

明 細 書

発明の名称：

キャピラリ電気泳動装置およびキャピラリ電気泳動法

技術分野

[0001] 本発明は、キャピラリ電気泳動装置およびキャピラリ電気泳動法に関する。

背景技術

[0002] 分析化学における機器分析は、核磁気共鳴スペクトル法、吸光分光法、ラマン分光法、蛍光分光法、質量分析法、クロマトグラフィー分析法、電気泳動分析法、等々を行う機器を用いた分析である。

[0003] 非特許文献1および非特許文献2に示されているように、これらの機器分析では、外部標準法（絶対検量線法）または内部標準法（内標準法）を用いて、サンプルに含まれる分析対象の未知の濃度を定量することが多い。

[0004] 外部標準法は、種々の既知濃度の分析対象を含む標準サンプルを用いて、分析対象の濃度と信号強度の関係である検量線をあらかじめ作成し、サンプルに含まれる分析対象の未知の濃度を定量する方法である。一般に、分析対象の濃度に対して信号強度が比例、つまり分析対象の濃度に対する信号強度の増加が直線的であり、分析対象の濃度に対する信号強度の増加率が一定である場合が想定されている。

[0005] ただし、分析対象の濃度に対する信号強度の増加が非直線的である場合、例えば、分析対象の濃度に対する信号強度の増加率が分析対象の濃度とともに減少する場合であっても、外部標準法は機能し得る。しかしながら、外部標準法では、サンプルのマトリクス効果の影響や、サンプルの分析機器への注入量のばらつきの影響により、定量精度が低くなる。

[0006] これに対して、内部標準法は、これらの影響を低減して定量精度を向上させる方法である。種々の既知濃度の分析対象と既知濃度の内部標準を含む標準サンプルを用いて、内部標準に対する分析対象の濃度比と、内部標準に対

する分析対象の信号強度比の関係である検量線をあらかじめ作成しておき、サンプルに含まれる分析対象の未知の濃度を定量する方法である。

- [0007] ここで、内部標準と分析対象の信号強度をそれぞれ独立に計測できることが必要である。非特許文献1および非特許文献2に示されているように、内部標準法では、分析対象および内部標準の濃度に対してそれぞれの信号強度が比例、つまり分析対象および内部標準の濃度に対するそれぞれの信号強度の増加が直線的であることが必要である。
- [0008] これに対して、分析対象および内部標準の濃度に対するそれぞれの信号強度の増加が非直線的である場合、内部標準法は機能しない。つまり、サンプルのマトリクス効果の影響や、サンプルの分析機器への注入量のばらつきの影響を低減して、定量精度を向上させることはできない。それどころか、非特許文献2で指摘されている通り、定量精度がむしろ低下することが知られている。
- [0009] 上記を、レーザ誘起蛍光計測のキャピラリー電気泳動分析によって、サンプルに含まれる分析対象である蛍光標識されたDNA断片の濃度 $C(tg)$ を定量する場合について、より具体的に説明する。本明細書では、数式に用いる係数または変数に用いる添え字を、括弧内に示す場合がある。例えば、変数 C に添え字 tg が付される場合に、 $C(tg)$ と表現される場合もあり、 C_{tg} と表現される場合もある。
- [0010] 特許文献1の図1において、4本のキャピラリー電気泳動分析を並列処理するキャピラリー電気泳動装置を用いて、この内の1本のキャピラリーを用いて電気泳動分析を行う。サンプルには、分析対象の蛍光標識されたDNA断片以外の、蛍光標識されたDNA断片が含まれていても良い。また、サンプルに含まれるDNA断片以外の塩（イオン）は、エタノール沈殿やカラム精製を用いて、あらかじめ可能な限り除去しておく。
- [0011] まず、サンプルの一部が電界注入によってキャピラリーのサンプル注入端から注入される。一般に、注入されるDNA断片の量は、電界注入の電界強度 E と時間 T 、および、サンプル中のDNA断片の濃度 $C(tg)$ に比例する。

[0012] 次に、注入されたDNA断片が電気泳動によってキャピラリのサンプル溶出端に向かって移動しながら、塩基長によって分離される。この際、電気泳動によってキャピラリ上の計測点を通過するDNA断片がレーザービームに照射され、DNA断片に標識された蛍光体が蛍光を発光する。

[0013] 発光される蛍光はイメージセンサによって逐次計測され、その時系列がエレクトロフェログラムを与える。エレクトロフェログラム上に、分析対象のDNA断片に対応するピークが得られる。

[0014] 分析対象のDNA断片の信号強度 $S(tg)$ は、一般に分析対象のDNA断片のピークの面積で示されるが、ピークの幅が一定と見なせる場合は、分析対象のDNA断片のピークの高さで示される。分析対象であるDNA断片の信号強度 $S(tg)$ は、キャピラリに注入された分析対象のDNA断片の量に比例するため、比例係数を $K(tg)$ として、

[数1]

$$S_{tg} = K_{tg} \cdot E \cdot T \cdot C_{tg} \quad (\text{数1})$$

である。ここで、 E は電界注入時のキャピラリのサンプル注入端近傍のサンプル中の実効的な電界強度、 T は電界注入の時間を表す。

[0015] E と T を固定すると、(数1)は、分析対象のDNA断片の信号強度 $S(tg)$ が、サンプル中の分析対象のDNA断片の濃度 $C(tg)$ に比例することを示し、外部標準法の検量線となる。(数1)を用いて、計測される分析対象のDNA断片の信号強度 $S(tg)$ から、サンプルに含まれる分析対象の未知の濃度 $C(tg)$ を定量することができる。

[0016] 一方、内部標準法では、サンプルに既知濃度の内部標準であるDNA断片を混合してキャピラリ電気泳動分析を行う。内部標準のDNA断片も蛍光標識されている。エレクトロフェログラム上に、分析対象のDNA断片のピークと、内部標準のDNA断片のピークが独立に観察される。内部標準のDNA断片の信号強度 $S(st)$ は、キャピラリに注入された内部標準のDNA断片の量に比例するため、比例係数を $K(st)$ として、

[数2]

$$S_{st} = K_{st} \cdot E \cdot T \cdot C_{st} \quad (\text{数 } 2)$$

[0017] である。(数2)は、内部標準のDNA断片の信号強度 $S(st)$ が、サンプル中の内部標準のDNA断片の濃度 $C(st)$ に比例することを示す。サンプル中の、分析対象のDNA断片と、内部標準のDNA断片の電界注入は一括で行われるため、(数1)と(数2)の電界注入の電界強度 E と時間 T は同一である。したがって、(数1)と(数2)の比を取ることで、

[数3]

$$\frac{S_{tg}}{S_{st}} = \frac{K_{tg}}{K_{st}} \cdot \frac{C_{tg}}{C_{st}} \quad (\text{数 } 3)$$

が得られる。(数3)は、内部標準に対する分析対象のDNA断片の信号強度比 $S(tg)/S(st)$ が、サンプル中の内部標準に対する分析対象のDNA断片の濃度比 $C(tg)/C(st)$ に比例することを示し、内部標準法の検量線となる。

[0018] (数3)を用いて、計測される内部標準に対する分析対象のDNA断片の信号強度比 $S(tg)/S(st)$ から、サンプル中の内部標準に対する分析対象のDNA断片の濃度比 $C(tg)/C(st)$ を定量することができる。これは、サンプル中の内部標準のDNA断片の濃度 $C(st)$ は既知であるため、サンプル中の分析対象のDNA断片の未知の濃度 $C(tg)$ を定量することと同義である。

[0019] (数1)による外部標準法では、例えば、電界注入の電界強度 E が $\pm 10\%$ ばらついたとすると、(数1)から明らかなように、このばらつきは分析対象のDNA断片の濃度の定量精度の低下に直接的につながる。これに対して、(数3)による内部標準法では、(数3)に電界注入の電界強度 E が含まれていないため、このばらつきは分析対象のDNA断片の濃度の定量精度に影響を与えない。(数1)における電界強度 E のばらつきの影響と、(数2)における電界強度 E のばらつきの影響は同じであり、(数1)と(数2)の比を取ることで、それらの影響がキャンセルしたためである。以上が、外部標準法と比較して、内部標準法による分析対象の定量精度を向上できる理由である。

先行技術文献

特許文献

[0020] 特許文献1：国際公開第2023/007567号公報

非特許文献

[0021] 非特許文献1：Harvey, David. Modern analytical chemistry. Vol. 1. New York: McGraw-Hill, 2000.

非特許文献2：A. K. Hewavitharana (2009) Internal Standard-Friend or Foe?, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 39:4, 272-275

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0022] 分析対象の濃度に対して信号強度が比例しない場合、外部標準法は機能し得るが、内部標準法は機能しない理由を考察する。

[0023] 例として、非特許文献2に倣い、分析対象の信号強度が濃度の2次関数で表されたとすると、 $L(tg)$ と $K(tg)$ を係数として、

[数4]

$$S_{tg} = L_{tg} \cdot (E \cdot T \cdot C_{tg})^2 + K_{tg} \cdot E \cdot T \cdot C_{tg} \quad (\text{数4})$$

である。 $C(tg)=0$ のときに $S(tg)=0$ となるように、2次関数の定数項はゼロとした。因みに、 $L(tg)=0$ の場合、(数4)は(数1)と同じになる。

[0024] 外部標準法では(数4)が検量線である。(数1)の場合と同様に、(数4)を用いて、計測される分析対象のDNA断片の信号強度 $S(tg)$ から、サンプルに含まれる分析対象の未知の濃度 $C(tg)$ を定量することができる。

[0025] 一方、同様に、内部標準の信号強度が濃度の2次関数で表されたとすると、 $L(st)$ と $K(st)$ を係数として、

[数5]

$$S_{st} = L_{st} \cdot (E \cdot T \cdot C_{st})^2 + K_{st} \cdot E \cdot T \cdot C_{st} \quad (\text{数5})$$

である。 $C(tg)=0$ のときに $S(tg)=0$ となるように、2次関数の定数項はゼロとし

た。因みに、 $L(st)=0$ の場合、(数5)は(数2)と同じになる。

[0026] このとき、(数3)と異なり、(数4)と(数5)の比を取っても、式は簡略化されず、内部標準に対する分析対象のDNA断片の信号強度比 $S(tg)/S(st)$ を、サンプル中の内部標準に対する分析対象のDNA断片の濃度比 $C(tg)/C(st)$ で表すことができない。さらに、(数3)と異なり、電界注入の電界強度 E と時間 T が残るため、それらのばらつきの影響をキャンセルすることができない。したがって、内部標準法による分析対象の定量精度が外部標準と比較して向上することがない。それどころか、(数4)による外部標準法よりも定量精度が低くなる。非特許文献2に記載されている通り、分析対象と内部標準のいずれか一方が濃度に対して信号強度が比例しないと、内部標準法による定量精度が低下する。

[0027] 以上は、分析対象および内部標準の信号強度がそれぞれの濃度の2次関数で表される例について考察したが、定数項がゼロの1次関数以外の任意の関数で表される場合についても同様である。以上より、分析対象の濃度に対して信号強度が比例しない場合、内部標準法を用いて定量精度を向上させることができない。

[0028] 一方、特許文献1では、イメージセンサのノイズ条件に応じてビニング条件を最適化することによって、キャピラリ電気泳動装置の蛍光計測のダイナミックレンジを向上する提案がなされている。特許文献1に従うと、従来よりも幅広い濃度範囲のDNA断片のサンプル中の濃度を定量することができるようになることが期待される。

[0029] しかしながら、実際に試してみたところ、サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が低いときは濃度に比例する信号強度が得られたが、サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が高くなると濃度に対して信号強度が飽和する現象が見出された。また、この飽和する信号強度は、イメージセンサが飽和する信号強度よりも低いため、イメージセンサの飽和が原因ではないことが判明した。

[0030] この現象は、従来よりも広いダイナミックレンジを有するキャピラリ電気

泳動装置を用いることによって明らかになった新しい課題である。サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が低いときは、分析対象のDNA断片の濃度に比例する信号強度が得られるため、内部標準法を用いて分析対象の定量精度を向上させることが可能である。しかしながら、サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が高いときは、分析対象のDNA断片の濃度に比例しない信号強度が得られるため、内部標準法を用いて分析対象の定量精度を向上させることが不可能である。

