

(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2005-528197

(P2005-528197A)

(43) 公表日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(51) Int. Cl.⁷

B 0 1 D 57/02

B 0 1 D 61/54

F I

B 0 1 D 57/02

B 0 1 D 61/54 5 1 0

テーマコード (参考)

4 D 0 0 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2004-508935 (P2004-508935)
 (86) (22) 出願日 平成15年5月30日 (2003. 5. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年1月31日 (2005. 1. 31)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/005704
 (87) 国際公開番号 W02003/101591
 (87) 国際公開日 平成15年12月11日 (2003.12.11)
 (31) 優先権主張番号 0212853.6
 (32) 優先日 平成14年6月1日 (2002. 6. 1)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 597011463
 ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
 スイス国、4 0 5 6 バーゼル、リヒトシ
 ユトラーセ 3 5
 (74) 代理人 100086405
 弁理士 河宮 治
 (74) 代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二
 (72) 発明者 ミシェル・ダニエル・フォベル
 フランス、エフ-6 8 4 4 0 エシャンツウ
 イレ、リュ・ドゥ・パール1 4 番
 (72) 発明者 パトリック・アンドレ・サンドレ
 フランス、エフ-6 8 6 4 0 ミュエスパッ
 ハ、リュ・ドゥ・ラ・フォーレ1 2 番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子の分離

(57) 【要約】

本発明は、溶液中の分子、特に生体高分子を分離するための方法及び装置に関する。本発明のある形態は更に、溶液中の分子を自動分離するためのシステムに関する。本発明の更なる形態は、溶液中の分子を分離するコンピュータプログラムに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 の流体仕切りの列で分離される分子を含む溶媒を充填するステップであって、第 1 の仕切りは第 1 の軸に沿って pH 膜により分離されて流体仕切りの列に沿う pH 勾配を形成し、上記第 1 の仕切りの少なくとも一つが第 2 の仕切りに隣接し、上記第 1 と第 2 の仕切りは第 1 の軸に実質的に垂直な第 2 の軸を形成する、ステップと、

流体仕切りの第 1 の軸に沿って溶媒に第 1 の電場を印加し、溶媒内の荷電された分子を第 1 の軸に沿ってそれらの等電点にまで移動させるステップと、

分子の第 2 の特性に従って、第 2 の軸に沿って溶媒に第 2 の電場を印加し、溶媒内の荷電された分子を第 2 の軸に沿ってそれらの等電点にまで移動させるステップとを含む液体媒体の分子を分離するための方法。

10

【請求項 2】

第 2 の電場が、第 1 の電場に続いて印加されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第 2 の軸に沿う仕切りが膜により分離されることを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第 2 の軸が第 1 の仕切りに近接する複数の第 2 の仕切りにより形成されることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のうちのいずれか一つに記載の方法。

20

【請求項 5】

複数の第 1 の仕切りが第 2 の仕切りに近接して配置されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のうちのいずれか一つに記載の方法。

【請求項 6】

第 2 の電場を印加する前に第 1 の軸の仕切りから第 2 の軸の仕切りを分離している不透水性バリアを除去するステップを更に含むことを特徴とする請求項 1 ~ 5 のうちのいずれか一つに記載の方法。

【請求項 7】

不透水性バリアを膜に置き換えるステップを更に含むことを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

第 2 の電場を印加する前に、不透水性バリアによって第 2 の軸の第 2 の仕切りから第 1 の軸に沿う第 1 の仕切りを分離するステップを更に含むことを特徴とする請求項 1 ~ 7 のうちのいずれか一つに記載の方法。

【請求項 9】

第 2 の軸に実質的に直交する第 3 の軸全体の溶液に電場を印加するステップを更に含むことを特徴とする請求項 1 ~ 8 のうちのいずれか一つに記載の方法。

【請求項 10】

一つ又は複数の分離された画分を一つ又は複数の仕切りから回収するステップを更に含むことを特徴とする請求項 1 ~ 9 のうちのいずれか一つに記載の方法。

40

【請求項 11】

第 1 の軸に沿って配置された複数の第 1 の流体仕切りを画定する基板を含み、

第 1 の仕切りは pH 膜で分離されて pH 勾配を形成し、第 1 の仕切りのうち少なくとも一つは第 2 の仕切りを隣接して配置し、上記第 1 と第 2 の仕切りは第 1 の軸に実質的に直交する第 2 の軸を画定し、少なくとも 2 対の電極が第 1 と第 2 の軸を横切って配置される、溶液の分子を分離するための装置。

【請求項 12】

第 2 の軸の仕切りは膜でも分離されることを特徴とする請求項 11 に記載の装置。

【請求項 13】

第 2 の軸の第 2 の仕切りが、取り外し自在の不透水性バリアにより第 1 の軸の第 1 の仕

50

切りから分離されることを特徴とする請求項 1 1 又は請求項 1 2 に記載の装置。

【請求項 1 4】

第 2 の軸は、第 1 の軸の第 1 の仕切りに隣接して配置される複数の第 2 の仕切りを含むことを特徴とする請求項 1 1、1 2、又は 1 3 のうちいずれか一つに記載の装置。

【請求項 1 5】

第 1 の軸の複数の第 1 の仕切りは第 1 の仕切りを隣接して配置し複数の第 2 の軸を設けることを特徴とする請求項 1 1 ~ 1 4 のうちのいずれか一つに記載の装置。

【請求項 1 6】

第 1 の軸の平行に配置され追加の分離の軸を設ける追加的な仕切りを、更に含むことを特徴とする請求項 1 1 ~ 1 5 のうちのいずれか一つに記載の装置。

10

【請求項 1 7】

基板上に配置のためのカバーを更に含むことを特徴とする請求項 1 1 ~ 1 6 のうちのいずれか一つに記載の装置。

【請求項 1 8】

カバーが、電極の対と契合し電氣的接続を設けるための手段を含むことを特徴とする請求項 1 7 に記載の装置。

【請求項 1 9】

電極の対がカバー上に設けられ、基板上に設けられた個々の仕切りの中に伸展することを特徴とする請求項 1 7 に記載の装置。

【請求項 2 0】

流体の入口と出口のチャンネルを更に含むことを特徴とする請求項 1 1 ~ 1 9 のうちのいずれか一つに記載の装置。

20

【請求項 2 1】

電流を電極の対に供給し装置に電場を印加するための手段を更に含むことを特徴とする請求項 1 1 ~ 2 0 のうちのいずれか一つに記載の装置。

【請求項 2 2】

電流を供給する手段は選択的に制御可能であることを特徴とする請求項 2 1 に記載の装置。

【請求項 2 3】

第 1 の軸に沿って配置された複数の第 1 の流体仕切りを画定する基板を含み、
第 1 の仕切りのうち少なくとも一つは第 2 の仕切りを隣接して配置し、上記第 1 と第 2 の仕切りは第 1 の軸に実質的に直交する第 2 の軸を画定し、
第 1 の軸に沿う第 1 の仕切りは、第 1 の仕切りを分離する pH 膜を受け留める手段を間に有し、
更に、第 1 と第 2 の軸の夫々に沿って配置される少なくとも 2 つの電極の対を受け留める手段を含む、
溶液の分子を分離するための装置。

30

【請求項 2 4】

第 2 の軸の仕切りの間に配置される膜を受け留める手段を更に含むことを特徴とする請求項 2 3 に記載の装置。

40

【請求項 2 5】

膜を受け留める手段が、膜を保持する取り外し自在のカートリッジを受け留めるための手段を含むことを特徴とする請求項 2 4 に記載の装置。

【請求項 2 6】

膜を保持し、膜を受け留めるための手段内部に配置される一つ又は複数の取り外し自在のカートリッジを更に含むことを特徴とする請求項 2 3、2 4 又は 2 5 のうちのいずれか一つに記載の装置。

【請求項 2 7】

膜を受け留めるための手段内部で受け留められる適切な次元の一つ又は複数の不透水性バリアを更に含むことを特徴とする請求項 2 3 ~ 2 6 のうちのいずれか一つに記載の装置

50

。

【請求項 28】

基板上に配置のためのカバーを更に含むことを特徴とする請求項 23 ~ 27 のうちのいずれか一つに記載の装置。

【請求項 29】

溶液の分子を分離するための装置で利用するカートリッジであって、

アパーチャを画定するフレームを含み、

上記アパーチャは膜を内部に有し、フレームは更にカートリッジを操作する操作部位を含む、カートリッジ。

【請求項 30】

フレームは 2 つの協働部分を含み、該協働部分は利用時に間に膜を保持することを特徴とする請求項 29 に記載の装置。

【請求項 31】

フレームが、第 2 の膜を内部に有する第 2 のアパーチャを更に画定することを特徴とする請求項 29 又は請求項 30 に記載のカートリッジ。

【請求項 32】

流体の浸透から膜の縁をシールするためのポリマーの又はエラストマーのシール部を更に含むことを特徴とする請求項 29、30、又は 31 のうちのいずれか一つに記載のカートリッジ。

【請求項 33】

第 1 の軸に沿って配置された複数の第 1 の流体仕切りを画定する基板であって、第 1 の仕切りは pH 膜で分離されて pH 勾配を形成し、第 1 の仕切りのうち少なくとも一つは第 2 の仕切りを隣接して配置し、上記第 1 と第 2 の仕切りは第 1 の軸に実質的に直交する第 2 の軸を画定し、少なくとも 2 対の電極が第 1 と第 2 の軸を横切って配置される、基板と、

所与の順序で電流を電極の対に選択的に加える制御手段と、

分離されるべき分子を含む液体をチャンバに注入し除去するための手段とを含む溶液から分子を分離するための自動化システム。

【請求項 34】

所与の順序で電流を少なくとも 2 対の電極に選択的に加えることを制御する実行コードを含む、溶液から分子を自動的に分離するためのコンピュータプログラム。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、溶液中の分子、特に生体高分子を分離するための方法及び装置に関する。本発明のある形態は、溶液中の分子の自動分離のためのシステムに関する。本発明の更なる形態は、溶液中の分子の分離のためのコンピュータプログラムに関する。

