

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12) 公表特許公報 ( A )

(11)特許出願公表番号

## 特表2002 - 537781

(P2002 - 537781A)

(43)公表日 平成14年11月12日(2002.11.12)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テラコード* ( 参考 )
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	4 B 0 2 9
// G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 33/53	M
33/53		33/566	
33/566		27/26	315 C

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 49数 )

(21)出願番号 特願2000 - 601418(P2000 - 601418)

(86)(22)出願日 平成12年2月25日(2000.2.25)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月24日(2001.8.24)

(86)国際出願番号 PCT/US00/04771

(87)国際公開番号 W000/50870

(87)国際公開日 平成12年8月31日(2000.8.31)

(31)優先権主張番号 60/121,836

(32)優先日 平成11年2月26日(1999.2.26)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 モザイク テクノロジーズ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0245  
1 ワルタム,ペア ヒル ロード 303

(72)発明者 アダムス, クリストファー, ピー.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0214  
4 サマヴィル,パウダーハウス ブルバール 141

(72)発明者 ボールズ, ティー., クリスチャン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0242  
0 レキシントン,パートウェル ロード 76

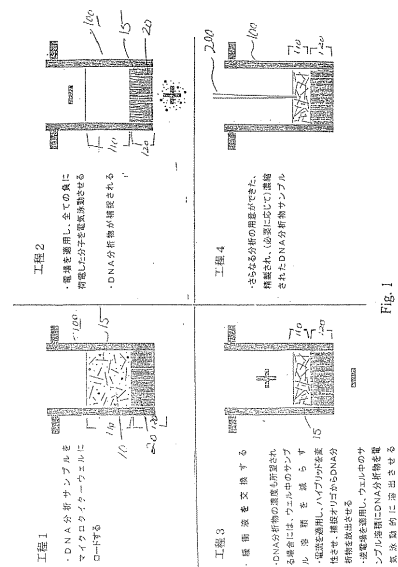
(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 固定化捕捉プローブを有する生化学的精製装置およびその使用

### (57)【要約】

本発明は、被検試料内に含まれる標的分子を精製および/または濃縮するために使用される、少なくとも1つの精製ユニットを含有する装置に関する。典型的には、標的分子は、被検試料であり、核酸である。これらの精製された核酸は、ヌクレオチド配列分析に供することをを含む種々の方法に使用できる。装置の使用法および装置を含むキットもまた提供される。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 (a) 収容部；および

(b) 標的核酸にハイブリダイズするように選択された少なくとも1種の固定化捕捉プローブを含有してなる電気泳動用媒体、  
を含有してなる少なくとも1個の精製ユニットを含有してなる、被検試料由来の標的核酸分子を精製するための装置。

【請求項2】 複数の精製ユニットを含有してなる請求項1記載の装置。

【請求項3】 該装置がマイクロタイタープレートであり、各精製ユニットがマイクロタイターウェルである請求項2記載の装置。

【請求項4】 電気泳動用媒体により収容部と分離されている収集チャンバーをさらに含有してなる請求項1記載の装置。

【請求項5】 複数の精製ユニットを含有してなる請求項4記載の装置。

【請求項6】 該装置はマイクロタイタープレートであり、各精製ユニットがマイクロタイターウェルである請求項5記載の装置。

【請求項7】 (a) 収容部；

(b) 電気泳動用媒体；および

(c) 収集チャンバー、

を含有してなり、電気泳動用媒体が収容部と収集チャンバーとを分離する、前精製ユニットをさらに含有してなる請求項1記載の装置。

【請求項8】 収集チャンバーが排出口を含有してなる請求項4記載の装置

。

【請求項9】 排出口が半透膜を含有してなる請求項8記載の装置。

【請求項10】 複数の同一の捕捉プローブを含有してなる請求項1記載の装置。

【請求項11】 複数の異なる捕捉プローブを含有してなる請求項1記載の装置。

【請求項12】 複数の同一の捕捉プローブを含有してなる請求項2記載の装置。

【請求項13】 複数の異なる捕捉プローブを含有してなる請求項2記載の

装置。

【請求項14】 複数の同一の捕捉プローブを含有してなる請求項4記載の装置。

【請求項15】 複数の異なる捕捉プローブを含有してなる請求項4記載の装置。

【請求項16】 複数の同一の捕捉プローブを含有してなる請求項5記載の装置。

【請求項17】 複数の異なる捕捉プローブを含有してなる請求項5記載の装置。

【請求項18】 (a)(1) 収容部；および

(2) 標的核酸分子にハイブリダイズするように選択された少なくとも1種の固定化捕捉プローブを含有する電気泳動用媒体、  
を含む精製装置のユニットの収容部内に、標的核酸分子を含有する被検試料を導入する工程；ならびに

(b) 被検試料中の標的分子が捕捉プローブにハイブリダイズし、それにより標的分子/捕捉プローブ複合体を形成するのに適し、かつ被検試料の残りの成分が媒体中を移動し、溶出されるのに適した条件下で電気泳動用媒体を電場に供し、媒体中での被検試料の移動をもたらす工程、  
を含む、被検試料由来の標的核酸分子を精製する方法。

【請求項19】 電気泳動用媒体を処理して標的分子を放出させる工程をさらに含む請求項18記載の方法。

【請求項20】 標的分子/捕捉プローブ複合体を変性させるのに十分な温度に電気泳動用媒体の温度を上昇させる工程、電気泳動用媒体内で捕捉プローブを固定化する化学結合を開裂させる工程、および標的分子/捕捉プローブ複合体を破壊するのに十分なレベルに電気泳動電場強度を上昇させる工程からなる群より選ばれる処理により標的分子を電気泳動用媒体から放出させる請求項19記載の方法。

【請求項21】 標的分子を収容部内に放出させる請求項19記載の方法。

【請求項22】 装置が、電気泳動用媒体により収容部と分離されている収

集チャンバーをさらに含有する請求項18記載の方法。

【請求項23】 標的分子を増幅する工程をさらに含む請求項18記載の方法。

【請求項24】 標的分子の濃度の上昇をもたらす請求項18記載の方法。

【請求項25】 精製装置が複数のユニットを含む請求項18記載の方法。

【請求項26】 複数の標的分子が同時に精製される請求項25記載の方法

。

【請求項27】 収集チャンバーが排出口を含む請求項22記載の方法。

【請求項28】 排出口が半透膜を含有する請求項27記載の方法。

【請求項29】 標的核酸分子の精製および濃縮が単一処理工程で起こる請求項18記載の方法。

【請求項30】 前精製処理工程をさらに含む請求項18記載の方法。

【請求項31】 被検試料が精製ユニットの収集チャンバーから得られたものである請求項22記載の方法。

【請求項32】 (a) 収容部；および

(b) 予め選択した核酸にハイブリダイズするように選択された少なくとも1種の固定化捕捉プローブを含有してなる電気泳動用媒体、  
を含有してなる少なくとも1つの精製ユニットを含んでなる、被検試料由来の標的核酸を精製するための装置を含有してなる、核酸配列決定適用において使用するための被検試料中の標的核酸の調製用キット。

【請求項33】 装置が複数の精製ユニットを含有してなる請求項32記載のキット。

【請求項34】 装置が、電気泳動用媒体により収容部と分離されている収集チャンバーをさらに含有してなる請求項32記載のキット。

【請求項35】 装置が、電気泳動用媒体により収容部と分離されている収集チャンバーをさらに含む請求項33記載のキット。

【請求項36】 (a) 収容部；

(b) 電気泳動用媒体；および

(c) 収集チャンバー、

を含有し、電気泳動用媒体が収容部と収集チャンバーとを分離する、前精製ユニットをさらに含んでなる請求項32記載のキット。

【請求項37】 予め選択した核酸が、ヒト疾患の検出に有用な変異核酸である請求項32記載のキット。

【請求項38】 疾患が癌である請求項37記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 関連出願

本出願は1999年2月26日出願のChristopher P. Adams、T. Christian Boles、Lawrence Weir、Rahul K. DhandraおよびNevin Summersによる、標題「固定捕捉プローブを含んでなる装置」の米国仮出願番号60/121836の利益を請求し、その教示は全て出展明示により本明細書の一部とする。

## 【0002】

## 背景技術

分子生物学研究および適用において、例えばDNAシーケンシングにおいてしばしばDNAを高度に精製する必要がでてくる。DNAシーケンシングのための現在のプロトコルでは自動分析する前にDNAの実質的な精製が必要である。典型的には、複製ベクター、例えばM13ファージベクター系、並びにDNAポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド、プライマー、塩およびその他の複製成分を用いる複製プロトコルにDNAを供する。この複製工程中に形成される伸長産物は、伸長産物そのもののみを含有する比較的精製された調製物を得るためにさらに処理する必要がある。DNA伸長産物を精製するのにしばしば用いられる方法論はエタノール沈殿である。エタノール沈殿は伸長産物を含有する調製物から組み込まれていないヌクレオチドおよび塩を除去するのに比較的有効である。伸長産物に関して配列分析を実施する前に調製物から任意の鋳型DNAおよび過剰なプライマーを除去するのも望ましい。しかしながら、沈殿には時間がかかり、確実な産物収量を得るためには非常に注意を払う必要がある。

## 【0003】

関与する時間因子を最小にし、高度に再現性のある結果を保証できる基盤を提供しうる装置が必要とされる。加えて、マルチプレックス調製(multiplexed preparative)シーケンシング反応の産物を分類できる精製装置を有するのは有利であろう。加えて、マルチプレックス調製シーケンシング反応の産物を分類できる精製装置を有するのは有利であろう。

## 【0004】

## 発明の要旨

本発明は被検試料中に含まれる標的分子を精製および/または濃縮するために用いる、少なくとも一つの精製ユニットを含む装置に関する。典型的には、被検試料中の標的分子は核酸である。これらの精製された核酸を、ヌクレオチド配列分析に供するなどの種々の方法に用いることができる。該装置および該装置を含有するキットを用いる方法もまた提供される。

## 【0005】

本発明の精製装置は少なくとも一つの精製ユニットを含む。あるいは、該装置は複数の精製ユニットを含むことができ、例えばマルチユニット装置でありうる。各々の精製ユニットは標的分子を含んでなる被検試料を受け取る領域、並びに標的分子が被検試料に存在する場合、これを精製および/または濃縮するための第2の領域を含む。典型的には、各精製ユニットは三つの構成部分を含み、これらは独立あるいは半独立した精製ユニットの領域でもよい。該領域はチャンバーとも称することができる。典型的には、被検試料を第1領域から第2領域へ、次いで第3領域へ移動させる。第1領域は標的分子を標的ではない成分、例えば夾雑タンパク質またはバッファー塩と共に含む被検試料を受け取る。第1領域を収容部(receptacle)とも称する。被検試料を収容部へ導入する。第2領域を用いて被検試料に含まれるその他の夾雑分子から標的分子を精製し、および/または濃縮する。具体的には、この分離領域は、電気泳動媒体内に一つまたはそれ以上の種またはクラスの固定化捕捉プローブを有する電気泳動マトリックス、例えばポリアクリルアミドゲルを含む。該固定化捕捉プローブは標的分子を特異的にハイブリダイズする。従って、標的分子は装置の分離領域でマトリックス内に保持されるが、標的でない、例えばサンプルの夾雑成分は、分離領域を通過する。第3領域を含む精製ユニットを有する装置では、電気泳動媒体が、装置の第2領域を通過するいずれかのまたは全ての分子を含有するために用いられる第3領域から収容部を分離する。この第3領域を収集チャンバーと称する。

## 【0006】

別の態様では、精製装置が複数の精製ユニットを含むことができる。好ましい

態様では、装置がマイクロタイタープレートであり、各精製ユニットがマイクロタイターウェルである。

【0007】

精製装置はまた収容部、電気泳動媒体および収集チャンバーを含む精製前ユニットを含むこともできる。電気泳動媒体は収容部を収集チャンバーから分離する。

【0008】

態様においては、収集チャンバーが出口を含む。好ましい態様では、出口は半透膜を含む。

【0009】

1個の精製ユニットを含む装置は複数の同一な、または同一に近い、捕捉プローブを含むことができる。1個の精製ユニットを含む装置は複数の異なる捕捉プローブを含むこともできる。該装置はまた、複数の捕捉プローブを含むこともでき、それらは同一かまたは同一に近い部分もあり、異なっている部分もある。

