

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2015 年 10 月 15 日(15.10.2015)



(10) 国際公開番号

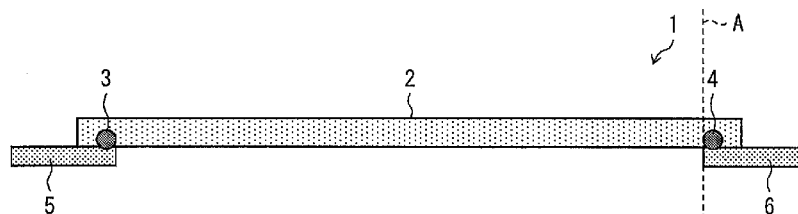
WO 2015/156286 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 27/447 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/060860
- (22) 国際出願日: 2015 年 4 月 7 日(07.04.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2014-079672 2014 年 4 月 8 日(08.04.2014) JP
- (71) 出願人: シャープ株式会社(SHARP KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒5458522 大阪府大阪市阿倍野区長池町 2 2 番 2 2 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 木下 英樹(KINOSHITA, Hideki). 石田 祥之(ISHIDA, Yoshiyuki). 鵜沼 豊(UNUMA, Yutaka).
- (74) 代理人: 特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK; 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大和南森町ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: ISOELECTRIC FOCUSING APPARATUS AND ISOELECTRIC FOCUSING METHOD

(54) 発明の名称: 等電点電気泳動器具および等電点電気泳動方法

図 1



(57) Abstract: The present invention prevents ionic contaminants from being deposited on an electrode in contact with a gel in isoelectric focusing and obtains clear electrophoresis results. An isoelectric focusing apparatus (1) is provided with a gel (2) having a pH gradient formed therein and first and second electrodes (4, 3) for applying a voltage to the gel (2). The first electrode (4) is in contact with the gel (2), and the isoelectric focusing apparatus (1) is further provided with a solvent holding part (6) for holding a solvent and bringing the solvent into contact with the first electrode (4) and gel (2).

(57) 要約: 等電点電気泳動において、ゲルに接触している電極にイオン性夾雑物が堆積することを防止して、クリアな泳動結果を得ること。等電点電気泳動器具 (1) は、pH 勾配が形成されているゲル (2) と、ゲル (2) に対し電圧を印加する第一および第二の電極 (4, 3) と、を備え、第一の電極 (4) はゲル (2) に接触しており、溶媒を保持するとともに溶媒を第一の電極 (4) およびゲル (2) に接触させる溶媒保持部 (6) をさらに備えている。

WO 2015/156286 A1

## 明 細 書

**発明の名称：**等電点電気泳動器具および等電点電気泳動方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、等電点電気泳動技術（I E F : Isoelectric focusing）に関するものであり、詳細には、サンプルに含まれるイオン性夾雑物の影響を低減する技術に関するものである。

### 背景技術

[0002] 生体分子サンプルの分析技術の一つとして、等電点電気泳動が知られている。等電点電気泳動では、サンプルにイオン性夾雑物が多く含まれている場合、イオン性夾雑物が電極に堆積して、泳動が乱れ、クリアな泳動結果が得られないという問題が生じ得る。

[0003] 特に、生体内から抽出したサンプルには、イオン性夾雑物（塩）が多く含まれる。また、難溶性の生体分子を溶解させるために塩を含んだ溶媒に溶解させてサンプルとする場合もある。

[0004] そのため、等電点電気泳動を行う前にサンプルの脱塩処理を行うことや、特許文献1に記載のように、等電点電気泳動の際に、電極とゲルとの間に水で湿らせたろ紙を挟み、ろ紙にイオン性夾雑物を吸着させること等が行われる。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0005] 特許文献1：日本国公開特許公報「特開2011-33546号公報（2011年2月17日公開）」

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、脱塩処理は煩雑である。また、特許文献1のように、電極とゲルとの間に水で湿らせたろ紙を挟んで等電点電気泳動を行った場合、当該ろ紙が等電点電気泳動に次の様な悪影響を及ぼす場合がある。

[0007] 図7の(a)は、従来技術に係る等電点電気泳動器具9の側方断面図である。等電点電気泳動器具9は、pH勾配が形成されたゲル2、電極3、電極4、ろ紙7およびろ紙8を備えており、ゲル2と電極3との間にろ紙7が、ゲル2と電極4との間にろ紙8が挟まれている。そのため、電流は、電極3ーろ紙7ーゲル2ーろ紙8ー電極4という経路で流れる。ゆえに、電気泳動によって、サンプルが、ゲル2からろ紙7またはろ紙8に流出する場合がある。ろ紙に接するゲル部は等電位になるため、ろ紙7またはろ紙8に流出したサンプルは、ろ紙7またはろ紙8中に拡散し、一部は、再度ゲル2に入る。これによって、ゲルにおけるろ紙7またはろ紙8が接触している部位の等電点が、図7の(b)に示すようにフラットになり、分離範囲が狭くなってしまう。また、ろ紙7、8を設置および除去する工程も煩雑であり、ろ紙7、8をゲル2から除去する際にゲル2を破損するおそれもある。

[0008] これに対し、図7の(c)に示す等電点電気泳動器具10のように、ゲル2に直接電極3および電極4が接触している構成では、電流が、電極3ーゲル2ー電極4という経路で流れるため、電気泳動によって、サンプルがゲル2からろ紙等に流出することはない。また、ろ紙の設置および除去も不要である。しかしながら、等電点電気泳動器具10の構成では、サンプルに含まれたイオン性夾雑物が電極に堆積して、クリアな泳動結果が得られない場合がある。

[0009] 本発明は、上記課題に鑑みてなされたものであり、等電点電気泳動において、ゲルに接触している電極にイオン性夾雑物が堆積することを防止して、クリアな泳動結果を得るための技術を提供することを主たる目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0010] 上記の課題を解決するために、本発明の一態様に係る等電点電気泳動器具は、特定の方向に沿ってpH勾配が形成されているゲルと、該ゲルに対し、該特定の方向に沿って電圧を印加する第一および第二の電極と、を備え、第一の電極は、該ゲルに接触しており、溶媒を保持するとともに、該溶媒を第一の電極および該ゲルに接触させる溶媒保持部をさらに備えている。

## 発明の効果

[0011] 本発明の一態様によれば、等電点電気泳動において、ゲルに接触している電極にイオン性夾雑物が堆積することを防止して、クリアな泳動結果を得ることができる。

## 図面の簡単な説明

[0012] [図1]本発明の一実施形態に係る等電点電気泳動器具の概略構成を模式的に示す側方断面図である。

[図2]本発明の一実施形態における溶媒保持部のバリエーションを模式的に示す平面図である。

[図3]本発明の他の実施形態に係る等電点電気泳動器具の概略構成を模式的に示す側方断面図である。

[図4]本発明のさらに他の実施形態に係る等電点電気泳動器具の概略構成を模式的に示す側方断面図である。

[図5]実施例および比較例に係る等電点電気泳動における電流値の変化を比較するグラフである。

[図6]実施例および比較例に係る等電点電気泳動を含む二次元電気泳動の結果を比較する図である。

[図7] (a) は、従来技術に係る等電点電気泳動器具の側方断面図を示し、(b) は、従来技術に係る等電点電気泳動器具を用いた等電点電気泳動における電位分布のグラフを示し、(c) は、従来技術に係る他の等電点電気泳動器具の側方断面図を示す。

