

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3918403号

(P3918403)

(45) 発行日 平成19年5月23日(2007.5.23)

(24) 登録日 平成19年2月23日(2007.2.23)

(51) Int. Cl.

GO 1 N 27/447 (2006.01)

F I

GO 1 N 27/26 3 3 1 G

GO 1 N 27/26 3 3 1 K

請求項の数 4 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2000-147497 (P2000-147497)
 (22) 出願日 平成12年5月15日(2000.5.15)
 (65) 公開番号 特開2001-324475 (P2001-324475A)
 (43) 公開日 平成13年11月22日(2001.11.22)
 審査請求日 平成15年2月19日(2003.2.19)

(73) 特許権者 000005108
 株式会社日立製作所
 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
 (74) 代理人 100100310
 弁理士 井上 学
 (72) 発明者 清水 康司
 茨城県ひたちなか市大字市毛882番地
 株式会社 日立製作所 計測
 器グループ内
 (72) 発明者 喜多 敏昭
 茨城県ひたちなか市大字市毛882番地
 株式会社 日立製作所 計測
 器グループ内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キャピラリアレイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料を注入できる試料注入端と、緩衝液を注入できる緩衝液注入端とを備える複数のキャピラリと、

複数のキャピラリにおける試料注入端を広げて保持し、各試料注入端と共に試料液中に浸漬される複数の電極を備える電圧印加部と、

励起光が照射される複数のキャピラリの一部を整列し、複数のキャピラリを串刺しするように通過する励起光が照射される光検知部と、

複数のキャピラリにおける緩衝液注入端を束ねて保持し、電気泳動装置の緩衝液容器と繋がる緩衝液ゲル供給部とを含み、

前記電極が金属管であり、当該金属管の内部に前記キャピラリが挿入され、

前記金属管の端面が前記キャピラリの軸に対し垂直であり、

前記キャピラリの前記試料注入端が前記金属管から所定長さ突出し、

前記金属管と前記キャピラリの隙間を封じ、

電気泳動装置に取り付け、取り外しできるキャピラリアレイ。

【請求項2】

請求項1記載のキャピラリアレイであって、

キャピラリ表面に保護膜を備え、光検知部において保護膜が除去されていることを特徴とするキャピラリアレイ。

【請求項3】

10

20

請求項 1 記載のキャピラリアレイであって、
光検知部において、複数のキャピラリが基板上に配列されていることを特徴とするキャピラリアレイ。

【請求項 4】

請求項 1 記載のキャピラリアレイであって、
基板にレーザ光が通過できる溝を備え、溝の底面に蛍光の反射を低減する加工が施されていることを特徴とするキャピラリアレイ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は DNA, 蛋白質等の試料を分離分析するキャピラリアレイ電気泳動装置に用いられるキャピラリアレイに関する。

【0002】

【従来の技術】

複数のキャピラリを組み合わせるアレイを構成し、各キャピラリに電気泳動媒体と分析又は分離すべき試料を供給、移動させて、対象となる試料を分離・分析などに利用する技術はよく知られている。蛍光物質で標識された DNA, 蛋白質などの試料をキャピラリに供給する。このような技術は、米国特許第 5366608, 同 5529679, 同 5516409, 同 5730850, 同 5790727, 同 5582705, 同 5439578, 同 5274240 などに記載されている。分離・分析のスループットの観点からすると、平板ゲルを用いた電気泳動法よりもマルチキャピラリを用いた方が、多くの利点がある。

【0003】

特開平 9 - 96623 号公報には、マルチキャピラリアレイを用いて、蛍光標識された試料を電気泳動により分離・分析する技術が開示されている。キャピラリアレイ電気泳動装置の基本構成は、キャピラリアレイ, レーザ光源等からなる励起光学系, 蛍光を検出する受光光学系及び電気泳動させるための電圧印加部等より構成される。キャピラリアレイは、キャピラリを平面状に配列した構造で、キャピラリの配列面と平行方向から、蛍光体で標識された試料(蛍光試料)が満たされたキャピラリにレーザを照射し、キャピラリのレンズ作用によってレーザを集光させることにより、すべてのキャピラリ内の蛍光試料にレーザを照射する。レーザが照射させられた蛍光試料は蛍光を発光する。レーザの照射方向とほぼ垂直方向に発光する蛍光試料からの蛍光を受光光学系で検出することにより、試料測定を行う装置である。

