

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-517054

(P2023-517054A)

(43)公表日 令和5年4月21日(2023.4.21)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6813(2018.01)	C 1 2 Q 1/6813	Z Z N A 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全209頁)

(21)出願番号 特願2022-553645(P2022-553645) (86)(22)出願日 令和3年3月4日(2021.3.4) (85)翻訳文提出日 令和4年11月7日(2022.11.7) (86)国際出願番号 PCT/US2021/020919 (87)国際公開番号 WO2021/221789 (87)国際公開日 令和3年11月4日(2021.11.4) (31)優先権主張番号 62/986,436 (32)優先日 令和2年3月6日(2020.3.6) (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US) (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く	(71)出願人 508032284 カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 1 2 5, バサデナ, イースト・カリフォルニア・プールヴァード 1 2 0 0, エムシー 6-3 2 (71)出願人 522353059 モレキュラー インストゥルメンツ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 4 1 ロサンゼルス イーグル ロック プールバード 5 0 1 5 スイート 3 0 1 (74)代理人 110002860 弁理士法人秀和特許事務所 最終頁に続く
--	---

(54)【発明の名称】 ハイブリダイゼーション連鎖反応を介した試料内の標的分子の分析

(57)【要約】

ハイブリダイゼーション連鎖反応(HCR)を用いた試料の分析法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態は、以下の態様のうちの1つ、2つ、または3つ全てを含む：1) 反復シグナル検出、2) オーバーラップ結合部位、および3) 触媒レポーター沈着(CARD)。これらに関する組成物およびキットも提供される。いくつかの実施形態として、レポーター標識HCRヘアピンによる反復シグナル検出法であって、1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、またはb) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む、1または複数のプローブセットを準備すること、1または複数のHCRアンプリファイア(各々は1または複数のレポーターで標識されている)を準備すること、1または複数のレポーターからの1または複数のシグナルを検出すること、を含む、方法が包含される。いくつかの実施形態では、プローブユニットは2個以上のHCR分割イニシエーター

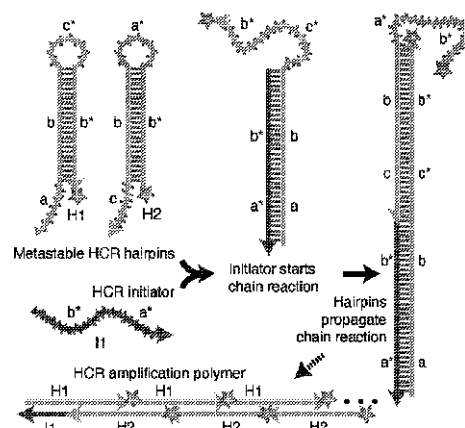


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レポーター標識ヘアピンによる反復シグナル検出法であって、

a) 最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；

b) i) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、i i) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、N 個のプローブセット（各々が N 個の標的種のうちの 1 つを標的とする）を準備すること；

c) 所望により前記試料を洗浄すること；

d) 前記 N 個のプローブセットのうちの M 個に対応する、M 個の H C R アンプリファイアを準備すること（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターで標識されている）；

e) 所望により前記試料を洗浄すること；

f) 前記 M 個のレポーターに対応する M 個のシグナルを検出すること；

g) 前記 M 個のシグナルを前記試料から除去すること；並びに

h) 所望により、N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 b ~ g のうちの 1 または複数を反復すること；を含み、

プローブセットは以下のいずれかを含み：

a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または

b) 1 または複数のプローブユニット、

H C R イニシエーター標識プローブは以下を含み：

1 または複数の標的結合領域、および

1 または複数のイニシエーター、

プローブユニットは 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含み、

H C R 分割イニシエータープローブは以下を含み：

標的結合領域、および

分割イニシエーター、

H C R アンプリファイアは 2 個以上の H C R ヘアピンを含み、

H C R ヘアピンは以下を含むインプットドメインを含み：

一本鎖トーホールド；および

ステム部、

H C R ヘアピンは以下を含むアウトプットドメインをさらに含み：

一本鎖ループ；および

前記ステム部に対する相補鎖、

H C R ヘアピンはレポーターをさらに含む、

反復シグナル検出法。

【請求項 2】

レポーター標識ヘアピンによる反復シグナル検出法であって、

a) 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；

b) i) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、i i) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1 または複数のプローブセットを準備すること；

c) 所望により前記試料を洗浄すること；

d) 1 または複数の H C R アンプリファイア（各々が 1 または複数のレポーターで標識されている）を準備すること；

e) 所望により前記試料を洗浄すること；

f) 1 または複数のレポーターから 1 または複数のシグナルを検出すること；

g) 所望により、1 または複数のプローブセットを前記試料から除去すること；

h) 所望により、1 または複数の H C R アンプリファイアを前記試料から除去すること

10

20

30

40

50

;

i) 所望により、1または複数のレポーターを前記試料から除去すること；並びに

j) 所望により、1または複数のシグナルを前記試料から除去すること；を含み、

プローブセットは以下のいずれかを含み：

a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または

b) 1または複数のプローブユニット、

HCRイニシエーター標識プローブは以下を含み：

1または複数の標的結合領域、および

1または複数のイニシエーター、

プローブユニットは2個以上のHCR分割イニシエータープローブを含み、

HCR分割イニシエータープローブは以下を含み：

標的結合領域、および

分割イニシエーター；

HCRアンプリファイアは2個以上のHCRヘアピンを含み；

HCRヘアピンは以下を含むインプットドメインを含み：

一本鎖トーホールド、および

ステム部、

HCRヘアピンは以下を含むアウトプットドメインをさらに含み：

一本鎖ループ、および

前記ステム部に対する相補鎖、

HCRヘアピンは1または複数のレポーターをさらに含む、

反復シグナル検出法。

10

20

【請求項3】

基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法であって、

a) 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；

b) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、N個のプローブセットを準備すること；

c) 所望により前記試料を洗浄すること；

d) 前記N個のプローブセットに対応する、N個のHCRアンプリファイアを準備すること（各々は別々の基質で標識されている）；

e) 所望により前記試料を洗浄すること；

f) 前記N個の基質のうちのM個に対応する、M個の標識プローブを準備すること（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターと結合している）；

g) 所望により前記試料を洗浄すること；

h) 前記M個の別々のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること；

i) 前記M個のシグナルを前記試料から除去すること；並びに

j) 所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程f～iのうちの1または複数の反復すること；を含み、

プローブセットは以下のいずれかを含み：

a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または

b) 1または複数のプローブユニット；

HCRイニシエーター標識プローブは以下を含み：

1または複数の標的結合領域、および

1または複数のイニシエーター、

プローブユニットは2個以上のHCR分割イニシエータープローブを含み；

HCR分割イニシエータープローブは以下を含み：

標的結合領域、および

分割イニシエーター；

30

40

50

H C R アンプリファイアは 2 個以上の H C R ヘアピンを含み；

H C R ヘアピンは以下を含むインプットドメインを含み：

一本鎖トーホールド、および
ステム部；

H C R ヘアピンは以下を含むアウトプットドメインをさらに含み：

一本鎖ループ、および

前記ステム部に対する相補鎖；

H C R ヘアピンは基質をさらに含み、

標識プローブは以下：

基質結合領域、および

レポーター、を含む、

反復シグナル検出法。

10

【請求項 4】

基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法であって、

a) 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；

b) i) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、i i) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1 または複数のプローブセットを準備すること；

c) 所望により前記試料を洗浄すること；

20

d) 1 または複数のプローブセットに対応する 1 または複数の H C R アンプリファイア（各々は基質で標識されている）を準備すること；

e) 所望により前記試料を洗浄すること；

f) 1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ（各々はレポーターに結合している）を準備すること；

g) 所望により前記試料を洗浄すること；

h) 1 または複数のレポーターに対応する 1 または複数のシグナルを検出すること；

i) 1 または複数のシグナルを前記試料から除去すること；並びに

j) 所望により、工程 b ~ i のいずれかを任意の順序で 1 回または複数回反復すること；を含む、

30

プローブセットは以下のいずれかを含み：

a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または

b) 1 または複数のプローブユニット、

H C R イニシエーター標識プローブは以下を含み：

1 または複数の標的結合領域、および

1 または複数のイニシエーター、

プローブユニットは 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含み、

H C R 分割イニシエータープローブは以下を含み：

標的結合領域、および

分割イニシエーター、

40

H C R アンプリファイアは 2 個以上の H C R ヘアピンを含み、

H C R ヘアピンは以下を含むインプットドメインを含み：

一本鎖トーホールド、および

ステム部、

H C R ヘアピンは以下を含むアウトプットドメインをさらに含み：

一本鎖ループ、および

前記ステム部に対する相補鎖、

H C R ヘアピンは基質をさらに含み、

標識プローブは以下：

基質結合領域、および

50

レポーター、を含む、
反復シグナル検出法。

【請求項 5】

レポーターおよび／または基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法であって、

a) 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；

b) i) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、i i) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1 または複数の H C R プローブセットを準備すること；

c) 1 または複数のプローブセットに対応する 1 または複数の H C R アンプリファイア (各々は 1 または複数のレポーターおよび／または 1 または複数の基質で標識されている) を準備すること；

d) 所望により、1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ (各々は 1 または複数のレポーターに結合している) を準備すること；

e) 1 または複数のシグナルを検出すること；

f) 所望により前記試料を洗浄すること；

g) 所望により、1 または複数のシグナルを前記試料から除去すること；

h) 所望により、1 または複数のレポーターを前記試料から除去すること；

i) 所望により、1 または複数の標識プローブを前記試料から除去すること；

j) 所望により、1 または複数の H C R アンプリファイアを前記試料から除去すること；

k) 所望により、1 または複数のプローブセットを前記試料から除去すること；並びに

l) 所望により、前記工程のいずれかを任意の順序で反復すること；を含み、

プローブセットは以下のいずれかを含み：

a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または

b) 1 または複数のプローブユニット、

H C R イニシエーター標識プローブは以下を含み：

1 または複数の標的結合領域、および

1 または複数のイニシエーター、

プローブユニットは 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含み、

H C R 分割イニシエータープローブは以下を含み：

標的結合領域、および

分割イニシエーター、

H C R アンプリファイアは 2 個以上の H C R ヘアピンを含み、

H C R ヘアピンは以下を含むインプットドメインを含み：

一本鎖トーホールド、および

ステム部、

H C R ヘアピンは以下を含むアウトプットドメインをさらに含み：

一本鎖ループ、および

前記ステム部に対する相補鎖、

H C R ヘアピンは以下をさらに含み：

1 または複数のレポーター、および／または

1 または複数の基質、

標識プローブは以下：

基質結合領域、および

1 または複数のレポーター、を含む、

反復シグナル検出法。

【請求項 6】

レポーターおよび／または基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法であって、

a) 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備す

ること；

b) 工程 c ~ g のいずれかを任意の順序で 1 回または複数回実行すること；

c) i) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、i i) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1 または複数の H C R プローブセットを準備すること；