[0031] 本発明はこのような課題を解決するためになされたものであり、内部標準法を用いて分析対象の定量精度を向上させることができる、キャピラリー電気泳動装置およびキャピラリー電気泳動法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0032] 本発明に係るキャピラリー電気泳動装置の一例は、
第1の成分と第2の成分を含むサンプルをキャピラリーに注入し、
注入された前記第1の成分と前記第2の成分を電気泳動分離し、
前記キャピラリー上に光を照射して誘起される前記第1の成分からの発光と前記第2の成分からの発光を検出器で計測し、これによって、前記第1の成分の信号強度と前記第2の成分の信号強度を取得する、
キャピラリー電気泳動装置において、
前記サンプルに含まれる前記第1の成分の濃度範囲が、前記第1の成分の濃度に対して前記第1の成分の信号強度が比例する濃度範囲に加えて、前記第1の成分の濃度に対して前記第1の成分の信号強度が、前記検出器の飽和信号強度よりも低く、かつ比例から外れて飽和信号強度に至る濃度範囲を含んでおり、
前記キャピラリー電気泳動装置は、前記第2の成分の信号強度に対する前記第1の成分の信号強度の比に基づき、前記サンプル中の前記第2の成分の濃度に対する前記第1の成分の濃度の比を定量することを特徴とする。

[0033] 本発明に係るキャピラリー電気泳動装置の一例は、

第1の成分と第2の成分を含むサンプルをキャピラリーに注入し、
注入された前記第1の成分と前記第2の成分を電気泳動分離し、
前記キャピラリー上に光を照射して誘起される前記第1の成分からの発光と前記第2の成分からの発光を検出器で計測し、これによって、前記第1の成分の信号強度と前記第2の成分の信号強度を取得する、
キャピラリー電気泳動装置において、
前記サンプルに含まれる前記第1の成分の濃度範囲が、前記第1の成分の濃度に対して前記第2の成分の信号強度が一定である濃度範囲に加えて、前記第1の成分の濃度に対して前記第2の成分の信号強度が、一定から外れて減少する濃度範囲を含んでおり、
前記キャピラリー電気泳動装置は、前記第2の成分の信号強度に対する前記第1の成分の信号強度の比に基づき、前記サンプル中の前記第2の成分の濃度に対する前記第1の成分の濃度の比を定量することを特徴とする。

- [0034] 本発明に係るキャピラリー電気泳動法の一例は、
第1の成分と第2の成分を含むサンプルをキャピラリーに注入することと、
注入された前記第1の成分と前記第2の成分を電気泳動分離することと、
前記キャピラリー上に光を照射して誘起される前記第1の成分からの発光と前記第2の成分からの発光を検出器で計測し、これによって、前記第1の成分の信号強度と前記第2の成分の信号強度を取得することと、
を備える、キャピラリー電気泳動法において、
前記サンプルに含まれる前記第1の成分の濃度範囲が、前記第1の成分の濃度に対して前記第1の成分の信号強度が比例する濃度範囲に加えて、前記第1の成分の濃度に対して前記第1の成分の信号強度が、前記検出器の飽和信号強度よりも低く、かつ比例から外れて飽和信号強度に至る濃度範囲を含んでおり、
前記キャピラリー電気泳動法は、前記第2の成分の信号強度に対する前記第1の成分の信号強度の比に基づき、前記サンプル中の前記第2の成分の濃度に対

する前記第1の成分の濃度の比を定量することを備えることを特徴とする。

- [0035] 本発明に係るキャピラリ電気泳動法の一例は、
第1の成分と第2の成分を含むサンプルをキャピラリに注入することと、
注入された前記第1の成分と前記第2の成分を電気泳動分離することと、
前記キャピラリ上に光を照射して誘起される前記第1の成分からの発光と前記第2の成分からの発光を検出器で計測し、これによって、前記第1の成分の信号強度と前記第2の成分の信号強度を取得することと、
を備える、キャピラリ電気泳動法において、
前記サンプルに含まれる前記第1の成分の濃度範囲が、前記第1の成分の濃度に対して前記第2の成分の信号強度が一定である濃度範囲に加えて、前記第1の成分の濃度に対して前記第2の成分の信号強度が、一定から外れて減少する濃度範囲を含んでおり、
前記キャピラリ電気泳動法は、前記第2の成分の信号強度に対する前記第1の成分の信号強度の比に基づき、前記サンプル中の前記第2の成分の濃度に対する前記第1の成分の濃度の比を定量することを備えることを特徴とする。

発明の効果

- [0036] 本発明で見出された新規の内部標準法を用いることによって、サンプルに含まれる、従来よりも幅広い濃度範囲のDNA断片を高精度に定量することができるようになる。
- [0037] 上記した以外の、課題、構成及び効果は、以下の実施形態の説明により明らかにされる。

図面の簡単な説明

- [0038] [図1A]本発明の一実施例に係るキャピラリ電気泳動装置の構成
[図1B]本発明の一実施例に係るキャピラリ電気泳動法の構成
[図2]電界注入の模式図
[図3]種々の濃度のサンプルのエレクトロフェログラム

[図4]サンプルの濃度と蛍光強度の関係（その1）

[図5]サンプルの濃度と蛍光強度の関係（その2）

[図6]2種類のサイズスタンダードを比率を変えて混合したサンプルのエレクトロフェログラム（その1）

[図7]2種類のサイズスタンダードを比率を変えて混合したサンプルのエレクトロフェログラム（その2）

[図8]サンプルの濃度と2種類のDNA断片の蛍光強度および蛍光強度比の関係（その1）

[図9]サンプルの濃度と3種類のDNA断片の蛍光強度の関係

[図10]サンプルの濃度と2種類のDNA断片の蛍光強度および蛍光強度比の関係（その2）

[図11]サンプルの濃度と2種類のDNA断片の蛍光強度比の関係

発明を実施するための形態

[0039] [原理]

上記の、キャピラリー電気泳動分析において、サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が低いときは濃度に比例する信号強度が得られ、サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が高いと濃度に対して信号強度が飽和する現象の原因を考察した。

[0040] イメージセンサが飽和することが原因でないとすると、他に考えられる原因は計測点における蛍光体の自己消光である。一般に、蛍光体の濃度が非常に高くなると蛍光体の自己消光が発生し、蛍光体の濃度に応じて蛍光強度の増大率が低下し、蛍光強度が飽和に至ることが知られている。また、さらに蛍光体の濃度が増加すると、蛍光強度が減少に転じる場合があることも知られている。

[0041] 上記のキャピラリー電気泳動分析における自己消光の有無を検証するため、分析対象が複数種類のDNA断片であり、それぞれの濃度が異なっているサンプルを上記のキャピラリー電気泳動装置で分析した。サンプルのDNA断片の濃度を増大させるときは、サンプル中の複数種類のDNA断片の濃度比を保ったまま、

複数種類のDNA断片の合計濃度を増大させた。

[0042] 複数種類のDNA断片は、キャピラリー電気泳動によって空間的に分離され、計測点におけるレーザ誘起蛍光計測によって互いに独立に検出され、それぞれがエレクトロフェログラム上の異なるピークを与えた。

[0043] サンプル中の濃度が高いDNA断片は高い強度のピークを与え、サンプル中の濃度が低いDNA断片は低い強度のピークを与えた。サンプルに含まれる分析対象の複数種類のDNA断片の合計濃度が低いときは、それぞれのDNA断片の濃度に比例する信号強度が得られた。それに対して、サンプルに含まれる分析対象の複数種類のDNA断片の合計濃度が高いときは、それぞれのDNA断片の濃度に比例しない信号強度が得られた。すなわち、サンプル中の濃度に対応する、エレクトロフェログラム上のピークの強度の大小に関わらず、「信号強度がDNA断片のサンプル中の濃度に比例する」状態から、「信号強度がDNA断片のサンプル中の濃度に比例しない」状態への変化が同時に生じた。

[0044] 蛍光体の自己消光の程度は、キャピラリー上の計測点における蛍光体の濃度に依存するはずである。しかしながら、上記の変化がキャピラリー上の計測点における蛍光体の濃度に依存せず生じている。以上から、本現象の原因は蛍光体の自己消光ではないことが判明した。したがって、上記のキャピラリー電気泳動分析では、キャピラリーの計測点におけるDNA断片およびDNA断片に標識されている蛍光体の濃度は、自己消光を生じる濃度には達していない。もちろん、本現象はイメージセンサの飽和によっても発生しないため、本現象の原因はイメージセンサの飽和によるものでもない。したがって、上記のキャピラリー電気泳動分析では、キャピラリーの計測点におけるDNA断片およびDNA断片に標識されている蛍光体の濃度は、イメージセンサの飽和を生じる濃度には達していない。

[0045] そこで以下のように、本発明に係る検討によって独自に本現象の原因を解明した。本現象は本発明に係る検討で初めて見出されたものであり、その原因も本発明に係る検討で初めて見出されたものである。さらに、本現象を許容しながら、見出された原因に基づいて、独自の新たな内部標準法を考案し

、分析対象の高精度な定量分析を可能とする。

[0046] [実施形態 1]

図1Aは、キャピラリー電気泳動装置の構成図である。キャピラリー電気泳動装置は、DNAシーケンスやDNAフラグメント解析を行う分析装置として広く用いられている。4本のキャピラリー1を用い、各キャピラリー1で異なるサンプルを分析することができる。

[0047] 図1Bは、キャピラリー電気泳動法の構成である。図1Bの(1)～(8)の工程を備えるキャピラリー電気泳動法によって、1回のキャピラリー電気泳動分析を実行する。(1)～(8)の工程を繰り返すことによって複数回のキャピラリー電気泳動分析を実行することができる。

[0048] (1) まず、4本のキャピラリー1のサンプル注入端2を陰電極側緩衝液6に浸し、サンプル溶出端3をポンプブロック10内部のポリマ溶液8を介して陽電極側緩衝液7に接続する。

[0049] (2) 次に、ポンプブロック10のバルブ11を閉じ、ポンプブロック10に接続されたシリンジ12のピストンを押し下げることにより内部のポリマ溶液8に加圧し、ポリマ溶液8を各キャピラリー1の内部に、サンプル溶出端3からサンプル注入端2に向かって充填する。

[0050] (3) 続いて、バルブ11を開け、4本のキャピラリー1のサンプル注入端2のそれぞれを異なるサンプル9に浸し、陰電極4と陽電極5の間に電源13により一定電圧を一定時間印加することにより、各キャピラリー1にサンプル注入端2から異なるサンプル9（少なくとも第1の成分および第2の成分を含む）の一部を電界注入する。これによって、第1の成分と第2の成分を含むサンプル9をキャピラリーに注入する。

[0051] (4) その後、4本のキャピラリー1のサンプル注入端2を陰電極側緩衝液6に浸し、陰電極4と陽電極5の間に電源13により高電圧を印加することにより、キャピラリー電気泳動を開始する。蛍光体で標識されたDNA断片を、サンプル注入端2からサンプル溶出端3に向かって電気泳動させる。これによって、注入された第1の成分と第2の成分を電気泳動分離する。

