的操作管,其中,所述操作介质还包含:含有核酸扩增反应液的水系液体层、或含有逆转录反应液的水系液体层和含有核酸扩增反应液的水系液体层两者。
5. 根据权利要求1所述的操作管,其中,
所述操作管具有操作部A和回收部B,
构成所述操作管的所述管具有与所述操作部A和所述回收部B分别对应的操作作用管部a和回收用管部b,
所述操作部A包含所述管部a和收纳于所述管部a内的所述操作介质,
所述回收部B包含所述管部b和收纳于所述管部b内且至少包含水系液体层和凝胶层中的任意一种的回收用介质。
6. 根据权利要求5所述的操作管,其中,所述操作作用管部a和所述回收用管部b能够分离。
7. 根据权利要求1所述的操作管,其中,所述管的材质选自由聚乙烯、聚丙烯、氟树脂、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、丙烯腈苯乙烯共聚物、丙烯酸(酯)树脂、聚乙酸乙烯酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、环状聚烯烃和玻璃组成的组。
8. 根据权利要求1所述的操作管,其中,所述开口端的内径比收纳有作为操作介质的凝胶层和水系液体层的所述管的内径宽。
9. 根据权利要求1所述的操作管,其中,所述管具有透光性。
10. 根据权利要求1所述的操作管,其中,所述管的内壁的表面粗糙度Ra为0.1 μ m以下。
11. 根据权利要求1所述的操作管,其中,所述凝胶层在长度方向的厚度为1~20mm。
12. 根据权利要求1所述的操作管,其中,所述水系液体层在长度方向的厚度为0.5~30mm。
13. 根据权利要求5所述的操作管,其中,所述回收部B还包含荧光色素,所述荧光色素用于与所述对象成分特异性结合并通过光照射产生荧光来检测对象成分。
14. 根据权利要求5所述的操作管,其中,所述回收部B还包含:含有逆转录反应液的水系液体层和含有核酸扩增反应液的水系液体层。
15. 一种器件,其包括:

权利要求13所述的操作管；

磁场施加单元，其能够通过通过对所述操作管施加磁场而使所述磁性体颗粒在所述操作管的长度方向上移动；以及，

光学检测单元，其对所述回收部B照射光并检测由与所述对象成分特异性结合的荧光色素产生的荧光。

16. 一种器件，其具备多个权利要求1~14中的任一项所述的操作管，

所述器件还包括磁场施加单元，其能够通过通过对多个所述操作管同时施加磁场而使多个所述操作管的所述磁性体颗粒在所述操作管的长度方向上同时移动。

17. 根据权利要求16所述的器件，其中，所述磁场施加单元包括：

可动基板，其能够在所述操作管的长度方向上移动；

磁场移动机构，其对所述可动基板在所述操作管的长度方向上的移动进行控制；以及，

多个磁力源，其保持于所述可动基板中，对应于多个操作管。

18. 一种器件，其包括：

权利要求1~14中的任一项所述的操作管；以及，

磁场施加单元，其能够通过通过对所述操作管施加磁场而使所述磁性体颗粒在所述操作管的长度方向上移动，

所述磁场施加单元使磁场在所述操作管的长度方向上振荡或者旋转。

用于在管内操作对象成分的器件和方法

[0001] 本申请是申请号为201180062156.7 (国际申请号为PCT/JP2011/065995) 的原申请的分案申请,该原申请的申请日为2011年7月13日,发明名称为“用于在管内操作对象成分的器件和方法”。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于使用凝胶来操作对象成分的器件和方法。更具体地说,本发明涉及通过在能够密闭的管内用来自管外的磁场操作磁性体颗粒,从而能够在该管内将对象成分供于各种操作的器件和方法。更具体地说,本发明涉及通过在使用油凝胶收纳有试剂溶液的细管内操作磁性体颗粒,从而能够进行对象成分的提取、精制、合成、洗脱、分离、回收和分析等的方法和装置。

背景技术

[0003] 通过使直径为十几 μm 至0.5 μm 的不溶于水的微粒的表面具有各种化学亲和力,能够进行对象成分的提取和精制、分离、回收等。另外,还能够识别特定细胞表面分子来进行对象细胞的回收。由此,正在市售根据对象而将功能性分子导入颗粒表面的微粒。在这些微粒中,颗粒材质为氧化铁等铁磁性材料的微粒能够利用磁体进行对象成分的回收,不需要离心操作,因此具有有利于化学提取和精制的自动化的特长。

[0004] 例如,正在市售使用一个器件连续地进行从细胞的核酸提取至利用基因扩增反应进行的分析的系统。例如,美国Cepheid公司GeneXpert System能够利用一个盒型器件进行从核酸提取至利用基因扩增反应进行的分析,同时处理检测体数最大为16。(GeneXpert System的技术内容记载于非专利文献1。)另外,例如,3M公司的Simplexa (非专利文献2)能够利用一个圆盘形器件进行从核酸提取直至PCR,一个圆盘能够固定12个检测体。

[0005] 另一方面,磁性颗粒作为提取和精制试剂盒的形式的试剂的一部分被市售。试剂盒在彼此分开的容器中装有多种试剂,使用者在使用时利用移液器等分取、分注试剂。在自动化装置的情况下,目前市售的装置中液体的分取也是以机械的方式进行移液操作。例如, Precision System Science公司正在市售使用磁性颗粒进行核酸提取的系统(非专利文献3)。

[0006] 现有技术文献

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1: Clinical Chemistry 51:882-890, 2005、2005年3月3日

[0009] 非专利文献2: “FDA Issues Another Emergency Use Authorization for Commercial H1N1Flu Test to Quest Diagnostics’ Focus Diagnostics”、Focus Diagnostics Inc.,、2009年10月17日

[0010] 非专利文献3: “GC series Magtration Genomic DNA Whole Blood”、Precision Science System Co.,Ltd.,、2008年12月

发明内容

[0011] 发明要解决的问题

[0012] 通常,市售的磁性颗粒能够由试样进行对象成分或特定细胞的分离回收,但是在进行回收物的分析时,必须利用实时PCR装置、质谱仪、流式细胞仪等其它系统进行。

[0013] 在市售的使用一个器件连续地进行从细胞的核酸提取至利用基因扩增反应进行的分析的系统中,同时处理检测体数少,而且器件自身也复杂,制造成本高,不实用。

[0014] 例如,在美国Cepheid公司GeneXpert System中,器件特别复杂并且成本高(1检测体42美元)。另外,器件尺寸也大,因此系统整体大型,并不是能够轻易移动而使用的制品。特别是,并不是适合于检测体数比较少的用途的POCT(Point of Care Testing,即时检验)的制品。

[0015] 另外,例如,3M公司的Simplexa的一个圆盘中的检测体数固定为12检测体,因此无法自由设定为任意的检测体数。

[0016] 在使用包含磁性体颗粒作为试剂的一部分的提取和精制试剂盒时所必须的移液操作伴随气溶胶的产生。这会提高妨碍分析的污染的危险性。在自动化装置中,利用机械方式进行移液操作来进行液体的分取时也相同。该情况下,污染源因气溶胶的产生而在装置内蓄积,因此需要定期清洗装置。但是,用移液器式分注机构实现自动化的装置的构造复杂,难以完全除去污染源。

[0017] 在由Precision System Science公司市售的使用磁性颗粒进行核酸提取的系统中,能够进行至精制后的核酸的回收,但是利用基因扩增反应等进行的分析必须利用实时PCR装置等其它系统进行。此外,该系统中利用移液器型分注机进行的分注在开放体系中进行,因此污染的危险性时常有影响。

[0018] 本发明的目的在于提供一种小型且低运行成本的器件,其能够极力抑制污染源的产生,同时所期望的一系列的操作全部能够在完全密封状态下进行。

[0019] 本发明的目的在于提供一种小型且低运行成本的器件,其例如能够在完全密闭容器内进行对象成分的提取和精制,或者进而接着一边保持密闭状态一边在同一容器内进行分析。

[0020] 用于解决问题的方案

[0021] 本发明人深入研究的结果,发现不使用伴随气溶胶的产生的分注机,而是通过在能够密闭的细管(毛细管)中用非水溶性凝胶物质隔开并收纳一种以上的液体试剂且使细管内收纳的液体试剂中存在磁性体颗粒、以及通过能够从细管外部操作的磁场施加单元,可以达到上述本发明的目的,由此完成了本发明。

[0022] 本发明包括以下方案。

[0023] (1)

[0024] 一种器件,其为用于在操作管内操作对象成分的器件,所述器件包括:

[0025] 操作管,所述操作管包括管和操作介质,所述管在一侧具有用于供给包含对象成分的试样的任选能够封闭的开口端,在另一侧具有闭口端,所述操作介质收纳于所述管内并且是由凝胶层和水系液体层在所述管的长度方向交替层叠而成的,

[0026] 用于捕捉并搬运对象成分的磁性体颗粒,以及

[0027] 磁场施加单元,其能够通过对所操作管施加磁场而使所述磁性体颗粒在所操作管的长度方向移动。

[0028] 上述开口端优选的是:以其全部或一部分能够开闭的方式封闭。优选的开口端的例子示于图1的(2)和(3)。

[0029] (2)

[0030] 根据(1)所述的器件,其中,所述管的近似内径为0.1mm~5mm。

[0031] (3)

[0032] 根据(1)或(2)所述的器件,其中,所述磁场施加单元能够在所述操作管的外部使所述磁性体颗粒在所操作管的长度方向移动。

[0033] (4)

[0034] 根据(1)~(3)中任一项所述的器件,其还包括保持单元,所述保持单元能够以开口端向上的方式大致垂直状地保持所述操作管。

[0035] (5)

[0036] 根据(4)所述的器件,其中,所述保持单元是形成有多个能够保持所述操作管的闭口端部的保持孔的保持基板。

[0037] 上述(5)的作为保持基板的保持单元的例子作为图5和图7的51示出。

[0038] (6)

[0039] 根据(4)或(5)所述的器件,其中,所述保持单元具有温度控制功能。

[0040] (7)

[0041] 根据(4)~(6)中任一项所述的器件,其中,所述保持单元具有允许所述磁场施加单元向所述操作管的长度方向移动的内凹处。

[0042] 上述(7)的具有凹处的保持单元的一例作为图7的51示出。

[0043] (8)

[0044] 根据(4)~(7)中任一项所述的器件,其中,所述保持单元具有光学检测口。

[0045] (9)

[0046] 根据(1)~(8)中任一项所述的器件,其中,所述磁场施加单元具有对磁场向操作管的长度方向的移动和磁场的强度进行控制的机构。

[0047] (10)

[0048] 根据(1)~(9)中任一项所述的器件,其中,所述磁场施加单元具有温度控制功能。

[0049] (11)

[0050] 根据(5)~(10)中任一项所述的器件,其中,所述磁场施加单元包括能够在所述操作管的长度方向移动的基板并保持于所述基板中的多个磁力源。

[0051] 上述(11)的磁场施加单元的一例作为图5的可动磁体板53示出。

[0052] (12)

[0053] 根据(11)所述的器件,其中,所述对磁场向操作管的长度方向的移动和磁场的强度进行控制的机构为,在所述可动基板中使所述多个磁力源同时移动的机构。

[0054] 具有上述(12)的机构的可动基板的一例示于图6。

[0055] (13)

[0056] 根据(1)~(12)中任一项所述的器件,其中,所述磁性体颗粒对作为对象成分的核

酸具有结合力或吸附力,所述操作用介质包含:含有用于使核酸游离并与所述磁性体颗粒结合或吸附的液体的水系液体层和/或含有所述磁性体颗粒的清洗液的水系液体层。

[0057] (14)

[0058] 根据(13)所述的器件,其中,所述操作用介质还包含:含有核酸扩增反应液的水系液体层、或含有逆转录反应液的水系液体层和含有核酸扩增反应液的水系液体层。

[0059] (15)

[0060] 根据(1)~(14)中任一项所述的器件,其中,所述管一体成型。

[0061] (16)

[0062] 根据(1)~(15)中任一项所述的器件,其中,

[0063] 所述操作管具有操作部A和回收部B,

[0064] 构成所述操作管的所述管具有与所述操作部A和所述回收部B分别对应的操作用管部a和回收用管部b,

[0065] 所述操作部A包含所述管部a和收纳于所述管部a内的所述操作介质,

[0066] 所述回收部B包含所述管部b和收纳于所述管部b内且至少包含水系液体层和凝胶层中的任意一种的回收用介质。

[0067] 上述(16)的操作管的一例示于图1的(3)。

[0068] (17)

[0069] 根据(16)所述的器件,其中,所述操作用管部a和所述回收用管部b能够分离。

[0070] (18)

[0071] 根据(1)~(17)中任一项所述的器件,其中,所述管的材质选自自由聚乙烯、聚丙烯、氟树脂、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物(ABS树脂)、丙烯腈苯乙烯共聚物(AS树脂)、丙烯酸(酯)树脂、聚乙酸乙烯酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、环状聚烯烃和玻璃组成的组。

[0072] (19)

[0073] 一种制作方法,其为(1)所述的器件中所含有的操作管的制作方法,所述制作方法包括以下工序:在一侧具有开口端且另一侧具有闭口端的管内交替层叠水系液体层和凝胶层。

[0074] (20)

[0075] 一种制作方法,其为(16)所述的器件中所含有的操作管的制作方法,所述制作方法包括以下工序:

[0076] (i)在两侧具有开口端的操作用管a内从一侧的端部交替层叠凝胶层和水系液体层,从而制作操作部A的工序;

[0077] (ii)在一侧具有开口端且另一侧具有闭口端的回收用管b内收纳水系液体或凝胶,或者交替层叠水系液体层和凝胶层,制作回收部B的工序;

[0078] (iii)将所述操作部A的操作用管a的所述一侧的端部和所述回收部B的回收用管b的开口端连结的工序。

[0079] 上述(20)的方法中的工序(i)的概要示于图2。

[0080] (21)

[0081] 一种方法,其用于使用(1)所述的器件来操作对象成分,所述方法包括以下的工

序：

[0082] (i) 在所述操作管的最上层得到含有包含对象成分的试样、磁性体颗粒和水系液体的水系液体混合物的工序；

[0083] (ii) 利用磁场施加单元产生磁场，将所述磁性体颗粒与所述对象成分一起从所述最上层的水系液体混合物的层经由所述凝胶层向邻接的水系液体层中搬运的工序；

[0084] (iii) 在所述水系液体层中进行所期望的处理的工序；

[0085] (iv) 利用磁场施加单元产生磁场，将所述磁性体颗粒与所述对象成分一起从所述水系液体层向其它水系液体层搬运的工序；

[0086] (v) 在所述其它水系液体层中进行所期望的处理的工序；

[0087] (vi) 根据需要重复所述的工序 (iv) 和 (v) 的工序；

[0088] (vii) 将所述磁性体颗粒与对象成分一起向操作管内的最下层搬运的工序。

[0089] (22)

[0090] 根据 (21) 所述的方法，其中，所述操作管存在多根，对于所述多根操作管，同时进行利用所述磁性体颗粒实施的搬运。

[0091] (23)