【0002】

多くの目的のために、混合された分子から特定の分子を分離できることは望ましい。例えば、細胞抽出物からのプロテイン又は他の生体高分子の精製、汚染物質からの合成化学薬品の精製、又は、混合された化学薬品の分離、分子の分離などである。更に、分子の混合体の成分の分析若しくは同定のために、分子を分離することも望まれる。特に、成長する科学であるプロテオミクスでは、細胞のプロテオーム（即ち、特定の細胞により生成されたプロテインの完全な補体）内部の多数の分子の分離若しくは同定が求められる。

【0003】

従来、そのような分離若しくは精製は、電気泳動によって行われてきた。即ち、分子に担持される電荷による分子の分離である。分子に担持される電荷は、電気泳動が行われる状況を変動させることによって変化しうる。即ち、分離は、分離される分子のタイプに依存して、“微調整”され得る。多くのタイプの電気泳動は一般的に、アガロース又はポリ

10

20

30

40

50

アクリルアミドゲルなどの固体媒体内部で行われる。この方法は比較的簡素で有効であるが、分離された分子を固体媒体から回収するという分離に続く追加のステップが求められる。これらの追加のステップは時間が掛かる可能性があり、追加の試薬の利用が求められる。追加の操作のステップはどんなものでも、回収する分子を損傷するリスクを増加し得る。

【0004】

従って、或るタイプの電気泳動は液体支持体で行われるのが好ましい。特に、等電点電気泳動 (IEF) の技術は、例えば米国特許第 4971670 号で記されるように、液体媒体で行われるのが好ましい。

【0005】

液体媒体内の IEF の間、異なる pH の一連の目盛り膜を利用して媒体に沿って pH 勾配が確立される。その膜は媒体を pH 勾配を形成する一連の仕分けに区分する。電場が液体媒体に加えられると、媒体内の荷電された分子が媒体を介して移動し膜を通過して分子の等電点に到る。このように、分子の混合体は、利用される状況下での荷電に従って分離され得る。

【0006】

しかしながら、多数の種々の分子が、他の特性では異なるにも拘わらず、同じ等電点を共有している。従って、従来 of IEF 技術で分離された単体の画分は、依然分子の混合体を含む。この混合体から研究者が単一の分子種を分離したいのであれば、混合体から所望の種を同定し分離するという追加の処理及び精製のステップ (例えば、親和力結合、沈殿など) を行うことが必要である。そうすると、固体媒体での IEF と比較した場合の液体媒体での IEF の主要な利点の一つが、失われることになる。一方、対象の分子を分子するため固体媒体上で 2 次元 (2-D) 電気泳動を実施することができる。しかしながら、ここでも、固体媒体から分離された分子を回収する追加の処理と精製が必要であり、結局所望の分子種を分離するには時間と資源の増加が必要である。

【0007】

公知の IEF 技術のこれら又は他の不利点を解消し緩和することが、本発明の実施形態の目的の一つである。特に、分子の多次元分離を液体媒体内で実施させる方法若しくは装置を提供することが本発明の実施形態の目的である。

【0008】

本発明の第 1 の実施形態によると、

第 1 の流体仕切りの列で分離される分子を含む溶媒を充填するステップであって、第 1 の仕切りは第 1 の軸に沿って pH 膜により分離されて流体仕切りの列に沿う pH 勾配を形成し、上記第 1 の仕切りの少なくとも一つが第 2 の仕切りに隣接し、上記第 1 と第 2 の仕切りは第 1 の軸に実質的に垂直な第 2 の軸を形成する、ステップと、

流体仕切りの第 1 の軸に沿って溶媒に第 1 の電場を印加し、溶媒内の荷電された分子を第 1 の軸に沿ってそれらの等電点にまで移動させるステップと、

分子の第 2 の特性に従って、第 2 の軸に沿って溶媒に第 2 の電場を印加し、溶媒内の荷電された分子を第 2 の軸に沿ってそれらの等電点にまで移動させるステップとを含む液体媒体の分子を分離するための方法が提示される。

【0009】

従って、本発明の方法は、溶液に残余しつつ 2 つの次元に関して分子を分離させる。このことは、分離された分子の後続の処理及び回収を大きく簡素化するのであり、それと同様に第 2 の分離も簡素化する。この第 2 の分離は、中間の固体媒体のステップを介するのではなく、第 1 の次元で分離された際の流体上で直接に実行され得る。

【0010】

第 2 の次元を利用することの利点は、第 1 の次元が複数の充填ウエルに渡って平行に実施されるときに追加のサンプルを処理することなく第 2 の次元が凝縮する効果を可能にすることである。低い存在量のプロテインや他の分子を検出する際に、このことは特に重要である。更に、第 2 の次元は凝縮デバイスとして利用され得る。例えば、複数のサンプル

10

20

30

40

50

に特定のpH範囲を与えるようにして、第1の次元は平行に行われる。複数の同一のウエルの内容物は、第1の次元での同じpH膜の間で第2の次元で集束することによって、より小さい体積に凝縮される。

【0011】

第2の電場は、第1の電場に続いて又は同時に印加されてもよい。第1の分離が第2の分離の前に完了すれば本発明の方法の分解能が増大するという点では、第2の電場は続いて印可されるのが好ましい。

【0012】

第2の軸に沿う仕切りが膜により分離されることが好ましい。膜はpH膜であってもよく、このとき第2のpH勾配を形成する。例えば、これは、特定のpI範囲内でのよりよい分解能の分離をもたらすのに利用され得る。一方、第2の軸に沿う膜は、流体の特定の成分を捕縛するために、親和性膜、抗体膜などでもよい。例えば、膜は、流体からバインドプロテイン又は核酸であることが望ましい。方法は、流体をかき回し若しくは混合し膜への流体のバインドを促進するステップを含む。仕切りが膜によって分離されていないところでは、電場はカソード若しくはアノードへの移動に従って分子を分離する。

10

【0013】

第2の軸は、第1の仕切りに近接する一つ又は複数の第2の仕切りにより形成されてもよい。一般に、第2の軸に仕切りが増えると、流体からの分子の分解能が大きくなる。

【0014】

一つ又は複数の第1の仕切りが、第2の仕切りに近接して配置され、分離が行われ得る一つ又は複数の第2の軸を形成してもよい。複数の第2の軸は、多数の分子種が分離されるべき場合、若しくは利用者が対象の分子が第1の軸に沿うどの仕切りに分離されるのかが予めわからない場合に、有用である。

20

【0015】

第2の軸に沿った第2の仕切りは、不透水性バリアによって第1の軸の第1の仕切りから最初に分離されてもよい。本発明の方法は、第2の電場を印加する前に、その不透水性バリアを除去するステップを含むでもよい。本発明の方法は、不透水性バリアを膜に置き換えるステップを更に含んでもよい。本発明の方法は、不透水性バリアによって第2の軸の第2の仕切りから第1の軸に沿う第1の仕切りを分離するステップを更に含んでもよい。

30

【0016】

本発明の方法は、第2の軸に実質的に直交する第3の軸全体の溶液に電場を印加するステップを更に含んでもよい。このことにより、所望の更なる分離を行うことができる。第3の軸は第1の軸と同じ軸でもよい。若しくは第3の軸は第1の軸に平行でもよい。若しくは第3の軸は第1の軸に垂直であってもよい。特定の構成は、利用者の選択だけでなく、実行される分離の性質により決められる。

【0017】

本発明の方法は、一つ又は複数の分離された画分を一つ又は複数の仕切りから回収するステップを更に含んでもよい。回収するステップは、自動でも手動でもよい。ステップは、回収した画分を分析し若しくは試験してその特性を判定することを更に含んでもよい。本発明では第2の分離が溶液内で実施されるので、回収するステップは比較的簡単であり、仕切りから流体サンプルを単に取得することを含んでもよい。

40

【0018】

本発明の第2の実施形態によると、第1の軸に沿って配置された複数の第1の流体仕切りを画定する基板を含み、第1の仕切りはpH膜で分離されてpH勾配を形成し、第1の仕切りのうち少なくとも一つは第2の仕切りを隣接して配置し、上記第1と第2の仕切りは第1の軸に実質的に直交する第2の軸を画定し、少なくとも2対の電極が第1と第2の軸を横切って配置される、溶液の分子を分離するための装置が提示される。

【0019】

第2の軸の仕切りは、膜でも分離されてもよい。これらはpH膜や親和性膜などであれ

50

ばよい。

【0020】

第2の軸の第2の仕切りは、取り外し自在の不透水性バリアにより第1の軸の第1の仕切りから分離されてもよい。

【0021】

第2の軸は、第1の軸の第1の仕切りに隣接して配置される一つ又は複数の第2の仕切りを含んでもよい。

【0022】

第1の軸の複数の第1の仕切りは、第1の仕切りを隣接して配置し、複数の第2の軸を設けてもよい。対応する複数の電極の対も設けられる。

10

【0023】

本発明の装置は、第1の軸の平行に配置され追加の分離の軸を設ける追加的な仕切りを、更にも含んでもよい。これらの追加的な軸は、第1の又は第2の軸の仕切りと流体連絡してもよく、又はそれらから分離してもよく、更に同じ基板上に配置され得る。このことにより、互いに干渉することなく同じ基板上での多数の分離が可能になる。

【0024】

本発明の装置は、基板上に配置のためのカバーを更にも含んでもよい。カバーは、電極の対と契合し電氣的接続を設けるための手段を含んでもよい。一方で、電極の対がカバー上に設けられ、基板上に設けられた個々の仕切りの中に伸展してもよい。