## 発明を実施するための形態

[0013] 本発明の態様1に係る等電点電気泳動器具は、特定の方向に沿ってpH勾配が形成されているゲルと、該ゲルに対し、該特定の方向に沿って電圧を印加する第一および第二の電極と、を備え、第一の電極は、該ゲルに接触しており、溶媒を保持するとともに、該溶媒を第一の電極および該ゲルに接触させる溶媒保持部をさらに備えている。

[0014] 上記の構成によれば、第一の電極はゲルに接触しており、溶媒保持部が溶

媒を第一の電極およびゲルに接触させている。これにより、ゲルに接触している第一の電極近傍に移動したイオン性夾雑物を当該溶媒に拡散させて、第一の電極にイオン性夾雑物が堆積することを防止することができる。これにより、イオン性夾雑物が等電点電気泳動に及ぼす影響を抑制して、クリアな泳動結果を得ることができる。

[0015]     〔実施形態１〕

（等電点電気泳動器具）

図１は、本発明の一実施形態（実施形態１）に係る等電点電気泳動器具１の概略構成を模式的に示す側方断面図である。等電点電気泳動器具１は、ゲル２、第一の電極４、第二の電極３、溶媒保持部６および溶媒保持部５を備えている。

[0016]     ゲル２としては、特定の方向に沿ってｐＨ勾配が形成されているものであれば特に限定されず、等電点電気泳動において一般的に用いられている公知のゲルを用いることができ、例えば、アクリルアミド誘導体によって形成されるＩＰＧ（Immobilized pH gradient、固定化ｐＨ勾配）ゲルや、アンフォライトによってｐＨ勾配が形成されたチューブゲル等を用いることができる。

[0017]     ゲル２の形状は特に限定されないが、本実施形態では、長手方向が、ｐＨ勾配の方向である板状のゲルである。このようなゲル２としては、例えば、市販のＩＰＧゲルを用いることができる。

[0018]     第一の電極４および第二の電極３は、何れか一方が陽極であり他方が陰極である。第一および第二の電極の素材は特に限定されないが、例えば、白金、金、銀、銅等の金属や、カーボン等であり得る。第一の電極４および第二の電極３は、ゲル２（例えば、ゲル２の板面）に接触しており、ゲル２に対して、ゲル２のｐＨ勾配の方向に沿って電圧を印加するための電極となる。

[0019]     溶媒保持部６は、溶媒を、第一の電極４およびゲル２に接触させるように保持するものである。また、溶媒保持部５は、溶媒を、第二の電極３およびゲル２に接触させるように保持するものである。

[0020] 「溶媒」は、イオン性夾雑物（例えば、塩）を溶解することができる溶媒であれば特に限定されず、水系の溶媒または有機溶媒であり得る。また、溶媒には、粘度を高めるための添加剤（例えば、グリセロール）が含まれていてもよい。

[0021] ゲル 2 にサンプルを導入し、第一の電極 4 および第二の電極 3 を用いてゲル 2 に電圧を印加することにより、等電点電気泳動器具 1 を用いて等電点電気泳動を行うことができる。ゲル 2 には pH 勾配が形成されているため、第一の電極 4 および第二の電極 3 の間に電圧が印加されると、サンプル中の各成分（例えば、タンパク質）は、その等電点に対応するゲル 2 中の位置に泳動される。

[0022] このとき、サンプル中には、イオン性夾雑物が含まれていることがある。例えば、生体内から抽出したサンプルには、イオン性夾雑物（塩）が多く含まれる。また、難溶性の生体分子を溶解させるために塩を含んだ溶媒に溶解させてサンプルとする場合もある。このイオン性夾雑物が、電気泳動によって、第一の電極 4 または第二の電極 3 の近傍まで移動し、第一の電極 4 または第二の電極 3 に堆積すると、泳動が乱れ、クリアな泳動結果が得られない。

[0023] ここで、本実施形態によれば、溶媒保持部 6 が、溶媒を第一の電極 4 に接触させるため、第一の電極 4 近傍に移動したイオン性夾雑物は当該溶媒に拡散する。これにより、第一の電極 4 にイオン性夾雑物が堆積することを防止することができる。これにより、イオン性夾雑物が等電点電気泳動に及ぼす影響を抑制して、クリアな泳動結果を得ることができる。また、溶媒保持部 5 も同様の効果を奏する。

[0024] なお、等電点電気泳動器具 1 では、第一の電極 4 および第二の電極 3 は、ゲル 2 に直接接触している。そのため、電流は、溶媒保持部 5 および 6 を介さずに、第二の電極 3－ゲル 2－第一の電極 4 という経路で流れる。ゆえに、電気泳動によって、ゲル 2 中のサンプルが、ゲル 2 から溶媒保持部 5 または 6 に流出することは殆ど生じない。ゆえに、特許文献 1 に記載の技術のよ

うに分離範囲が狭まることなく、電極近傍まで等電点スポットをクリアに検出することができる。

[0025] また、本実施形態において、溶媒保持部 6 は、ゲル 2 の pH 勾配の方向に垂直かつ第一の電極 4 における第二の電極 3 側の外縁を含む平面 A に対して、第二の電極 3 とは反対側の領域内に配置されており、平面 A に対して、第二の電極 3 とは反対側の領域内において溶媒を保持している。

[0026] これを、別の観点からみれば、第一の電極 4、および、溶媒保持部 6 における第二の電極側 3 の外縁がともに平面 A 上にあり、イオン性夾雑物を溶解する溶媒は、第一および第二の電極の電極間から完全に排除されている。

[0027] これにより、イオン性夾雑物を溶解する溶媒は、第一の電極 4 および第二の電極 3 の電極間外において保持される。これにより、溶媒中に溶解したイオン性夾雑物が、再度、第一の電極 4 方向に移動することを抑制し、イオン性夾雑物が等電点電気泳動に及ぼす影響をさらに抑制することができる。また、溶媒保持部 5 も同様の効果を奏する。

[0028] また、本実施形態では、ゲル 2 と溶媒保持部 6 とで第一の電極 4 を挟んでいる。これにより、第一の電極 4 近傍に移動したイオン性夾雑物を、溶媒保持部 6 が保持する溶媒に首尾よく拡散させることができる。また、溶媒保持部 5 も同様の効果を奏する。

[0029] (溶媒保持部)

図 2 は、本実施形態における溶媒保持部 6 のバリエーションを模式的に示す平面図である。

[0030] 図 2 の (a) は、溶媒保持部 6 における第一の電極 4 およびゲル 2 に対向する面に溝 6 a が設けられている構成を示す。このように、溶媒保持部 6 における第一の電極 4 およびゲル 2 に対向する面に、溶媒を保持するための溝 6 a が形成されていることによって、溶媒を首尾よく保持することができる。

[0031] 図 2 の (b) は、溶媒保持部 6 における第一の電極 4 およびゲル 2 に対向する面に、溶媒を保持する多孔質体 6 b が設けられている構成を示す。この