【0010】

複数の精製ユニットを含む装置は複数の同一な、または同一に近い捕捉プローブを含むことができる。複数の精製ユニットを含む装置はまた複数の異なる捕捉プローブを含むこともできる。該装置はまた複数の捕捉プローブを含むこともでき、それらは同一に近い部分もあり、異なっている部分もある。

【0011】

別の局面では、本発明は標的核酸分子を含有する被検試料を収容部および標的核酸分子にハイブリダイズするように選択した少なくとも一つの固定化捕捉プローブを含む電気泳動媒体を含む精製装置のユニットの収容部に導入し；被検試料中の標的分子が捕捉プローブにハイブリダイズし、それにより標的分子/捕捉プローブ複合体を形成するのに、かつ被検試料の残りの成分が媒体を通過して移動して媒体から溶出するのに適した条件下で、被検試料が媒体を通過して移動することをもたらす電場に電気泳動媒体を供し；および収集チャンバー中に被検試料の残りを収集する方法に関する。

【0012】

一つの態様では、該方法はさらに電気泳動用媒体を処理して標的分子を放出する工程を含む。好ましい態様では、電気泳動用媒体の温度を標的分子/捕捉プローブ複合体を變成するのに十分な温度まで上昇させるか、電気泳動用媒体内の捕捉プローブを固定化する化学結合を開裂するか、または電気泳動電場強度を標的分子/捕捉プローブ複合体を破壊するのに十分なレベルまで上昇させることにより、標的分子を電気泳動用媒体から放出できる。一つの態様では、標的分子を収容部内に放出する。

【0013】

一つの態様では、該方法で用いる装置はさらに、電気泳動用媒体により収容部から分離されている収集チャンバーを含む。

【0014】

さらなる態様では、該方法はさらに標的分子を増幅する工程を含む。

【0015】

別の態様では、該方法により結果的に標的分子の濃度が上昇しうる。

【0016】

また別の態様では、該方法を複数の精製ユニットを含む精製装置と共に用いることができる。好ましい態様では、複数の標的分子を同時に精製し、例えば、該方法はマルチプレックス法である。

【0017】

好ましい態様では、標的核酸分子の精製および濃縮を単一の処理工程において行うことができる。

【0018】

別の態様では、該方法はまた、精製前工程をも含むことができる。さらに別の態様では、被検試料を精製ユニットの収集チャンバーから得ることができる。

【0019】

別の局面では、本発明は標的核酸を精製する方法のための最適条件を開発する方法に関する。態様において、標的核酸は疾患の検出において情報を与えてくれることが知られている変異核酸である。態様では、最適化するのに必要な条件は標的核酸の捕捉および標的核酸の溶出に影響する条件である。

## 【0020】

別の局面では、本発明は、少なくとも一つの精製ユニットを含む、被検試料から標的核酸を精製するための装置を含む、核酸配列決定に適用するための被検試料中の標的核酸を調製するためのキットであって、その精製ユニットが収容部および標的核酸をハイブリダイズするために選択した少なくとも一つの固定化捕捉プローブを含む電気泳動用媒体を含むキットに関する。

## 【0021】

一つの態様では、該キットの装置はさらに、電気泳動用媒体により収容部から分離されている収集チャンバーを含む精製ユニットを含む。

## 【0022】

また別の態様では、該キットは複数の精製ユニットを含む装置を含むことができる。

## 【0023】

一つの態様では、該キットはさらに、収容部、電気泳動用媒体および収集チャンバーを含む精製前ユニットを含むことができ、ここで電気泳動用媒体は収容部を収集チャンバーから分離している。

## 【0024】

一つの態様では、該標的核酸は、ヒト疾患の検出に有用な変異核酸である。好ましい態様では、ヒト疾患は癌である。

## 【0025】

本発明の装置により、分子の複合混合物から核酸を迅速で高度に再現性のある精製が可能になる。

## 【0026】

## 発明の詳細な説明

本発明は、被検試料中に含まれる標的分子を精製および/または濃縮するために用いられる、少なくとも一つの精製ユニットを含む装置に関する。「標的分子」およびその複数形「(複数の)標的分子」なる用語は、本出願を通じて本質的に互換的に用いられ、本発明の装置および方法を用いてさらに精製または濃縮できる任意の荷電分子を含むことを意図している。

## 【0027】

好ましくは、標的分子は核酸である。「核酸」なる用語は、デオキシリボ核酸（以後「DNA」）またはリボ核酸（以後「RNA」）を含むことを意図している。かかる核酸には、例えばDNA配列決定法により生じるDNAポリメラーゼ伸長産物などがある。これらの産物は長さが異なり得、しばしばDNA配列決定法の前にさらに精製する必要としうる。精製した標的核酸を、さらなる分析、例えばヌクレオチド配列分析に供するなどの種々の方法に用いることができる。

## 【0028】

該標的核酸は、種々の成分を含む被検試料中に含まれ得る。さらに被検試料は種々の供給源に由来してよい。例えば、被検試料は植物または動物の器官、組織または細胞のいずれかに由来してよい。被検試料は細胞、組織または器官の培養系に由来してよい。被検試料はcDNAまたはゲノムライブラリーに由来してよい。被検試料に用いられるDNAを身体サンプルに見出される有機体、例えば血液、尿、脳脊髄液、組織材料等から種々の技術、例えばManiatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、280~281頁(1982)に記載されるような技術により抽出できる。被検試料はまた半精製されていてもよく、例えば組織標本からの上澄調製物を被検試料として用いることができる。

## 【0029】

本発明は被検試料中に含まれる標的分子を精製および濃縮するのに有用な精製装置を提供する。本発明の装置は独立あるいは半独立した領域を含む、少なくとも一つの精製ユニットを含む。典型的には、各精製ユニットは本明細書にてチャンバーまたはコンポーネントとも称する少なくとも三つの領域を含む。

## 【0030】

第1領域は収容部(receptacle)を含む。「収容部」なる用語は、サンプルを受け取ることができる精製ユニットの領域を含むことを意図している。

。

## 【0031】

第2領域は電気泳動用媒体を含む。「電気泳動用媒体」または「電気泳動媒体」なる用語は専門用語 ( t e t m o f a r t ) であり、被検試料中の標的核酸を精製および/または濃縮するのに適している全ての公知の媒体を含むことを意図している。該装置の電気泳動用媒体は媒体、例えばBolesらに付与された米国特許第5,932,711号(その教示は全てそのまま出展明示により本明細書の一部とする)に記載される電気泳動媒体内で固定されているオリゴヌクレオチド捕捉プローブを有する、例えばポリアクリルアミドゲルでよい。被検試料中に含まれる標的分子と特異的に相互作用し、ハイブリダイズするように捕捉プローブを設計できる。「捕捉プローブ」およびその複数形「(複数の)捕捉プローブ」なる用語は、標的分子、例えば標的核酸分子とハイブリダイズできるプローブを含むことを意図している。

#### 【0032】

第3領域は収集チャンバーを含む。「収集チャンバー」なる用語は、電気泳動媒体を通して移動した後の被検試料が含まれる領域を含むことを意図している。このチャンバーは物理的に第2領域と隣接できるか、または第2領域と近位にあることにより第2領域と接続 ( i n t e r f a c e ) できる。第3領域は第2領域から分離可能であり、収集チャンバーを空にするか、または充填することができる、バッファーを交換することができる。

#### 【0033】

收容部および収集チャンバーは、それらの間でバリアーを形成する電気泳動用媒体により互いに物理的に分離されている。

#### 【0034】

本発明の精製装置を多くの素材から形成できる。好ましい素材は生物学的分子、例えばDNAおよびRNAに最も適合する素材である。プラスチック、ステンレススチール、真ちゅう、セラミック、ガラス、シリカまたはこれらの素材の種々組み合わせのような素材を用いて精製装置を形成できる。精製装置の実際の幾何学的な外形はその操作には重大ではなく、特定の形状が特定の適用を有利にできる。例えば、ある適用では精製ユニットの環境が装置の種々構成成分を含む領域において異なるのが好ましいこともある。

## 【0035】

好ましくは、精製装置を電源と接触して設置し、電圧勾配を確立させて第2領域に含まれる電気泳動用媒体を通る分子の移動を促進できるようにする。精製のための電源を分離して実際の精製装置から隔離でき、または精製装置の設計に組み込むことができる。装置の重要な特徴は動力源により作られた電圧勾配に結合、または提供することができる精製装置を有することである。動力源からの電極または電極のための収容部を精製装置の特徴に組み込むことができる。

## 【0036】

被検試料を収容部に置くことにより、被検試料を該精製装置に導入することができる。標的分子およびその他のサンプル成分が分離電気泳動用媒体を通過して移動するのに十分な電場、例えば0.1から約100ないし200ボルト/cmを適用して収容部の荷電分子を電気泳動媒体を通過して適当な極に移動させることができる。典型的には、標的核酸分子は陰性電荷を有し、従ってアノードへ向かって移動する。標的分子はその特定の標的分子に特異的な固定化捕捉プローブ、例えばそれがハイブリダイズする捕捉プローブに接触するまで、媒体を通過して移動し続けることができる。固定化捕捉プローブと標的分子との間でハイブリダイゼーション複合体を形成できる。好ましい捕捉プローブは、電気泳動ゲル、例えばポリアクリルアミドゲル内で共重合できる5'アクリルアミド基で修飾したオリゴヌクレオチドである。標的分子と捕捉プローブ内に含まれる相補的配列間に実質的な相補性がある場合、この2分子は結合できる。

## 【0037】

「実質的な相補性」なる用語は、対応する標的分子にハイブリダイズできる捕捉プローブの核酸配列を含むことを意図している。かかる配列が標的分子の正確な核酸配列を反映する必要はない。かかる配列は、特定の条件下で標的分子とハイブリダイズする配列の同一性において十分に類似しなければならない。例えば、配列がそれにハイブリダイズするのに十分な相補性塩基を有する場合、非相補性塩基、またはさらなるヌクレオチドを配列内に散在させることができる。当業者はハイブリダイゼーションの特異的条件を経験的に決定できる。

## 【0038】

例えばストリンジェンシー条件は、非特異的ハイブリダイゼーション反応を有意に低減するよう選択すべきである。核酸ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー条件は、種々参考文献、例えばAusubel, F.M.ら、Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻：(補26)(1991)にて説明されており、その教示は参考として本明細書の一部とする。因子、例えばプローブの長さ、塩基組成、ハイブリダイズする配列間のミスマッチパーセント、温度およびイオン強度などは核酸ハイブリッドの安定性に影響する。ストリンジェンシー条件、例えば低度、中程度または高度なストリンジェンシーを経験的に決定でき、捕捉プローブおよび被検試料中の標的分子の特徴に一部依存する。

【0039】

ハイブリダイゼーション複合体は標的分子が電気泳動媒体を通過してさらに移動するのを防御するが、非標的分子の持続的な移動に影響せず、それにより被検試料中に含まれる標的分子の精製を実現する。非標的分子には、例えばタンパク質、ペプチド、糖、塩および核酸などが含まれる。

【0040】

被検試料に含まれる非標的分子は電気泳動用媒体を通過し続けることができ、効果的に標的分子から分離される。サンプル中に含まれる非標的分子はゲルを通過し、装置の収集チャンバーに含まれる電気泳動バッファーに入る。次いで、収集チャンバー中のバッファーを新鮮な電気泳動バッファーと交換できる。続いて標的分子を、引き続き分析するために、捕捉プローブおよび電気泳動用媒体から溶出できる。

【0041】

「溶出」なる用語は、ハイブリッドの溶解および溶出方向への標的の移動を含むことを意図する。プローブからの標的の溶解または解離は、バッファー条件を変化させることにより、例えばpH上昇またはホルムアミドのごとき溶媒の添加により、または高電圧を適用することにより装置に高温を適用することにより達成できる。

【0042】

例えば、十分な電圧を適用して標的分子と捕捉プローブとの間で形成されたハイブリダイゼーション複合体を変性させ、標的分子を放出することができる。元来適用されていたのと同じの極性を電場に適用でき、それにより放出した標的分子が新鮮電気泳動バッファーが含まれる収集チャンバーに移動し続けることができる。また別に、電場を逆にしてサンプルをマイクロタイタープレートのサンプルウェルに引き戻すことができる。今度は精製標的分子を近づけ、さらなる分析、例えば核酸配列分析に供することができる。また別に、標的分子を増幅反応、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ライゲーション連鎖反応、核酸配列に基づく増幅またはその他の同等の方法に導入できる。