【0025】

本発明の装置は、流体の入口と出口のチャンネル若しくは貯蔵部を更にも含むことが好ましい。これらは、基板のみ若しくはカバーのみ、又はそれらの組み合わせで、画定され得る。

20

【0026】

本発明の装置は、電流を電極の対に供給し装置に電場を印加するための手段を更にも含んでもよい。電流を供給する手段は、選択的に制御可能でありよって選択的に電流を供給し、分子の分離の十分な制御を可能にする。制御可能な電流を供給する手段はプログラム可能でもあり、所定の順序又はパターンで電流を設定する。

【0027】

本発明の更なる実施形態によると、第1の軸に沿って配置された複数の第1の流体仕切りを画定する基板を含み、第1の仕切りのうち少なくとも一つは第2の仕切りを隣接して配置し、上記第1と第2の仕切りは第1の軸に実質的に直交する第2の軸を画定し、第1の軸に沿う第1の仕切りは、第1の仕切りを分離するpH膜を受け留める手段を間に有し、更に、第1と第2の軸の夫々に沿って配置される少なくとも2つの電極の対を受け留める手段を含む、溶液の分子を分離するための装置を提示する。

30

【0028】

本発明の装置は、第2の軸の仕切りの間に配置される膜を受け留める手段を更にも含んでもよい。

【0029】

膜を受け留める手段が、膜を保持する取り外し自在のカートリッジを受け留めるための手段を含んでもよい。本発明の装置は、膜を保持し、膜を受け留めるための手段内部に配置される一つ又は複数の取り外し自在のカートリッジを更にも含んでもよい。

40

【0030】

本発明の装置は、膜を受け留めるための手段内部で受け留められる適切な次元の一つ又は複数の不透水性バリアを更にも含んでもよい。

【0031】

本発明の装置は、基板上に配置のためのカバーを更にも含んでもよい。

【0032】

本発明に係る装置により、膜が比較的素早く且つ容易に除去され且つ置換され得る。本発明の好適な実施形態では、膜のカートリッジの形態が特に便利である。このことは、装

50

置が、種々の用途に対して、例えば、第1の軸のpH勾配全体のpH値の範囲を変えることに対して、素早く再構成され得るということの意味する。

【0033】

本発明の装置は、電極を受け留める手段の少なくとも一つの内部にて受け留める一つ又は複数の電極の対を更に含んでもよい。電場を第2の軸に沿って印加するように再配置される単一の電極の対が設けられてもよい。但し、少なくとも2つの電極対が設けられることが好ましい。

【0034】

本発明の更なる実施形態によると、溶液の分子を分離するための装置で利用するカートリッジであって、アパーチャを画定するフレームを含み、上記アパーチャは膜を内部に有し、フレームは更にカートリッジを操作する操作部位を含む、カートリッジが提示される。

10

【0035】

フレームは2つの協働部分を含み、該協働部分は利用時に間に膜を保持することが好ましい。

【0036】

フレームが、第2の膜を内部に有する第2のアパーチャを更に画定してもよい。このことにより、使用済みの膜を取り替えることなくカートリッジの素早い再利用が可能になり、若しくは2つの膜が異なる特性を有する場合に分離装置の素早い再配置が可能になる。

【0037】

フレームはプラスチック部材からなることが好ましい。

20

【0038】

膜は、ポリアクリルアミドを含むことが好ましい。そのような膜はIEFでの利用のために知られており、公知の技術によると所望の値で固定されたpHを有する。一方で、膜は、膜の所望の特性に依存するが他のどんな適切な部材でもよく、例えば、ナイロン、セルロース、ニトロ-セルロースなどが利用され得る。膜は、膜表面上に結合する付加的な化学基(モイエティ)を更に含んでもよい。これらは膜の特定の性質を増進するため、又は膜の所望の分子の結合を高めるために選択され得る。

【0039】

カートリッジは、流体の浸透から膜の縁をシールするためのポリマーの又はエラストマーのシール部を更に含んでもよい。

30

【0040】

本発明の更なる実施形態によると、第1の軸に沿って配置された複数の第1の流体仕切りを画定する基板であって、第1の仕切りはpH膜で分離されてpH勾配を形成し、第1の仕切りのうち少なくとも一つは第2の仕切りを隣接して配置し、上記第1と第2の仕切りは第1の軸に実質的に直交する第2の軸を画定し、少なくとも2対の電極が第1と第2の軸を横切って配置される、基板と、所与の順序で電流を電極の対に選択的に加える制御手段と、分離されるべき分子を含む液体をチャンバに注入し除去するための手段と、を含む溶液から分子を分離するための自動化システムが、提示される。

【0041】

電流を選択的に加えるための制御手段は、一つ又は複数の電気スイッチを含む電源でもよい。制御手段は、適切なコンピュータプログラムを実行するコンピュータプロセッサを更に含んでもよい。例えば、加えられるべき電流の特定の所望の期間及び方向が、プログラムされてもよい。電流の期間及び方向は、実施される所望の分離に拠って変化し得る。コンピュータプロセッサは、本発明のコンピュータプロセッサを実行するために特に設計されてもよいし、一般用途のコンピュータが利用されてもよい。

40

【0042】

液体を注入し除去するための手段は、流体貯蔵部やチャンネルなどを含んでもよく、適当な流体ポンプを伴ってもよい。ポンプも、適切なコンピュータプログラムを実行するコンピュータプロセッサによって制御され、実施される分離に拠って液体が適切な時間に注入

50

され除去されるのが好ましい。

【0043】

システムの膜が取り外し自在のカートリッジの形態であって、膜が必要に応じて置換されたり除去されたりするのが好ましい。この場合、システムは、システムからカートリッジを除去したり挿入したりする自動的手段を更に含んでもよい。この手段は、適切なコンピュータプログラムを実行するコンピュータプロセッサにより制御されるロボットアームなどであればよい。ロボットアームは、液体をシステムに注入し且つ/又は除去するためにも、用いられ得る。

【0044】

本発明の更なる実施形態によると、所与の順序で電流を少なくとも2対の電極に選択的に加えることを制御する実行コードを含む、溶液から分子を自動的に分離するためのコンピュータプログラムが、提示される。

10

【0045】

本発明の更なる実施形態によると、コンピュータ読み取り可能なキャリア媒体に記録された実行コードを含むコンピュータプログラムプロダクトであって、実行コードが、所与の順序で電流を少なくとも2対の電極に選択的に加えることを制御する実行命令を含む、コンピュータプログラムプロダクトが、提示される。

【0046】

まず、図1aと図1bを参照すると、これらは本発明の第1の実施形態に係る溶液の分子を分離するための装置10のカバー36(図1a)と基板(図1b)を示す。

20

【0047】

図示する基板12は、4つの同一の十字形分離チャンバ14a, b, c, dを有し、そのうちの一つにつき詳細に説明する。但し、その説明は全ての分離チャンバに当てはまることである。個々の分離チャンバ14は、第1と第2の垂直のチャンバ軸16、18に沿う複数の仕切り若しくは小胞から形成される。5つの分離仕切り20、22、24、26、28が、軸16に沿って形成され、3つの仕切り30、24、32が軸18に沿って形成される。

【0048】

仕切りは相互連結し、連続的な流体流経路を与える。個々の仕切りの対の間の共通部は、狭いカートリッジレセプタクル34を形成し、該レセプタクル34は、後で記すように、カートリッジを受けて保持するように配置される。

30

【0049】

カバー36は、基板12に適合するように形作られて採寸され、一对のアパーチャ38を含む。該アパーチャ38は、基板12上に形成される対応する突出部40と協働しカバーと基板を整列させて配置し保持する。カバー36は更に、カバー36が基板12と整列した際に電極42が基板12の仕切り20、24、28、30、32の中に伸展するように形成された複数の電極42を含む。明確化のために、電極42aは、点線で示されているように、仕切り20aの中に伸展する。装置が組み立てられる際、電極42は、中央仕切り24だけでなく、2つの軸16、18のいずれの端部にも存在する。

【0050】

カバーが基板上に嵌め込まれるときに仕切りを分離している狭いカートリッジレセプタクル34と整列する複数のスロット44を、カバー36は更に含む。図2に最も良く示されるように、カバーが適所にあるとき、これらのスロットによりカートリッジはスロットを介してカートリッジレセプタクル34の中に挿入され得る。

40

【0051】

図2は、組み立てられた状態の装置10を示し、ここでカバー36は基板12の上に配置されている。カートリッジレセプタクル34と整列しているスロット44の配置が見られるのと同様に、電極42が仕切り20、24、28、30、32と整列するのが明確に見られる。図2は、スロット44の一つにカートリッジは配置されカートリッジレセプタクル34の中に伸展する様子も示す。勿論、利用時には、一つの若しくは複数のスロット

50

44とレセプタクル34がカートリッジ48を中に配置してもよいし、スロット44とレセプタクル34がカートリッジ48を中に配置しなくてもよい。カートリッジ48の目的及び正確な形態は、装置が用いられる利用内容に依存する。しかしながら、以下に示すように、概略、カートリッジ48は、隣り合う仕切りの間の連通を防ぐための固体バリアと、分離手順の部品を構成する浸透膜と、いずれから選ばれてもよい。図示する実施形態ではスロット44は選択されたレセプタクル34に隣接して存在するのみであるが、スロット44の数及び配置は変動し得るのであり、より少ない若しくはより多いカートリッジレセプタクル34に隣接してスロットを設けてもよい、ということは当業者には明白である。

【0052】

図3は、図2の装置の十字形チャンバ14の一つの拡大図を示し、対の電極42の一つへの電力供給接続のアタッチメント46を示す。

【0053】

図4と図5は、装置に挿入されるカートリッジ48を含む基板12とカバー36の更なる図を示す。カートリッジ48は、基板12のカートリッジレセプタクル34の中に当て嵌まるように寸法取りされ、その下方部位にてポリアクリルアミド膜52が装着される環状アパーチャ50を含み、該ポリアクリルアミド膜52はある種の分子を透過するものである。利用時には、カートリッジ48はレセプタクル34の中に完全に挿入され、隣接する仕切りの間での連通が膜52以外でもブロックされる。膜52の性質及び機能の更なる説明は以下に示す。

