

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6006231号
(P6006231)

(45) 発行日 平成28年10月12日 (2016. 10. 12)

(24) 登録日 平成28年9月16日 (2016. 9. 16)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 27/447 (2006. 01)

GO 1 N 27/26 (2006. 01)

GO 1 N 27/447 3 3 1 B

GO 1 N 27/447 3 3 1 C

GO 1 N 27/447 3 0 1 A

GO 1 N 27/26 P

GO 1 N 27/447 3 3 1 Z

請求項の数 24 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2013-544856 (P2013-544856)
 (86) (22) 出願日 平成23年12月16日 (2011. 12. 16)
 (65) 公表番号 特表2013-546003 (P2013-546003A)
 (43) 公表日 平成25年12月26日 (2013. 12. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/065673
 (87) 国際公開番号 W02012/083272
 (87) 国際公開日 平成24年6月21日 (2012. 6. 21)
 審査請求日 平成26年12月3日 (2014. 12. 3)
 (31) 優先権主張番号 12/972, 412
 (32) 優先日 平成22年12月17日 (2010. 12. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505307747
 マルバーン インストゥルメンツ リミテ
 ッド
 イギリス、ウースターシャー ダブリュア
 ール14 1 エックスゼット、マルバーン
 、グローブウッド ロード、エニグマ ビ
 ジネス パーク (番地なし)
 (74) 代理人 110000578
 名古屋国際特許業務法人
 (72) 発明者 コルベット ジェイソン セシル ウィリ
 アム
 イギリス国 エイチアール4 オーユー
 ヘレフォード ベイシャム ストリート
 74

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 拡散バリアを用いたレーザードップラー電気泳動法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

電気泳動測定方法であって、
 分散剤を保持する容器を提供する工程と、
 前記分散剤中に浸漬された第1電極を提供する工程と、
 前記分散剤中に浸漬された第2電極を提供する工程と、
 前記第1電極と前記第2電極の間の分散剤内の位置に、前記第1電極および前記第2電極に向かって拡散できるように、最初は両電極から分離された状態で試料を配置する工程と、

前記第1電極および前記第2電極にわたって交流電界を印加する工程と、
 前記試料の光散乱体積を時間的にコヒーレントな光で照射する工程と、
 前記交流電界を印加する工程中に前記試料と相互作用した、前記照射する工程による光において周波数シフトを検出する工程と、

前記検出する工程の結果に基づいて、前記試料の特性を導出する工程と
 を含み、前記検出する工程が、前記試料が第1電極および前記第2電極のいずれかまで拡散する前、又は、両電極において試料から生成された凝集体が光散乱体積内に戻る前に行われる、方法。

【請求項 2】

前記試料を配置する工程は、前記試料を前記分散剤中に注入することを含む、請求項1に記載の方法。

10

20

【請求項 3】

前記試料を配置する工程は、前記試料を、試料導入チャンネルを介して前記容器の外部から前記容器内に導入することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記試料が前記第 1 電極および前記第 2 電極のいずれかまで拡散する前に、又は、両電極において試料から生成された凝集体が光散乱体積内に戻る前に、前記試料を回収する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記試料は軟質試料である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記試料はタンパク質試料である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記試料を配置する工程は、分散剤によって前記第 1 電極および前記第 2 電極から分離された位置に前記試料を配置する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記試料を配置する工程は、前記分散剤とは異なるバリアによって、前記第 1 電極および前記第 2 電極から分離された位置に前記試料を配置する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記導出する工程は、前記試料の電気泳動移動度値からゼータ電位値を導出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記検出する工程は、前記交流電界が印加された状態で前記試料が前記第 1 電極および前記第 2 電極のいずれかまで拡散し得る時間よりも短い時間で、又は、両電極において試料から生成された凝集体が光散乱体積内に戻る前に、行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記照射する工程はレーザーを使用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