ように、溶媒保持部 6 における第一の電極 4 およびゲル 2 に対向する面に、溶媒を保持する多孔質体 6 b が設けられていることによって、溶媒を首尾よく保持することができる。また、毛管現象によって溶媒保持部 6 からゲル 2 へ溶媒が移動してゲル 2 が膨らみ、等電点電気泳動に悪影響を与えることを抑制することができる。

[0032] なお、溶媒保持部 6 全体を多孔質体 6 b で構成してもよい。また、多孔質体 6 b としては、溶媒を保持し得るものであれば特に限定されないが、例えば、多孔質樹脂または繊維であり得る。繊維としては、例えば、ろ紙であってもよい。多孔質体 6 b をろ紙とすることで、簡易かつ安価に溶媒保持部 6 を構成することができる。

[0033] 図 2 の (c) は、溶媒保持部 6 における第一の電極 4 およびゲル 2 に対向する面に複数の微細な溝 6 c が設けられている構成を示す。複数の微細な溝 6 c は、一実施形態において、キャピラリ電気泳動において使用されるような微細な溝であり得る。このように、溶媒が微細な溝 6 c 中に保持されていることによって、毛管現象によって溶媒保持部 6 からゲル 2 へ溶媒が移動してゲル 2 が膨らみ、等電点電気泳動に悪影響を与えることを抑制することができる。

[0034] なお、図 2 の (c) に示す構成では、溶媒保持部 6 における第一の電極 4 およびゲル 2 に対向する面に設けられる複数の微細な溝の形状は、ストライプ状であるが、本実施形態はこれに限定されず、図 2 の (d) に示すような同心円状の微細な溝 6 d であってもよいし、図 2 の (e) に示すような格子状の微細な溝 6 e であってもよい。なお、図 2 の (e) に示すような格子状の微細な溝 6 e を設けることにより、溶媒の保持量を増加させることができる。

[0035] また、溶媒保持部 6 は、等電点電気泳動器具 1 から取り外し可能であってもよい。これにより、等電点電気泳動を行っているとき、イオン性夾雑物が十分に溶媒に溶解した後に、溶媒保持部を取り外して、等電点電気泳動器具 1 内から、イオン性夾雑物を除去することができる。これにより、イオン性

夾雑物の等電点電気泳動に対する影響をさらに抑制して、よりクリアな泳動結果を得ることができる。なお、本実施形態における溶媒保持部6は、特許文献1に記載のろ紙とは異なり、電極とゲルとの間に挟まれているものではないため、電極とゲルとの間の位置関係をずらすことなく、取り外すことができる。

[0036] 溶媒保持部5のバリエーションについては、溶媒保持部6のバリエーションと同様であるため、説明を省略する。また、溶媒保持部5も、等電点電気泳動器具1から取り外し可能であってもよい。

[0037] (等電点電気泳動方法)

本実施形態に係る等電点電気泳動方法は、等電点電気泳動器具1のゲル2にサンプルを導入する導入工程と、第一の電極4および第二の電極3の間に電圧を印加して等電点電気泳動を行う泳動工程と、を包含する。

[0038] サンプルの導入方法は、特に限定されず、公知の方法を用いることができる。なお、ゲル2としてIPGゲルを用いる場合には、サンプルの導入の前に、ゲル2を膨潤させておくことが好ましい。

[0039] また、電圧印加の条件も特に限定されず、例えば、等電点電気泳動方法において一般的に使用される条件を用いればよい。

[0040] なお、一実施形態において、導入工程の後、泳動工程の前に、第一の電極4および第二の電極3の間に電圧を印加した後に、溶媒保持部6を等電点電気泳動器具1から取り外す予備泳動工程をさらに包含してもよい。これにより、予備泳動工程において、イオン性夾雑物が溶媒に溶解した後に、溶媒保持部6を取り外して、等電点電気泳動器具1内から、イオン性夾雑物を除去することができる。これにより、イオン性夾雑物の等電点電気泳動に対する影響をさらに抑制して、よりクリアな泳動結果を得ることができる。

[0041] 特に、第一の電極4および第二の電極3の間に電圧を印加した後において第一の電極4および第二の電極3の間に流れる電流値が減少した後に、溶媒保持部6を等電点電気泳動器具1から取り外すことが好ましい。第一の電極4および第二の電極3の間に流れる電流値は、ゲル2中のイオン性夾雑物の

量の指標となる。そのため、第一の電極 4 および第二の電極 3 の間に流れる電流値が減少し、ゲル 2 中に存在したイオン性夾雑物の多くが溶媒中に溶解した後に、溶媒保持部 6 を取り外すようにすることで、等電点電気泳動器具 1 内から、イオン性夾雑物を十分に除去することができる。これにより、イオン性夾雑物の等電点電気泳動に対する影響をさらに抑制して、よりクリアな泳動結果を得ることができる。

[0042] なお、予備泳動工程において、溶媒保持部 6 に加えて、または、溶媒保持部 6 の代わりに溶媒保持部 5 を取り外すようにしてもよい。

[0043] (変形例)

なお、本実施形態では、第一の電極 4 および第二の電極 3 のそれぞれに溶媒を接触させる溶媒保持部 6 および溶媒保持部 5 が設けられており、第一の電極 4 および第二の電極 3 の両方がゲル 2 に接触しているが、本発明はこれに限定されず、溶媒保持部 6 および溶媒保持部 5 のうちの一方は、省略してもよい。

[0044] [実施形態 2]

本発明の他の実施形態について、図 3 に基づいて説明すれば、以下のとおりである。なお、説明の便宜上、前記実施形態にて説明した部材と同じ機能を有する部材については、同じ符号を付記し、その説明を省略する。

[0045] 図 3 に示すように、溶媒保持部 6 の一部が、ゲル 2 の pH 勾配の方向に垂直かつ第一の電極 4 における第二の電極 3 側の外縁を含む平面 A に対して、第二の電極 3 側の領域内にも配置されていてもよく、平面 A に対して、第二の電極 3 側の領域内においても一部の溶媒を保持しているものであってもよい。すなわち、別の観点からみれば、第一の電極 4、および、溶媒保持部 6 における第二の電極側 3 の外縁は同一平面上になくともよい。

[0046] このような構成であっても、ゲル 2 に接触している第一の電極 4 近傍に移動したイオン性夾雑物を溶媒に拡散させて、第一の電極 4 にイオン性夾雑物が堆積することを防止することができる。これにより、イオン性夾雑物が等電点電気泳動に及ぼす影響を抑制して、クリアな泳動結果を得ることができ

る。

[0047] また、同様に、溶媒保持部 5 の一部が、ゲル 2 の pH 勾配の方向に垂直かつ第二の電極 3 における第一の電極 4 側の外縁を含む平面に対して、第一の電極 4 側の領域内にも配置されていてもよい。

[0048] [実施形態 3]

本発明のさらに他の実施形態について、図 4 に基づいて説明すれば、以下のとおりである。なお、説明の便宜上、前記実施形態にて説明した部材と同じ機能を有する部材については、同じ符号を付記し、その説明を省略する。

[0049] 図 4 に示すように、第一の電極 4 は、溶媒保持部 6 に埋め込まれていてもよい。すなわち、第一の電極 4 は、ゲル 2 および溶媒保持部 6 の両方に接触していればよく、ゲル 2 と溶媒保持部 6 とに挟まれている必要は無い。