d) 1 または複数のシグナルを直接的または間接的に生成する 1 または複数の H C R アンプリファイアを準備すること；

e) 所望により前記試料を洗浄すること；

f) 1 または複数のシグナルを検出すること；並びに

g) 所望により、1 または複数のシグナルを除去すること；を含み、
プローブセットは以下のいずれかを含み：

a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または

b) 1 または複数のプローブユニット；

H C R イニシエーター標識プローブは以下を含み：

1 または複数の標的結合領域、および

1 または複数のイニシエーター、

プローブユニットは 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含み、

H C R 分割イニシエータープローブは以下を含み：

標的結合領域、および

分割イニシエーター、

H C R アンプリファイアは 2 個以上の H C R ヘアピンを含み、

H C R ヘアピンは以下を含むインプットドメインを含み：

一本鎖トーホールド、および

ステム部、

H C R ヘアピンは以下を含むアウトプットドメインをさらに含み：

一本鎖ループ、および

前記ステム部に対する相補鎖、

H C R ヘアピンは以下：

1 または複数のレポーター、および／または

1 または複数の基質、をさらに含む、

反復シグナル検出法。

【請求項 7】

オーバーラップ結合部位を含む H C R 法であって、

a) 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；

b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットを含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が前記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、プローブセットを準備すること；

c) 所望により前記試料を洗浄すること；

d) レポーターおよび／または基質で標識された H C R アンプリファイアを準備すること；

e) 所望により前記試料を洗浄すること；

f) 所望により、前記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること；

g) 所望により前記試料を洗浄すること；並びに

h) 前記レポーターからのシグナルを検出すること、を含み、

プローブセットは 1 または複数のプローブユニットを含み、

プローブユニットは 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含み、

H C R 分割イニシエータープローブは以下を含み：

標的結合領域、および

分割イニシエーター、

10

20

30

40

50

各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は、前記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、

H C R アンプリファイアは 2 個以上の H C R ヘアピンを含み、

H C R ヘアピンは以下を含むインプットドメインを含み：

一本鎖トーホールド、および
ステム部、

H C R ヘアピンは以下を含むアウトプットドメインをさらに含み：

一本鎖ループ、および
前記ステム部に対する相補鎖、

H C R ヘアピンは以下をさらに含み：

レポーター、および／または
基質；

標識プローブは以下：

基質結合領域、および
レポーター、を含む、

H C R 法。

【請求項 8】

オーバーラップ結合部位を含む H C R 法であって、

a) 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること

b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットを含み、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、プローブセットを準備すること；

c) 所望により前記試料を洗浄すること；

d) レポーターおよび／または基質で標識された H C R アンプリファイアを準備すること；

e) 所望により前記試料を洗浄すること；

f) 所望により、前記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること；

g) 所望により前記試料を洗浄すること；並びに

h) 前記レポーターからのシグナルを検出すること、を含み、

プローブセットは 1 または複数のプローブユニットを含み；

プローブユニットは 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含み、

H C R 分割イニシエータープローブは以下を含み：

標的結合領域、および
分割イニシエーター、

各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは、H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、

H C R アンプリファイアは 2 個以上の H C R ヘアピンを含み、

H C R ヘアピンは以下を含むインプットドメインを含み：

一本鎖トーホールド、および
ステム部、

H C R ヘアピンは以下を含むアウトプットドメインをさらに含み：

一本鎖ループ、および
前記ステム部に対する相補鎖、

H C R ヘアピンは以下をさらに含み：

レポーター、および／または
基質、

標識プローブは以下：

基質結合領域、および

10

20

30

40

50

レポーター、を含む、
H C R 法。

【請求項 9】

反復シグナル検出によるオーバーラップ結合部位を含む H C R 法であって、

a) 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること

b) i) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、i i) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1 または複数のプローブセットを準備すること；

c) 所望により前記試料を洗浄すること；

d) 1 または複数のレポーターおよび／または基質でそれぞれ標識された 1 または複数の H C R アンプリファイアを準備すること；

e) 所望により前記試料を洗浄すること；

f) 所望により、1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ（各々は 1 または複数のレポーターに結合している）を準備すること；

g) 所望により前記試料を洗浄すること；

h) 1 または複数のレポーターからのシグナルを検出すること；

i) 所望により、1 または複数のシグナルを前記試料から除去すること；

j) 所望により、1 または複数のレポーターを前記試料から除去すること；

k) 所望により、1 または複数の標識プローブを前記試料から除去すること；

l) 所望により、1 または複数のアンプリファイアを前記試料から除去すること；

m) 所望により、1 または複数のプローブセットを前記試料から除去すること；並びに

n) 所望により、前記工程のいずれかを任意の順序で反復すること；を含み、

プローブセットは以下のいずれかを含み：

a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または

b) 1 または複数のプローブユニット、

H C R イニシエーター標識プローブは以下を含み：

1 または複数の標的結合領域、および

1 または複数のイニシエーター、

プローブユニットは 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含み、

H C R 分割イニシエータープローブは以下を含み：

標的結合領域、および

分割イニシエーター、

プローブユニット内の標的結合領域は前記標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、

各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは、H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、

H C R アンプリファイアは 2 個以上の H C R ヘアピンを含み、

H C R ヘアピンは以下を含むインプットドメインを含み：

一本鎖トーホールド、および

ステム部、

H C R ヘアピンは以下を含むアウトプットドメインをさらに含み：

一本鎖ループ、および

前記ステム部に対する相補鎖、

H C R ヘアピンは以下をさらに含み：

1 または複数のレポーター、および／または

10

20

30

40

50

1 または複数の基質、
標識プローブは以下：

基質結合領域、および

1 または複数のレポーター、を含む、
H C R 法。

【請求項 1 0】

前記標的が核酸配列である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1】

N が 1 ～ 1 0 0 0 である、請求項 1 または 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

M が 2 ～ 1 0 , 0 0 0 である、請求項 1 または 3 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記基質が、ハブテン、ジゴキシゲニン (D I G)、ジニトロフェニル (D N P)、ピ
オチン、フルオロフォア、4 ～ 5 0 個のヌクレオチドを含む核酸ドメイン、レポーター分
子の沈着を触媒する酵素をリクルートする基質、分割基質、レポーターの局在化を直接的
または間接的に媒介する核酸ドメインからなる群から選択される、請求項 1 ～ 1 2 のい
ずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記レポーターが、フルオロフォア、発色団、発光団、蛍光体、F R E T 対、いくつか
の F R E T 対、クエンチャー、フルオロフォア／クエンチャー対、希土類元素または化合
物、放射性分子、磁性分子である、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記試料を固定することをさらに含む、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記試料を透過処理することをさらに含む、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の方
法。

【請求項 1 7】

1 または複数のシグナルを前記試料から除去することをさらに含む、請求項 1 ～ 1 6 の
いずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

1 または複数のレポーターを前記試料から除去することをさらに含む、請求項 1 ～ 1 7
のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

1 または複数の標識プローブを前記試料から除去することをさらに含む、請求項 1 ～ 1
8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

1 または複数のアンプリファイアを前記試料から除去することをさらに含む、請求項 1
～ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

1 または複数のプローブセットを前記試料から除去することをさらに含む、請求項 1 ～
2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記工程のいずれかを任意の順序で反復することをさらに含む、請求項 1 ～ 2 1 のい
ずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

特許請求の範囲に記載されているようなアルファベット順に実行される、請求項 1 ～ 2
1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記プローブユニットのそれぞれが 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含
み、

10

20

30

40

50

H C R 分割イニシエータープロープが標的結合領域、および分割イニシエーターを含む、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

オーバーラッピング結合が含まれ、オーバーラップが少なくとも 1 個、少なくとも 2 個、または少なくとも 3 個のヌクレオチドである、請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

以下を含む、方法であって：

以下を準備すること：

第 1 分割イニシエーターを含む第 1 分割イニシエータープロープ；

第 2 分割イニシエーターを含む第 2 分割イニシエータープロープ；

以下を含む第 1 ヘアピン単量体：

第 1 トーホールドおよび第 1 ステム部を含む第 1 インプットドメイン、

第 1 ヘアピンループおよび前記第 1 ステム部に対する相補鎖を含む第 1 アウトプットドメイン、並びに

第 1 ハプテン分子；

以下を含む第 2 ヘアピン単量体：

第 2 トーホールドおよび第 2 ステム部を含む第 2 インプットドメイン、

第 2 ヘアピンループおよび前記第 2 ステム部に対する相補鎖を含む第 2 アウトプットドメイン、並びに

第 2 ハプテン分子；

標的分子；並びに

前記第 1 分割イニシエータープロープおよび前記第 2 分割イニシエータープロープを、前記標的と一緒にインキュベーションすること、を含む、方法。

【請求項 2 7】

前記インキュベーションが、前記第 1 分割イニシエータープロープを前記標的分子に結合させ、前記第 2 分割イニシエータープロープを前記標的分子に結合させるものである、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記第 1 ヘアピン単量体を前記第 1 分割イニシエーターおよび前記第 2 分割イニシエーターの両方に結合させること；

前記第 2 ヘアピン単量体を前記第 1 ヘアピン単量体に結合させること；

C A R D を媒介する酵素である、1 または複数のレポーター体で標識された抗ハプテン分子を準備すること；

1 または複数の C A R D 基質を準備すること；

前記 C A R D を媒介する酵素によって前記 C A R D 基質から生成される、1 または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定すること、をさらに含む、請求項 2 6 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記抗ハプテン分子が抗ハプテン抗体または抗ハプテンナノボディである、請求項 2 6 ～ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記少なくとも 1 つの標的が核酸である、請求項 2 6 ～ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記少なくとも 1 つの標的分子が R N A である、請求項 2 6 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

以下を含む、方法であって：

以下を準備すること：

少なくとも1つのイニシエーターを含む少なくとも1つのイニシエーター標識プローブ；

以下を含む第1ヘアピン単量体：

第1トーホールドおよび第1ステム部を含む第1インプットドメイン、

第1ヘアピンループおよび前記第1ステム部に対する相補鎖を含む第1アウトプットドメイン、並びに

第1ハプテン分子；

以下を含む第2ヘアピン単量体：

第2トーホールドおよび第2ステム部を含む第2インプットドメイン、

第2ヘアピンループおよび前記第2ステム部に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン、並びに

第2ハプテン分子、

標的分子；並びに

前記少なくとも1つのイニシエーターを含む少なくとも1つのイニシエーター標識プローブを前記標的と一緒にインキュベーションすること、を含む、

方法。

【請求項33】

前記インキュベーションが、前記少なくとも1つのイニシエーターを含む少なくとも1つのイニシエーター標識プローブを前記標的分子に結合させる、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記第1ヘアピン単量体を前記少なくとも1つのイニシエーターに結合させること；

前記第2ヘアピン単量体を前記第1ヘアピン単量体に結合させること；

CARDを媒介する酵素である、1または複数のレポーター体で標識された抗ハプテン分子を準備すること；

1または複数のCARD基質を準備すること；

前記CARDを媒介する酵素によって前記CARD基質から生成される、1または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定すること、をさらに含む、請求項32～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

前記標的分子がタンパク質である、請求項32～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】

前記抗ハプテン分子が抗ハプテン抗体または抗ハプテナノボディである、請求項32～35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】

