

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532384

(P2004-532384A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int. Cl.⁷
G01N 27/447
B01D 57/02
B03C 5/00
// C12N 15/00

F I

G O 1 N 27/26 3 1 5 K
 B O 1 D 57/02
 B O 3 C 5/00 Z
 G O 1 N 27/26 3 2 5 B
 G O 1 N 27/26 3 3 1 E

テーマコード (参考)

4 D O 5 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-559655 (P2002-559655)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月28日 (2002.1.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年7月28日 (2003.7.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/002515
 (87) 国際公開番号 W02002/059589
 (87) 国際公開日 平成14年8月1日 (2002.8.1)
 (31) 優先権主張番号 60/264, 605
 (32) 優先日 平成13年1月26日 (2001.1.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

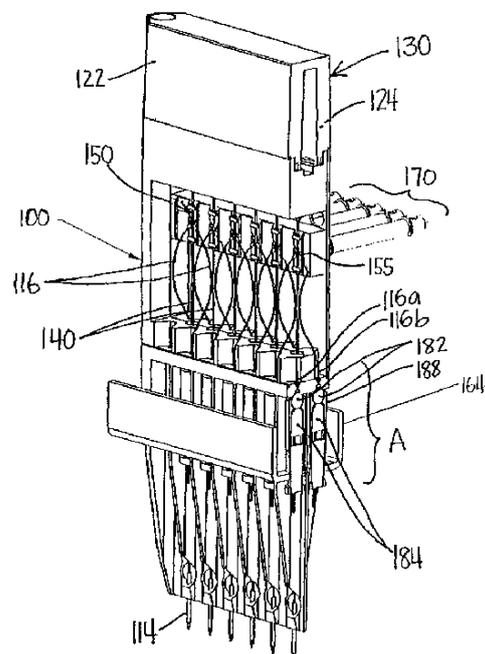
(71) 出願人 503269379
 バイオカル テクノロジー, インコーポレ
 イティド
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 928
 67, オレンジ, スイート オー, イース
 ト カテラ アベニュー 1920
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マルチチャンネル生物分離カートリッジ

(57) 【要約】

効率的で、小さい、持ち運び可能な、交換可能な、再利用可能な、再生利用できる、マルチチャンネルカートリッジを用いる生物分離システムであって、予め位置あわせされた光学部及び一体化された試薬リザーバーを有する生物分離システムである。このカートリッジは、例えば、CE分離のための複数のキャピラリーを担持する。分離支持媒体（ゲルバッファーなど）が入っている一体化されたリザーバーは全キャピラリーが共有する。媒体の化学的性質及びキャピラリーの特性（キャピラリーサイズ、コーティング及び長さ）は各カートリッジによって決まっている。特定の試料をベースとする分離に適合させる為に、カートリッジが容易に交換されて良い。リザーバーは空圧ポンプにつながっており、分離支持媒体としてのバッファーでキャピラリーを洗浄して満たす。本発明の他の観点において、検出部位に対する精密な配列の調整が要求される光学部（入射放射線及び/又は放射線の放射を導く光ファイバーなど）はカートリッジに内蔵されている。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物分離の為のマルチチャンネルカートリッジであって：

本体；

前記本体中に画定され、それぞれが検出帯を画定する、検体の為の複数の分離チャンネル；
分離チャンネルに共通して流体連絡(fluid communication)したリザーバーを画定する前記
本体中のチャンバー、ここで当該チャンバーは、当該カートリッジがある方向で扱われる
場合に、入っている分離支持媒体の漏れを防ぐ封入がされている；及び
1つ以上の入射放射線と放射線出力の為の検出帯に対して並べられた光学部位(optics)；
を含んで成る、マルチチャンネルカートリッジ。

10

【請求項 2】

下記の特徴：

持ち運び可能、再生使用可能、再使用可能並びに様々な分離支持媒体及び分離チャンネルの
1つを有する他のカートリッジと交換可能；

の少なくとも1つを特徴とする、請求項 1 に記載のマルチチャンネルカートリッジ。

【請求項 3】

前記リザーバーに電氣的に連結されている電極を更に含んで成る、請求項 1 に記載のマル
チチャンネルカートリッジ。

【請求項 4】

前記リザーバーから離れている分離チャンネルの各末端に電氣的に連結されている更なる電
極を更に含んで成る、請求項 3 に記載のマルチチャンネルカートリッジ。

20

【請求項 5】

前記光学部位が、本体によって末端が分離チャンネルに対して並べられている光ファイバ
ーを含んで成る、請求項 1 に記載のマルチチャンネルカートリッジ。

【請求項 6】

前記光学部位が更に、光ファイバーであって、本体によってもう一方の末端を外部放射線
源に対して連結する為の位置に置かれている光ファイバーを含んで成る、請求項 5 に記載
のマルチチャンネルカートリッジ。

【請求項 7】

前記分離チャンネルが、本体によって支えられているキャピラリーカラムを含んで成る、請
求項 1 に記載のマルチチャンネルカートリッジ。

30

【請求項 8】

前記分離支持媒体がゲルを含んで成る、請求項 1 に記載のマルチチャンネルカートリッジ。

【請求項 9】

前記ゲルがキャピラリー電気泳動に適した種類のものである、請求項 8 に記載のマルチ
チャンネルカートリッジ。

【請求項 10】

分離チャンネルを分離支持媒体で洗浄してそれで満たす為に、圧縮空気をリザーバーに導く
為のインターフェースを更に含んで成る、請求項 1 に記載のマルチチャンネルカートリジ
ジ。

40

【請求項 11】

生物分離システムであって：

台座；

台座上で支えられた生物分離の為のマルチチャンネルカートリッジ；

分離チャンネルに対して試料の位置を合わせて分離チャンネルと流体連絡する為の台座上で支
えられた位置決め手段；

分離チャンネルに沿って試料の生物分離を行う為の分離手段；及び

生物分離装置の動作を調節する為の調節手段；

を含んで成り、当該マルチチャンネルカートリッジは：

本体；

50

前記本体中に画定され、それぞれが検出帯を画定する、複数の分離チャンネル；
 分離チャンネルに共通して流体連絡したりザーバーを画定する前記本体中のチャンバー、ここで当該チャンバーは、当該カートリッジがある方向で扱われる場合に、入っている分離支持媒体が漏れるのを防ぐ為の封入がされている；及び

1つ以上の入射放射線と放射線出力の為の検出帯に対して並べられた光学部位；
 を含んで成る、
 生物分離システム。

【請求項12】

放射線を検出帯に導く放射線源；及び
 検出帯からの放射線を検出する検出器；

10

を更に含んで成る、請求項11に記載の生物分離装置。

【請求項13】

前記分離手段が、分離チャンネルにおいて試料の電気泳動による分離をする為の電気泳動手段を含んで成る、請求項11に記載の生物分離装置。

【請求項14】

前記分離チャンネルを洗浄して満たす為に、前記リザーバーに圧力を加える為の圧力手段を更に含んで成る、請求項11に記載の生物分離装置。

【請求項15】

前記分離チャンネルが、本体によって支えられているキャピラリーカラムを含んで成る、請求項11に記載の生物分離装置。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

この出願は、2001年1月26日に提出された米国仮出願特許第60/264,605号に基づく優先権を主張する。

【0002】

1. 相互参照

2002年1月28日に同時に提出された(代理人整理番号:第1031/209号)「Optical Detection IN A Multi-Channel Bio-Separation System」という名称の米国特許第_____号は、当該発明の譲受人である、Bio Cal Technology Inc.に与えられており、そしてそれは本明細書中に全体を参考文献として組み込まれている。

30

【0003】

2. 発明の分野

本発明は生物分離に関連し、そして一層詳細には光検出部(detection optics)及び試薬リザーバーを備えたマルチ分離カラムをポータブルカートリッジ並びにカートリッジを装備する生物分離システムに関連する。

【背景技術】

【0004】

3. 関連技術の説明

生物分析、例えばDNA分析などは、精度についての純粋な科学的探究から、証明された高い信頼性をもって日常的な手順へと急速に移り変わっている。医療研究者、薬理学者、及び法医学調査団らは全て彼らの仕事を遂行するのにDNA分析を用いる。しかし、DNA試料を検出及び測定する装置が複雑であり、そして試料を調製するのが困難である為、既存のDNA分析手順は往々にして時間がかかり且つ高価である。従って、装置の大きさを縮小し、部品の数を減らし、そしてコストを下げ、作業中の試料の扱いを簡単にし、そして一般に、簡素化された、低コストで、高感度の検出器を備える装置であることが望ましい。

40

【0005】

あるタイプのDNA分析装置は、電気泳動に依存することによってDNA分子を分離する。電気泳動技術を用いて、ヒトの同一性試験、発現解析、病原体検出、変異原検出及び薬理学的

50

研究などゲノタイピングの用途の為に、DNAの断片を分離することが出来る。用語、電気泳動とは、電場の影響を受けて電荷を帯びた分子が移動することを意味する。電気泳動を用いて、等しい電荷/質量の比を持つが質量が異なる分子を分離することができる。かかる分子の例はDNA断片である。

【0006】

DNA試料を分析する為に電気泳動を使用する、商業的に入手可能な様々な器械がある。かかる一つの例には、マルチレーンスラブゲル電気泳動装置があり、それは名前が示すように、DNA試料がその上に置かれるゲルのスラブを用いる。ゲルスラブ全体に電荷が加えられ、それによりDNA試料が様々な質量のDNA断片に分離される。

【0007】

他の種類の電気泳動装置は、キャピラリー電気泳動(CE)装置である。緩衝溶液を担持するフューズドシリカキャピラリーカラム中で電気泳動を適用することによって、要求される試料の大きさは有意に小さくなり、そして分離の速度及び解像度を、スラブゲル電気泳動法に比べて何倍にも向上させることができる。これらDNA断片は、CEにおいて往々にして、蛍光物質で標識された試料から分離した成分に、キャピラリーの壁を通して光を当て、そして入射光によって誘起される蛍光の放射を検出することによって検出される。放射の強度が試料の成分の濃度、量及び/又はサイズを表す。かつて、レーザー誘起蛍光(LIF)検出法がCE装置の為に開発されて来た。蛍光検出は、往々にしてゲノミクス及びプロテオミクスの分野における選り抜きの検出方法である。その理由は、他の検出方法に比べて際立ったその感度にある。

【0008】

CEに基づく装置及びCE分析プロトコルを設計することにおいて、試料検出技術に関連するいくつかの課題がある。蛍光検出の場合では、例えば、放射線源、光学的検出、感度及び検出の信頼性、光検出部(detection optics)構造のコスト及び信頼性、に対する多くの設計の検討がなされた。かつて、レーザーのような比較的高出力な光源が要求された。光がキャピラリーの壁を通過してキャピラリーの孔内で分離された試料成分に導かれた場合に、外側のキャピラリー壁/空気境界及び内側のキャピラリー壁/バッファ境界面で光が散乱(ラマン散乱)し、蛍光の放射の輝度を下げる又は悪影響を及ぼす。類似して、蛍光の放射は、壁の境界面で散乱する。かつて、一層完全に蛍光の放射を収集しシグナル強度を高め、その結果、検出感度を向上させる為の様々な方法が開発された。これらの方法は、相対的複雑性(relative complexity)を増して検出設備のコストを増やす更なる移動構成部品及び非移動構成部品を必要とする。

【0009】

従来技術の電気泳動装置の設計上の制限は、マルチキャピラリーCEに基づく装置の開発に悪影響を及ぼした。例えば、走査型レーザー誘起蛍光(LIF)検出はマルチキャピラリー電気泳動システムに適用されてきた。走査型共焦点検出は走査型光学システムに依存する。装置の簡便さ、ローバスト性及びより低いコストを考えた場合、可動部品の使用は理想的ではない。顕微鏡対物の焦点深度が浅いことも機械部品及び光学的部品の許容基準に対する厳しい要求を課す。更に、光学的走査法は一般に、より長い負荷サイクル/キャピラリーに関連する。このことにより、よりハイスループットな目的の為に器械をスケールアップしなければならない場合、システムの感度が損なわれうる。他の検出方法には、シースフロー検出もある。シースフロー検出器の主な欠点は、信頼できるシースフローを確立する為には非常に精巧なフローシステムが要求されることである。エンドユーザーの厳しい要求に見合う為、光学的構成部品及び機械的構成部品の許容基準についての極端な要求が課される。この装置の感度は非常に良いが、この方式の蛍光検出が現在のハイスループットな低コストDNA解析に適切であるということには疑う余地がある。

【0010】

マルチキャピラリーCEに基づく装置の設計における更なる課題は、キャピラリーの支持体に関連する。Burollaらの米国特許第5,198,091号には、長いキャピラリーアレイを用いる電気泳動の為、キャピラリーカートリッジの記載がある。この特許は、冷却流

10

20

30

40

50

体を循環させる為のキャピラリーの周りに画定されたくぼみの空間を含みうるが、カートリッジに一体化されたパーツとしてリザーバーを含まない。Kleinらの米国特許第5,413,686号には、複数のキャピラリーを含む自動化マルチチャンネルキャピラリー電気泳動分析器の記載がある。リザーバーは分析器中に示されているが、それらは複数のリザーバーであり且つそれらはキャピラリーと分離されていて、キャピラリーの支持体に一体化されてはいない。光検出部も装置中に示されているが、それらも集約型のキャピラリー支持体へと一体化されてはいない。Shartleらへの米国特許第5,338,427号には、キャピラリー電気泳動装置の為の1回使用型分離カートリッジの記載があり、それにおいてはキャピラリーチューブが同一平面状の配置で水平に配置されている。1回使用型の分離カートリッジは巨大な試薬リザーバーを半球型の試薬の滴に置き替える。

10

【0011】

そしてまた、ゲル-バッファ-化学反応の為の現在のシステムには、特定の用途のCE装置を使用することは可能ではない。換言すれば、現在のCE装置には、キャピラリー(様々なコーティングが施されておりそしてカラムサイズが様々な)と様々な分離用途(様々な種類、速度、解像度)の為のバッファ-試薬とをマッチングさせることが必要である。

【発明の開示】

【0012】

発明の概要

本発明は、効率的で、小型の、簡素化された、持ち運びできる(portable)、交換可能な、再使用可能な、低コストの、再生使用可能で、組み立てが簡単な生物分離の為に可動部品を使用しない、光検出部が予め位置合わせされ且つ試薬リザーバーが一体化されたマルチチャンネルカートリッジ生物分離システムを用いる、生物分離システムを提供する。前記カートリッジは、例えば、CE分離の為にマルチキャピラリーを支持する。分離支持媒体(ゲルバッファ-など)が入っている一体化リザーバーは全てのキャピラリーが共有するものである。媒体の化学的性質及びキャピラリーの特長(キャピラリーサイズ、コートティング及び長さなど)はカートリッジごとに決められている。この生物分離システムにおいては、特定の試料ベース分離に適するように様々なカートリッジが容易に交換できうる。前記リザーバーは、分離支持媒体としてバッファ-でキャピラリーを洗浄しそしてキャピラリーを満たす為にゲルリザーバーに圧力を掛ける空圧ポンプにつながっている。本発明の他の観点において、検出帯に対して精密に位置を合わせることが必要な光学部位(optics)

20

30

【0013】

本発明のある観点では、前記カートリッジがCE分離の為に複数のキャピラリーを支持する。このカートリッジには、組み立てられた本体部品、励起ファイバー、キャピラリー、電極、バッファ-/ゲルリザーバー、及び外部放射線入力の為に一体化された光学部位が含まれる。前記リザーバーには全てのキャピラリーが共有する単一電極が備えられている。

【0014】

本発明の他の観点では、光学部位がカートリッジに一体化されている。本発明の実施態様により、光学励起システムが前記カートリッジと一体化されている。この励起システムには、LEDとマイクロボールレンズをつなぐことによって励起ファイバーで励起光を検出帯に導くことが含まれる。励起ファイバーは各キャピラリーに隣接するV溝アセンブリに至る。本発明の他の実施態様により、光検出システムはシャッター機構によってカートリッジと連動する。各キャピラリーの為に光検出部位、又は検出アレイは、単一の光電子増倍管につながっている。前記検出アレイには、検出帯からの放射光をマイクロボールレンズ及び検出ファイバーを用いることによって平行にすることが含まれる。

40

【0015】

本発明の更なる観点において、本発明は、本発明のマルチチャンネル生物分離カートリッジを組み入れた生物分離装置を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【0016】

好適な実施態様の詳細な説明

本発明は、図を参照に、様々な実施態様に関して以下に記載される。本発明は本発明者の目的を達成する最良の形態の観点において記載されているとはいえ、これらの技術の観点から本発明の精神又は範囲を逸脱することなく変化版が達成されて良いことが当業者には分かるだろう。

【0017】

本発明は、分離された検体を検出する為の(レーザー又はLED源からの)入射放射線が、検出帯又は分離カラムの境界壁を通して導かれる、新規CEシステム及び新規カートリッジ形態に関する。本発明の方法を例示する目的でありそして限定する目的ではなく、本発明は、キャピラリー電気泳動及び放射線により導かれる蛍光に関する実施態様を参照にして記載されている。