#### 【0043】

一つの態様では、装置は単一の精製ユニットを含み、マイクロチューブ、またはディスポーザブルピペットチップ、例えばギルソンまたはエッペンドルフ型チップの形態である。別の態様では、装置は複数の精製ユニットを含み、マイクロタイタープレートの形態である。マイクロタイタープレートは複数のウェル、例えば96ウェルを含み、その各々は独立した精製ユニットを形成する。この態様は複数のサンプルの精製を促進する。装置が96ウェルマイクロタイタープレートを含む場合、96に分かれた被検試料を導入、例えば装置に負荷できる。96以外のウェルを含むマイクロタイタープレートもまた本発明の範囲内である。マイクロタイタープレートのウェルは三つの領域を含むことができる。ウェルの第1領域はサンプルを受け取るための収容部を含む。収容部は約5.0  $\mu$ lから約1000.0  $\mu$ lまでの容量を収容できるのが好ましいが、より大きなサンプルを用いることができる。ウェルの上部表面と電気泳動用媒体により形成された表面境界との間に収容部を配置する。電気泳動用媒体は媒体内に固定化した少なくとも一つの種類の捕捉プローブ、例えば一つのオリゴヌクレオチド配列を含んでなる。あるいは、複数の種類の捕捉プローブ、例えば複数のオリゴヌクレオチド配列を媒体内に固定化できる（例えば、1997年8月8日出願のBolesらの「固定化プローブを用いる分子の電気泳動分析」US N 08 / 971, 845（この全内容は参考として本明細書に引用される）を参照のこと）。好ましい態様では、プローブを電気泳動用ゲル媒体に共有結合させる。第2領域は収容部

の底部表面から収集チャンバーの上部表面までの間に配置し、そのとき第1領域に隣接する。

#### 【0044】

さらなる態様では、前精製ユニットを本発明の精製ユニットと連結させて用いることができる。精製前ユニットの電気泳動用媒体は固定化プローブを含まないが、むしろユニットが被検試料の最初の非特異的分離を提供するように意図されており、被検試料は結果的に部分的に精製されたサンプルになる。被検試料を、好ましくは電気泳動バッファー中、前精製ユニットの収容部に配置する。電圧勾配の存在下、サンプルは電気泳動用媒体、例えばゲル負荷領域を急速に移動する。この分離領域は、ほとんどの分子が同一の電荷を保持するサンプル中で、主に大きさに基づいて成分を移動させる。典型的には、サンプルをアノードに向かって引き、小型の分子は最も速く分離領域を移動する傾向がある。このように、伸長産物は、電気泳動用媒体に保持される鑄型よりも速く通過して収集チャンバーに入る。

#### 【0045】

次いで、前精製ユニットからの収集チャンバーの内容物を、本発明の装置の精製ユニット中でさらに精製できる。部分的に精製されたサンプルを通常部分的に精製されたサンプルを収容部に沈殿させることにより、第2領域の上部表面と接触させて配置する。第3の領域は第2の領域と近接しうる。マイクロタイターウェルのチップを切除するかまたは別の同等の有効な方法により除去できる。ウェルの基底部チップを除去して作った口を半透膜を用いて被覆できる。半透膜は夾雑サンプル成分に膜を通過させるのに適した分子量カットオフを有しうる。

#### 【0046】

マイクロタイタープレートを動力源と連結してマイクロタイタープレートに含まれるウェルに電場を適用できる。電場はウェルに関していずれかのジオメトリーを有しうる。好ましくは、電場を適用する場合、電場はウェルの縦軸に沿って存在し、収容部の荷電分子を第2領域内に含まれる電気泳動媒体を通して縦方向に移動させうる。一旦サンプルを負荷すると、電場が精製装置に適用され、荷電分子が電場の影響下移動する。

## 【0047】

いずれかの電気泳動媒体、すなわち電気泳動に適したマトリックスを本発明の装置に用いることができる。適当なマトリックスにはアクリルアミドおよびアガロースなどがあり、共に核酸電気泳動に一般的に用いられる。しかしながら、その他の素材を同様に用いてもよい。实例を挙げると、化学的修飾アクリルアミド、デンプン、デキストランおよびセルロースベースの重合体などがある。さらなる例としては、修飾アクリルアミドおよびアクリル酸エステル（ポリサイエンシズ・インコーポレーティッド、ポリマー&モノマーカタログ、1996~1997、ワーリントン、PAを参照のこと）、デンプン（Smithies、Biochem. J. , 71: 585 (1959)、および製品番号S5651、シグマ・ケミカル・カンパニー、セントルイス、MOを参照のこと）、デキストラン（ポリサイエンシズ・インコーポレーティッド、ポリマー&モノマーカタログ、1996~1997、ワーリントン、PAを参照のこと）、およびセルロースベースの重合体（Quesada、Current Opin. In Biotechnology, 8: 82~93 (1997)を参照のこと）などがある。記載されたいずれかの重合体を化学的に修飾して捕捉プローブが本発明で使用される電気泳動用媒体に特異的に結合するようにできる。とりわけ好ましいマトリックスはアクリルアミドである。

## 【0048】

種々の捕捉プローブを本発明の装置に用いることができる。典型的には、本発明の捕捉プローブは標的分子に含まれるヌクレオチド配列の領域に実質的に相補的なヌクレオチド配列を有する核酸を含んでなり、その結果標的分子は捕捉プローブにハイブリダイズできる。核酸捕捉プローブの相補性は標的分子を特異的に結合するのに、従って被検試料中の標的分子の精製を実行するのに十分である必要があるだけである。本発明の使用に適したプローブには核酸、例えばRNA、DNA、核酸アナログ、修飾核酸および核酸を別の有機成分、例えばペプチド核酸と共に含んでなる混合されたクラスのキメラプローブから形成されたものが含まれる。捕捉プローブは一本鎖または二本鎖核酸でありうる。好ましくは、捕捉プローブの長さは少なくとも5ヌクレオチド、より好ましくは5から50ヌクレ

オチドの長さであるが、長さは数千ヌクレオチドまででありうる。

【0049】

本発明のプロープに有用な核酸には、当該分野で周知の方法により得られる核酸などがある。これらの核酸には実質的に純粋な核酸、化学合成により、並びに生物学および化学的方法の組み合わせにより製造された核酸、および組換え核酸などがある。DNAおよびRNAの両方を用いることができる。

【0050】

「核酸アナログ」なる用語は、修飾された糖基、リン酸塩基または修飾された塩基を含有する核酸を含むことを意図している。修飾された塩基を有する核酸の例としては、例えばアセチル化塩基、カルボキシ化塩基、またはメチル化塩基、例えば4 - アセチルシチジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウリジン、1 - メチルイノシン、ノルバリン、またはアロイソロイシンなどがある。かかる核酸アナログは当業者に周知である。有用な核酸アナログの一例は標準DNA塩基がN - (2 - アミノエチル) グリシンユニットの反復からなる修飾ペプチドバックボーンに結合しているペプチド核酸 (PNA) である (Nielsenら、Science, 254: 1497 - 1500 (1991))。ペプチドバックボーンは標準DNAおよびRNA一本鎖と塩基対形成するのに適当な距離で塩基を保持することができる。PNA - DNAハイブリッド二重鎖は相当するDNA - DNA二重鎖よりも大いに強力であり、恐らくPNA鎖に負に荷電したホスホジエステル結合がないという事実に依るのであろう。加えて、通常と異なる構造のためにPNAはヌクレアーゼ分解に対して非常に抵抗性がある。これらの理由から、PNA核酸アナログは固定化プロープアッセイに有用である。類似の設計ストラテジーを用いて、固定プロープアッセイに有用な特性を有するその他の核酸アナログを構築できることは当業者には明らかであろう。

【0051】

修飾オリゴヌクレオチドを含有するプロープもまた有用である。例えば、デアザグアニンおよびウラシル塩基を含有するオリゴヌクレオチドをグアニンおよびチミン含有オリゴヌクレオチドの代わりに用いて、ハイブリダイズしたプロープの熱安定性を低減することができる。同様に、熱安定性を増したハイブリッドが

望ましい場合、5 - メチルシトシンをシトシンに代用することができる (Wetmur、Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 26:227~259 (1991))。リボース糖基の修飾、例えば2' - O - メチル基の添加により固定RNAプローブのヌクレアーゼ感受性を低減させることができる (Wagner、Nature, 372:333~335 (1994))。ホスホジエステル骨格から負電荷を除去する修飾によりハイブリッドの熱安定性を増強させることができる (Moodyら、Nucleic Acids Res., 17:4769~4782 (1989); Iyerら、J. Biol. Chem., 270:14712~14717 (1995))。

#### 【0052】

核酸を結合して固定化プローブを含有する電気泳動用媒体を形成する方法は当業者に周知である。臭化シアノまたは塩化シアヌール活性化を用いて、核酸、修飾された核酸および核酸アナログをアガロース、デキストラン、セルロース、およびデンプン重合体に結合できる。カルボイミドカップリングを用いてカルボキシル基を含有する重合体を、1級アミン基を有する合成捕捉プローブに結合できる。グルタルアルデヒドまたは塩化シアヌールを用いて1級アミンを担持する重合体をアミン含有プローブに結合できる。多くの重合体をチオール含有合成プローブに結合できるチオール反応性基で修飾することができる。多くのその他の適当な方法を文献に見出すことができる (検討される場合、Wong、Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking、シー・アール・シー・プレス、ボッカラートン、フロリダ州 (1993) を参照されたい)。

#### 【0053】

捕捉プローブを重合可能な化学基に共有結合させる方法もまた開発されている。適当な重合可能な単量体化合物の混合物と共重合させる場合、高濃度の固定核酸を含有するマトリックスを製造できる。核酸を重合可能な化学基に共有結合させるための好ましい方法の実例はBolesら、「核酸含有重合可能複合体」と標題のついた米国特許第5,932,711号、およびRehmanら、Nuc

leic Acid Res. , 27 : 649 ~ 655 ( 1999 ) に見出され、その教示は参考として本明細書に引用する。

#### 【0054】

装置のある態様では、二つまたはそれ以上のマトリックス形成物質の混合物を含有する混成マトリックス、例えば混成アクリルアミド・アガロースゲルが有用でありうる。これらのゲルは典型的には約2～5%アクリルアミドおよび0.5～1%アガロースを含有する。これらのゲルでは、アクリルアミドが主要なふるい分け機能を提供するが、アガロースがなければ、かかる低濃度アクリルアミドゲルは取扱いに都合のよい十分な機械的強度を欠く。アガロースの添加によりアクリルアミドのふるい分け特性を有意に変化させることなく機械的支持を提供する。これらの態様では、ゲルのふるい分け機能を付与する成分が溶液相の核酸標的と最も密接に接触するので、核酸をその成分に結合することができる。また別に、ゲルマトリックスが結合する強化物質または支持体を提供することができる（例えば2000年1月19日出願のJonesら、標題「薄層ゲル支持体を用いる核酸検出方法およびそのための装置」のUS 6,017,839を参照のこと（その教示を参考として本明細書に引用する））。

#### 【0055】

核酸を、それ自体電気泳動用媒体に組み込むことができる粒子に結合することができる。粒子は本質的に肉眼的、顕微鏡的またはコロイド性でありうる（ポリサイエンシズ・インコーポレーティッド、ポリマー&モノマーカタログ、1996～1997、ワーリントン、PAを参照のこと）。Cantorら、米国特許第5,482,863号では粒子の懸濁液を含有する電気泳動ゲルを鑄造する方法について記載している。前記に類似の方法を用いて粒子を核酸に結合し、ゲル形成化合物と混合し、望ましいマトリックス形態に懸濁液として成形する。

#### 【0056】

図面の検討により本発明の装置および方法の理解が容易になる。ここで図1に言及すると、本発明の装置の使用方法を説明する。工程1はDNA標的分子15をDNA鑄型、塩、単量体およびバッファーと共に含んでなる被検試料10をマイクロタイターウェル100の第1領域110に配置する。被検試料を、少なく