【0004】

この公報においてはアレイの検知部は概略図で記載されているが、電気泳動装置に組み込むための具体的なキャピラリアレイの全体構成は記載されていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、上記キャピラリアレイ電気泳動装置に好適な具体的なキャピラリアレイの構成を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明は、光検知部, 緩衝液注部, 電極内蔵キャピラリヘッドを備えたキャピラリアレイを提供する。本発明のキャピラリアレイは電気泳動装置に必要な機能を備えたものである。

【0007】

本発明をより具体的に説明すると、表面にポリマー保護膜を有し、一端が束ねられ他端が広げられた複数のキャピラリと、該キャピラリが近接してほぼ平面上に整列されて上記ポリマー保護膜が除去された光検知部と、上記広げられたキャピラリを一体に保持し、電極を内蔵したヘッドと、該ヘッドに電氣的に接続され、試料液中に浸漬される電極と、上記束ねられたキャピラリに設けられた他方の電極とを有するキャピラリアレイに関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

また、他の実施態様によれば、保護被覆を有する複数のキャピラリの一端を束ねて、その端部を平滑に揃えて緩衝液注入口を形成し、該キャピラリの他端は電極を内蔵したキャピラリヘッドを貫通して、該電極と電氣的に接続された金属管に挿入され、該キャピラリの中間部に光検知部を形成し、該光検知部はキャピラリの保護被覆を除去して、第1の支持基板と第2の支持基板とにより積層されて、該基板の一方に形成された窓から蛍光を発するように構成され、該支持基板の蛍光発射側とは反対側の面に黒塗を形成したキャピラリアレイが提供される。

【 0 0 0 9 】

該キャピラリアレイの光検知部の支持基板の一方にレーザー光が通過する溝を設け、その底面が蛍光の反射を減少するように加工してもよい。該キャピラリヘッドのキャピラリが切り揃えられて管に密に挿入され固定されている。固定の方法は接着剤を注入して硬化するなどの方法がある。該試料注入口を保護するキャップを取り付けることにより、キャピラリアレイの輸送、取り扱い、管理が安心して行える。また、使用中断中のキャピラリアレイの開放端の乾燥を防ぐことができる。該試料注入口におけるキャピラリを該金属管からわずかに突出させる。

10

【 0 0 1 0 】

光検知部においては、蛍光を発生する窓とは反対側に反射光遮蔽膜を設けてノイズを減らすようにしてある。キャピラリアレイの試料供給部にはアレイヘッドの電極に電氣的に接続した金属管電極が設けてあり、この中にキャピラリが挿入され、かつ金属管内で接着剤等により固定されている。

20

【 0 0 1 1 】

試料供給部の先端には、緩衝液を入れることができるキャップが取り付けられるようになっており、運搬中は試料供給部の先端を保護する。キャピラリアレイを電気泳動装置に組み込んで分離・分析に使用した後、分析を中断するときは、上記キャップに緩衝液を入れて、キャピラリ先端の乾燥を防止することによって、キャピラリがいつでも再使用できる状態に保持することができる。

【 0 0 1 2 】

【 発明の実施の形態 】

以下、本発明の実施形態を図を参照して詳細に説明する。

30

【 0 0 1 3 】

図1は、本発明のキャピラリアレイを電気泳動システムに適用したときの概略図である。複数のキャピラリたとえば16本をまとめて1つのアレイにする。光検知部29には下部支持板a(ガラス基板)と上部支持板b(シリコン基板)が設けられ、キャピラリのポリイミド被覆を除去して透明にした部分が、窓に設けられる。図2には本発明のキャピラリアレイの全体構造が示され、キャピラリ

1, 光検知部29, キャピラリヘッド30及び電極内蔵ロードヘッダー31を備えている。キャピラリの先端は、電極管32に挿入され、固定されている。電気泳動の電圧はキャピラリヘッド30とロードヘッダー31の間に掛けられる。