【0054】

利用例により、図1から図7の装置の操作の簡単な要約を記す。装置は、分子の選択された特性に従って、溶液から分子を分離することを意図されている。装置は、装置の仕切りの軸の各々に渡って、2次元以上にて分子を分離する。第1の次元での分離は、予備の等電点膜電気泳動技術に基づく。これは、ポリアクリルアミドゲルと共有結合しゲルのバッファリングpHを所望の値で固定する、という(Immobiline(登録商標)、Pharmaciaなどの)アクリルバッファの能力に基づくものである。膜は、仕切りを互いに分離する度盛りされたpH列の仕切りの間に配置される。勾配のあるpHの緩衝剤処理されたポリアクリルアミド膜に電場が加えられると、それらは“pI選択”となり、プロテインなどの両向性の種が(遠ざかるのではなく)等電点に向かって動けるようになる。プロテインマクロイオンは貯蔵部に蓄えられ、化学バッファシステム全体に渡って加えられる電場に連続して晒される。チャンバの形状は、電場がチャンバ全体で発生し溶液の中に存在する荷電された種の移動フラックスを形成するように、設計される。結局、サンプル(若しくは選択されたサンプルの混合体)は、精製されたサンプル内のプロテインのpI値を包含するpIを有する(仕切りのそれぞれの側面にある)2つの膜で分離される仕切りに捕らえられる。従って、連続的な滴定処理により、非等電でも異なるpI値を有していても、他の全ての不純物は仕切りを離れるように強いられる。集束の期間の後、対象の一つのサンプルのみ若しくはサンプルの混合体を含む仕切りが残される。分離の第2の次元が加えられる。第2の次元では、等電集束のために利用された膜は、別のタイプの膜に入れ替えられる。例えば、Biodyne(登録商標)(Pall Corporation)、Immunodyne(登録商標)、Nylon若しくはニトロセルロースなどの膜が、特定の特性を有する分子をバインドするのに全て利用され得る。特定の応用例のためにどの膜が選択されるべきか当業者には明白である。抗体若しくは基質が、所望の分子を固定するために膜に付着されてもよい。膜の代わりに、酵素固定ビーズのようなビーズが用いられてもよく、装置内のカートリッジの中のキャビティの中に組み込まれてもよい。

【0055】

第2の次元での分離を果たすため、仕切りの第2の軸全体に電場が加えられ得る。このことを為すため、電極への電気接続が物理的に再構成されてもよい。若しくはスイッチングメカニズムが、電極の対の間で電気供給をスイッチするように設けられてもよい。スイ

10

20

30

40

50

ツチングメカニズムは、適切にプログラムされた計算デバイスの制御の下にあってもよい。さらに、第2の分離は、溶液の分子の膜の中への接触を助長する装置の振動により促進され若しくは果たされ得る。

【0056】

本発明の操作のバックグラウンドを示すために、単一の次元で分子を分離せしめる先行技術の装置の利用例を以下に示す。それに続いて、本発明の装置の利用例を記す。例は、697細胞ライン(ATCC D5 MZ ACC 42)細胞抽出物からのプロテインの分別を示す。

【0057】

等電膜の準備

先行技術の装置の概略レイアウトを図6に示す。図6は、上記に示した個々の膜のような異なるpH値の膜で分離される単一軸の仕切り1~6を示す。膜は、ファイバグラスWhatman GF/F 4.7cmフィルタを利用して製造される。これらの膜のpHは配合表を利用して決定される。ここで例として興味があるのは、pH範囲4.75、5.00、5.25、5.50、5.75、6.00、6.50の膜を製造することである。従って利用される配合表は以下の通りである。

【0058】

【表1】

| pH | 利用される固定pKバッファ(μl) | | | | | | | |
|------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|----------|--------|
| | 3.6 | 4.6 | 6.2 | 7.0 | 8.5 | 9.3 | 1 M トリ塩基 | 1 M 酢酸 |
| 4.75 | 332 | 192 | 253 | 49 | 0 | 145 | 55 | 0 |
| 5.00 | 310 | 229 | 235 | 65 | 0 | 190 | 47 | 0 |
| 5.25 | 289 | 267 | 217 | 80 | 0 | 235 | 40 | 0 |
| 5.50 | 268 | 305 | 199 | 95 | 0 | 280 | 32 | 0 |
| 5.75 | 246 | 343 | 181 | 111 | 0 | 325 | 24 | 0 |
| 6.00 | 225 | 381 | 163 | 126 | 0 | 371 | 16 | 0 |
| 6.50 | 182 | 456 | 126 | 157 | 0 | 461 | 0 | 0 |

【0059】

これらの表は特定の個々のpHの2膜を作ることを基にしている。

【0060】

膜は、6つの分離小胞で準備される。6つの小胞の各々に対して、消イオンされた水(ddH₂O) 2mlを加える。これらに対して、表に示されるアクリルアミド(固定)バッファ体積分が加えられる。ddH₂Oを利用して全ての小胞を6mlの体積までにする。この時点で、線形勾配が形成されていることを確認するためpHメータを用いて溶液の実際のpHが計測されねばならない。pHの差異は、少量の酸や基本固定を加えることにより修正されるが、しかしながらこのことは必須ではなくできれば回避すべきである。pHは、テーブルに示された体積を利用して1Mトリ塩基又は1M酢酸を伴う6.5+/

10

20

30

40

50

- 0.2に調整され、よく混合される。3.333 mlのアクリルアミド/ビスのストック(30% T)(28.8 gアクリルアミド+1.2 gビス)を加える。ddH₂Oを利用して小胞を10 mlの体積までにし、よく混ぜる。

【0061】

この段階で、個々のpHの溶液に対して一度に以下のステップが為されねばならない。5 µlのTEMED、10 µlの新鮮なAPS(400 mg/ml)を加え、しばらく混ぜる。これらの成分が加えられた後、以下のように、6分以内に膜が準備されるべきである。

【0062】

3 mlの溶液をモールドブロック内の2つのウエルの各々に配布する。或る角度でWhatman GF/F, 4.7 cmフィルタペーパーを下げ毛細現象により飽和させることにより、Whatman GF/F, 4.7 cmフィルタペーパーを個々のウエルに注意深く注入する。飽和すれば、ウエルの中にペーパーを下げ、手袋をした指で適所の中に柔らかく押さえる。フィルタはウエルの中に設定され、その縁が完全に内部に且つ均等に集中しなければならない。フィルタペーパーの各々全体に、追加の2 mlの溶液をピペットで移す。過剰な溶液を避けるべく、2つの膜の各々を覆ってグラスカバーをゆっくり下げる。気泡は膜に穴を生じるので気泡を捕まえないようにする。

【0063】

20分間膜を放置し、50 のオープンに1時間入れるか、重合させる室温で一晩置いておく。

【0064】

完全に重合したあと、膜はウエルから離され(膜を十分に覆える)30%エタノールの中に配置される。これらのものは4 にて一月まで蓄えられ得る。

【0065】

膜が利用されるべきとき、膜は幅約8 mm長さ約8 mmの一連の矩形の膜に切られる。これらは装置内に配置され、集束のステップの間の漏れを回避するため個々のスロットの中に小ぎれいに嵌められる。ここで示される例の両方が、膜カートリッジによるのではなく、スロットの中に直接配置される膜を利用した。しかしながら、便利さという理由で、更には長い集束の期間に膜が装置内で直接利用される位置でリークが生じる危険は少ないという理由で、ここに記すカートリッジを利用するのが好ましい。

【0066】

集束の準備のセットアップ

構成は図6に概略示される。pH膜は仕切りの間の鉛直線で示され、正電極及び負電極が示される。全ての仕切りは膜で分けられている。集束のために要求されるサンプルは、仕切り1~6内に配置され、他の全てのウエル(符号無し)はRabilloudバッファで満たされる。

【0067】

サンプル準備

サンプル(697細胞ライン(ATCC DS MZ ACC42)細胞10 mg/ml)は、1% DTTを含むRabilloudバッファで1:4に希釈される。この希釈液250 µlがウエル1~6の中にピペットで移され、正電極と負電極が配置される残余のウエル(符号無し)は、Rabilloudバッファ250 µlで充填される。

【0068】

集束

集束手順のため、マルチホール装置(Amersham Biosciences)を利用した。マルチホール装置上の冷却は8 に設定される。集束のプログラムは以下の通りである。条件4時間、500 V、2 mA、2 W;一晩、1000 V、2 mA、2 W。トータル時間15時間。

【0069】

結果の分析

10

20

30

40

50

結果は、乾燥 I P G ゲル p H 4 - 7 で運ばれ、P h a r m a c i a B i o t e c h 銀ステインキット (T C A 固定ステップを含むプロトコル) を利用して着色された。開始部材 (6 9 7 細胞ライン (A T C C D S M Z A C C 4 2) 細胞 1 0 m g / m l) は、ゲル上で明確に読み取られるように、R a b i l l o u d バッファで 1 : 4 に希釈される。ゲルは図 7 で示され、明瞭な p H 範囲への 6 9 7 細胞ライン (A T C C D S M Z A C C 4 2) 細胞抽出物のはっきりした分離を示す。右手のレーンは、全体の細胞抽出物で行われた。

【 0 0 7 0 】

例 2

本発明の実施形態に係る、2つの次元の分子分離の例を以下に示す。膜は、(固定 p K バッファを利用して) 既述の方法により準備される。以下の表に従って作られる p H 4 . 0 0、5 . 2 5、5 . 3 5、5 . 4 5、5 . 5 5、及び 7 . 0 0 の膜を利用した。