[0092] 根据 (21) 或 (22) 所述的方法，其中，所述对象成分为核酸，

[0093] 在所述工序 (i) 中，所述最上层的水系液体混合物中所含有的水系液体是使所述核酸游离、并使其结合或吸附于所述磁性体颗粒的液体，在所述水系液体中进行核酸提取，

[0094] 在所述工序 (ii) ~ (vi) 中，所述水系液体层中的至少1个含有所述磁性体颗粒的清洗液，在所述清洗液中通过与游离核酸相伴的夹杂物的除去来进行核酸精制。

[0095] (24)

[0096] 根据 (23) 所述的方法，其中，在所述工序 (vii) 中，所述最下层包含核酸扩增反应液，在所述核酸扩增反应液中进行精制核酸中的靶核酸的扩增。

[0097] 上述 (24) 中，所述核酸为RNA的情况下，与包含核酸扩增反应液的最下层紧邻的层包含逆转录反应液。

[0098] (25)

[0099] 根据 (24) 所述的方法，其中，以光学方式实时检测所述核酸扩增反应所产生的产物。

[0100] 发明的效果

[0101] 根据本发明，能够提供一种小型且低运行成本的器件，其能够极力抑制污染源的产生，同时能够进行所期望的一系列的全部操作。

[0102] 根据本发明，能够提供一种小型且低运行成本的器件，其例如能够在完全密闭容器内进行对象成分的提取和精制，或者进而接着一边保持密闭状态一边在同一容器内进行分析。

附图说明

[0103] 图1是本发明的操作管的例子的纵剖图。

[0104] 图2示出了本发明的操作管的制作方法的一例。

[0105] 图3示出了使用图1的 (3) 所示的本发明的操作管由含有核酸的试样提取和精制核

酸的工序。

[0106] 图4示出了使用本发明的操作管的另一例由含有核酸的试样提取和精制核酸,进而利用逆转录反应和PCR反应进行分析的工序。

[0107] 图5是示出通过使用多个本发明的操作管而多通道化,从而能够同时进行操作管内的操作的器件的一例的斜视图。

[0108] 图6是图5所示的磁场施加单元(可动磁体板)的变形例的横剖图。

[0109] 图7是图5所示的磁场施加单元(可动磁体板)的变形例、保持单元(保持基板)的变形例、和包含保持单元所保持的操作管的部分的纵剖图。

[0110] 图8是进行了图3所示的工序的实施例1中得到的结果。

[0111] 图9是进行了图4所示的工序的实施例2中得到的结果。

具体实施方式

[0112] [1.对象成分的操作]

[0113] [1-1.对象成分]

[0114] 本发明中所操作的对象成分只要是通常水系液体中、乳液中或水凝胶中能够操作的成分则没有特别限定,无论生物体内成分和非生物体内成分。生物体内成分包括核酸(包括DNA和RNA)、蛋白质、脂质、糖等生物体分子。非生物体内成分还包括所述的生物体分子的人工(无论化学和生物化学)修饰体、标记体、突变体等非生物体分子、来自天然物的非生物体分子、其它能够在水系液体中操作的任何成分。

[0115] 对象成分通常能够以包含该对象成分的试样的形态提供。作为这样的试样,例如,可以举出动植物组织、体液、排泄物等来自生物体的试样、细胞、原生动物、真菌、细菌、病毒等生物体分子含有体。体液包括血液、吐痰、脑脊液、唾液、乳,排泄物包括粪便、尿、汗,也可以为这些的组合。细胞包括血液中的白细胞、血小板、口腔细胞和其它粘膜细胞的剥离细胞,也可以为这些的组合。这些试样可以以临床拭液形式获得。另外,上述试样可以以例如细胞悬浮液、匀浆、与细胞溶解液(cell lysis liquid)的混合液等形态制备。

[0116] 另外,包含对象成分的试样可以是对上述试样进行修饰、标记化、片段化、突变等处置所得到的物质。

[0117] 包含对象成分的试样也可以是进而预先对上述试样适宜进行前处理所制备的物质。作为前处理,可以举出例如由包含对象成分的试样进行对象成分或对象成分含有体的提取、分离、精制的处理等。但是,这样的前处理由于能够在本发明的器件中进行,因此未必要求在供给到器件内之前预先进行。通过在本发明的器件中进行前处理,能够避免通常在试样的前处理中担心的污染的问题。

[0118] [1-2.操作]

[0119] [1-2-1.操作的形态]

[0120] 本发明中,上述包含对象成分的试样被供给到作为图1中的1例示的操作管中,在操作管中操作对象成分。本发明中的对象成分的操作包括将上述对象成分供给到各种处理、和在进行各种处理的多种环境之间搬运上述对象成分。

[0121] 如下文中详细说明,在操作管中收纳有凝胶层和水系液体层。例如,在图1例示的形态中,以2g和3g示出的层由凝胶构成(凝胶塞),以31示出的层由水系液体构成。以4示出

的层可以由水系液体构成,只要水系液体能够维持凝胶状态则也可以由水凝胶构成。水系液体及水凝胶是构筑进行对象成分的处理的环境的。

[0122] 因此,更具体地说,本发明中的对象成分的操作包括将对象成分供给到在水系液体或水凝胶内的处理、和经由凝胶塞在进行处理的多种环境之间搬运对象成分。

[0123] [1-2-2.对象成分的处理]

[0124] 对象成分所受到的处理包括伴随对象成分的物质变化的处理和伴随物理变化的处理。

[0125] 作为伴随对象成分的物质变化的处理,只要是通过基质间的键的生成或切断而新生成不同物质的处理则包含任何处理。更具体地说,包含化学反应和生物化学反应。

[0126] 作为化学反应,还包括伴随化合、分解、氧化和还原的任何反应。本发明中,包括通常在水系液体中进行的反应。作为生物化学反应,也包括伴随生物体物质的物质变化的任何反应,通常,称为体外反应。例如,可以举出基于核酸、蛋白质、脂质、糖等生物体物质的合成系统、代谢系统和免疫系统的反应。

[0127] 作为伴随对象成分的物理变化的处理,还包括不伴随上述物质变化的任何处理。更具体地说,包括对象成分的变性(例如,对象成分为包含核酸、蛋白质的生物体高分子和其它高分子的情况)、溶解、混合、乳液化和稀释等。

[0128] 因此,通过本发明中的处理,能够进行对象成分的提取、精制、合成、洗脱、分离、回收和分析等工序。通过这些工序,最终能够实现对象成分的分离、检测和鉴定等。

[0129] 需要说明的是,本发明中的处理不仅包含作为目标的处理(直接得到对象成分的分离、检测和鉴定等效果的工序中的处理),还适宜包含与之相随的前处理和/或后处理。若举出对象成分为核酸时的例子,可以进行核酸扩增反应、或核酸扩增反应与扩增产物的分析等工序,作为它们的前处理,由含有核酸的试样的核酸的提取(细胞溶解)和/或精制(清洗)等是必须的,作为后处理,有时还进行扩增产物的回收等。

[0130] [1-2-3.对象成分的搬运]

[0131] 对象成分的搬运通过磁性体颗粒和磁场施加单元进行。磁性体颗粒在操作时存在于操作管中,以通过将对象成分结合或吸附到其表面而捕捉的状态在操作管内移动,由此能够搬运对象成分。磁性体颗粒能够在操作管内的水系液体层中分散,通常由操作管外部利用磁场施加单元产生磁场,由此在水系液体层中聚集。聚集的磁性体颗粒能够伴随着由操作管外部利用磁场施加单元所产生的磁场的变动而移动。聚集的磁性体颗粒能够在凝胶层中移动。通过利用3-2-3中记载的凝胶的触变性的性质(摇变性),聚集的磁性体颗粒能够不破坏凝胶层而通过凝胶层。在凝胶中,聚集的磁性体颗粒通过结合或吸附而伴随有对象成分。凝聚的磁性体颗粒群严密地被非常少的水系液体所覆盖。即,能够伴随对象成分以外的成分。但是由于覆盖的水系液体的量非常少,因此可以说基本上不带领水系液体。因此,能够非常有效地进行对象成分的搬运。

[0132] [2.操作管]

[0133] [2-1.操作管的构造]

[0134] 本发明的器件具有操作管。参照图1对操作管的构造进行说明(在以下的说明中,上下是指以图1为基准)。构成操作管的管为了投入试样而使上端开口,从污染的观点来看,开口端优选能够封闭。下端封闭。通常,构成操作管的管的横截面为大致圆形,但并不排除

具有其它形状的横截面的管。管内收纳有由水系液体层1和凝胶层g在管的长度方向交替层叠而成的操作介质。需要说明的是,图1中,例示出操作管的上部和下部的形态不同的(1)~(3)的3种形态。但是,上部和下部是任意组合的,并不限定于这些(1)~(3)所示的组合。

[0135] 管的上部开口端是用于供给包含对象成分的试样的试样供给部5,作为开口端的试样供给部5可以临时被开放(图1的(1)),也可以以其全部(图1的(2))或一部分能够开放的方式被封闭。通过使用作为以一部分能够开放的方式被封闭的例子的、具备止回阀功能的隔膜,能够利用注射针进行接近密闭状态的穿刺来供给试样。(图1的(3))。从能够构筑完全密闭系统的方面出发,作为开口端的试样供给部5优选被封闭。对于能够构筑完全封闭系统而言,由于能够防止操作中来自外部的污染,因此非常有效。试样供给部5的内径可以与收纳了作为操作介质的凝胶层和水系液体层的管部a的内径相同(图1的(1)),从试样供给时的操作性的观点来看,也可以适宜形成为具有更宽的内径(图1的(2)和(3))。

[0136] 在图1的(1)和(2)所例示的形态中,管一体成型。在图1的(3)所例示的形态中,管由操作管部a和回收用管部b构成。操作管部a的上下端开口。回收用管部b的上端开口,下端封闭。就操作管部a和回收用管部b而言,管部a的一侧的端部和管部b的开口端相连接。操作管部a和回收用管部b可以是能够分离的形状,也可以是不考虑分离的形状(不能分离的形状)。

[0137] 操作管部a内收纳封闭一侧的端部的凝胶层2g和层叠于其上的多个层即操作介质3。操作介质3由水系液体层3l和凝胶层3g交替层叠而构成。将由操作管部a和作为其收纳物的操作介质构成的部分记为操作部A。

[0138] 回收用管部b内收纳有至少包含水系液体和凝胶中的任意一种的回收用介质4。将由回收用管部b和作为其收纳物的回收用介质4构成的部分记为回收部B。

[0139] 操作部A和回收部B可以以连结的状态提供,也可以以各自独立的状态提供。

[0140] [2-2.操作管的尺寸]

[0141] 构成操作管的管的近似内径例如为0.1mm~5mm、优选为1~2mm。若在该程度的范围内,则操作管能够具有良好的操作性。若小于上述范围,为了维持强度而不得不增厚管壁,磁性颗粒与磁体的距离变大,磁力难以到达磁性体颗粒,从而操作上有可能产生问题。另一方面,若管的内径大于上述范围,则构成操作介质的凝胶层和水系液体层的多个层具有容易因来自外部的冲击及重力的影响等而紊乱的倾向。需要说明的是,本发明中,若毛细管材质能够耐受高精度加工,则不排除内径为0.1mm以下的管。

[0142] 操作管的长度方向的长度例如为1~30cm、优选为5~15cm。

[0143] 需要说明的是,如图1的(2)和(3)那样,在以内径更宽的方式形成试剂供给部5的情况下,试样供给部5的近似内径能够大于上述范围且为10mm以下、优选为5mm以下。从试剂供给时的作业性的观点来看,试剂供给部优选具有更宽的内径。若更宽的内径超过上述范围,则例如在同时处理多个操作管的情况下等,存在操作管彼此干扰、器件的集成性变差的倾向。

[0144] [2-3.管的材质]

[0145] 对于构成操作管的管的材质没有特别限定。例如,由于会降低对象成分和微量的液体与磁性体颗粒一起在凝胶层内移动时的移动阻力,因而可以举出作为搬运面的内壁光滑且为拒水性的材质。作为赋予这样性质的材质,例如,可以举出聚乙烯、聚丙烯、氟树脂

(特氟龙(注册商标))、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物(ABS树脂)、丙烯腈苯乙烯共聚物(AS树脂)、丙烯酸(酯)树脂、聚乙酸乙烯酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、环状聚烯烃等树脂原料。从即便操作管掉落或弯曲,操作管内的层也不易紊乱、坚固性高的方面出发,优选为树脂原料。另外,关于管的材质,若需要透明度、耐热性和/或加工性则也可以为玻璃。

[0146] 另外,试剂供给部5、操作用管部a和回收用管部b的材质可以相同,也可以不同。

[0147] [2-4.管的物性]

[0148] 从操作时的目视确认性的观点以及从管外部进行吸光度、荧光、化学发光、生物发光、折射率的变化等的测定的情况下进行光学检测的观点等来看,管的材质优选具有透光性。

[0149] 由于使包含对象成分的少量的液体块与磁性体颗粒一起在凝胶层内移动,因此构成管的内壁的搬运面优选为平滑面,特别优选表面粗糙度为 $Ra=0.1\mu\text{m}$ 以下。例如,在使永久磁体从管的外部接近管,通过磁场的变动而使包含对象成分的少量的液体块移动时,磁性体颗粒一边按压搬运面一边移动,通过使搬运面具有 $Ra=0.1\mu\text{m}$ 以下的表面粗糙度,从而能够使磁性体颗粒对变动的磁场具备充分的追随性。

[0150] [3.操作管内收纳物]

[0151] [3-1.操作用介质]

[0152] 在操作管内,至少收纳有由水系液体的层和凝胶的层交替层叠而成的多个层作为操作用介质。最上层可以为凝胶层(图1的(1)),也可以为水系液体层(图1的(2)和(3))。另外,最上层为水系液体层的情况下,该层中可以包含磁性体颗粒6(图1的(3)),也可以不包含(图1的(1)和(2))。最下层可以为水系液体层(图1的(1)~(3)),也可以为凝胶层。

[0153] 如图1的(1)和(2)所示构成操作管的管一体成型的情况下,能够为管内收纳的全部层相互接触的状态。

[0154] 如图1的(3)所示,构成操作管的管由操作用管部a和回收用管部b构成的情况下,回收用管部b中,作为回收用介质,可以仅收纳水系液体也可以仅收纳凝胶,还可以收纳由水系液体层与凝胶层交替层叠而成的多个层。收纳在操作用管部a的最下端的凝胶层2g与收纳在回收用管部b的水系液体、凝胶或收纳在回收用管部b的多个层的最上层可以相互接触,也可以通过在其间夹入气体层而不接触(图1的(3))。

[0155] 对管中收纳的层的数量和顺序没有特别限定,本领域技术人员能够基于提供给对象成分的操作的工序的数量和顺序而适宜决定。

[0156] 收纳于一根操作管内的各个水系液体层优选包含2种以上不同种类的水系液体。构成各个层的水系液体,能够从操作管的上端侧依次使用用于构筑提供给对象成分的处理工序及反应工序所分别需要的环境的液体。