【 0 0 1 4 】

図1において、レーザー光源20により発生するレーザー33はビームスプリッター22により2分割され、ミラー21により進行方向が変更される。集光レンズ23によりレーザー33は集光され、キャピラリー1が配列する平面と平行方向から、キャピラリー1を照射する。キャピラリー1の内部は蛍光標識された試料

40

(蛍光試料34)で満たされており、レーザー33を蛍光試料34に照射することにより、蛍光試料34が蛍光35を発光する。蛍光35の検出は、キャピラリー1が配列する平面とほぼ垂直方向に発光する蛍光35を、第1レンズ24により平行光にし、光学フィルタ及び像分割プリズム25により像分割をした後、第2レンズ26によりCCDカメラ27に結像し、CCDカメラ27により検出することにより行ない、検出する測定データは処理演算装置28により処理する。

50

【 0 0 1 5 】

なお、図 1 においては、レーザ 3 3 は光検出部 2 9 の両側から照射しているが、片側のみ照射させる構成でもよく、受光光学系においても、図 1 に示す構成に限るものではない。また、キャピラリー 1 の構成本数は 1 6 本に限るものではなく、緩衝液注入口 3 0 や導電性蛍光試料注入口 3 2 の構成などについても図 1 に示す構成に限るものではない。

【 0 0 1 6 】

続いてキャピラリーアレイ電気泳動装置の操作手順を説明する。緩衝液容器

1 7 に入っている緩衝液 3 6 を、緩衝液注入口 3 0 からキャピラリー 1 内に注入する。次に蛍光試料 3 4 で満たされた蛍光試料容器 1 8 に導電性蛍光試料注入口 3 2 を入れ、キャピラリー 1 内に蛍光試料 3 4 を注入する。その後、導電性蛍光試料注入口 3 2 を緩衝液の入った緩衝液容器（図では省略）に入れ、緩衝液注入口 3 0 と蛍光試料注入口 3 1 との間に高電圧電源 1 9 により高電圧を印加することにより、電気泳動を生じさせる。電気泳動の移動速度は分子の電荷の大きさに比例し、分子の大きさに逆比例するので、蛍光試料 3 4 は分離される。高電圧を長時間印加し続けることにより電気泳動を長時間生じさせ、この時に発光する蛍光 3 5 を連続的に測定するものである。

10

【 0 0 1 7 】

光検出部の詳細構造が図 3 に示されている。図 3 においては、ガラス基板 3 とシリコン基板 2 との間に、ポリイミド被覆 1 0 の除去部 9 を設けたキャピラリーアレイ 1 を挟んでいる。ガラス基板にはレーザ光が通過する溝が形成され、その溝の底面はすりガラス 1 1 になっている。なお、ガラス基板の溝部以外はレーザ非照射部 5 である。

20

【 0 0 1 8 】

シリコン基板 2 には蛍光を取り出すための窓 6 を有する窓枠 7 が設けられる。ガラス基板の外側には黒塗 4 6 が形成され、蛍光の反射によるノイズを減少させる。

【 0 0 1 9 】

図 4 は、図 3 のレーザ非照射部 5 における断面を示す。

【 0 0 2 0 】

ポリイミド被覆が接触するガラス基板 3 表面は干渉縞が観察される程度に高精度に加工されており、平面度が高い。複数本のキャピラリーはポリイミド樹脂 1 0 を介して前述の高平坦面に接触させ、配列させてある。これにより複数本のキャピラリーはガラス基板 3 に倣うことになり精度良く且つ簡単に配列することができる。シリコン基板 2 には V 溝 8 が形成され、キャピラリーをこの溝内で整列する。

30

【 0 0 2 1 】

図 5 は、図 3 のレーザ照射部 4 における断面を示す。（ a ）は黒塗 4 6 が無いときの説明図で、（ b ）は黒塗 4 6 が有るときの説明図である。

【 0 0 2 2 】

まず黒塗 4 6 が無い（ a ）の時、レーザ 4 7 は前述の精度良く配列された複数本のキャピラリーを串刺しするように通過する。この時熔融石英管 9 の表面から散乱光 5 1 がガラス基板 3 を通過し、ガラス基板 3 と対面する対面部材 4 9 の表面の蛍光発生物質に照射され、その時発生する発光 5 2 が熔融石英に戻り、さらに貫通窓 6 を通過して、第一レンズ 2 4 に向かい、ノイズを拾うことになる。また、ガラス基板 3 の裏面に蛍光発生物質 5 0 が付着している場合でも同様で、ノイズとなる。