10

【0018】

図1に関して、生物分離システム、更に詳細には本発明を組み込むキャピラリー電気泳動(CE)システム(200)の概略が示されている。このCEシステム(200)は一般に、分離チャンネル(36)(例えば、I.D. 25 ~ 200 μm)を特長とするキャピラリー分離カラム(22)(例えば、O.D. 200 ~ 500 μm)を含んで成る。このキャピラリーカラム(22)はフューズドシリカ、ガラス、ポリイミド、又は他のプラスチック/セラミック/ガラス性材料から作製されて良い。分離カラム(22)の内壁(即ち、分離チャンネル(36)の壁)は、試料成分の電気泳動及び/又は導電学的移動を促す為に、帯電を高めることができる物質でコーティングされていて良い。前記分離チャンネル(36)は分離支持媒体で満たされている。その媒体は、単に、ランニングバッファー又は当業界で公知のシーピングゲルマトリクスであって良い。放射線により誘起される蛍光を検出する為に、前記ゲルマトリクスにはエチジウムプロミドなどの公知の発蛍光団が含まれる。

20

【0019】

キャピラリーカラム(22)の片端は、ランニングバッファー/ゲル(34)のリザーバー(28)に浸されている。前記キャピラリーカラム(22)の另一端は、サンプルバイアル(26)につながっている。他の実施態様において示される検出形態は、CEシステム(20)に類似するシステム中で等しく実施できうるものと解される。そしてまた、分離チャンネル(36)は、出口末端(exit end)がゲルリザーバーに最も近接する、検出帯である検出窓部分(30)が有る、1本の直線状のキャピラリー又はマイクロチャンネルであって良く、それは我々の発明の好適な態様である。放射線検出器(24)は、キャピラリー壁の検出帯(30)がある透明な部分の外部に置かれる。励起ファイバー(16)は、励起源(18)(LED又はレーザー)から伸びてカラム壁の外側の検出帯(30)に向けられている。カートリッジアセンブリの一部である電極(12及び14)は、電気泳動経路(electrophoresis path)を完結する為にバッファーリザーバー(26)及びゲルリザーバー(28)につながっている。

30

【0020】

完全を期すために、図1及び図2に関連するCEシステム(200)の動作を簡潔に記載することで十分になる。実施に際して、本発明の一部ではない任意の多くの方法(試料リザーバーからの動電学的注入又はシリンジポンプを用いることでの物理的な圧力による注入など)によって、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)装置から直接、調製済みの生物試料(DNA試料など)が、検出帯から離れたキャピラリーカラムの遠端に導入される。この試料は発蛍光団に結合する。

40

【0021】

電極(12及び14)の間にDC電位(例えば1 ~ 30 kV)が適用された場合、前記試料は、適用された電位の下で分離チャンネル(36)に沿って移動して(例えば、負に帯電したDNAはゲルに組み込まれ色素マトリクス/発蛍光団と共に図1に示す陽極の方へシーピングゲルを移動する)試料成分のバンドに分かれる。分離の程度及び分離チャンネル(36)に沿って移動した距離の程度は多くの因子に依存する。その因子とは例えば、試料成分の移動可動性(migration mobility)、試料成分の質量及びサイズ又は長さ、並びに分離支持媒体である

50

。分離チャンネル(36)において試料を分離する為の駆動力は、電気泳動、圧力、又は電気浸透流(EOF)の手段でありうる。

【0022】

試料が検出帯に到達した場合、励起放射線がファイバー(16)を介して検出帯に向けられる。試料成分はそれぞれの試料成分の濃度に比例した強度(蛍光標識物質の量に比例する)で蛍光を発する。検出器(24)により、入射放射線のものとは異なる波長の放射された蛍光の輝度が検出される。検出される放射された放射線は公知の方法によって分析されて良い。自動化システムについて、コントローラ(32)によりCEシステム(200)の動作が調節される。

【0023】

複数キャピラリーのカートリッジに基づくCEシステム

マルチチャンネルキャピラリーアレイには、カートリッジ本体中のマイクロチャンネル(36)によって画定された12個の検出帯(30)が含まれる(図2も参照のこと)。支持体のカートリッジ本体は、一体化された光学素子配列V溝へとマルチチャンネルキャピラリーアレイを支持する為に、機械加工、熱形成、光エッチド又は射出形成(アクリル、PET、Ultem、Glastic、Fluorosint、又は他の光学的に透明なプラスチック)がされていて良い。本発明のカートリッジには、試料を分離及び検出する為に用いられる12チャンネルフューズドシリカキャピラリーアレイ(長さ16cm)が、使い捨てカートリッジアセンブリの一部として含まれる。カートリッジが用いられる為の設計をされているCEシステムにカートリッジが装着される場合、マイクロチャンネル(36)と一体化される励起ファイバー(即ち、マルチモードシリカ又はプラスチックファイバー、N.A.0.22)は検出帯(30)に向けられる。各チャンネルはLEDにつながっている。LEDの光はキャピラリー(36)の側に発射される。この詳細な実施態様において、シーピングゲルによりマイクロチャンネル/キャピラリーアレイ(36)が満たされる。

【0024】

図2には、本発明の実施態様に従いCEシステム(200)に取り付けられ、そうすることで、マルチチャンネル分離カラムの扱いが容易になり、そして検出帯をCE装置の光検出部に対して光学的に容易につなぐことが可能になる、マルチチャンネルカートリッジ(100)の図が示されている。図2には、12キャピラリーカートリッジが設置されたCE装置(200)(DNA分析器)の全体透視図が示されている。完全自動化されたDNA分析装置(200)は、支持ブラケット(164)上で支えられたマルチキャピラリーカートリッジ(100)に関連して2つの96ウェルのマイクロタイタープレート(70及び72)を移動させるモジュラーX-Z試料取り扱いトレイ機構(80)を支える台座(74)を有する。前記システム(200)により、マルチチャンネル分離カラムの動作が容易になり、そしてCE装置(200)の光検出部に対して前記検出帯の光学連結を簡単にすることが可能になる。

【0025】

カートリッジ(100)の更なる詳細を以下に記載する。簡潔に、カートリッジ(100)は、使い捨て及び/又は持ち運び可能、交換可能なカートリッジアセンブリ(100)の一部として、試料の分離及び検出の為に用いられる12本のチャンネルフューズドシリカキャピラリーアレイを含む。マルチチャンネルキャピラリーアレイには、カートリッジ(100)においてマイクロチャンネルにより画定される12個の検出帯が含まれる。図2に示されるマルチチャンネルカートリッジ(100)は長さ12~16cmのキャピラリー(140)を最大で12本有する。マルチチャンネルカートリッジ(100)は、上方で、全部のキャピラリー(140)が共有する流出バッファリザーバー(124)と一体化されている。流出バッファリザーバー(124)は、モジュラー空圧ポンプ(78)に対して直接連結されている。圧力ポンプ(78)により、リザーバー(124)に入っているシーピングゲルで全12キャピラリーを満たし、そして再充填プロセスの間に、キャピラリーから前のランのゲルを取り除く為に必要な空圧が提供される。ゲルの粘度によっては、ゲルが満たされたりザーバー(124)を介しキャピラリー(140)に対して最大で40PSIの圧力が適用されて良い。前記カートリッジゲルリザーバー(124)には、装置(200)の内部に設置された場合

10

20

30

40

50

に電気泳動の為に高圧電源(76)に自動的に連結される全12本のキャピラリーの為の共通の電極(陽極:示されていない)が内蔵して装備されている。カートリッジ(100)に隣接する、支持ブラケット(164)上のファン又はPeltierクーラーにより当該カートリッジの温度調節がなされる。カートリッジは(装置側からカートリッジへと導かれる温度調節がなされた)空気を循環させる為の通気孔(流入及び排出)を有するだろう。電源(66)によりCE装置(200)に対するDC電源が供給される。

【0026】

本発明の実施態様に従い、CE装置(200)の為にコントローラー(32)のブロック線図が図3に記載されている。このコントローラーはCPU(910)、PMT(178)(図13)からの検出シグナルを対応するデジタルシグナルに転換するA/Dコンバーター(912)、及びCPU(910)からの指示によってCE装置(200)の対応する部分からのシグナルを伝達及び受容するI/Oインターフェース(914)を含んで成る。温度コントローラー(916)により、マイクロチャンネル/キャピラリーアレイカートリッジ(100)の為に電気泳動チャンパーの温度を調節するファン又はPeltierクーラー(63)をコントロールする。前記I/Oインターフェース(914)は温度コントローラー(916)とつながっており、それはCE装置(200)の試料注入及び電気泳動機能の為に高圧電源(76)、励起放射線源(LEDなど)を変調する為の回路(921)、センサー、エアポンプ、エアバルブ、及びCE装置(200)のX-Zステージの為にモーターをも調節する。CPU(910)は更に、順にデータの処理をする又はCE装置(200)の為に更なる調節機能を実行する外付けのパーソナルコンピューター(918)につながって良い。前記CPU(210)及び/又はPC(918)は、自動化マルチチャンネルDNAアナライザー(200)の様々な特性と機能を調節する為に、National Instrument Corporationから入手できるLabVIEW(登録商標)ソフトウェアによって書かれたコントロール機能をプログラムされて良い。

【0027】

PC(218)を除いて、コントローラー(32)の構成部品は、CEシステム(200)に搭載され、電子基盤(64)(図2)及び冷却ファン(62)としてまとめられて良く、そしてシリアルポート(示されていない)を介して電氣的にPC(218)につながれる、あるいはそれらは、CEシステム(200)の外部の個別のコントローラーモジュールの一部分であって良い。前記CPU(210)及び/又はPC(218)は、CEシステム(200)の為に様々なコントロール機能及び特性を達成する為のプログラムがなされている。ある実施態様において、前記PC(218)は、装置(200)の為にフロントパネルコントロール(即ち、ユーザーインターフェース)を供する設定ができる。そして基盤(64)は時差/時分割(time multiple x)検出コントロールを供する設定がなされて良い。本明細書中で開示された機能及び特性を与えるプログラムコードを実行することは当業者にとっては明らかであろう。A/C電力フィルター/スイッチ(68)(図2)が装置(200)に備わっている。

【0028】

試料の注入は動電学的方法によって達成される。DNA試料の動電学的注入及び分離をする為に、ゲルで満たされたキャピラリーに対して0~20kVの電場を送る為に高圧電源(80)が用いられる。12個のLEDの広帯域の光エネルギー(FWHM=47nm)はそれぞれ、分離されたDNA断片を励起する為に、カートリッジ(100)内部のキャピラリーの検出帯のそれぞれに対して個別の光を伝達する光ファイバー(マルチモードシリカ又はマルチプラスチックの200マイクロコアファイバー、N.A.0.22)に依存する。

【0029】

実施に際して、試料取り扱いトレイ輸送機構(80)、そして96ウェルプレート(8x12)が用いられ、増幅されたDNA試料(又は検体)が各マイクロ孔チャンネル(36)に導入される。マイクロチャンネル(36)の内側は、ポリイミドを塗布されている又は分離カラムとして用いられるより小さな内径(25~100 μ m)のキャピラリーチューブ(22)である。X-Z輸送機構(80)は、試料を運ぶウェルの列をキャピラリーチップの列の下に動かし、そして当該チップがウェルに浸る。電圧を適用することによって、動電学的な注入により既知量のDNA試料が分離カラム(140)の始めに移動する。注入の後、試料トレイ(72)からのD

NA試料はトレイ(70)からのランニングバッファーに置き換えられて良い。あるいは、注入の後、輸送機構(80)は、カートリッジの下の位置に、バッファー溶液を含む12ウェルの列を動かし、DNA試料が入っている12ウェルと置き換える。キャピラリー分離チャンネル及びマイクロチャンネル(36)の全長に高電圧を適用することにより、DNA試料のDNA断片への分離が達成される。最大で1000V/cm(一般に300V/cm)の高電圧が適用され、それにより分離チャンネルの全長に沿って10分未満での迅速な分離が供される。総分離長は検出帯迄で最大で約12.5cmである。マイクロチャンネルの内部に挿入された分離キャピラリーの長さは、約6.5cmである。単一分離及び検出キャピラリーとしてゲルリザーバーの内側にあるI.D.75ミクロンの単一キャピラリーの端から端までの長さでありうる全作用長(active length)16~17cmに高電圧が適用される。電気泳動中、DNA断片がシーピングゲルを通過する速度はそれらの質量に反比例する。即ち、より軽い(又はより小さい)DNA断片がより重い(又はより大きな)ものより一層速く移動する。断片が分離カラム(22)の末端に近づき、そして検出帯(30)に入るにつれて、12個のLED(示されていない)それぞれからの励起光エネルギーが検出窓の外側からの個々の光伝達ファイバーによって分配され、試料トレイ(72)から移動するDNA断片を照らす。DNA断片がシーピングゲル、又は直鎖状ポリマー溶液(25mMのMops-トリス pH7.55など、1999年4月1日に出版された「Pace Setter」第3巻を参照のこと)を通過するにつれて、シーピングゲル内でDNAが色素(エチジウムブロミド)と相互作用することにより、移動するDNA断片を検出することが可能になる。実験により示されたことは、100ng/ml(0.02ngのHaeIIIがX174 DNA試験混合物を消化する)の検出感度が達成されたことであり、それは同じ相互作用色素を用いる通常のスラブゲル電気泳動装置よりも数倍オーダー良い感度である。12個のLEDが(サンプリング周波数10~100Hzで)時分割されている場合、12個の放射検出ファイバーと連動する12個の放射シグナルは、単一ファイバー束アセンブリを経て単一のPMTに時差的態様で到達するだろう。

10

20

30

40

50

【0030】

異なる試料とする次のランの準備の為に、リザーバーに圧力を加えることによって前のランでの古いゲルがキャピラリーから取り除かれ、新鮮なゲルでキャピラリーが再充填される。トレイ(70)及びトレイ(72)が洗浄溶液、回収廃棄物、及び試料を運ぶ。パーキングされたゲルは、トレイ(70)及び(72)のいずれか1つの廃棄物回収ウェルの列にキャピラリーのチップの先端の位置を合わせることによって1つのトレイに回収される。キャピラリーの先端は、適切なトレイウェル中の水又は洗浄溶液にキャピラリーの先端の位置を合わせて浸すことによって洗浄されて良い。キャピラリーが再充填されて次のランの準備が整った場合、キャピラリーの先端は、トレイ(70及び72)の位置が再度合わされることによって試料中に浸される。上記に説明したプロセスの順番はコントローラ(32)の自動化機能の一つとしてプログラムされていて良い。

【0031】

キャピラリーの出口でゲルリザーバーに流れる試料検体はリザーバーの容積に比べて少ない量及び少ない体積濃度であり、過去のランの検体が極僅かな量でのみゲルリザーバー内にあるので、そのゲルリザーバー内で検体が混合されることが予測され、そして次のランの為にキャピラリーを再充填するゲル中に最終的に分配されることが知られている。この極微量の検体によるノイズは、データ解析において、検出されたシグナルから容易に省くことが出来る比較的低いバックグラウンドノイズであろう。

【0032】

図4~9にはカートリッジの構成部品を組み立てる段階が示されている。ここでそれらは説明の目的で記載されており、そして限定する意味では記載されていない。図4には、カートリッジ(100)の下部体(110)が示されている。下部体(110)の上部末端には励起ファイバー(116)の部分が通され設置される穴(126)があり;励起ファイバー(116)は、これらの穴を通り設置された後に、所定の位置で固定される(これらの構成部品を固定化する他の手段も用いられて良い)。下部体(110)の下方の末端には電極(114)があり、それらも固定(又は110の部分として挿入成形)さ

れている。キャピラリー(140)(図7)は穴(139)に挿入されてこれらの電極(114)へ導かれる。12キャピラリーカートリッジについて、2倍多い励起ファイバー(即ち、2重波長検出型へアップグレードする場合の、24本の励起ファイバー)がある。これらの励起ファイバー(116)は12本のキャピラリー(140)を中心として交互に配置される。このことは、キャピラリー(140)の為にファイバーの穴(126a及び126b)が励起ファイバー(116a及び116b)のそれぞれ(図4)の為に使用されて良い為、一層明確に分かる。

【0033】

図5には、図4の下部体(110)へカートリッジ中部体(120)加えることが示されている。このカートリッジ中部体(120)は、部品(132)が励起ファイバー(116)又はキャピラリー(140)の通り道を遮断しないように設計されている。部品(132)は、励起ファイバー(116)を取り囲まないジグザグの形(zigzag design)であり、そしてそれはカートリッジが動作されている間は一般に水平である。部品(132)も、更なる図で示されるように、キャピラリー(140)が通され設置される穴(138)を有する。リザーバー部分を形成するだろう中部体(120)の上末端(131)も、キャピラリー(140)が通り設置されるだろう穴(139)を有する。