電気泳動装置であって、
第 1 アームおよび第 2 アームを有する、概ね直立した U 字形の容器と、
前記第 1 アームの上端に位置する第 1 電極と、
前記第 2 アームの上端に位置する第 2 電極と、
前記第 1 電極および第 2 電極にわたって交流電界を印加する手段と、
試料位置と前記第 1 電極との間の第 1 拡散バリアと、
前記試料位置と前記第 2 電極との間の第 2 拡散バリアと、
前記試料位置の光散乱体積を照射するために配置される時間的にコヒーレントな照射光の光源と、
前記試料と相互作用した後の前記試料位置からの照射光を受け入れるように配置される周波数シフト検出器と
を含み、

前記装置が、前記交流電界を印加する手段により前記第 1 電極および第 2 電極にわたって電界が印加される間、前記試料の光散乱体積を照射するように構成され、

前記検出器が、

i) 前記試料が前記第 1 電極および前記第 2 電極のいずれかまで拡散する前、又は
i i) 前記第 1 電極および前記第 2 電極において生成された凝集体が移動して前記光散乱体積内に戻る前に、
散乱光における周波数シフトを検出するように構成される、装置。

【請求項 13】

前記容器内の前記試料位置に試料を導入するために試料導入チャンネルをさらに含む、請求項 12 に記載の装置。

【請求項 14】

前記試料導入チャネルは針を含む、請求項 1 3 に記載の装置。

【請求項 1 5】

前記試料導入チャネルはポートを含む、請求項 1 3 に記載の装置。

【請求項 1 6】

前記容器内の前記試料位置にある前記試料を抽出するために試料抽出チャネルをさらに含む、請求項 1 2 に記載の装置。

【請求項 1 7】

前記第 1 拡散バリアは分散剤の体積を含み、前記第 2 拡散バリアは分散剤の体積を含み、請求項 1 2 に記載の装置。

【請求項 1 8】

前記第 1 拡散バリアおよび前記第 2 拡散バリアは導電性ゲルを含む、請求項 1 2 に記載の装置。

【請求項 1 9】

前記 U 字形の容器は、前記 U 字形の容器の開口部に近接して開口部を有する試料導入ポートをさらに含む、請求項 1 2 に記載の装置。

【請求項 2 0】

前記 U 字形の容器は、前記 U 字形の容器の開口部に近接して開口部を有する試料抽出ポートをさらに含む、請求項 1 2 に記載の装置。

【請求項 2 1】

前記 U 字形の容器は、前記 U 字形の容器の開口部に近接してそれぞれ開口部を有する試料導入ポートおよび試料抽出ポートを含む、請求項 1 2 に記載の装置。

【請求項 2 2】

前記容器は使い捨てのプラスチック容器である、請求項 1 2 に記載の装置。

【請求項 2 3】

前記照射光の光源はレーザーであることを特徴とする、請求項 1 2 に記載の装置。

【請求項 2 4】

前記検出器によって測定された前記試料の電気泳動移動度値からゼータ電位値を導出するためのゼータ電位導出ユニットをさらに含む、請求項 1 2 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明は、拡散バリアを用いたレーザードップラー電気泳動測定を含む、電気泳動測定を行うための方法および装置に関する。

(発明の背景)

キャピラリーゾーン電気泳動、膜密閉定常状態電気泳動 (membrane confined steady state electrophoresis)、ティセリウスの装置、およびレーザードップラー電気泳動 (LDE) を含む電気泳動光散乱など、軟質試料の電気泳動移動度を測定するために用いられてきた技術が数多くある。LDE は、外部電界の印加下で粒子の動きを測定することによって、粒子の移動度を測定する。図 1 を参照すると、粒子 1 6 はバッファ 1 4 中に分散され、電極 2 4 および 2 6 は試料中に浸漬される。電界は非常に高いバッファ導電率で印加され、試料の分解は電極表面で生じ得る。また、タンパク質試料の場合、電極表面での酸化 - 還元反応がタンパク質構造内の結合をイオン化して凝集体 1 8 を生成し、その後、凝集体 1 8 は、電極表面に付着し、且つ試料の残部中に分散されると考えられる。LDE に典型的に伴う体積は、試料コストが高く、且つ LDE 測定の最適化を繰り返し行う必要があるため、問題となり得る。

(発明の概要)