[0157] 收纳于一根操作管内的各个凝胶层可以包含不同种类的凝胶,也可以包含相同种类的凝胶。例如,在多个水系液体层中的一部分的水系液体层中利用加热进行处理或反应的情况下,可以仅在与该水系液体层邻接的凝胶层中使用具有在上述加热所需要的温度下也能够保持凝胶状态或凝胶-溶胶中间状态的高溶胶-凝胶转变点的凝胶,在其它的凝胶层中使用具有比较低的溶胶-凝胶转变点的凝胶。除此之外,本领域技术人员还能够根据构成邻接的水系液体层的水系液体的特性及体积等来适宜选择具有适当的特性的凝胶。

[0158] 凝胶层具有在操作管内在管的长度方向的两侧隔开水系液体的层的塞(凝胶塞)的作用。关于其厚度,本领域技术人员能够考虑管的内径及长度、由磁场施加单元搬运的磁性体颗粒的量等而适宜决定能够起到塞的功能的厚度。例如能够为1~20mm、优选为3~10mm。若小于上述范围,则具有欠缺作为塞的强度的倾向。若大于上述范围,则操作管变长,具有操作性、器件的耐久性、收纳性变差的倾向。

[0159] 水系液体层用于提供包含对象成分的试样被进行的处理及反应等的环境。关于其厚度,本领域技术人员能够考虑管的内径及长度、对象成分的量、对象成分被进行的处理及反应的种类等而适宜决定能够提供可以达到对于对象成分的所期望的处理或反应的水系液体量的厚度。例如,能够为0.5~30mm、优选为3~10mm。若小于上述范围,除了有时无法充分实现对于对象成分的处理及反应,而且塞成为液滴状,还有可能使磁性颗粒无法与试剂结合。若大于上述范围,则水系液体层与凝胶层相比大多变得相对过厚,有可能发生与凝胶塞同样的问题,而且在水系液体的比重大于凝胶的情况下,具有多个层容易破坏的倾向。

[0160] 另一方面,在凝胶层包含水凝胶的情况下,水凝胶层不仅起到隔开试剂的作用,而且与水系液体层同样地,能够提供包含对象成分的试样被进行的处理及反应等的环境。该情况下,水凝胶层的厚度还有可能大于水系液体层。

[0161] [3-2.凝胶的种类]

[0162] 就凝胶层而言,在管内与水系液体一起层叠的情况下,其包含不溶于或难溶于构成水系液体层的液体的化学惰性的物质。不溶于或难溶于液体是指25℃下对于液体的溶解度大致为100ppm以下。化学惰性的物质是指在对象成分的操作(即,水系液体中或水凝胶中的对象成分的处理和经由凝胶塞的对象成分的搬运)中不对对象成分和水系液体或水凝胶产生化学影响的物质。本发明中的凝胶包括有机凝胶和水凝胶两者。

[0163] [3-2-1.有机凝胶]

[0164] 有机凝胶通常通过在水非溶性或水难溶性的液体物质中添加凝胶化剂而凝胶化得到。

[0165] [3-2-1-1.非水溶性或水难溶性的液体物质]

[0166] 作为非水溶性或水难溶性的液体物质,能够使用25℃下对于水的溶解度大致为100ppm以下、常温(20℃±15℃)下为液体状的油。例如,能够由液体油脂、酯油、烃油、和硅油组成的组中组合1种或2种以上使用。

[0167] 作为液体油脂,可以举出亚麻籽油、山茶花油、澳洲坚果油、玉米油、貂油、橄榄油、鳄梨油、山茶花油、蓖麻油、红花油、杏仁油、肉桂油、霍霍巴油、葡萄油、葵花籽油、杏仁油、菜籽油、芝麻油、小麦胚芽油、米胚芽油、米糠油、棉籽油、大豆油、花生油、茶油、月见草油、蛋黄油、肝油、椰子油、棕榈油、棕榈仁油等。

[0168] 作为酯油,可以举出辛酸鲸蜡酯等辛酸酯、月桂酸己酯等月桂酸酯、肉豆蔻酸异丙酯、肉豆蔻酸辛基十二烷基酯等肉豆蔻酸酯、棕榈酸辛酯等棕榈酸酯、硬脂酸异鲸蜡酯等硬脂酸酯、异硬脂酸异丙酯等异硬脂酸酯、异棕榈酸辛酯等异棕榈酸酯、油酸异癸酯等油酸酯、己二酸异丙酯等己二酸酯、癸二酸乙酯等癸二酸酯、苹果酸异硬脂酯等苹果酸酯、三辛酸甘油酯、三异棕榈酸甘油酯等。

[0169] 作为烃油,可以举出十五烷、十六烷、十八烷、矿物油、液体石蜡等。

[0170] 作为硅油,可以举出二甲基聚硅氧烷、甲基苯基聚硅氧烷和其它含有苯基的硅油、

甲基氢聚硅氧烷(methylhydrogen polysiloxane)等。

[0171] [3-2-1-2.凝胶化剂]

[0172] 作为凝胶化剂,能够将选自羟基脂肪酸、糊精脂肪酸酯和甘油脂肪酸酯组成的组中的油凝胶化剂组合1种或2种以上使用。

[0173] 作为羟基脂肪酸,只要是具有羟基的脂肪酸则没有特别限定。具体地说,例如,可以举出羟基肉豆蔻酸、羟基棕榈酸、二羟基棕榈酸、羟基硬脂酸、二羟基硬脂酸、羟基十七烷酸、蓖麻油酸、反蓖麻酸、亚麻酸等。这些之中,特别优选羟基硬脂酸、二羟基硬脂酸、蓖麻油酸。这些羟基脂肪酸可以单独使用,也可以将2种以上合用。另外,作为这些的混合物的动植物油脂脂肪酸(例如,蓖麻油脂肪酸、氢化蓖麻油脂肪酸等)也能够用作所述羟基脂肪酸。

[0174] 作为糊精脂肪酸酯,例如,可以举出肉豆蔻酸糊精(商品名“RHEOPEARL MKL”、千叶制粉株式会社制)、棕榈酸糊精(商品名“RHEOPEARL KL”、“RHEOPEARL TL”、均为千叶制粉株式会社制)、(棕榈酸/2-乙基己酸)糊精(商品名“RHEOPEARL TT”、千叶制粉株式会社制)等。

[0175] 作为甘油脂肪酸酯,可以举出山嵛酸甘油酯、八硬脂酸甘油酯、二十烷酸甘油酯等,可以将这些组合1种以上使用。具体地说,可以举出包含20%山嵛酸甘油酯、20%八硬脂酸甘油酯和60%氢化棕榈油的商品名“TAISET 26”(太阳化学株式会社制)、包含50%山嵛酸甘油酯和50%八硬脂酸甘油酯的商品名“TAISET 50”(太阳化学株式会社制)等。

[0176] 关于非水溶性或水难溶性的液体物质中添加的凝胶化剂的含量,能够使用与该液体物质的全部重量的例如0.1~0.5重量%、0.5~2重量%或1~5重量%相当的量的凝胶化剂。但是并不限于此,本领域技术人员可以适宜决定能够达到所期望的凝胶和溶胶状态的程度的量。

[0177] 本领域技术人员能够适宜决定凝胶化的方法。具体地说,将非水溶性或水难溶性的液体物质加热,在所加热的该液体物质中添加凝胶化剂,使凝胶化剂完全溶解后进行冷却,由此能够使该液体物质凝胶化。作为加热温度,只要考虑所使用的液体物质和凝胶化剂的物性适宜决定即可。例如,有时优选为60~70℃左右。对加热状态的该液体物质进行凝胶化剂的溶解时,可以一边平稳地混合一边进行。冷却优选缓慢地进行。例如,能够用1~2小时左右的时间冷却。例如若温度下降至常温(20℃±15℃)以下、优选为4℃以下则能够完成冷却。作为适用上述凝胶化的方法的优选形态的一个形态,可以举出例如使用上述的TAISET 26(太阳化学株式会社制)的形态。

[0178] [3-2-2.水凝胶]

[0179] 作为水凝胶,例如,能够使用如下制备的物质:将明胶、胶原、淀粉、果胶、透明质酸、几丁质、壳聚糖或海藻酸和它们的衍生物作为水凝胶材料,使水凝胶材料在水或水系液体中平衡溶胀而制备。在上述水凝胶中,优选使用由明胶制备的水凝胶。另外,水凝胶可以通过将上述水凝胶材料化学交联或者用凝胶化剂(例如锂、钾、镁等碱金属、碱土金属的盐或钛、金、银、铂等过渡金属的盐、以及二氧化硅、炭、氧化铝化合物等)处理而获得。本领域技术人员能够容易地选择这些化学交联及凝胶化剂。

[0180] 特别是,在水凝胶与水系液体同样地提供包含对象成分的试样被进行的处理、反应等的环境的情况下,本领域技术人员可以适宜制备以具有适合于这样的处理及反应的组成。

[0181] 例如,可以举出能够合成蛋白质的将聚二甲基硅氧烷作为基剂的DNA水凝胶(P-凝

胶)。该水凝胶由作为凝胶支架的一部分的DNA构成。就该水凝胶而言,在对象成分为蛋白质合成用基质的情况下,其能够供给至由该对象成分得到蛋白质的反应(关于更具体的形态,本领域技术人员可以参考Nature Materials 8,432-437(2009)和Nature Protocols 4:1759-1770(2009)而适宜决定)。生成的蛋白质例如可以通过使用具有对该蛋白质为特异性的抗体的磁性体颗粒来回收。

[0182] [3-2-3.凝胶的特性]

[0183] 管中收纳的凝胶具有以某个温度为界而引起溶胶-凝胶转变的特性。溶胶-凝胶转变点能够为25~70℃的范围。在回收等需要溶胶化所引起的流动性的反应系统中,希望溶胶-凝胶转变点在该范围。溶胶-凝胶转变点能够根据有机凝胶材料(油)及水凝胶材料的种类、凝胶化剂的种类和凝胶化剂的添加量等条件而变动。因此,该各条件由本领域技术人员适宜选择,以具有所期望的溶胶-凝胶转变点。

[0184] 凝胶塞能够通过从管的长度方向的两侧夹入管内的水系液体而将其固定在管内的规定位置。另一方面,磁性体颗粒在凝胶中也能够因来自外部的磁场操作而移动,能够通过凝胶。这是由凝胶的触变性的性质(摇变性)所导致的。即,由于来自外部的磁体移动,管内的磁性体颗粒沿着搬运面对凝胶施加剪切力,磁性体颗粒的行进方向前方的凝胶溶胶化而流动化,因此磁性体颗粒能够保持前进。而且,在磁性体颗粒通过后,解除了剪切力的溶胶迅速地恢复为凝胶状态,因此凝胶中不会形成磁性体颗粒通过所导致的贯通孔。若利用该现象,对象物能够将磁性颗粒作为搬运体而容易地移动,因此能够以极短时间切换供给对象物的各种化学环境。例如,若将本发明用于包含基于多种试剂的多个化学反应的系统,则能够大幅缩短对象物的处理时间。

[0185] 若利用在常温以下的温度凝胶化的性质,即便是在该温度下呈液体状态的试剂,该液体试剂也能够通过在管内被凝胶塞夹持而被固定。因此,从器件制造时至交到利用者手中为止能够保持预先将液状试剂填充于毛细管中的状态,能够稳定供给液体试剂。此外,不需要每个工序的试剂分取和分注操作,能够减少劳力和时间,进而能够防止污染引起的分析精度的劣化。

[0186] 关于凝胶的物性,在动态粘弹性中储能粘弹性(storage viscoelasticity)E'能够优选常温(20℃±15℃)下为10~100kPa、更优选为20~50kPa。若小于上述范围,则具有欠缺作为凝胶塞的强度的倾向。若大于上述范围,则具有即便是粒径为几μm左右的磁性体颗粒移动也容易受妨碍的倾向。

[0187] 在溶胶状态中,能够具有5mm²/s~100mm²/s、优选为5mm²/s~50mm²/s、例如20mm²/s左右(50℃)的运动粘度。

[0188] [3-3.水系液体的种类]

[0189] 本发明中的水系液体只要是不溶于或难溶于凝胶的性质的水系液体即可,能够以水、水溶液或被称为乳液的乳浊液、或者微粒分散而成的悬浮液的形态提供。作为水系液体的构成成分,还包括用于提供本发明中的对象成分被进行的反应及处理的环境的任何成分。

[0190] 作为更具体的例子,可以举出用于使作为本发明的操作对象的成分在水系液体层中游离并与磁性体颗粒表面结合或吸附的液体(即,对将对象成分从夹杂物分离而与磁珠表面结合或吸附具有促进作用的液体)、用于除去与对象成分共存的夹杂物的清洗液、用于

将磁性体颗粒所吸附的对象成分从磁性体颗粒分离的洗脱液和用于构筑提供给对象成分的反应系统的反应液等。

[0191] 例如,在对象成分为核酸的情况下,可以举出用于破坏细胞而使核酸游离,从而吸附于涂布二氧化硅的磁性颗粒表面的试剂溶液(细胞溶解液);用于清洗磁性颗粒以除去核酸以外的成分的清洗液、用于使核酸从磁性颗粒分离的洗脱液(核酸洗脱液)、用于进行核酸扩增反应的核酸扩增反应液等。以下,将对象成分为核酸的情况作为例示,进一步对针对上述核酸的处理液和反应液与它们被进行的处理和反应进行说明。

[0192] [3-3-1.细胞溶解液]

[0193] 作为细胞溶解液,可以举出含有离液序列高的物质(chaotropic substance)的缓冲液。该缓冲液还能够包含EDTA和其它任意的螯合剂及TritonX-100和其它任意的表面活性剂。缓冲液基于例如Tris(三羟甲基氨基甲烷)盐酸、其它任意的缓冲剂。作为离液序列高的物质,可以举出盐酸胍、异硫氰酸胍、碘化钾、脲等。

[0194] 离液序列高的物质是强大的蛋白质变性剂,具有将与核酸纠缠的组蛋白等蛋白质从核酸分离,促进在磁性体颗粒的二氧化硅涂布表面吸附的作用。缓冲剂能够作为调整使核酸容易吸附于磁性体颗粒表面的pH环境的辅助剂使用。

[0195] 离液序列高的物质还兼具细胞溶解(即破坏细胞膜)作用。但是,对于细胞溶解(即破坏细胞膜)作用而言,与离液序列高的物质相比,表面活性剂的作用更大。

[0196] 螯合剂能够作为促进细胞溶解的辅助剂使用。

[0197] 本领域技术人员能够适宜决定由包含核酸的试样的核酸提取的具体方案。本发明中由于液滴封入介质内的核酸的搬运中使用磁性体颗粒,因此核酸提取方法也优选采用使用了磁性体颗粒的方法。例如,能够将日本特开平2-289596号公报作为参考,使用磁性体颗粒由包含核酸的试样实施核酸的提取、精制方法。

[0198] [3-3-2.清洗液]