10

【0034】

図6に示されるように、カートリッジの中部体(120)が下部体(110)にマウントされた後、ポリイミドが塗布されたキャピラリー(140)は、キャピラリーホール(139及び138)を通りそれらが下部体(110)の下の端に至り設置される(図7を参照のこと)。キャピラリー(140)は、検出窓を供する為にポリイミドコーティングが取り除かれた、予め焼かれた(pre-burned)窓を持つ。キャピラリー(140)をカートリッジの中部体(120)に固定化する為に留め金(136)が用いられて良い。中部体(120)の上部末端(131)はリザーバーへと伸びるキャピラリーの為に共通する電極(陽極)(134)である。

20

【0035】

図8には、中部体(110)及び下部体(120)がそれぞれ組み合わさったカートリッジが示されている。キャピラリーは、(リザーバーの為に穴(131)でキャピラリー先端(141)が突き出した状態で)中部体(120)の上部末端から電極(陰極)を伴う下部体(110)の底部に伸びる。キャピラリーの検出帯(155)も示されている。励起ファイバー(116)はファイバー穴(126)(図4も参照のこと)を通過して、励起ファイバーからの光がキャピラリーに向けられるV字ブロックアセンブリ(150)に至ることが示されている。

30

【0036】

図9には、カートリッジの背面図が示されている。カートリッジは全キャピラリーが共有する上部/出口バッファリザーバー(130)が一体化されている。このゲルリザーバー(130)は、シーリングとしてのOリングにより中部体(120)に取り付けられている。ゲルリザーバー(130)は約18ccの容量があり、そしてゲルの高さを確認する為の透明、又は澄んだ窓を各側面に有する。ゲルリザーバー(130)はモジュラー空圧ポンプ(78)につながっている(図2も参照のこと)。圧力ポンプ(78)により12本のキャピラリーをシーピングゲルで満たす為の空気圧が提供される。ゲルの粘度によって、最大で40PSIの圧力がゲルで満たされたリザーバーを通してキャピラリーに適用される。カートリッジ(100)は中部体(120)の上部の穴に単一電極(陽極)を有し、そしてカートリッジアセンブリの一部として下部体に複数の電極(陰極)(114)を持つ。カートリッジのゲルリザーバー(140)は全12本のキャピラリーに共通する内蔵電極(陽極)(134)を備えている。その内蔵電極は、装置(200)(DNA分析器)の内部に備わった、電気泳動の為にシェルフポゴピン(shelf pogo-pin)により高圧電源(76)に自動的につながられる。商業的に入手可能な高圧電源(即ち、Emco)は、動電学的注入をする為及びDNA断片を分離する為に、ゲルが満たされたキャピラリー(140)に対して0~20kVの電場を与える為に用いられる。

40

50

【0037】

ゲルが入っているリザーバー(130)は、ゲルの漏れが無い状態でカートリッジが扱われる事が可能になるように、例えば、ハーメチックシール(hermetically sealed)するなど、封入される(キャピラリー孔内での表面張力及び高い粘度が理由で、キャピラリー先端での極僅かな漏れ又は露出はある)。カートリッジ(100)は、ポンプ(78)からカートリッジ中へと空気圧を供給する、装置に設置された針(又は鋭い物体)が貫通するゴムセプタム(示されていない)を有する。これにより各分離ランの後に空圧によりキャピラリーをゲル/ブッファ溶液を満たし、そしてプロセス中に以前のランの古いゲルを取り除くことが可能になる。この方法によりカートリッジのリザーバー内部にゲルを適切に封じ込めることが確実となり;それにより、ゲルリザーバーへのアクセス、並びにCE分離を行う 10
 為に高電圧を適用する前、キャピラリーをゲルで満たす為に十分な空気圧を供給する単純且つ信頼性ある手段も供される。

【0038】

カートリッジ(100)は検出プローブ(170)がはめ込まれる光検出ポート(161)も持つ。これらそれぞれの光検出部ポート(161)により、放射収集部の為のマイクロレンズ(166)が設置され、そしてエラストマーレンズリテーナー(168)が設置される。カートリッジはシャッターカバー、又はマルチチャネルアパチャーストリップ(142)を光検出部ポート(161)に有する。アパチャーストリップ(142)は、約0.5mm厚の薄いポリエステル物質であって良く、それにより全ての塵粒又は異物の光収集領域内部への侵入が防がれる。光収集部位を含む検出アレイ(170)がカートリッジに入る場合アパチャー 20
 (142)が開くだろう。検出アレイ(170)がカートリッジアセンブリから外される場合アパチャー(142)は閉じるだろう。シャッターは、それが装置の光検出部位と連動させられている場合に開く機械的カバー又は窓であっても良い。

【0039】

フロントカバー(146)とリアカバー(148)を伴うカートリッジを組み立てる最後の段階が図10に示されている。リアカバー(148)には各光検出部ポート(161)の為の穴(162)がある。キャピラリーを冷やす為にそれを通してカートリッジ内部に冷たい空気流が入る空気穴(165)も穴(162)の上にある。

【0040】

図11及び図12には、放射収集ファイバーアレイ(170)がより明確に分かるカートリッジ(100)の背面図(124)が示されている。図12には下部体(110)は前後、左右対称であることが示されている(即ち、向かい合わせの(mirrored)LED(184a及び184b)を参照のこと)。図13には、ファイバーコネクタ(174)及び放射フィルター(176)を通して単一の光電子増倍管(PMT)(178)につながる、放射収集検出部アレイ(170)からの検出プローブ(171)を伴うカートリッジ(100)の部分透視図が示されている。 30

【0041】

図14には励起光学システム及び放射光学システムに沿ったカートリッジ(100)の部分図が示されている。前記カートリッジ(100)はサポートフレーム(164)によって支えられている。このカートリッジはこのサポートフレーム(164)を通じて装置内部に設置 40
 される場合、LEDモジュール/バレルアセンブリとの機械的な位置合わせをされる。カートリッジの下部体(110)の構造は、光学部アライメント手段又はレンズバレルアセンブリ(188)のカートリッジ内部の励起ファイバーへの連結を担う。励起システムには、マイクロボールレンズ(182)とそれぞれのLED(184)をつなぐことが含まれる。LED(184)からの励起光は励起ファイバー(116)を通してキャピラリー(155)の検出帯に向けられる。放射システムには、カートリッジ(100)の背面に連結されている放射収集ファイバーアレイ(170)が含まれる。

【0042】

カートリッジは、マイクロ光学検出モジュールを容易に装置(200)内部で整列させるアライメント機能を有する。光学検出アレイ(170)及びLEDアレイ(184)は全てばね仕掛 50

けにされており、そうすることで、レンズバレルアセンブリ(188)(即ち、LED又はファイバーフェルル)ごとに、カートリッジに対して信頼性があり且つ反復可能な配置にする為の追従力が独立的に供される。カートリッジは全て、以下に詳細が示されるように、装置からのスプリング及びばね仕掛けアレイをに対応する適切な円錐型特性(即ち、コンカルレンズシーティング(186))を有する。

【0043】

励起システム

図15には、励起システムを示す図14の部分Aをより近くで見たものを示す。これも図13のカートリッジ部分Aの斜視断面図である。励起システムは、(図11に示されるように)使用中カートリッジにはめ込まれている(図10)励起サポートフレーム(164)によって支えられている。励起ファイバー(116)は光を受けて光をその経路に沿ってキャピラリー検出帯(155)に導かなければならないので、この励起システムは、LED(184)からの必要な光をボールレンズ(182)を通して励起ファイバー(116)に入れることを可能にする設定がされなければならない。励起システムには、ボールレンズ(182)、LED(184)、及びエラストマースプリング(190)(それらは全てレンズバレル(188)内に配置されている)、コイルスプリング(192)、励起サポートフレーム(164)、リテーナー(194)、LEDリード線(196)が含まれる。レンズバレル(188)の中で、エラストマースプリングがLED(184)をボールレンズ(182)に対して傾かせる。励起サポートフレーム(164)上に位置するコイルスプリング(192)によりレンズバレル(188)において軸及び角度コンプライアンスが供され、従って、ボールレンズ(182)を正確にコンカルレンズシート(186)の真中に合わせる事が可能になる。これらのバイアシングフォース(biasing force)はどちらも、LED(184)からボールレンズ(182)を通じて励起ファイバー(116)へ移動する励起光の為のより近い接触経路を提供する。

【0044】

(各キャピラリーについて)2つの波長の為の2本の励起ファイバー(116)はカートリッジ(100)の内部で統合され、キャピラリー検出帯(155)の近くで配列が固定される。カートリッジがCE装置(200)(即ち、DNA分析器)内部に設置された場合、これら2本の励起ファイバー(116)は2つのLED(184)(例えば、2つの異なる色:526nmと473nm)へつながれる。2つの色は2色放射フィルターによって検出モジュール(PMTモジュール(178))で分離及び検出されうる。カートリッジ(100)は、DNA断片を分析する用途の為に単一色検出能力を有して良く、そして他の用途の為に2色検出能力を持つようにアップグレードされても良い。本発明の譲受人であるBioCal Technologyに対して同一に与えられ、本明細書中に参考文献として組み込まれた、2001年10月19日に提出された(代理人整理番号:第1031/207号)、「A portable Multi-Color Multiplexed Analysis Electrophoretic Device」という名称の米国特許仮出願第_____号に言及される。

【0045】

検出システム

本発明の譲受人であるBioCal Technologyに対して同一に与えられ、本明細書中に参考文献として組み込まれた、2002年1月28日に提出された(代理人整理番号:第1031/207号)、A portable Multi-Color Multiplexed Analysis Electrophoretic Deviceという名称の米国特許仮出願第_____号は、更に詳細には、カートリッジ(100)が用いられる設計がされたCEシステム(200)に適用できる時差/時分割検出機構に関する。

【0046】

図16では、検出、又は放射のシステムを示す図14の部分Bをより近くで見たものを示す。光源(LED(184)など)からの励起光は励起ファイバー(116)を通りキャピラリー(140)の検出帯(155)に至る。ファイバーフェルル(210)が、V溝ブロック(150)内に差し込まれている励起ファイバー(116)の補強及び保護をする。2本の励起ファイバー(116)は、1つのV溝ブロック(150)へと導かれるこ

とがあり、両者はV溝ブロック(150)の下部の傾斜した2つの穴から光を導いて良い。各励起ファイバーとキャピラリーとの位置合わせをする為の好適な実施態様は、励起ファイバーとキャピラリーを双方互いに正しい位置でそろえる(nest)、単一ブロックを盛り込んだ機械化V溝である。このブロックは、鋳造部品の為の道具を用いることによって又は射出形成によって作製されて良い。また、V溝よりも正確にキャピラリー及びファイバーが機械化穴に詰め詰め込まれるだろう、十字の穴が空いた(cross drilled)ねじ切り盤部品が用いられても良い。

【0047】

励起光が検出帯(155)に向けられる場合(図17を参照のこと)、励起平面に対して90度の角度で、検出システムが放射光、又は放射シグナルを検出する。放射ファイバー(180)は液体又はゲルの外部にあるので、放射ビームを平行化する平行光部(collimation optics)が必要である。励起ファイバー(116)の開口数により、検出帯に近いゲルの内部で放たれる出力密度が決まる。励起光源としては、比較的安価であるLED(184)又はレーザー(固体状態レーザー、ガスレーザー、色素レーザーなど)であって良い。分離された成分又は検体からの検出帯での蛍光の放射はマイクロレンズ(166及び167)を介して収集され、そして放射収集ファイバー(180)を通過して検出器へ向けられる。これら2つのボールレンズ(166及び167)の間はスペーサー(206)である。キャピラリー(140)は、放射をマイクロレンズ(166及び167)に向ける為に、透明な壁又は透明な窓を備える不透明な壁を有して良い。レンズ(166)は放射を収集する為に用いられ、そして好ましくは高収集角度特性(high collection angle property)を有する(例えば、Swiss Jewel Company製の#B2.00モデルのサファイアマイクロレンズは開口数(N.A.)が高いことで焦点距離が短く $n = 1.76$ の屈折率を有する)。レンズ(167)は、サファイアレンズによって生産された平行化放射光を放射ファイバー(180)につなぐ為のもの(例えば、Swiss Jewel Co.から入手できるBK-7マイクロレンズ)である。次いで、励起光よりも高い波長(例えば、570~630nm)の蛍光光は、大核光ファイバー(180)(O.D.370 μm 、N.A.0.22のファイバー、のみならずO.D.100~1000 μm 、N.A.0.12~0.5でも良い)によって(例えば570~630nmを用いる)色分離長路放射フィルターを通して検出器(例えば、R5984 Hamamatsu光電子増倍管(PMT))に導かれる。放射シグナルは、励起ファイバー(180)によって検出モジュール(PMT検出器(178))へと中継される。検出モジュールでは、放射シグナルが単一又は複数の放射フィルター(176)によつてろ過され、時分割(時差的)機構で読み込まれる(検出される)。検出ファイバー(180)は、図13に記載及び示されるように、光検出システムとの関連において一層明瞭に理解することができる。

【0048】

検出帯は、物質の性質、入射放射線、及び蛍光の放射によっては、境界の画定が十分になされた完全に限定された領域である必要がないことが更に分かっている。一般に、励起ファイバーからの光が当てられる領域は蛍光の放射を生じ、そして光検出部は、かかる蛍光の放射を捕らえる狙いがある。励起ファイバーからの光は検出体の外部で蛍光の放射を生じ、そしてこの部分内からの放射の一部は光検出部位によって検出されなくても良い。励起ファイバーが検出帯により近くなる又は励起光の出力密度がより高くなると、より強い放射シグナルが収集される。

【0049】

本発明のマルチキャピラリーCE装置では、蛍光励起光源は超高輝度青LED又は超高輝度緑LEDであって良い。光源としてのLEDの魅力的な特性は、それらが低コストであり、大きさが小さく、寿命が長く、ノイズが低く輝度が安定しており、そして直接電気変調(direct electronic modulation)が可能なことである。本発明において熟慮されるLED(Aglientから入手するHLMP-CB15及びHLMP-CM15)はInGaN材料技術に基づいており、平均光出力は2.5~3mWである。InGaN LEDのスペクトル特性がそのピーク波長及び半値幅(nm)で示すことは、これらのLEDは、440~570nmの範囲に励起スペクトル色素伴う蛍光(例えば、フルオレシン、ローダミン、エチヂウムブロミド、チアゾールオレンジ)

を励起する為に用いられて良く、そして1 Hzから100 MHzの範囲の周波数で用いられて良いと言うことである。これらのLEDの応答時間は非常に長い(数百ナノ秒)ので、それらを(パルスモードでは最大で100 mAの)より大きな順電流(forward current)でパルス化させ、高い放射ピークを得ることができうる。LEDのパルス化動作は、一般に、トランジスター駆動回路によって達成できる。有意により高いピークのLED光出力が、DC動作よりも低い負荷サイクル(即ち、5%、10%、25%又は50%)で、大駆動電流(large drive current)により実現されて良い。

【0050】

異なる色のLED(即ち、青又は緑のLED)が様々な発蛍光団(様々な用途の)を励起する為の励起源として使用できうる。好適な実施態様では500~600 nmの波長において、詳細には524 nmでLEDを用いる。1本又は2本のファイバーを用いてマイクロチャンネルに2つの波長をもたらす2重波長検出装置の為に現行の設計に対して、第2のLEDモジュール、又は第2のカラーLEDが加えられて良い。現行の検出/分離プラットフォームは、第2PMTと励起部及び収集部を持つ2重LEDモジュールで拡張でき、マルチ波長蛍光検出DNA断片検出器が提供されて良い。

10

【0051】

励起光源はLEDからレーザーダイオード(半導体固体状態レーザー)へ変える事もできる。もう一つには、それらはパルスレーザー(固体状態レーザー、ガスレーザー、色素レーザー、ファイバーレーザーなど)であっても良い。LED(即ち、緑、524 nm)を用いる主な理由は、それらの低コスト性、超高輝度及び大きさが小さいこと(small package)にある。分離する検体へ励起光を分配する為に、キャピラリーに対してファイバーを連結する機構又は直接端と端を連結する機構のどちらかを用いることで、表面実装型(SMT)のLEDも使用できうる。この装置の為に代わりの光源は、400~800 nmの範囲のレーザーダイオードであろう。

20

【0052】

本発明の本質を含む装置はDNA分子以外の生体分子を分析する為にも用いられて良いことは当業者によって明らかであるだろう。例えば、本システムは、分離ゲル又はバッファを換えることによって、タンパク質、炭水化物、及び脂質など生体分子を分析する為にも改変できうる。様々なバッファ/ゲルの化学的性質、キャピラリーなどを有する本発明の多くのマルチチャンネルカートリッジを用いること、及び特定のバッファ/ゲルの化学的性質とキャピラリー(特定の内部壁コーティング及び絡むサイズを持つ)を適合させることで、特定の試料をベースとする分離用途及びラン条件を適合させる為に容易に交換され、様々な分離、タイプ、速度、解像度などが達成されて良い。同カートリッジは取って置かれ、そして今後の分離ランの為に再使用されて良い。従来技術のCEシステムに比べて、様々な試験をする為に本発明のカートリッジ(100)を用いことによりCEシステム(200)を準備し立ち上げる時間を有意に減らすことができうる。何故なら、分離カラム、分離媒体、及び少なくともキャピラリーに対して精密に配置の調整をする必要がある光検出部が全てカートリッジの中に内蔵されているからである。カートリッジが再使用できることによりCEシステムの為に材料費が有意に削減される。そしてまた、色素が挿入されているゲルマトリクスはカートリッジ内部でハメチックシールされているので、それにより環境的に安全な/「緑の」製品の為に良い溶液が供される。発蛍光団及び/又はゲルマトリクスは、発ガン性物質及び環境と健康に害のある他の物質を含みうる。カートリッジの内部にゲルを詰めることによって有意に取り扱いが簡単になり且つ安全性が向上する。カートリッジは環境上安全な態様に従って、回収及び廃棄されるか、又はカートリッジは、環境に対して害を与える事を避ける為に、熟練工によって使用済み部品を交換もしくは修復することで、再生使用可能であって良い。