前記抗ハプテン抗体が一次抗体である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記抗ハプテン抗体が前記ハプテンと結合する一次抗体を含み、

前記方法が前記一次抗体と結合する二次抗体（1または複数のレポーター体で標識されている）をさらに含む、請求項36に記載の方法。

【請求項39】

以下を含む、方法であって：

以下を準備すること：

第1分割イニシエーターを含む第1分割イニシエータープローブ；

第2分割イニシエーターを含む第2分割イニシエータープローブ；

以下を含む第1ヘアピン単量体：

第1トーホールドおよび第1ステム部を含む第1インプットドメイン、

第1ヘアピンループおよび前記第1ステム部に対する相補鎖を含む第1アウトプットドメイン、並びに

10

20

30

40

50

基質；

以下を含む第 2 ヘアピン単量体：

第 2 トーホールドおよび第 2 ステム部を含む第 2 インプットドメイン、

第 2 ヘアピングループおよび前記第 2 ステム部に対する相補鎖を含む第 2 アウトプットドメイン、並びに

基質、

標的分子；並びに

前記第 1 分割イニシエータープローブおよび前記第 2 分割イニシエータープローブを、前記標的と一緒にインキュベーションすること、を含む、

方法。

10

【請求項 40】

前記インキュベーションが、前記第 1 分割イニシエータープローブを前記標的分子に結合させ、前記第 2 分割イニシエータープローブを前記標的分子に結合させるものである、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記第 1 ヘアピン単量体を前記第 1 分割イニシエーターおよび前記第 2 分割イニシエーターの両方に結合させること；

前記第 2 ヘアピン単量体を前記第 1 ヘアピン単量体に結合させること；

1 または複数のレポーター体で標識された基質結合領域であって、前記基質結合領域は前記基質に結合し、前記レポーター体は C A R D を媒介する酵素である、基質結合領域を準備すること；

20

1 または複数の C A R D 基質を準備すること；

前記 C A R D を媒介する酵素によって前記 C A R D 基質から生成される、1 または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定すること、をさらに含む、請求項 39 ～ 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記少なくとも 1 つの標的が核酸である、請求項 39 ～ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

前記少なくとも 1 つの標的分子が R N A である、請求項 39 ～ 42 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 44】

以下を含む、方法であって：

以下を準備すること：

第 1 分割イニシエーターを含む第 1 分割イニシエータープローブ；

第 2 分割イニシエーターを含む第 2 分割イニシエータープローブ；

以下を含む第 1 ヘアピン単量体：

第 1 トーホールドおよび第 1 ステム部を含む第 1 インプットドメイン、

第 1 ヘアピングループおよび前記第 1 ステム部に対する相補鎖を含む第 1 アウトプットドメイン、並びに

40

第 1 分割基質；

以下を含む第 2 ヘアピン単量体：

第 2 トーホールドおよび第 2 ステム部を含む第 2 インプットドメイン、

第 2 ヘアピングループおよび前記第 2 ステム部に対する相補鎖を含む第 2 アウトプットドメイン、並びに

第 2 分割基質、

標的分子；並びに

前記第 1 分割イニシエータープローブおよび前記第 2 分割イニシエータープローブを、前記標的分子と一緒にインキュベーションすること、を含む、

方法。

50

【請求項 4 5】

前記インキュベーションが、前記第 1 分割イニシエータープローブを前記標的分子に結合させ、前記第 2 分割イニシエータープローブを前記標的分子に結合させるものである、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記第 1 ヘアピン単量体を前記第 1 分割イニシエーターおよび前記第 2 分割イニシエーターの両方に結合させること；

前記第 2 ヘアピン単量体を前記第 1 ヘアピン単量体に結合させること；

前記第 1 および第 2 分割基質を含む完全基質を得ること；

1 または複数のレポーター体で標識された基質結合領域であって、前記基質結合領域は前記完全基質に結合し、前記レポーター体は C A R D を媒介する酵素である、基質結合領域を準備すること；

1 または複数の C A R D 基質を準備すること；

前記 C A R D を媒介する酵素によって前記 C A R D 基質から生成される、1 または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定すること、をさらに含む、請求項 4 4 ～ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記少なくとも 1 つの標的が核酸である、請求項 4 4 ～ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記少なくとも 1 つの標的分子が R N A である、請求項 4 4 ～ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、アメリカ国立衛生研究所によって授与された助成金番号 R 0 1 E B 0 0 6 1 9 2、および D A R P A からの助成金番号 H R 0 0 1 1 - 1 7 - 2 - 0 0 0 8 を基に、政府援助を得てなされたものである。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0 0 0 2】

優先権および関連出願の相互参照

本願は、2020 年 3 月 6 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 9 8 6 4 3 6 号の利益を主張するものであり、当該米国仮特許出願はその全体が参照によって本明細書に援用されるものとする。

【0 0 0 3】

電子配列表の参照

本願は電子配列表と共に提出されている。電子配列表は、2021 年 3 月 4 日に作成された、サイズが 1, 3 4 1 バイトの、M O I N S 0 0 7 W O S E Q L I S T . t x t という名称のファイルとして提供されている。電子配列表中の情報は、その全体が参照によって本明細書に援用される。

【背景技術】

【0 0 0 4】

分野

本発明は全体として、ハイブリダイゼーション連鎖反応に関する組成物および方法に関する。

【0 0 0 5】

関連技術の記述

ハイブリダイゼーション連鎖反応（H C R）は、準安定ヘアピン単量体または他の準安定核酸構造から開始される、核酸分子の惹起型ハイブリダイゼーション法である。H C R は酵素を必要とせず、等温操作が可能である。

【0006】

HCRは、2個以上の準安定ヘアピン単量体を含むことができる。ヘアピン単量体はそれぞれ、少なくとも1個の一本鎖トーホールド、一本鎖ループ、および二本鎖ステムを有する。自己集合カスケードを駆動するエネルギーは、ヘアピンの一本鎖ループセグメントおよびトーホールドセグメント内に貯蔵されている。

【0007】

各単量体は速度論的トラップに捕捉され、系が迅速に平衡化することを妨げる。すなわち、単量体対は、イニシエーターの非存在下では互いにハイブリダイズすることができない。イニシエーター鎖の導入により、単量体がハイブリダイゼーションイベントの連鎖反応を起こして、ニックの入った二本鎖重合体を形成する。HCRを利用することで、例えば、HCRイニシエーターを有するイニシエーター標識プローブで分析物を検出することによって試料中の目的の分析物の存在を検出することができ、HCRイニシエーターはHCRシグナル増幅を惹起する。HCRシグナル増幅は、試料から生じるバックグラウンドよりもシグナルを高めることで、分子検出およびイメージング応用のためにSB比を増加することが可能である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許出願公開第11/087,937号明細書

【特許文献2】米国特許第8,105,778号明細書

【特許文献3】米国特許第8,507,204号明細書

【特許文献4】米国特許出願公開第2018/0010166号明細書

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Dirks, R. およびPierce, N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101巻(43号): pp15275~15278 (2004年)

【非特許文献2】Singletonら、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology、第2版、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社(ニューヨーク、ニューヨーク州、1994年)

【非特許文献3】Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版局(コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年)

【非特許文献4】Smith JJ, Gunasekera TS, Barardi CR, Veal D, Vesey G (2004年)、J Appl Microbiol、96巻(2号): pp409~417

【非特許文献5】Lan HY, Mu W, NG YY, Nikolic-Paterson DH, およびAtkins RC (1996年)、J Histochem Cytochem、44巻(3号): pp281~287

【非特許文献6】The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies 第10版

【非特許文献7】Tyagiら、Nature Biotechnology、14巻: pp303~308、1996年

【非特許文献8】Ellingtonら、Nature、346巻: pp818~822、1990年

【非特許文献9】Tuerkら、Science、249巻: pp505~510、1990年

【非特許文献10】Levskyら、Science、297巻: pp836~840、2002年

【非特許文献11】Darnell, D. K., Kaur, S., Stanislaw,

10

20

30

40

50

S.、Davey, S.、Konieczka, J. H.、Yatskievych, T. A.、およびAntin, P. B. (2007).、GEISHA: An In situ hybridization gene expression resource for the chicken embryo.、Cytogenet. Genome Res.、117巻: pp30~35

【非特許文献12】Gall JGおよびPardue ML (1969年)、Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations.、Proc Natl Acad Sci USA、63巻: pp378~383。

【非特許文献13】Cox KH、Deleon DV、Angerer LM、およびAngerer RC (1984年)、Detection of mRNAs in Sea Urchin Embryos by Insitu Hybridization Using Asymmetric RNA Probes.、Dev Biol 101巻 (2号): pp485~502。

10

【非特許文献14】Tautz DおよびPfeifle C (1989年)、A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in Drosophila embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback.、Chromosoma、98巻: pp81~85。

20

【非特許文献15】Rosen BおよびBeddington RSP (1993年)、Whole-Mount Insitu Hybridization in the Mouse Embryo: Gene-Expression in three Dimensions.、Trends Genet.、9巻 (5号): pp162~166。

【非特許文献16】Wallner G、Amann R、およびBeisker W (1993年)、Optimizing Fluorescent In situ Hybridization with rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms.、Cytometry、14巻 (2号): pp136~143。

30

【非特許文献17】Nieto MA、Patel K、およびWilkinson DG (1996年)、In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections.、Methods Cell Biol (アカデミック・プレス社)、51巻、pp219~235。

【非特許文献18】Thisse CおよびThisse B (2008年)、High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos.、Nat Protoc、3巻 (1号): pp59~69。

【非特許文献19】Kislauskis EH、Li Z、Singer RH、およびTaneja KL (1993年)、Isoform-Specific 3'-Untranslated Sequences Sort α -Cardiac and β -Cytoplasmic Actin Messenger RNAs to Different Cytoplasmic Compartments.、J Cell Biol、123巻 (1号): pp165-172。

40

【非特許文献20】Femino A、Fay FS、Fogarty K、およびSinger RH (1998年)、Visualization of Single RNA Transcripts In Situ.、Science、280巻 (5363号): pp585~590。

【非特許文献21】Levsky JM、Shenoy SM、Pezzo RC、および

50

Singer RH (2002年)、Single-Cell Gene Expression Profiling.、Science、297巻：pp836～840。

【非特許文献22】Kosman Dら (2004年)、Multiplex Detection of RNA Expression in Drosophila Embryos.、Science、305巻：p846。

【非特許文献23】Capodiceci Pら (2005年)、Gene Expression Profiling in Single Cells within Tissue.、Nat Methods、2巻 (9号)：pp663～665。

【非特許文献24】Chan PM、Yuen T、Ruf F、Gonzalez-Maeso J、およびSealfon SC (2005年)、Method for Multiplex Cellular Detection of mRNAs Using Quantum Dot Fluorescent In Situ Hybridization.、Nucleic Acids Res、33巻 (18号)：e161。

【非特許文献25】Raj A、van den Bogaard P、Rifkin SA、van Oudenaarden A、およびTyagi S (2008年)、Imaging Individual mRNA Molecules Using Multiple Singly Labeled Probes.、Nat Methods、5巻 (10号)：pp877～879。

