

明 細 書

発明の名称： 分離媒体の連続使用方法

技術分野

[0001] 本発明は、分離媒体の連続使用方法に関する。

背景技術

[0002] 60歳以上の人口が総人口に対して占める割合は今後増大し、いずれの先進国でも超高齢化社会を迎える。それを背景として人々の健康への関心は近年非常に高まっており、健康・長寿を維持するためのヘルスケア技術に関心が集まっている。その中でもゲノム医療は最も注目されている技術の一つである。ゲノム医療は文字どおり個人の遺伝子情報を診断に適用し、個々の患者にふさわしい医療を適用しようというものである。その遺伝子の配列情報を読み取るための装置がDNAシーケンサーである。つまり、DNAシーケンサーは代表的な分析装置の一つであるといえる。

[0003] ヒトのゲノムの全塩基配列の解析を目論んだヒトゲノム計画は2003年に完了した。DNAシーケンスに関する技術は当時から今日まで大きく進展し、様々なシーケンスに関する様々な技術が開発された。その中でも次世代シーケンシングと呼ばれる技術は、超並列に配列解読を実施することを特徴としている。この技術革新により、現在ではヒトゲノムを1000ドル以下で解読できるようになっている。

[0004] しかしながら、依然としてヒトゲノム計画で採用された、キャピラリーシーケンスにおいて用いられるサンガー法というDNA読み取り方法は、DNAシーケンスにおけるゴールドスタンダードとされている。その理由は、読み取り塩基精度が高く、かつ次世代シーケンシングなど他手法に対する1サンプルあたりの分析コストの優位性があるためである。従って、このキャピラリーシーケンシングで用いるサンガー法は現在でも世界各国の研究現場でなくてはならない技術となっている。

[0005] 研究現場において、キャピラリーシーケンサーが確固とした地位を確立し

た理由の一つとして、キャピラリー内の分離媒体を可能とした液体ポリマの適用を挙げることができる。キャピラリーシーケンサーが普及する以前は2枚のゲル板の間に固化させたゲルを用いてDNAの分離を実施するのが一般的であった。しかし、このゲルの作製には労力を要するため、ユーザーの負担となっていた。しかし、液体ポリマを用いることで、ゲルを作成せずに、流路に液体ポリマを充填することで電気泳動を実施できることが判明した。液体ポリマは計測毎に流路内の液体ポリマを置換することで計測を継続できる。つまりユーザーのゲル作製の労力を省くことができる。

[0006] 液体ポリマであればキャピラリーはそのまま、分離媒体である液体ポリマのみ交換すれば、連続して計測を実施することができる。また、固体の分離媒体（ゲル）を用いるマイクロ流路チップにおいてはゲルが固化しているため、チップそのものを計測毎に廃棄し、新たなチップを準備する必要がある。これがランニングコストの増大を招き、ユーザーの負担となっている。このような状況の中、容易に交換が可能な液体ポリマはキャピラリーシーケンサーの有利な特徴の一つとなっている。

[0007] また、キャピラリーシーケンサーのユーザーの最も大きな要求の一つとして、ランニングコストの低減がある。キャピラリーシーケンサーで用いる試薬には陽極側緩衝液、陰極側緩衝液、液体ポリマなどがあるが、それらの中でも最も高価な試薬は、DNAを分離する媒体である液体ポリマである。この最も高価である液体ポリマにおけるランニングコストを低減するために、非特許文献1では、ベックマン社のキャピラリーシーケンサーを用いて、キャピラリーに対する1回の液体ポリマ充填で複数の分析が可能であるかどうかを検証している。この検証においては、1回の液体ポリマ充填では分析回数を重ねるにつれ、分析性能が劣化していく結果が示されている。結論としては“Replacement of the separation matrix is simple and is not worth compromising the results with its reuse”（（キャピラリーの）液体ポリマの置換は簡単であり、液体ポリマの再利用によって実験結果を損なうべきではない）と言及されている。換言すると、液体ポリマの再利用は分析性

能を損なうため、分析毎に液体ポリマを交換することが強く推奨されている。

[0008] 複数回の分析が液体ポリマの劣化を及ぼす原因は、液体ポリマに含有されるウレアの分解である。一般にキャピラリーシーケンサーにおける泳動分析は60℃の温度環境下で15kV程度の高電圧をキャピラリー末端に印加することで実施される。ウレアは2本鎖DNAを1本鎖に解離させる働きを持つが、非特許文献2によると、ウレアは高温で分解するという問題を持っている。

[0009] また、DNAシーケンシングで使用するキャピラリーアレイは通常化学的な修飾を施していない無垢のガラスを用いており、その表面は水酸基で覆われている。一方、キャピラリーシーケンシングで使用するバッファはpH8.0付近の水溶液であり、キャピラリーのガラス表面は負に帯電することになる。このガラス表面には水溶液中の正イオンが吸着するが、この状態でキャピラリーアレイに高電圧を印加すると、ガラス表面の正イオンが引きずられることにより電気浸透流が発生する。この電気浸透流はDNAの分離性能を劣化させる働きを持つため、電気浸透流の抑制の良し悪しは分析結果に大きく影響する。ここで、液体ポリマはDNAの分離媒体であると同時に、ガラス表面に吸着し、電気浸透流を防ぐ役割も持つ。しかし、非特許文献3によると、ウレアの分解産物は、液体ポリマのガラス表面への吸着を阻む働きを持つ。結果として、ウレアの分解に伴い電気浸透流が増大し、DNAの分離性能が低下してしまう。

[0010] なお、キャピラリーシーケンサーにおける分析の工程は、(1)キャピラリーアレイへのポリマフィル、(2)プレラン、(3)サンプルインジェクション、(4)電気泳動の4つの工程に分けることができる。

[0011] そのうち(2)のプレランはキャピラリーアレイへ液体ポリマを充填した後、液体ポリマのみに電圧を3分ほど印加するプロセスである。この工程は、液体ポリマ中の不純物の除去に必須であり、分析に至適な分離媒体環境を整えるために必要であると考えられている。非特許文献4ではプレランの適

用によりスラブゲルにおけるタンパクの分離が大幅に向上することが報告されている。

[0012] 現在、キャピラリーシーケンス市場の90%を保持しているのは、サーモフィッシャーサイエンス社である。サーモフィッシャーサイエンス社は装置のみならず試薬、解析ソフトの販売を行い、sample to answerとしての包括的なソリューションを顧客に提供している。しかしながら、その強大な寡占状態により、キャピラリーシーケンスにおけるランニングコストは高止まりし、装置のブラックボックス化も顧客の自由度を阻んでいる。その一方でサーモフィッシャーサイエンス社は多種の電気泳動装置などを提供することで、顧客の自由度の緩和を図っている。

[0013] ランニングコストが高止まりする具体的な要因としては、DNAの分離媒体である液体ポリマを分析毎に交換するプロトコルが変更を許容しない形で顧客に提供されている点である。つまり、顧客がキャピラリーアレイに液体ポリマを1回充填した場合、顧客は当該液体ポリマを用いた分析は1回に限定される。換言すると、顧客は1回の液体ポリマ充填について複数の分析を実施することができない。一方、液体ポリマはキャピラリーシーケンスの分析に必要な試薬の中で最も高価であるため、顧客は分析のランニングコストの低減を図ることが困難であった。

[0014] このような状況下、分析のランニングコストの低減を図り得る発明が幾つか提案されている。

例えば、特許文献1には、各キャピラリーの発熱を、熱伝導性媒体を介して電極から放熱し、電気泳動の動作中の各キャピラリーの温度を室温以上80℃以下に保つ電気泳動分析方法が開示されている。特許文献1には、このような構成とすることにより、ゲルの劣化を阻止でき、同一ゲルを用いて繰り返し電気泳動分析できると記載されている。

[0015] また、例えば、特許文献2には、分離された成分を検出する検知器と、キャピラリー中を泳動する試料の泳動終了を判定する手段（泳動終了判定手段）を備えているキャピラリー電気泳動装置が開示されている。この泳動終了

判定手段は、前記検出器によって検出された試料中の各成分に対応する信号ピークの強度を求め、この求められる強度が所定の値より低いときに、前記試料の前記キャピラリー中での泳動を終了したと判定する。特許文献2には、このような構成とすることにより、電気分離媒体であるゲルを交換することなく複数回の分析に繰り返し使用する場合に、2回目以降の測定開始時間を過不足なく算定できると記載されている。また、特許文献2には、このような構成とすることにより、複数の試料が同時にキャピラリーに導入される危険や、泳動時間が不必要に長くなることを避けることができ、最低限の時間で複数回の正確な分析が可能となると記載されている。