30

40

【0053】

この自動化され、そして統合された光学部を伴うモジュラー及び自己配置(移動マイクロ光学部品がない)マルチチャンネル法により、装置の動作が単純になり、ハイスループットが供されるが一層信頼性は高まる。分離チャンネルに対して光学部が内蔵され予め並べられた

50

カートリッジ(100)は、容易にCEシステム(200)へとはめ込むことができる。更に、このマルチチャンネル検出機構は検出感を損なうことなく、検出チャンネルを12超もしくは偶数(96チャンネルなど)に拡張もしくはスケールアップできる。この単一時時分割型の検出方法の他の利点とは、任意の他のハイスループットLIF検出機構と比べてチャンネル間でのクロストークが殆ど無いことである。

【0054】

上記の実施態様において、複数の放射線源は同じ波長であるが、複数の放射線源を様々な波長に設定すること、特異的な試料、試料に基づく検出手段及びゲルの化学的性質を、異なるキャピラリーにおいて補足することは本発明の精神及び範囲内である。

【0055】

検出の為の入射放射線は検出帯に当てられて良く、そして/又は当該検出帯からの放射線放射は分離媒体に沿って軸方向に出力されて良い。風にさらされた検出帯が適用されて良い。本明細書中に参考文献として組み込まれた、2002年6月22日に全て提出された、Optical Detection in Bio-Separation Device Using Axial Radiation Inputという名称の米国特許第09/887,871号; Optical Detection in Bio-Separation Device Using Axial Radiation Outputという名称の米国特許第09/887,953号;及び Optical Detection in Bio-Separation Device Using a Winded Detection Zoneという名称の米国特許第09/887,872号に言及される。

【0056】

本発明の低コスト装置は使い捨て/再生使用可能(大部分のカートリッジ本体のパーツは修正され、そして梱包又は再利用されうるのが理由である。キャピラリー及びゲルのみが交換されるだろう)マルチチャンネルカートリッジデザイン、蛍光検出システム、及び内蔵式試料取り扱いトレイ(96ウェルプレート)機構を有する。試料の分析がたった4~10分/12チャンネル(12個の試験試料について12の並列する結果)で完了することが実験により証明された。DNA分析システムは、注入~検出~断片データ収集までの完全なDNA断片分析を処理するオールインワンハイスループットワークステーションである。本発明の記載された検出モードを用いる単一キャピラリーの検出感度は、(HaeIII消化 X174バクテリオファージDNA試験混合物を用いて)分離時間10分未満で0.02ngのDNA断片のオーダーである。このような並行して12本のマイクロチャンネル/キャピラリーを動かす方法により、全12個の電気泳動された試料に関する結果が10分以内に出る。このような分離スピード及び検出感度は、一般のスラブゲル電気泳動法よりも数倍のオーダーで良い。

【0057】

本発明は好適な実施態様を参考にして詳細に示されているが、方法と詳細の変更は本発明の精神、範囲並びに教示を逸脱しないことは当業者によって理解されるだろう。励起放射線源は、例えば、LED、レーザーダイオード(半導体固体状態レーザー)、パルスレーザー(固体状態レーザー、ガスレーザー、色素レーザー、ファイバーレーザーなど)、又は他の放射線源であって良い。LED(緑、524nm)は低コスト、超高輝度、及び大きさが小さい(small package)ことを伴う。本発明の為の比較的安価な別の光源は、可視の、UV及び/又は赤外領域のレーザーダイオードであって良い。例えば、400~900nmの領域、そして更に詳細には400~600nmの領域のレーザーダイオードなどが用いられて良い。

【0058】

本発明の本質を含む装置もDNA分子以外の生体分子を分析する為に用いられて良いことは当業者によってあきらかであるだろう。例えば、本システムは、分離ゲル又はバッファを換えることによって、タンパク質、炭水化物、及び脂質など生体分子を分析する為にも改変できる。

【0059】

本発明の検出機構はキャピラリー電気泳動及び放射線が誘導した蛍光の検出と関連して、例としてそして限定を意図したものではなく記載されている。本発明は、電気泳動以外の生物分離現象に基づき分離される検体の検出、及び蛍光の放射以外、例えば、リン光、発

10

20

30

40

50

光及び化学発光など、他の種類の放射線放射による放射線の放射の検出、並びに吸光度に基づく検出にも使用できることが理解される。

【0060】

更に、実施態様において記載された分離チャンネルは円筒カラム又はチューブによって画定されているが、本発明の概念は、オープンチャンネルによって画定される分離チャンネル、例えば、基盤(ミクロ流体型装置又はバイオチップ)中でエッチングすることによって画定されるミクロチャンネルにも、等しく適用できるものと解される。

【0061】

輸送機構は、水平面でトレイを移動するように設定されて良く、そして、トレイに対してカートリッジを垂直に近づける為の更なる輸送機構が供されて良い。

10

【0062】

従って、開示された発明は単なる例示であると考えられ、添付のクレームに特定するだけの範囲で制限されると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0063】

本発明の性質及び利点の理解、並びに好適な利用の形態を十分にする為に、付随する図面に読まれる伴い次の詳細な説明が参照されるべきである。以下の図面において、参照番号は、図面全体の同じ又は類似する部分を示す。

【図1】本発明を組み込むキャピラリー電気泳動システムの概略図である。

【図2】本発明の実施態様に従う、キャピラリー電気泳動システム/装置の概略図である

20

【図3】コントロールシステムの線図である。

【図4】励起ファイバーを伴うカートリッジ下部の透視図である。

【図5】連結される前のカートリッジ中部と励起ファイバーを伴うカートリッジ下部の透視図である。

【図6】連結された後のカートリッジ中部と励起ファイバーを伴うカートリッジ下部の透視図である。

【図7】図6のカートリッジ中部とカートリッジ下部がキャピラリーと組み合わせられる前の透視前面図である。

【図8】カートリッジ中部及び励起ファイバーを伴う下部とキャピラリーとが合わされた後の透視前面図である。

30

【図9】ゲルリザーバーを伴うカートリッジ中部及び下部の透視背面図である。

【図10】ゲルリザーバーを伴うカートリッジ中部及び下部並びにフロント及びリアカバーの透視前面図である。

【図11】光検出部が挿入されたカートリッジの透視前面図である。

【図12】励起及び放射光学システムを伴う図11のカートリッジの部分透視前面図である。

【図13】カートリッジと検出システムの配線図の部分透視図である。

【図14】励起及び放射光学システムを伴うカートリッジの部分透視前面図である。

【図15】図14の部分Aの拡大図及び図13に示されるカートリッジ部分Aの部分透視図である。

40

【図16】図13に示されるカートリッジ部分Bの部分透視図である。

【図17】レンズ、ブルーブ、キャピラリー、及び励起ファイバーを伴う検出帯の部分透視図である。

【 図 3 】

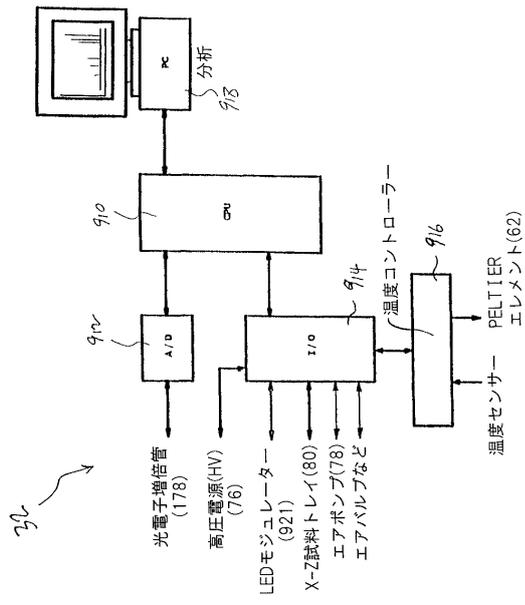


FIG. 3

【国際公開パンフレット】

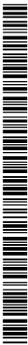
(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059589 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 27/00 (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/02515
- (22) International Filing Date: 28 January 2002 (28.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/264,605 26 January 2001 (26.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOCAL TECHNOLOGY, INC. [US/US]; 1920 East Kanella Avenue, Suite O, Orange, CA 92667 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): AMIRKHANIAN, Yaron [US/US]; 3851 19 Camino Street, La Crescenta, CA 91214 (US); LIU, Ming-Sun [CA/US]; 2588 Chelsea Court, Brea, CA 92821 (US); MOONEY, Paul [US/US]; 20812 Raintree Lane, Rancho Santa Margarita, CA 92679 (US).
- (74) Agent: LIU, Wen; Liu & Liu LLP, Suite 1100, 811 West 7th Street, Los Angeles, CA 90017 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/059589 A2

(54) Title: MULTI-CHANNEL BIO-SEPARATION CARTRIDGE

(57) Abstract: A bio-separation system using an efficient, compact, portable, interchangeable, reusable, recyclable, multi-channel cartridge, has integrated pre-aligned optics and an integrated reagent reservoir. The cartridge supports, for example, multiple capillaries for CIE separation. An integrated reservoir containing a separation support medium (e.g., a gel buffer) is common to all capillaries. The chemistry of the medium and the characteristics of the capillaries (e.g., capillary size, coating and length) are defined for each cartridge. Different cartridges can be easily interchanged in the bio-separation system to suit the particular sample based separation. The reservoir is coupled to an air pressure pump that pressurizes the gel reservoir to purge and fill the capillaries with buffer as the separation support medium. In another aspect of the present invention, optics requiring fine alignment with respect to the detection zones (such as fiber optics for directing incident radiation and/or radiation emissions) are integrated into the cartridge.

WO 02/059589

PCT/US02/02515

MULTI-CHANNEL BIO-SEPARATION CARTRIDGE**BACKGROUND OF THE INVENTION**

5

This application claims the priority of U.S. Provisional Patent Application No. 60/264,605, filed on January 26, 2001.

1. Cross-Reference

10 Reference is made to U.S. Patent Application No. _____ entitled "Optical Detection In A Multi-Channel Bio-Separation System", concurrently filed on January 28, 2002 (Attorney Docket No.: 1031/209), which is commonly assigned to BioCal Technology, Inc., the assignee of the present invention, and which is fully incorporated by reference herein.

15

2. Field of the Invention

The present invention relates to bio-separation, and more particularly a portable cartridge for supporting multi-separation columns with integrated detection optics and reagent reservoir and a bio-separation system incorporating the cartridge.

20

3. Description of Related Art

Bioanalysis, such as DNA analysis, is rapidly making the transition from a purely scientific quest for accuracy to a routine procedure with increased, proven dependability. Medical researchers, pharmacologists, and forensic investigators all use DNA analysis in
25 the pursuit of their tasks. Yet due to the complexity of the equipment that detects and measures DNA samples and the difficulty in preparing the samples, the existing DNA analysis procedures are often time-consuming and expensive. It is therefore desirable to reduce the size, number of parts, and cost of equipment, to ease sample handling during the process, and in general, to have a simplified, low cost, high sensitivity detector.

WO 02/059589

PCT/US02/02515

One type of DNA analysis instrument separates DNA molecules by relying on electrophoresis. Electrophoresis techniques could be used to separate fragments of DNA for genotyping applications, including human identity testing, expression analysis, pathogen detection, mutation detection, and pharmacogenetics studies. The term
5 electrophoresis refers to the movement of a charged molecule under the influence of an electric field. Electrophoresis can be used to separate molecules that have equivalent charge-to-mass ratios but different masses. DNA fragments are one example of such molecules.

There are a variety of commercially available instruments applying
10 electrophoresis to analyze DNA samples. One such type is a multi-lane slab gel electrophoresis instrument, which as the name suggests, uses a slab of gel on which DNA samples are placed. Electric charges are applied across the gel slab, which cause the DNA sample to be separated into DNA fragments of different masses.

Another type of electrophoresis instrument is the capillary electrophoresis (CE)
15 instrument. By applying electrophoresis in a fused silica capillary column carrying a buffer solution, the sample size requirement is significantly smaller and the speed of separation and resolution can be increased multiple times compared to the slab gel-electrophoresis method. These DNA fragments in CE are often detected by directing
20 light through the capillary wall, at the components separating from the sample that has been tagged with a fluorescence material, and detecting the fluorescence emissions induced by the incident light. The intensities of the emission are representative of the concentration, amount and/or size of the components of the sample. In the past, Laser-induced fluorescence (LIF) detection methods had been developed for CE instruments.
25 Fluorescence detection is often the detection method of choice in the fields of genomics and proteomics because of its outstanding sensitivity compared to other detection methods.

Some of the challenges in designing CE-based instruments and CE analysis
30 protocols relates to sample detection techniques. In the case of fluorescence detection, considerable design considerations had been given to, for example, radiation source, optical detection, sensitivity and reliability of the detection, cost and reliability of the

WO 02/059589

PCT/US02/02515

structure of the detection optics. In the past, a relatively high power light source is required, such as a Laser. When light is directed through the capillary wall at the separated sample components in the capillary bore, light scatters at the outside capillary wall/air interface and the inside capillary wall/buffer interface (Raman scattering), which obscures or corrupts the fluorescence emission intensity. Similarly, fluorescence emissions scatter at the wall interfaces. In the past, various techniques were developed for more completely collecting the fluorescence emissions to improve signal intensity and hence detection sensitivity. These techniques involve additional moving and non-moving components that add to the relative complexity and cost of the detection setup.

The design limitations of prior art electrophoresis instruments are exacerbated in the development of multi-capillary CE-based instruments. For example, confocal scanning laser induced fluorescence (LIF) detection has been adopted in multi-capillary electrophoresis systems. The scanning confocal detection relies on a scanning optical system. The use of moving parts is not ideal when taking simplicity, robustness, and lower cost of the instrument into consideration. Also, the shallow focal depth of the microscope objective for the confocal detector puts severe demands on the mechanical and optical component tolerances. Further, the optical scanning method generally involves a longer duty cycle per capillary. Thus, should the instrument be scaled up in order to generate higher throughput, the sensitivity of the system may be compromised. Also, another detection method is Sheath Flow detection. The main drawback of the sheath flow detector is the highly sophisticated flow system needed to ensure a reliable sheath flow with minimum optical cross talk between the channels. Extreme demands are put on the optical and mechanical component tolerances in order to meet the robustness demands of end-users. The sensitivity of the device is very good, but it is not obvious that this principle of fluorescence detection is suited for a high-throughput, yet low cost, DNA analysis.

Additional challenges in designing multi-capillary CE-based instruments related to the support of the capillaries. U.S. Patent No. 5,198,091 to Burolla et al. describes a capillary cartridge for electrophoresis that employs a long length of capillary arrays. This patent may include a hollow space defined about the capillary for circulating coolant fluid

WO 02/059589

PCT/US02/02515

but it does not include a reservoir as an integrated part of the cartridge. U.S. Patent No. 5,413,686 to Klein et al. describes an automated multi-channel capillary electrophoresis analyzer including a plurality of capillaries. Reservoirs are shown in the analyzing apparatus, but they are multiple reservoirs and they are separated from the capillaries, not
5 integrated into a capillary support. Detection optics are also shown in the apparatus, but they are not integrated into a compact capillary support. U.S. Patent No. 5,338,427 to Shartle et al. describes a single use separation cartridge for a capillary electrophoresis instrument, in which capillary tubes are horizontally disposed in a coplanar array. The single use separation cartridge replaces large reagent reservoirs with hemispherical drops
10 of reagent.

Also, current systems for gel buffer chemistry do not allow use of the CE instrument that is specific with applications. In other words, current CE instruments require matching the capillary (with different coatings and column sizes) with the buffer reagent for different separation applications (different types, speeds, resolutions).

15

WO 02/059589

PCT/US02/02515

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a bio-separation system that uses an efficient, compact, simplified, portable, interchangeable, reusable, low cost, recyclable, easy to assemble multi-channel cartridge with no moving parts for bio-separation, which has integrated pre-aligned optics and an integrated reagent reservoir. The cartridge supports, for example, multiple capillaries for CE separation. The integrated reservoir containing a separation support medium (e.g., a gel buffer) is common to all capillaries. The chemistry of the medium and the characteristics of the capillaries (e.g., capillary size, coating and length) are defined for each cartridge. Different cartridges can be easily interchanged in the bio-separation system to suit the particular sample based separation. The reservoir is coupled to an air pressure pump that pressurizes the gel reservoir to purge and fill the capillaries with buffer as the separation support medium. In another aspect of the present invention, optics requiring fine alignment with respect to the detection zones (such as fiber optics for directing incident radiation or radiation emissions) are integrated into the cartridge.