[0199] 作为清洗液,优选为下述溶液:能够在核酸吸附于磁性体颗粒表面的状态下,溶解含有核酸的试样中所包含的核酸以外的成分(例如蛋白质、糖质等)、及核酸提取等预先进行的其它处理中使用的试剂和其它成分。具体地说,可以举出氯化钠、氯化钾、硫酸铵等的高盐浓度水溶液、乙醇、异丙醇等的醇水溶液等。

[0200] 核酸的清洗即吸附有核酸的磁性体颗粒的清洗。该清洗的具体方案也可以由本领域技术人员适宜决定。另外,本领域技术人员能够以核酸扩增反应时不产生不希望的阻碍的程度适宜选择吸附有核酸的磁性体颗粒的清洗次数。另外,基于同样的观点,在可以忽视阻碍成分的影响的情况下,还能够省略清洗工序。

[0201] 包含清洗液的水系液体层至少制备与清洗的次数相同的数量。

[0202] [3-3-3.核酸洗脱液]

[0203] 作为核酸洗脱液,能够使用水或包含盐等的缓冲液。具体地说,能够使用Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液、磷酸缓冲液、蒸馏水等。

[0204] 本领域技术人员还能够适宜决定从吸附有核酸的磁性体颗粒分离核酸并洗脱至洗脱液中的具体方法。

[0205] [3-3-4.核酸扩增反应液]

[0206] 本发明中的核酸扩增反应液中,至少包含通常核酸扩增反应中使用的各种要素中

的、含有所要扩增的碱基序列的核酸和在表面吸附了所述核酸的磁性体颗粒。

[0207] 如后所述,核酸扩增反应没有特别限定,因此本领域技术人员能够基于后述例示的公知的核酸扩增法等适宜决定核酸扩增反应中使用的各种要素。通常,包括MgCl₂、KCl等盐类、引物、脱氧核苷酸类、核酸合成酶和pH缓冲液。另外,上述盐类能够适宜变更为其它盐类而使用。另外,有时还进一步添加二甲基亚砷、甜菜碱、甘油等用于减少非特异性的配对的物质。

[0208] 本发明中的核酸扩增反应液中,除了上述成分以外,还能够含有封闭剂。封闭剂能够用于防止核酸聚合酶在反应容器的内壁及磁性体颗粒表面等的吸附所导致的失活。

[0209] 作为封闭剂的具体例,可以举出牛血清白蛋白(即BSA)和其它白蛋白、明胶(即变性胶原)、酪蛋白和聚赖氨酸等蛋白质、及肽(均不论天然和合成)、聚蔗糖(Ficoll)、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙二醇等。

[0210] 作为本发明的核酸扩增反应,没有特别限定,例如,能够使用PCR法(美国专利第4683195号说明书、美国专利第4683202号公报、美国专利第4800159号公报、美国专利第4965188号公报)、LCR法(美国专利第5494810号公报)、QB法(美国专利第4786600号公报)、NASBA法(美国专利第5409818号公报) LAMP法(美国专利第3313358号公报)、SDA法(美国专利第5455166号公报)、RCA法(美国专利第5354688号公报)、ICAN法(日本专利第3433929号公报)、TAS法(日本专利第2843586号公报)等。

[0211] 另外,还能够对上述反应之前进行RT反应。

[0212] 本领域技术人员能够适宜选择这些核酸扩增反应所需要的反应液的组成以及反应温度。

[0213] 需要说明的是,若举出在逆转录酶(RT)反应后进而进行核酸扩增反应的情况、例如进行RT-PCR的情况,能够在回收部B中在PCR反应液的层上隔着凝胶层层叠RT反应液的层(例如图4中例示)。

[0214] 在实时核酸扩增方法中,利用能够与双链DNA结合的荧光色素、或者用荧光色素标记的探针,能够对扩增产物进行荧光检测。

[0215] 作为实时核酸扩增法中的检测法,可以举出下述方法。

[0216] 例如,在利用特异性高的引物能够仅扩增目标靶标的情况下,使用利用SYBR(注册商标)GREEN I等的嵌入剂法。

[0217] 通过与双链DNA结合而发出荧光的嵌入剂与通过核酸扩增反应合成的双链DNA结合,并通过激发光的照射而发出特定波长的荧光。通过检测该荧光,能够监控扩增产物的生成量。该方法不需要设计、合成对靶标特异的荧光标记探针,能够简便地用于各种各样的靶标的测定。

[0218] 另外,在需要对很相似的序列进行区别、检测的情况下,或在进行SNPs的分型的情况下,采用荧光标记探针法。作为一例,有将用荧光物质修饰5'末端、用猝灭物质修饰3'末端的寡聚核苷酸用作探针的TaqMan(注册商标)探针法。

[0219] TaqMan探针在退火阶段与模板DNA特异性杂交,但由于在探针上存在猝灭剂,所以即使照射激发光荧光发光也受到抑制。在延伸反应阶段,利用TaqDNA聚合酶具有的5'→3'核酸外切酶活性,与模板杂交的TaqMan探针被分解,则荧光色素会从探针游离,由猝灭剂产生的抑制被解除而发出荧光。通过测定该荧光强度,能够监控扩增产物的生成量。

[0220] 以下叙述通过这样的方法用实时PCR对DNA进行定量的原理。首先,将进行了系列稀释的已知浓度的标准样品用作模板来进行PCR。然后,求出达到一定的扩增产物量的循环数(threshold cycle;Ct值)。以该Ct值作为横轴,以初始的DNA量作为纵轴作图,制作出标准曲线。

[0221] 关于未知浓度的样品,也在同样条件下进行PCR反应并求出Ct值。从该值和前述的标准曲线能够测定样品中的目标DNA量。

[0222] 此外,在嵌入剂法中将包含荧光色素的PCR反应后的液体从40℃缓慢地提高温度至95℃左右,连续地监控荧光强度,则能够得到扩增产物的熔解曲线。

[0223] 核酸扩增反应中产生的双链DNA基于DNA的长度及其碱基序列而具有固有的T_m值。即,若使含有结合了荧光色素的DNA的液滴的温度缓慢上升,则可以观测到荧光强度急剧减少的温度。若调查荧光强度的变化量,其温度峰与由碱基序列和长度所规定的T_m值大体上一致。由此,能够从视为阳性的数据中排除不是目标基因而是例如产生引物二聚体而观测到的数据等(即假阳性数据)。在基因检查中,由于多因试样中的夹杂物而产生非特异反应,因此排除这样的假阳性很重要。由此,也能够判断生成的扩增产物是否是靶基因固有的。

[0224] [3-3-5.其它水系液体]

[0225] 关于上述以外的任何反应和处理,本领域技术人员能够容易决定各个水系液体的组成。另外,在对象成分为上述核酸以外的情况下,本领域技术人员也能够容易决定各个水系液体的组成。

[0226] [4.操作管的制作方法]

[0227] 作为操作管的制作方法,根据准备所要收纳作为操作用介质的多个层的管的状态,可以举出下述两种方法。

[0228] [4-1.在一根操作管的制作中准备一根管的情况]

[0229] 作为进行该制作方法的情况,适用于以下情况:以一体形成的状态准备管的情况、或者管由操作用管部a和回收用管部b构成且以管部a和管部b连结的状态进行准备的情况。

[0230] 在一根管内,从下部闭口端以必要的顺序以必要的水系液体和凝胶交替层叠的方式进行填充从而形成操作用介质,从而能够制作操作管。

[0231] 在管由操作用管部a和回收用管部b构成的情况下,首先,在用于构成回收部B所需要的回收用介质的收纳、即水系液体的收纳、凝胶的收纳、或水系液体层与凝胶层的多层形成完成的时刻,回收部B完成。此外,通过用于构成操作部A所需要的操作用介质的收纳、即形成水系液体层和凝胶层的多个层,由此操作部A完成。

[0232] 关于交替地层叠水系液体和凝胶而形成多个层的更具体的方法,本领域技术人员能够基于后述4-2的情况下的层叠方法而适宜进行。

[0233] 需要说明的是,在收纳必要的水系液体和/或凝胶后,作为上部开口端的试样供给部可以适宜封闭。

[0234] [4-2.在一根操作管的制作中准备多根管的情况]

[0235] 作为进行该制作方法的情况,适用的情况如下:以管由操作用管部a和回收用管部b构成、且以管部a和管部b独立的状态准备的情况。该情况下,通过分别在管部a内和管部b内收纳必要的水系液体和/或凝胶而分别制作操作部A和回收部B,并将所制作的操作部A和回收部B相互连结,由此能够制作操作管。

[0236] 关于操作部A的制作方法的概要,示意性地示于图2。构成水系液体层的水系液体L(例如清洗液)收纳于容器,构成凝胶层的凝胶G以溶胶状态收纳于其它容器。图2中,例如在70℃的恒温浴21中加热,由此保持溶胶状态。在管部a的下部开口端被按压于按压用垫22而封闭的状态下来准备。

[0237] 向管部a内的送液系统包括:从收纳有水系液体L和溶胶化凝胶G的容器内分别伸出的用于输送水系液体L或溶胶化凝胶G的管23和23'、连接有管23'的送液单元24(图2中为蠕动泵)和用于将由送液单元送来的管内的液状物质填充到管部a内的针25。针25优选具有通过插入管部a而到达管部a内的最底部的程度的长度。

[0238] 图2中,从收纳有水系液体L的容器内伸出的管23和从收纳有溶胶化凝胶G的容器内伸出的管23与转换阀26连接。该情况下,通过阀26的转换,能够将不同的液状物质(水系液体L和溶胶化凝胶G)分别输送至相同的管23'和相同的针25。关于该形态,由于利用一根插入管部a内的针即可,因此在管部a的内径比较小的情况下能够优选使用。

[0239] 另一方面,也可以不使用转换阀26而使从容器内至针的送液通路全部独立。例如在制作与图2相同的操作部A的情况下,能够构成为:从收纳有水系液体的容器内伸出的管和与该管连结的针、以及从收纳有溶胶化凝胶的容器内伸出的管和与该管连结的针的两条送液通路。该形态中,能够在管部a内插入两根针,因此在管部a的内径比较大的情况下能够优选使用。

[0240] 如图2的(1)~(3)中依次所示,向管部a内由溶胶化凝胶G起依次交替输送并填充溶胶化凝胶G和水系液体L。针25的前端随着管部a内的液面上升而上升。溶胶化凝胶填充后,如图2的(2)所示在层叠水系液体L时,可以使先填充的溶胶化凝胶完全凝胶化,也可以不完全凝胶化。从收纳有溶胶化凝胶G的容器内输送的液状物质在从插入管部a内的针25向管部a内放出时,与热源(图2中为恒温浴21)分离,因此通常能够成为粘弹性高的凝胶-溶胶的中间状态。因此,在层叠水系液体的层时,即使不使之前的层2完全凝胶化,凝胶2g对管部a内壁的接触阻力发挥作用,比重比较轻的凝胶2g也不会浮起。

[0241] 这样,通过将溶胶化凝胶G和水系液体L交替地输送到管部a内,形成必要数量的层,能够得到操作部A。

[0242] 回收部B能够通过收纳必要的水系液体或凝胶而获得。或者,回收部B能够除了不使用按压用垫以外,利用与上述同样的方法,适宜地以必要的顺序形成水系液体层和凝胶层的多个层而获得。

[0243] 将如上得到的操作部A和回收部B相互连结。关于操作部A,为了不使内容物滑落而倾斜管部a,取下按压用垫,以倾斜的状态或横倒的状态连结回收部B即可。作为连结的形态,可以将管部a和管部b缠绕胶带等,也可以使用分别形成有能够相互连结的连结部的管部a和管部b并将两连结部连结。

[0244] 需要说明的是,在收纳了必要的水系液体和/或凝胶后,作为操作用管部a的上部开口端的试样供给部可以适宜封闭。作为封闭的时机,可以是制作操作部A后且连结操作部A和回收部B前,也可以是连结操作部A和回收部B后。

[0245] [5.磁性体颗粒]

[0246] 磁性体颗粒用于通过来自操作管外的磁场的变动而使操作管内的对象成分与附带的少量的液体块一起被带领从而移动。用于通过这样的移动而能够进行特定成分的分

离、回收、精制的磁性体颗粒通常在其表面具有化学官能团。磁性体颗粒也可以不预先收纳于操作管内(图1的(1)和图1的(2)),也可以预先收纳于操作管内(图1的(3)、图3和图4)。预先收纳于操作管内的情况下,能够包含在构成最上层的水系液体中。磁性体颗粒不预先收纳于操作管内的情况下,在将具有对象成分的试样供给到操作管内时,磁性体颗粒也被供给到操作管内。

[0247] 磁性体颗粒只要是对磁力有反应的颗粒则没有特别限定,例如,可以举出具有磁铁矿、 γ -氧化铁、锰锌铁氧体等磁性体的颗粒。另外,磁性体颗粒可以具有与供给于上述处理或反应的对象成分特异性结合的化学结构、例如氨基、羧基、环氧基、抗生物素蛋白、生物素、地高辛、A蛋白、G蛋白、络合物化的金属离子、或者具备抗体的表面,也可以具有利用静电力、范德华力而与对象成分特异性结合的表面。由此,能够使供给到反应或处理的对象成分选择性地吸附到磁性体颗粒。

[0248] 作为磁性体颗粒表面所具有的亲水性基团,可以举出羟基、氨基、羧基、磷酸基、磺酸基等。

[0249] 除了上述以外,磁性体颗粒还能够包括由本领域技术人员适宜选择的各种要素来构成。例如,作为表面具有亲水性基团的磁性体颗粒的具体形态,优选可以举出由磁性体与二氧化硅和/或阴离子交换树脂的混合物构成的颗粒、用二氧化硅和/或阴离子交换树脂覆盖表面的磁性体颗粒、介由巯基用具有亲水性基团的金覆盖表面的磁性体颗粒、含有磁性体并且介由巯基在表面具有亲水性基团的金颗粒等。

[0250] 作为表面具有亲水性基团的磁性体颗粒的大小,平均粒径能够为 $0.1\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 左右。若平均粒径小,则磁性体颗粒在水系液体层中由磁场释放时容易以分散的状态存在。

[0251] 作为磁性体颗粒市售的例子,可以举出作为东洋纺销售的Plasmid DNA Purification Kit MagExtractor-Plasmid-的构成试剂的、用于核酸提取的、涂布了二氧化硅的磁珠(Magnetic Beads)。在这样作为试剂盒的构成试剂销售的情况下,由于包含磁性体颗粒的制品原液含有保存液等,因而优选通过用纯水(例如10倍量左右)悬浮来清洗。该清洗中,在用纯水悬浮后,能够通过离心操作或利用磁体所产生的凝聚而除去上清来进行,并且能够反复进行悬浮和上清除去。

[0252] 需要说明的是,关于为了使磁性体颗粒移动而提供磁场的变动的磁场施加单元,在后述的项目8中详细说明。

[0253] [6.在管内操作对象成分的方法]

[0254] 将操作管内的对象成分的操作示于图3的(0)~(14)和图4的(0)~(7)。以下,基于图3和图4进行说明。

[0255] [6-1.向操作管内的试样的供给]