- [0016] 特許文献3には、逐次的に次のサンプルを時間 n ($T_s - T_F$) に毛管電気泳動ゲルの注入端に注入して、直前のサンプル中で最も遅い電気泳動度を有するポリヌクレオチドが次のサンプル中で最も速い電気泳動度を有するポリヌクレオチドより先に電気泳動システムの検出窓を通過するように、前記次のサンプルについて電気泳動を実行するステップを含む、電気泳動を実行する方法が開示されている。特許文献3には、このような構成とすることにより、代表的な実施態様では合計約25回までの泳動が、毛管ゲルを洗い流したり交換したりしないで同一の毛管ポリアクリルアミドゲルが全てのサンプルの電気泳動に使用されるように、同一の毛管電気泳動ゲルで実行されと記載されている。

先行技術文献

特許文献

- [0017] 特許文献1：特開2004-191247号公報
特許文献2：特開2000-314720号公報
特許文献3：特表2006-504099号公報

非特許文献

- [0018] 非特許文献1：J. Braz. Chem. Soc., Vol. 15, No. 3, 413-420, 2004
非特許文献2：J Forensic Sci. 2005 Jul;50(4):842-8.
非特許文献3：J Chromatogr A. 1998 May 8;806(1):157-64.

非特許文献4：J Applied Polymer. 2010 Jan, 48994

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0019] 特許文献1の[0008]には、「同一ゲルを用いて繰り返し電気泳動分析できる」との記載はあるが、前記したプレランを行う旨の記載はない。

同様に、特許文献3の[0017]には、「同一の毛管ポリアクリルアミドゲルが全てのサンプルの電気泳動に使用される」との記載、および「毛管ゲルを洗い流したり交換したりしないで、同一の毛管電気泳動ゲルで逐次的に電気泳動される」との記載はあるが、前記したプレランを行う旨の記載はない。

[0020] 一方、特許文献2の[0020]には予備泳動（プレラン）、[0022]には試料導入、[0024]には電気泳動について説明されている。そして、特許文献2の[0026]には分析終了後、上述の手順で試料導入、電気泳動が行われる旨記載されている。なお、特許文献2の[0020]には、予備泳動においては、標準試料および分析試料はキャピラリーの中には導入されないと記載されている。

しかし、特許文献2には、上述の手順にゲルの充填と予備泳動が含まれるが明らかにされていない。また、特許文献2には、ゲルの充填をどのタイミングで行うのか、[0020]以降の全体的な動作の説明において明らかにされていない。

[0021] そして、特許文献1～3に記載の発明はいずれも分離媒体としてゲルを用いるものであり、分離媒体として液体ポリマを用いた場合の構成について一切記載されておらず、示唆等となる記載もない。そのため、特許文献1～3に記載されている発明が提案されているものの、分離媒体として液体ポリマを用いる場合における、分析のランニングコストの低減を図るという問題は未だ解決されていない状況にある。

[0022] 本発明は前記状況に鑑みてなされたものである。本発明の課題は、分離媒体として液体ポリマを用いる場合において、分析のランニングコストを低減

できる分離媒体の連続使用方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0023] 前記課題を解決した本発明に係る分離媒体の連続使用方法是、キャピラリーに分離媒体を充填する分離媒体充填工程と、前記分離媒体を充填したキャピラリーに電圧を印加してプレランを行う第1プレラン工程と、前記プレランを行ったキャピラリーに1回目の試料を注入する第1試料注入工程と、前記1回目の試料を注入したキャピラリーに電圧を印加して1回目の電気泳動を行う第1電気泳動工程と、前記第1電気泳動工程後のキャピラリーに電圧を印加してプレランを行う第2プレラン工程と、前記第2プレラン工程を行ったキャピラリーに次回分の試料を注入する第2試料注入工程と、前記次回分の試料を注入したキャピラリーに電圧を印加して次回分の電気泳動を行う第2電気泳動工程と、を有し、前記第2プレラン工程、前記第2試料注入工程および前記第2電気泳動工程を予め設定された設定回数繰り返して行う。

発明の効果

[0024] 本発明によれば、分離媒体として液体ポリマを用いる場合において、分析のランニングコストを低減できる分離媒体の連続使用方法を提供できる。

前述した以外の課題、構成およ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

[0025] [図1]本発明の一実施形態に係る分離媒体の連続使用方法を適用できる電気泳動装置の構成を説明する構成概要図である。

[図2]本発明の一実施形態に係る分離媒体の連続使用方法を適用できる電気泳動装置の構成を説明する上面概要図である。

[図3A]図2のⅠⅠⅠa-ⅠⅠⅠa断面図である。

[図3B]図3AのⅠⅠⅠb部拡大図である。

[図4]本発明の一実施形態に係る分離媒体の連続使用方法を適用できる電気泳動装置の制御構成を説明する概要図である。

[図5]本発明の第1実施形態に係る分離媒体の連続使用方法の内容を説明する

フローチャートである。

[図6]分離媒体充填工程による分離媒体の充填頻度を設定するためのグラフィカルユーザーインターフェース（GUI）の一例を示す模式図である。

[図7]本発明の第1実施形態に係る分離媒体の連続使用方法に関して、ユーザーが入出力装置で分離媒体の充填頻度を入力した後のマイコンにおける処理および電気泳動等について説明するフローチャートである。

[図8]分析毎に分離媒体を充填する従来法の内容を説明するフローチャートである。

[図9]本発明の第2実施形態に係る分離媒体の連続使用方法の内容を説明するフローチャートである。

[図10]本発明の第2実施形態に係る分離媒体の連続使用方法に関して、ユーザーが入出力装置で分離媒体の充填頻度を入力した後のマイコンにおける処理および電気泳動等について説明するフローチャートである。

[図11]実施例1の1回目のラン（1st）、3回目のラン（3rd）、8回目のラン（8th）における400bp付近のDNA塩基配列および波形データを示す説明図である。

[図12]実施例1の1回目のラン（1st）、3回目のラン（3rd）、8回目のラン（8th）における600bp付近のDNA塩基配列および波形データを示す説明図である。

[図13]実施例1および実施例2の試料注入回数（InjectionID）、すなわち、ランの回数が1～6回目までの各回の隣接リード長（CRL）の統計値を示すグラフである。

[図14]実施例1および実施例2の試料注入回数が1～6回まで（Injection6まで）のトータルのCRLの統計値を比較したグラフである。

[図15]実施例4の試料注入回数（InjectionID）が1～16、すなわち、ランの回数が1～16回目までのDNAシーケンス解析におけるCRLの推移を連続的に示したグラフである。

[図16]実施例4の試料注入回数（InjectionID）が1～12、す

なわち、ランの回数が1～12回目までのフラグメント解析におけるEQの推移を連続的に示したグラフである。

[図17]ラン毎にプレランを行う実施例1、3と、液体ポリマ充填後、1回目のランを行うときのみプレランを行い、2回目以降のランではプレランを行わない実施例2、4とにおける、2回目のランの解析時間の差を対比して説明する説明図である。

[図18]実施例4における4つのキャピラリー（Cap1～4）の1～10回目のランのランタイムなどを示す表である。

発明を実施するための形態

[0026] 以下、適宜図面を参照して本発明の一実施形態に係る分離媒体の連続使用方法（以下、単に「本使用方法」と呼称する場合がある）について詳細に説明する。なお、実施形態の説明において、実質的に同一または類似の構成には同一の符号を付し、説明が重複する場合にはその説明を省略する場合がある。

[0027] （電気泳動装置）

本使用方法について説明する前に、本使用方法を適用できる電気泳動装置について説明する。

図1は、本使用方法を適用できる電気泳動装置1の構成を説明する構成概要図である。図2は、本使用方法を適用できる電気泳動装置1の構成を説明する上面概要図である。図3Aは、図2のIIIa-IIIa断面図である。図3Bは、図3AのIIIb部拡大図である。図4は、本使用方法を適用できる電気泳動装置1の制御構成を説明する概要図である。

[0028] 図1に示すように、本使用方法を適用できる電気泳動装置1（以下、単に「本装置1」と呼称する場合がある）は、装置下部にあるオートサンプラーユニット150と、装置上部にある照射検出／恒温槽ユニット160の、二つのユニットに大きく分けることができる。