40

【 0 0 2 3 】

しかし、（ b ）のように、ガラス基板 3 の裏に黒塗 4 6 を施しておくこと、対面部材に蛍光発生物質 5 0 があっても、さらに黒塗 4 6 を施した後に蛍光発生物質が付着しても、散乱光 5 1 は黒塗 4 6 に吸収され、ノイズの原因が取り除かれる。

【 0 0 2 4 】

もちろん、黒塗 4 6 の物性は蛍光を発生しない塗料を使用する。代表的な塗る作業はシルクスクリーンなどが用いられる。もちろんその他の印刷方法でもかまわないし、手塗りでも十分である。

【 0 0 2 5 】

50

図6は、図3を上から見た代表的平面図で概略を示している。シリコン基板2は2点鎖線で示す。シリコン基板2に設けられている貫通窓6も2点鎖線で示してある。複数本のキャピラリが並んでいる状態を示してある。

【0026】

図6によりキャピラリの整列を説明する。光検出部のキャピラリはその部分だけ、熔融石英管9を被覆しているポリイミド樹脂10が除去されている。従来、この除去は1本毎に別々に所定の寸法だけ除去された後、その除去部分を整列させていた。この時1本毎のため所定の除去幅に加工誤差が生じ、除去幅がまちまちとなる。またその除去部の特に境界（ポリイミド樹脂10が切れている境界）を合わせる様に整列させるが、この時にも合わせ誤差が生じ多くの作業時間が掛かる。通常、境界部分が合っていないことですぐに確認

10

10

【0027】

そこで、1本毎の被覆除去はやらないで、まずキャピラリを整列させた後、一括してポリイミド樹脂を除去すれば、複数本のキャピラリのポリイミド樹脂10の除去部がきれいに整列される。前述の境界部が揃っていることですぐに確認できる。除去部の所定の幅、所定の位置は複数本のキャピラリを一緒に自由に換えられる。

【0028】

図7は本発明の実施形態であるロードヘッダー部の説明図である。ロードヘッダー部は、キャピラリ211、金属管として電極SUSパイプ212、ホルダ

20

20

【0029】

キャピラリヘッドと蛍光検出部が組まれた16本のキャピラリのロードヘッダー側の先端を、蛍光検出部の中心からL+10mmの長さに切り揃える。ここでLは、ロードヘッダーが組立完成後における蛍光検出部の中心からロードヘッダー先端までのキャピラリ長さで、シーケンサーの分離性能と泳動時間などから所定の長さが要求され、例えば、220、360、500、800mmなどに設計される。次に、キャピラリ211をロードヘッダー

30

30

【0030】

次にロードヘッダー先端部の加工を説明する。図8はその説明図を示す拡大断面図である。図に示すように、SUSパイプ212とキャピラリ211の間に接着剤217を注入し、SUSパイプ212とキャピラリ211の隙間を封じる。その後、ブレードを用いた切断装置で、キャピラリ211の先端をSUSパイプ212の端面から0.5~1.0mmの長さに切断する。以上の方法により、ロードヘッダー先端から蛍光検出部までの各キャピラ

40

40

【0031】

次に、キャピラリ211のSUSパイプ212先端からの長さは、DNA分子をキャピラリ内に導入するための最適電場形成に0.5mm以上が必要である。一方、図8に示すように、マイクロリッター程度の微量サンプルを測定するためには、キャピラリ211の先端長さは1.0mm以下にする必要がある。0.5~1.0mmの長さは、SUSパイプ212先端の接着剤封入作業と、キャピラリ先端の切断作業にも適切な長さである。

50

50

【0032】

本発明の他の実施形態であるロードヘッダーのSUSパイプ212の先端形状を説明する。全体の構造は上記実施形態と同じであるが、ホルダに内蔵される側の先端を、円錐上に広げた形状のSUSパイプ212を使用する。その結果、ロードヘッダーカバー215の穴からキャピラリ211をSUSパイプ212に挿入する時、両者の穴の同心度が多少ずれていても、容易に挿入でき、作業性が向上できる効果がある。