[0050] このような構成であっても、ゲル 2 に接触している第一の電極 4 近傍に移動したイオン性夾雑物を溶媒に拡散させて、第一の電極 4 にイオン性夾雑物が堆積することを防止することができる。これにより、イオン性夾雑物が等電点電気泳動に及ぼす影響を抑制して、クリアな泳動結果を得ることができる。

[0051] なお、第二の電極 3 も、同様に、溶媒保持部 5 に埋め込まれていてもよい。すなわち、第二の電極 3 は、ゲル 2 および溶媒保持部 5 の両方に接触していればよく、ゲル 2 と溶媒保持部 5 とに挟まれている必要は無い。

[0052] (まとめ)

以上の様に、本発明の態様 1 に係る等電点電気泳動器具は、特定の方向に沿って pH 勾配が形成されているゲルと、該ゲルに対し、該特定の方向に沿って電圧を印加する第一および第二の電極と、を備え、第一の電極は、該ゲルに接触しており、溶媒を保持するとともに、該溶媒を第一の電極および該ゲルに接触させる溶媒保持部をさらに備えている。

[0053] 上記の構成によれば、第一の電極はゲルに接触しており、溶媒保持部が溶媒を第一の電極およびゲルに接触させている。これにより、ゲルに接触している第一の電極近傍に移動したイオン性夾雑物を当該溶媒に拡散させて、第

一の電極にイオン性夾雑物が堆積することを防止することができる。これにより、イオン性夾雑物が等電点電気泳動に及ぼす影響を抑制して、クリアな泳動結果を得ることができる。

[0054] 本発明の態様2に係る等電点電気泳動器具では、上記態様1において、上記溶媒保持部は、上記特定の方に垂直かつ第一の電極における第二の電極側の外縁を含む平面に対して第二の電極とは反対側の領域内において上記溶媒を保持していてもよい。

[0055] 上記の構成によれば、イオン性夾雑物を溶解する溶媒は、第一および第二の電極の電極間外において保持される。これにより、溶媒中に溶解したイオン性夾雑物が、再度、電極方向に移動することを抑制し、イオン性夾雑物が等電点電気泳動に及ぼす影響をさらに抑制することができる。また、第一および第二の電極の間に、ろ紙が接して等電位になるゲル部がないため、分離範囲が狭くなることはない。

[0056] 本発明の態様3に係る等電点電気泳動器具では、上記態様1または2において、第一の電極および上記溶媒保持部における第二の電極側の外縁が同一平面上にあってもよい。

[0057] 上記の構成によれば、イオン性夾雑物を溶解する溶媒は、第一および第二の電極の電極間から完全に排除される。これにより、溶媒中に溶解したイオン性夾雑物が、再度、電極方向に移動することを抑制し、イオン性夾雑物が等電点電気泳動に及ぼす影響をさらに抑制することができる。

[0058] 本発明の態様4に係る等電点電気泳動器具では、上記態様1～3において、上記ゲルと上記溶媒保持部とで第一の電極を挟んでいてもよい。

[0059] 上記の構成によれば、第一の電極近傍に移動したイオン性夾雑物を、溶媒保持部が保持する溶媒に首尾よく拡散させることができる。

[0060] 本発明の態様5に係る等電点電気泳動器具では、上記態様1～4において、上記溶媒保持部における第一の電極および上記ゲルに対向する面には、上記溶媒を保持するための溝が形成されていてもよい。

[0061] 上記の構成によれば、溶媒保持部は、溶媒を首尾よく保持することができ

る。

[0062] 本発明の態様 6 に係る等電点電気泳動器具では、上記態様 5 において、上記溝が、複数の微細な溝から構成されていてもよい。

[0063] 上記の構成によれば、溶媒が微細な溝中に保持されていることによって、毛管現象によって溶媒保持部からゲルへ溶媒が移動してゲルが膨らむことを抑制することができる。

[0064] 本発明の態様 7 に係る等電点電気泳動器具では、上記態様 1 ～ 4 において、上記溶媒保持部における第一の電極および上記ゲルに対向する面には、上記溶液を保持する多孔質体が設けられていてもよい。

[0065] 上記の構成によれば、溶媒が多孔質体中に保持されていることによって、毛管現象によって溶媒保持部からゲルへ溶媒が移動してゲルが膨らむことを抑制することができる。

[0066] 本発明の態様 8 に係る等電点電気泳動器具では、上記態様 7 において、上記多孔質体が、ろ紙であってもよい。

[0067] 上記の構成によれば、簡易かつ安価に溶媒保持部を構成することができる。

[0068] 本発明の態様 9 に係る等電点電気泳動器具では、上記態様 1 ～ 8 において、上記溶媒保持部は、当該等電点電気泳動器具から取り外し可能であってもよい。

[0069] 上記の構成によれば、溶媒保持部を、等電点電気泳動器具から取り外すことができるため、イオン性夾雑物が十分に溶媒に溶解した後に、溶媒保持部を取り外して、等電点電気泳動器具内から、イオン性夾雑物を除去することができる。これにより、イオン性夾雑物の等電点電気泳動に対する影響をさらに抑制して、よりクリアな泳動結果を得ることができる。

[0070] 本発明の態様 10 に係る等電点電気泳動器具では、上記態様 1 ～ 9 において、上記ゲルは、長手方向が上記特定方向である板状のゲルであり、第一の電極は、上記ゲルの板面に接触していてもよい。

[0071] 上記の構成によれば、ゲルとして、市販の I P G ゲルを首尾よく用いるこ

とができる。

[0072] 本発明の態様 1 1 に係る等電点電気泳動方法では、態様 1 ～ 1 0 の等電点電気泳動器具における上記ゲルにサンプルを導入する導入工程と、第一および第二の電極間に電圧を印加して等電点電気泳動を行う泳動工程と、を包含する。

[0073] 上記の構成によれば、態様 1 ～ 1 0 の等電点電気泳動器具と同等の効果を奏する。

[0074] 本発明の態様 1 2 に係る等電点電気泳動器具では、上記態様 1 1 において、上記導入工程の後、上記泳動工程の前に、第一および第二の電極間に電圧を印加した後に上記溶媒保持部を上記等電点電気泳動器具から取り外す予備泳動工程をさらに包含してもよい。

[0075] 上記の構成によれば、予備泳動工程において、イオン性夾雑物が溶媒に溶解した後に、溶媒保持部を取り外して、等電点電気泳動器具内から、イオン性夾雑物を除去することができる。これにより、イオン性夾雑物の等電点電気泳動に対する影響をさらに抑制して、よりクリアな泳動結果を得ることができる。

[0076] 本発明の態様 1 3 に係る等電点電気泳動器具では、上記態様 1 2 において、上記予備泳動工程では、第一および第二の電極間に所定の電圧を印加した状態において第一および第二の電極間に流れる電流値が減少した後に、上記溶媒保持部を上記等電点電気泳動器具から取り外してもよい。

[0077] 上記の構成によれば、第一および第二の電極間に流れる電流値は、ゲル中のイオン性夾雑物の量の指標となる。そのため、第一および第二の電極間に流れる電流値が減少し、ゲル中に存在したイオン性夾雑物の多くが溶媒中に溶解した後に、溶媒保持部を取り外すようにすることで、等電点電気泳動器具内から、イオン性夾雑物を十分に除去することができる。これにより、イオン性夾雑物の等電点電気泳動に対する影響をさらに抑制して、よりクリアな泳動結果を得ることができる。