【 0 0 7 1 】

【表 2】

| | 利用される固定 p K バッファ (μ l) | | | | | | | |
|------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|----------|--------|
| p H | 3.6 | 4.6 | 6.2 | 7.0 | 8.5 | 9.3 | 1 M トリ塩基 | 1 M 酢酸 |
| 4.00 | 276 | 103 | 59 | 0 | 0 | 170 | 42 | 0 |
| 5.25 | 300 | 225 | 124 | 0 | 0 | 372 | 24 | 0 |
| 5.35 | 302 | 235 | 130 | 0 | 0 | 388 | 22 | 0 |
| 5.45 | 304 | 244 | 135 | 0 | 0 | 420 | 21 | 0 |
| 5.55 | 306 | 254 | 140 | 0 | 0 | 420 | 19 | 0 |
| 7.00 | 139 | 532 | 90 | 188 | 0 | 551 | 0 | 0 |

【 0 0 7 2 】

これらの表は特定の個々の p H の 2 膜を作ることを基にしている。

【 0 0 7 3 】

装置の概略のレイアウトは図 8 に示される。装置は、2つの交差軸で配置される、数字 1 ~ 7 の 7 つの仕切りを含む。仕切り 1 ~ 3 は、図の水平方向に第 1 の軸を形成し、仕切り 4、5、2、6、及び 7 は縦方向に第 2 の軸を形成する。個々の分離のステップは、装置の異なる構成により行われる。第 1 のステップは図 8 の左手部に示され、第 2 の軸を分離するように配置された分離ブロックにより第 1 の軸に沿って行われ、第 2 のステップは図 8 の右手部に示され、第 1 の軸を分離するように配置された分離ブロックにより第 2 の軸に沿って行われる。

【 0 0 7 4 】

全ての 7 つの仕切りは、1時間で、D T T を含む R a b i l l o u d バッファ内で平衡に達する。この時間後、第 1 の次元に進む。

【 0 0 7 5 】

第 1 の次元

分離ブロックは図 8 の左手部に示されるように適所に配置され、正電極はウエル 1 であ

り負電極はウエル3である。更に、300 μ lの開始部材がウエル2に配置され、他の全てのウエルはRabilloodバッファでの充填が維持される。第1の次元のためのプログラムは次の通りである。200V、2mA、2W、10分；500V、2mA、2W、2時間。集束後、ウエル1、2、3内のサンプルが除去され貯められる。第2の次元に進む。

【0076】

第2の次元

分離ブロックは第1の図に示される位置から除去され、図8の右手部に示されるように置き換えられる。ウエル1及び3は、300 μ lのRabilloodバッファで再充填され、ウエル2は第1の分離から分離された部材で再充填され、ウエル5及び6のRabilloodバッファは除去され分離された部材で置き換えられる。正電極はウエル4に配置され負電極はウエル7に配置される。第2の次元のためのプログラムは次の通りである。500V、2mA、2W、最小2時間；1000V、2mA、2W、2時間。サンプルが除去され貯められる。サンプルは乾燥IPGゲルpH4-7で運ばれ得る。

10

【0077】

結果の視覚化

再水和

- a) ゲルのカソード側をマークする。
- b) 数滴の水で清潔な厚手のガラス板を濡らし、ゲルを上にして板上にゲルを配置する。
- c) 清潔なゴムローラを利用して、ゲルをロールし捕捉された気泡を除去する。
- d) U字形フレームのガスケットもカットオフコーナを覆って密閉し更に漏れを回避すべくクランプを正確に装着するように特に注意しつつ、ゲルをカセット内に装着する。
- e) 所望の量のRabilloodバッファを充填し、2時間の再水和に委ねる。

20

【0078】

平衡

- a) この後、ゲルを除去し、ゲルと冷却プレートとの間に気泡が捕捉されていないことを確認して、集束に備えてゲルをマルチホーレに設置する。
- b) フィルタペーパーで静かに押さえて過剰な液体を除去する。
- d) RabilloodバッファまたはddH20で湿らせた2枚のフィルタストリップを対向側のゲルに沿って配置し、更にフィルタペーパーで上から静かに押さえて過剰なバッファを除去する。鋭利なはさみを使って、短い端部のゲルを越えて突起するストリップがあればそこをカットオフする。これらのストリップは、ゲルと電極の間の良好な電気接触を保証する。それらはスパークも回避し、ゲルからの塩イオンをストリップの中に移す。
- e) 少なくとも45分間、500V、5mA、5Wでゲルを平衡させる。

30

【0079】

サンプル搭載

サンプル塗布ピースを用いて、毛細作用により20 μ lのサンプルを吸収させる。相互に比例して乖離するゲルの右手長に沿うようにピースを配置する。収束プログラムは以下の通りである。

40

【0080】

【表3】

| 電圧 1 | 電圧 2 | 時 (時間) | アンペア (mA) | ワット (W) |
|------|------|--------|-----------|---------|
| 0 | 500 | 20 | 5 | 5 |
| 500 | 1000 | 2 | 5 | 5 |
| 1000 | 2000 | 3 | 5 | 5 |
| 2000 | 3500 | 0.5 | 5 | 5 |

50

【0081】

集束後、ゲルは、Pharmacia Biotech 銀ステインキットを利用して着色される。開始部材（697細胞ライン（ATCC DS MZ ACC42）細胞10mg/ml）は、IPGゲル上で良好な溶解を示すように、1：4に希釈された。図9の結果から見られるように、良好で明白な分離範囲を示し、図7に示す一つの次元で得られるものにまさる異なるpH範囲の2つのサンプル間での明確な分離が示されている。

【0082】

分離の結果の更なる分析を、2つの次元の電気泳動を利用して行った。697細胞ライン（ATCC DS MZ ACC42）プロテイン分離のサンプルは、（図8の）ウエル2及びウエル4から取られた。画分2から125 μ lで画分4から140 μ lである。サンプルは二つに分けられバッファで希釈され、各々のサンプルがpH5-6の2枚のIPGストリップを再水和した。これらの4枚のIPGストリップは、同じ基準の第1の次元の集束状況（表参照）の下に置かれ、4つの別途の12%SDS2-Dゲル上に載せられた。もう一度、4つのゲル全てが第2の次元のための同じプログラムを受ける。

【0083】

【表4】

| V開始 | V終了 | 時（時間） | ボルト時間積（Vh） |
|------|------|-------|------------|
| 0 | 300 | 0.01 | 1.5 |
| 300 | 300 | 3 | 900 |
| 300 | 3500 | 5 | 9500 |
| 3500 | 3500 | 20 | 70000 |
| | トータル | 28.01 | 80401.5 |

【0084】

サンプル毎の2つのゲルのうち、ひとつはBioRad Sypro Ruby（図10では“Sypro”）を利用して着色され、もう一つはBioRad Colloidal Coomassie Blue ステイン（図10では“CCB”）を利用して着色された。図10はゲルを示し、個々の点は細胞抽出物から分離されたプロテインを示す。

【0085】

2つのCCB着色を図11に再び示し、複数の分離スポットが個々のゲル上にマークされている。2つのCoomassie青着色ゲル（画分2：pH5.25-5.35からのものと、画分4：pH5.45-5.55からのもの）からの図11に示されるスポットが、取り上げられて分類された。それからサンプルが取り上げられ質量分析法により分析された。この結果は図12に示す。図中に示されるプロテインのリストは、質量分析法により確認された選択されたプロテインに対応し、これらは2つの画分に含まれる。個々のプロテインに対して計算されたpIは個々のプロテインが誘導されたサンプル画分の特定のpH境界に適合する、ということの結果が示す。

【0086】

中間的な処理や回収のステップを必要とすることなく溶液内のサンプルが2つ又はそれ以上の次元に関して分離され得る方法及び装置を、本発明が提供することがわかる。このことにより、利用者を巻き込むことなく、分子のより素早い分離ができる。

【0087】

図13a及び図13bは、本発明で利用され得る基板112、212の別の形態を示す。図13aで示される基板112は図1Bのもとの類似するものである。但し単一の十字形構成のみ存在する。図13bに示される基板212は、仕切りに関する3つの軸216、218、219が与えられているという点において、異なる。2つの軸218、219は互いに平行であり、第3の軸216に直交する。軸218は軸216に関して対称的に配置され、軸のいずれの側にも2つの仕切りがあるが、軸219は非対称であり、軸216に関して一つの側にはひとつの仕切りがあり軸216に関してもう一つの側には2つの

10

20

30

40

50

仕切りがある、ということもわかる。

【0088】

図14a、図14b及び図14cは、図1の装置で利用できるカートリッジ134、234、334の別の形態を示す。まず図14aを参照すると、カートリッジは、装置の基板及びカバー上に設けられたスロット及びカートリッジレセプタクルと協働するように形付けられ寸法取りされたプラスチックフレーム138を含む。フレーム138は、エラストマのオーリングを受けるように溝142付けられた環状アパーチャ140を画定し、そのオーリングは利用時にアパーチャ140全体で透水性膜(図示せず)の円板を保持する。カートリッジ134の上部144は空のままであり、隣接するカートリッジを互いに分離するためにカートリッジを逆さ向きにすることでカートリッジ上部144が用いられる。カートリッジ134の上部144若しくは側面146は、ピンセット又は素手でカートリッジを取り扱うために用いられ得る。 10

【0089】

他の2つのカートリッジの形態(図14b、図14c)234、334は構成が類似する。但し、図14aのカートリッジの空の上部144の代わりに第2のアパーチャ24、340が設けられている。このアパーチャは、第1の膜と同じタイプ若しくは異なるタイプの第2の透水性膜を保持するのに利用でき、従って、装置利用時にカートリッジを単に逆さにすることのみによって膜を素早く交換できる。第3のカートリッジ334には、アパーチャの一つ340が3つの独立のアパーチャ340a、340b、340cを含むという点において、更なる修正が施されている。利用時には、これらのアパーチャ340a、340b、340cの各々が異なる膜を含んでもよく、従って、分離の間に異なるタイプの膜が同じ溶液に対して与えられてもよい。 20