【非特許文献26】Harland RM (1991年)、In Situ Hybridization: An Improved Whole-Mount Method for Xenopus Embryos.、Methods Cell Biol、36巻：pp685～695。

【非特許文献27】Lehmann RおよびTautz D (1994年)、In Situ Hybridization to RNA. Methods Cell Biol、(アカデミック・プレス社)、44巻、pp575～598。

【非特許文献28】Kerstens HMJ、Poddighe PJ、およびHanselaar AGJM (1995年)、A Novel in-Situ Hybridization Signal Amplification Method Based on the Deposition of Biotinylated Tyramine.、J Histochem Cytochem、43巻 (4号)：pp347～352。

【非特許文献29】Wiedorn KH、Kuhl H、Galle J、Caselitz J、およびVollmer E (1999年)、Comparison of In-Situ Hybridization, Direct and Indirect In-Situ PCR as well as Tyramide Signal Amplification for the Detection of HPV.、Histochem Cell Biol、111巻：pp89～95。

【非特許文献30】Player AN、Shen LP、Kenny D、Antao VP、およびKolberg JA (2001年)、Single-Copy Gene Detection Using Branched DNA (bDNA) In Situ Hybridization.、J Histochem Cytochem、49巻 (5号)：pp603～611。

【非特許文献31】Pernthaler A、Pernthaler J、およびAmann R (2002年)、Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria.、Appl Environ Microbiol、68巻 (6号)：pp3094～3101。

【非特許文献32】Thisse Bら、(2004年)、Spatial and T

10

20

30

40

50

temporal Expression of the Zebrafish Genome by Large-Scale In Situ Hybridization Screening. The Zebrafish: 2nd Edition Genetics Genomics and Informatics, Methods in Cell Biology、(編) Detrich III HWD、Zon LI、および Westerfield M (エルゼビア・アカデミック・プレス社、サンディエゴ、カリフォルニア州)、77巻、pp505~519。

【非特許文献33】Denkers N、Garcia-Villalba P、Rodesch CK、Nielson KR、および Mauch TJ (2004年)、FISHing for Chick Genes: Triple-Label Whole-Mount Fluorescence In Situ Hybridization Detects Simultaneous and Overlapping Gene Expression in Avian Embryos.、Dev Dyn、229巻(3号): pp651~657。

10

【非特許文献34】Zhou Hら、(2004年)、Two-Color, Rolling-Circle Amplification on Antibody Microarrays for Sensitive, Multiplexed Serum-Protein Measurements.、Genome Biol、5巻(4号): R28。

【非特許文献35】Larsson Cら、(2004年)、In Situ Genotyping Individual DNA Molecules by Target-Primed Rolling-Circle Amplification of Padlock Probes.、Nat Methods、1巻(3号): pp227~232。

20

【非特許文献36】Clay Hおよび Ramakrishnan L (2005年)、Multiplex Fluorescent In Situ Hybridization in Zebrafish Embryos Using Tyramide Signal Amplification.、Zebrafish 2巻(2号): pp105~111。

【非特許文献37】Barroso-Chinea Pら、(2007年)、Detection of Two Different mRNAs in a Single Section by Dual In Situ Hybridization: A Comparison Between Colorimetric and Fluorescent Detection.、J Neurosci Methods、162巻(1~2号): pp119~128。

30

【非特許文献38】Acloque H、Wilkinson DG、および Nieto MA (2008年)、In Situ Hybridization Analysis of Chick Embryos in Whole-Mount and Tissue Sections. Avian Embryology, 2nd Edition, Methods in Cell Biology、(編) Bronner-Fraser M (エルゼビア・アカデミック・プレス社、サンディエゴ、カリフォルニア州)、87巻、pp169~185。

40

【非特許文献39】Piette D、Hendrickx M、Willems E、Kemp CR、および Leyns L (2008年)、An optimized procedure for whole-mount in situ hybridization on mouse embryos and embryoid bodies.、Nat Protoc、3巻(7号): pp1194~1201。

【非特許文献40】Weiszmann R、Hammonds AS、および Celniker SE (2009年)、Determination of gene expression patterns using high-throughput R

50

NA in situ hybridization to whole-mount *Drosophila* embryos.、Nat Protoc、4巻(5号): pp 605~618。

【非特許文献41】Larsson C、Grundberg I、Soderberg O、およびNilsson M(2010年)、In Situ Detection and Genotyping of Individual mRNA Molecules.、Nat Methods、7巻(5号): pp395~397。

【非特許文献42】Wang Fら、(2012年)、RNAscope: A Novel in Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues.、J Mol Diagnostics、14巻(1号): pp22~29。 10

【非特許文献43】Choi HMTら、(2010年)、Programmable in situ amplification for multiplexed imaging of mRNA expression.、Nat Biotechnol、28巻(11合): pp1208~1212。

【非特許文献44】Choi HMT、Beck VA、およびPierce NA(2014年)、Next-generation in situ hybridization chain reaction: higher gain, lower cost, greater durability.、ACS Nano、8巻(5号): pp4284~4294。 20

【非特許文献45】Shah Sら(2016年)、Single-molecule RNA detection at depth via hybridization chain reaction and tissue hydrogel embedding and clearing.、Development。

【非特許文献46】Zhang HQ、Li F、Dever B、Li XF、およびLe XC(2013年)、DNA-Mediated Homogeneous Binding Assays for Nucleic Acids and Proteins.、Chem Rev、113巻(4号): pp2812~2841。

【非特許文献47】Wang F、Lu CH、およびWillner I(2014年)、From Cascaded Catalytic Nucleic Acids to Enzyme-DNA Nanostructures: Controlling Reactivity, Sensing, Logic Operations, and Assembly of Complex Structures.、Chem Rev、114巻(5号): pp2881~2941。 30

【非特許文献48】Jung CおよびEllington AD(2014年)、Diagnostic applications of nucleic acid circuits.、Acc Chem Res、47巻(6号): pp1825~1835。

【非特許文献49】Ikbali J、Lim GS、およびGao ZQ(2015年)、The hybridization chain reaction in the development of ultrasensitive nucleic acid assays.、Trends in Analytical Chemistry、64巻: pp86~99。 40

【非特許文献50】McLennan Rら(2015年)、Neural crest migration is driven by a few trailblazer cells with a unique molecular signature narrowly confined to the invasive front.、Development、142巻(11号): pp2014~2025。

【非特許文献51】Huss Dら(2015年)、Combinatorial analysis of mRNA expression patterns in mouse embryos using hybridization chain re 50

action.、Cold Spring Harbor Protocols。

【非特許文献52】Rosenthal AZら(2013年)、Localizing transcripts to single cells suggests an important role of uncultured deltaproteobacteria in the termite gut hydrogen economy.、Proc Natl Acad Sci USA、110巻(40号): pp16163~16168。

【非特許文献53】Yamaguchi Tら(2015年)、In situ DNA-hybridization chain reaction (HCR): a facilitated in situ HCR system for the detection of environmental microorganisms.、Environmental Microbiology、17巻(7号): pp2532~2541。10

【非特許文献54】Nikolakakis K、Lehnert E、McFall-Ngai MJ、およびRuby EG(2015年)、Use of Hybridization Chain Reaction-Fluorescent In Situ Hybridization To Track Gene Expression by Both Partners during Initiation of Symbiosis.、Appl Environ Microbiol、81巻(14号): pp4728~4735。20

【非特許文献55】Hybridization chain reaction methods for in situ molecular detection、Evan R. DAUGHARTHY、George M. Church、<https://patents.google.com/patent/WO2017189525A1/en>

【非特許文献56】Nanoscale imaging of proteins and nucleic acids via expansion microscopy、Asmamaw Wassie、Fei Chen、Edward Stuart Boyden、Shahar Alon、George Church、Evan Daugharthy、<https://patents.google.com/patent/CA2994958A1/en> 30

【非特許文献57】Chen, F.、A. T. Wassie、A. J. Cote、A. Sinha、S. Alon、S. Asano、E. R. Daugharthyら、2016年.、“Nanoscale Imaging of RNA with Expansion Microscopy.”、Nature Methods、13巻(8号): pp679~84。

【非特許文献58】Husain, N.、2016年、“Mapping mRNA and Protein Expression with High Signal-to-Background in Diverse Organisms.”、博士論文、カリフォルニア工科大学。40

【非特許文献59】Koos, B.、G. Cane、K. Grannas、L. Lof、L. Arngarden、J. Heldin、C. M. Claussonら、2015年、“Proximity-Dependent Initiation of Hybridization Chain Reaction.”、Nature Communications、6巻: p7294、https://doi.org/ARTN_7294_10.1038/ncomms8294。

【非特許文献60】Leino, Mattias、Johan Heldin、Marie Rubin Sander、Despoina Kerpatsou、Dorothea Raykova、Bjorn Koos、およびOla Soderberg.、2019年、“Optimization of Proximity-Depen 50

dent Initiation of Hybridization Chain Reaction for Improved Performance.”、Molecular Systems Design & Engineering、4巻(5号) : pp1058~65.、<https://doi.org/10.1039/C9ME00079H>。

【非特許文献61】Lin, R.、Q. Feng、P. Li、P. Zhou、R. Wang、Z. Liu、Z. Wangら、2018. “A Hybridization-Chain-Reaction-Based Method for Amplifying Immunosignals.”、Nature Methods、15巻(4号) : pp275~78.、<https://doi.org/10.1038/nmeth.4611>。 10

【非特許文献62】Wang, Y.、W. Xie、R. E. Kohman、およびG. M. Church.、2018年、“Multiplexed Imaging Using Same Species Primary Antibodies with Signal Amplification.”、BioRxiv, January、274456.、<https://doi.org/10.1101/274456>。 6。

【非特許文献63】Wang, Y.、Y. Zeng、S. K. Saka、W. Xie、I. Goldaracena、R. E. Kohman、P. Yin、およびG. M. Church、2020年、“Multiplexed in Situ Protein Imaging Using DNA-Barcoded Antibodies with Extended Hybridization Chain Reactions.”、BioRxiv, January、274456.、<https://doi.org/10.1101/274456>。 20

【非特許文献64】Wolfe, B. R.、N. J. Porubsky、J. N. Zadeh、R. M. Dirks、およびN. A. Pierce.、2017年、“Constrained Multistate Sequence Design for Nucleic Acid Reaction Pathway Engineering.”、Journal of the American Chemical Society、139巻(8号) : pp3134~44。 30

【非特許文献65】Zadeh, J. N.、C. D. Steenberg、J. S. Bois、B. R. Wolfe、M. B. Pierce、A. R. Khan、R. M. Dirks、およびN. A. Pierce.、2011年、“NUPACK: Analysis and Design of Nucleic Acid Systems.”、Journal of Computational Chemistry、32巻(1号) : pp170~73.、<https://doi.org/10.1002/jcc.21596>。

【非特許文献66】Acharya, A.、2016年、“Multiplexed Analysis of Diverse RNA Classes via Hybridization Chain Reaction.”、博士論文、カリフォルニア工科大学。 40