[0078] 本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した

範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。さらに、各実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を組み合わせることにより、新しい技術的特徴を形成することができる。

## 実施例

### [0079] (実施例1)

図1に示すような等電点電気泳動器具1を用いて等電点電気泳動を行った。ゲル2としては、pH4～7の範囲でpH勾配が形成されている膨潤されたIPGゲルを用いた。サンプルとしては、IC-5によって標識されたMLL（マウス肝臓サンプル）2 $\mu$ gを尿素、チオ尿素、3-（3-cholamidopropyl）dimethylammonio-1-propanesulphonate（CHAPS）、ジチオトレイトール（DTT）、両性電解質（Ampholyte）を含む溶液に、塩として80mM NaClを加えた溶解させたものを用いた。溶媒保持部5、6としては、蒸留水によって湿らせたろ紙を用いた。

[0080] 等電点電気泳動では、図5の折れ線5に示す電圧を第一の電極4と第二の電極3との間に印加した。すなわち、ステップ1として、5分間、200Vの定電圧を印加した。続いて、ステップ2として、5分間、1000Vまで非線形に変化させながら電圧を印加した。続いて、ステップ3として、5分間、1000Vの定電圧を印加した。続いて、ステップ4として、10分間、7000Vまで線形に変化させながら電圧を印加した。続いて、ステップ5として、10分間、7000Vの定電圧を印加した。

[0081] 次に、等電点電気泳動が行われたゲル2をSDS平衡化し、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて二次元目の電気泳動を行った。得られたゲルを蛍光イメージスキャナー（Typhoon：GEヘルスケア社）で撮像し、スポットを可視化した。

### [0082] (比較例1)

図7の(c)に示すような等電点電気泳動器具10を用いたこと以外は、

実施例 1 と同様に等電点電気泳動を行った。次いで、実施例 1 と同様に二次元目の電気泳動および撮像を行った。

[0083] (実施例 2)

実施例 1 において、ステップ 1 の前に予備泳動を行ったこと以外は、実施例 1 と同様に等電点電気泳動を行った。予備泳動では、ステップ A として、5 分間、200 V の定電圧を印加した。続いて、ステップ B として、5 分間、1000 V まで非線形に変化させながら電圧を印加した。続いて、ステップ C として、5 分間、1000 V の定電圧を印加した。その後、溶媒保持部 5、6 を等電点電気泳動器具 1 から取り外し、ステップ 1～5 を行った。

[0084] 次いで、実施例 1 と同様に二次元目の電気泳動および撮像を行った。

[0085] (結果)

図 5 は、実施例 1、2 および比較例 1 に係る等電点電気泳動における電流値の変化を比較するグラフである。折れ線 1 は、実施例 1 における電流値の変化を示す。折れ線 2 は、比較例 1 における電流値の変化を示す。折れ線 3 は、実施例 2 のステップ 1～5 における電流値の変化を示す。折れ線 4 は、実施例 2 のステップ A～C における電流値の変化を示す。折れ線 5 は、実施例 1、2 および比較例 1 のステップ 1～5 における電圧の変化を示す。

[0086] 図 6 の (a) は、比較例 1 における二次元電気泳動の結果の写真を示す。

図 6 の (b) は、実施例 1 における二次元電気泳動の結果の写真を示す。図

6 の (c) は、実施例 2 における二次元電気泳動の結果の写真を示す。

[0087] 図 6 の (a) と (b) とを比較すれば分かるように、実施例 1 では、比較例 1 に比べて、スポットの分解能（集束）が格段に向上しており、よりクリアな結果が得られた。

[0088] 図 6 の (b) と (c) とを比較すれば分かるように、実施例 2 では、実施例 1 に比べて、スポットの分解能（集束）がさらに向上しており、よりクリアな結果が得られた。また、折れ線 1 と折れ線 3 とを比較すれば分かるように、実施例 2 では、実施例 1 とは異なり、泳動初期～中期（ステップ 1～3）において殆ど電流が流れていなかった。これは、実施例 2 の予備泳動（ス

テップA～C 折れ線4)が、電流値が0に近いところまで減少してから終了していることから、予備泳動において、ゲル2中のイオン性夾雑物の大部分が、溶媒内に溶解して除去されたことを示している。

### 産業上の利用可能性

[0089] 本発明は、生体分子等の分析機器の製造分野および生体分子等の分析分野において利用可能である。

### 符号の説明

- [0090]
- |   |           |
|---|-----------|
| 1 | 等電点電気泳動器具 |
| 2 | ゲル        |
| 3 | 第二の電極     |
| 4 | 第一の電極     |
| 5 | 溶媒保持部     |
| 6 | 溶媒保持部     |

## 請求の範囲

- [請求項1] 特定の方向に沿ってpH勾配が形成されているゲルと、  
該ゲルに対し、該特定の方向に沿って電圧を印加する第一および第二の電極と、を備え、  
第一の電極は、該ゲルに接触しており、  
溶媒を保持するとともに、該溶媒を第一の電極および該ゲルに接触させる溶媒保持部をさらに備えていることを特徴とする等電点電気泳動器具。
- [請求項2] 上記溶媒保持部は、上記特定の方向に垂直かつ第一の電極における第二の電極側の外縁を含む平面に対して第二の電極とは反対側の領域内において上記溶媒を保持していることを特徴とする請求項1に記載の等電点電気泳動器具。
- [請求項3] 第一の電極および上記溶媒保持部における第二の電極側の外縁が同一平面上にあることを特徴とする請求項1または2に記載の等電点電気泳動器具。
- [請求項4] 上記ゲルと上記溶媒保持部とで第一の電極を挟んでいることを特徴とする請求項1～3の何れか一項に記載の等電点電気泳動器具。
- [請求項5] 上記溶媒保持部における第一の電極および上記ゲルに対向する面には、上記溶媒を保持するための溝が形成されていることを特徴とする請求項1～4の何れか一項に記載の等電点電気泳動器具。
- [請求項6] 上記溝が、複数の微細な溝から構成されることを特徴とする請求項5に記載の等電点電気泳動器具。
- [請求項7] 上記溶媒保持部における第一の電極および上記ゲルに対向する面には、上記溶媒を保持する多孔質体が設けられていることを特徴とする請求項1～4の何れか一項に記載の等電点電気泳動器具。
- [請求項8] 上記多孔質体が、ろ紙であることを特徴とする請求項7に記載の等電点電気泳動器具。
- [請求項9] 上記溶媒保持部は、当該等電点電気泳動器具から取り外し可能であ

ることを特徴とする請求項 1 ～ 8 の何れか一項に記載の等電点電気泳動器具。

[請求項10]       上記ゲルは、長手方向が上記特定の方向である板状のゲルであり、  
第一の電極は、上記ゲルの板面に接触していることを特徴とする請求項 1 ～ 9 の何れか一項に記載の等電点電気泳動器具。