[0256] 在使用操作管时,从试剂供给口5供给包含对象成分的试样32(图3的(1)和图4的(1))。通常,试样以液状的形态供给。试样供给可以利用注射器等以手动方式进行,也可以通过使用移液器等的分注机自动控制来进行。试样供给能够在将操作管用适当的保持单元(未图示;需要说明的是,关于用于保持操作管的保持单元,在后述的项目7中详细说明。)立起的状态下进行。

[0257] 在操作管内的最上层,得到包含含有对象成分的试样32、磁性体颗粒6和水系液体31₁的水系液体混合物33。更具体地说,这样的水系液体混合物能够如下获得。

[0258] 例如,在收纳于操作管内的最上层包含水系液体的情况下,可以将试样与磁性体颗粒一起供给到操作管内,也可以将试样与水系液体和悬浮的磁性体颗粒一起供给到操作管内。由此,能够由最上层中的水系液体得到水系液体混合物。

[0259] 另外,例如,在收纳于操作管内的最上层含有包含磁性体颗粒的水系液体的情况下(相当于图3和图4例示的情况),可以仅将试样供给到操作管内,也可以将试样与水系液体一起供给到操作管内。由此,能够由最上层中的包含磁性体颗粒的水系液体得到水系液体混合物。

[0260] 此外,例如,在收纳于操作管内的最上层包含凝胶的情况下,可以将试样与水系液体和磁性体颗粒一起供给到操作管内。由此,在所述凝胶层上,能够重新形成水系液体混合物作为最上层。

[0261] [6-2. 操作管内的操作]

[0262] 供给试样并在最上层制备了包含试样和磁性颗粒的水系液体混合物的操作管能够在保持单元立起的状态直接安装到器件,或者能够以转移到器件内专用的保持单元的要领安装到器件。在器件内,通过从外部使磁场施加单元(例如直径1mm~5mm、长度5mm~30mm的圆筒形钕磁体)31接近操作管1而产生磁场,使分散于水系液体混合物层31₁的磁性体颗粒6与对象成分一起凝聚(图3的(2)和图4的(2))。此时,水系液体混合物层31₁中含有的不要成分也能够一起凝聚。通过使磁场施加单元31以每秒0.5mm~10mm的速度向下移动,从而将带领对象成分的磁性体颗粒从水系液体混合物层31₁经由与其接触的正下方的凝胶层3g₁(图3的(3)和图4的(3))而向与凝胶层3g₁接触的正下方的水系液体层31₂搬运(图3的(4)和图4的(4))。需要说明的是,通过凝胶层3g₁的磁性体颗粒在通过前被所供给的水系液体混合物层31₁的水系液体混合物薄薄地涂布,因此除了对象成分以外虽然浓度低但也伴随着夹杂成分。这样的磁性体颗粒进而被搬运至水系液体层31₂。

[0263] 本领域技术人员可以根据磁性颗粒的量、操作管的内径和外径、凝胶塞的状态等适宜决定磁体的大小和移动速度。

[0264] 进而,利用磁场施加单元31根据需要重复从水系液体层31₂经由凝胶层向其它水系液体层搬运。“根据需要重复”是指原则上仅在从上至下的一个方向使磁性体颗粒移动,从而可以进行与层的数量对应的数量的搬运操作(图3的(4)~(13)和图4的(4)~(7)),也可以不仅在从上至下的一个方向而适宜从下方返回上方的方向,从而可以进行与层的数量对应的数量以上的搬运操作。即,搬运目的地的其它水系液体层可以存在于原搬运处的水系液体层上,也可以存在于搬运原处的水系液体层下。

[0265] 通过重复这样的搬运操作,与对象成分一起被磁性体颗粒搬运的夹杂成分的量无限接近于零。虽然伴随对象成分的磁性体颗粒伴随极少的清洗液,但是颗粒表面的对象成分被精制至不会对之后的分析工序等带来障碍的水平。这样,仅通过磁场操作即可非常有效地进行对象成分的精制。

[0266] 另外,在水系液体层中,从提高处理效率的观点来看,优选以带领对象成分(具体地说,包括附带不要成分等的对象成分的情况和除去了不要成分的对象成分的情况)的磁性体颗粒能够与水系液体充分接触的方式操作。作为用于更有效地进行这样的操作的方法之一,可以举出在水系液体层中在磁性体颗粒通过磁场的施加而凝聚的状态下使磁场施加单元上下运动的方法。作为其它方法,可以举出以下方法:在水系液体层中,由受到磁性体

颗粒所产生的磁场的施加的磁性体颗粒释放磁场,由此使因磁场的施加而凝聚的磁性体颗粒自然扩散。

[0267] 作为具体例,如图3的(4)所示,通过暂时使磁场施加单元31从操作管1远离而将磁场遮断或减弱,在清洗液层31₂中使磁性体颗粒分散。由此,吸附于磁性体颗粒的对象成分与附带成分一起充分暴露于清洗液31₂中而被清洗。如图3的(5)所示,通过再次使磁场施加单元31接近操作管1,从而使磁性体颗粒与对象成分一起凝聚,成为能够搬运的状态。进而使磁场施加单元31向下移动,由此如图3的(6)所示同样地被搬运至正下方的凝胶层3g₂。在图3的(6)中的凝胶层3g₂内的磁性体颗粒和对象成分中,通过图3的(4)中的清洗,与图3的(3)中的凝胶层3g₁内的磁性体颗粒和对象成分的相比,附带成分的一部分或大部分被除去。

[0268] 另外,在收纳于回收部B的层中使对象物质从磁性体颗粒分离后,通过使已经与对象物质分离的磁性体颗粒从进行了所述对象物质的分离的层移动至其它层(例如图3中(13)~(14)),在回收部中,能够以从磁性体颗粒洗脱的状态回收对象物质。

[0269] [6-3. 核酸提取]

[0270] 例如磁性颗粒表面具有二氧化硅覆膜的情况下,如图3所示,生物体试样被供给至包含表面活性剂和硫氰酸胍等离液盐(chaotropic salt)的细胞溶解液31₁中,从而使核酸从细胞游离(图3的(1))。游离的核酸能够特异性地吸附于颗粒的二氧化硅表面。吸附的核酸保持伴随着反应抑制成分的状态,因而无法用作基因扩增反应的模板。因此,在表面吸附有核酸的状态下用清洗液31₂清洗磁性颗粒。此时为了不将反应抑制成分大量带入清洗液中,利用磁体31集中磁性体颗粒6(图3的(2))并使其通过隔开细胞溶解液31₁和清洗液31₂的凝胶塞3g₁中(图3的(3))。在磁性体颗粒通过凝胶塞3g₁内时,基本上能够不带领液体组分地到达清洗液31₂(图3的(4))。因此,能够以高效率实施磁性颗粒的清洗。通过重复磁性体颗粒的进一步在凝胶塞(3g₂、3g₃)内的通过和向清洗液(31₃、31₄)的搬运(图3的(5)~(10)),能够提高核酸的精制度。以吸附于磁性体颗粒表面的状态精制的核酸被磁体再次集中(图2的(11))并通过凝胶塞2g内(图3的(12)),被搬运至洗脱液4中(图3的(13))。在洗脱液4中核酸从磁性体颗粒分离并在洗脱液中洗脱。不希望混入磁性体颗粒的情况下,洗脱了核酸的磁性体颗粒再次停留在凝胶塞2g中,回收部B残留洗脱后的精制核酸(图3的(14))。这样得到的核酸作为能够用作核酸扩增反应分析的模板核酸。通过将操作管的回收部B从操作部A卸下,所得到的核酸能够供给到下一操作(利用核酸扩增反应进行分析的工序)。

[0271] [6-4. 核酸合成和分析]

[0272] 另外,如图4所示,操作管的操作部A的管部a和回收部B的管部b一体成型,使用具有与图3中相同的操作部A和收纳有被凝胶塞4g隔开的RT反应液41₁和PCR反应液41₂的回收部B的操作管的情况下,在进行与图3的(1)~(12)相同的操作(图4的(1)~(5))后,磁性颗粒6以吸附了精制的核酸(RNA)的状态被运至RT反应液41₁,进行RT反应(图4的(7))。RT反应终止后,磁性颗粒也吸附通过RT反应得到的DNA(成为PCR反应的模板)吸附并通过凝胶塞4g中,被运至PCR反应液41₂进行PCR反应(图4的(7))。PCR产物能够通过利用荧光色素的实时检测法或利用终点检测法的荧光检测法进行分析。

[0273] 需要说明的是,图4中,42和43示意性地示出温度控制功能。42的温度控制功能的更具体的例子在后述的项目8-2-6中说明,43的温度控制功能的更具体的例子在后述的项

目7-3中说明。

[0274] 在多个操作管内同时进行上述那样的操作的情况下,能够如图5中记载的那样进行多通道化。图5所例示的器件为以具有磁体移动机构的磁场施加单元(可动磁体板53)和带有温度控制功能的保持基板(温度控制块体51)作为主要单元的简单构成。关于各个构成,在后述的项目7和8中说明。

[0275] [6-5.蛋白质的合成、分离和分析]

[0276] [6-5-1.使用水凝胶(P-凝胶)的蛋白质合成]

[0277] 以聚二甲基硅氧烷作为基剂的无细胞蛋白质合成系统(cell-free protein synthesis)发表于前述的参考文献(Nature materials 8,432-437,2009)中。该无细胞蛋白质合成系统在通用的试管中进行,但是在本发明的操作管内也能够构筑这样的无细胞蛋白质合成系统。

[0278] [6-5-2.利用目标蛋白质和其它蛋白质的相互作用的分析]

[0279] 利用了基于蛋白质和以其为靶标制造的抗体(这也是蛋白质)的抗原抗体反应的蛋白质的分离、回收单元已经以市售精制试剂盒存在。它们利用使用了通用的管和离心机的方案实施。在上述无细胞蛋白质系统中,合成的蛋白质的分离也可以使用不同于试管的离心柱。

[0280] 本发明中,通过采用表面固定有目标蛋白质的抗体的磁性体颗粒,不使目标蛋白质在不同的器件间移动,而能够在在一个操作管内进行目标蛋白质的分离和取得。

[0281] [6-5-3.蛋白质吸附于磁性体颗粒的状态下的质谱分析]

[0282] 在表面涂布有二氧化钛的磁性体颗粒上吸附另外制备的用于质谱分析的蛋白质、以该状态与基质混合并用质谱分析仪分析的手法记载于参考文献(Analytical Chemistry,77,5912-5919,2005)等中。本发明中,所要进行质谱分析的蛋白质的制备和在磁性体颗粒上的吸附能够在在一个操作管内进行。

[0283] [7.保持单元]

[0284] 操作管通常以使用时作为开口部的试样供给部向上的方式以大致垂直状(即以立起的状态)设置。设置能够使用适当的保持单元。并且,保持单元在试样供给时和对对象成分操作时可以使用相同的保持单元,也可以使用不同的保持单元。在试样供给时和对对象成分操作时使用不同的保持单元的情况下,保持单元间的操作管的转变可以是手动的,也可以自动化。

[0285] [7-1.保持的形态]

[0286] 作为保持单元,通常只要作为操作管的开口部的试样供给部能够以向上的方式大致垂直状地(即以立起的状态)保持则没有特别限定。例如,可以举出如下构成的架等,但不限于这些,所述架将形成有通过将操作管的闭口端部刺进而能够保持的保持孔的保持构件组合1个或2个以上,或者将线状构件以形成作为保持孔的格子孔的方式以格子状交叉而构成。在上述前者的情况中,形成于保持构件的保持孔可以贯通,也可以不贯通。保持孔的内径基于所保持的操作管的外径而决定。在保持构件中,保持操作管的闭口端部的保持构件记为保持基板。在保持基板中,保持孔能够以保持部B的闭口端不穿透保持基板的方式(即保持孔自身不贯通保持基板)形成。保持孔的深度基于操作管中的想要保持的范围而适宜决定。

[0287] [7-2. 多个操作管的保持]

[0288] 本发明的操作管细长, 立起时每一根的设置面积积极小, 因此即便是小的设置面积, 也能够以密集状态直立设置多个操作管。由此, 能够同时操作多个操作管。即, 能够实现操作的多通道化。

[0289] 将该形态的一例示于图5。在图5的器件中, 最多能够同时处理20根操作管。当然, 根据器件的规格, 还能够处理更多的操作管。例如, 若具有标准的96孔板大的设置面积, 最多能够立起96根操作管, 由此最多能够进行96检测体的同时处理。另外, 由于操作管一根一根是独立的, 因此在上述例子中, 能够根据检测体数而任意地加减操作管的数量。这样的形态特别是在检测体数少且其数量也不一定的POCT(即时检验(Point Of Care Testing))用途中 useful。

[0290] 在直立设置多个操作管的情况下, 例如如图5的51所示, 保持基板能够形成有多个保持孔52。保持孔根据使操作管密集的形态而异, 例如能够以阵列状(即一维状、一列)或如图5所示以矩阵状(即二维状)形成。保持孔52的间隔能够基于操作管的密集度而适宜决定。另外, 保持孔52所保持的操作管在试样供给部具有更大的内径的情况下, 保持孔52的间隔能够基于试样供给部的外径而适宜决定。

[0291] [7-3. 温度控制功能]

[0292] 另外, 保持单元可以具有温度控制功能。更具体地说, 保持单元可以在保持回收部B的至少一部分的部位具有温度控制功能。例如图4中, 将温度控制功能作为43而示意性地示出。更具体地说, 保持基板在保持孔保持回收部B的闭口端部的情况下, 在该保持的部位能够具有温度控制功能。例如图5所示的保持基板51在保持孔52保持回收部B的闭口端部, 保持基板51自身可以由温度控制块体形成。利用温度控制功能, 能够在收纳于回收部B的至少下端的水系液体内进行需要温度控制的处理或反应。本发明中, 例如在回收部B进行核酸扩增反应的情况下, 优选使用该形态。

[0293] [7-4. 光学检测口]

[0294] 此外, 保持基板可以具有光学检测口。光学检测口能够向回收部B内照射激发光, 是为了检测在回收部B中的处理或反应中发出的来自对象成分或与其关联的信号的信号而设置的。例如如图7所示, 光学检测口能够以使保持基板从保持孔52的下端贯通、且具有比保持孔52所保持的管部b的外径小的口径的方式形成光学检测口71。光学检测口71能够设置有光学检测单元(图7中包含荧光检测用透镜44和光纤电缆45而构成)。光学检测口的位置不限于图7, 可以考虑从例如回收部侧面测光。

[0295] [8. 磁场施加单元]

[0296] 关于带来用于使操作管内的磁性体颗粒与对象成分一起移动的磁场变动的磁场施加单元和其所具有的磁场移动机构, 没有特别限定。作为磁场施加单元, 能够使用永久磁体(例如铁氧体磁体或钕磁体)及电磁体等磁力源。磁场施加单元能够在操作管的外侧使分散于操作管内的水系液体层中的磁性体颗粒在管的搬运面侧凝聚, 并且能够以可以搬运操作管内的凝胶层中凝聚的磁性体颗粒的程度接近操作管而配置。由此, 磁场施加单元能够隔着管的搬运面对磁性体颗粒有效地产生磁场, 能够与磁性体颗粒块一起捕捉和搬运对象成分。