【0033】

図9は本発明におけるキャピラリアレイの試料注入部とその保護キャップとの関係を示す斜視図である。キャピラリアレイのロードヘッダ31の先端にある試料注入部をキャップ341にはめ込む様に構成する。これにより、キャピラリアレイの運搬時の保護を図ることができ、しかもキャピラリアレイを使用して電気泳動装置の運転を一次中断する場合、あるいは何らかの理由でキャピラリアレイを電気泳動装置から取り外して保管する場合、キャピラリ先端が乾燥しないように緩衝液などをキャップに入れてこの中にキャピラリアレイを浸しておく事でキャピラリアレイを保護できる。キャップ341のつば部134はロードヘッダー31との密着を図る。

10

【0034】

図10は本発明におけるキャピラリヘッドとそ保護キャップとの関係を示す図である。30にシリコンゴム製のキャップ111をはめ込む構成になっている。これにより、図9の保護キャップ341と同様、キャピラリアレイの運搬時の保護を図ることができる。また、キャピラリアレイを電気泳動装置から取り外して保管する場合、キャピラリヘッド先端の乾燥を防ぐことができる。

20

【0035】

なお以上説明したキャピラリアレイにおいて使用しているキャピラリー1は、内径 $50 \pm 10 \mu\text{m}$ 、外径 $340 \pm 20 \mu\text{m}$ の熔融石英チューブを使用する。熔融石英チューブはそれ自体だと非常に折損し易いので、 $15 \pm 5 \mu\text{m}$ 厚さのポリイミド被覆をつける。キャピラリーの内径は蛍光試料34の微量化を考慮すると細かい方が望ましいが、蛍光試料34と熔融石英の屈折率差による凹レンズ効果を抑えるためには内径が細すぎない方がよい。熔融石英管内径を $50 \sim 100 \mu\text{m}$ が好ましい。また、外径は上記屈折率差による影響を抑えるためには、細かい方がよいが、細くなると逆に静電気により組立てしづらくなるため、熔融石英管外径を $250 \sim 350 \mu\text{m}$ が好ましい。

30

【0036】

また、キャピラリー1の被覆材としてはポリイミド樹脂10に限る必要はなく、ポリイミド樹脂10と同等の電気絶縁性、およびその他諸特性を持つ部材を用いてもよい。

【0037】

以上のように、本発明のキャピラリアレイは、電気泳動装置に組み込むのに必要な光検知部、電圧印加部及び緩衝液ゲル供給部が一体となっており、電気泳動に必要な基本機能を備えたキャピラリアレイである。

【0038】

【発明の効果】

本発明によれば、取り扱い性がよく、機械的な保護が十分確保され、しかも電気泳動装置に取り付け、取り外しが容易なキャピラリアレイを提供することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のキャピラリアレイが適用される電気泳動システムを示す概略図である。