- [0052] (5) 並行して、各キャピラリ1の、サンプル注入端2から一定距離電気泳動された位置を計測点16とし、レーザ光源15から発振されたレーザビーム14を各計測点16に一括照射する。ここで、計測点16近傍の各キャピラリ1の被覆を予め除去し、計測点16近傍の各キャピラリ1を同一平面上に配列し、レーザビーム14を絞ってから、上記の配列平面の側方より、配列平面に沿って導入する。
- [0053] (6) そして、蛍光体で標識されたDNA断片が計測点16を通過する際にレーザビーム14の照射によって励起され、蛍光を発光する。つまり、4個の計測点16から発光される蛍光の強度がそれぞれ、電気泳動に伴い、時々刻々と変化する。
- [0054] (7) 次に、各計測点16から発光される蛍光を検出器17によって計測する。すなわち、キャピラリ1上にレーザビームを照射して誘起される第1の成分からの発光蛍光と第2の成分からの発光蛍光を検出器17で計測し、これによって、第1の成分の信号強度と第2の成分の信号強度を取得する。これらの信号強度の時系列データであるエレクトロフェログラムを取得し、各キャピラリ1に注入されたサンプル9の解析を行う。検出器17は分光器とイメージセンサを含み（不図示）、4個の計測点16から発光蛍光を同時かつ独立に分光計測できる。このため、複数種類の蛍光体の発光蛍光を識別することが可能である。
- [0055] (8) 最後に、第2の成分の信号強度に対する第1の成分の信号強度の比に基づき、サンプル中の第2の成分の濃度に対する第1の成分の濃度の比を定量する。この定量は、上記「原理」の説明に基づき、以下に検証する手法によって可能となる。
- [0056] 図2は、キャピラリ電気泳動分析における、サンプル9の電界注入を模式的に表している。ポリマ溶液8が充填された1本のキャピラリ1のサンプル注入端2が溶液状のサンプル9に浸漬されており、図2(a)は電界注入前、図2(b)は電界注入後を示している。図2(b)の後には、サンプル注入端2を陰電極側緩衝液に浸漬し、電気泳動を開始する。
- [0057] サンプル9には、負イオンである第1DNA断片18（第1の成分）、第2DNA断片1

9（第2の成分）、およびDNA断片以外の負イオン20が含まれている。分析対象である第1DNA断片18および第2DNA断片19は、いずれも蛍光体が標識されたDNA断片である。第1DNA断片18の塩基長と第2DNA断片19の塩基長は異なる。第1DNA断片18および第2DNA断片19は、サンプル9中の濃度が異なる。

[0058] 後述する具体例のように、サンプル9はサイズスタンダードを含んでいてもよく、第2DNA断片19は、サイズスタンダードに含まれるDNA断片であってもよい。また、サンプル9はPCR産物を含んでいてもよく、第1DNA断片18は、PCR産物であるDNA断片またはPCR産物由来のDNA断片であってもよい。また、サンプル9は1塩基伸長産物を含んでいてもよく、第1DNA断片18は、1塩基伸長産物である第1のDNA断片であってもよく、第2DNA断片19は、1塩基伸長産物である第2のDNA断片であってもよい。

[0059] この例では、複数種類のDNA断片の最も簡単な例として、主として2種類のDNA断片を取り扱うが、3種類以上の任意の種類数のDNA断片についても同様の考察が可能であることは言うまでもない。

[0060] 図2では陽イオン、陰電極を省略している。サンプル9の溶媒は純水またはホルムアミドである。サンプル9は、事前に、可能な限りDNA断片以外の負イオン（塩）をエタノール沈殿等によって取り除いておくが、ゼロにすることはできない。

[0061] 図2(a)の状態、キャピラリ1のサンプル注入端2を陰電極側、サンプル溶出端3を陽電極側として、キャピラリ1の両端に、電圧×時間の値が一定となるように電圧を印加することで電界注入を行う。たとえば一定電圧を一定時間印加してもよい。これによって図2(b)の状態になる。図2(b)に示されるように、サンプル9中の負イオンである第1DNA断片18、第2DNA断片19、およびDNA断片以外の負イオン20の一部がキャピラリ1のサンプル注入端2からキャピラリ1内部に注入される。このときの各負イオンの注入量を以下で見積もる。

[0062] 陰電極と陽電極の間に一定電圧 V を印加した際に流れる電流 I は、ポリマ溶液8が充填されたキャピラリ1の電気抵抗 R でほぼ決まり、 $I \approx V/R$ である。これは、陰電極4（図1A）とキャピラリ1のサンプル注入端2の間の電気抵抗 $R(i)$ 、

およびキャピラリのサンプル溶出端3（図1A）と陽電極5（図1A）の間の電気抵抗 $R(o)$ が、 R と比較して十分に小さいため（ $R \gg R(i)$ 、 $R(o)$ ）である。つまり、陰電極4と陽電極5の間の合成抵抗 $R(i) + R + R(o)$ は近似的に R と等しい（ $R(i) + R + R(o) \div R$ ）。

[0063] このため、サンプルの組成を問わず、例えばサンプルが純水であっても高イオン濃度溶液であっても、陰電極と陽電極の間に一定電圧 V を印加した際に流れる電流 I は殆ど変化しない。このため、「陰電極と陽電極の間に一定電圧を印加する」を、「キャピラリの両端に一定電圧を印加する」と表現することがある。

[0064] また、陰電極とキャピラリのサンプル注入端の間を流れる電流 I 、キャピラリ中を流れる電流 I 、およびキャピラリのサンプル溶出端と陽電極の間を流れる電流 I は、電流の連続性より等しい。

[0065] ここで、電界注入の際に陰電極とキャピラリのサンプル注入端の間を流れる電流 I 、すなわちサンプル中を流れる電流 I は、簡単のため正イオンを無視すると、キャピラリに注入される負イオンが担っている。したがって、キャピラリの両端に一定電圧を一定時間印加することによる電界注入によってキャピラリに注入される負イオンの総量はサンプルの組成を問わず一定である。

[0066] 電界注入時のキャピラリのサンプル注入端近傍のサンプル中の実効的な電界強度を E 、電界注入の時間を T 、キャピラリの内断面積を A とする。サンプル中のDNA断片以外の負イオンの移動度を $\mu(0)$ 、濃度を $C(0)$ とすると、電界注入によるDNA断片以外の負イオンの注入分子数 $J(0)$ は、

[数6]

$$J_0 = E \cdot T \cdot A \cdot \mu_0 \cdot C_0 \quad (\text{数 } 6)$$

である。移動度は単位電界強度あたりの各負イオンの移動速度を示す。

[0067] DNA断片以外の負イオンが複数種類存在する場合は、それらの移動度および濃度の平均を $\mu(0)$ および $C(0)$ とする。DNA断片以外の負イオンの分子あたりの平均電荷量を $q(0)$ とすると、電界注入によるDNA断片以外の負イオンの注入

電荷量 $Q(0)$ は、

[数7]

$$Q_0 = q_0 \cdot J_0 = E \cdot T \cdot A \cdot q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0 \quad (\text{数 } 7)$$

である。

[0068] また、サンプル中の第1DNA断片および第2DNA断片の移動度を μ 、第1DNA断片の濃度を $C(1)$ 、第2DNA断片の濃度を $C(2)$ とすると、電界注入による第1DNA断片の注入分子数 $J(1)$ 、第2DNA断片の注入分子数 $J(2)$ は、

[数8]

$$J_1 = E \cdot T \cdot A \cdot \mu \cdot C_1 \quad (\text{数 } 8)$$

[数9]

$$J_2 = E \cdot T \cdot A \cdot \mu \cdot C_2 \quad (\text{数 } 9)$$

である。

[0069] ここで、第1DNA断片と第2DNA断片の移動度を等しくしているのは、分子ふり効果のない溶液中、すなわちサンプル中のDNA断片の移動度は、塩基長によらずに一定であるためである。

[0070] 第1DNA断片および第2DNA断片のそれぞれの分子あたりの平均電荷量を $q(1)$ および $q(2)$ とすると、電界注入による第1DNA断片および第2DNA断片のそれぞれの注入電荷量 $Q(1)$ および $Q(2)$ は、

[数10]

$$Q_1 = q_1 \cdot J_1 = E \cdot T \cdot A \cdot q_1 \cdot \mu \cdot C_1 \quad (\text{数 } 10)$$

[数11]

$$Q_2 = q_2 \cdot J_2 = E \cdot T \cdot A \cdot q_2 \cdot \mu \cdot C_2 \quad (\text{数 } 11)$$

である。

[0071] サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の合計濃度を $C=C(1)+C(2)$ とすると、電界注入による第1DNA断片と第2DNA断片の合計注入分子数 J は、

[数12]

$$J = J_1 + J_2 = E \cdot T \cdot A \cdot \mu \cdot C \quad (\text{数 } 12)$$

である。

[0072] ここで、第1DNA断片および第2DNA断片のそれぞれの分子あたりの平均電荷量が等しく、 $q=q(1)=q(2)$ と近似できる場合、電界注入による第1DNA断片および第2DNA断片の合計注入電荷量 Q は、

[数13]

$$Q = q \cdot J = E \cdot T \cdot A \cdot q \cdot \mu \cdot C \quad (\text{数 } 13)$$

である。あるいは、サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の合計濃度 C に対する、第1DNA断片および第2DNA断片の濃度 $C(1)$ および $C(2)$ の比率が一定である場合、 $q=(q(1) \cdot C(1)+q(2) \cdot C(2))/(C(1)+C(2))$ と定義することによっても（数13）が得られる。

[0073] （数6）～（数13）において、 E 、 T 、および A は同一の値である。電界注入時の、単位時間あたりの負イオンの注入電荷量の合計が電流 I と等しいため、

[数14]

$$\frac{Q_0+Q_1+Q_2}{T} = I \quad (\text{数 } 14)$$

すなわち、

[数15]

$$E \cdot A = \frac{I}{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0 + q_1 \cdot \mu \cdot C_1 + q_2 \cdot \mu \cdot C_2} \quad (\text{数 } 15)$$

である。

[0074] （数14）および（数15）は、上述のように I が一定であるため、電界注入が、サンプルに含まれるDNA断片を含む複数種類の負イオンの間の競合工程であり、それぞれの負イオンの注入電荷量はそれぞれの負イオンの電荷量、移動度、および濃度の積に応じて配分されることを意味する。電流に対する正イオンの寄与を考慮する場合は、電流に対する負イオンの寄与率を（数14）の

右辺に乗ずれば良い。

[0075] (数15)を用いると、(数8)～(数11)は次のように変形できる。

[数16]

$$J_1 = \frac{\frac{I \cdot T}{q_1}}{1 + \frac{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0 + q_2 \cdot \mu \cdot C_2}{q_1 \cdot \mu \cdot C_1}} \quad (\text{数 } 16)$$

[数17]

$$J_2 = \frac{\frac{I \cdot T}{q_2}}{1 + \frac{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0 + q_1 \cdot \mu \cdot C_1}{q_2 \cdot \mu \cdot C_2}} \quad (\text{数 } 17)$$

[数18]

$$Q_1 = \frac{I \cdot T}{1 + \frac{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0 + q_2 \cdot \mu \cdot C_2}{q_1 \cdot \mu \cdot C_1}} \quad (\text{数 } 18)$$

[数19]

$$Q_2 = \frac{I \cdot T}{1 + \frac{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0 + q_1 \cdot \mu \cdot C_1}{q_2 \cdot \mu \cdot C_2}} \quad (\text{数 } 19)$$

[0076] また、上述のように $q=q(1)=q(2)$ と近似できる場合、(数12)と(数13)は次のように変形できる。

[数20]

$$J = \frac{\frac{I \cdot T}{q}}{1 + \frac{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0}{q \cdot \mu \cdot C}} \quad (\text{数 } 20)$$

[数21]

$$Q = \frac{I \cdot T}{1 + \frac{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0}{q \cdot \mu \cdot C}} \quad (\text{数 } 21)$$

[0077] あるいは、サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の合計濃度 C に対する、第1DNA断片および第2DNA断片の濃度 $C(1)$ および $C(2)$ の比率が一定である場合、 $q=(q(1) \cdot C(1) + q(2) \cdot C(2)) / (C(1) + C(2))$ と定義することによっても (数20

)と(数21)が得られる。

[0078] 一方、キャピラリ電気泳動によって得られるエレクトロフェログラム上の第1DNA断片および第2DNA断片のピークの信号強度 $S(1)$ および $S(2)$ は、それぞれの感度係数を $m(1)$ および $m(2)$ とすると、(数8)および(数9)より、
[数22]

$$S_1 = m_1 \cdot J_1 = E \cdot T \cdot A \cdot m_1 \cdot \mu \cdot C_1 \quad (\text{数 } 22)$$

[数23]

$$S_2 = m_2 \cdot J_2 = E \cdot T \cdot A \cdot m_2 \cdot \mu \cdot C_2 \quad (\text{数 } 23)$$

であり、(数15)を用いると、

[数24]

$$S_1 = \frac{\frac{m_1 \cdot I \cdot T}{q_1}}{1 + \frac{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0 + q_2 \cdot \mu \cdot C_2}{q_1 \cdot \mu \cdot C_1}} \quad (\text{数 } 24)$$