[0297] [8-1. 形状]

[0298] 对磁场施加单元的形状没有特别限定。例如,可以是能够使操作管的一点或一部分产生磁场的块状形状(例如作为图3或图4的磁体31例示)。更具体地说,能够为圆筒形(例如直径1mm~5mm、厚度5mm~30mm)。在这样的形状的情况下,磁场施加单元能够通过附加到操作管的外周的一点或一部分而在操作管内部产生磁场。另一方面,磁场施加单元可以是能够使横截面为大致圆形的操作管的周围产生磁场的、中心具有大致圆形孔的环状的磁体。在这样的形状的情况下,磁场施加单元通过使操作管通过该环的中心大致圆形孔,从而能够在操作管内部产生磁场。该情况下,具有环状的形状的磁场施加单元包围操作管,因此若磁性体颗粒凝聚,则磁性体颗粒也跟随磁场施加单元的形状而形成环状。另一方面,若磁场施加单元的形状为块状,则磁性体颗粒的凝聚形状也成为块状。即,在使用具有环状的形状的磁场施加单元的情况下,由于磁性体颗粒与水系液体的接触面积更大,因而能够使吸附于磁性体颗粒的对象成分等更有效地暴露于构成水系液体层的液体中,从这点出发是优选的。

[0299] [8-2. 磁场移动机构]

[0300] [8-2-1. 向操作管的长度方向的移动]

[0301] 作为磁场施加单元所具有的磁场移动机构,例如,可以是在能够保持磁性体颗粒的凝聚形态的状态下能够使磁场在操作管的长度方向(轴方向、至少下方向)移动的磁场移动机构。以下记为磁场移动机构的情况下,该机构能够进行停止位置的决定和移动速度的控制,该控制可以手动进行,也可以利用计算机等自动进行。移动速度例如为每秒0.5mm~10mm。

[0302] 磁场移动机构优选能够以物理方式在操作管的长度方向移动磁场施加单元自身。磁场移动机构能够在上下方向移动图3及图4所示那样的磁场施加单元(图3和图4中永久磁体31)自身。另外,在图5所示那样的能够密集多个操作管的器件中,也能够能够在上下方向移动磁场施加单元(图5中可动磁体板53)(磁场移动机构自身均未图示)。

[0303] [8-2-2. 磁场的强度的控制]

[0304] 磁场施加单元所具有的磁场移动机构可以是能够可变控制向磁性体颗粒施加的磁场的强度的磁场移动机构。具体地说,磁场能够遮断或减弱。磁场的遮断或减弱的程度优选为凝聚的磁性体颗粒群能够在液滴中分散(前述项目6-2)的程度。

[0305] 例如,若为电磁体的情况下,能够使用通电控制单元将磁场遮断。

[0306] 另外,例如,若为永久磁体的情况下,能够使用能够使配置于操作管外侧的磁体从操作管远离的机构。该机构可以手动控制,也可以自动控制。通过减弱向磁性体颗粒的磁场、优选从磁场释放磁性体颗粒,从而能够在水系液体层中使磁性体颗粒群自然分散。由此,能够使吸附于磁性体颗粒的对象成分及附带成分充分暴露于构成水系液体层的液体中。

[0307] [8-2-3. 多个操作管密集的器件的情况]

[0308] 如图5所例示那样在使多根操作管1密集的器件中,与多个操作管对应的多个磁力源能够通过单元化成能够在操作管的长度方向移动的一个构件而被保持。如图5所例示的那样,这样单元化的构件能够作为能够在操作管1的长度方向移动的磁场施加单元即可动磁体板53而体现。如图6所例示那样,图5的可动磁体板53包含能够在操作管的长度方向移动的可动基板和保持于该可动基板中的磁力源(磁体31)而构成,能够以配置有与各个操作

管对应的多个磁体31的状态被保持。

[0309] 另外,所述构件可以具有前述保持单元那样的保持操作管的功能,也可以不具有。在图5所例示的情况下,通过在可动磁体板53形成与操作管1对应的保持孔54,还能够具有保持功能。

[0310] 需要说明的是,在图6的例示中,磁场施加单元以块状示出,但是磁场施加单元也可以为具有与保持孔54对应的中空的一环状。

[0311] 如图5所例示那样在使多根操作管1密集的器件中,磁场施加单元所具有的磁场移动机构能够在多个操作管中的各管中利用磁场施加单元同时进行磁场的强度的控制。例如,在对多个操作管中的各管使用不同的多个磁场施加单元时,磁场移动机构能够同时控制由所述多个磁场施加单元所带来的磁场。

[0312] 在这样的构件中,使用电磁体作为磁场施加单元的情况下,磁场的控制能够利用电流控制进行。

[0313] 另一方面,使用永久磁体作为磁场施加单元的情况下,在上述构件中,例如,能够具有下述机构:能够使构件自身接近操作管或从操作管远离(例如在操作管的长度方向大致垂直地移动),或者在中间插入磁屏蔽材料,或者构件自身不动而使保持于构件的多个磁场施加单元暂时接近操作管或从操作管远离。

[0314] 如图6所例示的那样,图5的可动磁体板53能够以配置有与保持于保持孔54的各个操作管对应的磁体31的状态收纳于磁体保持部61。磁体保持部61形成为允许可动磁体板53中的磁体31的移动(即,使磁体31接近操作管或从操作管远离的动作)的大小。如图6所例示那样,能够将多个磁体31彼此用连结棒62相互连结,并使全部连结棒62与拉手构件63结合。通过移动拉手构件63,如图6所示,能够使全部磁体接近操作管(磁场施加状态)和从操作管远离(磁场释放状态)。

[0315] 需要说明的是,在磁体为环状且使用该磁体进行磁场的强度的控制的情况下,例如,作为环状磁体,能够使用通过由两个以上的弧状的磁体零件构成而形成环状的磁体。这样的环状磁体通过在直径方向大致垂直地分割,从而能够使操作管从磁场释放。

[0316] [8-2-4.能够保持回收部B的保持单元中的磁场施加单元的移动]

[0317] 保持单元能够具有磁场施加单元能够向管部b的长度方向移动的凹处。更具体地说,保持单元能够在保持回收部B的部位具有磁场施加单元能够向管部b的长度方向移动的凹处。在该凹处中移动的磁场施加单元可以与对操作部A中的操作做出贡献的磁场施加单元相同,也可以不同。例如,如图7的(1)所示,在设置有保持孔52的保持基板51(图7中,保持基板51由温度控制块体构成)中形成有凹处72,在该凹处预先收纳有磁体31'。配置磁体31的可动磁体板53逐渐下降,如图7的(2)所示,可动磁体板53与保持基板51接触,成为无法再向下移动的状态。即,成为无法利用磁体31使磁性体颗粒6再向下搬运的样态。此时,通过可动磁体板53中的磁体31带来的磁场,收纳于保持基板51的凹处72的磁体31'被磁体31吸引。并且,操作管1内的磁性体颗粒6被磁体31和磁体31'两者所吸引。接着,如图7的(3)所示,若使可动磁体板53中的磁体31从操作管1远离,则磁体31'从磁体31所产生的磁场释放,因此通过重力而落到凹处72内。此时,操作管1内的磁性体颗粒通过受到磁体31'的磁场的影响而一同被搬运至回收部B内的水系液体41₂中,能够降低至回收部B内的底附近。这样,利用磁体31和磁体31'进行磁性体颗粒的交接,能够使伴随对象成分的磁性体颗粒充分暴露于

操作管内的最下层内。

[0318] [8-2-5.磁场的摇动]

[0319] 磁场移动机构可以具备能够进行磁场的振荡、旋转等摇动运动的机构。例如通过具备能够使磁力源在操作管的长度方向进行振荡(上下运动)的功能,能够代替搅拌器使用。由此,水系液体中的混合及搅拌变得容易。

[0320] 例如即便在不具有磁场的遮断或减弱的功能的情况下,通过在使磁场施加单元接近操作管的状态下(使磁性体颗粒凝聚的状态下)在水系液体层的厚度的范围内、在上下方向往复运动数次,则能够使水系液体中吸附于磁性体颗粒的对象成分等充分暴露于构成水系液体层的液体中。

[0321] [8-2-6.温度控制功能]

[0322] 磁场施加单元还可以具有温度控制功能。例如图4中,作为42而示意性地示出温度控制功能。或者,还能够使磁场施加单元中内置加热器。利用后者的温度控制功能,能够任意调节存在磁性体颗粒的位置的水系液体层中的试剂温度等。

[0323] 例如,举出图4所示的操作管被图7所示的保持单元(保持基板)且为具有上述7-3中记载的温度控制功能的保持单元所保持的情况进行说明。在图4所示的操作管中,回收部B收纳隔着凝胶层4g而包含RT反应液层41₁和PCR反应液层41₂的多个层作为回收用介质。若图4的操作管被图7所示的保持基板51所保持,则被保持基板51的保持孔52直接保持的部分有时大体上仅为相当于操作管的最下层(PCR反应液层41₂)的部分。该情况下,收纳有进行逆转录反应的RT反应液层41₁的部分与被保持基板51直接保持的PCR反应液层41₂分离,因此难以利用保持基板51进行温度控制。

[0324] 因此,在本发明的器件中,能够具备与保持单元中的温度控制功能分开的另外的温度控制功能。例如,如作为图4的42所例示的那样,可以不与磁场施加单元连动,也可以如作为图6的64所例示的那样,通过在作为磁场施加单元的可动磁体板53中内置而与磁场施加单元连动。在图6所示的内置有温度控制功能(加热器)的可动磁体板53的具体形态中,加热器64为包围保持孔54的环状。若这样使可动磁体板53具有温度控制功能,则可动磁体板53在收纳有RT反应液层41₁的位置之处(图7的(1)),RT反应液被可动磁体板53内的加热器64加热,能够实现最适温度(例如50℃)。

[0325] [9.光学检测单元]

[0326] 对光学检测单元没有特别限定,本领域技术人员能够根据提供给对象成分的分析方法而容易地选择。例如,能够使用适宜包含光产生部、检测用单元、光传输单元和个人计算机等而构成的单元。

[0327] 若举出一例,在图4的(7)所示的荧光检测单元41的情况下,如图7中更具体地示出那样,从光产生部(未图示)向安装于检测用单元(检测用透镜44)的光传输单元(光纤电缆45)进行入射,通过检测用透镜44而能够向操作管1内的反应液4进行光照射。利用光纤电缆45将由检测用透镜44检测的光学信号送至光接收元件,变换成电信号后,实时发送到个人计算机(未图示),能够监控反应液4的荧光强度的变化。这在本发明进行实时核酸扩增反应等进行能够变化的荧光强度的检测的反应或处理时合适。

[0328] 作为光产生部,能够使用LED、激光器、灯等。并且,在检测中能够利用从廉价的光电二极管到目标在于更高的灵敏度的光电倍增管等各种光接收元件,没有特别限定。

[0329] 若以进行实时核酸扩增反应等核酸关连反应及核酸关连处理的情况为例,在使用例如SYBR(注册商标)GREEN I的情况下,该色素与双链DNA特异性结合并在525nm附近产生荧光,因此检测单元能够用光学滤波器滤除目标波长以外的光而检测目标波长的光。

[0330] 另外,若以在操作管内利用液滴移动进行核酸扩增反应的情况为例,关于供于核酸扩增反应的液滴的荧光观测,能够在利用DNA聚合酶进行延伸反应(通常68~74℃左右)的温度地点照射激发光,在该地点以停止液滴的状态在暗室内进行。此外,若使激发光的照射范围从进行热变性的温度地点扩大至进行退火的温度地点,则还能够随着移动液滴而得到扩增产物的熔解曲线。

[0331] 实施例

[0332] 接着,举出实施例来更详细地说明本发明,但是本发明并不限于这些实施例。

[0333] [实施例1:由血液的核酸提取和精制]

[0334] 在硅油(Shin-Etsu Silicone KF-56)中以1.2%(重量比)添加凝胶化剂(太阳化学株式会社;TAISET 26),并加热至70℃而完全与硅油混合。从注射针的前端以不产生气泡的方式交替地向图3的(0)所示的操作管(由毛细管(操作部A)和样品管(回收部B)构成)内注入所需量的混合而形成溶胶状态的油与需要的试剂,进行层叠。在使用内径为1.5mm的毛细管的情况下,如图3的(0)所示那样,凝胶塞的形成中装填各10 μ L,清洗液(200mM KCl)装填各15 μ L,洗脱液(10mM Tris HCl,1mM EDTA pH8.0)装填20 μ L。将完成填充的毛细管在室温下放置30分钟,使凝胶塞完全凝胶化。毛细管上端形成了用膜材料封印的漏斗状的试样供给口,并用隔膜密封。

[0335] 毛细管内的最上层为100 μ L的细胞溶解液(4M硫氰酸胍、2%(w/v) Triton X-100和100mM Tris-HCl pH6.3),并包含涂布了二氧化硅的磁性颗粒(核酸提取试剂盒;东洋纺MagExtractor-Plasmid-添附的磁性颗粒)500 μ g。需要说明的是,利用了二氧化硅颗粒和离液盐的核酸的分离方法(日本特开平2-289596)使用由Boom等公开的方法。

[0336] 图3的(1)~(14)是示出按照磁体的每个操作来由血液提取核酸的工序的图。最终核酸被回收至安装到毛细管下端的样品管内的洗脱液中。

[0337] 在图3的(1)中用注射针注入人全血200 μ L,通过移液轻轻地与磁性颗粒一起混合。5分钟后,如图3的(2)和(3)所示,通过从毛细管侧面接近磁体而集中磁性颗粒,使磁体以每秒0.5mm的速度下降。在磁性体颗粒通过凝胶塞后,如图3的(4)所示,使磁体离开毛细管。如图3的(5)至(12)所示,同样地进行3次清洗。之后,如图3的(13)所示使磁体离开,使磁性颗粒落入装有洗脱液的管中。1分钟后,再次使磁体接近而集中磁性颗粒,如图3的(14)所示,后退至凝胶塞中,完成核酸提取和精制的操作。该实施例中每1 μ L洗脱液得到200ng的DNA。

[0338] 从毛细管拆卸样品管,使用样品管内得到的洗脱液1 μ L,使用包含0.15U的Taq DNA聚合酶、各500nM的人GAPDH基因检测用引物(5'-GCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGG-3'(序列号1)和5'-GGCCCTCCGACGCTGCTTCACCA-3'(序列号2))以及200nM dNTP的PCR反应混合物(总反应液量10 μ L),通过热循环仪(ABI 9700Applied Biosystems公司)进行PCR(温度循环:95℃、1秒、60℃、10秒、72℃、10秒、40循环)。其结果,如图8所示,利用琼脂糖凝胶电泳能够确认人GAPDH基因特异的反应产物(片段大小171碱基)。

[0339] [实施例2:由鼻腔拭液的流感病毒的检测]