[0029] オートサンプラーユニット150には、サンプラーベース80の上にY軸駆動体85が搭載され、Y軸に駆動を行うことができる。Y軸駆動体85に

はZ軸駆動体90が搭載され、Z軸に駆動を行うことができる。Z軸駆動体90の上には試料トレイ100が搭載される。そして、図1および図2に示すように、試料トレイ100の上に、分離媒体容器20、陽極側緩衝液容器30、陰極側緩衝液容器40、試料容器50をユーザーがセットする。試料容器50は、試料トレイ100上に搭載されたX軸駆動体95の上にセットされ、試料トレイ100上で試料容器50のみがX軸に駆動することができる。Z軸駆動体90には送液機構60も搭載される。この送液機構60は分離媒体容器20の下方に配置される。

[0030] 図1に示すように、照射検出／恒温槽ユニット160には、恒温槽ユニット110、恒温槽ドア120があり、中を一定の温度に保つことができる。恒温槽ユニット110の後方には照射検出ユニット130が搭載され、電気泳動時の検出を行うことができる。恒温槽ユニット110の中に、キャピラリー125（図3B参照）を複数まとめたキャピラリーアレイ10をユーザーがセットし、恒温槽ユニット110にてキャピラリーアレイ10を恒温に保ちながら電気泳動を行い、照射検出ユニット130にて検出を行う。また、恒温槽ユニット110には、電気泳動のための高電圧印加時にGNDに落とすための電極115も搭載されている。

[0031] 図3Aに示すように、キャピラリーアレイ10には、ロードヘッダ126、キャピラリーヘッド127、検出部128などが備えられている。

ロードヘッダ126は、キャピラリーアレイ10の一方の端部に装着されている。ロードヘッダ126は、キャピラリーアレイ10の陰極側端部となる。

キャピラリーヘッド127は、キャピラリーアレイ10のもう一方の端部に装着されている。キャピラリーヘッド127は、耐圧機密によってキャピラリー125が束としてまとめられている束なり耐圧機密で着脱可能な部材である。キャピラリーヘッド127は、キャピラリーアレイ10の陽極側端部となる。

検出部128の内部では、キャピラリー125が平面状に一定の間隔で配

列されている。照射検出ユニット１３０は、検出部１２８に配列されているキャピラリー１２５に光照射を行う。そして、検出部１２８は、光照射によって、それぞれのキャピラリー１２５を電気泳動している試料から発生される蛍光等を検出する。

[0032] 前記したように、キャピラリーアレイ１０は恒温槽ユニット１１０にセットされる。分離媒体容器２０、陽極側緩衝液容器３０、陰極側緩衝液容器４０、試料容器５０は、オートサンプラーユニット１５０にてＹＺ軸に駆動することができ、試料容器５０のみ、さらにＸ軸に駆動することができる。セットされたキャピラリーアレイ１０に、分離媒体容器２０、陽極側緩衝液容器３０、陰極側緩衝液容器４０、試料容器５０が、オートサンプラーユニット１５０の動きで任意の位置に自動で接続することができる。

[0033] 図２に示すように、試料トレイ１００上にセットされた陽極側緩衝液容器３０には、陽極側洗浄槽３１、陽極側電気泳動用緩衝液槽３２、試料導入用緩衝液槽３３がある。また、陰極側緩衝液容器４０には、廃液槽４１、陰極側洗浄槽４２、陰極側電気泳動用緩衝液槽４３がある。

[0034] 分離媒体容器２０、陽極側緩衝液容器３０、陰極側緩衝液容器４０、試料容器５０は図２に示すような位置関係に配置される。つまり、陽極側緩衝液容器３０は試料トレイ１００上の装置手前側（恒温槽ドア１２０が開閉する側）かつ左側に配置されている。分離媒体容器２０は陽極側緩衝液容器３０の奥に配置されている。試料容器５０は試料トレイ１００上の装置手前側かつ右側に配置されている。陰極側緩衝液容器４０は試料容器５０の奥に配置されている。これにより、キャピラリーアレイ１０との接続の際の陽極側－陰極側の位置関係は、「分離媒体容器２０－廃液槽４１」、「陽極側洗浄槽３１－陰極側洗浄槽４２」、「陽極側電気泳動用緩衝液槽３２－陰極側電気泳動用緩衝液槽４３」、「試料導入用緩衝液槽３３－試料容器５０」となる。

[0035] 図３Ａに示すように、分離媒体容器２０は試料トレイ１００に埋め込まれたガイド１０１の中に挿入してセットされる。分離媒体容器２０には分離媒

体が収容されている。分離媒体としては、例えば、液体ポリマを用いることが好ましい。このようにすると、本装置 1 における送液機構 60 により好適かつ自動的にキャピラリー 125（図 3 B 参照）に分離媒体を充填したり、キャピラリー 125 から分離媒体を排出したりできる。送液機構 60 は、送液機構 60 に内蔵されたプランジャ 61 が、分離媒体容器 20 の下方になるように配置される。プランジャ 61 が分離媒体容器 20 に設けられているシリンダ（不図示）を押し上げることで分離媒体容器 20 内の分離媒体（不図示）がキャピラリーヘッド 127 を介してキャピラリー 125 内に導入される。

[0036] 電気泳動の際、キャピラリーアレイ 10 の図 3 A における左側が陽極側となり、右側が陰極側となる。オートサンプラーユニット 150 が「陽極側電気泳動用緩衝液槽 32－陰極側電気泳動用緩衝液槽 43」の位置に移動し、陰極側のキャピラリーアレイ 10 に高電圧がかかり、陰極側緩衝液容器 40、陽極側緩衝液容器 30 を介し、電極 115 にて GND に流すことで電気泳動を行う。

[0037] 図 3 B に示すように、キャピラリーアレイ 10 を構成する個々のキャピラリー 125 は、それぞれ金属製の中空電極 124 を通して固定されている。なお、中空電極 124 はキャピラリー 125 の一部（陰極側端部からロードヘッダ 126 まで）に設けられている。

図 3 B に示すように、キャピラリー 125 の先端 125 a が中空電極 124 から 0.5 mm 程度突出している状態となっている。なお、中空電極 124 から突出するキャピラリー 125 の長さは 0.5 mm に限らない。さらに、それぞれのキャピラリー 125 に備えられている中空電極 124 のすべては一体となっている状態でロードヘッダ 126（図 3 A 参照）に装着される。そして、すべての中空電極 124 はロードヘッダ 126 を介して高圧電源 122 に接続されている。高圧電源 122 は負電圧を中空電極 124 に印加するため、電気泳動時や試料注入時など、電圧が中空電極 124 に印加される際に中空電極 124 は陰極電極として動作する。

[0038] 図4に示すように、電圧制御機構は、マイクロコントローラ（マイコン）141、コントローラ142、高圧電源122、第一電流計121、および第二電流計123を備える。

マイコン141は、キャピラリーアレイ10に充填されている分離媒体を用いて、陽極側電気泳動用緩衝液槽32および陰極側電気泳動用緩衝液槽43の通電状態を確認する。そして、マイコン141は、確認した通電状態の結果を入出力装置（不図示）に出力する。入出力装置は、例えば、タッチパネルなどで構成されている。

コントローラ142は高圧電源122を制御することによる通電路への電圧の印加、試料トレイ100の移動、X軸駆動体95による試料容器50の移動などを制御する。

[0039] 高圧電源122は、コントローラ142の制御に基づいて、通電路に電圧を印加する。通電路は、中空電極124、陰極側電気泳動用緩衝液槽43に満たされた電気泳動用緩衝液（あるいは試料容器50内の試料である場合もある）、陽極側電気泳動用緩衝液槽32に満たされた電気泳動用緩衝液（あるいは試料導入用緩衝液槽33に満たされた緩衝液である場合もある）、電極115である。より具体的には、高圧電源122は、GND129a、129bより低い電圧（負電圧）を発生するため、高圧電源122によって負電圧が印加された際の電流の流れは図4の破線矢印で示す流れとなる。つまり、電流は、GND129a→第二電流計123→電極115→キャピラリーアレイ10→中空電極124→第一電流計121→高圧電源122の順に流れる。よって、通電路は、GND129a→第二電流計123→電極115→キャピラリーアレイ10→中空電極124→第一電流計121→高圧電源122となる。