[数25]

$$S_2 = \frac{\frac{m_2 \cdot I \cdot T}{q_2}}{1 + \frac{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0 + q_1 \cdot \mu \cdot C_1}{q_2 \cdot \mu \cdot C_2}} \quad (\text{数 } 25)$$

である。尚、感度係数には、DNA断片の分子あたりの平均の標識蛍光体数、蛍光体の励起効率、蛍光体の量子収率、発光蛍光の集光効率、イメージセンサの感度、等々が含まれる。

[0079] また、第1DNA断片および第2DNA断片のそれぞれの感度係数を $m(1)$ および $m(2)$ が等しいと近似できる場合、 $m=m(1)=m(2)$ として、キャピラリ電気泳動によって得られるエレクトロフェログラム上の第1DNA断片および第2DNA断片のピークの合計信号強度 S は、(数12)より、
[数26]

$$S = m \cdot J = E \cdot T \cdot A \cdot m \cdot \mu \cdot C \quad (\text{数 } 26)$$

である。あるいは、サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の合計濃度 C に対す

る、第1DNA断片および第2DNA断片の濃度 $C(1)$ および $C(2)$ の比率が一定である場合、 $m=(m(1) \cdot C(1)+m(2) \cdot C(2))/(C(1)+C(2))$ と定義することによっても（数26）が得られる。

[0080] （数15）を用いて $q=q(1)=q(2)$ と近似すると、

[数27]

$$S = \frac{\frac{m \cdot I \cdot T}{q}}{1 + \frac{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0}{q \cdot \mu \cdot C}} \quad (\text{数 } 27)$$

である。あるいは、サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の合計濃度 C に対する、第1DNA断片および第2DNA断片の濃度 $C(1)$ および $C(2)$ の比率が一定である場合、 $q=(q(1) \cdot C(1)+q(2) \cdot C(2))/(C(1)+C(2))$ と定義することによっても（数27）が得られる。

[0081] （数16）～（数21）、（数24）、（数25）、および（数27）は、 a と b を定数として、 y が x の関数である次式で表すことができる。

[数28]

$$y = \frac{a}{1 + \frac{b}{x}} \quad (\text{数 } 28)$$

[0082] 例えば、（数16）は、 $y=J(1)$ 、 $x=C(1)$ 、 $a=I \cdot T/q(1)$ 、 $b=(q(0) \cdot \mu(0) \cdot C(0)+q(2) \cdot \mu \cdot C(2))/(q(1) \cdot \mu)$ とすると、（数28）になる。（数28）は、 x が b と比較して小さい場合には、比例係数が a/b で y が x に比例するが（ $y=a/b \times x$ ）、 x が b と比較して大きい場合には、 y が x に対して飽和し、一定値 a に漸近することを示す。

[0083] つまり、（数16）は、 $C(1)$ が $b=(q(0) \cdot \mu(0) \cdot C(0)+q(2) \cdot \mu \cdot C(2))/(q(1) \cdot \mu)$ と比較して小さい場合には $J(1)$ が $C(1)$ に比例し、 $C(1)$ が $b=(q(0) \cdot \mu(0) \cdot C(0)+q(2) \cdot \mu \cdot C(2))/(q(1) \cdot \mu)$ と比較して大きい場合には $J(1)$ が $C(1)$ に対して飽和し、一定値に漸近することを示している。

[0084] 一方、（数8）は $J(1)$ が $C(1)$ に比例している関係を示しているため、（数8）と（数16）は矛盾しているように見える。しかしながら、実は、（数8）に

含まれるEがC(1)に応じて変化するため、(数8)においてJ(1)がC(1)に比例するとは限らない。したがって、(数8)と(数16)は矛盾せず、両立する。

[0085] 具体的には、(数15)において、Iが一定であるため、C(0)とC(2)を一定にした状態でC(1)が上昇すると、Eが減少することになる。Eは、電界注入時のキャピラリのサンプル注入端近傍のサンプル中の実効的な電界強度であり、キャピラリの両端に印加する電圧を一定、すなわち平均の電界強度を一定にしても、サンプルの組成に応じてEは変化し得るのである。

[0086] 同様に、(数17)は、C(2)が小さい場合にはJ(2)がC(2)に比例し、C(2)が大きい場合にはJ(2)がC(2)に対して飽和し、一定値に漸近することを示している。(数18)は、C(1)が小さい場合にはQ(1)がC(1)に比例し、C(1)が大きい場合にはQ(1)がC(1)に対して飽和し、一定値に漸近することを示している。(数19)は、C(2)が小さい場合にはQ(2)がC(2)に比例し、C(2)が大きい場合にはQ(2)がC(2)に対して飽和し、一定値に漸近することを示している。(数20)は、Cが小さい場合にはJがCに比例し、Cが大きい場合にはJがCに対して飽和し、一定値に漸近することを示している。(数21)は、Cが小さい場合にはQがCに比例し、Cが大きい場合にはQがCに対して飽和し、一定値に漸近することを示している。(数24)は、C(1)が小さい場合にはS(1)がC(1)に比例し、C(1)が大きい場合にはS(1)がC(1)に対して飽和し、一定値に漸近することを示している。(数25)は、C(2)が小さい場合にはS(2)がC(2)に比例し、C(2)が大きい場合にはS(2)がC(2)に対して飽和し、一定値に漸近することを示している。そして、(数27)は、Cが小さい場合にはSがCに比例し、Cが大きい場合にはSがCに対して飽和し、一定値に漸近することを示している。

[0087] したがって、(数24)、(数25)、および(数27)は、キャピラリ電気泳動分析において、サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が低いときは濃度に比例する信号強度が得られ、サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が高いと濃度に対して信号強度が飽和する現象を説明できている。すなわち、上記現象の原因を特定することができた。これは、(数14)および(数15)を導入することによって初めて得られた知見である。

[0088] また、(数8)と(数16)が矛盾しないのと同様に、(数9)と(数17)、(数10)と(数18)、(数11)と(数19)、(数12)と(数20)、(数13)と(数21)、(数22)と(数24)、(数23)と(数25)、および(数26)と(数27)はそれぞれ矛盾せず、両立する。

[0089] 一方、(数8)および(数9)より、E、T、A、および μ が共通であることから、

[数29]

$$\frac{J_1}{J_2} = \frac{C_1}{C_2} \quad (\text{数 } 29)$$

が成立する。すなわち、電界注入によってキャピラリに注入される第1DNA断片と第2DNA断片の分子数比は、サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の濃度比と等しい。また、(数8)、(数9)、および(数12)より、

[数30]

$$\frac{J_1}{J} = \frac{C_1}{C} \quad (\text{数 } 30)$$

[数31]

$$\frac{J_2}{J} = \frac{C_2}{C} \quad (\text{数 } 31)$$

が成立する。すなわち、電界注入によってキャピラリに注入される第1DNA断片と第2DNA断片の合計分子数に対する第1DNA断片または第2DNA断片の分子数の比率は、サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の合計濃度に対する第1DNA断片または第2DNA断片の濃度の比率と一致する。

[0090] また、(数10)および(数11)より、E、T、A、および μ が共通であることから、

[数32]

$$\frac{Q_1}{Q_2} = \frac{q_1 \cdot C_1}{q_2 \cdot C_2} \quad (\text{数 } 32)$$

が成立する。すなわち、電界注入によってキャピラリに注入される第1DNA断

片と第2DNA断片の電荷量比は、サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の濃度比に比例する。

[0091] また、 $q=q(1)=q(2)$ と見なせる場合は、(数10)、(数11)、および(数13)より、

[数33]

$$\frac{Q_1}{Q} = \frac{C_1}{C} \quad (\text{数 } 33)$$

[数34]

$$\frac{Q_2}{Q} = \frac{C_2}{C} \quad (\text{数 } 34)$$

が成立する。すなわち、電界注入によってキャピラリに注入される第1DNA断片と第2DNA断片の合計注入電荷量に対する第1DNA断片または第2DNA断片の注入電荷量の比率は、サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の合計濃度に対する第1DNA断片または第2DNA断片の濃度の比率と一致する。

[0092] さらに、(数22) および(数23) より、

[数35]

$$\frac{S_1}{S_2} = \frac{m_1 \cdot C_1}{m_2 \cdot C_2} \quad (\text{数 } 35)$$

が成立する。すなわち、電界注入によってキャピラリに注入される第1DNA断片と第2DNA断片をキャピラリ電気泳動分析して得られる第1DNA断片と第2DNA断片の信号強度比は、サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の濃度比に比例する。

[0093] このため、図1Aのキャピラリ電気泳動装置は、第2DNA断片の信号強度に対する第1DNA断片の信号強度の比に基づき、サンプル中の第2DNA断片の濃度に対する第1DNA断片の濃度の比を定量することができる。

[0094] また、とくに、サンプル中の第2DNA断片の濃度が既知である場合には、第2DNA断片の信号強度に対する第1DNA断片の信号強度の比に基づき、前記サンプル中の第1DNA断片の濃度を定量することができる。

[0095] また、 $m=m(1)=m(2)$ と見なせる場合は、(数22)、(数23)、および(数26)より、

[数36]

$$\frac{S_1}{S} = \frac{C_1}{C} \quad (\text{数 } 36)$$

[数37]

$$\frac{S_2}{S} = \frac{C_2}{C} \quad (\text{数 } 37)$$

である。すなわち、電界注入によってキャピラリに注入される第1DNA断片と第2DNA断片の合計信号強度に対する第1DNA断片または第2DNA断片の信号強度の比率は、サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の合計濃度に対する第1DNA断片または第2DNA断片の濃度の比率と一致する。

[0096] 以上で注目すべきことは、(数16)、(数17)、および(数20)が、(数29)、(数30)、および(数31)が矛盾せず、両立することである。すなわち、サンプル中の第1DNA断片、第2DNA断片、またはDNA断片全体の濃度に対してそれぞれ、第1DNA断片、第2DNA断片、またはDNA断片全体の注入分子数が比例する場合も、比例しない場合も、第1DNA断片と第2DNA断片の注入分子数比がサンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の濃度比に一致し、DNA断片全体に対する第1DNA断片または第2DNA断片の注入分子数比がサンプル中のDNA断片全体に対する第1DNA断片または第2DNA断片の濃度比に一致するのである。

[0097] もうひとつ注目すべきことは、(数18)、(数19)、および(数21)が、(数32)、(数33)、および(数34)が矛盾せず、両立することである。すなわち、サンプル中の第1DNA断片、第2DNA断片、またはDNA断片全体の濃度に対してそれぞれ、第1DNA断片、第2DNA断片、またはDNA断片全体の注入電荷量が比例する場合も、比例しない場合も、第1DNA断片と第2DNA断片の注入電荷量比がサンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の濃度比に比例し、DNA断片全体に対する第1DNA断片または第2DNA断片の注入電荷量比がサンプル中のDNA断片全体に対する第1DNA断片または第2DNA断片の濃度比に一致するのである。

[0098] さらに注目すべきことは、(数24)、(数25)、および(数27)と、(数35)、(数36)、および(数37)が矛盾せず、両立することである。すなわち、サンプル中の第1DNA断片、第2DNA断片、またはDNA断片全体の濃度に対してそれぞれ、第1DNA断片、第2DNA断片、またはDNA断片全体の信号強度が比例する場合も、比例しない場合も、第1DNA断片と第2DNA断片の信号強度比がサンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の濃度比に比例し、DNA断片全体に対する第1DNA断片または第2DNA断片の信号強度比がサンプル中のDNA断片全体に対する第1DNA断片または第2DNA断片の濃度比に一致するのである。

[0099] 第2DNA断片を内部標準とすれば、(数35)は(数3)と同じ形の検量線になり、電界注入の電界強度Eと時間Tの変動の影響を回避することができ、分析対象である第1DNA断片を高精度に定量することが可能である。したがって、従来の内部標準法の検量線である(数3)と同様に、(数35)を新規の内部標準法の検量線とすることによって、分析対象のDNA断片の精度の高い定量が可能となる。