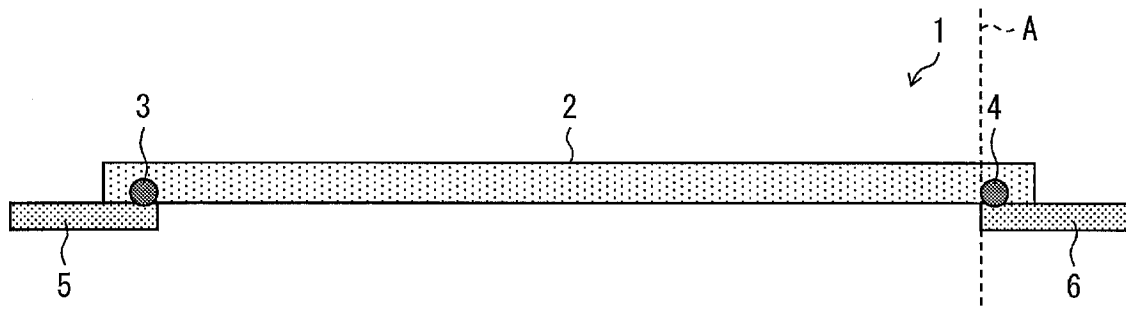
[請求項11]       請求項 1 ～ 10 の何れか一項に記載の等電点電気泳動器具における  
上記ゲルにサンプルを導入する導入工程と、  
第一および第二の電極間に電圧を印加して等電点電気泳動を行う泳動工程と、を包含することを特徴とする等電点電気泳動方法。

[請求項12]       上記導入工程の後、上記泳動工程の前に、第一および第二の電極間に電圧を印加した後に上記溶媒保持部を上記等電点電気泳動器具から取り外す予備泳動工程をさらに包含することを特徴とする請求項 11 に記載の等電点電気泳動方法。

[請求項13]       上記予備泳動工程では、第一および第二の電極間に所定の電圧を印加した状態において第一および第二の電極間に流れる電流値が減少した後に、上記溶媒保持部を上記等電点電気泳動器具から取り外すことを特徴とする請求項 12 に記載の等電点電気泳動方法。

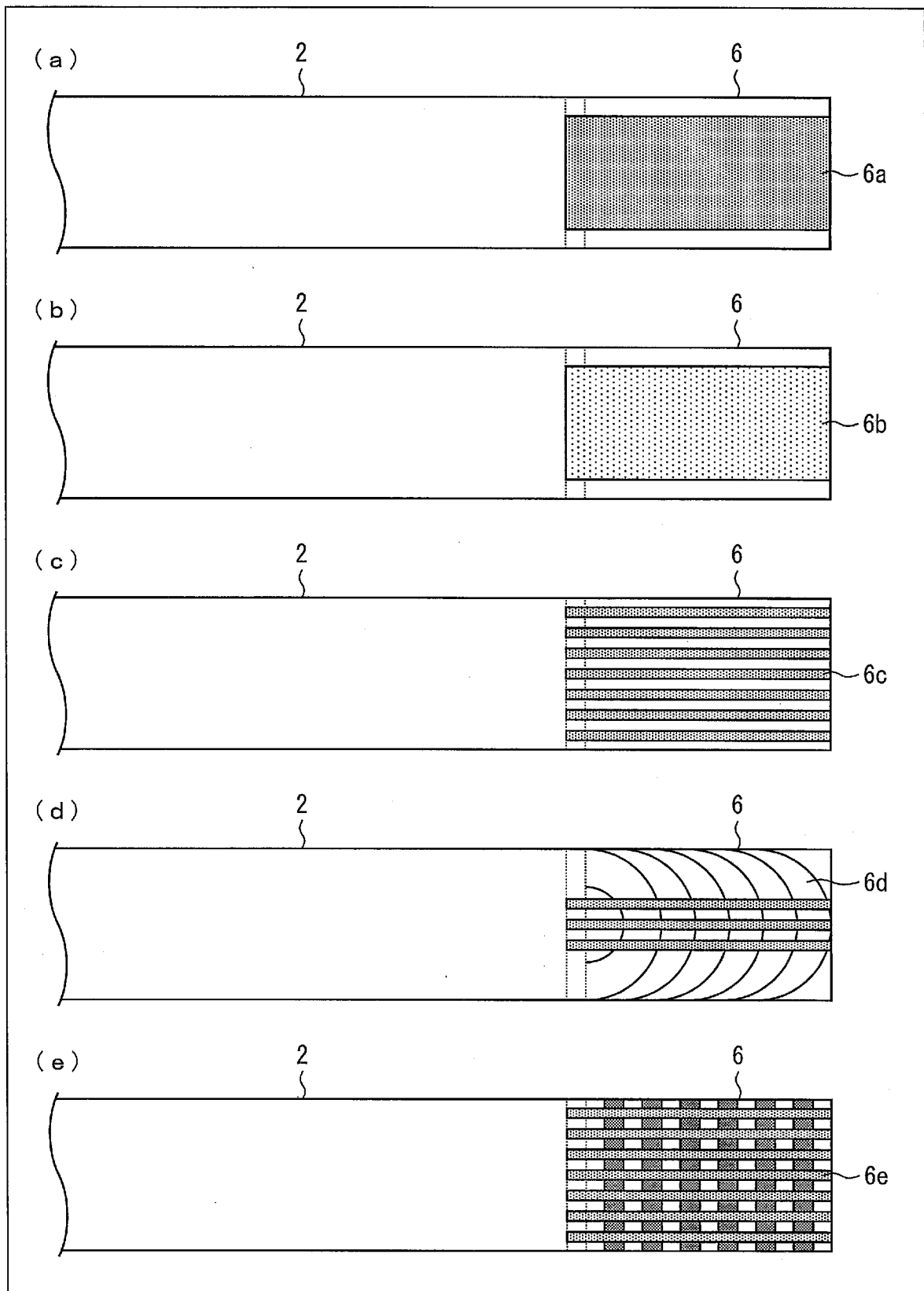
[図1]

図 1



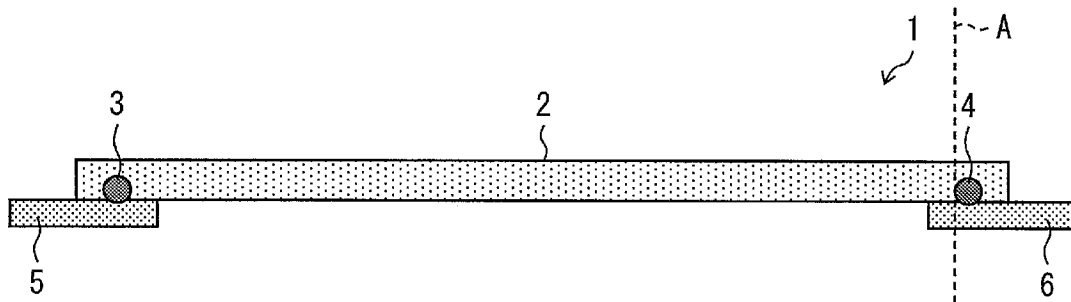
[図2]