In one aspect of the present invention, the cartridge supports multiple capillaries for CE separation. The cartridge includes assembled body parts, excitation fibers, capillaries, electrodes, a buffer/gel reservoir, and integrated optics for external radiation input. The reservoir is equipped with a single electrode common to all capillaries.

In another aspect of the present invention, optics are integrated into the cartridge. According to an embodiment of the present invention, the optical excitation system is integrated with the cartridge. The excitation system includes directing excitation light by excitation fibers to detection zone by coupling LEDs with micro-ball lenses. The excitation fibers are routed to a V-groove assembly adjacent to each capillary. According to another embodiment of the present invention, the optical detection system is engaged with the cartridge by a shutter mechanism. The detection optics for each of the capillaries, or the detection array, is coupled to a single photo-multiplier tube. The detection array includes collimating the emission light from the detection zone by using micro-ball lenses and detection fibers.

WO 02/059589

PCT/US02/02515

In a further aspect of the present invention, the present invention provides a bio-separation instrument that incorporates the multi-channel bio-separation cartridge of the present invention.

5

6

WO 02/059589

PCT/US02/02515

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

For a fuller understanding of the nature and advantages of the invention, as well as the preferred mode of use, reference should be made to the following detailed description read in conjunction with the accompanying drawings. In the following drawings, like

5 reference numerals designate like or similar parts throughout the drawings.

FIG. 1 is a schematic view of a capillary electrophoresis system that incorporates the present invention.

FIG. 2 is a perspective view of the capillary electrophoresis system/machine in accordance with one embodiment of the present invention.

10 FIG. 3 is a diagram of the control system.

FIG. 4 is a perspective view of the cartridge lower section with excitation fibers.

FIG. 5 is a perspective view of the cartridge mid-section and the lower section with excitation fibers before being joined.

15 FIG. 6 is a perspective view of the cartridge mid-section and the lower section with excitation fibers after being joined.

FIG. 7 is a perspective front view of the combined cartridge mid-section and the lower section in FIG. 6 with capillaries before being joined.

FIG. 8 is perspective front view of the cartridge mid-section and lower section with capillaries after being joined.

20 FIG. 9 is a perspective rear view of the cartridge mid-section and lower section with the gel reservoir.

FIG. 10 is a perspective front view of the cartridge mid-section and lower section with the gel reservoir and front and rear covers.

FIG. 11 is a front perspective view of the cartridge with detection optics inserted.

25 FIG. 12 is a front perspective sectional view of the cartridge in FIG. 11 with the excitation and emission optical system.

FIG. 13 is a perspective sectional view of the cartridge with schematic of the detector system.

30 FIG. 14 is a front perspective sectional view of the cartridge with the excitation and emission optical system.

WO 02/059589

PCT/US02/02515

FIG. 15 is an enlarged view of section A in FIG. 14 and a perspective sectional view of the cartridge section A shown in FIG. 13.

FIG. 16 is a perspective sectional view of the cartridge section B shown in FIG. 13.

5 FIG. 17 is perspective sectional view of the detection zone with lens, probe, capillary, and excitation fiber.

WO 02/059589

PCT/US02/02515

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

This invention is described below in reference to various embodiments with reference to the figures. While this invention is described in terms of the best mode for achieving this invention's objectives, it will be appreciated by those skilled in the art that variations may be accomplished in view of these teachings without deviating from the spirit or scope of the invention.

The present invention is directed to a novel CE system and novel cartridge configuration in which incident radiation (e.g., from a laser or LED source) for detection of separated analytes is directed through the boundary walls of the detection zone or the separation column. For purpose of illustrating the principles of the present invention and not limitation, the present invention is described by reference to embodiments directed to capillary electrophoresis and radiation induced fluorescence.

Referring to FIG. 1, a bio-separation system, more specifically a capillary electrophoresis (CE) system 200 that incorporates the present invention is schematically illustrated. The CE system 200 generally comprises a capillary separation column 22 (e.g., 200-500 μ m O.D.), which defines a separation channel 36 (e.g., 25-200 μ m I.D.). The capillary column 22 may be made of fused silica, glass, polyimide, or other plastic/ceramic/glassy materials. The inside walls of the separation column 22 (i.e., the walls of the separation channel 36) may be coated with a material that can build up an electrostatic charge to facilitate electrophoresis and/or electrokinetic migration of the sample components. The separation channel 36 is filled with a separation support medium, which may simply be a running buffer, or a sieving gel matrix known in the art. For radiation induced fluorescence detection, the gel matrix includes a known fluorophore, such as Ethidium Bromide.

One end of the capillary column 22 is submerged in a reservoir 28 of running buffer/gel 34. The other end of the capillary column 22 is coupled to the sample vial 26. It is understood that the detection configurations shown in the other embodiments can be equally implemented in a system similar to the CE system 20. Also, the separation channel 36 may be one straight capillary or micro-channel with a section of the detection

WO 02/059589

PCT/US02/02515

5 window closest to the gel-reservoir at the exit end being the detection zone, which is the current preferred mode of our invention. A radiation detector 24 is positioned outside a transparent section of the capillary walls at detection zone 30. An excitation fiber 16 extends from a radiation source 18 (e.g., LED or laser) and is directed at the detection zone 30 outside the walls of the column. Electrodes 12 and 14, that are part of the cartridge assembly are coupled to the buffer reservoirs 26 and gel reservoir 28 to complete the electrophoresis path.

10 For the sake of completeness, it is sufficient to briefly mention the operation of the CE system 200. In operation, a prepared biological sample (e.g., a DNA sample), direct from Polymerase Chain Reaction (PCR) machine is introduced into the far end of the capillary column away from the detection zone by any of a number of ways that is not part of the present invention (e.g., electrokinetic injection from a sample reservoir or physical pressure injection using a syringe pump). The sample binds to the fluorophore.

15 When a DC potential (e.g., 1-30 KV) is applied between electrodes 12 and 14, the sample migrates under the applied electric potential along the separation channel 36 (e.g. DNA that is negatively charged travels through the sieving gel with an integrated dye matrix/fluorophore toward a positive electrode as shown in FIG. 1) and separates into bands of sample components. The extent of separation and distance moved along the separation channel 36 depends on a number of factors, such as migration mobility of the sample components, the mass and size or length of the sample components, and the separation support medium. The driving forces in the separation channel 36 for the separation of samples could be electrophoretic, pressure, or electro-osmotic flow (EOF) means.

25 When the sample reaches the detection zone, excitation radiation is directed via the excitation fiber 16 at the detection zone. The sample components fluoresce with intensities proportional to the concentrations of the respective sample components (proportional to the amount of fluorescent tag material). The detector 24 detects the intensities of the emitted fluorescence at a wavelength different from that of the incident

WO 02/059589

PCT/US02/02515

radiation. The detected emitted radiation may be analyzed by known methods. For an automated system, a controller 32 controls the operations of the CE system 200.

Multiple Capillary Cartridge Based CE System

5 The multi-channel capillary array includes twelve detection zones 30 defined by micro-channels 36 in cartridge body (also see FIG. 2). The substrate cartridge body may be machined, thermoformed, photo-etched or injection molded (e.g., Acrylic, PET, Ulfem, Glastic, Fluorosint, or any optically clear plastic) to support the multi-channel capillary array to the integrated optics alignment V-grooves. The cartridge of the present
10 invention includes a twelve-channel fused silica capillary array (16 cm long) that is used for separation and detection of the samples as part of a disposable cartridge assembly. When the cartridge is attached to the CE system in which it is designed for use, excitation fibers (i.e., multi-mode silica or plastic fibers, 0.22 N.A.) that are integrated with the micro-channels 36 are directed at the detection zone 30. Each channel is coupled to an
15 LED. LED light is launched into the side of capillaries 36. In this particular embodiment, sieving gel fills the micro-channels/capillary array 36.

FIG. 2 shows the design of a multi-channel cartridge 100 installed in a CE system 200 in accordance with the one embodiment of the present invention, which provides easy handling of multi-channel separation columns, and allows easy optical
20 coupling of the detection zones to the detection optics of the CE instrument. FIG. 2 shows an overall perspective view of the CE instrument 200 (DNA Analyzer) with the twelve-capillary cartridge in place. The fully automated DNA analysis instrument 200 has a base 74, supporting a modular X-Z sample handling tray mechanism 80, which moves two 96-well micro-titer plates 70 and 72 in relation to the multi-
25 capillary cartridge 100 supported on support bracket 164. The system 200 provides easy handling of multi-channel separation columns, and allows easy optical coupling of the detection zones to the detection optics of the CE instrument 200.

The cartridge 100 described in greater details below. Briefly, the cartridge 100 includes a twelve-channel fused silica capillary array that is used for separation and
30 detection of the samples as part of a disposable and/or portable, interchangeable cartridge

WO 02/059589

PCT/US02/02515

assembly 100. The multi-channel capillary array includes twelve detection zones defined by micro-channels in the cartridge 100. The multi-channel cartridge 100 shown in FIG. 2 holds up to 12 capillaries 140, 12-16 cm long. The multi-channel cartridge 100 is integrated with a top, outlet buffer reservoir 124 common to all capillaries 140, which is
5 directly coupled to a modular air pressure pump 78. The pressure pump 78 provides the required air pressure to fill-up all the 12-capillaries with the sieving gel contained in the reservoir 124 and to purge the gel from the previous run from the capillaries during the refilling process. Depending on the viscosity of the gel, pressures of up to 40 PSI may be applied to the capillaries 140 through the gel-filled reservoir 124. The cartridge gel-
10 reservoir 124 is equipped with built in common electrode (anode; not shown) for all 12-capillaries, which is automatically connected to a high voltage power supply 76 for electrophoresis when installed inside the instrument 200. A fan or Peltier cooler on the adjacent structure to the cartridge 100 provides temperature control of the cartridge. The cartridge will have vent holes (input and output) for air circulation (temperature
15 controlled air to be introduced to the cartridge from the instrument side). A power supply 66 provides DC power to the CE system 200.

In accordance with one embodiment of the present invention, the block diagram of the controller 32 for the CE system 200 is shown in FIG. 3. The controller comprises a CPU 910, an A/D converter 912 for converting detection signals from the
20 PMT 178 (FIG. 13) to corresponding digital signals, and an I/O interface 914 for transferring and receiving signals to and from respective parts of the CE instrument 200 by instructions from the CPU 910. A temperature controller 916 controls the fan or Peltier cooler 63 that controls the temperature of the electrophoresis chamber for the micro-channel/capillary array cartridge 100. The I/O interface 914 is coupled with
25 the temperature controller 916, which also controls the high-voltage power supply 76 for sample injection and electrophoresis functions of the CE instrument 200, a circuit 921 for modulating the excitation radiation source (e.g., LEDs), sensors, air pump, air valve, and motors for the X-Z stage of the CE instrument 200. The CPU 910 may be further coupled to an external personal computer 918, which in turn performs data
30 processing or additional control function for the CE system 200. The CPU 910 and/or

WO 02/059589

PCT/US02/02515

the PC 918 may be programmed with control functions dictated by LabVIEW™ software available from National Instruments Corporation, to control various features and functions of the automated multi-channel DNA analyzer 200.

5 The components of the controller 32, with the exception of the PC 218, may be packaged as an electronic board 64 (FIG. 2) and cooling fan 62, on board the CE system 200 and electrically coupled to the PC 218 via a serial port (not shown), or they may be part of a separate controller module outside of the CE system 200. The CPU 210 and/or the PC 218 are programmed to accomplish the various control functions and features for the CE system 200. In one embodiment, the PC 218 can be
10 configured to provide the front panel control (i.e., user interface) for the instrument 200, and the board 64 may be configured to provide the time staggered/time multiplex detection controls. It would be within a person skilled in the art to implement the program code given the functions and features disclosed herein. An A/C power filter/ switch 68 (FIG. 2) is provided for the instrument 200.

15 Injection of the samples is achieved by electrokinetic methods. The high voltage power supply 76 is used to deliver 0-to-20 KV of electrical field to the gel-filled capillaries for the electrokinetic injection and separations of DNA fragments. Each of the 12-LED's broad band light energy (FWHM= 47 nm) is relayed by individual light transmitting optical fibers (multi-mode silica or plastic 200 micron
20 Core fibers, 0.22 N.A.) to each of the capillary's detection zone inside the cartridge 100 for the excitation of the separated DNA fragments.

In operation, the sample handling tray transport mechanism 80, with a 96-well plate (8x12), is used to introduce the amplified DNA samples (or analytes) to each micro-bore channel 36. Inside the micro-channels 36 are Polyimide coated or glass capillary
25 tubings 22 of smaller inner diameter (25 – 100 μm) used as separation columns. The X-Z transport mechanism 80 indexes a row of sample carrying wells under the row of capillary tips and dip the tips into the well. By applying a voltage, electrokinetic injection moves a known amount of the DNA sample to the beginning of the separation column
30 140. After injection, the DNA samples from sample tray 72 may be replaced with a running buffer from tray 70. Alternatively, after injection, the transport mechanism 80

WO 02/059589

PCT/US02/02515

may index to move a row of 12 wells containing buffer solution into position under the cartridge to replace the twelve wells containing DNA samples. By applying high voltage across the total length of the capillary separation channel and the micro-channel 36, separation of the DNA sample into DNA fragments is achieved. Up to 1000 V/cm

5 (typically 300 V / cm) of high voltage is applied, which provides fast separations of less than 10 minutes along the entire length of the separation channel. The total separation length is about 12.5 cm up to the detection zone. The separation capillary length inserted inside the micro-channel is about 6.5 cm. High voltage is applied to a total active length of 16-17 cm, which could be the length from the bottom to the top of one single capillary

10 with 75 micron I.D. inside the gel-reservoir as a single separation and detection capillary. During electrophoresis, the rate at which the DNA fragments move through the sieving gel is inversely proportional to their mass; i.e., lighter (or smaller) DNA fragments move more quickly than heavier (or larger) ones. As the fragments approach the end of the separation column 22 and enter into the detection zone 30, the excitation light energy

15 from each of the twelve LEDs (not shown) is delivered by individual light transmitting optical fibers from outside the detection window, illuminating the migrating DNA fragments from sample tray 72. As the DNA fragments move through the sieving gel, or linear polymer solution (e.g., 25 mM Mops-Tris pH 7.55, as referenced in "Pace Setter", Vol. 3, Issue 1, April 1999), a DNA intercalating dye (Ethidium Bromide) within the

20 sieving gel allows the migrating DNA fragments to be detected. Experiments have shown that detection sensitivities of 100 ng/ml (0.02 ng of the HaeIII digest ϕ X174 DNA test mix) are achievable, which is several orders of magnitude better than conventional slab gel electrophoresis devices using the same intercalating dye. As the twelve LEDs are time-multiplexed (with sampling frequency of 10-100 Hz), twelve emission signals

25 coupled to twelve emission detection fibers will reach the single PMT in a time-staggered manner by a single fiber-bundle assembly.

To prepare for the next run with a different sample, the old gel from the previous run is purged from the capillaries by pressuring the reservoir to refill the capillaries with fresh gel. The trays 70 and 72 carries cleaning solutions, waste collection, and samples.

30 The purged gel is collected by one of the trays 70 and 72 by positioning the tips of the

WO 02/059589

PCT/US02/02515

capillaries at a row of waste collecting wells in one of the trays. The tips of the capillaries may be cleaned with water or a cleaning solution by positioning and dipping the tips of the capillaries in such solution in the appropriate tray wells. When the capillaries are refilled and ready for the next run, the tips of the capillary are dipped into
5 the samples by repositioning the trays 70 and 72. The above mentioned sequence of process may be programmed as one of the automated functions of the controller 32.

It is noted that because the sample analytes that flowed to the gel reservoir at the exits of the capillaries are in such small amount and volume concentration compared to the volume of the reservoir, and that the analytes are expected to be mixed within the gel
10 reservoir, there will only be a negligible trace of analytes from past runs in the reservoir, and that will be evenly distributed in the gel that refills the capillaries for the next run. Any noise from this negligible trace would be relatively small background noise that can be easily removed from the detected signal in the data analysis.

FIGS. 4-9 show the steps for assembling components for the cartridge. They are
15 described here for illustrative purposes and are not to be taken in a limiting sense. FIG. 4 shows the lower-section body 110 of the cartridge 100. At the upper end of the lower-section body 110 are openings 126 through which portions of the excitation fibers 116 are placed; after being placed through these openings, the excitation fibers 116 are bonded in place. (Other means of securing these components may be used as well.) At the lower
20 end of the lower-section body 110 are electrodes 114 that are also bonded (or insert molded as part of 110). The capillaries 140 (FIG. 7) are inserted at holes 139 and guided to these electrodes 114. For a twelve-capillary cartridge, there are twice as many excitation fibers (i.e., twenty-four excitation fibers, in case of upgrading for dual-wavelength type detections). These excitation fibers 116 are positioned to alternate
25 around the twelve capillaries 140. This is seen more clearly as fiber openings 126a and 126b may be used for excitation fibers 116a and 116b (FIG. 4) for capillary 140, respectively.