[0100] 従来の内部標準法は、分析対象の濃度に対して信号強度が比例する場合にのみ適用可能であった。これに対して新規の内部標準法は、(数24)、(数25)、および(数27)に示される通り、分析対象の濃度に対して信号強度が比例する場合だけでなく、比例しない場合、飽和に近づく場合、飽和に達する場合のいずれにおいても適用可能である。

[0101] [計測結果の具体例]

キャピラリ電気泳動分析において、サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が低いときは濃度に比例する信号強度が得られ、サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が高いと濃度に対して信号強度が飽和する現象の具体例を示す。

[0102] 特定個人のヒトゲノムを鋳型としてDNA型検査向けのSTR-PCRを行い、脱塩し、溶媒をホルムアミドとした。STR-PCR産物である複数種類のDNA断片の各濃度を、基準濃度に対して1倍、0.05倍、0.002倍、0.0001倍と4桁の濃度範囲に渡って変化させた4種類のサンプルを調製した。

- [0103] 図1Aのキャピラリー電気泳動装置を用いて、濃度が0.0001倍、0.002倍、0.05倍、1倍のサンプルをそれぞれ4本のキャピラリーで電気泳動分析を行って得られたエレクトロフェログラムの一部をそれぞれ図3(a), (b), (c), および(d)に示す。
- [0104] エレクトロフェログラム上の各ピークは、各ローカスのSTR-PCR産物であるDNA断片の信号を示す。例えば、図3(a)、(b)、(c)、および(d)のそれぞれにおいて、電気泳動時間4200フレーム前後で観察されているシングルピークは、ローカスD5S818のSTR-PCR産物であるDNA断片の信号を示す。サンプルに含まれるDNA断片の濃度を上昇させると、各DNA断片の蛍光強度（信号強度を表す。以下同じ）が増大している。4本のキャピラリーそれぞれの計測点で同じ蛍光強度の蛍光を生じる時に計測される蛍光強度がそれぞれ等しくなるように調整済であるため、計測される蛍光強度の違いは計測点において発光される蛍光強度の違いを忠実に反映している。
- [0105] 図4は、図3におけるローカスD5S818のSTR-PCR産物であるDNA断片を分析対象として、ローカスD5S818のピークの蛍光強度を、サンプルに含まれるDNA断片の濃度に対してプロットした両対数グラフである。ここで、ピークの幅は、図3(a)、(b)、(c)、および(d)で同等と見なせるため、ピークの面積ではなく、ピークの高さを蛍光強度としている。横軸のDNA断片の濃度は、サンプルに含まれるローカスD5S818のSTR-PCR産物であるDNA断片の濃度とするが、サンプルに含まれるDNA断片の全体濃度と考えても構わない。
- [0106] サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が低いときは、分析対象のDNA断片の蛍光強度がサンプルに含まれるDNA断片の濃度に対して比例しているが、サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度が高くなると、分析対象のDNA断片の蛍光強度がサンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度に対して比例から外れ、飽和に近づいている。
- [0107] (数24) は、 $y=S(1)$ 、 $x=C(1)$ 、 $a=m(1) \cdot I \cdot T / q(1)$ 、 $b=(q(0) \cdot \mu(0) \cdot C(0) + q(2) \cdot \mu \cdot C(2)) / (q(1) \cdot \mu)$ とすると、(数28)になる。また、(数28)において、分析対象のDNA断片の蛍光強度を $S(1)$ 、サンプルに含まれる

分析対象のDNA断片の濃度を $C(1)$ とする。

[0108] 図4の破線は、 $a=3500$ 、 $b=0.17$ とした場合の $S(1)$ と $C(1)$ の関係である（数28）を示し、図4の4点のプロットに対する、すなわち $C(1)$ が低い場合も高い場合も、良い近似曲線になっている。つまり、（数28）で示されるように、 $C(1)$ が低いときは、 $S(1)$ が $C(1)$ に対して比例しているが、 $C(1)$ が高くなると、 $S(1)$ が $C(1)$ に対して比例から外れ、飽和に近づくことの裏付けが得られた。

[0109] 一方、図4の実線は、 $S(1)=a/b \cdot C(1) \div 20000 \cdot C(1)$ とした場合、すなわち $S(1)$ が $C(1)$ に比例する関係を示し、図4の左側2点のプロットに対する、すなわち $C(1)$ が低い場合の、良い近似直線になっている。この結果から、 $S(1)$ と $C(1)$ は、 $C(1)$ が0.01倍程度を境に、比例関係から非比例関係に外れることが分かる。

[0110] したがって、従来の内部標準法によると、 $C(1)$ が0.0001倍～0.01倍の濃度範囲の定量、つまりダイナミックレンジ2桁の濃度範囲の定量が可能である。これに対して、新規の内部標準法によると、 $C(1)$ が0.0001倍～1倍の濃度範囲の定量、つまりダイナミックレンジ4桁の濃度範囲の定量が可能である。

[0111] このように、本開示に係る新規の内部標準法を用いることによって、サンプルに含まれる、従来よりも幅広い濃度範囲のDNA断片を高精度に定量することができるようになる。

[0112] 以上は、図3におけるローカスD5S818のピークに着目して分析しているが、その他のピークについても全く同様の関係が成立する。すなわち、サンプルに含まれるDNA断片の全体濃度が高くなるのに従って、D5S818のピークが比例関係から外れるのと同期して、その他のピークも比例関係から外れている。各エレクトロフェログラムにおいて、各ピークの蛍光強度が異なるにも関わらず、このように同期した現象が得られるのは、原因が検出器の飽和や蛍光体の自己消光ではないことを示している。

[0113] 以上より、図3および図4で観察されている現象は、上記〔原理〕で考察されている原因、理論によって明快に説明、理解される。

[0114] 図5は、図3および図4とは異なるサンプルについて、サンプルに含まれる分

析対象のDNA断片の濃度の変化に対する分析対象のDNA断片の蛍光強度の変化をプロットした両対数グラフである。

- [0115] サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度を、基準濃度に対して100倍、10倍、1倍、0.1倍、0.01倍と4桁の濃度範囲に渡って変化させた5種類のサンプルを調製した。ただし、図5における基準濃度と、図3および図4における基準濃度は無関係である。
- [0116] 図1Aのキャピラリー電気泳動装置を用いて、5種類のサンプルを2グループに分けてそれぞれを電気泳動分析した。図4と同様に、サンプルに含まれるDNA断片の濃度が低いときは、DNA断片の蛍光強度がサンプルに含まれるDNA断片の濃度に対して比例しているが、サンプルに含まれるDNA断片の濃度が高くなると、DNA断片の蛍光強度がサンプルに含まれるDNA断片の濃度に対して比例から外れ、飽和に近づいている。
- [0117] 上記と同様に、(数24) は、 $y=S(1)$ 、 $x=C(1)$ 、 $a=m(1) \cdot I \cdot T / q(1)$ 、 $b=(q(0) \cdot \mu(0) \cdot C(0) + q(2) \cdot \mu \cdot C(2)) / (q(1) \cdot \mu)$ とすると、(数28) になる。また、(数28) において、分析対象のDNA断片の蛍光強度を $S(1)$ 、サンプルに含まれる分析対象のDNA断片の濃度を $C(1)$ とする。
- [0118] 図5の破線は、 $a=22000$ 、 $b=10$ とした場合の $S(1)$ と $C(1)$ の関係である(数28)を示し、図5の5点のプロットに対する、すなわち $C(1)$ が低い場合も高い場合も、良い近似曲線になっている。つまり、(数28)で示されるように、 $C(1)$ が低いときは、 $S(1)$ が $C(1)$ に対して比例しているが、 $C(1)$ が高くなると、 $S(1)$ が $C(1)$ に対して比例から外れ、飽和に近づくことの裏付けが得られた。
- [0119] 一方、図5の実線は、 $S(1)=a/b \cdot C(1) \div 2180 \cdot C(1)$ とした場合、すなわち $S(1)$ が $C(1)$ に比例する関係を示し、図5の左側3点のプロットに対する、すなわち $C(1)$ が低い場合の、良い近似直線になっている。この結果から、 $S(1)$ と $C(1)$ は、 $C(1)$ が1倍程度を境に、比例関係から非比例関係に外れることが分かる。
- [0120] したがって、従来の内部標準法によると、 $C(1)$ が0.01倍～1倍の濃度範囲の定量、つまりダイナミックレンジ2桁の濃度範囲の定量が可能である。これに

対して、新規の内部標準法によると、C(1)が0.01倍～100倍の濃度範囲の定量、つまりダイナミックレンジ4桁の濃度範囲の定量が可能である。

[0121] このように、本開示に係る新規の内部標準法を用いることによって、サンプルに含まれる、従来よりも幅広い濃度範囲のDNA断片を高精度に定量することができるようになる。以上より、図5で観察されている現象は、上記〔原理〕で考察されている原因、理論によって明快に説明、理解される。

[0122] 〔実施例1〕

図1Aに示すキャピラリー電気泳動装置を用い、以下の計測を行った。以下において、「™」記号は商標を表す。Thermo Fisher Scientific社の、Hi-Di™ Formamide（以降、ホルムアミド）を溶媒として、2種類のサイズスタンダード：GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard（以降、600 LIZ）、およびGeneScan™ 500 ROX™ dye Size Standard（以降、500 ROX）を特定の比率で混合した4種類のサンプルを調製し、図1Aのキャピラリー電気泳動装置を用いて分析した。4本のキャピラリーはそれぞれ内径50 μm、全長47 cm、有効長36 cmとした。陰電極側緩衝液および陽電極側緩衝液として、Thermo Fisher Scientific社のApplied Biosystems™ 310 and 31xx Running Buffer、10Xを純水で10倍希釈して用いた。ポリマ溶液として、Thermo Fisher Scientific社のPOP-4™ Polymer、for 3500/SeqStudio™ Flexを用いた。

[0123] また、4種類のサンプルに含まれる600 LIZの濃度をそれぞれ、基準濃度に対して1/2倍（0.5倍）、1/20倍（0.05倍）、1/200倍（0.005倍）、1/2000倍（0.0005倍）に変化させる一方、4種類のサンプルに含まれる500 ROXの濃度を、基準濃度に対して1/200倍（0.005倍）に一定とした。ただし、600 LIZの基準濃度と、500 ROXの基準濃度は無関係である。ここで、600 LIZおよび500 ROXはそれぞれ複数種類のDNA断片を含むが、それらの濃度比を保ったまま、全体濃度を変化させた。各サンプルの電界注入は、各キャピラリーの両端に電圧1.2 kVを9秒間だけ印加して実施した。電気泳動は、各キャピラリーの両端に電圧8.5 kVを印加して実施した。

[0124] 図6(a)は、600 LIZの濃度が1/2000倍、および500 ROXの濃度が1/200倍のサ

ンプルのエレクトロフェログラムを示す。図6(b)は、600 LIZの濃度が1/200倍、および500 R0Xの濃度が1/200倍のサンプルのエレクトロフェログラムを示す。図7(a)は、600 LIZの濃度が1/20倍、および500 R0Xの濃度が1/200倍のサンプルのエレクトロフェログラムを示す。図7(b)は、600 LIZの濃度が1/2倍、および500 R0Xの濃度が1/200倍のサンプルのエレクトロフェログラムを示す。いずれのグラフにおいても、実線は600 LIZの蛍光強度、点線は500 R0Xの蛍光強度を示す。横軸は電気泳動時間、左側の縦軸は500 R0Xの蛍光強度、右側の縦軸は600 LIZの蛍光強度を示す。

[0125] 600 LIZは、塩基長が20、40、60、80、100、114、120、140、160、180、200、214、220、240、250、260、280、300、314、320、340、360、380、400、414、420、440、460、480、500、514、520、540、560、580、および600の36種類の1本鎖のDNA断片を含み、それぞれが蛍光体LIZで標識されている。図6および図7のエレクトロフェログラムはこの内の20、40、60、80、100、114、120、140、160、180、200、214、220、240、250塩基長の15種類のDNA断片のピークを示している。さらにこの内の40、114、160塩基長のDNA断片のピークを矢印で示し、LIZ 40、LIZ 114、LIZ 160と記している。