[0040] 高圧電源122は、第一電流計121を介して中空電極124と、第二電流計123を介して電極115と導通している。この両端に、数十キロボルトの電圧を印加すると、中空電極124から電極115の方向に電界が生じる。この電界により、負に帯電した核酸等の試料は、キャピラリー125の

陰極側の先端 1 2 5 a (図 3 B 参照) から検出部 1 2 8 (図 3 A 参照) へ向かって移動する。これにより、図 4 の矢印 A 1 の方向に負の電荷を有する試料 (例えば、DNA) が泳動される。

[0041] この際、第一電流計 1 2 1 は、高圧電源 1 2 2 から中空電極 1 2 4 に流れる電流を検出し、その電流値をマイコン 1 4 1 に送信する。また、第二電流計 1 2 3 は、電極 1 1 5 から GND 1 2 9 a に流れる電流を検出し、その電流値をマイコン 1 4 1 に送信する。電流値およびその変動のチェックには、通常、第二電流計 1 2 3 を使用する。その理由は、第二電流計 1 2 3 が電気泳動路を流れる電流値をより直接的に反映しているためである。第一電流計 1 2 1 と第二電流計 1 2 3 の間に漏電などがあったときに、第一電流計 1 2 1 が示す値は漏電の電流値も含めているのに対して、第二電流計 1 2 3 が示す数値は漏電の分は含まれない。つまり、電気泳動路を流れる正味の電流量が検出される。第一電流計 1 2 1 と第二電流計 1 2 3 の間は緩衝液や分離媒体 (例えば、液体ポリマ) など金属に比べて比較的抵抗の大きい媒体が介在する部分で、さらにブロックやキャピラリー 1 2 5 などの接続部が多く存在する。従って、第一電流計 1 2 1 を経由した回路は漏電が発生し易い部分であるといえる。

[0042] (分離媒体の連続使用方法)

次に、本使用方法について説明する。図 5 は、本発明の第 1 実施形態に係る分離媒体の連続使用方法の内容を説明するフローチャートである。

本使用方法は電気泳動装置 1 に適用される。

[0043] (第 1 実施形態)

図 5 に示すように、第 1 実施形態に係る本使用方法は、分離媒体充填工程 S 1 と、第 1 プレラン工程 S 2 と、第 1 試料注入工程 S 3 と、第 1 電気泳動工程 S 4 と、第 2 プレラン工程 S 5 と、第 2 試料注入工程 S 6 と、第 2 電気泳動工程 S 7 と、を有する。

そして、本使用方法は、前記第 2 プレラン工程 S 5、前記第 2 試料注入工程 S 6 および前記第 2 電気泳動工程 S 7 を予め設定された設定回数 (n 回)

繰り返して行う。

[0044] 分離媒体充填工程 S 1 は、キャピラリー 1 2 5 に分離媒体を充填する工程である。キャピラリー 1 2 5 への分離媒体の充填は、前記した送液機構 6 0 により行うことができる。

第 1 プレラン工程 S 2 は、前記分離媒体を充填したキャピラリー 1 2 5 に電圧を印加してプレランを行う工程である。プレランとは、試料の電気泳動に先立って分離媒体に電圧を印加することである。プレランを行うことで、分離媒体中の不純物を除去でき、分析に至適な分離媒体環境を整えることができる。プレランは、試料を注入せずに行う。第 1 プレラン工程 S 2 は、試料トレイ 1 0 0 を X 軸、Y 軸、Z 軸に適宜駆動させて、キャピラリーアレイ 1 0 との接続における陽極側－陰極側の位置関係が「陽極側電気泳動用緩衝液槽 3 2－陰極側電気泳動用緩衝液槽 4 3」となるようにし、電圧を印加することで行うことができる。第 1 プレラン工程 S 2 は、一般的な条件、例えば、6 0℃×3 分×1 5 k Vで行うことができる。

[0045] 第 1 試料注入工程 S 3 は、前記プレランを行ったキャピラリー 1 2 5 に 1 回目の試料を注入する工程である。第 1 試料注入工程 S 3 は、試料トレイ 1 0 0 を X 軸、Y 軸、Z 軸に適宜駆動させて、キャピラリーアレイ 1 0 との接続における陽極側－陰極側の位置関係が「試料導入用緩衝液槽 3 3－試料容器 5 0」となるようにし、電圧を印加することで行うことができる。第 1 試料注入工程 S 3 は、例えば、6 0℃×4 秒×1 . 2 k Vで行うことができる。

[0046] 第 1 電気泳動工程 S 4 は、前記 1 回目の試料を注入したキャピラリー 1 2 5 に電圧を印加して 1 回目の電気泳動を行う工程である。第 1 電気泳動工程 S 4 は、試料トレイ 1 0 0 を X 軸、Y 軸、Z 軸に適宜駆動させて、キャピラリーアレイ 1 0 との接続における陽極側－陰極側の位置関係が「陽極側電気泳動用緩衝液槽 3 2－陰極側電気泳動用緩衝液槽 4 3」となるようにし、電圧を印加することで行うことができる。第 1 電気泳動工程 S 4 は、例えば、6 0℃×3 0 分×7 . 5 k Vで行うことができる。

- [0047] 第2プレラン工程S5は、前記第1電気泳動工程S4後のキャピラリー125に電圧を印加してプレランを行う工程である。つまり、本使用方法では、前回の電気泳動（ラン）で分析を行った後に通常行われるキャピラリー125内の分離媒体の廃棄および再注入（すなわち、分離媒体の交換）を行わずに、前回のランで使用した分離媒体のままで次回の試料分析のプレラン（第2プレラン工程S5）を行う。なお、ランとは、高圧電源122によって、キャピラリー125の両端に電位差が生じることで、分離媒体に加えた試料がキャピラリー125に泳動されることである。ランの実行中、照射検出ユニット130による試料の検出が行われる。
- [0048] 第2試料注入工程S6は、前記第2プレラン工程S5を行ったキャピラリー125に次回分の試料を注入する工程である。第2試料注入工程S6は、第1試料注入工程S3と同様にして行うことができる。
- 第2電気泳動工程S7は、前記次回分の試料を注入したキャピラリー125に電圧を印加して次回分の電気泳動を行う工程である。第2電気泳動工程S7は、第1電気泳動工程S4と同様にして行うことができる。
- [0049] そして、前記したように、本使用方法は、第2プレラン工程S5、第2試料注入工程S6および第2電気泳動工程S7を予め設定された設定回数（ n 回）繰り返して行う。本使用方法は、第2プレラン工程S5、第2試料注入工程S6および第2電気泳動工程S7の一連の工程を予め設定された設定回数繰り返して行ったら、1回の分離媒体充填工程S1で充填した分離媒体での分析を終了する。その後、分離媒体充填工程S1に戻ってキャピラリー125内の分離媒体を交換し、新しい分離媒体で第1プレラン工程S2以降の各工程を前記したとおりに行う。本使用方法では、これを所望の回数行う。
- [0050] ここで、本明細書における分離媒体の充填頻度（ f 回）とは、1回充填した分離媒体に対して行う複数回のランの合計数が所定の数（ f 回）に達するごとに、新しい分離媒体を充填すること（分離媒体の再充填度数）をいう。すなわち、分離媒体の充填頻度（ f 回）は、1回の分離媒体の充填に対して1回の第1電気泳動工程S4と、 n 回繰り返して行われる第2電気泳動工程

S 7 との合計ラン数を意味する。つまり、 f 回 $= 1 + n$ 回である。換言すれば、第 2 プレラン工程 S 5、第 2 試料注入工程 S 6 および第 2 電気泳動工程 S 7 の繰り返し回数 (n 回) は、「分離媒体充填工程 S 1 による分離媒体の充填頻度 $- 1$ 回」 ($f - 1$ 回) で算出し、設定できる。例えば、分離媒体の充填頻度 (f 回) を 4 回で設定すると、その設定内容には、1 回の第 1 電気泳動工程 S 4 のランと 3 回の第 2 電気泳動工程 S 7 のランとが 1 セットで含まれる。このように、本態様とした場合、分離媒体の充填頻度 (f 回) を設定すると、それにより、第 2 プレラン工程 S 5、第 2 試料注入工程 S 6 および第 2 電気泳動工程 S 7 の繰り返しの設定回数 (n 回) が設定される。