【図2】本発明によるキャピラリアレイの構成を示す斜視図である。

【図3】本発明によるキャピラリアレイの光検知部の構成を示す分解図である。

【図4】本発明によるキャピラリアレイの光検知部の非照射部の構成を示す概略断面図である。

【図5】図3における黒塗の作用を説明する図である。

【図6】図3の平面図である。

【図7】ロードヘッダー近傍の構成を示す一部切り欠き斜視図である。

50

【図8】キャピラリ先端具体構成を説明する断面図である。

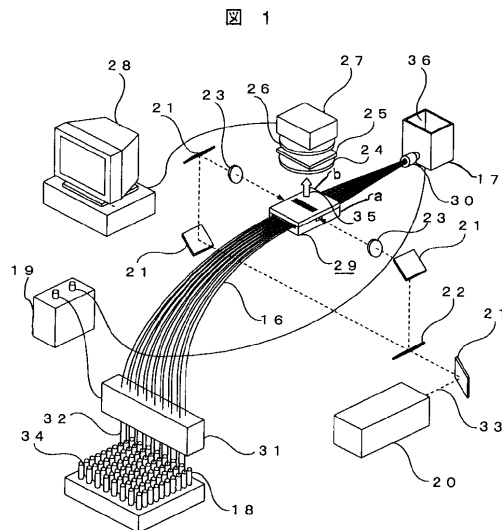
【図9】ロードヘッダーと保護キャップとの関係を説明する斜視図である。

【図10】キャピラリヘッド部の構造を示す斜視図である。

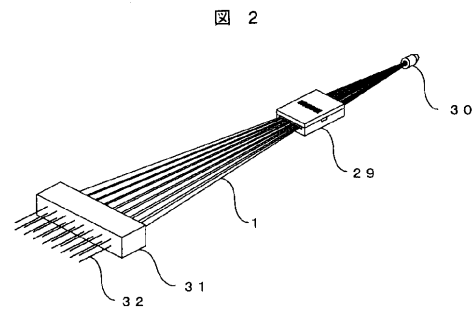
【符号の説明】

1 ... キャピラリ、2 ... シリコン基板、3 ... ガラス基板、4 ... レーザ照射部、5 ... レーザ非照射部、6 ... 貫通窓、7 ... 貫通窓枠、8 ... V溝、9 ... 除去所、10 ... ポリイミド樹脂、11 ... すりガラス面、46 ... 黒塗、212 ... SUSパイプ。