[0126] 500 R0Xは、塩基長が35、50、75、100、139、150、160、200、250、300、340、350、400、450、490、および500の16種類の1本鎖のDNA断片を含み、それぞれが蛍光体R0Xで標識されている。図6および図7のエレクトロフェログラムはこの内の35、50、75、100、139、150、160、200、250塩基長の9種類のDNA断片のピークを示している。さらにこの内の160塩基長のDNA断片のピークを矢印で示し、R0X 160と記している。

[0127] LIZ 160のピークとR0X 160のピークのように、同じ塩基長のDNA断片のピークが若干異なる時刻に観察されているのは、標識されている蛍光体LIZおよびR0Xの移動度の違いによるものである。

[0128] 図8(a)は、図6および図7の4個のエレクトロフェログラムで得られたLIZ 160のピークとR0X 160のピークの蛍光強度を、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対してプロットした両対数グラフである。横軸は、サンプルに含まれるL

IZ 160の濃度と考えても構わない。ここで、各ピークの幅はほぼ等しいと見なせるため、各ピークの高さを蛍光強度とした。黒丸プロットがLIZ 160の蛍光強度、白丸プロットがROX 160の蛍光強度を示す。

[0129] LIZ 160の蛍光強度は、サンプルに含まれる600 LIZの濃度が低いとき、具体的には600 LIZの濃度が $1/2000 \sim 1/20$ 倍の範囲では、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対して比例し、傾き1の直線で近似することができる。一方、LIZ 160の蛍光強度は、サンプルに含まれる600 LIZの濃度が高いとき、具体的には600 LIZの濃度が $1/20 \sim 1/2$ 倍の範囲では、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対して比例から外れ、飽和に近づいている。この現象は、図4および図5で観察されている現象と同じである。

[0130] このように、サンプルに含まれる第1の成分の濃度範囲は、第1の成分の濃度に対して第1の成分の信号強度が比例する濃度範囲に加えて、第1の成分の濃度に対して第1の成分の信号強度が、検出器の飽和信号強度よりも低く、かつ比例から外れて飽和信号強度に至る濃度範囲を含んでいる。本実施例に係るキャピラリ電気泳動装置は、このようなサンプルに対しても濃度の計測が可能である。

[0131] これに対して、ROX 160の蛍光強度は、サンプルに含まれる600 LIZの濃度が低いとき、具体的には600 LIZの濃度が $1/2000 \sim 1/200$ 倍の範囲では、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対して一定になっている。サンプルに含まれるROX 160の濃度は一定であるため、上記は容易に理解される。ところが、ROX 160の蛍光強度は、サンプルに含まれる600 LIZの濃度が高いとき、具体的には600 LIZの濃度が $1/200 \sim 1/2$ 倍の範囲では、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対して減少している。サンプルに含まれるROX 160の濃度は一定であるため、このような変化は容易に理解され得ない。以上は、本開示で見出された新たな現象である。

[0132] このように、サンプルに含まれる第1の成分の濃度範囲は、第1の成分の濃度に対して第2の成分の信号強度が一定である濃度範囲に加えて、第1の成分の濃度に対して第2の成分の信号強度が、一定から外れて減少する濃度範囲を

含んでいる。本実施例に係るキャピラリ電気泳動装置は、このようなサンプルに対しても濃度の計測が可能である。

[0133] 以上の現象は、(数24) および (数25) によって説明される。

[0134] (数24) および (数25) において、第1DNA断片を600 LIZに含まれる全てのDNA断片、第2DNA断片を500 ROXに含まれる全てのDNA断片と考える。すなわち、 $S(1)$ が600 LIZに含まれる全てのDNA断片の蛍光強度の合計、 $C(1)$ が600 LIZに含まれる全てのDNA断片の濃度の合計、 $q(1)$ が600 LIZに含まれる全てのDNA断片の平均電荷量とし、 $S(2)$ が500 ROXに含まれる全てのDNA断片の蛍光強度の合計、 $C(2)$ が500 ROXに含まれる全てのDNA断片の濃度の合計、 $q(2)$ が500 ROXに含まれる全てのDNA断片の平均電荷量とする。

[0135] このとき、(数24) で、DNA断片以外の負イオンの濃度 $C(0)$ が一定、および500 ROXの濃度 $C(2)$ が一定の条件下で、600 LIZの蛍光強度 $S(1)$ は、600 LIZの濃度 $C(1)$ が低いときは600 LIZの濃度 $C(1)$ に対して比例し、600 LIZの濃度 $C(1)$ が高いときは600 LIZの濃度 $C(1)$ に対して比例から外れて飽和に至る。LIZ 160の蛍光強度は600 LIZの蛍光強度に比例するため、両者は同様の変化を示す。したがって、図8(a)のLIZ 160の全濃度範囲におけるLIZ 160の蛍光強度の変化は、(数24) によって説明される。

[0136] これに対して、(数25) において、DNA断片以外の負イオンの濃度 $C(0)$ が一定、および500 ROXの濃度 $C(2)$ が一定の条件下で、500 ROXの蛍光強度 $S(2)$ は、600 LIZの濃度 $C(1)$ が低いときは一定であり、600 LIZの濃度 $C(1)$ が高いときは600 LIZの濃度 $C(1)$ に対して減少する。ROX 160の蛍光強度は500 ROXの蛍光強度に比例するため、両者は同様の変化を示す。したがって、図8(a)のLIZ 160の全濃度範囲におけるROX 160の蛍光強度の変化は、(数25) によって説明される。

[0137] さらに上記は(数14) および (数15) により説明される。すなわち、電界注入時の電流が一定である条件下で、第1DNA断片の濃度 $C(1)$ の増大によって第1DNA断片の注入電荷量 $Q(1)$ が増加すると、第2DNA断片の注入電荷量 $Q(2)$ が減少する。これは、(数15) の左辺の E 、つまり電界注入時のキャピラリのサ

ンプル注入端近傍のサンプル中の電界強度が減少することによって実現される。

[0138] 以上は、図6および図7におけるLIZ 160のピークおよびROX 160のピークに着目した考察であるが、これら以外のDNA断片のピークに着目しても、同様の考察が成り立つ。

[0139] 図9は、LIZ 160のピークの蛍光強度（図8(a)と同じデータ）に加えて、例として、LIZ 40およびLIZ 114のピークの蛍光強度を、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対してプロットした両対数グラフである。横軸は、サンプルに含まれるLIZ 40、LIZ 114、またはLIZ 160の濃度と考えても構わない。

[0140] 各蛍光強度は、サンプルに含まれる600 LIZの濃度が低いとき、具体的には600 LIZの濃度が $1/2000 \sim 1/20$ 倍の範囲では、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対して比例し、傾き1の直線で近似することができる。一方、各蛍光強度は、サンプルに含まれる600 LIZの濃度が高いとき、具体的には600 LIZの濃度が $1/20 \sim 1/2$ 倍の範囲では、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対して比例から外れ、飽和に近づいている。以上の蛍光強度の変化は、各DNA断片について同期して生じている。言うまでもなく、いずれの蛍光強度の変化も（数24）によって近似することができる。

[0141] 各エレクトロフェログラムにおいて、LIZ 40、LIZ 114、およびLIZ 160のピークの蛍光強度が異なっているにも関わらず、上記のような蛍光強度の変化が同期して生じていることは、原因が検出器の飽和、あるいは蛍光体の自己消光ではなく、本開示で見出した一定の電界注入量によるものであることを示している。ROXについても、ROX 160以外のDNA断片のピークについても、ROX 160と同様の蛍光強度の変化が得られ、（数25）によって近似することができる。

[0142] 図8(a)より、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対してLIZ 160の蛍光強度が比例する、600 LIZの濃度が $1/2000 \sim 1/20$ 倍の範囲のとき、ROX 160を内部標準とする従来の内部標準法を用いてLIZ 160を高精度に定量することが可能である。あるいは、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対してROX 160の

蛍光強度が一定である、600 LIZの濃度が1/2000~1/200倍の範囲のとき、ROX 160を内部標準とする従来の内部標準法を用いてLIZ 160を高精度に定量することが可能である。

[0143] しかしながら、これらの範囲を逸脱すると、従来の内部標準法を適用することができない。特に、サンプルに含まれる600 LIZの濃度が1/2倍のとき、図8(a)では、LIZ 160のピークの蛍光強度が飽和に差し掛かり、ROX 160の蛍光強度が減少しているため、これらの比率によってLIZ 160を定量することは、従来の発想では不可能と思われた。

[0144] これに対して、図8(b)は、図8(a)における、ROX 160のピークの蛍光強度に対する、LIZ 160のピークの蛍光強度の比率を、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対してプロットした両対数グラフである。横軸は、サンプルに含まれるLIZ 160の濃度と考えても構わない。

[0145] 図8(a)あるいは従来の内部標準法からは想像できないことに、図8(a)の横軸の1/2000~1/2倍の全濃度範囲について、ROX 160のピークの蛍光強度に対する、LIZ 160のピークの蛍光強度の比率が、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に比例し、傾き1の直線で近似することができている。すなわち、ROX 160を内部標準とする新規の内部標準法を用いて、従来より広い濃度範囲でLIZ 160を高精度に定量することが可能である。

[0146] 図8(b)の結果は、(数35)において、第1DNA断片をLIZ 160、第2DNA断片をROX 160とすることによって説明される。すなわち、ROX 160のピークの蛍光強度に対する、LIZ 160のピークの蛍光強度の比率は、サンプルに含まれるROX 160の濃度に対する、LIZ 160の濃度の比率に比例する。ここで、ROX 160の濃度は一定であるため、ROX 160のピークの蛍光強度に対する、LIZ 160のピークの蛍光強度の比率は、サンプルに含まれるLIZ 160の濃度に比例する。

[0147] (数35) は、E、T、C(0)、等の変化し得るパラメータを含んでいないため、従来の内部定量法と同様に、高精度な定量を可能とする。最も重要なことは、(数35) が(数24) および(数25) と両立する点である。すなわち、図8(a)に示されているように、サンプルに含まれるLIZ 160の濃度に対して、LIZ

160のピークの蛍光強度が比例であっても、比例から外れても、あるいはROX 160のピークの蛍光強度が一定であっても、減少しても、常に、ROX 160のピークの蛍光強度に対する、LIZ 160のピークの蛍光強度の比率は、サンプルに含まれるLIZ 160の濃度に比例するのである。

[0148] 図10は、図6～図9と同様の実験において、電界注入時間を9秒から18秒に増加させた場合の図8に対応する実験結果である。図10(a)は、図8(a)と異なる実験条件で、異なる電気泳動分析で取得したにも関わらず、図8(a)と同等の傾向を示す結果である。ただし、各プロットの位置が多少上下している。これに対して、図10(b)は、図8(b)と異なる実験条件で、異なる電気泳動分析で取得したにも関わらず、図8(b)とほぼ完全に同等の結果を示しており、各プロットの位置の変動も非常に小さい。さらに、図10(b)で用いている傾き1の近似直線は、図8(a)用いている傾き1の近似直線と同一である。以上の結果は、新規の内部標準法が高い定量精度を有していることを示している。

[0149] 図11は、図6および図7の4個のエレクトロフェログラムで得られたLIZ 160のピークの蛍光強度に対する、LIZ 40のピークの蛍光強度の比率、およびLIZ 114のピークの蛍光強度の比率を、サンプルに含まれる600 LIZの濃度に対してプロットした両対数グラフである。横軸は、サンプルに含まれるLIZ 40、LIZ 114、またはLIZ 160の濃度と考えても構わない。

[0150] 図6、図7、および図8(a)に示されるように、サンプルに含まれる600 LIZの濃度の変化に伴って、各ピークの蛍光強度は変化しているが、図11に示される各蛍光強度比は一定に保たれている。この結果は、図6および図7の各エレクトロフェログラムにおいて、600 LIZまたは500 ROXに属する任意の2種類のDNA断片のピークの蛍光強度の比率が一定に保たれていることを示している。

[0151] これは、(数35)において、第1DNA断片をLIZ 40またはLIZ 114、第2DNA断片をLIZ 160とすることによって説明される。サンプルに含まれる600 LIZの濃度を変化させるときに、600 LIZに含まれる複数種類のDNA断片の濃度比を一定に保っているため、右辺が一定に保たれ、左辺の蛍光強度比が一定になるのである。以上の結果は、上記「原理」で開示されている一連の考察が正