とも一つの捕捉プローブ20を含んでなる第2領域120に位置する電気泳動用媒体と接触させる。工程2では、電場をマイクロタイターウェルの内容物に適用し、負に荷電した分子を第2領域の電気泳動マトリックスを通して移動させることができる。DNA標的15は捕捉プローブ20により電気泳動マトリックス120に捕捉される。工程3では、第1チャンバー110において電気泳動バッファを新鮮なバッファと(好ましくはDNA分析物サンプルよりも小容量で)交換する。電流を適用して捕捉プローブおよびDNA標的により形成された複合体を変性し、捕捉プローブからDNA分析物標的15を放出する。逆の電場を適用し、DNA分析物を精製ユニットの第1領域のサンプル容量に溶出する。工程4では、精製ユニットの第1領域からのDNA分析物の除去について説明する。DNA分析物をピペット200またはその他の手段を用いて除去でき、次いでバッファ中のDNA分析物サンプルをさらなる分析、例えばDNA配列決定に備える。

#### 【0057】

ここで図2に言及すると、配列決定のためのプライマー伸長産物を含んでなるサンプルを調製する方法を説明する。工程1では、バッファ中でポリメラーゼ連鎖反応を実施し、サンプル溶液中に伸長産物22を提供する。サンプル溶液は伸長産物を含有するのに加えて、ddNTP24、ポリメラーゼ酵素26、塩およびその他の成分をも含有する。工程2では、サンプル溶液を、固定化捕捉プローブ120を含有する電気泳動用媒体の上の収容部110に配置する。電気泳動用媒体の底部を収集チャンバー130に含まれる電気泳動バッファと接触させる。収容部と収集チャンバー130との間で電場を確立する。ddNTP24、ポリメラーゼ酵素26および被検試料のその他の非標的成分を電気泳動バッファ30に通し、一方伸長産物22は捕捉プローブとハイブリダイズして、ゲルマトリックス内に捕捉されるハイブリダイゼーション複合体222を形成する。電気泳動バッファを除去し、変性バッファを収容部110および収集チャンバー130の両方に配置する。工程3では、収集チャンバーはそのベース135の口(orifice)で半透膜132を有する。装置を変成条件に暴露し、ハイブリダイゼーション複合体222から伸長産物22を放出し、それを収集チャンバー1

30に入れる。半透膜は過剰のバッファーが除去されるまで伸長産物22が下部電極チャンバー140に入るのを妨げる。次いで伸長産物をDNA配列決定の自動シーケンサーに負荷しうる。

#### 【0058】

図では示していない配列決定用の精製DNAサンプルを提供するための別の態様では、ゲル中の捕捉されたDNA配列を自動シーケンサーのキャピラリーに直接導入し、前記の溶出および回収工程を排除する。例えば、ハイブリゲル溶液（40%アクリルアミド（29：1 アクリルアミド単量体：ビスアクリルアミド）および10×TBE（90mMトリスホウ酸EDTAバッファー、pH8.3；試薬はバイオラッド・ラボラトリーズ・インコーポレーティッド、ヘルクレス、CAより購入）を調製することによりアクリダイト（acrydite）ビーズを作ることができる。次いでアクリルアミドホスホラミダイト誘導体（モサイック・テクノロジーズ・インコーポレーティッド、ボストン、MAから入手可能なアクリダイト（商標）重合体）から形成した捕捉プローブを加える。10%過硫酸アンモニウムおよびN,N,N',N'-テラメチルエチレンジアミン（TEMED；バイオラッド、ヘルクレス、CA）を添加することにより重合を開始する。約1.0μlから約10.0μlの小滴をオイルにピペッティングし、重合させてビーズ形成を完了させる。望ましい捕捉プローブ配列を有するビーズをチップの、または類似の非干渉支持装置のマイクロタイタープレートのウェルに配置できる。精製および濃縮するサンプルをビーズの上部表面に導入する。次いでプラチナ電極および動力源を用いて、電気泳動バッファーの存在下で、ビーズを通して電圧勾配を確立する。サンプルをビーズ内に電気泳動し、捕捉プローブ配列に相補的な配列を捕捉する。次いで小容量バッファー中のビーズをシーケンサーの電極に沈着させる。配列決定に用いる高電圧は標的/捕捉プローブハイブリダイゼーション複合体を変性するのに十分であり、DNA配列はハイブリゲルビーズを出て、液体を通過してキャピラリーに移動する。

#### 【0059】

ここで図3Aに言及すると、装置の態様を用いてマルチプレックス反応の産物を精製する方法を説明する。マルチプレックス反応では、二本鎖オリゴヌクレオ

チドの両方の鎖をフォワードおよびリバースプライマーの両方を用いて同一の容器で同時に複製する。このように、複数のオリゴヌクレオチドフラグメントを合成する。複製される二本鎖インサートを有するプラスミドが提供される。フォワードおよびリバースプライマーの各々は各鋳型を複製する。各々は種々の長さの一連のオリゴヌクレオチドフラグメントを生じる。典型的には、図3Aで説明するように重なり合う配列が作製される。装置の精製ユニットを用いて、フォワードプライマーにより生じたオリゴヌクレオチドフラグメントをリバースプライマーにより生じたオリゴヌクレオチドフラグメントから分離する。フォワード捕捉プローブ-ゲル-チップ40をリバース捕捉プローブ-ゲル-チップ50の上に積み重ね、電気泳動バッファを全体に供給する。マルチプレックス反応からの被検試料をフォワード捕捉プローブ-ゲル-チップ40の収容部に負荷し、電場の影響で下、両チップを通して移動させる。図3Bおよび3Cに示すゲルの写真により明らかにされているように、その各々の捕捉プローブによりオリゴヌクレオチドフラグメントが捕捉される。あるいは、サンプルをプローブ-ゲル-チップの積み重ね (stack) に導入する前に、サンプルを電気泳動にかけ、例えば前精製し、ゲル負荷チップを通してマルチプレックス反応から残留する好ましくない成分を除去する。

#### 【0060】

本発明の装置は、疾患の検出の情報を得られることが知られている変異核酸を選択的に濃縮するのにとりわけ有用である。加えて、精製標的分子は、フィンガープリンティング、組織類型化、法医学適用、母子および父子鑑定試験、胎児性別決定、ならびに農業、食品および医薬産業における品質管理における適用が見出されている。

#### 【0061】

未知サンプル中に見出されるDNA配列を既知DNA配列と比較することにより、癌の素因または遺伝病を進展させる可能性に特徴的な変異配列の同定に頼る診断方法を発展させることができる。例えば癌検出アッセイにおいて、癌を生じる新形成組織中、並びに癌の段階、癌の型および癌性である組織に依存するその他の生物学的サンプル中に癌細胞に特徴的な変異核酸を見出すことができる。

## 【0062】

具体的には、遺伝子配列における欠失または点変異、例えば塩基変化の特定のパターンは結腸直腸癌の種々段階の特徴である。便サンプルを用いて、疾患に特徴的な変異DNA配列を区別することにより結腸直腸癌細胞を検出していた。一例についてはVogelsteinら、米国特許第5,380,645号、5,580,729号および5,910,407号を参照のこと(その開示は全体として参照により本明細書に取り込まれる)。癌組織が転移する場合、変異核酸を血液およびリンパ節中に見出すことができる。しかしながら、正常な核酸配列の量に比較して、変異オリゴヌクレオチド配列は非常に少量で存在し、典型的には全存在の10%未満の量である。本発明は変異オリゴヌクレオチドを濃縮して疾患検出のための正確な配列決定を可能にする方法を提供する。

## 【0063】

本発明の装置を用いる方法は、血液サンプルを入手し、サンプルから核酸、例えばDNAを単離し、並びに核酸を精製および所望により濃縮することに関する。これは、標的核酸配列に十分特異的である共有結合捕捉プローブを有し、捕捉プローブでハイブリダイズできる電気泳動用媒体を含有する装置の収容部に、血液を抽出することにより得られた核酸被検試料を配置することにより達成できる。標的核酸が捕捉プローブにハイブリダイズするまで、標的核酸を電気泳動にかけることができる。核酸をプローブから除去し、所望により増幅して配列決定に十分な核酸を提供することができる。別法としては、それを直接配列決定できる。ハイブリダイゼーション複合体から放出した標的核酸配列を収集する場合、少量のバッファーを用いてサンプルの濃縮を達成できる。

## 【0064】

標的核酸を精製する方法に最適な条件を開発する方法もまた、本発明の範囲内である。標的核酸の捕捉および標的核酸の溶出に影響する条件を最適化すると、標的核酸、とりわけ疾患の検出の情報が得られることが知られている標的変異核酸を最も効果的に精製できる。

## 【0065】

記載した方法を実行するのに有用な本発明の装置を含むキットもまた企図され

る。キャピラリー電気泳動用のDNA配列産物の調製を促進するためのキットは、ゲル負荷チップの容器およびプローブ-ゲル-チップの容器を含むことができる。これはまたチップに適合するように大きさを揃えた電極並びに電気泳動バッファおよび/または電極に連動する動力源の容器を含むことができる。

#### 【0066】

マルチプレックス(multiplexing)を促進するキットは、プローブ1-ゲル-チップ(フォワードプライマー配列相補体でよい)の容器、およびプローブ2-ゲル-チップ(リバースプライマー配列相補体でよい)の容器を含むことができる。さらに、キットはゲル負荷チップ、電極、動力源およびバッファまたはこれらの構成成分のいずれもの組み合わせの容器を含むことができる。

#### 【0067】

癌組織に関連するDNA配列に特徴的な変異DNAの検出を促進するキットもまた企図される。かかるキットはプローブ-ゲル-チップの容器を含んでなり得、ここで電気泳動媒体に固定されているプローブ配列は特定の癌の型に関連することが知られている変異DNA配列に相補的である。

#### 【0068】

複数の精製ユニットを有する装置を含むようにいずれものキットを構成することができる。

#### 【0069】

### 実施例

#### 実施例1

##### M13mp18配列に相補的な単一のDNA産物の精製

図5はプライマー、塩、DNA鋳型、組み込まれていないヌクレオチドおよび色素ターミネーターを含むDNAシーケンシング反応物からの望ましいオリゴヌクレオチド配列の精製の結果を示すゲルの写真である。第1にシーケンシング反応に用いるDNAをゲル負荷チップにより精製して粗製サンプルを提供し、次いで捕捉プローブ-ゲル-チップにより粗製サンプルを精製した。レーン1は精製前に提供されたパターンを示す。レーン2はゲル負荷チップを使用して精製

した後に認められたパターンを提供する。DNA鋳型が除去されたのが示される。レーン3は捕捉プローブ-ゲル-チップを用いて精製した後に認められたパターンを示す。DNA鋳型が存在せず、望ましい配列が局在するのが示される。

#### 【0070】

A. 固定化捕捉プローブを有する(プローブ-ゲル-チップ)分離装置および有さない(ゲル負荷チップ)分離装置の精製

プローブ-ゲル-チップ、すなわちAcrydite(登録商標)オリゴヌクレオチドゲルを含む精製装置の調製を以下のように実施した:

40%アクリルアミド(29:1 アクリルアミド単量体:ビス-アクリルアミド)および10xTBE(90mMトリスホウ酸-EDTAバッファー、pH 8.3; 試薬はバイオラッド・ラボラトリーズ・インコーポレーティッド; ヘルクレス、CAより購入)の収容溶液からハイブリゲル溶液を調製した。米国特許第5,641,658号ならびにKenney, RayおよびBoles, BioTechniques 25:516~521(1998)の文献(各開示は全体として参照により本明細書に取り込まれる)に開示されている方法に従って、オリゴヌクレオチド(オペロン・テクノロジーズ・インコーポレーティッド; アラメダ、CAから入手)およびアクリルアミドホスホロアミダイト(モザイク・テクノロジーズ・インコーポレーティッド; ワルトハム、MAから入手可能なAcrydite(登録商標)重合体)を用いて捕捉プローブ用のAcrydite(登録商標)オリゴヌクレオチドを合成した。ハイブリゲルは5%アクリルアミド(29:1)、1xTBEおよび以下の配列:

5'-アクリルアミドGCT GAG ATC TCC TAG GG3'(プローブ1)(配列番号:1)