図 2



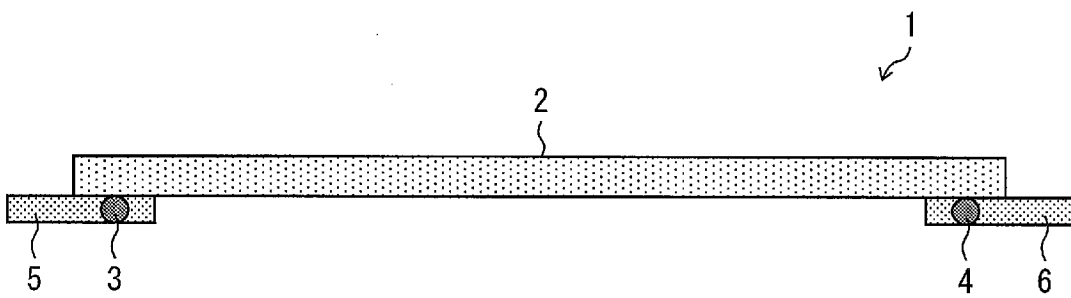
[図3]

図 3



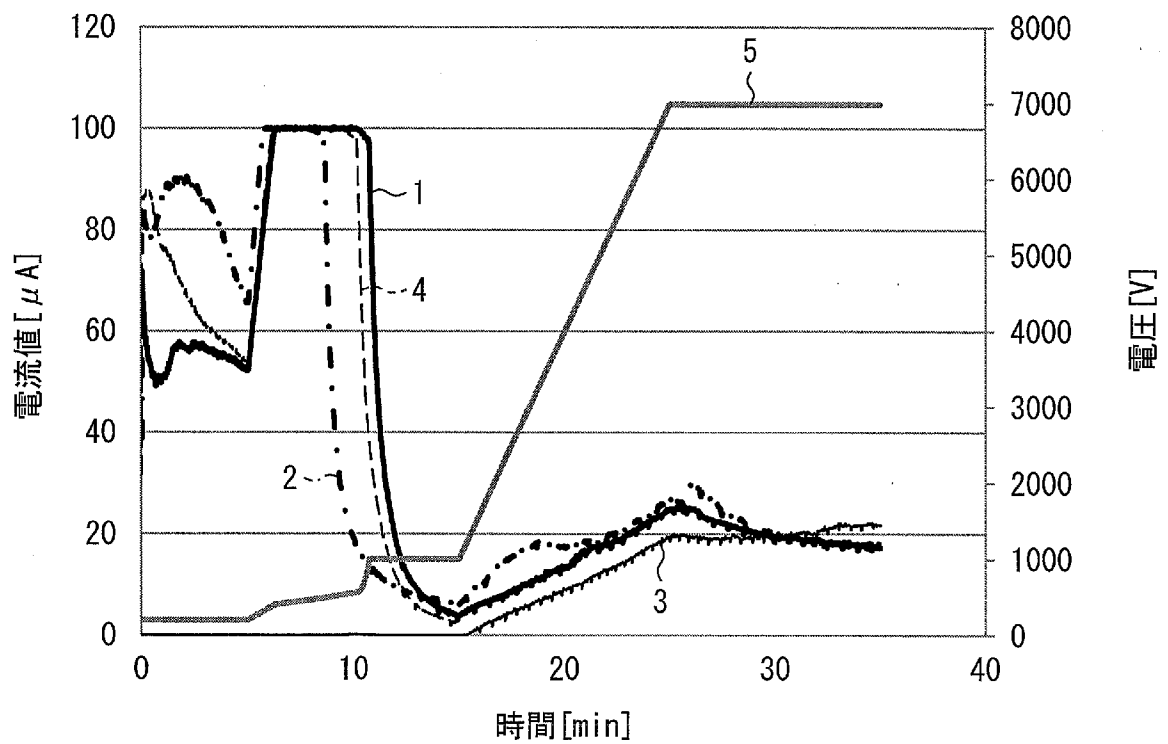
[図4]

図 4



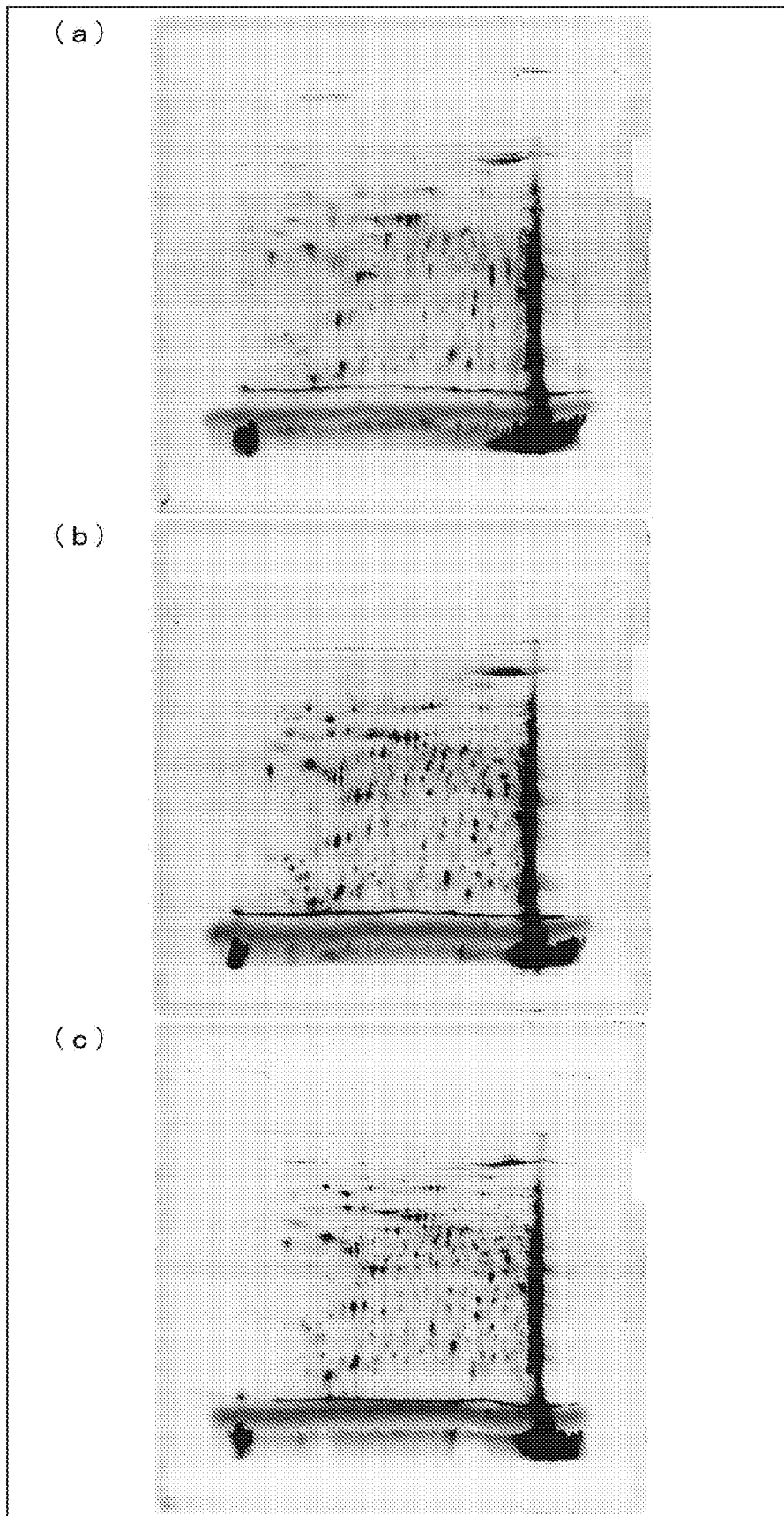
[図5]