一方、第 2 プレラン工程 S 5、第 2 試料注入工程 S 6 および第 2 電気泳動工程 S 7 の繰り返し回数 (n 回) は、1 回目のランで用いた分離媒体を用いて行う 2 回目以降のランの回数をいう。

[0051] 前述したように、本使用方法では、1 回充填した分離媒体を複数回のランで使用する。従って、本使用方法は、キャピラリーシーケンスの分析に必要なとなる試薬の中で最も高価な分離媒体、例えば、液体ポリマの充填頻度を低減でき、それにより、分析のランニングコストを低減できる。

[0052] ここで、本実施形態においては、ユーザーにより第 2 プレラン工程 S 5、第 2 試料注入工程 S 6 および第 2 電気泳動工程 S 7 の繰り返しの設定回数 (n 回) を任意に設定することもできる。これらの工程の繰り返しの設定回数 (すなわち、第 2 電気泳動工程 S 7 によるランの繰り返し回数) は、例えば、1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回、10 回、11 回、12 回、13 回、14 回、15 回、16 回、17 回、18 回、19 回、20 回、21 回、22 回、23 回、24 回または 25 回などとすることができ、26 回以上であってもよい。第 1 電気泳動工程 S 4 のランが 1 回あるので、設定した繰り返しの設定回数が例えば 5 回である場合、1 回充填した分離媒体で、合計 6 回のランを行うことになる。このように、本態様では、第 2 プレラン工程 S 5、第 2 試料注入工程 S 6 および第 2 電気泳動工程 S 7 の繰り返しの設定回数 (n 回) を予め設定しておくことにより、1 回の分

離媒体の充填ごとに、1回の第1電気泳動工程S4のランと、任意に設定したn回の第2電気泳動工程S7のランとを1セットで行うことができる。

[0053] なお、前記した工程の繰り返しの設定回数（n回）は、分離媒体の劣化状況やDNA鎖の長さなどの試料の状態に応じて任意に設定可能である。設定回数は、例えば、DNA鎖が300bp程度の長さであれば、1回の分離媒体の充填で4～5回（合計ラン数5～6回、すなわち分離媒体の充填頻度5～6回）などとすることができる。また、設定回数は、例えば、DNA鎖が600bp程度の長さであれば、1回の分離媒体の充填で3回（合計ラン数4回、すなわち分離媒体の充填頻度4回）などとすることができる。

[0054] 分離媒体充填工程S1による分離媒体の充填頻度（f回）の入力は、例えば、マイコン141に接続された入出力装置（不図示）により行うことができる。図6は、分離媒体充填工程S1による分離媒体の充填頻度を設定するためのグラフィカルユーザーインターフェース（GUI）の一例を示す模式図である。図6に示すように、入出力装置は、分離媒体の充填頻度（f回）を入力するためのGUIを表示できる。

ユーザーは、図6に示すGUIのうち、下方の欄の「Polymer exchange frequency」に、例えば、「every 4 injection」や「4」などと入力したり、ラジオボタンで「4」を選択したりすることにより、分離媒体の充填頻度を4回と設定することができる。

[0055] 図6において図示はしないが、前記した工程の繰り返しの設定回数（n回）の入力も分離媒体の充填頻度（f回）と同様にして行うことができる。例えば、前記した入出力装置に前記した工程の繰り返しの設定回数（n回）を入力するためのGUIを表示させるとよい。前記した工程の繰り返しの設定回数（n回）を入力するため、GUI中に、「Number of repetitions of 2nd electrophoresis」という欄を設け、これに、例えば、「3 times」や「3」などと入力したり、ラジオボタンで「3」を選択したりすることにより、前記した工程の繰

り返しの設定回数を3回と設定することができる。

[0056] 本使用方法では、分離媒体の充填頻度が予め設定された回数（ f 回）を達成したら、換言すると、合計ラン回数が f 回を達成したら（さらに換言すると、 $f-1$ 回で算出されて設定される前記した工程の繰り返しの設定回数（ n 回）を達成したら）（図5のステップS8でYes）、1回の分離媒体の充填で行う全ての分析（ラン）を終了する。その後、分離媒体充填工程S1に戻ってキャピラリー125内の分離媒体を交換し、新しい分離媒体で第1プレラン工程S2以降の各工程を前記したとおりに行う。

一方、分離媒体充填工程S1の頻度が予め設定された回数（ f 回）を達成していない場合、換言すると、合計ラン回数が f 回を達成していない場合（さらに換言すると、 $f-1$ 回で算出されて設定される前記した工程の繰り返しの設定回数（ n 回）を達成していない場合）（図5のステップS8でNo）、第2プレラン工程S5に戻って、第2プレラン工程S5、第2試料注入工程S6および第2電気泳動工程S7を行う。

[0057] 図7は、本発明の第1実施形態に係る分離媒体の連続使用方法に関して、ユーザーが入出力装置で分離媒体の充填頻度を入力した後のマイコン141における処理および電気泳動等について説明するフローチャートである。

図7に示すように、ユーザーが、分離媒体の充填頻度を入力する（ステップS11）。図7の例では、例えば、分離媒体の充填頻度を「4」と入力する（ $f=4$ ）。これにより、マイコン141は、合計ラン数が4回を達成したら、キャピラリー125から古い分離媒体を廃棄して、新たな分離媒体をキャピラリー125に充填すると設定される。また、マイコン141では、「分離媒体の充填頻度-1」を算出し、前記した工程の繰り返しの設定回数が設定される（ $n=3$ ）。

[0058] そして、ユーザーがラン開始のキーを入力すると、分析が開始される（ステップS12）。マイコン141は、電気泳動が初回か否かを判断する（ステップS13）。電気泳動が初回である場合（ステップS13でYes）、マイコン141は分離媒体の充填を行う旨の指示を出し（ステップS14）

、本装置 1 で分離媒体充填工程 S 1 を行う。

次いで、マイコン 1 4 1 はプレランを行う旨の指示を出し（ステップ S 1 5）、本装置 1 で第 1 プレラン工程 S 2 を行う。

次いで、マイコン 1 4 1 は試料注入を行う旨の指示を出し（ステップ S 1 6）、本装置 1 で第 1 試料注入工程 S 3 を行う。

次いで、マイコン 1 4 1 は電気泳動を行う旨の指示を出し（ステップ S 1 7）、本装置 1 で第 1 電気泳動工程 S 4 を行う。

[0059] 電気泳動終了後、マイコン 1 4 1 は、合計ラン数が、入力された分離媒体の充填頻度（ $f = 4$ ）を達成したか否かを判断する（ステップ S 1 8）。合計ラン数が分離媒体の充填頻度（ $f = 4$ ）を達成していない場合（ステップ S 1 8 で N o）、マイコン 1 4 1 は、ラン開始のキー入力直後に戻って、次に行う電気泳動が初回か否かを判断する（ステップ S 1 3）。

次に行う電気泳動は初回ではないので（ステップ S 1 3 で N o）、マイコン 1 4 1 は、プレランを行う旨の指示を出し（ステップ S 1 5）、本装置 1 で第 2 プレラン工程 S 5 を行う。

次いで、マイコン 1 4 1 は試料注入を行う旨の指示を出し（ステップ S 1 6）、本装置 1 で第 2 試料注入工程 S 6 を行う。

次いで、マイコン 1 4 1 は電気泳動を行う旨の指示を出し（ステップ S 1 7）、本装置 1 で第 2 電気泳動工程 S 7 を行う。

[0060] 電気泳動終了後、マイコン 1 4 1 は、合計ラン数が、入力された分離媒体の充填頻度（ $f = 4$ ）を達成したか否かを判断する（ステップ S 1 8）。合計ラン数が分離媒体の充填頻度（ $f = 4$ ）を達成していない場合（ステップ S 1 8 で N o）、マイコン 1 4 1 は、再びラン開始のキー入力直後に戻って、次に行う電気泳動が初回か否かを判断し（ステップ S 1 3 で Y e s または N o）、当該判断に従って、本装置 1 に対して前述した指示を出す（ステップ S 1 4 またはステップ S 1 5 に進む）。

合計ラン数が分離媒体の充填頻度（ $f = 4$ ）を達成している場合（ステップ S 1 8 で Y e s）、マイコン 1 4 1 は、本装置 1 にラン終了の旨の指示を