FIG. 5 shows the addition of the cartridge mid-section body 120 to the lower-section body 110 in FIG. 4. The cartridge mid-section body 120 is designed so that the
30 part 132 does not obstruct the path of the excitation fibers 116 or that of the capillaries

WO 02/059589

PCT/US02/02515

140. The part 132 has a zigzag design that does not enclose the excitation fibers 116 and that is generally horizontal while the cartridge is in operation. This part 132 also has holes 138 through which the capillaries 140 are placed, as will be shown in further figures. The top end 131 of the mid-section body 120, which will form part of the
5 reservoir, also has holes 139 through which the capillaries 140 will be placed.

After the mid-section body 120 of the cartridge is mounted onto the lower-section body 110, as shown in FIG. 6, polyimide coated capillaries 140 are placed through the capillary holes 139 and 138 until they reach the lower end of the lower-section body 110 (see FIG. 7). The capillaries 140 have a pre-burned window, with the polyimide coating
10 removed to provide a detection window. Staples 136 may be used to secure the capillaries 140 to the mid-section body 120 of the cartridge. At the top end 131 of the mid-section body 120 is a common electrode (anode) 134 for the capillaries that extends into the reservoir.

FIG. 8 shows the cartridge with the combined mid-section and lower-section
15 bodies 110 and 120, respectively. The capillaries extend from the top of the mid-section body 120 (with the capillary tips 141 protruding at the opening 131 for the reservoir) to the bottom of the lower-section body 110 with the electrodes (cathodes) 114. The detection zone 155 of the capillaries is also shown. The excitation fibers 116 are shown through fiber openings 126 (see also FIG. 4) up to the V-groove block assembly 150,
20 where light from the excitation fibers is directed at the capillaries.

In FIG. 9, a rear view of the cartridge is shown. The cartridge is integrated with a top/outlet buffer reservoir 130 common to all capillaries. The gel reservoir 130 is attached to the mid-section body 120 with an O-ring 144 as a seal. The gel reservoir 130 has a capacity of about 18 cc and may have transparent, or clear, windows on each side
25 for inspection of the gel level. The gel reservoir 130 is coupled to a modular air pressure pump 78 (see also FIG. 2). The pressure pump 78 provides the required air pressure to fill all 12-capillaries with the sieving gel. Depending on the viscosity of the gel, pressures of up to 40 PSI have been applied to the capillaries through the gel-filled reservoir. The cartridge 100 has a single electrode (anode) 134 at the top opening of the
30 mid-section body 120 and multiple electrodes (cathodes) 114 at the lower-section body

WO 02/059589

PCT/US02/02515

110 as part of the cartridge assembly. The cartridge gel reservoir 140 is equipped with a built-in electrode (anode) 134 common for all twelve capillaries, which is automatically connected to the high voltage power supply 76 via off the shelf pogo-pins for electrophoresis when installed inside the instrument 200 (DNA Analyzer). A
5 commercially available high voltage power supply (i.e. Emco) is used to deliver 0 to 20 KV of electrical field to gel-filled capillaries 140 for the electrokinetic injection and separations of DNA fragments.

The reservoir 130 containing the gel is sealed, such as hermetically sealed at the body of the cartridge, which allows the cartridge to be handled by holding it in an orientation without leakage of the gel. (There is negligible leakage or exposure at the
10 capillary tips because of surface tension and high viscosity within the microbore of the capillaries.) The cartridge 100 has a rubber septum (not seen) that is pierced by an instrument-mounted needle (or any sharp object) that provides air pressure from the pump 78 into the cartridge. This allows air pressure to fill the capillaries with the gel/buffer
15 solution after each separation run, and to purge the old gel from the previous run in the process. This approach assures the proper containment of the gel inside the cartridge reservoir; it also provides a simple and reliable means of accessing the gel reservoir and of providing enough air pressure for the gel to fill up the capillaries prior to applying high voltage to effect CE separation.

The cartridge 100 also has detection optic ports 161 through which detector
20 probes 170 (FIG. 11) are fitted. Through each of these detection optic ports 161, micro-lenses 166 for emission collection optics are placed, followed by elastomer lens retainers 168. The cartridge also has a shutter covering, or a multi-channel aperture strip 142, at the detection optic port 161. The aperture strip 142 may be a thin Polyester material
25 about 0.5 mm thick, which will prevent any dust particles or foreign objects from entering inside the collection optics area. The apertures 142 will open up when the detection array 170 containing the collection optics enters the cartridge. The apertures 142 will close up again when the detection array 170 is removed from the cartridge assembly. The shutter can also be a mechanical covering or window, which opens up when it is interfaced with
30 the instrument's detection optics.

WO 02/059589

PCT/US02/02515

The last stage of assembling the cartridge is shown in FIG. 10 with the front cover 146 and the rear cover 148. The rear cover 148 has holes 162 for each of the detection optic ports 161. There are also vent holes 165 above holes 162 through which cooled air flows inside the cartridge to cool the capillaries.

5 FIGS. 11 and 12 show the rear view 124 of the cartridge 100 with a clearer view of the emission collection fiber array 170. FIG. 12 shows that the lower-section body 110 is symmetrical, front and rear (i.e., see mirrored LEDs 184a and 184b). FIG. 13 shows a perspective sectional view of the cartridge 100 with a detector probe 171 from the emission collection optical detection array 170 coupled to a single photo-multiplier tube
10 (PMT) 178 through a fiber connector 174 and an emission filter 176.

FIG. 14 shows a sectional view of the cartridge 100 along with the excitation and emission optical systems. The cartridge 100 is supported by support frame 164. The cartridge when installed inside the instrument through this support frame 164 gets
15 mechanically aligned with LED module/barrel assemblies. The structure of the lower body of cartridge 110 provides the optical alignment means or coupling of lens barrel assembly 188 to the excitation fibers inside the cartridge. The excitation system includes the coupling micro-ball lenses 182 with respective LEDs 184. The excitation light from the LEDs 184 is directed through the excitation fibers 116 to the detection zone 155 of the capillaries. The emission system includes the emission collection fiber array 170,
20 which is connected at the rear side 122 of the cartridge 100.

The cartridge has alignment features to be easily aligned to the micro-optical detection module inside the instrument 200. The optical detection array 170 and LED array 184 are all spring loaded, which provides independently compliant forces to each lens barrel assembly 188 (i.e. LED or fiber ferrule) for a reliable and repeatable alignment
25 to the cartridge. The cartridge has all the proper conical type features (i.e., conical lens seating 186) to accept the spring and the spring loaded arrays from the instrument, as will be described in greater detail below.

30 Excitation System

WO 02/059589

PCT/US02/02515

A closer look at section A in FIG. 14 shows the excitation system in FIG. 15. This also shows an angled sectional view of the cartridge section A in FIG. 13. The excitation system is supported by the excite support frame 164, which is fitted to the cartridge (in FIG. 10) during use (as shown in FIG. 11). Since the excitation fiber 116 must receive light and direct light along its path toward the capillary detection zone 155, the excitation system is configured to allow the required light to enter excitation fiber 116 through a ball lens 182 from LED 184. The excitation system includes ball lens 182, LED 184, and elastomer spring 190, which are all arranged within lens barrel 188, coil spring 192, excite support frame 164, retainer 194, and LED lead 196. Within the lens barrel 188, the elastomer spring biases LED 184 against ball lens 182. The coil spring 192, which rests on the excite support frame 164, provides axial and angular compliance in the lens barrel 188, thus allowing ball lens 182 to center accurately in conical lens seat 186. Both these biasing forces provide a closer contacting path for the excitation light to travel, from the LED 184 through the ball lens 182 to the excitation fiber 116.

Two excitation fibers 116 for two wavelengths (for each capillary) are integrated inside the cartridge 100, with fixed alignment, at close proximity to the capillary detection zone 155. These two excitation fibers 116 are coupled to two LEDs 184 (e.g., two different colors: 526 nm and 473 nm) when the cartridge is installed inside the CE instrument 200 (i.e., DNA Analyzer). Two colors can be separated and detected by two-color emission filters at the detection module (PMT module 178). The cartridge 100 can have single color capabilities for DNA fragment analysis applications and also can be upgraded to have two-color detecting capabilities for other applications. Reference is made to U.S. Provisional Application No. _____ entitled "A Portable Multi-color Multiplexed Analysis Electrophoretic Device," filed on October 19, 2001 (Attorney Docket No.: 1031/207), which is commonly assigned to BioCal Technology, Inc., the assignee of the present invention, and which is fully incorporated by reference herein.

Detection System

U.S. Patent Application No. _____ entitled Optical Detection in A Multi-Channel Bio-Separation System, concurrently filed on January 28, 2002 (Attorney

WO 02/059589

PCT/US02/02515

Docket No.: 1031/209), which is assigned to BioCal Technology, Inc., the assignee of the present invention, and which had been fully incorporated by reference herein, is more specifically directed to the time staggered/multiplexed detection scheme that can be adopted in the CE system 200 in which the cartridge 100 is designed to be used.

5 A closer look at section B in FIG. 13 shows the detection, or emission, system in FIG. 16. Excitation light from a light source (e.g., LED 184) travels in the excitation fiber 116 to the detection zone 155 of the capillary 140. A fiber ferrule 210 strengthens and protects the excitation fiber 116 that is inserted within V-groove block 150. Two excitation fibers 116 may be guided to one V-groove block 150, both directing light from
10 the two lower angle openings of the V-groove block. The preferred embodiment for aligning each excitation fiber with a capillary is a single block featuring machined V-grooves that nest both the capillary and the fiber in precise alignment to each other. The block may be manufactured by using tooling for a coined part or by injection molding. Also, a cross drilled screw machine part may be used in which the capillary and fibers
15 would be loaded in precisely machined holes rather than in V-grooves.

When the excitation light is directed at the detection zone 155 (also see FIG. 17), the detection system detects emitted light, or emission signals at 90 degrees with respect to the excitation plane. Collimation optics for collimating the emission beam is needed since the emission fiber 180 is outside the liquid or gel. The Numerical Aperture of the
20 excitation fiber 116 determines the amount of power density launched inside the gel close to the detection zone. The excitation light source may be a LED 184, which is relatively inexpensive, or a laser (may be a solid state laser, gas laser, dye laser or the like). The fluorescence emissions from the separated components or analytes at the detection zone is collected through micro-lenses 166 and 167, and directed through an emission collection
25 fiber 180 to a detector. Between these two ball lenses 166 and 167 is a spacer 206. The capillary 140 may have transparent walls, or opaque walls provided with a transparent window to direct emissions to the micro-lenses 166 and 167. The lens 166 is used for collecting emissions and preferably has a high collection angle property (e.g., a sapphire micro-lens with index of refraction of $n=1.76$ from Swiss Jewel Company Model # B2.00
30 that has a short focal distance with a high numerical aperture (N.A.)). The lens 167 is for

WO 02/059589

PCT/US02/02515

coupling the collimated emission light produced by the sapphire lens to the emission fiber 180 (e.g., a BK-7 micro-lens, available from the Swiss Jewel Co.). The fluorescent light, which has a higher wavelength (e.g., 570 to 630 nm) than the excitation light, is then routed by a large core optical fiber 180 (370 μm O.D., 0.22 NA fibers; but could also be in ranges of: 100-1000 μm O.D., 0.12-0.5 NA) to a detector (e.g., R5984 Hamamatsu photo-multiplier tube (PMT)) after going through color separation (e.g., using 570 – 630nm) long pass emission filters. The emission signals are relayed by emission fibers 180 into the detector module (PMT detector 178) where they are filtered by a single or multiple emission filter 176 and are read (detected) in a time-multiplexed (time-staggered) scheme. The detection fiber 180 can be seen more clearly in connection with the detection optics system as described and shown in FIG. 13.

It is further noted that the detection zone is not necessarily a well-defined zone with well-defined boundaries, due to the nature of the substance, the incident radiation, and the fluorescence emissions. It is generally a zone in which light from the excitation fiber is directed to cause fluorescence emissions and the detection optics is aimed to capture part of such fluorescence emissions. Light from the excitation fiber may cause fluorescence emissions outside the detection zone, and some of the emissions from within the zone may not be detected by the detection optics. The closer the excitation fiber is to the detection zone or the higher the power density of excitation light, the stronger the collected emission signals are.

In the multi-capillary CE device of the present invention, the fluorescence excitation light sources may be super bright blue or green LEDs. The attractive features of LEDs as light sources are their low cost, small size, long lifetime, good intensity and stability resulting in low noise, and the possibility of direct electronic modulation of the intensity. The LEDs contemplated in this invention are based on InGaN material technology (e.g., HLMP-CB15 and HLMP-CM15 from Agilent) with an average light output power of 2.5 – 3 mW. The spectral characteristics with its peak wavelength and halfwidth (nm) of the InGaN LEDs indicate that these LEDs can be used for excitation of fluorescence with excitation spectra in the range of 440 to 570 nm (e.g., fluorescein, rhodamine, Etidium Bromide, thiazol orange) and for frequency in the range of 1 Hz to

WO 02/059589

PCT/US02/02515

100 MHz. Since the response time of these LEDs are very high (at a few hundred nanoseconds), they can be pulsed at greater forward currents, up to 100 mA in pulsed mode operation, to obtain high radiant peaks. Pulsed operation of LEDs can typically be achieved by the transistor drive circuits. Significantly higher peak LED light output can
5 be realized from large drive current pulses at low duty cycles (i.e., 5%, 10%, 25% or 50%) than DC operation.

Different color LEDs (i.e., blue or green LEDs) could be used as excitation sources for excitation of different fluorophores (different applications). The preferred embodiment uses LEDs in wavelength ranges of 500-600 nm, and specifically at 524 nm.
10 A second LED module, or a second color LED, could be added to the current design for a dual-wavelength detection device either bringing two wavelengths to the micro-channel using one or two fibers. The current detection/separation platform could be expanded with dual LED modules by having excitation and collection optics with a second PMT to provide a multi-wavelength fluorescence detection DNA fragment detector.

15 The excitation light sources could be changed from LEDs to Laser Diodes (semiconductor solid-state lasers). Alternatively, they could be pulsed lasers (e.g., solid state lasers, gas lasers, dye lasers, fiber lasers). The main reason for using LEDs (i.e., Green, 524 nm) is their low cost, super brightness, and small package. Surface Mount (SMT) type LEDs could also be used, using either fiber coupled or direct butt-to-butt
20 coupled scheme to capillaries to deliver excitation light to the separating analytes. An alternate light source for this instrument would be laser diodes in the range of 400-800 nm.

A person skilled in the art will recognize that the instrument incorporating the essence of this invention can also be used for other biomolecular analysis. For example,
25 by altering the separation gel or buffer, the system can also be modified to analyze biomolecules like proteins, carbohydrates, and lipids. Using a number of multi-channel cartridges of the present invention having different buffer/gel chemistries, capillaries, etc., particular buffer/gel chemistry, with matching capillary (e.g., with particular internal wall coatings and column sizes), may be easily interchanged to suit the particular sample based
30 separation applications and run conditions, to achieve different separations, types, speeds,

WO 02/059589

PCT/US02/02515

resolutions, etc. The same cartridge may be set aside, and later reused for conducting future separation runs. Compared to the prior art CE systems, the set up time to prepare the present CE system 200 using the cartridge 100 to run different test can be reduced significantly, since the separation column, the separation medium, and at least the detection optics requiring fine alignment with respect to the capillaries are all self-contained within the cartridges. The reusability of the cartridge significantly reduces the material cost for the CE system. Also since the gel matrix with intercalated dye is hermetically sealed inside cartridge it provides a good solution for an environmentally safe / "Green" product. The fluorophore and/or gel matrix may contain carcinogens and other materials harmful to health and environment. By packaging the gel inside the cartridge, it significantly ease handling and improve safety. The cartridge may be collected and disposed of accordingly in an environmentally safe manner, or it can be recyclable, with spent parts replaced or refurbished by trained technicians to avoid harm to the environment.

With this automated and modular with integrated optics and self-aligning (non-moving micro-optical parts) multi-channel approach the operation of the instrument becomes simpler, more reliable yet provides high throughput. The cartridge 100 with self-contained, pre-aligned optics with respect to the separation channels, can be easily snapped into the CE system 200. Further, this multi-channel detection scheme could be expanded or scaled up to more than 12 or even N^{th} number of detection channels (e.g. 96-channels) without impairing the detection sensitivity. The other advantage of this simple time-multiplexed type detection method is that there is negligible or no cross talk between the channels compared with any other high-throughput LIF detection schemes.

While in the embodiments described above, the multiple radiation sources are at the same wavelength, it is within the scope and spirit of the present invention to configure the multiple radiation sources at different wavelengths, to complement the specific samples, sample based detection applications or gel chemistries in the different capillaries.