を有する10 $\mu$ M Acrydite(登録商標)オリゴヌクレオチド捕捉プローブを含む。この実施例のために選別した捕捉プローブは、DNAシーケンシング反応の産物である標的分子を提供するベクターM13mp18のポリリンカーの一部に相補的である配列を有するが、該捕捉プローブはプライマー配列を全く含まない。10%過硫酸アンモニウムおよびN,N,N',N'-テトラ(Tera)-メチルエチレンジアミン(TEMED; バイオラッド、ヘルクレス、

C A) をハイブリゲル溶液に添加すると、重合が急速であった(2分以内)。

#### 【0071】

プローブ-ゲル-チップを調製するために、10%過硫酸アンモニウム1.0  $\mu$ l およびTEMED 0.5  $\mu$ l をハイブリゲル溶液200.0  $\mu$ l に加えた。重合ハイブリゲルオリゴヌクレオチド含有溶液10.0  $\mu$ l を200.0  $\mu$ l チップ(フィッシャー・サイエンティフィック・カンパニー、ピッツバーグ、PA) に素早くピペティングし、重合させた。マルチピペティング装置(200  $\mu$ l 使い捨てピペットチップおよびマルチピペティング装置はギルソン、ミッドレイトン、WIより入手可能)を用いて一度に8または12個のプローブ-ゲル-チップを作った。保存用に1 x TBE 約0.3 ml を含むマイクロチューブチップにプローブ-ゲル-チップを噴出させた。チップからゲルを押し出さないように注意を払わなければならない。次いでプローブ-ゲル-チップを1 x TBE 150.0  $\mu$ l で積層した。

#### 【0072】

ゲル負荷チップを用いて鋳型DNAを除去した。アクリルアミド(29:1)のみを含むゲル負荷チップ(すなわちAcrydite(登録商標)捕捉プローブを有さない)を調製した。前記のように、40%アクリルアミド(29:1 単量体:ビス)および10 x TBEの収容溶液より製造された、5%アクリルアミド(29:1)、1 x TBEを含有する溶液を用いてゲル負荷チップを調製した。10%過硫酸アンモニウムおよびTEMEDを溶液に加え、最終溶液200.0  $\mu$ l を各チップにピペティングした。ゲル負荷チップも前記のように保存できる。

#### 【0073】

B. DNA配列産物および捕捉プローブの調製

PEアプライドバイオシステムズにより推奨される循環条件を用いて、GeneAmp 2400中で-21M13フォワードプライマーを用いて、PEアプライドバイオシステムズBigDyeプライマーサイクルシークエンシングキット(PEアプライドバイオシステムズ、ウェレスレイ、MAより入手可能)のプロトコルに従って、PEアプライドバイオシステムズシークエンシング産物を調製

した。ベクターM13mp18を用いた。既知配列を有するDNAセグメントをプライマー部位の後に挿入した。伸長産物を調製した。プライマーおよび挿入DNAの間の領域に捕捉プローブを作った。フォワードプライマーの伸長産物にハイブリダイズできる捕捉プローブを選別した。捕捉プローブは5'末端にAcrydite (登録商標)を用いて合成したオリゴヌクレオチドを含んでなる。

#### 【0074】

別法として、アメルシャム・ファルマシアのDYEnamic ETターミネーター・サイクルシーケンシングキットを用いることができる。

#### 【0075】

### C. DNA配列伸長産物の捕捉

選択した伸長産物(被検試料中の標的)の電気泳動捕捉および分離を以下のように実施した: プライマー、塩、組み込まれていないヌクレオチド、色素ターミネーター、鋳型DNAおよび鋳型DNAから合成した標的DNA伸長産物を含有するシーケンシング反応溶液10.0 $\mu$ l(すなわち一つの反応物の1/2)を10xフィコール負荷バッファー(35%フィコール400、0.1%プロモフェノールブルー、0.1%キシレンシアノール、100mM EDTA)1.0 $\mu$ lに加え、サンプル溶液を提供した。約200 $\mu$ lの容量の電気泳動バッファーをゲル負荷チップのゲル表面に積層する一方で、表面の湿りを保持し、電気的接触を提供するのに十分な、より少量の電気泳動バッファーをプローブ-ゲル-チップの表面に積層した。サンプル溶液をゲル負荷チップ(すなわちAcrydite (登録商標)捕捉プローブを有さない)内にあるゲル表面に積層し、鋳型DNAを除去した。図4Aに示すように、このチップをプローブ-ゲル-チップ、すなわちハイブリゲル含有チップの上に積み重ねた。小容量の電気泳動バッファーをプローブ-ゲル-チップのゲルの表面に積層し、ゲル負荷チップを電気泳動バッファーと接触させて配置した。このように、二つのゲル間で液体接続を形成し、電極および動力源を設置した場合電気的接続が可能になる。

#### 【0076】

ゲル負荷チップのゲル表面にサンプル溶液を負荷した後、両方のチップを1xTBE、電気泳動バッファーを含むマイクロチューブ(1.5ml)に配置した

。積み重ねたゲルチップの上および下の電気泳動バッファー中にプラチナ電極を設置し、100V電圧を10分間適用した。上部電極は動力供給の陰性リードに接続する一方、下部電極を動力供給の陽性電極に接続した。このようにゲル負荷チップはプローブ-ゲル-チップに導入するための部分的に精製されたサンプル溶液を提供した。(この時点で、ゲル負荷チップを廃棄できる。)小型のDNAフラグメントはバッファーを通り、次いでゲル負荷チップに保持されるDNA鋳型および色素よりも速くプローブ-ゲル-チップに入る。

#### 【0077】

プローブ-ゲル-チップゲル表面上に残存する電気泳動バッファーを除去した。電気泳動バッファーをホルムアミド負荷色素(5:1脱イオン化ホルムアミド、25mg/mlブルーデキストラン、25mM EDTA)4 $\mu$ lと置換した。低バッファー保存物を含むマイクロチューブをドライバスに入れることにより、プローブ-ゲル-チップのゲルの温度を55 $^{\circ}$ Cまで上昇させ、捕捉プローブからの標的オリゴヌクレオチド配列の剥離を促進した。(VWR)。5%アクリル酸を含む30%アクリルアミドゲルを有する清浄な第2のゲル負荷チップをホルムアミド負荷色素にまで下げた。プラチナ電極を上部のゲル負荷チップに配置した。電流の方向を逆行させて上向きにハイブリダイゼーション複合体からのオリゴヌクレオチドの放出を誘導した。プローブ-ゲル-チップからホルムアミド負荷色素へオリゴヌクレオチドを誘導するのに40Vで1分で十分であった。サンプル4.0 $\mu$ lをピペットにより除去し、配列分析用に保持した。電気泳動の後、モレキュラー・ダイナミクス・フルオールイメジャー595を用いてプローブ-ゲル-チップのゲルを可視化した。図4Bに示す結果はプローブ-ゲル-チップのゲルの上部表面で捕捉を生じていることを表している。

#### 【0078】

##### D. ハイブリゲルアッセイによる配列精製の分析

垂直ポリアクリルアミド・ミニゲル用ガラスプレート(10x10cm、0.75mm間隔)を組み立て、20%アクリルアミド(29:1; Bio-Rad)、1xTBE(90mMトリスホウ酸バッファー、pH8.3、2mM EDTA)でサンドウィッチの約半分まで充填した。10%過硫酸アンモニウム水溶

液 ( A P S ) および T E M E D を各々ゲル容量の 1 / 1 0 0 および 1 / 1 0 0 0 で含有することにより重合を開始した。一つの捕捉層を含有するゲル用には、 A c r y d i t e ( 登録商標 ) 標識オリゴヌクレオチドを最終濃度 1 0 μ M で含有するゲル溶液 ( 2 0 % ポリアクリルアミド、 1 × T B E 、 1 0 % A P S 4 μ l および 1 0 % T E M E D 4 μ l ) 6 0 0 μ l を重合した。捕捉層の重合の後、プレートサンドウィッチの残りの空間を 5 % ゲルで充填した。次いでこの混成ゲルを 1 × T B E を含有するミニゲル装置に組み立て、 1 0 0 ないし 1 5 0 V 、 約 4 5 分間、電気泳動に供した。電気泳動後、モレキュラー・ダイナミクス・フルオールイメージャー 5 9 5 を用いてゲルを可視化した。結果によりハイブリゲルプローブにより捕捉された配列は鋳型 D N A の相補体であることが確認される。

#### 【 0 0 7 9 】

#### E . 捕捉されたオリゴヌクレオチドの自動シーケンシング

前記の方法に従って、本発明の装置により精製したオリゴヌクレオチド配列を自動シーケンサーで分析し、標準ベクターを用いる反復実験により最初の 5 0 0 ヌクレオチドのシーケンシングの精度が 1 0 0 % に近いことが示された。読み取り可能な配列は少なくとも 7 5 0 ヌクレオチドまで伸長する。

#### 【 0 0 8 0 】

### 実施例 2

#### 複数の D N A 配列産物の同時分離

この実施例は、本発明の装置および方法がプラスミドで複製されるオリゴヌクレオチドインサートのシーケンシングに有用であることを示している。図 3 A に説明するようにフォワードおよびリバースプライマーの両方を用いる。大きなインサートを有するプラスミドを一つの反応容器中で二つのプライマーを同時に用いてシーケンシングした。各々異なる捕捉プローブを含む二つのプローブ - ゲル - チップを縦列に配置した。プローブ配列は用いたフォワードおよびリバースプライマーに基づいて設計した。図 5 で示される平板ゲルから、被検試料中の二つのオリゴヌクレオチド標的の精製が、粗製産物と比較して説明される。リバース産物 ( 右 ) の配列がフォワード配列での夾雑を示さないことに注目されたい。また D N A 鋳型夾雑物が除去されていることにも注目されたい。

## 【0081】

## A. 固定化捕捉プローブを含む分離装置および含まない分離装置の調製

ゲル負荷チップを実施例1に記載するように調製した。

## 【0082】

図3Aに示すように、一つはフォワードプライマープローブ(プローブ2)が提供され、他方はリバースプライマープローブ(プローブ3)が提供される以外は、実施例1に記載するようにプローブ-ゲル-チップを調製した。このように、一つはアクリダイトオリゴヌクレオチド6269-17ac(配列番号:2)を有し、他方はアクリダイトオリゴヌクレオチド6231-19ac(配列番号:3)を有する二つの別個のハイブリゲルチップを作った。ポリリンカーのXbaI部位に3.8kbインサートを有するプラスミドベクターpGEM3Zf(-)(プロメガ・バイオテック、WI)であるプラスミドp698を用いた。二つのプローブはポリリンカー内のXbaI部位のいずれかの側の配列に由来する。プローブ6269-17acは、リバースプライマーを用いて作った配列産物に相補的であり、従ってそれを捕捉できる。同様に、プローブ6231-19acはフォワードプライマーからの配列を捕捉できる。

6269-17ac 5' アクリルアミド-TGCAGGCATGCAAGC  
TT(配列番号:2)

6231-19ac 5' アクリルアミド-GGGTACCGAGCTCGA  
ATTC(配列番号:3)

## 【0083】

このように、各オリゴヌクレオチドプライマープローブは5'末端でアクリダイトを用いて合成され、伸長産物にハイブリダイズできる。各捕捉プローブ配列は伸長産物配列およびプライマーの両方に相補的である。各捕捉プローブ配列はプライマー部位およびインサートDNA間の領域に由来する特定のベクターに特異的である。

## 【0084】

## B. 複数反応の産物の精製

図3Aで説明するように、プローブ2ゲルチップをプローブ3ゲルチップと縦

列に配置（積み重ね）した。流す電気泳動バッファをプローブ3ゲルチップの上部表面に配し、電氣的接触を提供し、乾燥を防いだ。マルチプレックスシーケンシング反応物からの被検試料をプローブ2ゲルチップおよびプローブ3ゲルチップの両方を通して電気泳動した。図3Bは二つの異なるプローブによる二つの別個のチップにおける捕捉を説明している。