[0340] 关于图4的(0)所示的操作管(毛细管器件)中的试剂和凝胶的装填,进一步使用逆

转录用反应液(RT反应液)和PCR反应液,除此以外与实施例1同样进行。本实施例中的毛细管器件并非如实施例1那样在毛细管下端安装有回收用样品管,而是使用毛细管下端为封闭状的毛细管器件整体一体成型的器件。若用隔膜堵塞该毛细管器件的试样供给口,则成为带有核酸提取功能的完全密封型的PCR器件。检测通过利用SYBR Green I等荧光色素的实时检测法或利用终点检测法(end-point detection method)的荧光检测法进行。

[0341] 在图4的毛细管器件中的核酸提取中,与图3的(1)至(12)为止同样地进行试样添加和磁体的操作(图4的(1)至(5))。在作为试样的200 μ L的鼻腔拭液中添加100个流感病毒颗粒,尝试是否能够利用RT-PCR从其中检测病毒基因。由于流感病毒的基因组为RNA,因而为了利用PCR对其进行检测,需要变换为DNA,因此在PCR之前使用逆转录酶进行了反应。在图4的(6)的状态下,磁性颗粒表面吸附有包含病毒RNA的核酸。通过逆转录酶和逆转录反应用引物,将病毒RNA变换为DNA。

[0342] 本实施例中使用的逆转录反应液组成根据Invitrogen公司制造的SuperScript III逆转录酶的操作说明书的记载。关于所使用的引物,利用50ng的random hexamer(Roche公司)。反应液量为10 μ L。反应如下进行:使磁体从毛细管离开并使磁性颗粒在反应液内分散后,在25 $^{\circ}$ C孵育5分钟,接着在50 $^{\circ}$ C孵育5分钟。逆转录反应后,用磁体再次集中磁性颗粒,使其移动到最下端的PCR反应液中。之后,实行PCR的温度循环。在实行温度循环的同时,从温度控制块体的底部照射波长470nm的来自LED光源的光,监控SYBR Green I的PCR产物特异的520nm的荧光。

[0343] 本实施例中使用的PCR反应液的组成如下所述:25mM Tris-HCl pH8.3、10mM MgCl₂、0.2% (w/v) BSA、1mM dNTP、各0.5 μ M流感病毒A型检测用引物(5'-GACCRATCCTGTCACCTCTGAC-3'(序列号3))和(5'-AGGCATTYTGACAAAKCGTCTA-3'(序列号4))、0.1U/ μ L Ex Taq DNA聚合酶(TAKARA BIO INC.)。PCR反应液量为5 μ L。PCR温度循环为95 $^{\circ}$ C、1秒、68 $^{\circ}$ C、10秒,为50循环。荧光测定使用冷CCD照相机(cooled CCD camera),在68 $^{\circ}$ C的延伸反应时曝光3秒而进行。使用分析软件“Image J”将其图像数据数值化。将其结果示于图9。如图9所示,从35循环附近观察到SYBR Green I特异的荧光的上升,可知流感病毒基因被扩增和检测。

[0344] 如上所述,虽然已经根据本发明的实施形态对本发明进行了记载,但构成公开的一部分的论述和附图不应理解为对本发明的内容的限定。对本领域技术人员而言,从该公开内容中各种各样的代替实施形态、实施例和运用技术是明显的。本发明的技术范围是从上述说明中由恰当的权利要求所限定的发明特定事项而决定的内容,在实施阶段中,能够以不脱离主旨的范围进行变形和具体化。

[0345] 附图标记说明

- [0346] 1: 操作管
- [0347] 2g: 凝胶层(凝胶塞)
- [0348] 3: 操作用介质(多个层)
- [0349] 3l: 水系液体层
- [0350] 3g: 凝胶层(凝胶塞)
- [0351] 4: 回收用介质(例如洗脱液、反应液)
- [0352] 4l: 水系液体层

- [0353] 4g: 凝胶层(凝胶塞)
- [0354] 5: 试样供给部(开口端)
- [0355] 6: 磁性体颗粒
- [0356] 31: 磁场施加单元(磁体)
- [0357] 32: 试样
- [0358] 33: 水系液体混合物
- [0359] 41: 光学检测单元
- [0360] 42、43: 温度控制功能(加热器)
- [0361] 51: 保持单元(温度控制块体)
- [0362] 52: 保持孔
- [0363] 53: 磁场施加单元(可动磁体板)
- [0364] 54: 保持孔
- [0365] 61: 磁体保持部
- [0366] 64: 温度控制功能(加热器)
- [0367] 71: 光学检测口
- [0368] 72: 凹处
- [0369] 序列表自由文本
- [0370] 序列号1~4为合成引物。

序列表

<110> 株式会社岛津制作所 (SHIMADZU CORPORATION)

<120> 用于在管内操作对象成分的器件和方法

<130> G111077

<150> JP2010-285210

<151> 2010-12-21

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0001] <223> 合成的引物

<400> 1

ggctgcccag gctgtgggc aagg

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 2

ggcctccaga gctgcttc acca

24

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

	<220>		
	<223>	合成的引物	
	<400>	3	
		gaccratctt gtcacctctg ac	22
[0002]	<210>	4	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的引物	
	<400>	4	
		aggcattt ggcctaacg tcta	24