【0090】

図15は、2つの次元での、複数のサンプルの複数の平行分離をするのに利用され得る、本発明に係る処理を示す。装置410は、直交アレイの仕切りの形態であり、仕切りの各々は隣と連絡している。上述のように、不透水性バリア若しくは透水性膜カートリッジが、輪セルの仕切りの間に配置され得る。分離の間には、分離の第1の次元が比較的目の粗い勾配(本例では、縦方向で1pH単位のステップ)にてサンプルを分離するのに利用され得る。このことが終わると、より細かい勾配で直交方向で第2の次元が利用される。この例では、水平方向で0.1pH単位のステップである。最終結果は、緻密に分離された一連の画分を与え、異なる画分が装置の個々のウエルにあることになる。 30

【0091】

図16はこの方法の更なる変更例を示す。この例では、分離の第1の次元が通常通り行われ、複数のサンプルが、縦方向の1pH単位のステップを伴う勾配において分離される。しかしながら、第2の次元は、特定のpH範囲からのサンプルを全て利用して行われ、それらサンプルはより小さい体積の範囲内で同じ特定のpH範囲において分離される。このことは、更なる利用者の介入を必要とすることなく、所望の画分を一つ若しくは少数の仕切りの中に集中するという効果がある。

【0092】

図17a、図17b及び図17cは、図15及び図16に関して記載した方法を用いて利用するのに適した24仕切りの装置に係る、拡大透視図を示す。各々の仕切りは、各々の面でのカートリッジ受容アパーチャに隣接し(各々の面はアパーチャの端部ではこれら仕切りから離れる)、そのカートリッジ受容アパーチャは更なる仕切りに繋がる。図17bは装置の2つの変形例を示し、各々は僅かに異なる形態の仕切りを有する。図17cは2つの方向で装置に挿入されたカートリッジwp示す。 40

【0093】

図18は、図14a及び図14bに示すものと類似する、3つの異なるタイプの膜カートリッジの写真である。

【0094】

図19は、本発明の更なる変形例の垂直断面図である。この実施形態では、装置のペー 50

ス 5 1 2 は、ベースを貫徹して伸展するカートリッジ受容アパーチャ 5 3 4 を含む。図 1 9 a に示すようにこれらのアパーチャによりカートリッジはベース 5 1 2 の中に挿入される。カートリッジはアパーチャ 5 3 4 を貫徹して伸展しない状態で、溶液に対する第 1 の膜を設定する。その後、図 1 9 b に示すようにカートリッジアパーチャ 5 3 4 の下方部位の中に押し込まれ、溶液に対して（更なる膜か、固体バリア部位となる）カートリッジの上方部位を設定する。仕切りからの溶液の漏れを回避するため、オーリング 5 5 0 が個々のアパーチャ 5 3 4 周りに設けられる。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図 1 a】本発明の第 1 の実施形態に係る溶液の分子を分離するための装置のカバーと基板を示す。 10

【図 1 b】本発明の第 1 の実施形態に係る溶液の分子を分離するための装置のカバーと基板を示す。

【図 2】組み立てられた形状の図 1 の装置を示す。

【図 3】図 1 の装置の部分拡大図であり、電極の接続を示す。

【図 4】図 1 の装置を利用するための準備の段階を示す。

【図 5】図 1 の装置を利用するための準備の段階を示す。

【図 6】p I に係る単一次元での溶液内の分子を分離するための装置の概略レイアウトを示す。

【図 7】図 6 に示されるレイアウトに基づいた 6 9 7 細胞ライン（A T T C D S M Z A C C 4 2）細胞抽出物のゲル分離の結果を示す。 20

【図 8】図 1 の装置の一部の概略レイアウトを示し、p I に係る 2 次元での溶液内の分子の分離に備えるものである。

【図 9】図 8 に示されるレイアウトに基づいた 6 9 7 細胞ライン（A T T C D S M Z A C C 4 2）細胞抽出物のゲル分離の結果を示す。

【図 10】図 9 に示す分離結果の更なる分析を示す。6 9 7 細胞ライン（A T T C D S M Z A C C 4 2）細胞抽出物の 2 D ゲル電気泳動イメージである。

【図 11】図 9 に示す分離結果の更なる分析を示す。6 9 7 細胞ライン（A T T C D S M Z A C C 4 2）細胞抽出物の 2 D ゲル電気泳動イメージである。

【図 12】図 9 に示す分離結果の更なる分析を示す。図 11 から選択されたスポットの質量分光分析の結果を示すテーブルである。 30

【図 13 a】本発明の実施形態に係る、溶液の分子を分離するための装置基板の別の構成を示す。

【図 13 b】本発明の実施形態に係る、溶液の分子を分離するための装置基板の別の構成を示す。

【図 14 a】本発明の溶液の分子を分離するための装置と共に利用する別のカートリッジを示す。

【図 14 b】本発明の溶液の分子を分離するための装置と共に利用する別のカートリッジを示す。

【図 14 c】本発明の溶液の分子を分離するための装置と共に利用する別のカートリッジを示す。 40

【図 15】複数の平行の分離を用いる溶液の分子の多重次元分離の処理を示す。

【図 16】図 15 の処理が溶液のサンプルの集中のためにどのように利用されるかを示す。

【図 17 a】図 15 と図 16 の処理を行うために利用される装置を示す。

【図 17 b】図 15 と図 16 の処理を行うために利用される装置を示す。

【図 17 c】図 15 と図 16 の処理を行うために利用される装置を示す。

【図 18】本発明の膜カートリッジを示す写真である。

【図 19 a】本発明の更なる実施形態の垂直断面を示し、分離の間に膜カートリッジがいかに荷電されるかを示す。

【図19b】本発明の更なる実施形態の垂直断面を示し、分離の間に膜カートリッジがいかに荷電されるかを示す。

【符号の説明】

【0096】

10・・・装置、34・・・カートリッジレセプタクル、48・・・カートリッジ、52・・・膜。

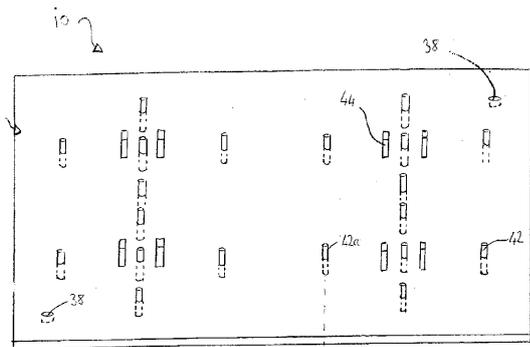


Fig. 1a

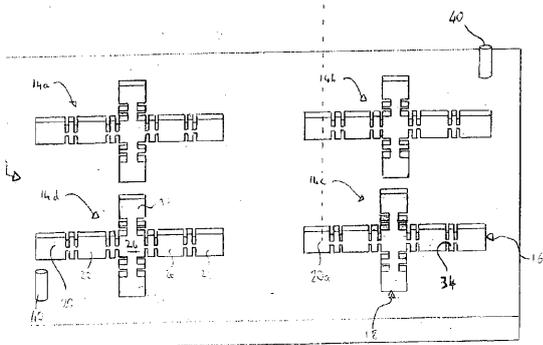


Fig. 1b

【図2】

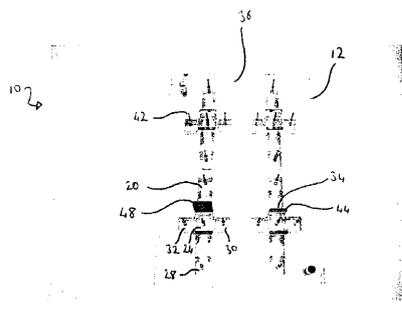


Fig. 2

【図3】

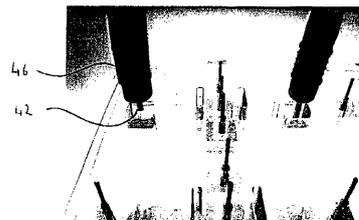


Fig. 3

【 図 4 】

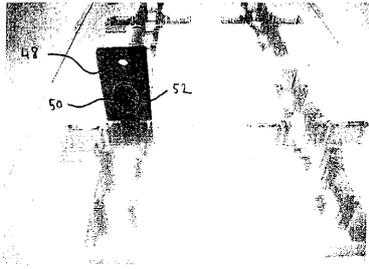


Fig. 4

【 図 5 】

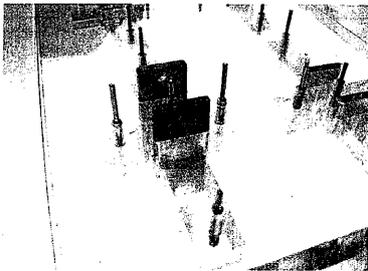


Fig. 5

【 図 6 】

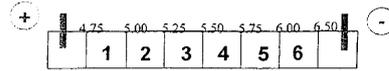


Fig. 6

【 図 7 】

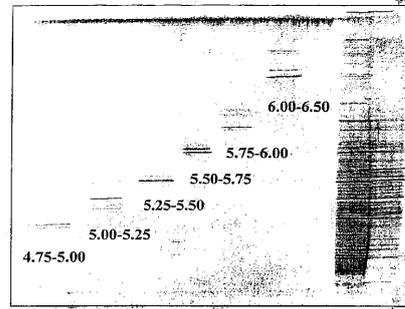
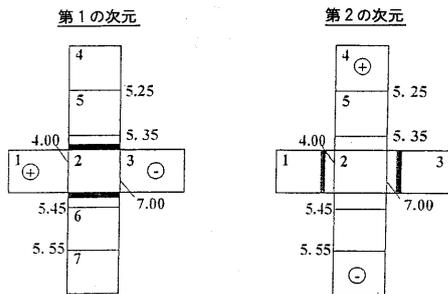