【発明の概要】

【0010】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、分割イニシエーターをそれぞれ含む2個以上の分割イニシエータープローブを含むプローブユニットを用いて、さらに大きなSB比をもたらす。個々の分割イニシエータープローブが試料中で非特異的に結合する場合、分割イニシエータープローブはHCRを惹起しない。しかし、分割イニシエータープローブがそのコグネイトな標的に特異的に結合する場合、プローブユニット内の分割イニシエーターが共局在化して完全HCRイニシエーターを形成し、HCRシグナル増幅の惹起が可能となる。いくつかの実施形態では、イニシエーターを2個以上の分割イニシエーター 50

に分割することで、標的の存在下で共局在化した場合のみ有効となるため、検出工程時の自動的なバックグラウンド抑制が可能となる。増幅時のHCRがもたらす自動バックグラウンド抑制と組み合わせられた場合、このプロセスは、プロトコル全体を通じた自動バックグラウンド抑制を可能にする（例えば、個々のプローブまたは個々のヘアピン単量体のいずれかである試薬が試料中で結合する場合、増幅されたバックグラウンドの生成に繋がらない）。

【0011】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態では、プローブユニットは、標的結合領域および分割イニシエーターをそれぞれ含む2個の分割イニシエータープローブを含み、プローブユニット内の標的結合領域は、標的上の隣接結合部位に結合し、完全HCRイニシエーターを共局在化するように構成されており、各プローブユニット内の分割イニシエーターは、HCRヘアピン上の隣接結合部位に結合し、HCRシグナル増幅を惹起するように構成されている。いくつかの実施形態では、標的、分割イニシエータープローブ、および／またはHCRヘアピンの間の接続は、エネルギー的に起こりにくい。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の標的結合領域を標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成することで、且つ／または、プローブユニット内の分割イニシエーターをHCRヘアピン上のオーバーラップ結合部位にハイブリダイズするように構成することで、上記接続をリラックスさせてエネルギー的により起こりやすい高次構造にし、HCRシグナル増幅の強度を増加することができる。

【0012】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態では、1または複数の標的は、1または複数のHCRシグナルを生成すること、1または複数のHCRシグナルを検出すること、1または複数のHCRシグナルを除去すること、および、これらの工程のうちの1または複数の反復することによって、試料中で分析することができる。

【0013】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態では、HCRシグナル増幅を用いて、触媒レポーター沈着（CARD）を媒介し、信号ゲインをさらに高めて、調節目的の染色試料の長期アーカイブ保存を可能にする。

【0014】

いくつかの実施形態では、レポーター標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、またはii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含むN個のプローブセット（各々はN個の標的種のうちの1つを標的とする）を準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、上記N個のプローブセットのうちのM個に対応する、M個のHCRアンプリファイアを準備すること（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターで標識されている）、所望により上記試料を洗浄すること、上記M個のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること、上記M個のシグナルを上記試料から除去すること；所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで上記工程のうちの1または複数の反復すること、を含む。プローブセットは、1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、1または複数のプローブユニットのいずれかを含む。HCRイニシエーター標識プローブは、1または複数の標的結合領域、および、1または複数のイニシエーターを含む。プローブユニットは、2個以上のHCR分割イニシエータープローブを含む。HCR分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。HCRアンプリファイアは、2個以上のHCRヘアピンを含む。HCRヘアピンは、一本鎖トールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。HCRヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。HCRヘアピンは、レポーターをさらに含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、レポーター標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1または複数のプローブセットを準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、1または複数のHCRアンプリファイア（各々は1または複数のレポーターで標識されている）を準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、1または複数のレポーターからの1または複数のシグナルを検出すること、所望により、1または複数のプローブセットを上記試料から除去すること、所望により、1または複数のHCRアンプリファイアを上記試料から除去すること、所望により、1または複数のレポーターを上記試料から除去すること、並びに、所望により、1または複数のシグナルを上記試料から除去すること、を含む。プローブセットは、1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、1または複数のプローブユニットのいずれかを含む。HCRイニシエーター標識プローブは、1または複数の標的結合領域、および、1または複数のイニシエーターを含む。プローブユニットは、2個以上のHCR分割イニシエータープローブを含む。HCR分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。HCRアンプリファイアは、2個以上のHCRヘアピンを含む。HCRヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびシステム部を含むインプットドメインを含む。HCRヘアピンは、一本鎖ループ、および上記システム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。HCRヘアピンは、1または複数のレポーターをさらに含む。

10

20

【0016】

いくつかの実施形態では、基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、b) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、N個のプローブセットを準備すること、c) 所望により上記試料を洗浄すること、d) 上記N個のプローブセットに対応する、N個のHCRアンプリファイアを準備すること（各々は別々の基質で標識されている）、e) 所望により上記試料を洗浄すること、f) 上記N個の基質のうちのM個に対応する、M個の標識プローブを準備すること（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターと結合している）、g) 所望により上記試料を洗浄すること、h) 上記M個の別々のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること、i) 上記M個のシグナルを上記試料から除去すること、並びに、j) 所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程f～iのうちの1または複数の反復すること、を含む。プローブセットは、1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、1または複数のプローブユニットのいずれかを含む。HCRイニシエーター標識プローブは、1または複数の標的結合領域、および、1または複数のイニシエーターを含む。プローブユニットは、2個以上のHCR分割イニシエータープローブを含む。HCR分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。HCRアンプリファイアは、2個以上のHCRヘアピンを含む。HCRヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびシステム部を含むインプットドメインを含む。HCRヘアピンは、一本鎖ループ、および上記システム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。HCRヘアピンは、基質をさらに含む。標識プローブは、基質結合領域およびレポーターを含む。

30

40

【0017】

いくつかの実施形態では、基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、b) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1または複数のプローブセットを準備

50

備すること、c) 所望により上記試料を洗浄すること、d) 1または複数のプローブセットに対応する1または複数のHCRアンプリファイア（各々は基質で標識されている）を準備すること、e) 所望により上記試料を洗浄すること、f) 1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々はレポーターに結合している）を準備すること、g) 所望により上記試料を洗浄すること、h) 1または複数のレポーターに対応する1または複数のシグナルを検出すること、i) 1または複数のシグナルを上記試料から除去すること、並びに、j) 所望により、工程b～iのいずれかを任意の順序で1回または複数回反復すること、を含む。プローブセットは、1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、1または複数のプローブユニットのいずれかを含む。HCRイニシエーター標識プローブは、1または複数の標的結合領域、および、1または複数のイニシエーターを含む。プローブユニットは、2個以上のHCR分割イニシエータープローブを含む。HCR分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。HCRアンプリファイアは、2個以上のHCRヘアピンを含む。HCRヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。HCRヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。HCRヘアピンは、基質をさらに含む。標識プローブは、基質結合領域およびレポーターを含む。

10

【0018】

いくつかの実施形態では、レポーターおよび／または基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1または複数のHCRプローブセットを準備すること、1または複数のプローブセットに対応する1または複数のHCRアンプリファイア（各々は1または複数のレポーターおよび／または1または複数の基質で標識されている）を準備すること、所望により、1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々は1または複数のレポーターに結合している）を準備すること、1または複数のシグナルを検出すること、所望により上記試料を洗浄すること、所望により、1または複数のシグナルを上記試料から除去すること、所望により、1または複数のレポーターを上記試料から除去すること、所望により、1または複数の標識プローブを上記試料から除去すること、所望により、1または複数のHCRアンプリファイアを上記試料から除去すること、所望により、1または複数のプローブセットを上記試料から除去すること、並びに、所望により、上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること、を含む。プローブセットは、1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、1または複数のプローブユニットのいずれかを含む。HCRイニシエーター標識プローブは、1または複数の標的結合領域、および、1または複数のイニシエーターを含む。プローブユニットは、2個以上のHCR分割イニシエータープローブを含む。HCR分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。HCRアンプリファイアは、2個以上のHCRヘアピンを含む。HCRヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。HCRヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。HCRヘアピンは、1または複数のレポーター、および／または、1または複数の基質をさらに含む。標識プローブは、基質結合領域、および1または複数のレポーターを含む。

20

30

40

【0019】

いくつかの実施形態では、レポーターおよび／または基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、工程c～gのいずれかを任意の順序で1回または複数回実行すること、i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む

50

1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1 または複数の H C R プローブセットを準備すること、1 または複数のシグナルを直接的または間接的に生成する 1 または複数の H C R アンプリファイアを準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、1 または複数のシグナルを検出すること、並びに、所望により、1 または複数のシグナルを除去すること、を含み、プローブセットは以下のいずれかを含む：1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、1 または複数のプローブユニット。H C R イニシエーター標識プローブは、1 または複数の標的結合領域、および、1 または複数のイニシエーターを含む。プローブユニットは、2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含む。H C R 分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。H C R アンプリファイアは、2 個以上の H C R ヘアピンを含む。H C R ヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびシステム部を含むインプットドメインを含む。H C R ヘアピンは、一本鎖ループ、および上記システム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。H C R ヘアピンは、1 または複数のレポーター、および／または、1 または複数の基質をさらに含む。

10

【0020】

いくつかの実施形態では、オーバーラップ結合部位を含む H C R 法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットを含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、プローブセットを準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、レポーターおよび／または基質で標識された H C R アンプリファイアを準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、並びに、上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む。プローブセットは 1 または複数のプローブユニットを含む。プローブユニットは、2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含む。H C R 分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は、上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている。H C R アンプリファイアは、2 個以上の H C R ヘアピンを含む。H C R ヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびシステム部を含むインプットドメインを含む。H C R ヘアピンは、一本鎖ループ、および上記システム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。H C R ヘアピンは、レポーターおよび／または基質をさらに含む。標識プローブは、基質結合領域およびレポーターを含む。

20

30

【0021】

いくつかの実施形態では、オーバーラップ結合部位を含む H C R 法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットを含み、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、プローブセットを準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、レポーターおよび／または基質で標識された H C R アンプリファイアを準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、並びに、上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む。プローブセットは 1 または複数のプローブユニットを含む。プローブユニットは、2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含む。H C R 分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは、H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている。H C R アンプリファイアは、2 個以上の H C R ヘアピンを含む。H C R ヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびシステム部を含むインプットドメインを含む。H C R ヘアピンは、一本鎖ループ、および上記システム部に対す