しいことを裏付けている。

[0152] 本開示は、キャピラリー電気泳動による任意のフラグメント解析に応用できる。以降の各実施例では、その具体例の一部を示す。

[0153] [実施例2]

Short Tandem Repeat (STR) 解析によるDNA型検査は、個人識別の精度の高さから、犯罪捜査、大規模災害における身元確認、親子鑑定、等に広く用いられている。現在、様々な種類のSTR解析の試薬キットが販売されている。例えば、Promega社のPowerPlex (登録商標) Fusion 6C Systemでは、犯罪現場で採取された血液から抽出されたヒトゲノムを鋳型として、ヒトゲノム上の27箇所のローカスのSTRのマルチプレックスPCRを5種類の蛍光体を用いて行う。

[0154] PowerPlex Fusion 6C 5X Master Mix 5 μ l、PowerPlex Fusion 6C 5X Primer Pair Mix 5 μ l、および抽出されたヒトゲノム含む反応前溶液25 μ lを、96°Cで1分間のインキュベーションの後、96°Cで5秒間および60°Cで1分間のサーマルサイクルを29回繰り返し、60°Cで10分間のインキュベーションを行い、4°Cでインキュベーションする。このSTR-PCRの反応後溶液25 μ lをエタノール沈殿し、純水25 μ lに溶解することで脱塩した。この溶液25 μ lの内の1 μ lを、上記5種類の蛍光体と異なる1種類の蛍光体で標識されたサイズスタンダードであるPromega社のWEN ILS 500 (以降、500 WEN) 0.5 μ l、およびホルムアミド9.5 μ lと混合し、サンプル11 μ lを得る。

[0155] 500 WENは、塩基長が60、65、80、100、120、140、160、180、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、および500の21種類の1本鎖のDNA断片を含み、それぞれが蛍光体WENで標識されている。このサンプルを、95°Cで熱変性後に急氷冷してからキャピラリー電気泳動分析することにより、サンプルに含まれる6種類の蛍光体のいずれかで標識された様々な塩基長のDNA断片を分離し、標識蛍光体を識別しながら検出する。得られた6種類の蛍光体毎のエレクトロフェログラムを解析することにより、DNA型検査を行う。

- [0156] DNA型検査では、各DNA断片のそれぞれの塩基長を正確に同定することが個人識別の精度を向上する上で重要である。しかしながら、キャピラリー電気泳動では、キャピラリー毎、サンプル毎、および分析毎に各DNA断片の泳動速度が変動するため、エレクトロフェログラム上の各DNA断片のピークの時刻から塩基長を正確に同定することは困難である。そこで、上記の通り、サンプルに塩基長が既知であるサイズスタンダードを混合して分析し、塩基長既知のDNA断片のピークの時刻を参照することによって、任意のDNA断片の塩基長を正確に同定するのである。
- [0157] 上述のように、従来のDNA型検査では、サイズスタンダードに属する複数種類のDNA断片のピークが計測される時刻は活用されているが、そのピークの蛍光強度は活用されて来なかった。しかしながら、サンプルに含まれるサイズスタンダードの濃度は既知、または固定であるため、サイズスタンダードに属する複数種類のDNA断片のいずれかのピークの蛍光強度を参照することによって、サンプルに含まれるSTR-PCR産物である複数種類のDNA断片のいずれかのピークの蛍光強度から、サンプルに含まれるそのDNA断片の濃度を定量することが可能である。すなわち、鋳型であるヒトゲノムをDNA型検査するだけでなく、サンプルに含まれるSTR-PCR産物である複数種類のDNA断片のそれぞれを高精度に定量することが可能である。
- [0158] この定量の精度が高いことは、(数35)において、第1DNA断片をSTR-PCR産物に含まれる任意のDNA断片、第2DNA断片をサイズスタンダードに含まれる任意のDNA断片とすることによって説明される。すなわち、第2DNA断片のピークの蛍光強度に対する第1DNA断片のピークの蛍光強度の比率から、サンプル中の第2DNA断片の濃度に対するサンプル中の第1DNA断片の濃度を求めることができる。
- [0159] サンプル中のサイズスタンダードの濃度が一定、つまり、サンプル中の第2DNA断片の濃度が一定の場合は、第2DNA断片のピークの蛍光強度に対する第1DNA断片のピークの蛍光強度から、サンプル中の第1DNA断片の濃度を求めることができる。(数35)は、E、T、C(0)、等の変化し得るパラメータを含んで

いないため、従来の内部定量法と同様に、高精度な定量を可能とする。このような高精度な定量は、(数24)に示される通り、サンプルに含まれる第1DNA断片の濃度に対して、第1DNA断片のピークの蛍光強度が比例する場合も、比例から外れている場合にも成立する。すなわち、新規の内部標準法によって、従来よりも幅広い濃度範囲の第1DNA断片の濃度を高精度に定量することが可能である。

[0160] さらに、STR-PCRで実施されるサーマルサイクルの回数を用いることによって、STR-PCRの直前の溶液に含まれる鋳型のヒトゲノムの濃度を定量することが可能である。サーマルサイクルの回数をN、STR-PCRの増幅効率を $E(f)$ 、STR-PCRの反応前溶液中のヒトゲノムの濃度を $C(f)$ とする。上記の例では、 $N=29$ である。 $E(f)$ は、理想条件では $E(f)=1$ であるが、実際の値はあらかじめ調べて置くことができる。また、STR-PCRの反応後溶液に含まれる任意のSTR-PCR産物を第1DNA断片とし、その濃度を $B(1)$ とする。そして、電界注入に用いるサンプル中の第1DNA断片の濃度を $C(1)$ とする。さらに、STR-PCRの反応後溶液中の第1DNA断片の濃度 $B(1)$ に対する、電界注入に用いるサンプル中の第1DNA断片の濃度 $C(1)$ の比率、すなわちSTR-PCRの反応後溶液の希釈率を $D=C(1)/B(1)$ とする。上記の例では $D=1 \mu\text{l}/25 \mu\text{l}=0.04$ である。このとき、

[数38]

$$C_1 = D \cdot C_f \cdot (1 + E_f)^N \quad (\text{数 } 38)$$

が成立する。

[0161] (数35)において、第2DNA断片をサイズスタンダードに含まれる任意のDNA断片とすると、(数35)より $C(1)$ を求めることができる。これは、 $S(1)$ と $S(2)$ はエレクトロフェログラムから得られ、 $C(2)$ は既知であり、 $m(1)$ と $m(2)$ はあらかじめ調べて置くことができるためである。 D 、 $E(f)$ 、 N はそれぞれ、上記の通り、既知である。したがって、(数38)から、STR-PCRの反応前溶液に含まれるヒトゲノムの濃度 $C(f)$ を高精度に定量することが可能である。

[0162] [実施例3]

Thermo Fisher Scientific社のSNaPshot（登録商標） Multiplexシステムは、キャピラリー電気泳動を用いてヒトゲノム上の複数箇所のSNP（1塩基多型）を同時にタイピングするキットである。ヒトゲノム上の複数箇所のSNPを含む領域を増幅した鋳型DNAをあらかじめ調製する。鋳型DNAに対して、各SNPに隣接する位置に蛍光体未標識のプライマーをそれぞれハイブリダイズさせ、蛍光標識ターミネーターを用いて各プライマーの1塩基伸長反応を実施する。蛍光標識ターミネーターは、4種類の異なる蛍光体でそれぞれ標識されたddATP、ddCTP、ddGTP、およびddTTPである。各プライマーの塩基長は、対応するSNPに応じて変化させて置く。複数種類の1塩基伸長産物であるDNA断片をキャピラリー電気泳動分析して、4種類の蛍光体毎のエレクトロフェログラムを得る。エレクトロフェログラム上で、ピークが観察される電気泳動時間、すなわち対応するDNA断片の塩基長から対応するSNPの箇所を特定する。また、同ピークの蛍光体種からSNPがA、C、G、Tのいずれであるかを特定する。以上のSNPタイピングを、複数箇所のSNPについて同時に実施することが可能である。

[0163] 上記のSNPタイピングでは、各SNPが、A、C、G、Tのいずれか1種類のコホモ接合体（1種類のSNPが100%存在）であるか、あるいはA、C、G、Tのいずれか2種類のヘテロ接合体（2種類のSNPが50%ずつ存在）であるかを特定できれば良い。しかしながら、一般には、各SNPが、A、C、G、Tが任意の比率で混在した塩基である可能性がある。例えば、がんの進行に伴って、任意のSNPの野生型（以降、WT）がA、C、G、Tのいずれか1種類であり、変異型（以降、MT）がA、C、G、Tの内の上記1種類を除く3種類であり、かつそれぞれの存在比が異なる場合がある。逆に、任意のSNPにおけるA、C、G、Tの塩基種の存在比を定量することによって、がんを早期に診断したり、がんの状態を高精度に把握したりすることが可能になる場合がある。

[0164] Mを1以上の整数として、M箇所のSNPにおけるA、C、G、Tの塩基種の存在比、特にWTの塩基種に対するMTの塩基種の存在比を定量することを想定する。M箇所のSNPのそれぞれについて、最大で4種類の1塩基伸長産物が得られる。このように最大で合計4×M種類のDNA断片を含む反応溶液をエタノール沈殿によ

り脱塩した後、所望の量のホルムアミドに溶出し、電界注入に用いるサンプルとする。

[0165] 電界注入された各DNA断片は、キャピラリ電気泳動分析により得られる4種類の蛍光体毎のエレクトロフェログラム上でピークを与え、最大で4×M個のピークを与える。M箇所のSNPにSNP番号*i*を付与し、*i*=1、2、…、Mとする。SNP番号*j*の塩基種A、C、G、Tの1塩基伸長産物であるDNA断片の、エレクトロフェログラム上のピークの蛍光強度を*S*(*ja*)、*S*(*jc*)、*S*(*ig*)、*S*(*jt*)、それぞれの感度係数を*m*(*ja*)、*m*(*jc*)、*m*(*ig*)、*m*(*jt*)、それぞれの平均電荷量を*q*(*ja*)、*q*(*jc*)、*q*(*ig*)、*q*(*jt*)、キャピラリに電界注入されるサンプル中のそれぞれの濃度を*C*(*ja*)、*C*(*jc*)、*C*(*ig*)、*C*(*jt*)とする。キャピラリに電界注入される全てのDNA断片の合計注入電荷量*Q*は、(数13)と同様に、

[数39]

$$Q = E \cdot T \cdot A \cdot \sum_i (q_{ia} \cdot \mu \cdot C_{ia} + q_{ic} \cdot \mu \cdot C_{ic} + q_{ig} \cdot \mu \cdot C_{ig} + q_{it} \cdot \mu \cdot C_{it}) \quad (\text{数 } 39)$$

である。方、(数15)と同様に、

[数40]

$$E \cdot A = \frac{I}{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0 + \sum_i (q_{ia} \cdot \mu \cdot C_{ia} + q_{ic} \cdot \mu \cdot C_{ic} + q_{ig} \cdot \mu \cdot C_{ig} + q_{it} \cdot \mu \cdot C_{it})} \quad (\text{数 } 40)$$

である。(数39)および(数40)より、(数21)と同様に、

[数41]

$$Q = \frac{I \cdot T}{1 + \frac{q_0 \cdot \mu_0 \cdot C_0}{\sum_i (q_{ia} \cdot \mu \cdot C_{ia} + q_{ic} \cdot \mu \cdot C_{ic} + q_{ig} \cdot \mu \cdot C_{ig} + q_{it} \cdot \mu \cdot C_{it})}} \quad (\text{数 } 41)$$

である。*q*(0)・*μ*(0)・*C*(0)はDNA断片以外の負イオンの注入電荷量を示し、 Σ の項は全てのDNA断片の合計注入電荷量を示す。

[0166] (数41)は、*Q*が、*q*(0)・*μ*(0)・*C*(0)と比較して Σ の項が小さいときは、 Σ の項に比例するが、*q*(0)・*μ*(0)・*C*(0)と比較して Σ の項が大きくなると、 Σ の項に対して比例から外れて飽和に至ることを表している。したがって、全てのDNA断片の合計注入量は、全てのDNA断片の合計濃度に対して、全てのD