一態様では、本発明は、分散剤を保持する容器を提供することと、分散剤中に浸漬された第 1 電極を提供することと、分散剤中に浸漬された第 2 電極を提供することとを含む、電気泳動測定法を特徴とする。第 1 電極と第 2 電極の間の分散剤内の位置に、両電極から

10

20

30

40

50

分離された状態で試料が配置され、両電極にわたって交流電界を印加され、試料が時間的にコヒーレントな光で照射される。交流電界を印加する工程中に試料と相互作用した、照射する工程からの光において、周波数シフトを検出する。検出する工程の結果に基づいて、試料の特性を導出する。

【 0 0 0 2 】

好ましい実施形態では、試料を配置する工程は、試料を注入することを含み得る。試料を配置する工程は、試料を容器内に引き込む過程の一部であり得る。前記方法は、さらに、試料を回収する工程を含み得る。試料は、軟質試料であり得る。試料は、タンパク質試料であり得る。試料を配置する工程は、分散剤によって電極から分離された位置に試料を配置することができる。試料を配置する工程は、分散剤とは異なるバリアによって電極から分離された位置に試料を配置することができる。導出する工程は、試料の電気泳動移動度値からゼータ電位値を導出することを含み得る。検出する工程は、交流が印加された状態で相当量の試料が第1および第2電極のいずれかまで拡散し得る時間よりも短い時間で行うことができる。照射する工程は、レーザーを使用することができる。

10

【 0 0 0 3 】

別の態様では、本発明は、容器、第1電極、第2電極を含む、電気泳動装置を特徴とする。第1拡散バリアは、試料位置と第1電極との間に位置し、第2拡散バリアは、試料位置と第2電極との間に位置する。時間的にコヒーレントな照射光の光源は、試料位置を照射するように配置され、周波数シフト検出器は、試料と相互作用した後の試料位置からの照射光を受け入れるように配置される。

20

【 0 0 0 4 】

好ましい実施形態では、電気泳動装置は、さらに、容器内の試料位置に試料を導入するための試料導入チャネルを含み得る。試料導入チャネルは、針を含み得る。試料導入チャネルは、ポートを含み得る。電気泳動装置は、さらに、容器内の試料位置にある試料を抽出するための試料抽出チャネルを備えることを含み得る。第1拡散バリアは分散剤の体積を含むことができ、第2拡散バリアは分散剤の体積を含む。第1および第2拡散バリアは、導電性ゲルを含み得る。容器は、概ね直立したU字形の容器であり得る。U字形の容器は、U字形の容器の開口部に近接して開口部を有する試料導入ポートを含み得る。U字形の容器は、さらに、U字形の容器の開口部に近接して開口部を有する試料抽出ポートを含み得る。U字形の容器は、さらに、U字形の容器の開口部に近接してそれぞれ開口部を有する試料導入ポートおよび試料抽出ポートを含み得る。容器は、使い捨てのプラスチック容器であり得る。照射光源は、レーザーであり得る。電気泳動装置は、さらに、検出器によって測定された試料の電気泳動移動度値からゼータ電位値を導出するためのゼータ電位導出ユニットを含み得る。

30

【 0 0 0 5 】

全体として、本文書は、拡散バリアの概念について述べる。この概念により、(分散されたまたはそれ以外の形態の)試料自体の小さな体積が、電極を含む、分散剤のみで予め充填されたより大きな体積に導入される。拡散バリアは、試料が分散されたバッファを介して、電極表面との電氣的接触を保ちながら試料を電極表面から隔離することが意図されている。LDE測定を行うのは、試料が電極に到達する前、またはより長い測定時間を必要とする場合には電極で生成された凝集体が光散乱検出体積内に戻る前が理想的である。また、この場合、試料体積は通常大幅に低減される。理想的には、試料は電極で分解されないため、測定を適切に最適化するために、著しく多くの測定を行うことが可能である。また、試料セルの物理的形態によっては、測定後に試料を回収することが可能である場合もある。また、本技術は、主としてタンパク質またはその他の軟質試料を対象としているが、電極の黒化を低減することによりセル寿命を延ばすために使用することもできる。