40

50

る相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。H C Rヘアピンは、レポーターおよび／または基質をさらに含む。標識プローブは、基質結合領域およびレポーターを含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、反復シグナル検出によるオーバーラップ結合部位を含むH C R法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、i) 1または複数のH C Rイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のH C R分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターはH C Rヘアピン上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1または複数のプローブセットを準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、1または複数のレポーターおよび／または基質でそれぞれ標識された1または複数のH C Rアンプリファイアを準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、所望により、1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々は1または複数のレポーターに結合している）を準備すること、所望により上記試料を洗浄すること、1または複数のレポーターからのシグナルを検出すること、所望により、1または複数のシグナルを上記試料から除去すること、所望により、1または複数のレポーターを上記試料から除去すること、所望により、1または複数の標識プローブを上記試料から除去すること、所望により、1または複数のアンプリファイアを上記試料から除去すること、所望により、1または複数のプローブセットを上記試料から除去すること、並びに、所望により、上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること、を含む。プローブセットは、1または複数のH C Rイニシエーター標識プローブ、または、1または複数のプローブユニットのいずれかを含む。H C Rイニシエーター標識プローブは、1または複数の標的結合領域、および、1または複数のイニシエーターを含む。プローブユニットは、2個以上のH C R分割イニシエータープローブを含む。H C R分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。プローブユニット内の標的結合領域は上記標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている。各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは、H C Rヘアピン上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている。H C Rアンプリファイアは、2個以上のH C Rヘアピンを含む。H C Rヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。H C Rヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。H C Rヘアピンは、1または複数のレポーター、および／または、1または複数の基質をさらに含む。標識プローブは、基質結合領域、および1または複数のレポーターを含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、方法は、第1分割イニシエーターを含む第1分割イニシエータープローブ、第2分割イニシエーターを含む第2分割イニシエータープローブ、第1トーホールドおよび第1ステム部を含む第1インプットドメイン、第1ヘアピンループおよび上記第1ステム部に対する相補鎖を含む第1アウトプットドメイン、並びに第1ハプテン分子、を含む第1ヘアピン単量体、第2トーホールドおよび第2ステム部を含む第2インプットドメイン、第2ヘアピンループおよび上記第2ステム部に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン、並びに第2ハプテン分子、を含む第2ヘアピン単量体、標的分子、を準備すること、並びに、上記第1分割イニシエータープローブおよび上記第2分割イニシエータープローブを、上記標的と一緒にインキュベーションすること、を含む。

【0024】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも1つのイニシエーターを含む少なくとも1つのイニシエーター標識プローブ、第1トーホールドおよび第1ステム部を含む第1インプットドメイン、第1ヘアピンループおよび上記第1ステム部に対する相補鎖を含む第

1 アウトプットドメイン、並びに第1ハプテン分子、を含む第1ヘアピン単量体、第2トーホールドおよび第2ステム部を含む第2インプットドメイン、第2ヘアピンループおよび上記第2ステム部に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン、並びに第2ハプテン分子、を含む第2ヘアピン単量体、標的分子、を準備すること、並びに、上記少なくとも1つのイニシエーターを含む少なくとも1つのイニシエーター標識プローブを上記標的と一緒にインキュベーションすること、を含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、方法は、第1分割イニシエーターを含む第1分割イニシエータープローブ、第2分割イニシエーターを含む第2分割イニシエータープローブ、第1トーホールドおよび第1ステム部を含む第1インプットドメイン、第1ヘアピンループおよび上記第1ステム部に対する相補鎖を含む第1アウトプットドメイン、並びに基質、を含む第1ヘアピン単量体、第2トーホールドおよび第2ステム部を含む第2インプットドメイン、第2ヘアピンループおよび上記第2ステム部に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン、並びに基質、を含む第2ヘアピン単量体、標的分子、を準備すること、並びに、上記第1分割イニシエータープローブおよび上記第2分割イニシエータープローブを、上記標的と一緒にインキュベーションすること、を含む。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、方法は、第1分割イニシエーターを含む第1分割イニシエータープローブ、第2分割イニシエーターを含む第2分割イニシエータープローブ、第1トーホールドおよび第1ステム部を含む第1インプットドメイン、第1ヘアピンループおよび上記第1ステム部に対する相補鎖を含む第1アウトプットドメイン、並びに第1分割基質、を含む第1ヘアピン単量体、第2トーホールドおよび第2ステム部を含む第2インプットドメイン、第2ヘアピンループおよび上記第2ステム部に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン、並びに第2分割基質、を含む第2ヘアピン単量体、標的分子、を準備すること、並びに、上記第1分割イニシエータープローブおよび上記第2分割イニシエータープローブを、上記標的分子と一緒にインキュベーションすること、を含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A】図1Aは、ハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）を介したインサイト増幅のいくつかの実施形態を示している。

30

【図1B】図1Bは、ハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）を介したインサイト増幅のいくつかの実施形態を示している。

【図2A】図2Aは、2段階プロトコルまたは3段階プロトコルのいずれかを用いたインサイトHCRの模式図を示している。

【図2B】図2Bは、2段階プロトコルまたは3段階プロトコルのいずれかを用いたインサイトHCRの模式図を示している。

【図3A】図3Aは、2つの近接する標的セクション、およびこれらの近接する標的セクションにハイブリダイズして2つの分割イニシエーターを共局在化させる2つの分割イニシエータープローブの、いくつかの構成を示している。

【図3B】図3Bは、2つの近接する標的セクション、およびこれらの近接する標的セクションにハイブリダイズして2つの分割イニシエーターを共局在化させる2つの分割イニシエータープローブの、いくつかの構成を示している。

40

【図4A】図4Aは、標的分子によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図4B】図4Bは、標的分子によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図4C】図4Cは、標的分子によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図4D】図4Dは、標的分子によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

50

【図 5 A】図 5 A は、標的複合体によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 5 B】図 5 B は、標的複合体によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 5 C】図 5 C は、標的複合体によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 5 D】図 5 D は、標的複合体によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 5 E】図 5 E は、標的複合体によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 6】図 6 は、最適化されていない標準的なプローブおよび分割イニシエータープローブを用いた、全載ニワトリ胚における標的 mRNA のイメージングを示している。

【図 7 A】図 7 A は、標的によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示しており、標的によって共局在化した分割イニシエータープローブを用いた H C R の惹起を明らかにしている試験管データを示している。

【図 7 B】図 7 B は、標的によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示しており、標的によって共局在化した分割イニシエータープローブを用いた H C R の惹起を明らかにしている試験管データを示している。

【図 7 C】図 7 C は、標的によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示しており、標的によって共局在化した分割イニシエータープローブを用いた H C R の惹起を明らかにしている試験管データを示している。

【図 8 A】図 8 A は、分割イニシエータープローブを用いたインサイツ H C R のいくつかの実施形態を示している。

【図 8 B】図 8 B は、分割イニシエータープローブを用いたインサイツ H C R のいくつかの実施形態を示している。

【図 9 A】図 9 A は、標準的なプローブおよび分割イニシエータープローブを用いた、バックグラウンドおよび S B 比を示している。

【図 9 B】図 9 B は、標準的なプローブおよび分割イニシエータープローブを用いた、バックグラウンドおよび S B 比を示している。

【図 9 C】図 9 C は、標準的なプローブおよび分割イニシエータープローブを用いた、バックグラウンドおよび S B 比を示している。

【図 9 D】図 9 D は、標準的なプローブおよび分割イニシエータープローブを用いた、バックグラウンドおよび S B 比を示している。

【図 10 A】図 10 A は、プローブセット最適化を行っていない分割イニシエータープローブを用いた、固定後の全載ニワトリ胚における、S B 比が高い、m R N A 発現の多重イメージングを示している。

【図 10 B】図 10 B は、プローブセット最適化を行っていない分割イニシエータープローブを用いた、固定後の全載ニワトリ胚における、S B 比が高い、m R N A 発現の多重イメージングを示している。

【図 10 C】図 10 C は、プローブセット最適化を行っていない分割イニシエータープローブを用いた、固定後の全載ニワトリ胚における、S B 比が高い、m R N A 発現の多重イメージングを示している。

【図 10 D】図 10 D は、プローブセット最適化を行っていない分割イニシエータープローブを用いた、固定後の全載ニワトリ胚における、S B 比が高い、m R N A 発現の多重イメージングを示している。

【図 11 A】図 11 A は、分割イニシエータープローブを用いた、固定後の全載ニワトリ胚における、細胞内解像度での、m R N A 発現の定量的画像化を示している。

【図 11 B】図 11 B は、分割イニシエータープローブを用いた、固定後の全載ニワトリ胚における、細胞内解像度での、m R N A 発現の定量的画像化を示している。

【図 12】図 12 は、第 1 分割イニシエータープローブおよび第 2 分割イニシエーター

10

20

30

40

50

ローブを標的分子にハイブリダイズする、いくつかの実施形態を示している。

【図 1 3】図 1 3 は、H C R イニシエーターによる開始後の、ヘアピン単量体から H C R 増幅重合体の自己集合の惹起のいくつかの実施形態を示している。図 1 3 中の 1 0 5 0 は、2 つの部分からなる、完全イニシエーターを示している。分割イニシエータープローブの一部分のみが示されている。I 1 (1 0 5 0) は、標的によって共局在化した 2 つの分割イニシエータープローブによって形成された完全イニシエーターを表している。

【図 1 4】図 1 4 は、H C R イニシエーターによって惹起される、ヘアピン単量体を用いる H C R 増幅のいくつかの実施形態を示している。分割イニシエータープローブの一部分のみが示されている。I 1 は、標的によって共局在化した 2 つの分割イニシエータープローブによって形成された完全イニシエーターを表している。

10

【図 1 5】図 1 5 は、簡略化した H C R ヘアピン単量体を用いて、H C R 機序のいくつかの実施形態を示している。

【図 1 6 A】図 1 6 A は、1 または複数のプローブユニットを含み、所望により 1 または複数のヘルパープローブを含む、プローブセットのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 6 B】図 1 6 B は、1 または複数のプローブユニットを含み、所望により 1 または複数のヘルパープローブを含む、プローブセットのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 6 C】図 1 6 C は、1 または複数のプローブユニットを含み、所望により 1 または複数のヘルパープローブを含む、プローブセットのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 6 D】図 1 6 D は、1 または複数のプローブユニットを含み、所望により 1 または複数のヘルパープローブを含む、プローブセットのいくつかの実施形態を示している。

20

【図 1 7 A】図 1 7 A は、分割イニシエータープローブを含むプローブユニットのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 7 B】図 1 7 B は、分割イニシエータープローブを含むプローブユニットのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 7 C】図 1 7 C は、分割イニシエータープローブを含むプローブユニットのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 8 A】図 1 8 A は、H C R アンプリファイアのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 8 B】図 1 8 B は、H C R アンプリファイアのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 8 C】図 1 8 C は、H C R アンプリファイアのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 8 D】図 1 8 D は、H C R アンプリファイアのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 8 E】図 1 8 E は、H C R アンプリファイアのいくつかの実施形態を示している。

30

【図 1 8 F】図 1 8 F は、H C R アンプリファイアのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 9 A】図 1 9 A は、4 つの H C R ヘアピンを含む H C R アンプリファイアのいくつかの実施形態を示している。

【図 1 9 B】図 1 9 B は、4 つの H C R ヘアピンを含む H C R アンプリファイアのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 0 A】図 2 0 A は、標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 0 B】図 2 0 B は、標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 0 C】図 2 0 C は、標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 0 D】図 2 0 D は、標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 0 E】図 2 0 E は、標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 0 F】図 2 0 F は、標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