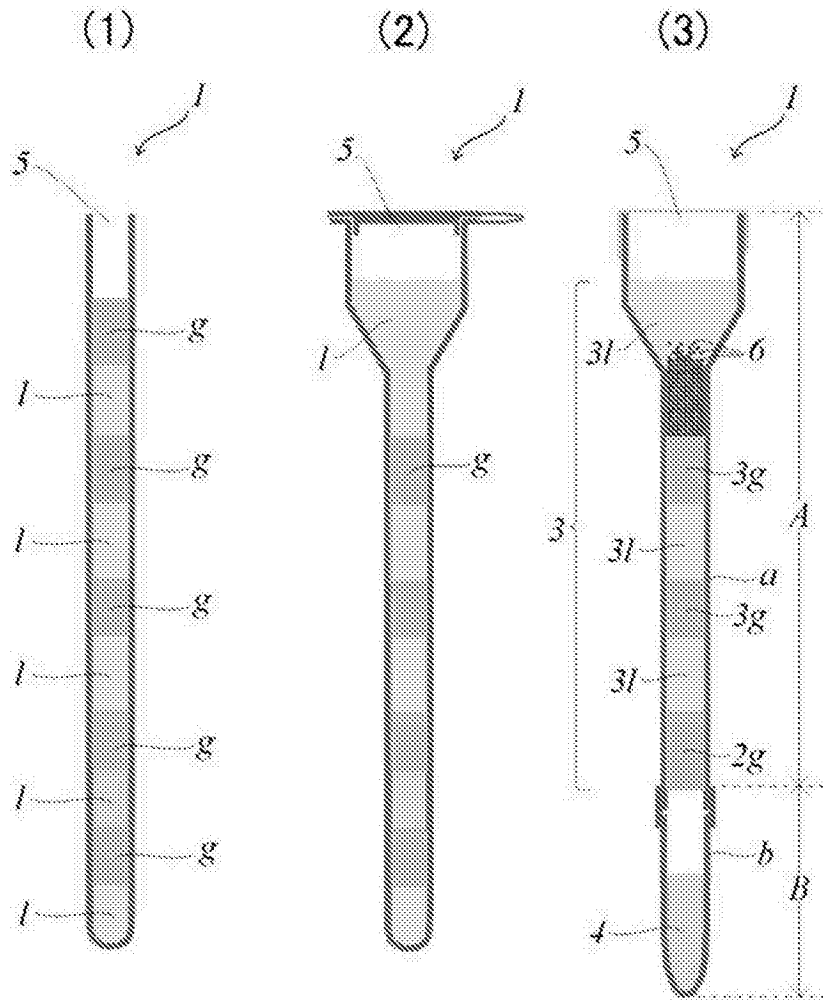


图1

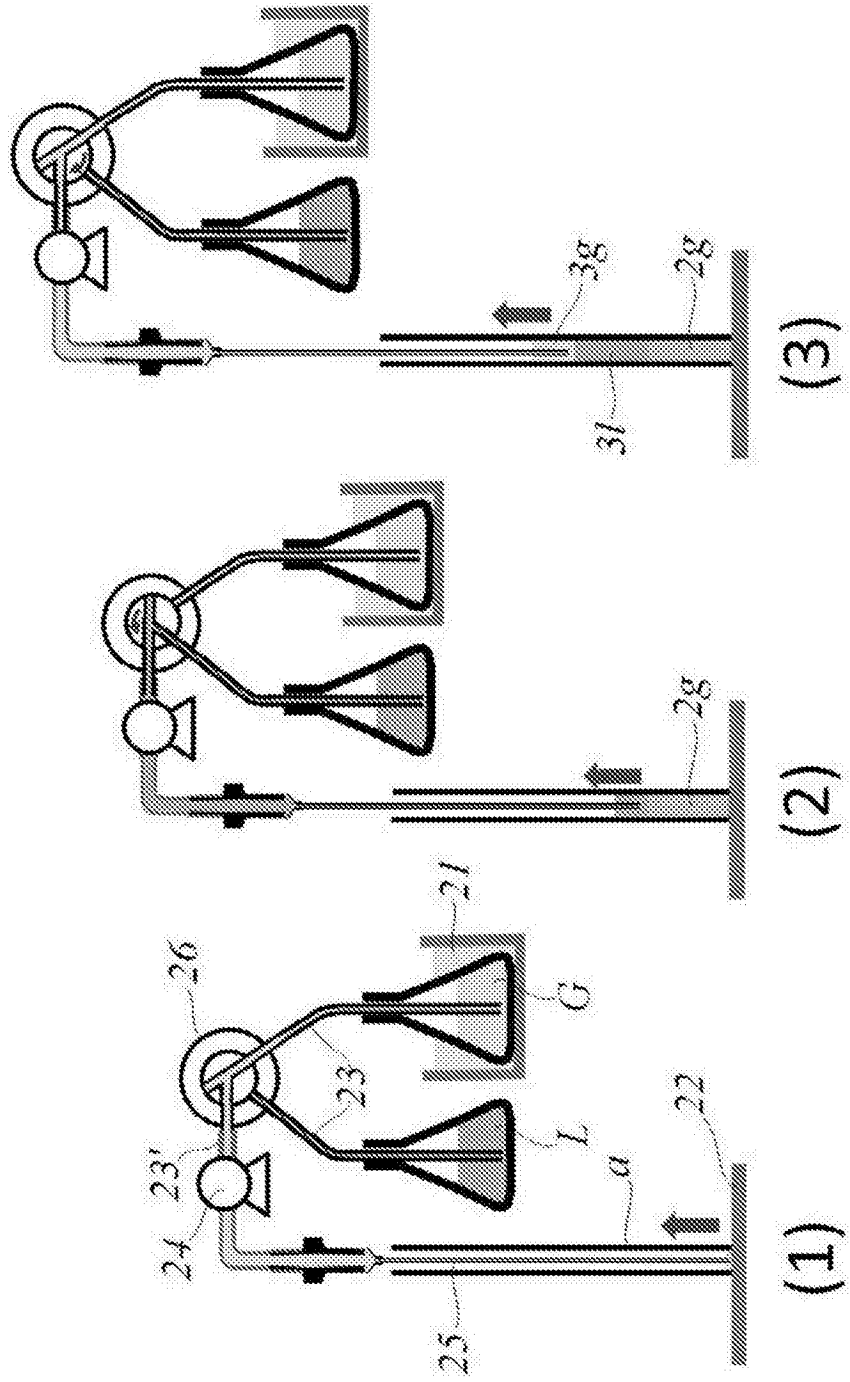


图2

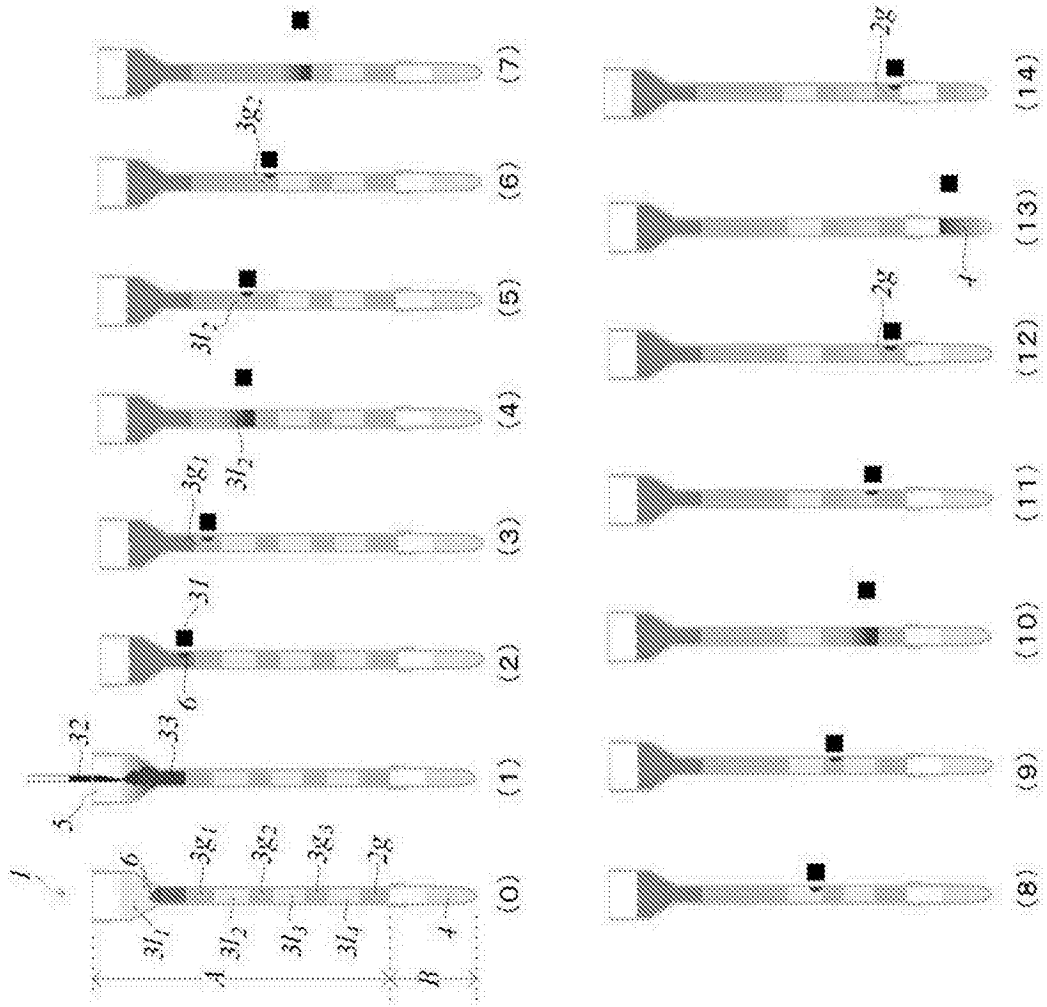


图3

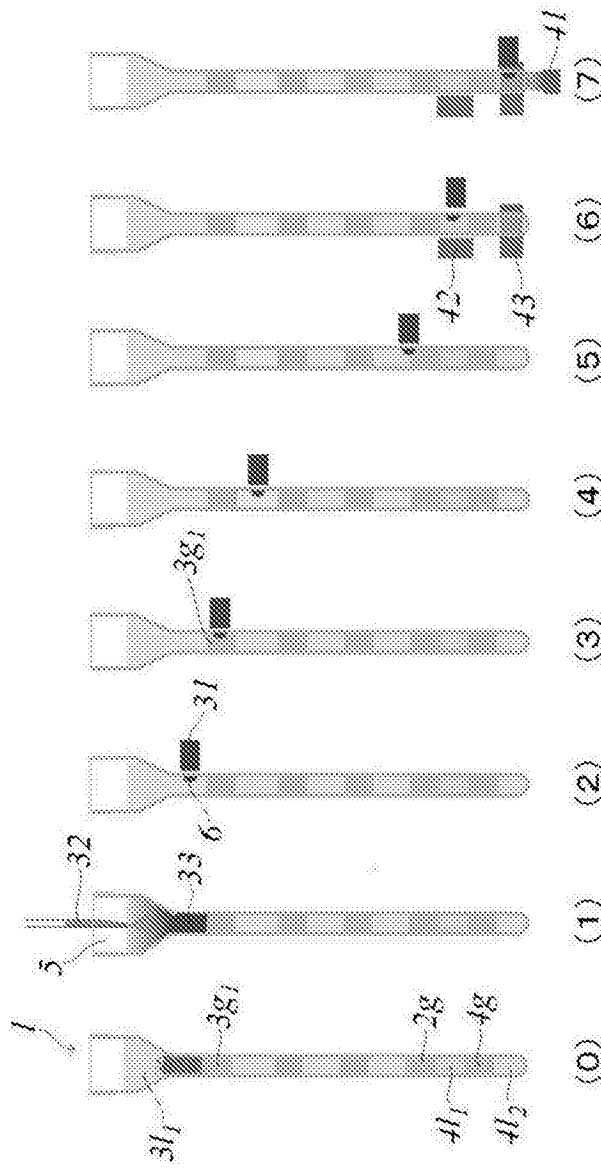


图4

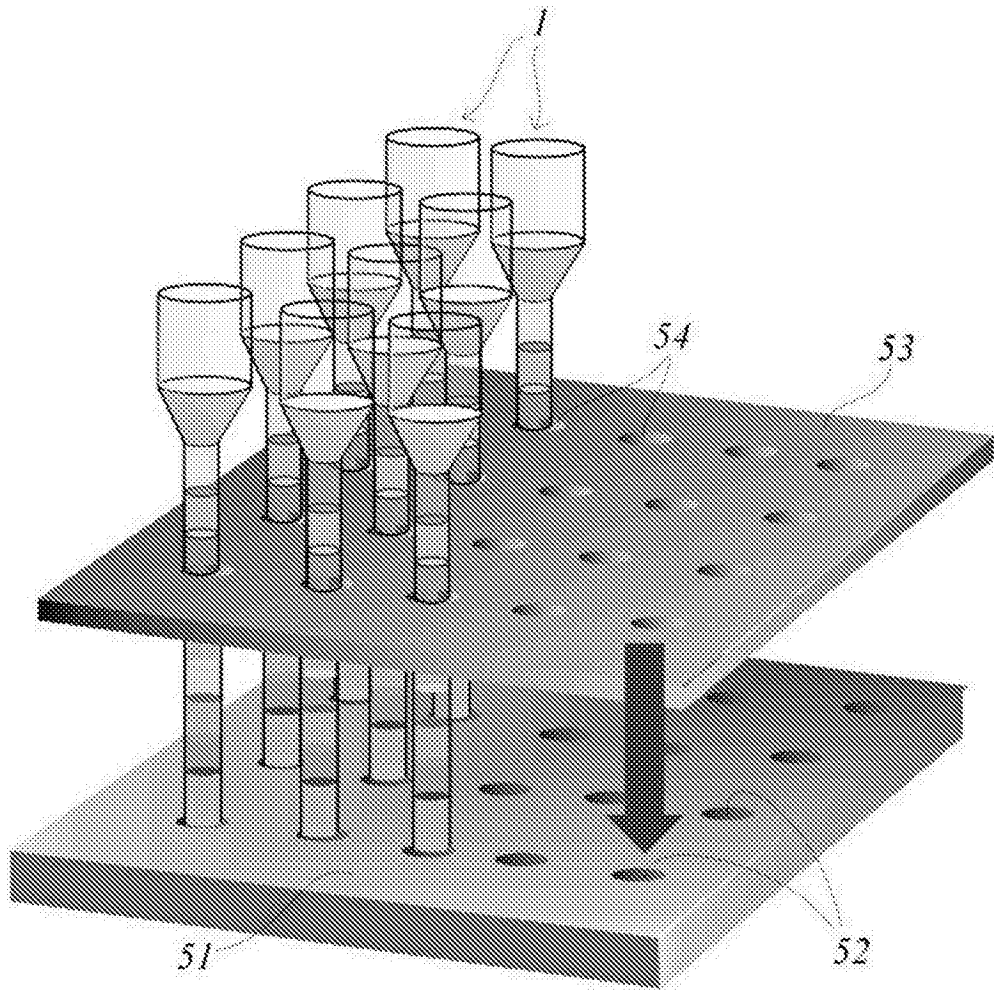


图5

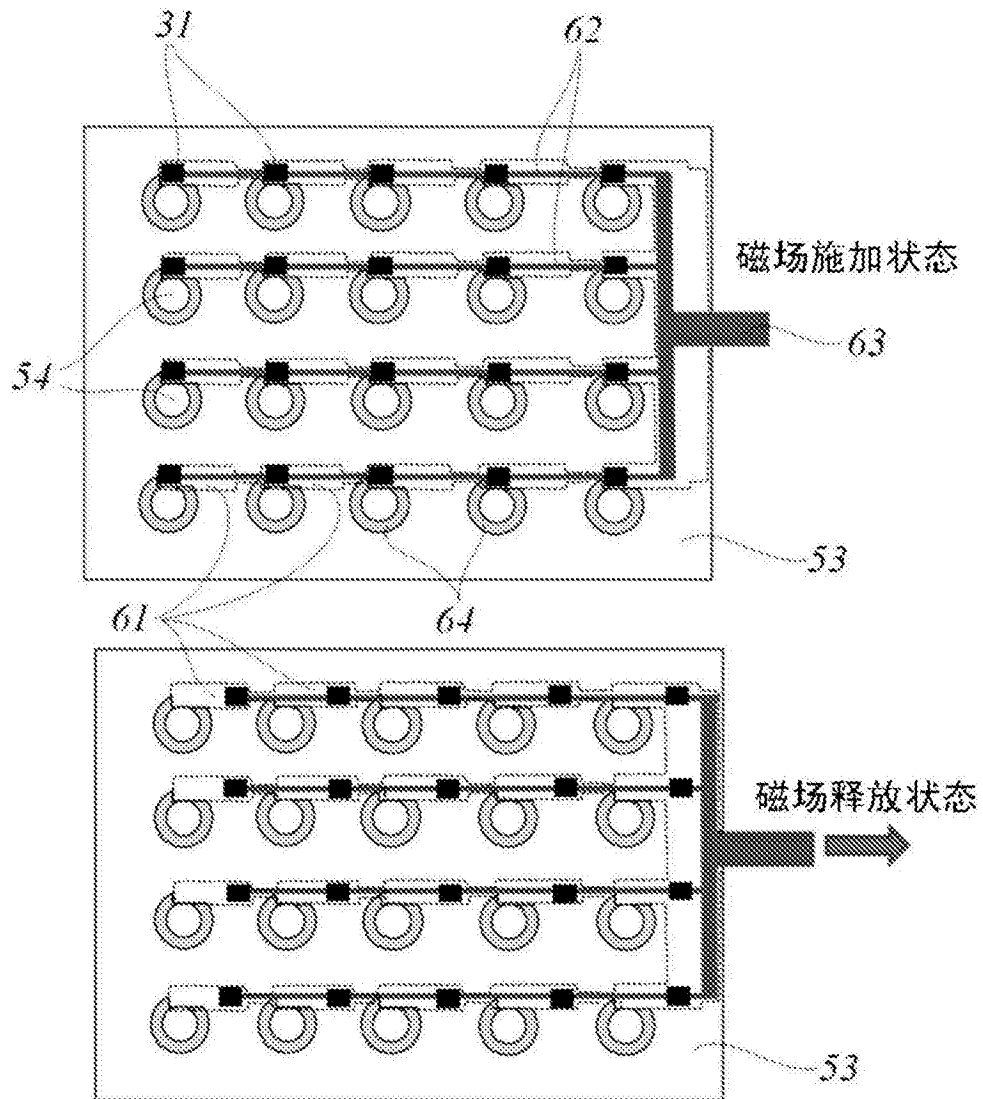


图6

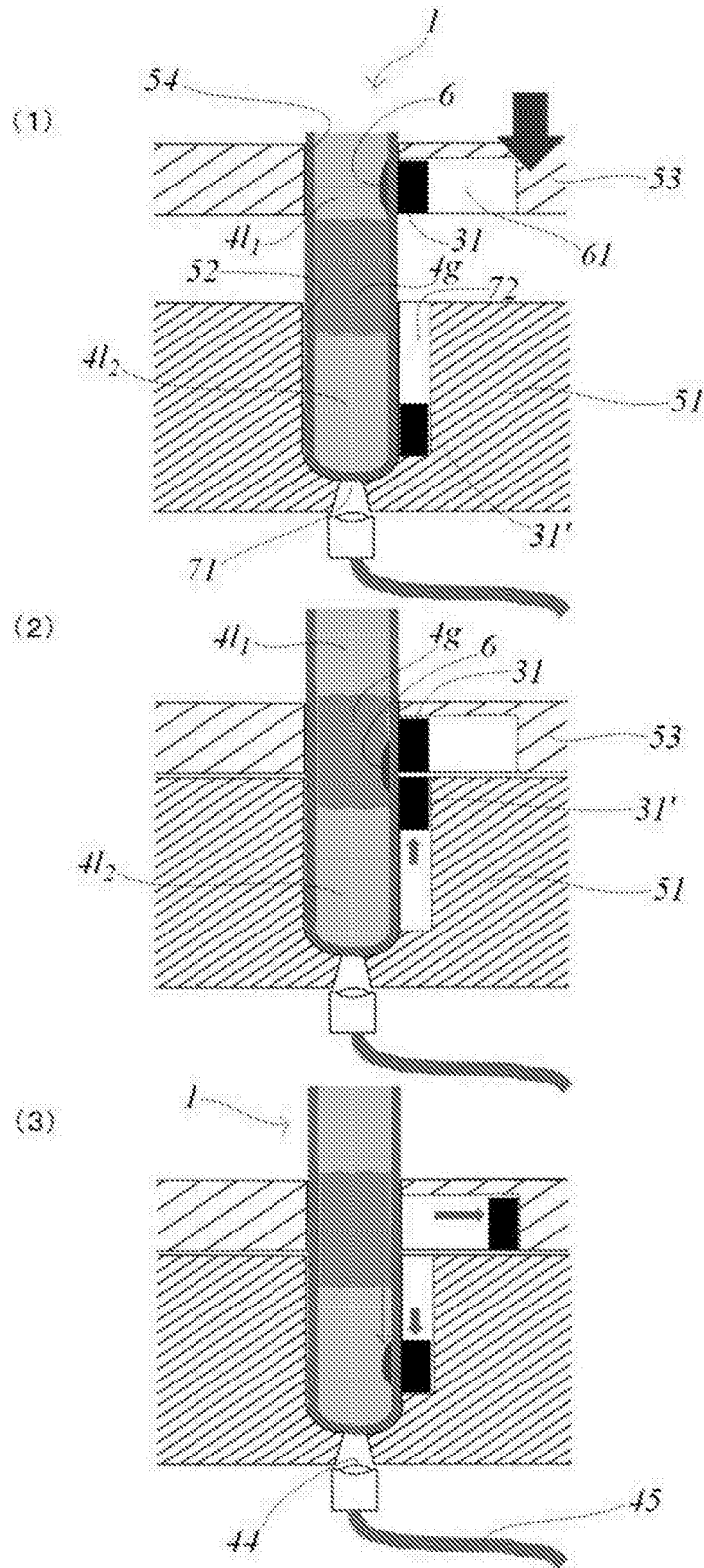
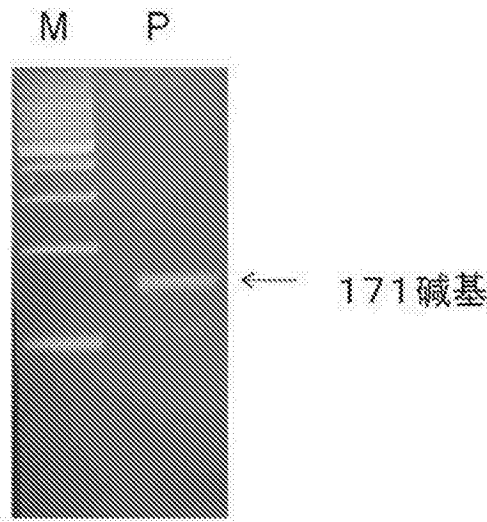


图7



条带M: 100bp 梯状分子量标记物
条带P: PCR反应后的液体 (5 μ L)

图8

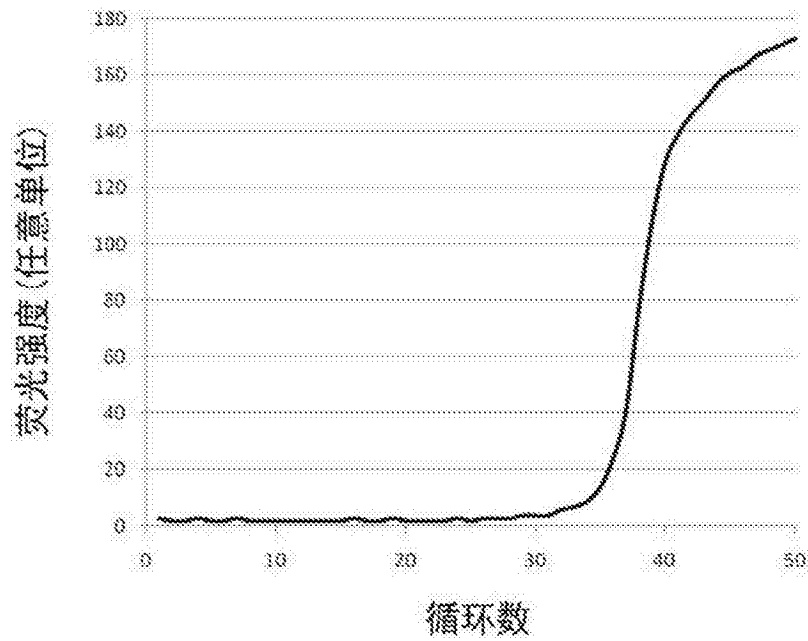


图9