40

【 0 0 0 6 】

3ポートキュベット、4ポートキュベット、および現在提供されている折り曲げキャピラリーセル(folded capillary cell)(FCC)の独特な充填方法を含む、数多くの好ましい実施形態がある。これらのセルは全て、ゼータサイザーナノ

50

(英国マルバーンに所在するマルバーン インストゥルメンツ リミテッド製)で見られるような標準的なキューベットホルダー用セルとして実施することができる。

【0007】

本発明のシステムは、タンパク質試料の電気泳動移動度測定における凝集体の生成を回避する助けになるという点で有利となり得る。これにより、凝集体の移動度はもとのタンパク質自体の移動度と非常に異なり得るため、これらの測定における誤差の原因が低減される可能性がある。電極の黒化は測定の質に何ら影響しないことを示している研究者らもいるが、この黒化は極度に外観が悪く、黒化は、業界の認識では、「汚れた」セル、したがって使用不能なセルを示すものとされている。

【図面の簡単な説明】

10

【0008】

【図1】従来技術の電気泳動測定を示す概略図である。

【図2A】電気泳動測定の開始時の本発明の電気泳動装置を示す概略図である。

【図2B】電気泳動測定中の第1期間経過後の、図2Aに示した電気泳動装置を示す概略図である。

【図2C】電気泳動測定中の第2期間経過後の、図2Aに示した電気泳動装置を示す概略図である。

【図2D】第3期間が経過し電気泳動測定が完了した後の、図2Aに示した電気泳動装置を示す概略図である。

【図3】本発明のU字形電気泳動装置の概略図である。

20

【図4】図3のU字形電気泳動装置の実施例の写真である。

【図5A】試料導入前を示した、導入チャンネルおよび抽出チャンネルを備えた本発明のU字形電気泳動装置の概略図である。

【図5B】試料導入中を示した、図5Aの電気泳動装置の概略図である。

【図5C】試料の電気泳動移動度測定後を示した、図5Aの電気泳動装置の概略図である。

【図5D】移動度測定を行った試料の抽出後を示した、図5Aの電気泳動装置の概略図である。

【図6】図5Aの電気泳動装置の一実施形態の概略図である。

【図7】本発明の電気泳動装置の濃度対距離のプロットである。(例示的实施形態の詳細な説明) 図2Aを参照すると、本発明の一態様の例示的電気泳動装置は、針などの導入チャンネル28を有するセル12を含む。この導入チャンネルにより、ユーザは、タンパク質試料などの試料を、バッファー/分散剤14内の電極から分離された位置に導入することができる。

30

【0009】

図2A~2Dを参照すると、動作中、試料セルは、最初は、試料自体が分散されたバッファーのみで充填され、試料自体は充填されない(図2Aを参照)。試料は、検出体積近くの小さな領域にのみ添加され、測定が開始される。測定は、電気泳動移動度の正確な推定値を記録するために十分な時間行われるが(図2B~2Dを参照)、試料が電極に到達するに十分なほど長くは行われぬ。これは、その後、電極凝集体の不存在下で、希釈されてはいるが、試料を取り出すことができることを意味する。

40

【0010】

図3を参照すると、電気泳動装置は、直立したU字形セル12Aをベースとすることができる。セル12Aの底部の光検出領域に試料16が注入される。これにより、拡散バリアとして機能するバッファーを保持するために、所与の占有面積について比較的長いチャンネル長が提供される。拡散バリアは、試料が分散されたバッファーを介して、電極表面との電氣的接触を保ちながら試料(タンパク質、軟質試料等)を電極表面から隔離し、電気泳動測定を行うことが意図されている。別の実施形態では、拡散をさらに妨げることができる寒天等の導電性ゲルプラグを、折り曲げセルチャンネルに追加することができよう。

【0011】

50

図4を参照すると、U字形電気泳動装置は、既存の光散乱測定システム、ゼータサイザーナノと適合するプラスチックセルとして実施することができる。ゼータサイザーナノは、英国マルバーンに所在するマルバーン インストゥルメンツ リミテッドから入手可能であり、本明細書に参照によって組み込まれる「ハイスループット懸濁液測定用装置 (APPARATUS FOR HIGH-THROUGHPUT SUSPENSION MEASUREMENTS) 」と題された国際公開第WO2010/041082号に記載されている。ゼータサイザーナノは、様々な種類の測定を行うことができるが、レーザードップラー電気泳動測定は、移動度測定に対して最も感度がよい。