Incident radiation for the detection may be directed at the detection zone and/or radiation emissions from the detection zone may be output axially along the separation

WO 02/059589

PCT/US02/02515

medium. A widened detection zone may be adopted. References are made to U.S. Patent Application No. 09/887,871 entitled Optical Detection in Bio-Separation Device Using Axial Radiation Input, U.S. Patent Application No. 09/887,953 entitled Optical Detection in Bio-Separation Device Using Axial Radiation Output, and U.S. Patent Application No. 5 09/887,872 entitled Optical Detection in Bio-Separation Device Using a Widened Detection Zone, all filed on June 22, 2001, which are commonly assigned to BioCal Technology, Inc., the assignee of the present invention, and which are fully incorporated by reference herein.

The low cost instrument of the present invention has a disposable / recyclable 10 multi-channel cartridge design (since, most of the cartridge body parts could be retrieved and then repackaged or reused. The only part that would be replaced are the capillaries and the gel), a fluorescence detection system, and a built-in sample handling tray (96-well plate) mechanism. Experiments have demonstrated the analyses of samples are 15 completed in just 4 to 10 minutes per twelve-channel (twelve parallel results for twelve test samples). The DNA analyzing system is an all-in-one high throughput workstation that handles complete DNA fragment analysis from injection to detection to fragment data collection. Detection sensitivity for a single capillary using the described detection mode of the present invention is in the order of 0.02 ng of the DNA fragment in less than 10 minutes of separations (using HaeIII digest ϕ X174 bacteriophage DNA test mix). This 20 kind of approach for having twelve micro-channels/capillaries running in parallel produces results within 10 minutes for all twelve electrophoresed samples. This kind of separation speed and detection sensitivity is several orders of magnitude better than conventional slab gel-electrophoresis techniques.

25

* * *

While the invention has been particularly shown and described with reference to the preferred embodiments, it will be understood by those skilled in the art that various changes in form and detail may be made without departing from the spirit, scope, and 30 teaching of the invention. For example, the excitation radiation source could be, for

WO 02/059589

PCT/US02/02515

example, LEDs, Laser Diodes (semiconductor solid-state lasers), pulsed lasers (e.g., solid state lasers, gas lasers, dye lasers, fiber lasers), or other sources of radiation. LEDs (e.g., Green, 524 nm) are associated with low cost, super brightness, and small package.

5 Alternate relative inexpensive light source for the present invention could be laser diodes in the visible, UV and/or infrared range. For example, laser diodes in the range of 400-900 nm, and more specifically in the range of 400-600 nm may be used, for example.

10 A person skilled in the art will recognize that the instrument incorporating the essence of this invention can also be used for biomolecular analysis other than DNA analysis. For example, by altering the separation gel or buffer, the system can also be modified to analyze biomolecules like proteins, carbohydrates, and lipids.

By way of example and not limitation, the detection scheme of the present invention is described in connection with capillary electrophoresis and radiation induced fluorescence detection. It is understood that the present invention is also applicable to detection of analytes separated based on bio-separation phenomenon other than electrophoresis, and detection of radiation emissions other than fluorescence emissions, including other types of emissive radiation, such as phosphorescence, luminescence and chemiluminescence, as well as absorbance based detection.

15 Furthermore, while the separation channels in the described embodiments are defined by cylindrical columns or tubes, it is understood that the concepts of the present invention is equally applicable to separation channels defined by open channels, for example micro-channels defined by etching in a substrate (micro-fluidics type devices or bio-chips).

The transport mechanism can be configured to move the trays in a horizontal plane, and an additional transport mechanism may be provided to move the cartridge vertically to access the trays.

25 Accordingly, the disclosed invention is to be considered merely as illustrative and limited in scope only as specified in the appended claims.

WO 02/059589

PCT/US02/02515

CLAIMS

We Claim:

5

1. A multi-channel cartridge for bio-separation, comprising:

a body;

a plurality of separation channels for analytes defined in the body, each defining a detection zone;

10

a chamber in the body defining a reservoir in fluid communication common with the separation channels, said chamber containing a separation support medium which is sealed from leakage when the cartridge is handled in an orientation; and

optics aligned with respect to the detection zone for at least one of incident radiation and radiation output.

15

2. The multi-channel cartridge as in claim 1, characterized by at least one of the following: portable, recyclable, reusable and interchangeable with other cartridges having different one of separation support medium and separation channels.

20

3. The multi-channel cartridge as in claim 1, further comprising an electrode electrically coupled to the reservoir.

25

4. The multi-channel cartridge as in claim 3, further comprising a further electrode electrically coupled to each end of the separation channels that are away from the reservoir.

5. The multi-channel cartridge as in claim 1, wherein the optics comprises optic fibers having an end aligned by the body to the separation channels.

WO 02/059589

PCT/US02/02515

6. The multi-channel cartridge as in claim 5, wherein the optics further comprises optic fibers having another end positioned by the body for coupling to external radiation sources.
- 5 7. The multi-channel cartridge as in claim 1, wherein the separation channels comprise capillary columns supported by the body.
8. The multi-channel cartridge as in claim 1, wherein the separation support medium comprises a gel.
- 10 9. The multi-channel cartridge as in claim 8, wherein the gel is of a type suitable for capillary electrophoresis.
10. The multi-channel cartridge as in claim 1, further comprising an interface for introducing pressurized air into the reservoir to purge and fill the separation channels with the separation support medium.
- 15 11. A bio-separation system, comprising:
a base;
20 a multi-channel cartridge for bio-separation supported on the base, comprising:
a body;
a plurality of separation channels defined in the body, each defining a detection zone;
a chamber in the body defining a reservoir in fluid communication
25 common with the separation channels, said chamber containing a separation support medium which is sealed from leakage when the cartridge is handled in an orientation;
optics aligned with respect to the detection zone for at least one of incident radiation and radiation output;

WO 02/059589

PCT/US02/02515

positioning means supported on the base for positioning samples with respect to the separation channels and in fluid communication with the separation channels;

separation means for effecting bio-separation of the samples along the separation channels; and

5 control means for controlling operations of the bio-separation instrument.

12. The bio-separation instrument as in claim 11, further comprising:

a radiation source directing radiation at the detection zone; and

a detector detecting radiation from the detection zone.

10

13. The bio-separation instrument as in claim 11, wherein the separation means comprises electrophoretic means for effecting electrophoresis separation of the samples in the separation channels.

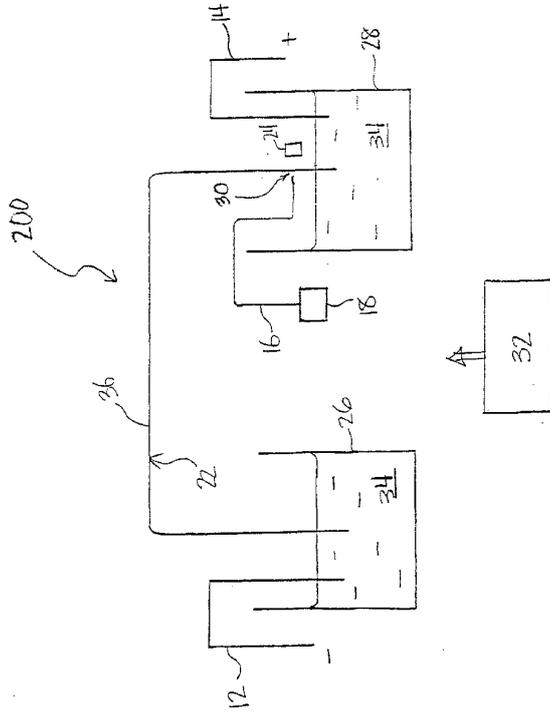
15

14. The bio-separation instrument as in claim 11, further comprising pressure means for pressurizing the reservoir to purge and fill the separation channels.

15. The bio-separation instrument as in claim 11, wherein the separation channels comprise capillary columns supported by the body.

20

FIG. 1



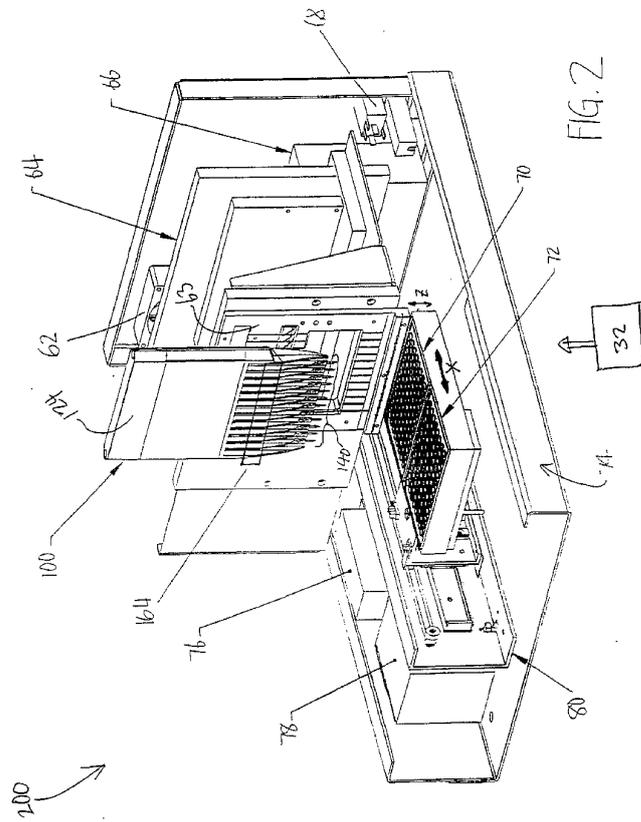


FIG. 2

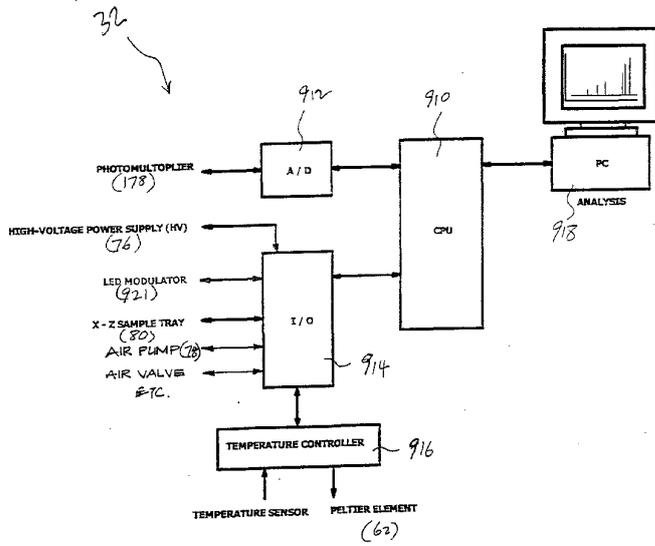
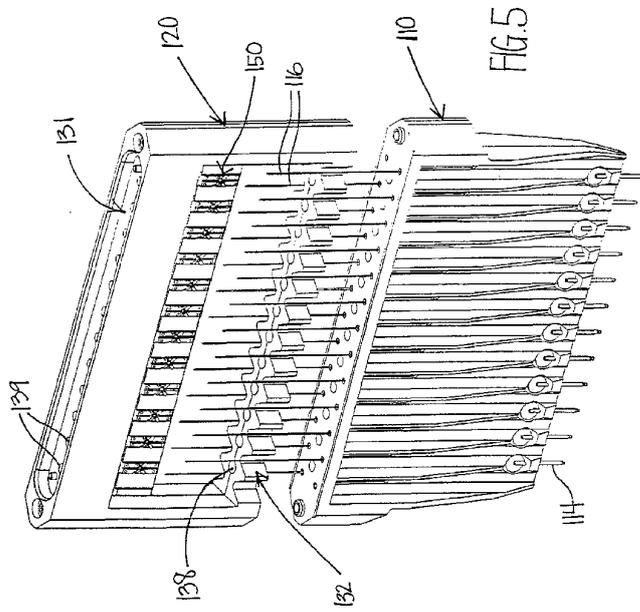
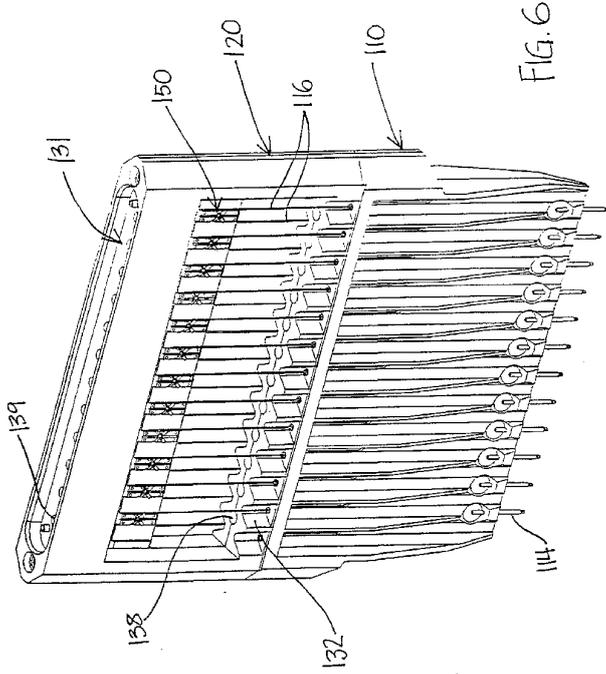


FIG. 3

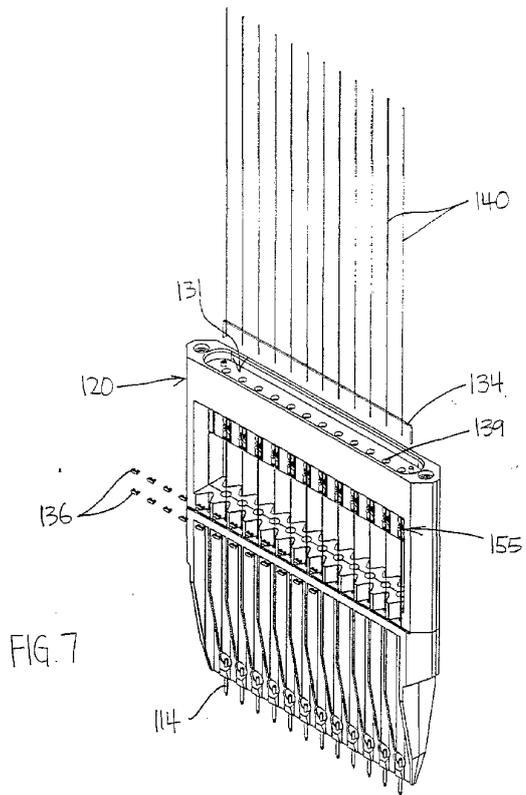




WO 02/059589

7/17

PCT/US02/02515



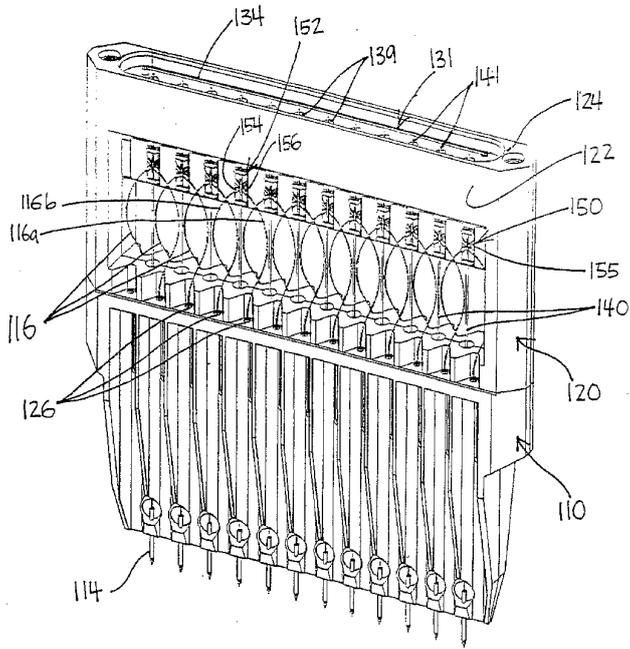
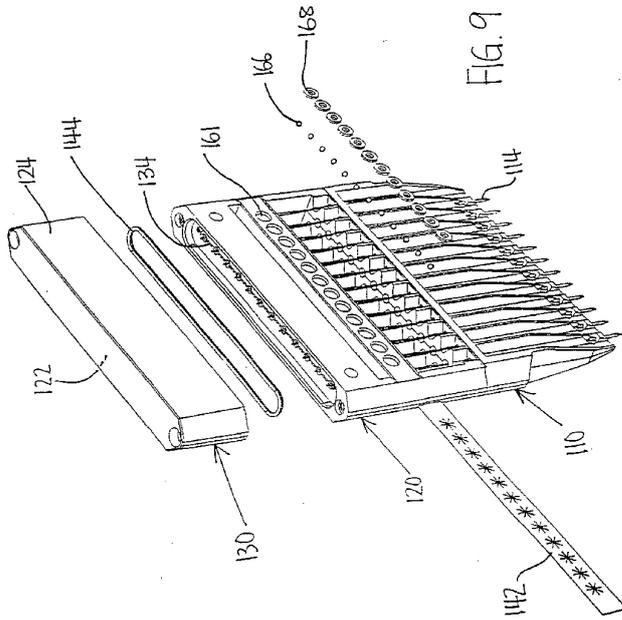