NA断片の合計濃度は低いときは比例するが、全てのDNA断片の合計濃度が高くなると比例から外れて飽和に至る。言うまでもなく、全てのDNA断片の合計濃度の増大は、任意のDNA断片の濃度の増大によってもたらされる。そして、全てのDNA断片の合計注入量が飽和すると、任意のDNA断片の注入量が飽和したり、逆に減少したりする。

[0167] しかしながら一方で、全てのDNA断片の内の任意の2種類のDNA断片を第1DNA断片および第2DNA断片とすると、(数8)～(数11)、(数22)、(数23)、(数29)、(数32)、(数35)が成立する。(数35)は、電界注入によってキャピラリに注入される第1DNA断片と第2DNA断片をキャピラリ電気泳動分析して得られる第1DNA断片と第2DNA断片の蛍光強度比は、サンプル中の第1DNA断片と第2DNA断片の濃度比に比例することを示す。

[0168] 例えば、SNP番号jの塩基種A、C、G、Tの1塩基伸長産物であるDNA断片に着目すると、(数22)および(数23)と同様に、

[数42]

$$S_{ja} = E \cdot T \cdot A \cdot m_{ja} \cdot \mu \cdot C_{ja} \quad (\text{数 } 42)$$

[数43]

$$S_{jc} = E \cdot T \cdot A \cdot m_{jc} \cdot \mu \cdot C_{jc} \quad (\text{数 } 43)$$

[数44]

$$S_{jg} = E \cdot T \cdot A \cdot m_{jg} \cdot \mu \cdot C_{jg} \quad (\text{数 } 44)$$

[数45]

$$S_{jt} = E \cdot T \cdot A \cdot m_{jt} \cdot \mu \cdot C_{jt} \quad (\text{数 } 45)$$

である。

[0169] したがって、例として、WTがAであり、MTがC、G、Tとすると、(数35)は、

[数46]

$$\frac{S_{jc}}{S_{ja}} = \frac{m_{jc} \cdot C_{jc}}{m_{ja} \cdot C_{ja}} \quad (\text{数 } 46)$$

[数47]

$$\frac{S_{jg}}{S_{ja}} = \frac{m_{jg} \cdot C_{jg}}{m_{ja} \cdot C_{ja}} \quad (\text{数 } 47)$$

[数48]

$$\frac{S_{jt}}{S_{ja}} = \frac{m_{jt} \cdot C_{jt}}{m_{ja} \cdot C_{ja}} \quad (\text{数 } 48)$$

となる。すなわち、エレクトロフェログラム上のピークの蛍光強度 $S(jc)/S(ja)$ 、 $S(jg)/S(ja)$ 、 $S(jt)/S(ja)$ により、WTに対する3種類のMTの存在比に対応する濃度比 $C(jc)/C(ja)$ 、 $C(jg)/C(ja)$ 、 $C(jt)/C(ja)$ を高精度に定量することができる。 $m(ja)$ 、 $m(jc)$ 、 $m(jg)$ 、 $m(jt)$ はあらかじめ求めて置く。

[0170] 以上では、サンプルに最大で合計 $4 \times M$ 種類の1塩基伸長産物であるDNA断片が含まれる場合を想定した。以下では、サンプルに、最大で合計 $4 \times M$ 種類の1塩基伸長産物であるDNA断片に加えて、濃度既知または濃度固定の内部標準である1種類以上のDNA断片が含まれる場合を想定する。内部標準として、複数種類の塩基長のDNA断片を含むサイズスタンダードを用いても良い。この場合は、(数35)において、SNP番号jの塩基種A、C、G、Tの1塩基伸長産物であるDNA断片のいずれかひとつを第1DNA断片とし、内部標準のDNA断片のいずれかひとつを第2DNA断片とすることによって、サンプル中の第1DNA断片の濃度を高精度に定量することが可能である。

符号の説明

- [0171]
- 1 キャピラリ
 - 2 サンプル注入端
 - 3 サンプル溶出端
 - 4 陰電極
 - 5 陽電極

- 6 陰電極側緩衝液
- 7 陽電極側緩衝液
- 8 ポリマ溶液
- 9 サンプル
- 10 ポンプブロック
- 11 バルブ
- 12 シリンジ
- 13 電源
- 14 レーザビーム
- 15 レーザ光源
- 16 計測点
- 17 検出器
- 18 第1DNA断片（第1の成分）
- 19 第2DNA断片（第2の成分）
- 20 DNA断片以外の負イオン

請求の範囲

[請求項1]

第1の成分と第2の成分を含むサンプルをキャピラリーに注入し、
注入された前記第1の成分と前記第2の成分を電気泳動分離し、
前記キャピラリー上に光を照射して誘起される前記第1の成分からの
発光と前記第2の成分からの発光を検出器で計測し、これによって、
前記第1の成分の信号強度と前記第2の成分の信号強度を取得する、
キャピラリー電気泳動装置において、

前記サンプルに含まれる前記第1の成分の濃度範囲が、前記第1の成分の濃度に対して前記第1の成分の信号強度が比例する濃度範囲に加えて、前記第1の成分の濃度に対して前記第1の成分の信号強度が、前記検出器の飽和信号強度よりも低く、かつ比例から外れて飽和信号強度に至る濃度範囲を含んでおり、

前記キャピラリー電気泳動装置は、前記第2の成分の信号強度に対する前記第1の成分の信号強度の比に基づき、前記サンプル中の前記第2の成分の濃度に対する前記第1の成分の濃度の比を定量することを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。

[請求項2]

第1の成分と第2の成分を含むサンプルをキャピラリーに注入し、
注入された前記第1の成分と前記第2の成分を電気泳動分離し、
前記キャピラリー上に光を照射して誘起される前記第1の成分からの
発光と前記第2の成分からの発光を検出器で計測し、これによって、
前記第1の成分の信号強度と前記第2の成分の信号強度を取得する、
キャピラリー電気泳動装置において、

前記サンプルに含まれる前記第1の成分の濃度範囲が、前記第1の成分の濃度に対して前記第2の成分の信号強度が一定である濃度範囲に加えて、前記第1の成分の濃度に対して前記第2の成分の信号強度が、一定から外れて減少する濃度範囲を含んでおり、

前記キャピラリー電気泳動装置は、前記第2の成分の信号強度に対する前記第1の成分の信号強度の比に基づき、前記サンプル中の前記第2

の成分の濃度に対する前記第1の成分の濃度の比を定量することを特徴とするキャピラリ電気泳動装置。

[請求項3] 請求項1または2に記載のキャピラリ電気泳動装置において、
前記サンプル中の前記第2の成分の濃度が既知であり、
前記第2の成分の信号強度に対する前記第1の成分の信号強度の比に基づき、前記サンプル中の前記第1の成分の濃度を定量することを特徴とするキャピラリ電気泳動装置。

[請求項4] 請求項1～3のいずれか一項に記載のキャピラリ電気泳動装置において、
前記第1の成分と前記第2の成分は、いずれも蛍光体が標識されたDNA断片であり、前記第1の成分の塩基長と前記第2の成分の塩基長は異なり、
前記発光が蛍光であり、
前記信号強度が蛍光強度である
ことを特徴とするキャピラリ電気泳動装置。

[請求項5] 請求項4に記載のキャピラリ電気泳動装置において、
前記サンプルがサイズスタンダードを含んでおり、
前記第2の成分が、サイズスタンダードに含まれるDNA断片であることを特徴とするキャピラリ電気泳動装置。

[請求項6] 請求項4に記載のキャピラリ電気泳動装置において、
前記サンプルがPCR産物を含んでおり、
前記第1の成分が、前記PCR産物に含まれるDNA断片であることを特徴とするキャピラリ電気泳動装置。

[請求項7] 請求項4に記載のキャピラリ電気泳動装置において、
前記サンプルが1塩基伸長産物を含んでおり、
前記第1の成分が、前記1塩基伸長産物に含まれる第1のDNA断片である
ことを特徴とするキャピラリ電気泳動装置。

- [請求項8] 請求項7に記載のキャピラリー電気泳動装置において、
前記第2の成分が、前記1塩基伸長産物に含まれる第2のDNA断片である
ことを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。
- [請求項9] 第1の成分と第2の成分を含むサンプルをキャピラリーに注入すること
と、
注入された前記第1の成分と前記第2の成分を電気泳動分離すること
と、
前記キャピラリー上に光を照射して誘起される前記第1の成分からの
発光と前記第2の成分からの発光を検出器で計測し、これによって、
前記第1の成分の信号強度と前記第2の成分の信号強度を取得すること
と、
を備える、キャピラリー電気泳動法において、
前記サンプルに含まれる前記第1の成分の濃度範囲が、前記第1の成分
の濃度に対して前記第1の成分の信号強度が比例する濃度範囲に加
えて、前記第1の成分の濃度に対して前記第1の成分の信号強度が、前
記検出器の飽和信号強度よりも低く、かつ比例から外れて飽和信号強
度に至る濃度範囲を含んでおり、
前記キャピラリー電気泳動法は、前記第2の成分の信号強度に対する
前記第1の成分の信号強度の比に基づき、前記サンプル中の前記第2の
成分の濃度に対する前記第1の成分の濃度の比を定量することを備え
る
ことを特徴とするキャピラリー電気泳動法。
- [請求項10] 第1の成分と第2の成分を含むサンプルをキャピラリーに注入すること
と、
注入された前記第1の成分と前記第2の成分を電気泳動分離すること
と、
前記キャピラリー上に光を照射して誘起される前記第1の成分からの

発光と前記第2の成分からの発光を検出器で計測し、これによって、
前記第1の成分の信号強度と前記第2の成分の信号強度を取得すること
と、

を備える、キャピラリー電気泳動法において、

前記サンプルに含まれる前記第1の成分の濃度範囲が、前記第1の成分の濃度に対して前記第2の成分の信号強度が一定である濃度範囲に加えて、前記第1の成分の濃度に対して前記第2の成分の信号強度が、一定から外れて減少する濃度範囲を含んでおり、

前記キャピラリー電気泳動法は、前記第2の成分の信号強度に対する前記第1の成分の信号強度の比に基づき、前記サンプル中の前記第2の成分の濃度に対する前記第1の成分の濃度の比を定量することを備える

ことを特徴とするキャピラリー電気泳動法。

[請求項11]

請求項9または10に記載のキャピラリー電気泳動法において、

前記サンプル中の前記第2の成分の濃度が既知であり、

前記第2の成分の信号強度に対する前記第1の成分の信号強度の比に基づき、前記サンプル中の前記第1の成分の濃度を定量する

ことを特徴とするキャピラリー電気泳動法。

[請求項12]

請求項9～11のいずれか一項に記載のキャピラリー電気泳動法において、

前記第1の成分と前記第2の成分は、いずれも蛍光体が標識されたDNA断片であり、前記第1の成分の塩基長と前記第2の成分の塩基長は異なり、

前記発光が蛍光であり、

前記信号強度が蛍光強度である

ことを特徴とするキャピラリー電気泳動法。

[請求項13]

請求項12に記載のキャピラリー電気泳動法において、

前記サンプルがサイズスタンダードを含んでおり、

前記第2の成分が、サイズスタンダードに含まれるDNA断片であることを特徴とするキャピラリー電気泳動法。

[請求項14] 請求項12に記載のキャピラリー電気泳動法において、
前記サンプルがPCR産物を含んでおり、
前記第1の成分が、前記PCR産物に含まれるDNA断片であることを特徴とするキャピラリー電気泳動法。

[請求項15] 請求項12に記載のキャピラリー電気泳動法において、
前記サンプルが1塩基伸長産物を含んでおり、
前記第1の成分が、前記1塩基伸長産物に含まれる第1のDNA断片であることを特徴とするキャピラリー電気泳動法。

[請求項16] 請求項15に記載のキャピラリー電気泳動法において、
前記第2の成分が、前記1塩基伸長産物に含まれる第2のDNA断片であることを特徴とするキャピラリー電気泳動法。