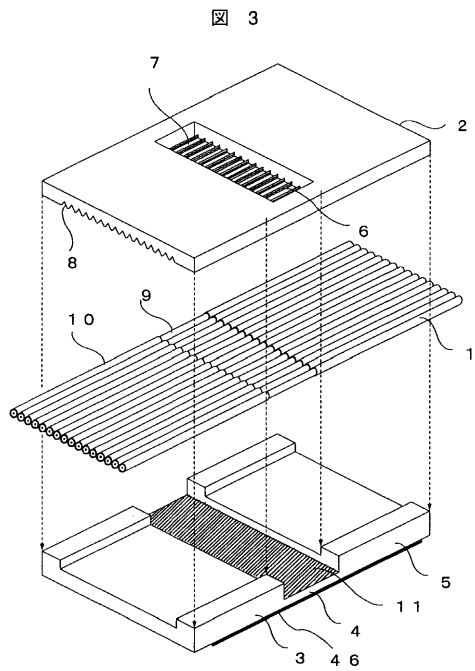
【図1】



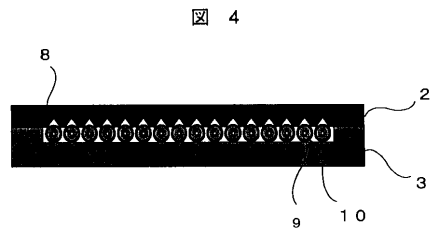
【図2】



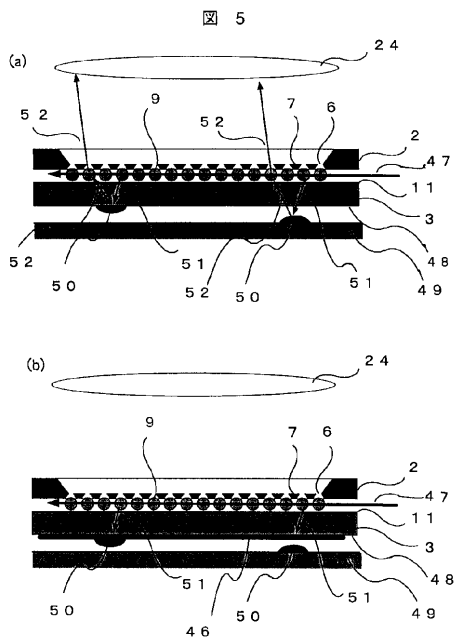
【 図 3 】



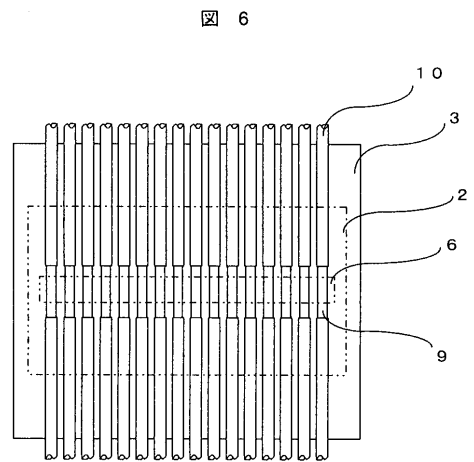
【 図 4 】



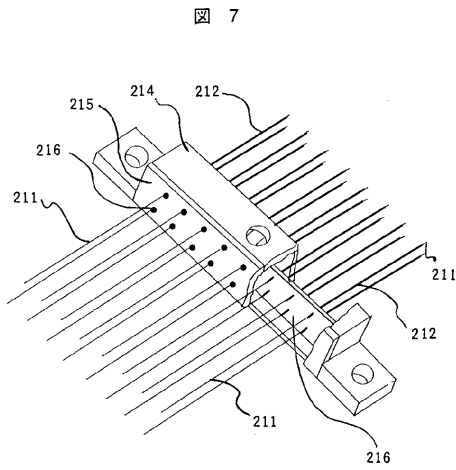
【 図 5 】



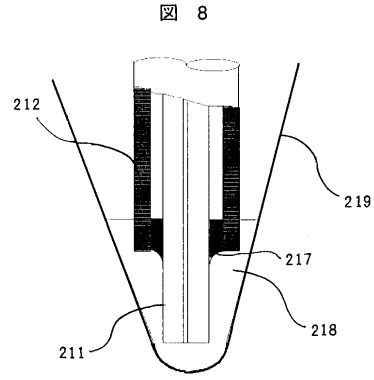
【 図 6 】



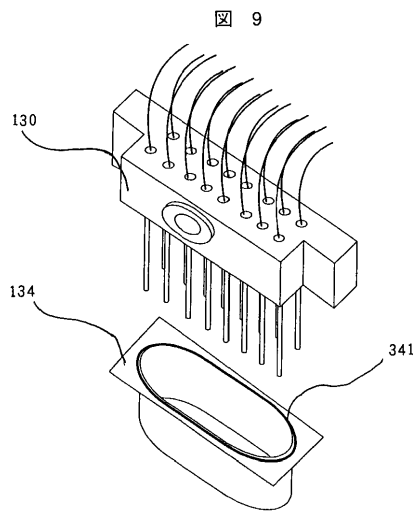
【 図 7 】



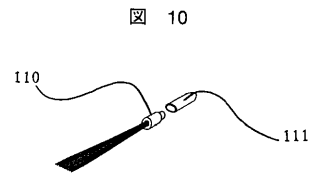
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



フロントページの続き

- | | | | | |
|---------|----------------------------------|------|-------|----------|
| (72)発明者 | 塚田 清司
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 | 株式会社 | 日立製作所 | 計測器グループ内 |
| (72)発明者 | 鈴木 章浩
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 | 株式会社 | 日立製作所 | 計測器グループ内 |
| (72)発明者 | 盛岡 友成
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 | 株式会社 | 日立製作所 | 計測器グループ内 |
| (72)発明者 | 小島 正也
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 | 株式会社 | 日立製作所 | 計測器グループ内 |
| (72)発明者 | 伊名波 良仁
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 | 株式会社 | 日立製作所 | 計測器グループ内 |
| (72)発明者 | 時永 大三
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 | 株式会社 | 日立製作所 | 計測器グループ内 |
| (72)発明者 | 山本 周平
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 | 株式会社 | 日立製作所 | 計測器グループ内 |
| (72)発明者 | 沖島 由幸
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 | 株式会社 | 日立製作所 | 計測器グループ内 |
| (72)発明者 | 福永 正雄
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 | 株式会社 | 日立製作所 | 計測器グループ内 |
| (72)発明者 | 古川 貴康
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 | 株式会社 | 日立製作所 | 計測器グループ内 |
| (72)発明者 | 庄司 智広
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 | 株式会社 | 日立製作所 | 計測器グループ内 |

審査官 柏木 一浩

- (56)参考文献 国際公開第 00 / 016086 (WO, A1)
特開平 11 - 230940 (JP, A)
特開平 05 - 060728 (JP, A)
米国特許第 06027627 (US, A)
特開平 05 - 093710 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/47