【0012】

レーザードップラー電気泳動測定では、レーザードップラー風速測定法の技術を使用して粒子の速度を測定する。移動する粒子によって生じる入射レーザービームの周波数シフトまたは位相シフトは、粒子移動度として測定される。この移動度は、分散剤粘度を入力し、且つスモルコフスキーまたはヒュッケルの理論を応用することにより、粒子のゼータ電位に変換することができる。これらの理論は、ほとんどの用途に有用な近似である。さらに正確な変換が可能な最新のモデルも入手可能であるが、分散の化学知識をより多く必要とする。

【0013】

図5を参照すると、マルチポート折り曲げキャピラリーセル12Cを使用して、本発明の電気泳動測定を行うこともできる。基本概念を図5A～5Dにまとめている。セルは4つのポートからなり、2つは希釈剤のみに用いられ (AおよびB) 、2つは試料のみに用いられる (CおよびD) 。3つのポートの場合は、ポートCおよびDの機能が1つにまとめられる。

【0014】

動作中は、セル12C全体が、試料が分散されたバッファーで充填される (図5A) 。試料は試料カップC内に滴下 (ピペットで移動) され、シリンジが試料を測定チャンバー内に引き込む (図5B) 。直ちにLDE測定が開始される。測定が完了すると (図5C) 、試料は何らかの形でセルアームに沿って拡散しているであろう。高速電界測定は、電極チャンバーから電極チャンバへの試料の電気浸透性の「スロッシング」に影響されないため、これらの電極チャンバーの頂部は開放されたままであり、希釈された形態ではあるが、試料をシリンジで回収することにより、セルがきれいに一掃される。 (図5D) 。図6を参照すると、マルチポートセルは、ゼータサイザーナノに都合のよい折り曲げ形態に設計することもできる。

【0015】

図7を参照すると、特定の測定に必要な拡散バリアは、フィックの第一法則を使用して決定することができる。フィックの第一法則は、一定濃度供給源 $n(0)$ からの距離 x における、時間 t の、濃度 n を記述しており、[数1]によって求められる。

【0016】

【数1】

$$n(x,t)=n(0)\operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right)$$

【0017】

式中、 $\operatorname{erfc}()$ は、相補誤差関数であり、 D は、拡散係数である。ここでは、ゼータサイザーナノZSを使用して測定した $D = 120 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ のリゾチームに焦点を当てる。

【0018】

図7は、リゾチーム試料が $x = 0$ の供給源から 30 mm の距離を顕著に拡散するまでには多くの経過時間が必要であることを示している。マイクロ電気泳動を使用してタンパク

10

20

30

40

50

質移動度測定を行うためにかかる時間は、約数分～数十分である。これは、図 7 に示された時間尺度よりもかなり小さい。対流や残留電気浸透により図 7 に示された時間がかかなり短くなる可能性は高いが、本技術の理論ベースを強調するための限界推定値としては十分である。即ち、試料を回収することが求められる場合、タンパク質が電極表面に移動するのにかかる時間内に、LDE 測定を行うことができる。あるいは、タンパク質試料を損なうことなく回収することが求められない場合、タンパク質が電極に到達するまでにかかる時間と、その後のタンパク質 / 電極凝集体が電極から検出領域に戻るのにかかる時間の合計時間内に、LDE 測定を行うことができる。

【 0 0 1 9 】

ここまで、多くの特定の実施形態に関連して、本発明を説明してきた。しかしながら、当業者であれば、本発明の範囲に包含されると考えられる多くの改変が明白であろう。例えば、セルの他の形状や、他の注入および / または抽出機構を考案することもできるであろうし、本発明の方法を他の種類の試料に適用することもできるであろう。したがって、本発明の範囲は、本明細書に添付される特許請求の範囲によってのみ制限されることが意図されている。加えて、特許請求の範囲の記載の順序は、特許請求の範囲における特定の用語の範囲を制限するものとして解釈されないものとする。