Fig. 7

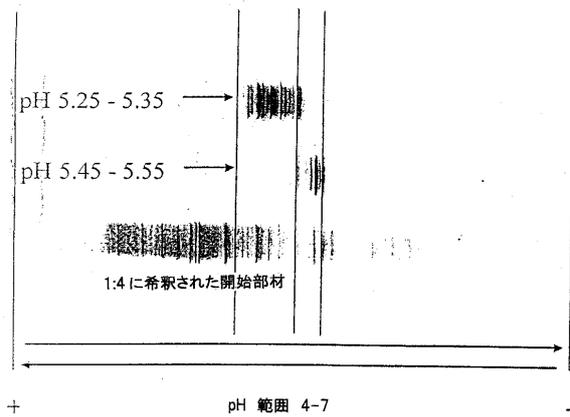
【 図 8 】



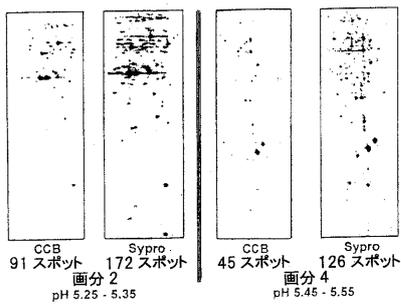
キー

分離ブロック (第1の次元のための配置)
 膜 (第2の次元のための配置)

【 図 9 】



【図10】



【図11】

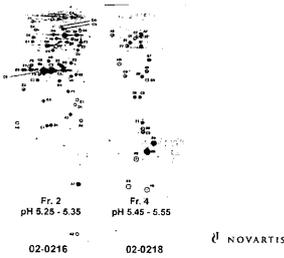
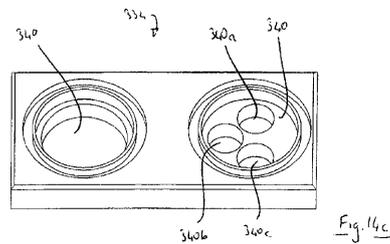
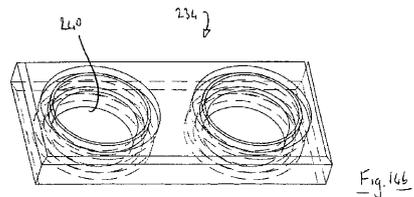
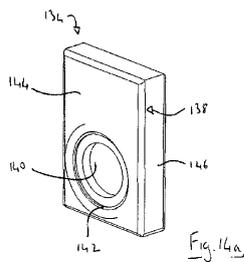
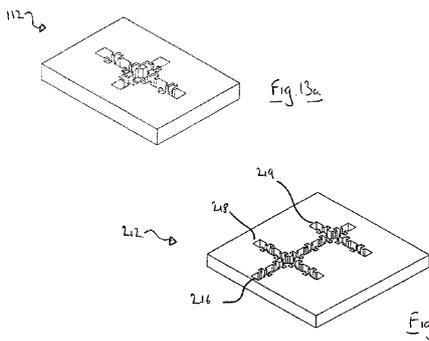


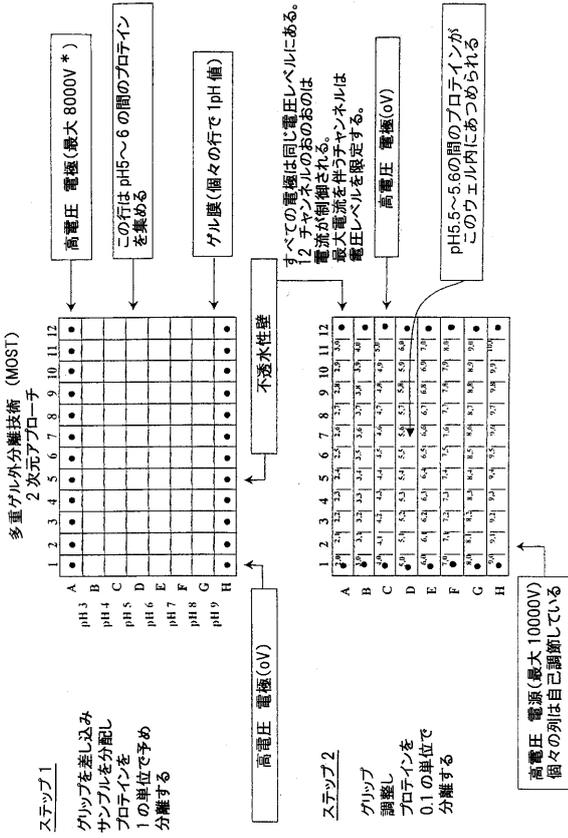
Fig. 11

【図12】

| サンプル名 | シークエンスカバレッジ | 識別 | 受入れ番号 | 観察された質量 (kDa) | 計算上の質量 (Da) | pI 画分 | 計算上の pI |
|-------|-------------|--|-----------------|---------------|-------------|-------------|---------|
| B2 | | C14orf3 | swiss O95433 | 42 | 38445 | 5.25 - 5.35 | 5.33 |
| C2 | | Actin | swiss P02570 | 75 | 42079 | 5.25 - 5.35 | 5.24 |
| H2 | | IF41 Eukaryotic initiation factor | swiss P04765 | 39 | 46382 | 5.25 - 5.35 | 5.21 |
| B3 | | hnRNP F | swiss P52597 | 45 | 46014 | 5.25 - 5.35 | 5.39 |
| C3 | | Actin | swiss P02577 | 28 | 41829 | 5.25 - 5.35 | 5.15 |
| D3 | | FK506-binding protein 4 | swiss Q02790 | 20 | 51959 | 5.25 - 5.35 | 5.24 |
| E3 | | T-complex protein 1 | swiss P48643 | 35 | 60127 | 5.25 - 5.35 | 5.42 |
| H3 | | Heat shock cognate protein | swiss P11142 | 48 | 71127 | 5.25 - 5.35 | 5.25 |
| B4 | | Heat shock 60kDa protein | sptrembl Q96FZ6 | 72 | 59984 | 5.25 - 5.35 | 5.38 |
| D4 | | L-plastin (Lymphocyte cytosolic protein 1) | sptrembl Q9NTI9 | 35 | 70859 | 5.25 - 5.35 | 5.17 |
| H4 | | Heat shock cognate 71 kDa protein | swiss P11142 | 26 | 71126 | 5.25 - 5.35 | 5.25 |
| A5 | | L-plastin (Lymphocyte cytosolic protein 1) | sptrembl Q9NTI9 | 48 | 70859 | 5.25 - 5.35 | 5.17 |
| G5 | | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F | swiss P52597 | 19 | 46014 | 5.25 - 5.35 | 5.39 |
| B7 | | ANXB Annexin VI (Lipocortin) | swiss P08133 | 57 | 76085 | 5.45 - 5.55 | 5.36 |
| G7 | | Erythrocyte cytosolic protein of 51 kDa | sptrembl Q9Y230 | 65 | 51328 | 5.45 - 5.55 | 5.42 |
| H7 | | T-complex protein 1, epsilon subunit | swiss P48643 | 66 | 60128 | 5.45 - 5.55 | 5.42 |
| D8 | | F-actin capping protein | swissnew P52907 | 33 | 33094 | 5.45 - 5.55 | 5.5 |
| E8 | | Prohibitin | swissnew P52907 | 31 | 29861 | 5.45 - 5.55 | 5.55 |
| B9 | | L-3-phosphoserine phosphatase | swiss P78330 | 43 | 25193 | 5.45 - 5.55 | 5.51 |



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

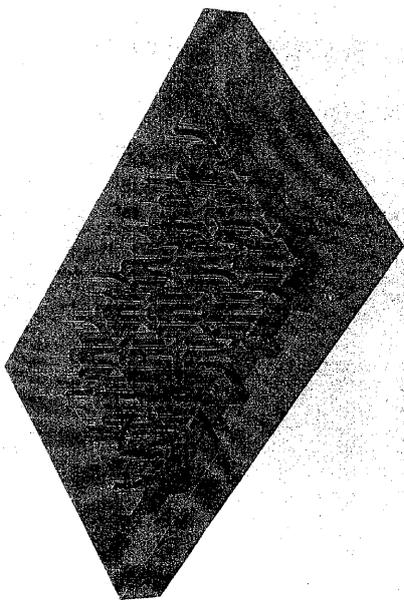
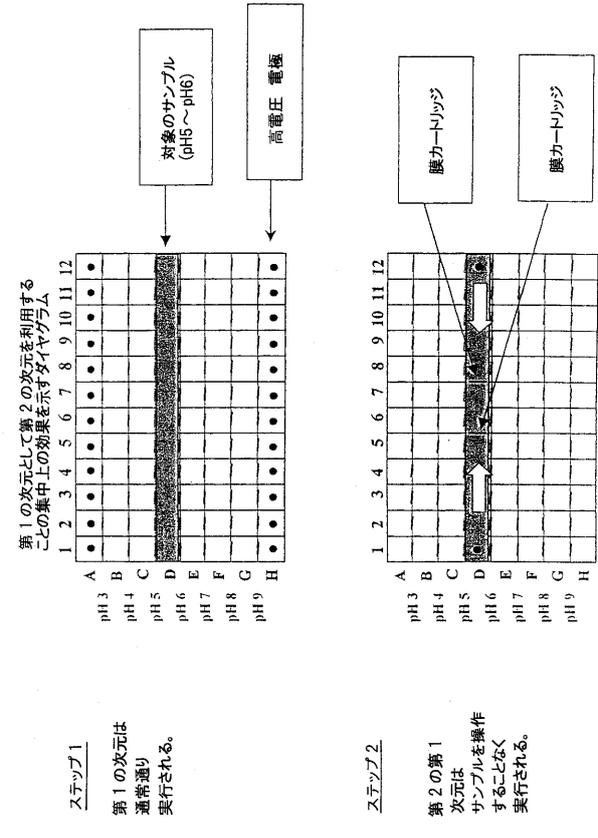