出し（ステップS 1 9）、本装置 1 はランを終了する。

[0061] マイコン 1 4 1 は、ユーザーが設定した回数、図 7 に示す上記の一連のフローを行って試料の分析を行う。

[0062] このように、本使用方法是、設定された分離媒体の充填頻度において、電気泳動が初回ではない場合は分離媒体の充填を行わない。従って、本使用方法是、キャピラリーシーケンスの分析に必要となる試薬の中で最も高価な分離媒体、例えば、液体ポリマの充填頻度を低減でき、それにより、分析のランニングコストを低減できる。

[0063] ここで、本使用方法と、分析毎に分離媒体を充填する従来法との比較を行う。

図 8 は、分析毎に分離媒体を充填する従来法の内容を説明するフローチャートである。

図 8 に示すように、従来法は、分離媒体充填工程 S 1 0 1 と、プレラン工程 S 1 0 2 と、試料注入工程 S 1 0 3 と、電気泳動工程 S 1 0 4 と、を有する。

図 8 に示す従来法におけるこれらの工程はそれぞれ、図 5 に示す本使用方法における分離媒体充填工程 S 1、第 1 プレラン工程 S 2、第 1 試料注入工程 S 3 および第 1 電気泳動工程 S 4 に相当する。

[0064] 図 8 に示す従来法は、分析毎に分離媒体を充填するので、毎回これらの工程を行う。つまり、図 8 に示す従来法は、図 5 に示す本使用方法における第 2 プレラン工程 S 5、第 2 試料注入工程 S 6 および第 2 電気泳動工程 S 7 を有しておらず、また、それらの工程を繰り返し行うものでもない。そのため、従来法は、キャピラリーシーケンスの分析に必要となる試薬の中で最も高価な分離媒体の充填頻度が低減されず、分析のランニングコストは高いままである。

[0065] 本発明者は、本発明の課題を解決するため研究したところ、第 1 実施形態に係る本使用方法で、第 2 プレラン工程 S 5、第 2 試料注入工程 S 6 および第 2 電気泳動工程 S 7 を予め設定された設定回数繰り返して行うこととした

。このようにして得られる分析性能は、後述するように、波形データはやや劣化するものの、十分に仕様を満たすことを見出した。また、第1実施形態に係る本使用方法是、図8に示す従来法と比べ、ターンアラウンドタイム（TAT）の向上が得られることを見出した。

[0066] （第2実施形態）

次に、第2実施形態に係る本使用方法について説明する。図9は、本発明の第2実施形態に係る分離媒体の連続使用方法の内容を説明するフローチャートである。

図9に示すように、第2実施形態に係る本使用方法是、分離媒体充填工程S1と、第1プレラン工程S2と、第1試料注入工程S3と、第1電気泳動工程S4と、第2試料注入工程S6と、第2電気泳動工程S7と、を有する。

そして、本使用方法是、前記第2試料注入工程S6および前記第2電気泳動工程S7を予め設定された設定回数（n回）繰り返して行う。

[0067] 第2実施形態に係る本使用方法是、第2プレラン工程S5を有していない点で、第2プレラン工程S5を有している第1実施形態に係る本使用方法と相違している。

また、第2実施形態に係る本使用方法の第2試料注入工程S6は、第1電気泳動工程S4後のキャピラリーに次回分の試料を注入する工程である。これに対し、第1実施形態に係る本使用方法の第2試料注入工程S6は、第2プレラン工程S5を行ったキャピラリーに次回分の試料を注入する工程である。従って、第2実施形態に係る本使用方法の第2試料注入工程S6と、第1実施形態に係る本使用方法の第2試料注入工程S6とは、工程の内容が相違している。

また、第2実施形態に係る本使用方法是、前記第2試料注入工程S6および前記第2電気泳動工程S7を予め設定された設定回数（n回）繰り返して行う。これに対し、第1実施形態に係る本使用方法是、前記第2プレラン工程S5、前記第2試料注入工程S6および前記第2電気泳動工程S7を予め

設定された設定回数（ n 回）繰り返して行う。従って、第2実施形態に係る本使用方法と第1実施形態に係る本使用方法とでは、繰り返して行う工程の内容が相違している。

第2実施形態に係る本使用方法と第1実施形態に係る本使用方法とは、第2実施形態に係る本使用方法が第2プレラン工程S5を有していないことによりこれらの相違点を有しているが、これら以外は同様の構成である。

以下、第2実施形態に係る本使用方法について、第1実施形態に係る本使用方法との相違点を中心に説明する。

[0068] 前記したように、第2実施形態に係る本使用方法の第2試料注入工程S6は、第1電気泳動工程S4後のキャピラリー125に次回分の試料を（プレランを行わずにそのまま）注入する工程である。本発明者は、本発明の課題を解決するため研究したところ、驚くべきことに、第1電気泳動工程S4後のキャピラリー125に次回分の試料を、プレランを行わずにそのまま注入して次回の電気泳動を行うと、すなわち、第1電気泳動工程S4の後に第2試料注入工程S6および第2電気泳動工程S7を行うと、第2試料注入工程前にプレラン（第1実施形態における第2プレラン工程S5）を行う場合と比較して、分析回数の増大、ターンアラウンドタイム（TAT）の向上、分析性能の向上などが得られることを見出した。これらの効果は、プレランを省略し、分離媒体の劣化が抑制されることになったために齎されたものである。分離媒体の劣化としては、例えば、ウレアの分解などが挙げられる。すなわち、第2実施形態に係る本使用方法は、第2プレラン工程S5を省くことでプレランによって生じるウレアの分解を抑制し、ウレアの分解産物による液体ポリマなどの分離媒体のガラス表面への吸着を阻む働きを低減する。その結果、電気浸透流が増大し難くなり（抑制され）、それにより、例えば、DNAなどの試料の分析回数および分析性能が向上する。また、プレランを行わないのでその分、分析を早く終わらせることができる。例えば、一般的なキャピラリーDNAシーケンサーでは、1回の分析に約30分の時間が必要であり、プレランはそのうちの約3分を必要とする。次回分の試料の分

析にあたって、プレランを省略するので、分析時間を約10%短縮できる。
これは、分析毎にプレランを行う従来法や第1実施形態に係る本使用方法と比較して有利な効果であるといえる。

[0069] 図10は、本発明の第2実施形態に係る分離媒体の連続使用方法に関して、ユーザーが入出力装置で分離媒体の充填頻度を入力した後のマイコン141における処理および電気泳動等について説明するフローチャートである。

図10に示すように、ユーザーが、分離媒体の充填頻度を入力する（ステップS11）。図10の例では、例えば、分離媒体の充填頻度を「4」と入力する（ $f=4$ ）。これにより、マイコン141は、合計ラン数が4回を達成したら、キャピラリー125から古い分離媒体を廃棄して、新たな分離媒体をキャピラリー125に充填すると設定される。また、マイコン141では、「分離媒体の充填頻度-1」を算出し、前記した工程の繰り返しの設定回数が設定される（ $n=3$ ）。

[0070] そして、ユーザーがラン開始のキーを入力すると、分析が開始される（ステップS12）。マイコン141は、電気泳動が初回か否かを判断する（ステップS13）。電気泳動が初回である場合（ステップS13でYes）、マイコン141は分離媒体の充填を行う旨の指示を出し（ステップS14）、本装置1で分離媒体充填工程S1を行う。

次いで、マイコン141はプレランを行う旨の指示を出し（ステップS15）、本装置1で第1プレラン工程S2を行う。

次いで、マイコン141は試料注入を行う旨の指示を出し（ステップS16）、本装置1で第1試料注入工程S3を行う。

次いで、マイコン141は電気泳動を行う旨の指示を出し（ステップS17）、本装置1で第1電気泳動工程S4を行う。

[0071] 電気泳動終了後、マイコン141は、合計ラン数が、入力された分離媒体の充填頻度（ $f=4$ ）を達成したか否かを判断する（ステップS18）。合計ラン数が分離媒体の充填頻度（ $f=4$ ）を達成していない場合（ステップS18でNo）、マイコン141は、ラン開始のキー入力直後に戻って、次

に行う電気泳動が初回か否かを判断する（ステップS 1 3）。

次に行う電気泳動は初回ではないので（ステップS 1 3でN o）、マイコン1 4 1は、試料注入を行う旨の指示を出し（ステップS 1 6）、本装置1で第2試料注入工程S 6を行う。