10

【 図 1 】

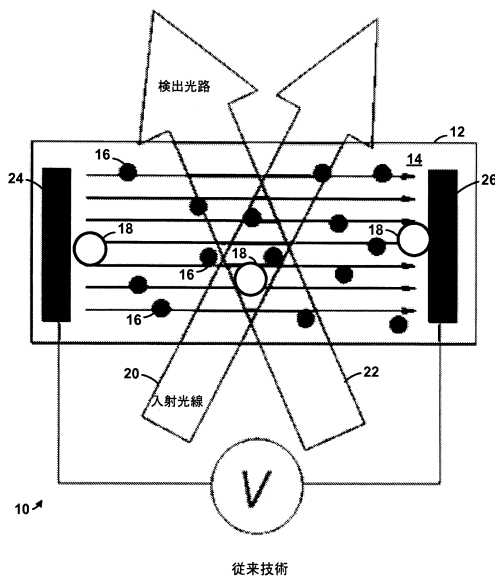


FIG. 1

【 図 2 A 】

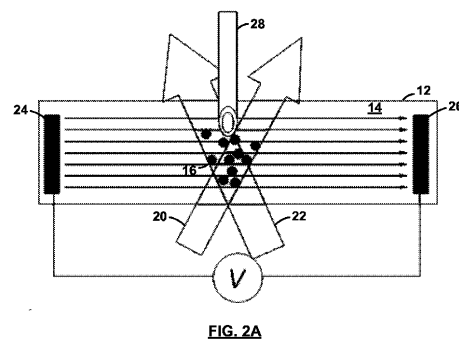


FIG. 2A

【 図 2 B 】

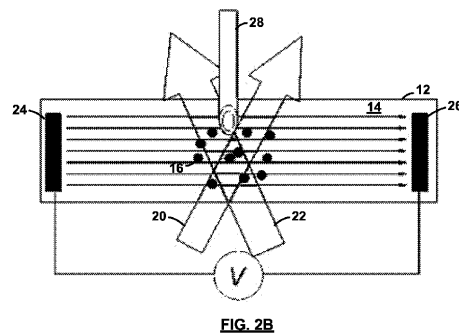
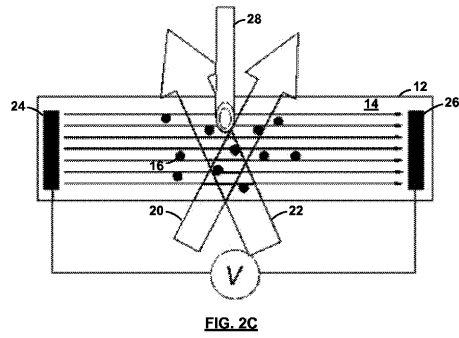
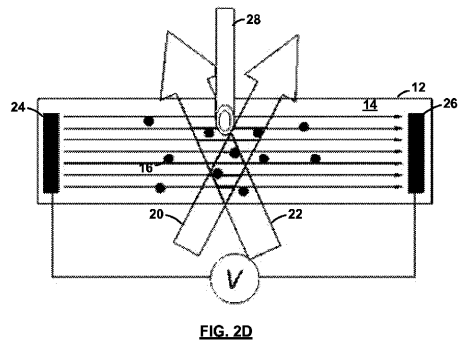