【0085】

### 実施例3

温度勾配を用いる捕捉プローブからの標的の溶出

以下の方法を用いて捕捉および溶出のための最適温度を決定する。

【0086】

ハイブリダイゼーション複合体の安定性は温度に依存する。捕捉プローブを含まないゲルの層の間でサンドウィッチされたAcrydite（登録商標）捕捉プローブの層を含む垂直平板ゲルを製造した。上層および下層のゲルはゲル負荷チップに用いたものであった。捕捉プローブ配列6249-17ac（配列番号：4）を用いてプローブ-ゲル-チップ用にアクリライトプローブ層を実施例1に記載のとおり製造した。この場合のサンプルは6249-17acに相補的な配列を有する蛍光オリゴヌクレオチドであった。同じサンプルを各ウェルに負荷した。アルミニウム背板および2個の水浴を用いて全ゲルを温度勾配に供した。左のゲル温度は23℃である。温度はゲルを横切って右では53℃まで上昇した。低温では標的は捕捉層の上部で効果的に捕捉された。温度が上昇するにつれて、サンプルが層を通過して右に流れるまで標的捕捉は阻害された。遷移温度、すなわち標的が捕捉されなくなる（stops ceases）温度が $T_m$ に関連する。この遷移温度以下の温度が捕捉に有用である一方、この遷移温度を越える温度は溶出に有用である。

【0087】

### 実施例4

配列溶出の温度および捕捉プローブの大きさの依存性

シーケンシング産物の捕捉および溶出のための温度条件を決定するために、図7に示す実験を実施した。この実験は溶出温度が捕捉プローブの大きさにより

影響されることを示している。溶出温度が捕捉プローブの大きさにより影響されることが示された。図7に示される5個のパネルは23で始まる五つの異なる温度での同一の垂直平板ゲルの流れを示し、ここでは5個の異なるプローブを使用した。各プローブ配列での塩基の数は図7で示すように、13、15、17、19および21ヌクレオチドであった(左から右へ)。各レーンにM13シーケエンシング反応物(Dynamic(登録商標)ET)を負荷した。13マーは23ではうまく捕捉されなかったが、その他は全て捕捉された。30で15マーが配列を放出する一方、17マーは35で放出し始めるなど、50°までには全ての標的配列が放出された。これらの結果はシーケエンシング産物の捕捉および溶出の温度条件を説明している。

#### 【0088】

溶出が45で起こる標準的な方法では、17マーAcrydite(登録商標)プローブを捕捉プローブとして選択した。

#### 【0089】

本発明をとりわけその好ましい態様を参考にして示し、記載したが、添付の請求の範囲に包含される本発明の範囲から逸脱することなく形態および詳細において種々変更をそこに加えることができることは当業者に理解されよう。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1はさらなる分析、例えばDNAシーケエンシングで使用するための、マイクロタイタープレートのウェルである装置の精製ユニットを用いて標的DNAを精製する方法を図式的に表す。

##### 【図2】

図2はさらなる分析、例えばDNAシーケエンシングで使用するための、半透膜を含む収集チャンバーを含む精製ユニットを有する装置を用いて標的DNAを精製する方法を図式的に表す。

##### 【図3】

図3Aは、フォワードプライマー、リバースプライマー、およびシーケエンシングされるオリゴヌクレオチドインサートを有するプラスミドが提供される精製

ユニット内で行われる複数の反応のオリゴヌクレオチド産物の精製方法を図式的に表す。固定化捕捉プローブ、例えばプローブ・ゲル・チップ装置を含む電気泳動用媒体を含む積み重ねられた装置（電気泳動用媒体中にフォワード捕捉プローブを有する上部装置および電気泳動用媒体中にリバース捕捉プローブを有する下部装置を含む）を用いて増幅反応のマルチプレックス産物を精製する。

図3Bおよび3Cは図3Aに示す方法を用いて達成した精製結果の写真である。フォワード複製産物をリバース複製産物から分離する。

図3Dは逆配列を示す。

図3Eは図3Aに示す方法において用いられる配列を示す。

#### 【図4】

図4Aは固定化捕捉プローブ、例えばゲル負荷チップ装置を含まない電気泳動用媒体を、固定化捕捉プローブ、例えばプローブ・ゲル・チップ装置を含む電気泳動用媒体を含む装置と縦列に並べて用い、DNA標的分子、例えばDNAシーケンシング反応の産物を精製、および所望により濃縮する装置を用いる方法を図式的に表す。

図4Bは電気泳動後、および溶出前の電気泳動用媒体領域中の標的分子の分布を示す写真である。

#### 【図5】

図5は、1)本発明の装置で精製する前、および2)ハイブリダイズして装置から除去した後に撮影したサンプル成分の分布を示す電気泳動ゲルの写真である。

#### 【図6】

図6は固定化捕捉プローブ、例えばプローブゲル層を含む電気泳動用媒体が、固定化捕捉プローブ、例えばプローブ負荷層を含まない上部電気泳動用媒体および下部電気泳動用媒体でサンドイッチされている垂直平板電気泳動用媒体の写真である。該プローブはプローブ・ゲル層中に一様に分布している。24.7から53.4の温度勾配は色素タグを有する標的オリゴヌクレオチドの電気泳動中に左から右へ提供された。

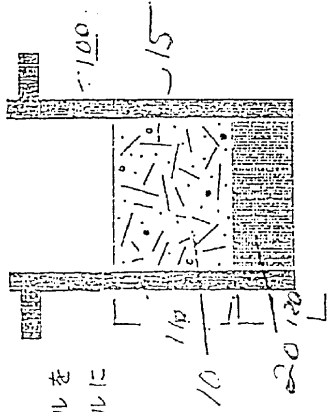
#### 【図7】

図7は、複数のレーンを有する垂直平板電気泳動用媒体の写真である。各レーンには、上部から底部へ23 から45 の温度勾配が提供されている。各レーンには異なる大きさの捕捉プローブが提供されている。レーン1の相補性捕捉プローブは13マー；レーン2は15マー；レーン3は17マー；レーン4は19マー；およびレーン5は21マーである。色素タグを有する同一のオリゴヌクレオチドは各レーンで電気泳動される。

【図1】

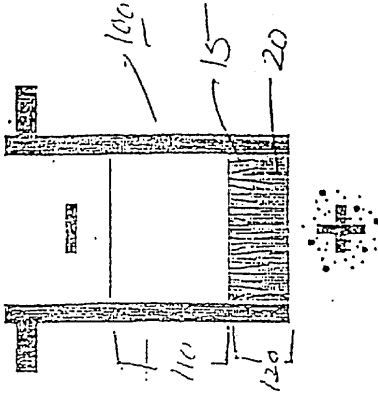
工程1

- ・DNA分析サンプルをマイクロタイターウェルにロードする



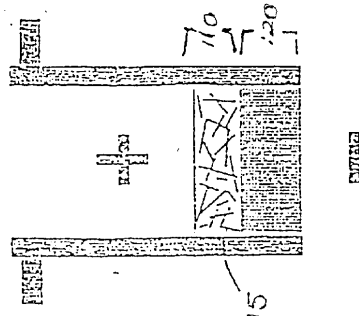
工程2

- ・電場を適用し、全ての負に荷電した分子を電気泳動させる
- ・DNA分析物が捕捉される



工程3

- ・緩衝液を交換する
- ・DNA分析物の濃度も所望される場合には、ウェル中のサンプル溶積を減らす
- ・電流を適用し、ハイブリッドを変性させ、捕捉オリゴからDNA分析物を放出させる
- ・逆電場を適用し、ウェル中のサンプル溶積にDNA分析物を電気泳動的に溶出させる