次いで、マイコン1 4 1は電気泳動を行う旨の指示を出し（ステップS 1 7）、本装置1で第2電気泳動工程S 7を行う。

[0072] 電気泳動終了後、マイコン1 4 1は、合計ラン数が、入力された分離媒体の充填頻度（ $f = 4$ ）を達成したか否かを判断する（ステップS 1 8）。合計ラン数が分離媒体の充填頻度（ $f = 4$ ）を達成していない場合（ステップS 1 8でN o）、マイコン1 4 1は、再びラン開始のキー入力直後に戻って、次に行う電気泳動が初回か否かを判断し（ステップS 1 3でY e sまたはN o）、当該判断に従って、本装置1に対して前述した指示を出す（ステップS 1 4またはステップS 1 6に進む）。

合計ラン数が分離媒体の充填頻度（ $f = 4$ ）を達成している場合（ステップS 1 8でY e s）、マイコン1 4 1は、本装置1にラン終了の旨の指示を出し（ステップS 1 9）、本装置1はランを終了する。

[0073] マイコン1 4 1は、ユーザーが設定した回数、図1 0に示す上記の一連のフローを行って試料の分析を行う。

実施例

[0074] 次に、本使用方法の実施例を説明する。

〔1〕検討1

<実施例1>

実施例1は図5に示すフローおよび次の条件でキャピラリーシーケンスDNA塩基配列解析を行った。キャピラリーDNAシーケンサーは、日立ハイテク社製DS3000を用いた。分離媒体として、液体ポリマを用いた。液体ポリマは、Spectrum Compact Polymer 7（Promega社製CE237A）を用いた。解析対象となるDNAサンプルは、Sequencing Standard, BigDye™ Termini

nator v3.1 (Thermo Fisher社製)を用いた。

[0075] <実施例1の条件>

分離媒体充填工程S1は、キャピラリーDNAシーケンサーにおいて定められた方法で行った。

第1プレラン工程S2は、60℃×3分×15kVで行った。

第1試料注入工程S3は、60℃×4秒×1.2kVで行った。

第1電気泳動工程S4は、60℃×30分×7.5kVで行った。

第2プレラン工程S5は、60℃×3分×15kVで行った。

第2試料注入工程S6は、60℃×4秒×1.2kVで行った。

第2電気泳動工程S7は、60℃×30分×7.5kVで行った。

[0076] 実施例1は、分離媒体の充填頻度を8（すなわち、第2プレラン工程S5、第2試料注入工程S6および第2電気泳動工程S7の繰り返し設定回数を7）で設定し、これを1セットで2回連続して行い、合計16ランの分析を行った。

[0077] <実施例2>

実施例2は、図9に示すフローおよび次の条件でキャピラリーシーケンスDNA塩基配列解析を行った。なお、キャピラリーDNAシーケンサー、液体ポリマおよびDNAサンプルは実施例1と同様である。

[0078] <実施例2の条件>

分離媒体充填工程S1は、キャピラリーDNAシーケンサーにおいて定められた方法で行った。

第1プレラン工程S2は、60℃×3分×15kVで行った。

第1試料注入工程S3は、60℃×4秒×1.2kVで行った。

第1電気泳動工程S4は、60℃×30分×7.5kVで行った。

第2試料注入工程S6は、60℃×4秒×1.2kVで行った。

第2電気泳動工程S7は、60℃×30分×7.5kVで行った。

[0079] 実施例2も、分離媒体の充填頻度を8（すなわち、第2試料注入工程S6および第2電気泳動工程S7の繰り返し設定回数を7）で設定し、これを1

セットで2回連続して行い、合計16ランの分析を行った。

[0080] 実施例1の分析の結果の一部を図11および図12に示す。

図11は、実施例1の1回目のラン(1st)、3回目のラン(3rd)、8回目のラン(8th)における400bp付近のDNA塩基配列および波形データを示す説明図である。1回目のランは1回の液体ポリマ充填後における初回の電気泳動である。3回目のランは1回の液体ポリマ充填後における3回目の電気泳動である。8回目のランは1回の液体ポリマ充填後における8回目の電気泳動である。

図12は、実施例1の1回目のラン(1st)、3回目のラン(3rd)、8回目のラン(8th)における600bp付近のDNA塩基配列および波形データを示す説明図である。1回目のランは1回の液体ポリマ充填後における初回の電気泳動である。3回目のランは1回の液体ポリマ充填後における3回目の電気泳動である。8回目のランは1回の液体ポリマ充填後における8回目の電気泳動である。

[0081] 図11および図12に示すように、1回の液体ポリマ充填後のランの回数が増えると、波形データはやや劣化するものの、DNA塩基配列は問題なく解析することができた。具体的には、図12に示す8回目のランの645bp付近に十分な精度で解析できない部分があったが、それ以外は十分高い精度で解析できた。

実施例2については図示を省略するが、実施例1とほぼ同様の結果となった。

[0082] 図13は、実施例1および実施例2の試料注入回数(Injection ID)、すなわち、ランの回数が1~6回目までの各回の隣接リード長(CRL)の統計値を示すグラフである。なお、図13は、3回独立に同じ解析を行って得た統計値を示している。

図13に示すように、600bpを基準値として定めた場合、実施例1および実施例2のいずれも、4回目のランまでCRLが当該基準値をクリアしており、十分に仕様を満たすことが確認された。仮に、400bpを基準値

として定めた場合は、実施例1および実施例2のいずれも、6回目のランまでCRLが当該基準値をクリアできており、十分に仕様を満たすことが分かる。なお、基準値は、解析したいDNA塩基配列の長さに応じて任意に変更できる。例えば、解析したいDNA塩基配列がPCR増幅産物であり、その長さが300bpや400bpなどのように予め予想できる場合には、それを基準値として検討することができる。例えば、PCR増幅産物の長さが300bpの場合、図13に示す結果から、8～10回目のラン程度までは十分に仕様を満たすことができると推察された。

[0083] 図14は、実施例1および実施例2の試料注入回数が1～6回まで（Injection6まで）のトータルのCRLの統計値を比較したグラフである（ $p=0.04721$ ）。図14に示すように、実施例1および実施例2のいずれにおいても十分に仕様を満たすことが確認された。また、実施例2は実施例1よりもCRLが高い傾向にあることが確認された。これは、実施例2では、第2プレラン工程S5を行わなかったため、液体ポリマに含まれるウレアの分解が抑制されたためと結論付けられた。

[0084] [2] 検討2

検討2では、分離媒体の充填頻度を変更して、実施例1、2と同様の条件でキャピラリーシーケンスDNA塩基配列解析を行った。具体的には、次のようにして解析を行った。

[0085] <実施例3>

実施例3は、分離媒体の充填頻度を4（すなわち、第2プレラン工程S5、第2試料注入工程S6および第2電気泳動工程S7の繰り返し設定回数を3）で設定し、これを1セットで4回連続して行い、合計16ランの分析を行った。実施例3は、これ以外は実施例1と同様にして解析を行った。

[0086] <実施例4>

実施例4は、分離媒体の充填頻度を4（すなわち、第2試料注入工程S6および第2電気泳動工程S7の繰り返し設定回数を3）で設定し、これを1セットで4回連続して行い、合計16ランの分析を行った。実施例4は、こ

れ以外は実施例2と同様にして解析を行った。

[0087] 図15は、実施例4の試料注入回数（InjectionID）が1～16、すなわち、ランの回数が1～16回目までのDNAシーケンス解析におけるCRLの推移を連続的に示したグラフである。図中、右側の1、2、3は、キャピラリーの番号を示している。すなわち、図15は3つのキャピラリーの1～16回目までのランのCRLの推移を折れ線グラフで示している。また、図中の「▲」は、液体ポリマを充填または再充填（交換）した後、1回目のランの結果を示している。図中の「□」は、1回目のランで用いた液体ポリマを用い、2回目、3回目および4回目のランを行った結果を示している。

[0088] 図15に示すように、1～3のキャピラリーの個体差により分析の調子が良かったものとそうでなかったものがあり、1回の液体ポリマ充填後のランの回数が増えると、CRLがやや低下するものがあった。しかし、DNA塩基配列は問題なく解析することができた。このことから、CRLの基準を600bpとした場合（解析したいDNA塩基配列の長さが600bpの場合）は、分離媒体の充填頻度を4とすれば十分な仕様を満たすことが確認された。なお、図15に示す結果から、例えば、CRLの基準が500bp以下であれば（解析したいDNA塩基配列の長さが500bp以下であれば）、分離媒体の充填頻度を5以上に増やしても十分な仕様を満たすことができると推察された。