40

【図 2 1 A】図 2 1 A は、H C R ヘアピンのオーバーラップ領域に相補的となるように設計された分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 1 B】図 2 1 B は、H C R ヘアピンのオーバーラップ領域に相補的となるように設計された分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 2】図 2 2 は、標的のオーバーラップ領域に相補的となるように設計された分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 3 A】図 2 3 A ~ 図 2 3 O は、試料からの H C R シグナルの除去のいくつかの実施形態を示している。いくつかの実施形態では、これらの方法の任意の 1 または複数の工程

50

は、図 2 3 A ～図 2 3 O および図 4 0 A ～図 4 0 N の他の方法と組み合わせることができる。いくつかの実施形態では、図 2 3 A ～図 2 3 O の方法の任意の 1 または複数の工程は、図 2 6 A ～図 2 6 T および図 4 0 A ～図 4 0 N の他の方法と組み合わせることができる。

【図 2 3 B】 同上。

【図 2 3 C】 同上。

【図 2 3 D】 同上。

【図 2 3 E】 同上。

【図 2 3 F】 同上。

【図 2 3 G】 同上。

【図 2 3 H】 同上。

【図 2 3 I】 同上。

【図 2 3 J】 同上。

【図 2 3 K】 同上。

【図 2 3 L】 同上。

【図 2 3 M】 同上。

【図 2 3 N】 同上。

【図 2 3 O】 同上。

【図 2 4 A】 図 2 4 A は、H C R ヘアピンのオーバーラップ領域に相補的となるように設計された分割イニシエータープローブを用いた、H C R シグナル強度の増大のいくつかの実施形態を示している。

【図 2 4 B】 図 2 4 B は、H C R ヘアピンのオーバーラップ領域に相補的となるように設計された分割イニシエータープローブを用いた、H C R シグナル強度の増大のいくつかの実施形態を示している。

【図 2 5 A】 図 2 5 A は、反復レポーター検出を介した、培養ヒト細胞における多重インサイツハイブリダイゼーションのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 5 B】 図 2 5 B は、反復レポーター検出を介した、培養ヒト細胞における多重インサイツハイブリダイゼーションのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 6 A】 図 2 6 A ～図 2 6 T は、H C R イニシエーター標識プローブおよび／または H C R 分割イニシエータープローブを、H C R アンプリファイアと組み合わせて用いる、試料中の 1 または複数の標的を検出するための各種方法のいくつかの実施形態を示している。いくつかの実施形態では、これらの方法の任意の 1 または複数の工程は、図 2 6 A ～図 2 6 T の他の方法と組み合わせることができる。

【図 2 6 B】 同上。

【図 2 6 C】 同上。

【図 2 6 D】 同上。

【図 2 6 E】 同上。

【図 2 6 F】 同上。

【図 2 6 G】 同上。

【図 2 6 H】 同上。

【図 2 6 I】 同上。

【図 2 6 J】 同上。

【図 2 6 K】 同上。

【図 2 6 L】 同上。

【図 2 6 M】 同上。

【図 2 6 N】 同上。

【図 2 6 O】 同上。

【図 2 6 P】 同上。

【図 2 6 Q】 同上。

【図 2 6 R】 同上。

【図 2 6 S】 同上。

【図 2 6 T】 同上。

【図 2 7】 図 2 7 は、H C R ヘアピンのオーバーラップ領域に相補的となるように設計され、且つ、標的のオーバーラップ領域に相補的となるように設計された、分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 2 8 A】 図 2 8 A は、分割イニシエーター H C R 抑制（O F F 状態）および変換（O N 状態）を増強する協同的プローブ接合の、インビトロ最適化例のいくつかの実施形態を示している。

【図 2 8 B】 図 2 8 B は、分割イニシエーター H C R 抑制（O F F 状態）および変換（O N 状態）を増強する協同的プローブ接合の、インビトロ最適化例のいくつかの実施形態を示している。

10

【図 2 8 C】 図 2 8 C は、分割イニシエーター H C R 抑制（O F F 状態）および変換（O N 状態）を増強する協同的プローブ接合の、インビトロ最適化例のいくつかの実施形態を示している。

【図 2 9 A】 図 2 9 A は、イニシエーター標識一次抗体プローブを用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片におけるタンパク質標的をイメージングするための、多重 H C R 免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

【図 2 9 B】 図 2 9 B は、イニシエーター標識一次抗体プローブを用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片におけるタンパク質標的をイメージングするための、多重 H C R 免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

20

【図 2 9 C】 図 2 9 C は、イニシエーター標識一次抗体プローブを用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片におけるタンパク質標的をイメージングするための、多重 H C R 免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

【図 2 9 D】 図 2 9 D は、イニシエーター標識一次抗体プローブを用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片におけるタンパク質標的をイメージングするための、多重 H C R 免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

【図 3 0 A】 図 3 0 A は、未標識一次抗体プローブおよびイニシエーター標識二次抗体プローブを用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片におけるタンパク質標的をイメージングするための、多重 H C R 免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

【図 3 0 B】 図 3 0 B は、未標識一次抗体プローブおよびイニシエーター標識二次抗体プローブを用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片におけるタンパク質標的をイメージングするための、多重 H C R 免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

30

【図 3 0 C】 図 3 0 C は、未標識一次抗体プローブおよびイニシエーター標識二次抗体プローブを用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片におけるタンパク質標的をイメージングするための、多重 H C R 免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

【図 3 0 D】 図 3 0 D は、未標識一次抗体プローブおよびイニシエーター標識二次抗体プローブを用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片におけるタンパク質標的をイメージングするための、多重 H C R 免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

【図 3 1 A】 図 3 1 A は、m R N A 標的には D N A 分割イニシエータープローブを用い、タンパク質標的にはイニシエーター標識一次抗体プローブを用いて、H C R シグナル増幅を全標的において同時に実行した、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片における、同時 H C R による R N A インサイツハイブリダイゼーションおよびタンパク質免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

40

【図 3 1 B】 図 3 1 B は、m R N A 標的には D N A 分割イニシエータープローブを用い、タンパク質標的にはイニシエーター標識一次抗体プローブを用いて、H C R シグナル増幅を全標的において同時に実行した、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片における、同時 H C R による R N A インサイツハイブリダイゼーションおよびタンパク質免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

【図 3 1 C】 図 3 1 C は、m R N A 標的には D N A 分割イニシエータープローブを用い、タンパク質標的にはイニシエーター標識一次抗体プローブを用いて、H C R シグナル増幅

50

を全標的において同時に実行した、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片における、同時HCRによるRNAインサイツハイブリダイゼーションおよびタンパク質免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

【図32A】図32Aは、mRNA標的にはDNA分割イニシエータープローブを用い、タンパク質標的には未標識一次抗体プローブおよびイニシエーター標識二次抗体プローブを用いて、HCRシグナル増幅を全標的において同時に実行した、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片における、同時HCRによるRNAインサイツハイブリダイゼーションおよびタンパク質免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

【図32B】図32Bは、mRNA標的にはDNA分割イニシエータープローブを用い、タンパク質標的には未標識一次抗体プローブおよびイニシエーター標識二次抗体プローブを用いて、HCRシグナル増幅を全標的において同時に実行した、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片における、同時HCRによるRNAインサイツハイブリダイゼーションおよびタンパク質免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

【図32C】図32Cは、mRNA標的にはDNA分割イニシエータープローブを用い、タンパク質標的には未標識一次抗体プローブおよびイニシエーター標識二次抗体プローブを用いて、HCRシグナル増幅を全標的において同時に実行した、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片における、同時HCRによるRNAインサイツハイブリダイゼーションおよびタンパク質免疫組織化学のいくつかの実施形態を示している。

【図33A】図33Aは、種々の標的種の場合で、CARDシグナル増幅を媒介するためにHCRを使用する場合のいくつかの実施形態を示している。

【図33B】図33Bは、種々の標的種の場合で、CARDシグナル増幅を媒介するためにHCRを使用する場合のいくつかの実施形態を示している。

【図33C】図33Cは、種々の標的種の場合で、CARDシグナル増幅を媒介するためにHCRを使用する場合のいくつかの実施形態を示している。

【図33D】図33Dは、種々の標的種の場合で、CARDシグナル増幅を媒介するためにHCRを使用する場合のいくつかの実施形態を示している。

【図33E】図33Eは、種々の標的種の場合で、CARDシグナル増幅を媒介するためにHCRを使用する場合のいくつかの実施形態を示している。

【図34A】図34Aは、総称的な標的分子および標的複合体の場合で、CARDシグナル増幅を媒介するためにHCRを使用する場合のいくつかの実施形態を示している。

【図34B】図34Bは、総称的な標的分子および標的複合体の場合で、CARDシグナル増幅を媒介するためにHCRを使用する場合のいくつかの実施形態を示している。

【図34C】図34Cは、総称的な標的分子および標的複合体の場合で、CARDシグナル増幅を媒介するためにHCRを使用する場合のいくつかの実施形態を示している。

【図35-1】図35-1は、HCR CARDシグナル増幅と絡めてハブテンを配置する場合の、いくつかの実施形態を示している。

【図35-2】図35-2は、HCR CARDシグナル増幅と絡めてハブテンを配置する場合の、いくつかの実施形態を示している。

【図36A】図36Aは、基質標識HCRヘアピンまたは分割基質HCRヘアピンを用いた、HCR CARDシグナル増幅のいくつかの実施形態を示している。

【図36B】図36Bは、基質標識HCRヘアピンまたは分割基質HCRヘアピンを用いた、HCR CARDシグナル増幅のいくつかの実施形態を示している。

【図37A】図37Aは、HCRを介したCARDシグナル増幅を用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト腎臓切片およびホルマリン固定パラフィン包埋ヒト肝臓切片における、RNA標的のイメージングのいくつかの実施形態を示している。

【図37B】図37Bは、HCRを介したCARDシグナル増幅を用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト腎臓切片およびホルマリン固定パラフィン包埋ヒト肝臓切片における、RNA標的のイメージングのいくつかの実施形態を示している。

【図38-1】図38-1は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

10

20

30

40

50

【図 38-2】図 38-2 は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体によって共局在化した分割イニシエータープローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39A】図 39A は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39B】図 39B は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39C】図 39C は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39D】図 39D は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

10

【図 39E】図 39E は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39F】図 39F は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39G】図 39G は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39H】図 39H は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39I】図 39I は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

20

【図 39J】図 39J は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39K】図 39K は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39L】図 39L は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39M】図 39M は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図 39N】図 39N は、直接的または間接的に標的分子または標的複合体に結合したイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

30

【図 40A】図 40A～図 40N は、試料からの HCR シグナルの除去のいくつかの実施形態を示している。いくつかの実施形態では、これらの方法の任意の 1 または複数の工程は、図 23A～図 23O および図 40A～図 40N の他の方法と組み合わせることができる。いくつかの実施形態では、図 40A～図 40N の方法の任意の 1 または複数の工程は、図 23A～図 23O および図 26A～図 26T の他の方法と組み合わせることができる。