工程4

- ・さらなる分析の用意ができた、精製され、(必要に応じて)濃縮されたDNA分析物サンプル

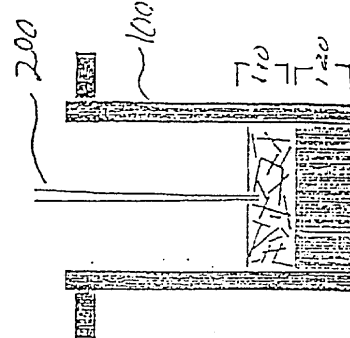


Fig. 1

【図2】

配列決定のためのサンプルプレップ

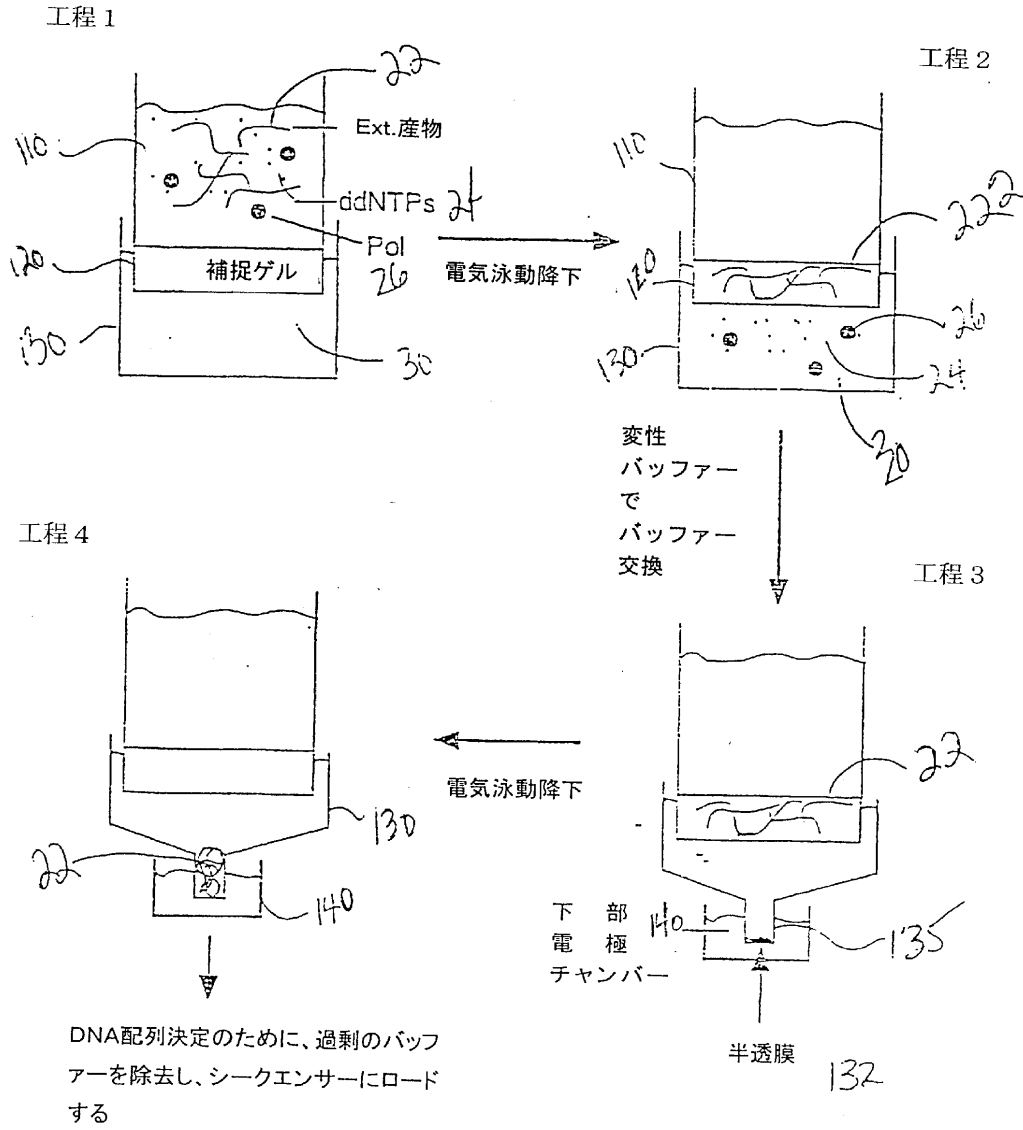


Fig. 2

【図3A】

マルチプレックス(multiplexing)・複数反応の産物を精製するためのハイブリゲルの使用

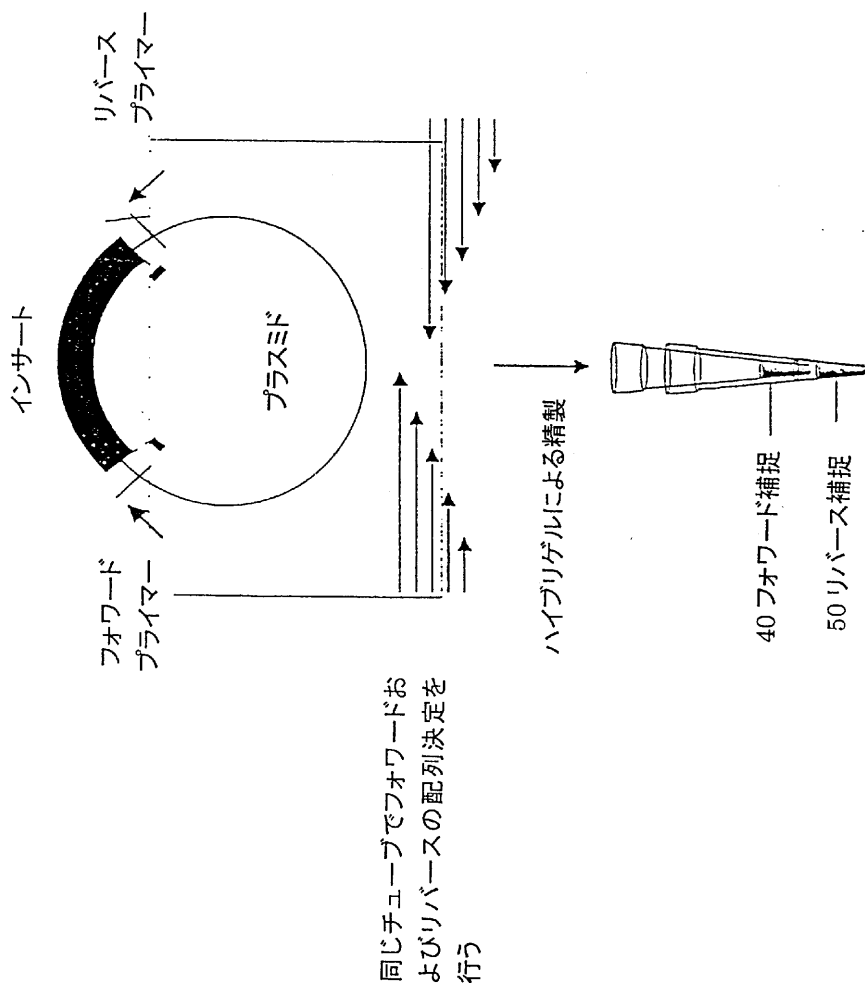
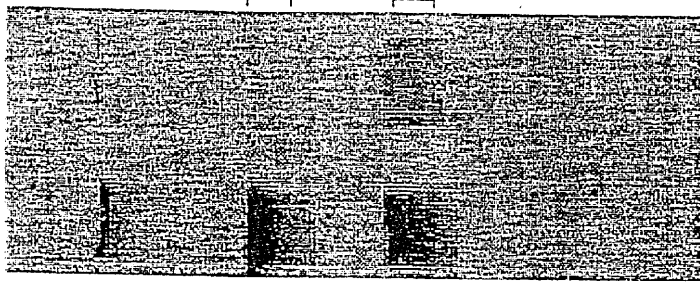


Fig. 3A

【図3B-D】

For ハイブリゲル精製  
+ Rev リバース



リバース配列決定

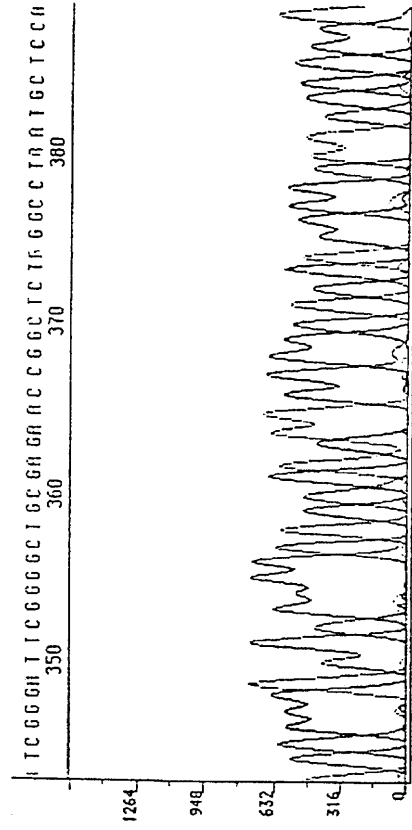


Fig. 3D



Fig. 3B

Fig. 3C

6249 ↓  
ポリリンカー  
GGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTACAA  
← tgaccggcagcaaatgt  
-21 プライマー

5' ac-GGGATCCTCTAGAGTCG 6249-17ac  
5' ac-TGCAGGCATGCAAGCTT 6269-17ac  
5' ac-ATGCAAGCTTGGCAC'TGGCCG 6277-21ac  
5' ac-ACTGGCCGTCGTTTACA 6290-18ac

Fig. 3E

【図4A】

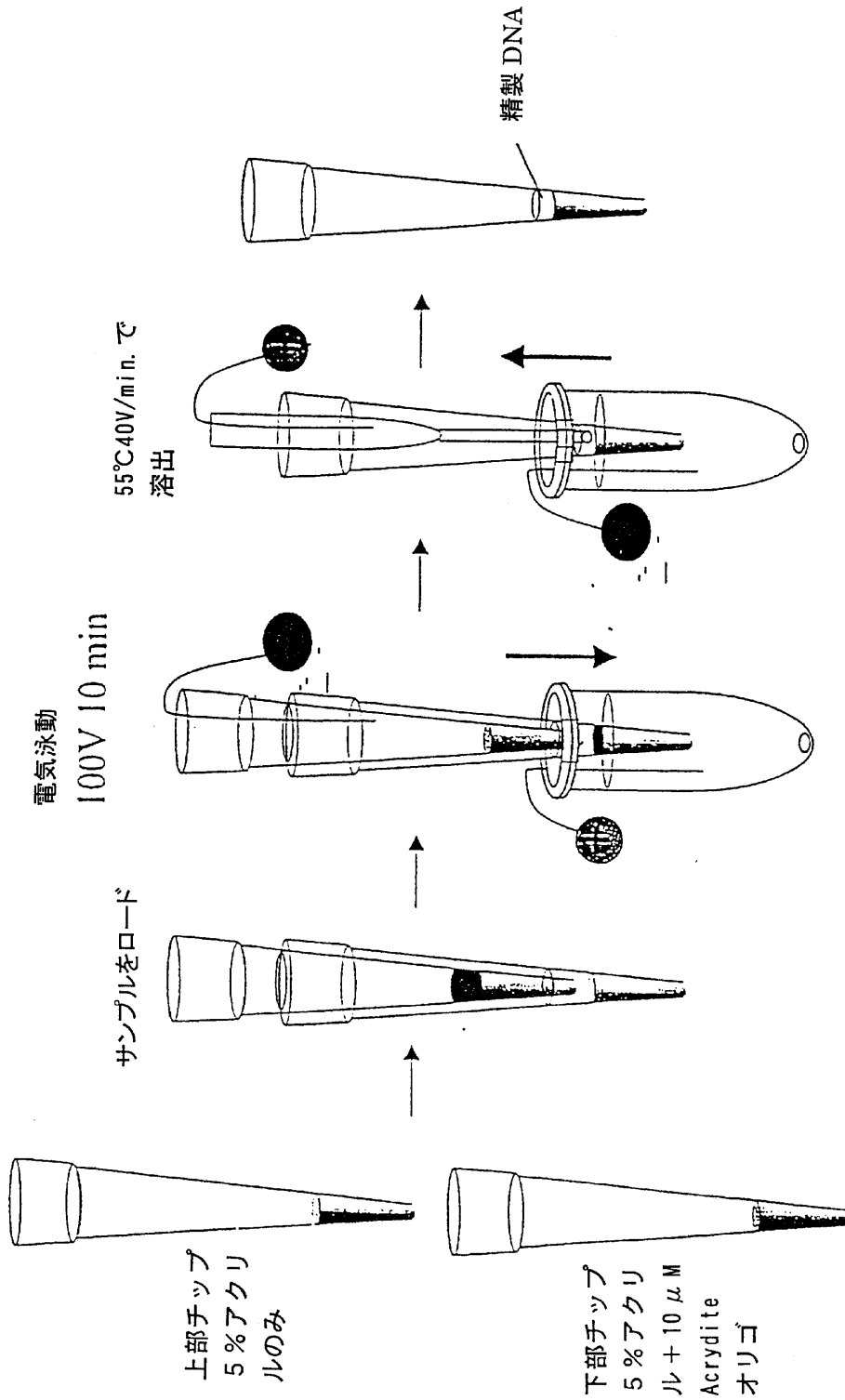
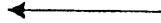