Fig. 17 a

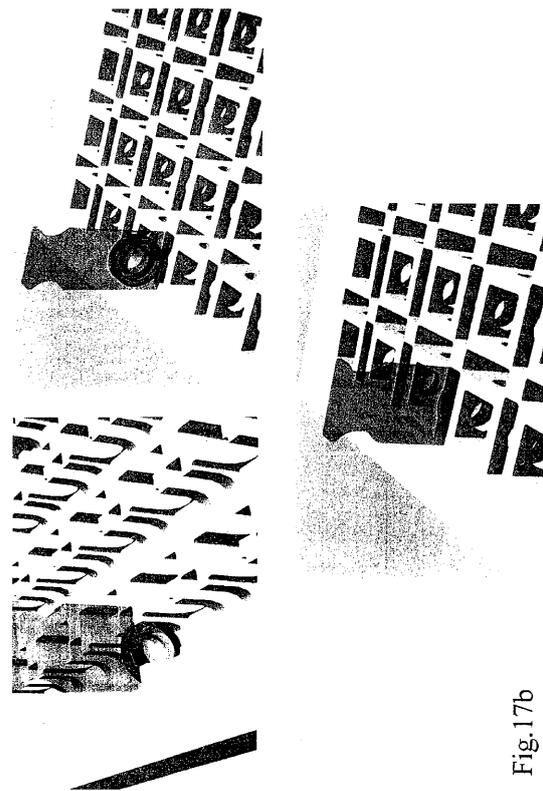


Fig. 17b

【 図 1 8 】

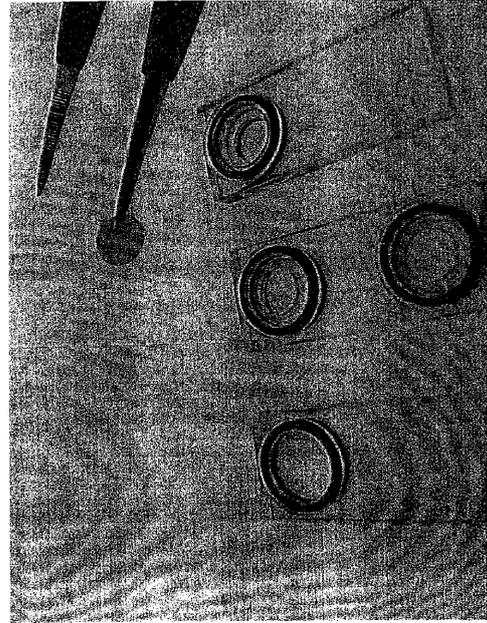


Fig.18

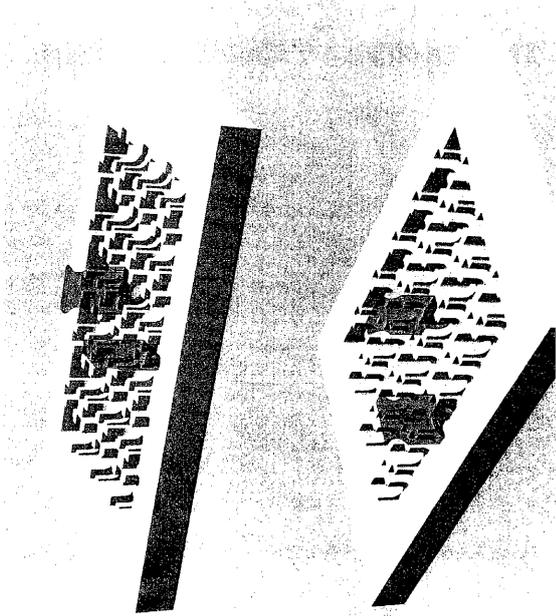
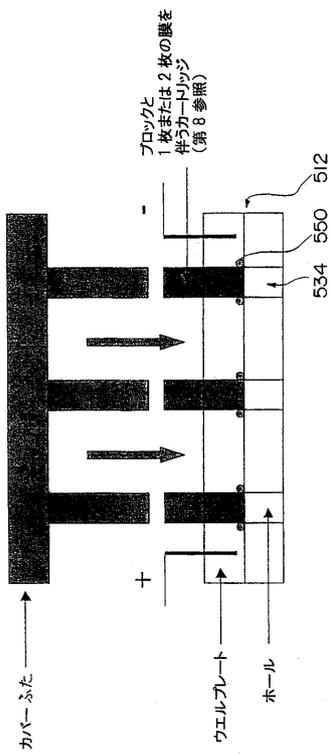
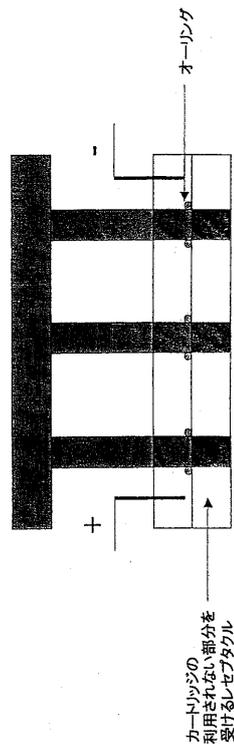


図 17c

【 図 1 9 a 】



【 図 1 9 b 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/05704

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 B01D57/02 G01N27/447 C07K1/28 | | |
| 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 B01D G01N C07K | | |
| 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, WPI Data, PAJ | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 00 17631 A (AMERSHAM PHARM BIOTECH AB ;LAURIN YLVA (SE)) 30 March 2000 (2000-03-30) the whole document | 1-5, 10-25, 28,33 |
| X | US 2002/043462 A1 (HUANG ZHENG ET AL) 18 April 2002 (2002-04-18) paragraph '0045! - paragraph '0047! | 34 |
| Y | paragraph '0076! paragraph '0151!; figure 25C | 1-5, 10-25, 28,33 |
| X | WO 01 53817 A (KIEFFER HIGGINS STEPHEN G ;MOSAIC TECHNOLOGIES (US); ABRAMS EZRA S) 26 July 2001 (2001-07-26) page 14, line 19 -page 15, line 18; figures 5-7G | 29-32 |
| | --- -/-- | |
| <input checked="" 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) 'C' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. '&' document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 8 August 2003 | | Date of mailing of the international search report 21/08/2003 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Marti, P |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/05704

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO 01 75432 A (WISTAR INST) 11 October 2001 (2001-10-11) page 7, line 16 -page 13, line 14; figures 1,8,9 --- | 1-34 |
| A | WO 01 36449 A (HERBERT BEN ;PROTEOME SYSTEMS LTD (AU); RIGHETTI PIER GIORGIO (IT)) 25 May 2001 (2001-05-25) the whole document --- | 1-34 |
| A | WO 01 36071 A (CHAMPAGNE JAMES T) 25 May 2001 (2001-05-25) the whole document ----- | 1-34 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/05704**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 03 05704

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-28,33

Method, apparatus and automated system for separating molecules in a liquid medium comprising a series of first fluid compartments separated along a first axis by pH-membranes, and at least one of the first fluid compartments having a second compartment disposed adjacent thereto, wherein said first and second compartment defining a second axis perpendicular to the first axis.

2. Claims: 29-32

Cartridge for use with an apparatus for separating molecules in a liquid medium, said cartridge comprising a frame and a membrane.

3. Claim : 34

Computer program for automated separation of molecules from a liquid medium comprising a executable code for controlling the application of current selectively to at least two electrode pairs in a determined sequence.

The common inventive concept linking together the groups 1, 2 and 3 is the separation of molecules from a liquid medium with an apparatus. Since this concept is not novel, the different groups are not so linked as to form a single general inventive concept, and the application lacks unity within the meaning of R. 13 PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/05704

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|----|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 0017631 | A | 30-03-2000 | EP 1116020 A1 | 18-07-2001 |
| | | | JP 2002525191 T | 13-08-2002 |
| | | | WO 0017631 A1 | 30-03-2000 |
| US 2002043462 | A1 | 18-04-2002 | US 6277258 B1 | 21-08-2001 |
| WO 0153817 | A | 26-07-2001 | AU 3102801 A | 31-07-2001 |
| | | | CA 2397883 A1 | 26-07-2001 |
| | | | EP 1255983 A2 | 13-11-2002 |
| | | | JP 2003520961 T | 08-07-2003 |
| | | | WO 0153817 A2 | 26-07-2001 |
| | | | US 2003138774 A1 | 24-07-2003 |
| WO 0175432 | A | 11-10-2001 | AU 4786101 A | 15-10-2001 |
| | | | CA 2405501 A1 | 11-10-2001 |
| | | | EP 1269178 A2 | 02-01-2003 |
| | | | WO 0175432 A2 | 11-10-2001 |
| WO 0136449 | A | 25-05-2001 | WO 0136449 A1 | 25-05-2001 |
| | | | AU 755326 B2 | 12-12-2002 |
| | | | AU 1258901 A | 30-05-2001 |
| | | | EP 1230258 A1 | 14-08-2002 |
| | | | JP 2003514829 T | 22-04-2003 |
| WO 0136071 | A | 25-05-2001 | AU 1599501 A | 30-05-2001 |
| | | | EP 1235634 A1 | 04-09-2002 |
| | | | WO 0136071 A1 | 25-05-2001 |

フロントページの続き

(81) 指定国 EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, I
E, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, D
M, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NI, NO
, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SE, SG, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4D006 GA17 HA41 KE15Q MA03 MC04 MC38 PB52