図 5



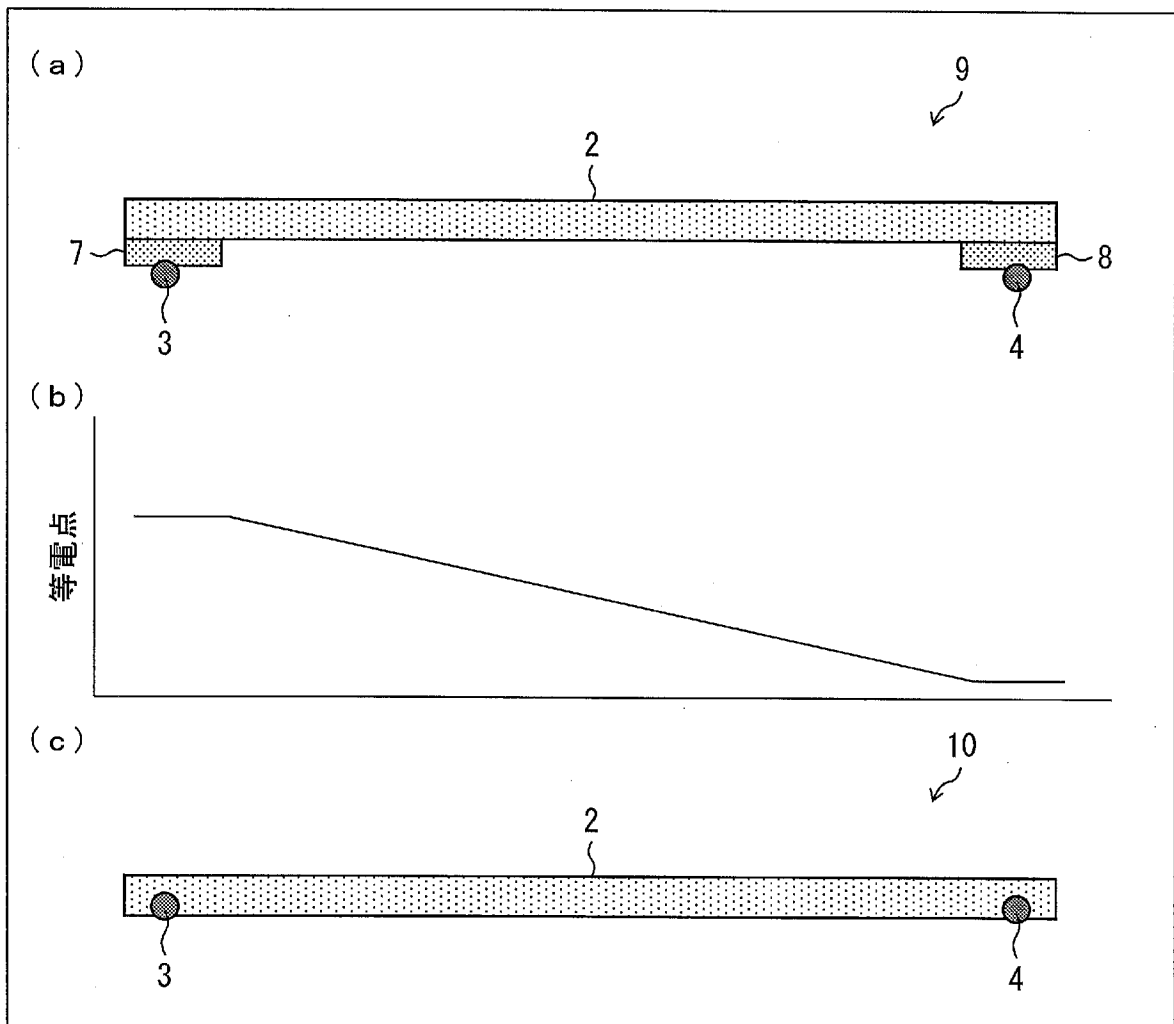
[図6]

図 6



[図7]

図 7



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/060860

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/447(2006.01) i

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N27/447

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

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2015 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2015 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2015 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                     | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 2004-510168 A (Proteom Systems Ltd.),<br>02 April 2004 (02.04.2004),<br>paragraphs [0025] to [0027]; fig. 6, 7<br>& US 2002/0100690 A1 & US 2004/0222096 A1<br>& WO 2002/026773 A1 & AU 9350001 A<br>& CN 1466593 A | 1-13                  |
| A         | JP 2012-242084 A (Sharp Corp.),<br>10 December 2012 (10.12.2012),<br>paragraphs [0062] to [0068]; fig. 15, 16, 18 to<br>20<br>(Family: none)                                                                           | 1-13                  |
| A         | JP 2011-33548 A (Hoyu Co., Ltd.),<br>17 February 2011 (17.02.2011),<br>paragraphs [0062] to [0064]<br>(Family: none)                                                                                                   | 1-13                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 June 2015 (17.06.15)

Date of mailing of the international search report  
30 June 2015 (30.06.15)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2015/060860

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 2014-10083 A (Sharp Corp.),<br>20 January 2014 (20.01.2014),<br>paragraphs [0069] to [0077]; fig. 11<br>& WO 2014/003103 A1 & CN 104412103 A | 1-13                  |
| A         | JP 3-29844 A (Shimadzu Corp.),<br>07 February 1991 (07.02.1991),<br>entire text; all drawings<br>(Family: none)                                 | 1-13                  |
| A         | JP 63-502456 A (Pharmacia AB.),<br>14 September 1988 (14.09.1988),<br>entire text; all drawings<br>& US 4874491 A & WO 1987/004948 A1           | 1-13                  |

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N27/447 (2006.01) i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N27/447

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| 日本国実用新案公報   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 5 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 5 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 5 年 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                           | 関連する<br>請求項の番号 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| A               | JP 2004-510168 A（プロテオム システムズ リミテッド）<br>2004.04.02, [0025] - [0027]、第6, 7図 & US<br>2002/0100690 A1 & US 2004/0222096 A1 & WO 2002/026773 A1 & AU<br>9350001 A & CN 1466593 A | 1-13           |
| A               | JP 2012-242084 A（シャープ株式会社）2012.12.10, [0062]<br>- [0068]、第15, 16, 18 - 20図（ファミリーなし）                                                                                         | 1-13           |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 7 . 0 6 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

3 0 . 0 6 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

黒田 浩一

2 J

9 2 1 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                  |                |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                | 関連する<br>請求項の番号 |
| A                     | JP 2011-33548 A (ホーユ株式会社) 2011.02.17, [0062] – [0064] (ファミリーなし)                                  | 1-13           |
| A                     | JP 2014-10083 A (シャープ株式会社) 2014.01.20, [0069] – [0077]、第11図 & WO 2014/003103 A1 & CN 104412103 A | 1-13           |
| A                     | JP 3-29844 A (株式会社島津製作所) 1991.02.07, 全文、全図 (ファミリーなし)                                             | 1-13           |
| A                     | JP 63-502456 A (フアーマシア・アー・ベー) 1988.09.14, 全文、全図 & US 4874491 A & WO 1987/004948 A1               | 1-13           |