Fig. 4A

【図4B】



捕捉された  
配列

Fig. 4B

【図5】

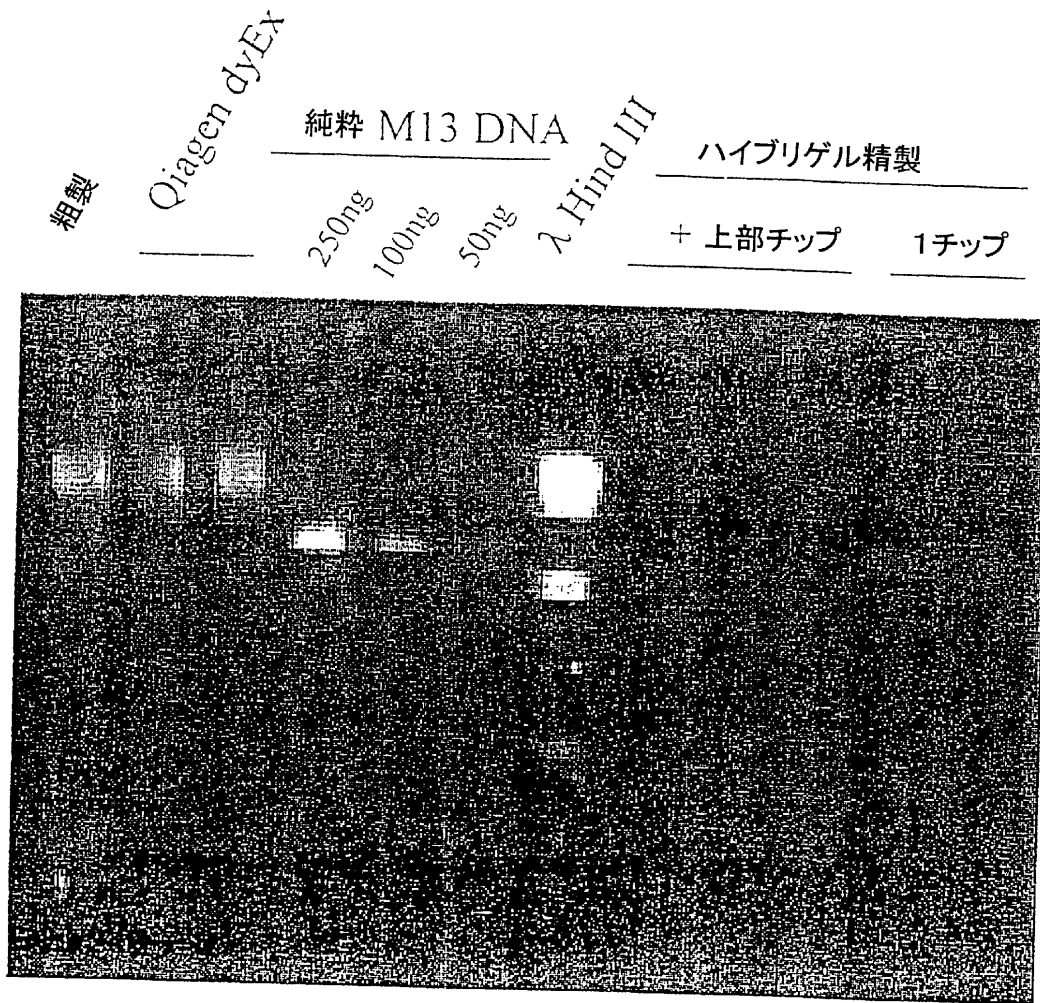


Fig. 5

【图6】

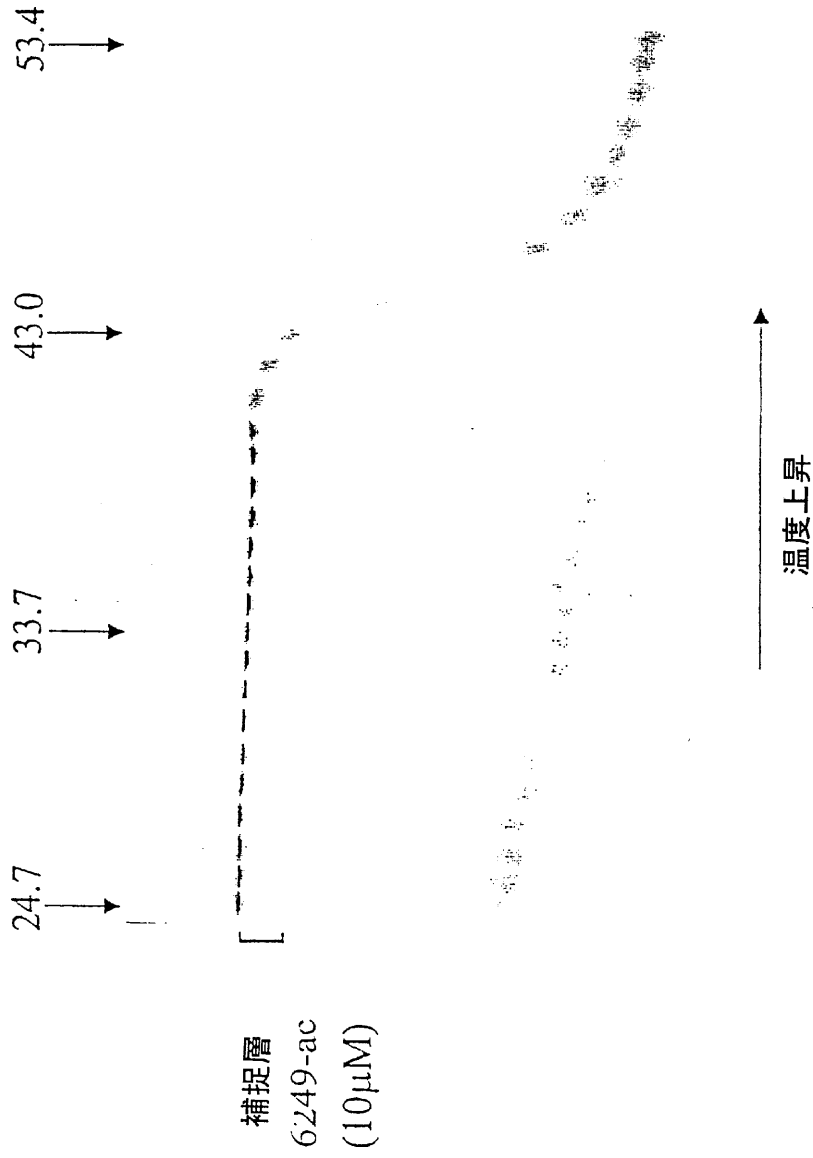


Fig. 6

【図7】

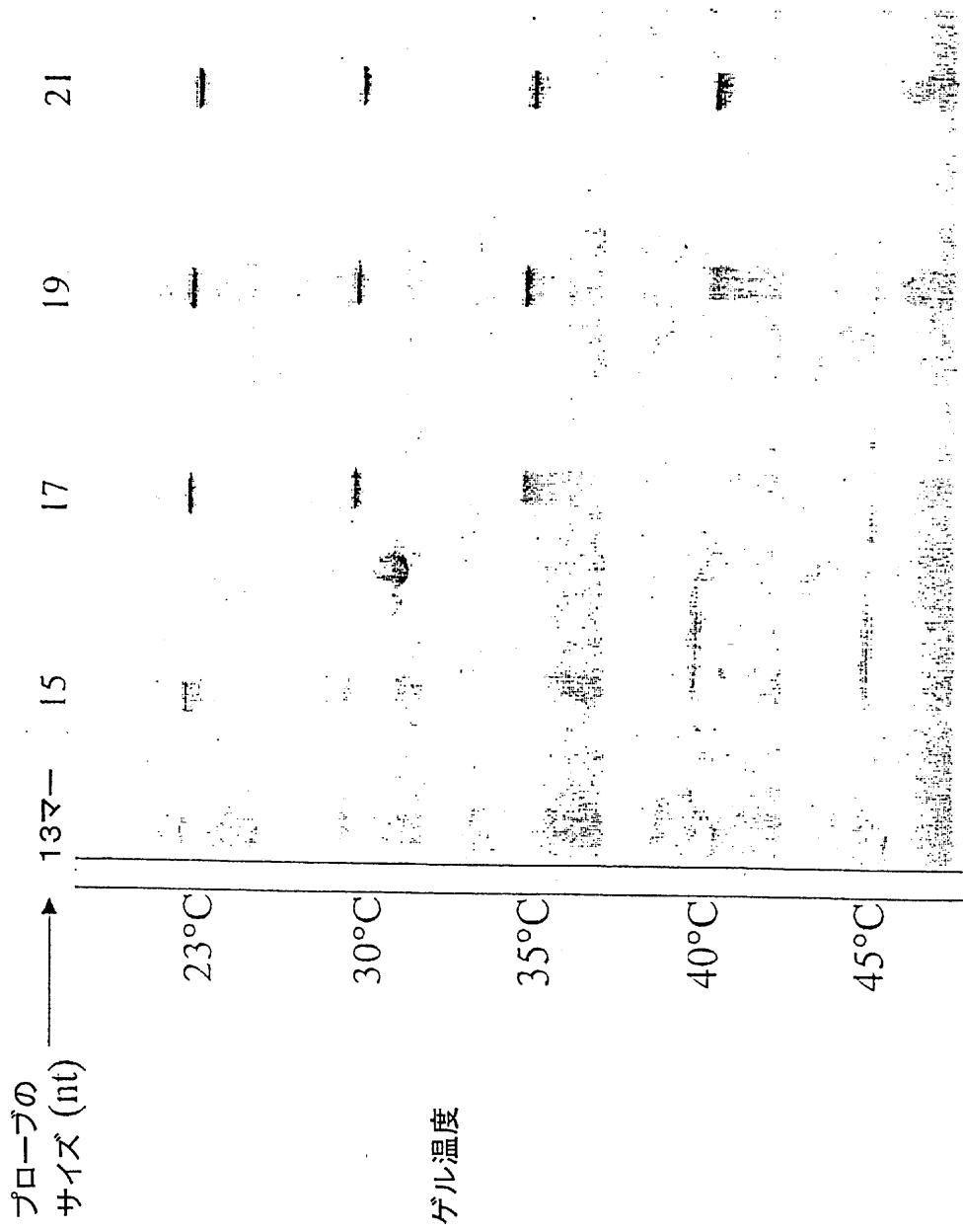


Fig. 7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Int. Patent Application No PCT/US 00/04771
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 776 700 A (INST OF PHYSICAL AND CHEMICAL) 4 June 1997 (1997-06-04) column 1, line 5 -column 1, line 18 column 1, line 29 -column 2, line 26 column 3, line 3 -column 3, line 39 column 5, line 24 -column 5, line 48 column 6, line 22 -column 6, line 54	1-6, 10-17
Y	column 7, line 22 -column 7, line 56  column 9, line 36 -column 10, line 15 column 10, line 50 -column 11, line 38 figures 1,4,5,7	32-35, 37,38
Y	DE 197 02 907 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30 July 1998 (1998-07-30) column 1, line 3 -column 1, line 62 column 2, line 19 -column 2, line 31 column 3, line 6 -column 3, line 25 column 3, line 39 -column 4, line 17 column 4, line 64 -column 5, line 26 column 6, line 58 -column 7, line 47 figure 1	32-35, 37,38
Y	US 5 453 382 A (TSUDA TAKAO ET AL) 26 September 1995 (1995-09-26)  column 1, line 23 -column 1, line 34 column 1, line 50 -column 2, line 4 column 2, line 61 -column 3, line 14 column 3, line 33 -column 3, line 50 column 4, line 34 -column 4, line 48 column 5, line 7 -column 5, line 39 column 6, line 36 -column 7, line 37 figure 1	18,19, 22, 24-27, 29,30
P,Y	DE 197 51 968 A (LWG LAUSITZER WASSER GMBH & CO) 29 July 1999 (1999-07-29) column 1, line 65 -column 2, line 6 figure 1	20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No

PCT/US 00/04771

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5632957 A	27-05-1997	US 6017696 A	25-01-2000
		US 5605662 A	25-02-1997
		AU 702773 B	04-03-1999
		AU 3507095 A	27-03-1996
		BR 9508908 A	28-10-1997
		CN 1164894 A	12-11-1997
		EP 0871888 A	21-10-1998
		FI 970957 A	07-05-1997
		JP 10505497 T	02-06-1998
		WO 9607917 A	14-03-1996
		US 6068818 A	30-05-2000
		US 5849486 A	15-12-1998
		US 6048690 A	11-04-2000
		US 6051380 A	18-04-2000
		AU 708677 B	12-08-1999
		AU 2966195 A	09-02-1996
		BR 9506035 A	14-10-1997
		CA 2169852 A	25-01-1996
		CN 1135220 A	06-11-1996
		EP 0717749 A	26-06-1996
		FI 961034 A	02-05-1996
		JP 9503307 T	31-03-1997
		NZ 289731 A	24-09-1998
		WO 9601836 A	25-01-1996
		AU 692800 B	18-06-1998
		AU 8125794 A	23-05-1995
		AU 8522798 A	10-12-1998
		AU 8522898 A	10-12-1998
		BR 9407952 A	26-11-1996
		CA 2175483 A	11-05-1995
		CN 1141078 A	22-01-1997
		EP 0727045 A	21-08-1996
		FI 961843 A	20-06-1996
JP 9504910 T	13-05-1997		
NZ 275962 A	28-07-1998		
WO 9512808 A	11-05-1995		
US 5929208 A	27-07-1999		
EP 0776700 A	04-06-1997	CA 2192262 A	09-06-1997
		JP 9215490 A	19-08-1997
		US 5856100 A	05-01-1999
DE 19702907 A	30-07-1998	AU 6213298 A	18-08-1998
		WO 9832877 A	30-07-1998
		EP 0964934 A	22-12-1999
US 5453382 A	26-09-1995	NONE	
DE 19751968 A	29-07-1999	NONE	

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72)発明者 ウェア, ローレンス  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
01748 ホプキントン, グラニット ストリート 55
- (72)発明者 ダーング, ラウル, ケイ.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
02143 サマヴィル, リンデン アベニュー  
- ナンバーツ- 27
- (72)発明者 クロン, ステファン, ジェイ.  
アメリカ合衆国 イリノイ 60302 オーク  
パーク, フェア オークス アベニュー  
- 611

Fターム(参考) 4B029 AA09 AA23 BB20 CC03 CC08  
HA10

专利名称(译)	具有固定化捕获探针的生化纯化装置及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002537781A</a>	公开(公告)日	2002-11-12
申请号	JP2000601418	申请日	2000-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	马赛克技术		
申请(专利权)人(译)	马赛克技术		
[标]发明人	アダムスクリストファーピー ポールズティークリスチャン ウェアローレンス ダーンダラウルケイ クロンステファンジェイ		
发明人	アダムス,クリストファー,ピー. ポールズ,ティー.,クリスチャン ウェア,ローレンス ダーンダ,ラウル,ケイ. クロン,ステファン,ジェイ.		
IPC分类号	B01L3/00 B01L3/02 C12Q1/6806 C12Q1/6834 G01N1/34 G01N27/447 C12M1/00 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	G01N1/405 B01L3/0275 B01L3/5025 B01L3/50255 B01L2200/0631 B01L2300/0829 B01L2300/087 B01L2400/0421 C12N15/1006 C12Q1/6806 C12Q1/6834 G01N1/34 G01N27/44747 G01N2001/4038 C12Q2565/125 C12Q2565/519		
FI分类号	C12M1/00 G01N33/53.M G01N33/566 G01N27/26.315.C		
F-TERM分类号	4B029/AA09 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/HA10		
优先权	60/121836 1999-02-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种装置，其包含至少一个用于纯化和/或浓缩测试样品中包含的靶分子的纯化单元。通常，靶分子是测试样品并且是核酸。这些纯化的核酸可用于多种方法，包括对其进行核苷酸序列分析。还提供了使用设备的方法以及包含该设备的套件。