FIG. 8



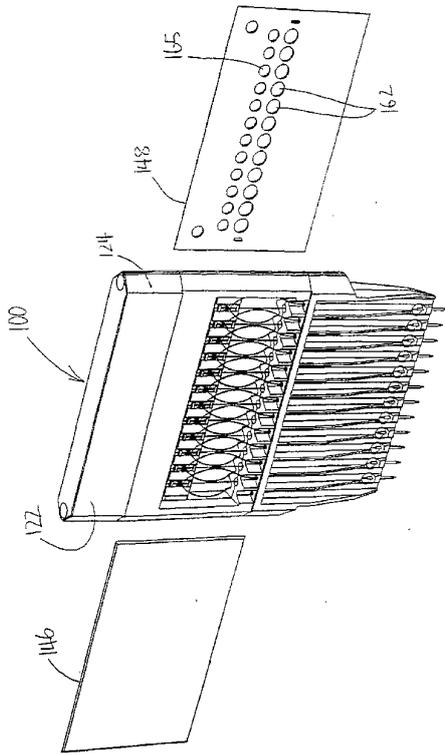


FIG 10

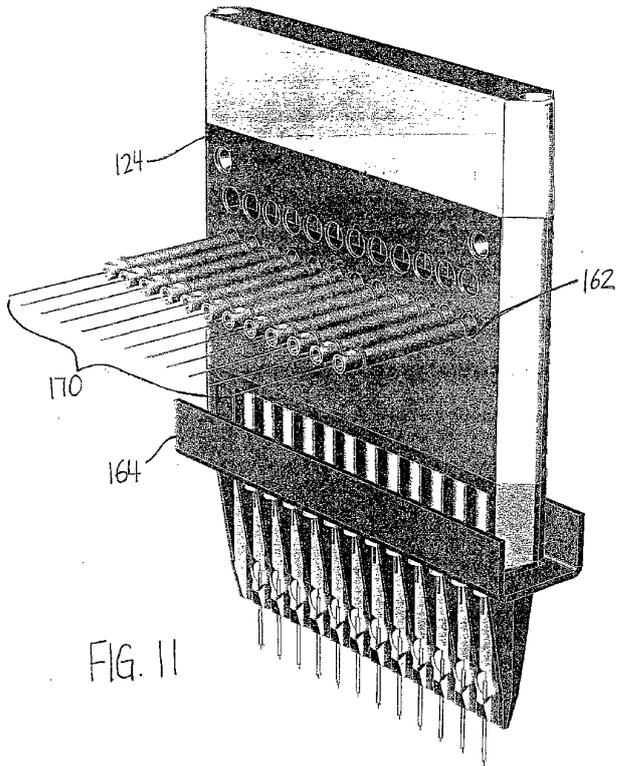
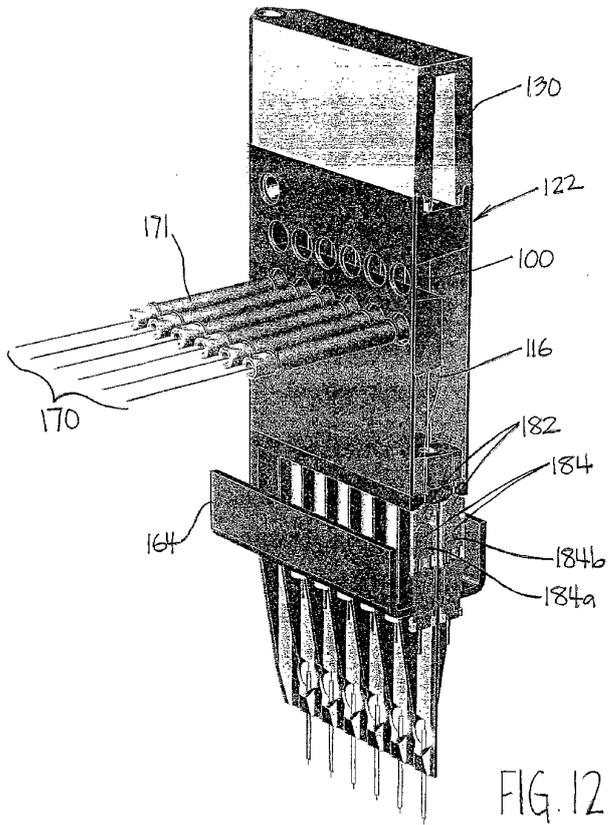


FIG. 11

WO 02/059589

12/17

PCT/US02/02515



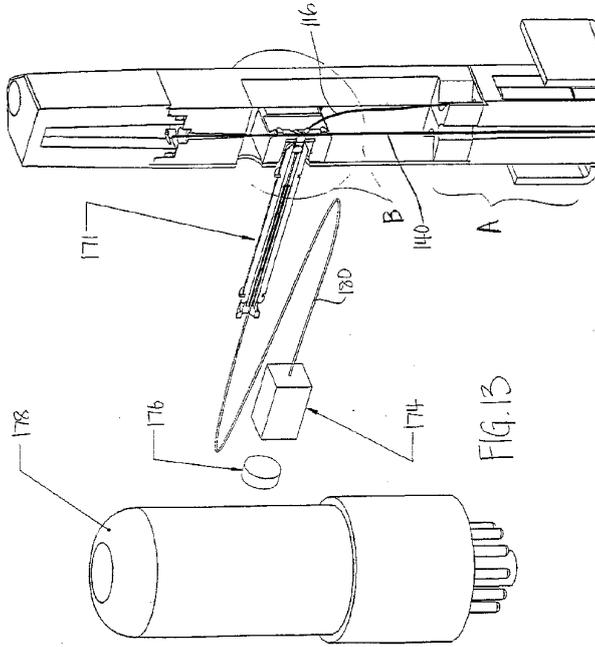
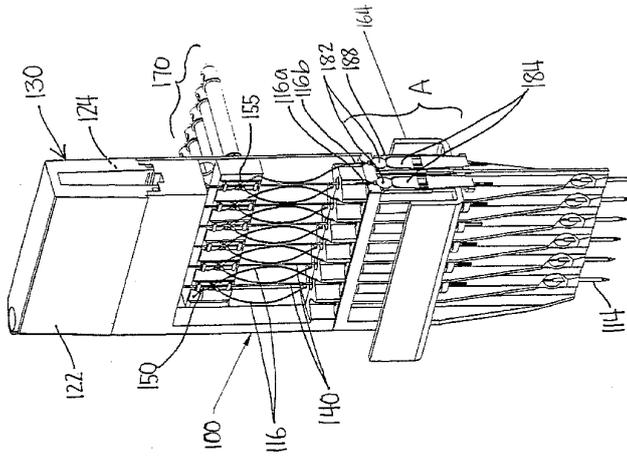


FIG. 14



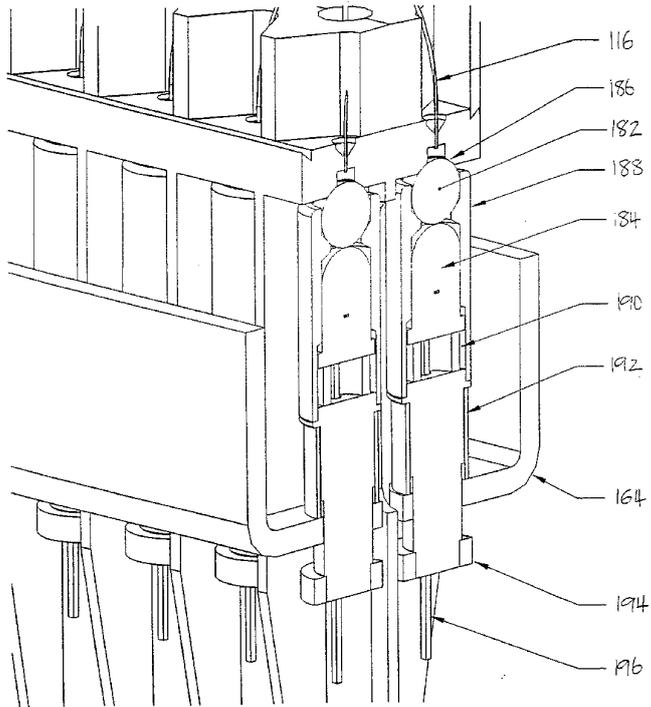
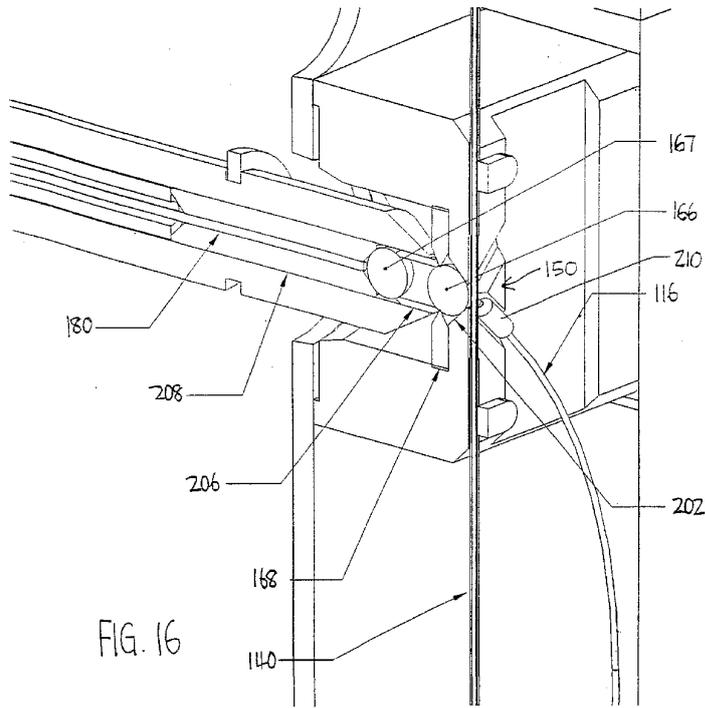


FIG. 15

WO 02/059589

16/17

PCT/US02/02515



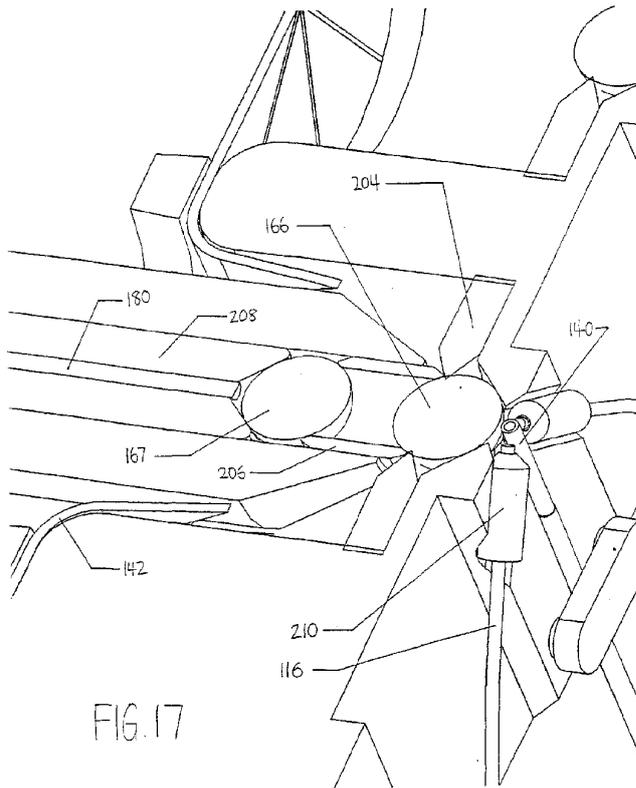


FIG. 17

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059589 A3

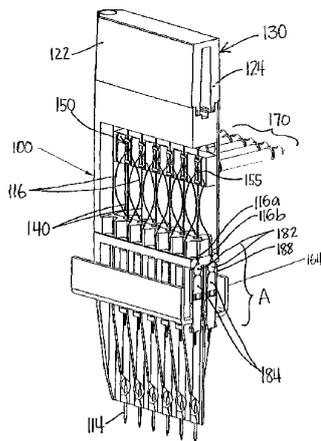
- (51) International Patent Classification⁷: G01N 27/447
- (21) International Application Number: PCT/US02/02515
- (22) International Filing Date: 28 January 2002 (28.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 50/264,605 26 January 2001 (26.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOCAL TECHNOLOGY, INC. [US/US]; 1920 East Katella Avenue, Suite O, Orange, CA 92867 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): AMIRKHANDIAN,
- Varouj [US/US]; 3831 El Camino Street, La Crescenta, CA 91214 (US); LIU, Ming-Sun [CA/US]; 2588 Chelsea Court, Brea, CA 92821 (US); MOONEY, Paul [US/US]; 20812 Raintree Lane, Rancho Santa Margarita, CA 92679 (US).
- (74) Agent: LIU, Wen; Liu & Liu LLP, Suite 1100, 811 West 7th Street, Los Angeles, CA 90017 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW).

[Continued on next page]

(54) Title: MULTI-CHANNEL BIO-SEPARATION CARTRIDGE



WO 02/059589 A3



(57) Abstract: A bio-separation system using an efficient, compact, portable, interchangeable, reusable, recyclable, multi-channel cartridge, has integrated pre-aligned optics and an integrated reagent reservoir. The cartridge supports, for example, multiple capillaries for CE separation. An integrated reservoir containing a separation support medium (e.g., a gel buffer) is common to all capillaries. The chemistry of the medium and the characteristics of the capillaries (e.g., capillary size, coating and length) are defined for each cartridge. Different cartridges can be easily interchanged in the bio-separation system to suit the particular sample based separation. The reservoir is coupled to an air pressure pump that pressurizes the gel reservoir to purge and fill the capillaries with buffer as the separation support medium. In another aspect of the present invention, optics requiring fine alignment with respect to the detection zones (such as fiber optics for directing incident radiation and/or radiation emissions) are integrated into the cartridge.

WO 02/059589 A3



Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
10 April 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

*with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments*

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 02/02515
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N27/447		
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) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 865 974 A (YOGEV URI ET AL) 2 February 1999 (1999-02-02) column 6, line 26 -column 7, line 18; figures 3,4	1-4,11
Y	US 5 066 382 A (WEINBERGER SCOT R ET AL) 19 November 1991 (1991-11-19) column 6, line 41 - line 48; figure 4	1-4,11
A	US 5 916 428 A (KANE THOMAS E ET AL) 29 June 1999 (1999-06-29) column 9, line 18 -column 10, line 55; figures 6A,6B	1
A	US 6 074 827 A (SASSI ALEXANDER P ET AL) 13 June 2000 (2000-06-13) column 21, line 32 -column 23, line 33; figure 27	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 February 2003		Date of mailing of the international search report 11/02/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5016 Patentean 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3036		Authorized officer Duchateillier, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 on patent family members

International application No
 PCT/US 02/02515

Parent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5865974	A	02-02-1999	US 5582702 A 10-12-1996
			AU 2575597 A 19-11-1997
			WO 9741070 A1 06-11-1997
			US 2002112960 A1 22-08-2002
			US 6379516 B1 30-04-2002
			AU 706048 B2 10-06-1999
			AU 5569396 A 18-11-1996
			CA 2219536 A1 31-10-1996
			EP 0824689 A1 25-02-1998
			IL 118033 A 29-02-2000
			JP 11505325 T 18-05-1999
			NZ 306974 A 25-02-1999
			WO 9634276 A1 31-10-1996
			US 5066382
US 5916428	A	29-06-1999	US 5885430 A 23-03-1999
			AU 4665597 A 24-04-1998
			EP 1010006 A1 21-06-2000
			WO 9814773 A1 09-04-1998
US 6074827	A	13-06-2000	US 6007690 A 28-12-1999
			US 5770029 A 23-06-1998
			AU 2488799 A 23-08-1999
			CA 2320362 A1 12-08-1999
			EP 1053298 A1 22-11-2000
			JP 2002502597 T 29-01-2002
			US 2002119482 A1 29-08-2002
			WO 9940174 A1 12-08-1999
			US 6344326 B1 05-02-2002
			AU 744264 B2 21-02-2002
			AU 3968097 A 20-02-1998
			EP 1007953 A1 14-06-2000
			JP 2000515978 T 28-11-2000
			US 2002053399 A1 09-05-2002
			WO 9804909 A1 05-02-1998
			US 6176962 B1 23-01-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/00 Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72) 発明者 アミルカニアン, パロウ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 1 2 1 4, ラ クレッセンタ, エル カミーノ ストリート
3 8 3 1

(72) 発明者 リウ, ミン - スン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 8 2 1, プレア, チェルシー コート 2 5 8 8

(72) 発明者 ムーニー, ポール

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 6 7 9, ランチョ サンタ マルガリータ, レインツリー
レーン 2 0 8 1 2

Fターム(参考) 4D054 FA06 FA10 FB20