FIG. 2B

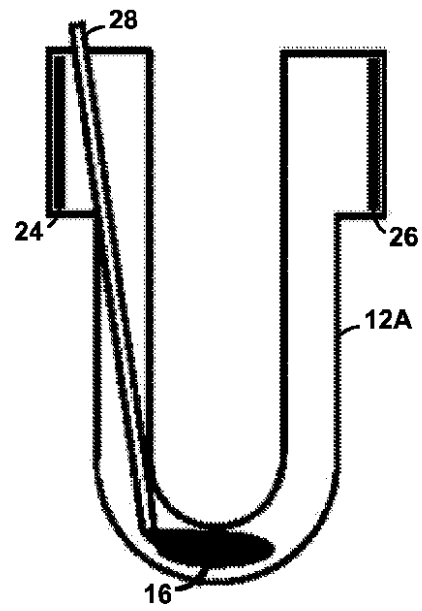
【図 2 C】



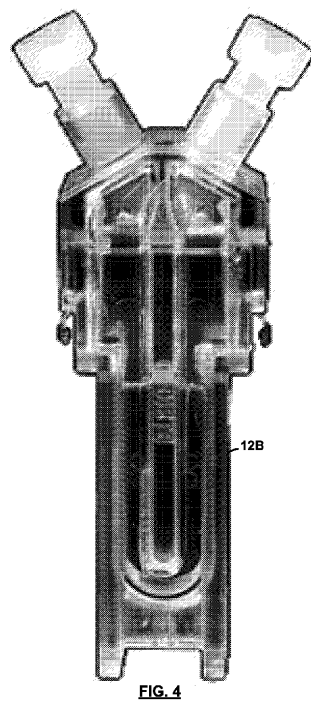
【図 2 D】



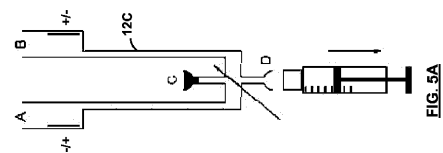
【図 3】



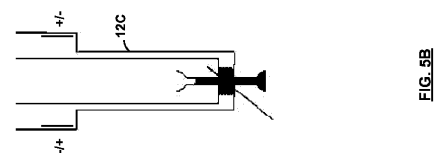
【図 4】



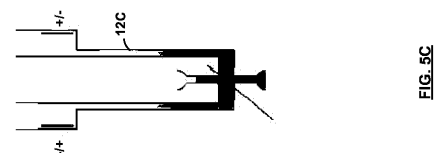
【図 5 A】



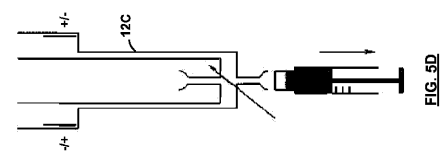
【図 5 B】



【図 5 C】



【図 5 D】



【図 6】

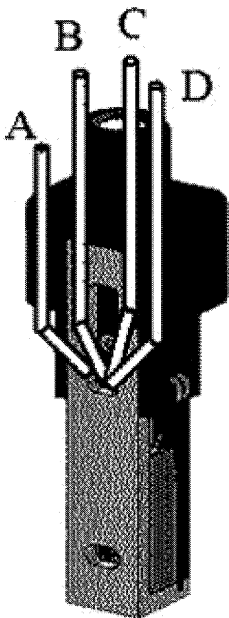


FIG. 6

【図 7】

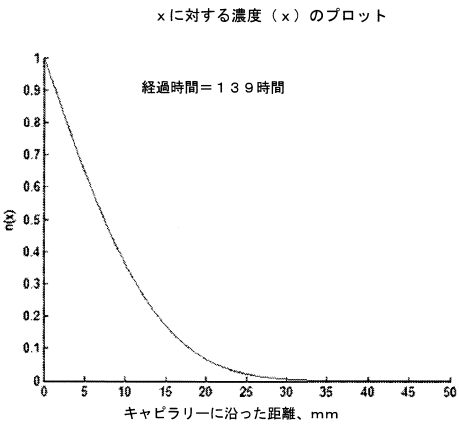


FIG. 7

フロントページの続き

(72)発明者 コナー マルコム
イギリス国 ダブリュアール13 6エスイー ウスターシャー マルバーン ジファード ドラ
イブ 28

(72)発明者 マティソン ケビン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01564 スターリング ホールデン ロード 74

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 特開平09-292358(JP,A)
特開2006-177732(JP,A)
特開2002-005888(JP,A)
特開2004-317123(JP,A)
特開2006-226981(JP,A)
特開2002-360237(JP,A)
特開2011-075537(JP,A)
特開昭57-004546(JP,A)
特開2010-101705(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 27/26-27/49
G01N 15/00-15/14