[0089] また、図16は、実施例4の試料注入回数（InjectionID）が1～12、すなわち、ランの回数が1～12回目までのフラグメント解析における一塩基分離が可能な範囲の最大塩基長を示すEQの推移を連続的に示したグラフである。図中、右側の1、2、3は、キャピラリーの番号を示している。すなわち、図16は3つのキャピラリーの1～12回目までのランのEQの推移を折れ線グラフで示している。また、図中の「▲」は、液体ポリマを充填または再充填（交換）した後、1回目のランの結果を示している。図中の「□」は、1回目のランで用いた液体ポリマを用い、2回目、3回

目および4回目のランを行った結果を示している。

[0090] 図16に示すように、1～3のキャピラリーの個体差により分析の調子が良かったものとそうでなかったものがあり、1回の液体ポリマ充填後のランの回数が増えると、EQがやや低下するものがあった。しかし、DNA塩基配列は問題なく解析することができた。このことから、EQの基準を400bpとした場合（解析したいDNA塩基配列の長さが400bpの場合）は、分離媒体の充填頻度を4とすれば十分な仕様を満たすことが確認された。なお、図16に示す結果から、例えば、EQの基準が200bp以下であれば（解析したいDNA塩基配列の長さが200bp以下であれば）、分離媒体の充填頻度を5以上に増やしても十分な仕様を満たすことができると推察された。

[0091] 図17は、ラン毎にプレランを行う実施例1、3と、液体ポリマ充填後、1回目のランを行うときのみプレランを行い、2回目以降のランではプレランを行わない実施例2、4とにおける、2回目のランの解析時間の差を対比して説明する説明図である。なお、ラン毎にプレランを行うという点については、実施例1、3と従来法とは同様であるといえる。

[0092] 図17に示すように、実施例1、3は（従来法も）ラン毎にプレランを行うので、2回目のランにおいて、図17の上の説明図中、左側の二点破線で示されている解析開始初期のB部で示されるプレランのための電圧印加を行っている。

これに対し、実施例2、4は、液体ポリマ充填後の2回目以降のランではプレランを行わないので、2回目のランにおいて、図17の下の説明図に示すように、図17の上の説明図のB部で示されるプレランのための電圧印加が不要となる。従って、実施例2、4は、液体ポリマ充填後の2回目以降のランについては解析時間を短縮できることが確認された。具体的には、図17の上の説明図および下の説明図における横軸は解析時間の指標を示している。図17の上の説明図に示される実施例1、3では、解析開始から終了までの指標は約300となっているのに対し、図17の下の説明図に示される

実施例 2、4 では、解析開始から終了までの指標は約 265 となっている。これらのことから、実施例 2、4 は、実施例 1、3（および従来法）に対して、約 10% 解析時間を短縮できることが確認された。

[0093] 図 18 は、実施例 4 における 4 つのキャピラリー (Cap 1~4) の 1~10 回目のランのランタイムなどを示す表である。図 18 に示す表は、これらのランタイム [min] と、平均ランタイム (Average runtime) [min] と、平均ランタイムの仕様 (Average runtime spec) [min] と、平均ランタイムの仕様に対する判定 (Average runtime spec judge) と、泳動時間 (Migration Time) の均一性 (MT Uniformity) と、泳動時間の均一性の仕様 (Spec) と、泳動時間の均一性の仕様に対する判定 (MT Uniformity judge) とを示している。

[0094] 図 18 の表に示すように、2 回目のランは Cap 1~4 のいずれもランタイムが長くなったため、平均ランタイムも長くなった。そのため、2 回目のランは平均ランタイムの仕様 30 min 以下を満たすことができず、平均ランタイムの仕様に対する判定が不合格 (Fail) となった。その他の 1、3~10 回目のランは合格 (Pass) となった。また、図 18 の表に示すように、トータルでみるとランタイムは 25 分~30 分であり、若干ばらつきが生じていた。

一方、泳動時間の均一性はいずれも泳動時間の均一性の仕様 5.0% 以下を満たしており、1~10 ラン目の全てが合格であった。

[0095] 以上、本発明に係る分離媒体の連続使用方法について実施形態および実施例により詳細に説明したが、本発明は前記した実施形態に限定されるものではなく、様々な変形例が含まれる。例えば、前記した実施形態は本発明を分かり易く説明するために詳細に説明したものであり、必ずしも説明した全ての構成を備えるものに限定されるものではない。また、ある実施形態の構成の一部を他の実施形態の構成に置き換えることが可能であり、また、ある実

施形態の構成に他の実施形態の構成を加えることも可能である。また、それぞれの実施形態の構成の一部について、他の構成の追加・削除・置換をすることが可能である。

符号の説明

[0096]	1	電気泳動装置（本装置）
	10	キャピラリーアレイ
	20	分離媒体容器
	30	陽極側緩衝液容器
	31	陽極側洗浄槽
	32	陽極側電気泳動用緩衝液槽
	33	試料導入用緩衝液槽
	40	陰極側緩衝液容器
	41	廃液槽
	42	陰極側洗浄槽
	43	陰極側電気泳動用緩衝液槽
	50	試料容器
	60	送液機構
	61	プランジャ
	80	サンプラーベース
	85	Y軸駆動体
	90	Z軸駆動体
	95	X軸駆動体
	100	試料トレイ
	101	ガイド
	110	恒温槽ユニット
	115	電極
	120	恒温槽ドア
	121	第一電流計

- 1 2 2 高圧電源
- 1 2 3 第二電流計
- 1 2 4 中空電極
- 1 2 5 キャピラリー
- 1 2 5 a 先端
- 1 2 6 ロードヘッダ
- 1 2 7 キャピラリーヘッド
- 1 2 8 検出部
- 1 2 9 a、1 2 9 b GND
- 1 3 0 照射検出ユニット
- 1 4 1 マイコン
- 1 4 2 コントローラ
- 1 5 0 オートサンプラーユニット
- 1 6 0 照射検出／恒温槽ユニット
- S 1 分離媒体充填工程
- S 2 第1 プレラン工程
- S 3 第1 試料注入工程
- S 4 第1 電気泳動工程
- S 5 第2 プレラン工程
- S 6 第2 試料注入工程
- S 7 第2 電気泳動工程

請求の範囲

[請求項1]

キャピラリーに分離媒体を充填する分離媒体充填工程と、
前記分離媒体を充填したキャピラリーに電圧を印加してプレランを行う第1プレラン工程と、
前記プレランを行ったキャピラリーに1回目の試料を注入する第1試料注入工程と、
前記1回目の試料を注入したキャピラリーに電圧を印加して1回目の電気泳動を行う第1電気泳動工程と、
前記第1電気泳動工程後のキャピラリーに電圧を印加してプレランを行う第2プレラン工程と、
前記第2プレラン工程を行ったキャピラリーに次回分の試料を注入する第2試料注入工程と、
前記次回分の試料を注入したキャピラリーに電圧を印加して次回分の電気泳動を行う第2電気泳動工程と、
を有し、
前記第2プレラン工程、前記第2試料注入工程および前記第2電気泳動工程を予め設定された設定回数繰り返して行う、分離媒体の連続使用方法。

[請求項2]

キャピラリーに分離媒体を充填する分離媒体充填工程と、
前記分離媒体を充填したキャピラリーに電圧を印加してプレランを行う第1プレラン工程と、
前記プレランを行ったキャピラリーに1回目の試料を注入する第1試料注入工程と、
前記1回目の試料を注入したキャピラリーに電圧を印加して1回目の電気泳動を行う第1電気泳動工程と、
前記第1電気泳動工程後のキャピラリーに次回分の試料を注入する第2試料注入工程と、
前記次回分の試料を注入したキャピラリーに電圧を印加して次回分

の電気泳動を行う第2電気泳動工程と、

を有し、

前記第2試料注入工程および前記第2電気泳動工程を予め設定された設定回数繰り返して行う、分離媒体の連続使用方法。

[請求項3]

請求項1または請求項2において、

前記分離媒体が、液体ポリマである、分離媒体の連続使用方法。

[請求項4]

請求項1または請求項2において、

前記分離媒体充填工程による前記分離媒体の充填頻度が、グラフィカルユーザーインターフェースにより設定される、分離媒体の連続使用方法。