【図 40B】同上。

【図 40C】同上。

【図 40D】同上。

【図 40E】同上。

40

【図 40F】同上。

【図 40G】同上。

【図 40H】同上。

【図 40I】同上。

【図 40J】同上。

【図 40K】同上。

【図 40L】同上。

【図 40M】同上。

【図 40N】同上。

【図 41A】図 41A は、分割イニシエータープローブを用いた、ホルマリン固定パラフ

50

イン包埋マウス脳切片における、細胞内解像度での、mRNA発現の定量的画像化のいくつかの実施形態を示している。

【図41B】図41Bは、分割イニシエータープローブを用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片における、細胞内解像度での、mRNA発現の定量的画像化のいくつかの実施形態を示している。

【図41C】図41Cは、分割イニシエータープローブを用いた、ホルマリン固定パラフィン包埋マウス脳切片における、細胞内解像度での、mRNA発現の定量的画像化のいくつかの実施形態を示している。

【図42A】図42Aは、1または複数のHCRイニシエーターを含むイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

10

【図42B】図42Bは、1または複数のHCRイニシエーターを含むイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図42C】図42Cは、1または複数のHCRイニシエーターを含むイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図42D】図42Dは、1または複数のHCRイニシエーターを含むイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図42E】図42Eは、1または複数のHCRイニシエーターを含むイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図42F】図42Fは、1または複数のHCRイニシエーターを含むイニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

20

【図43A】図43Aは、イニシエーター標識プローブを用いた、全載ゼブラフィッシュ胚における、標的マイクロRNAおよびmRNAのイメージングのいくつかの実施形態を示している。

【図43B】図43Bは、イニシエーター標識プローブを用いた、全載ゼブラフィッシュ胚における、標的マイクロRNAおよびmRNAのイメージングのいくつかの実施形態を示している。

【図43C】図43Cは、イニシエーター標識プローブを用いた、全載ゼブラフィッシュ胚における、標的マイクロRNAおよびmRNAのイメージングのいくつかの実施形態を示している。

【図44A】図44Aは、1または複数の遮蔽HCRイニシエーターを含む遮蔽イニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

30

【図44B】図44Bは、1または複数の遮蔽HCRイニシエーターを含む遮蔽イニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図44C】図44Cは、1または複数の遮蔽HCRイニシエーターを含む遮蔽イニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図44D】図44Dは、1または複数の遮蔽HCRイニシエーターを含む遮蔽イニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図44E】図44Eは、1または複数の遮蔽HCRイニシエーターを含む遮蔽イニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図44F】図44Fは、1または複数の遮蔽HCRイニシエーターを含む遮蔽イニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

40

【図44G】図44Gは、1または複数の遮蔽HCRイニシエーターを含む遮蔽イニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図44H】図44Hは、1または複数の遮蔽HCRイニシエーターを含む遮蔽イニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図44I】図44Iは、1または複数の遮蔽HCRイニシエーターを含む遮蔽イニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図44J】図44Jは、1または複数の遮蔽HCRイニシエーターを含む遮蔽イニシエーター標識プローブのいくつかの実施形態を示している。

【図44K】図44Kは、1または複数の遮蔽HCRイニシエーターを含む遮蔽イニシエ

50

【図 4 6 H】図 4 6 H は、遮蔽イニシエーター標識プローブと絡めて使用する場合の、遮

50

蔽イニシエーターのいくつかの実施形態を示している。

【図 4 6 I】図 4 6 I は、遮蔽イニシエーター標識プローブと絡めて使用する場合の、遮蔽イニシエーターのいくつかの実施形態を示している。

【図 4 6 J】図 4 6 J は、遮蔽イニシエーター標識プローブと絡めて使用する場合の、遮蔽イニシエーターのいくつかの実施形態を示している。

【図 4 6 K】図 4 6 K は、遮蔽イニシエーター標識プローブと絡めて使用する場合の、遮蔽イニシエーターのいくつかの実施形態を示している。

【図 4 6 L】図 4 6 L は、遮蔽イニシエーター標識プローブと絡めて使用する場合の、遮蔽イニシエーターのいくつかの実施形態を示している。

【図 4 6 M】図 4 6 M は、遮蔽イニシエーター標識プローブと絡めて使用する場合の、遮蔽イニシエーターのいくつかの実施形態を示している。

【図 4 7】図 4 7 は、図 2 5 A（表 2）における H C R 重合体からの H C R ヘアピンの脱ハイブリダイズに使用される配列の実施形態を示している。

【発明を実施するための形態】

【0028】

ハイブリダイゼーション連鎖反応（H C R）は、準安定ヘアピン単量体または他の準安定核酸構造から開始される、核酸分子の惹起型ハイブリダイゼーション法である。例えば、各々その全体が参照によって本明細書に援用される、非特許文献 1、並びに、2005 年 3 月 22 日に出願された特許文献 1、特許文献 2（2012 年 1 月 31 日）、特許文献 3（2013 年 8 月 13 日）；並びに、2017 年 6 月 30 日に出願された特許文献 4 を参照されたい。このプロセスの単純なバージョンでは、核酸イニシエーター鎖によって惹起された際、準安定ヘアピン単量体が、ハイブリダイゼーションイベントの連鎖反応を起こして、ニックの入った二本鎖重合体を形成する。ヘアピン単量体は、重合プロセスを駆動するためのエネルギーを、一本鎖ループおよびトーホールドに貯蔵している。

【0029】

H C R は、2 個以上の準安定ヘアピン単量体を含むことができる。ヘアピン単量体はそれぞれ、少なくとも 1 個の一本鎖トーホールド、一本鎖ループ、および二本鎖システムを有する。自己集合カスケードを駆動するエネルギーは、ヘアピンの一本鎖ループセグメントおよびトーホールドセグメント内に貯蔵されている。

【0030】

各単量体は速度論的トラップに捕捉され、系が迅速に平衡化することを妨げる。すなわち、単量体対は、イニシエーターの非存在下では互いにハイブリダイズすることができない。イニシエーター鎖の導入により、単量体がハイブリダイゼーションイベントの連鎖反応を起こして、ニックの入った二本鎖重合体を形成する。H C R を利用することで、例えば、H C R イニシエーターを有するプローブで分析物を検出することによって試料中の目的の分析物の存在を検出することができ、H C R イニシエーターは H C R シグナル増幅を惹起する。H C R シグナル増幅は、試料から生じるバックグラウンドよりもシグナルを高めることで、分子検出およびイメージング応用のために S B 比を増加することが可能である。

【0031】

H C R の実施形態が本明細書で提供される。ハイブリダイゼーション連鎖反応（H C R）を用いる試料分析法は、以下の態様のうちの 1 つ、2 つ、または 3 つ全てを含み得る：1）反復シグナル検出、2）オーバーラップ結合部位、および 3）触媒レポーター沈着（CARD）。

【0032】

方法のいくつかの実施形態では、最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を、2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットをそれぞれ含む N 個のプローブセット（各々は N 個の標的種のうちの 1 つを標的とする）と組み合わせる。上記 N 個のプローブセットのうちの M 個に対応する、M 個の H C R アンプリファイア（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターで標識されてい

10

20

30

40

50

る)を添加する。その後、上記M個のレポーターに対応するM個のシグナルを検出する。上記方法の各工程を、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで反復する。

【0033】

方法のいくつかの実施形態では、1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を、2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む1または複数のプローブセットと組み合わせる。1または複数のHCRアンプリファイア（各々は1または複数のレポーターで標識されている）を添加し、1または複数のレポーターからの1または複数のシグナルを検出する。

【0034】

方法のいくつかの実施形態では、最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を、2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含むN個のプローブセットと組み合わせる。N個のプローブセットに対応するN個のHCRアンプリファイア（各々は別々の基質で標識されている）、および、上記N個の別々の基質のうちのM個に対応するM個の標識プローブ（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターに結合している）を添加する。その後、上記M個の別々のレポーターに対応するM個のシグナルを検出する。上記方法の各工程を、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで反復する。いくつかの実施形態では、反復シグナル検出法が提供される。上記方法は基質標識ヘアピンを含み、1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を、2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む1または複数のプローブセット、1または複数のプローブセットに対応する1または複数のHCRアンプリファイア（各々は基質で標識されている）、並びに、1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々はレポーターに結合している）と組み合わせる。その後、1または複数のレポーターに対応する1または複数のシグナルを検出する。上記方法の各工程を任意の順序で1回または複数回反復する。

10

20

【0035】

レポーターおよび／または基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法のいくつかの実施形態では、1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を、2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む1または複数のHCRプローブセット、1または複数のプローブセットに対応する1または複数のHCRアンプリファイア（各々は1または複数のレポーターおよび／または1または複数の基質で標識されている）、並びに、1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々は1または複数のレポーターに結合している）と組み合わせる。その後、1または複数のシグナルを検出する。上記方法の各工程を任意の順序で反復する。

30

【0036】

レポーターおよび／または基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法のいくつかの実施形態では、1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を、2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む1または複数のHCRプローブセットと組み合わせる。1または複数のシグナルを直接的または間接的に生成する1または複数のHCRアンプリファイアを添加し、1または複数のシグナルを検出する。上記方法の各工程を任意の順序で1回または複数回実行することができる。

40

【0037】

方法のいくつかの実施形態では、標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を、2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含むプローブセットと組み合わせる。各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は、上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている。その後、レポーターおよび／または基質で標識されたHCRアンプリファイア、並びに所望による上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を添加し、上記レ

50

ポーターからのシグナルを検出する。いくつかの実施形態では、アンプリファイアを代わりにレポーターで標識し、プローブ上の標識を任意にすることができる。

【0038】

方法のいくつかの実施形態では、標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を、2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含むプローブセットと組み合わせる。各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは、HCRヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている。レポーターおよび／または基質で標識されたHCRアンプリファイア、並びに所望による上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を添加する。その後、上記レポーターからのシグナルを検出する。いくつかの実施形態では、アンプリ

10

【0039】

方法のいくつかの実施形態では、1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を、2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む1または複数のプローブセットと組み合わせる。各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は、標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている。各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは、HCRヘアピン上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている。1または複数のレポーターおよび／または基質でそれぞれ標識されている1または複数のHCRアンプリファイア、並びに、（所望による）1または複数の基質に対応する1または複数の所望による標識プローブ（各々は1または複数のレポーターに結合している）を添加する。1または複数のレポーターからのシグナルを検出する。上記方法の各工程を任意の順序で反復することができる。いくつかの実施形態では、アンプリファイアを代わりにレポーターで標識し、

20

【0040】

方法のいくつかの実施形態では、第1分割イニシエーターを含む第1分割イニシエータープローブ、第2分割イニシエーターを含む第2分割イニシエータープローブ、0、1、または複数のハプテンで標識された第1ヘアピン単量体、0、1、または複数のハプテンで標識された第2ヘアピン単量体、並びに標的分子を組み合わせる。この結果、上記第1分割イニシエータープローブが上記標的分子に結合し、上記第2分割イニシエータープローブが上記標的分子に結合する。上記第1ヘアピン単量体は上記第1分割イニシエーターおよび上記第2分割イニシエーターの両方に結合し、上記第2ヘアピン単量体は上記第1ヘアピン単量体に結合する。1または複数のレポーターで標識された抗ハプテン分子を準備する。上記レポーターは、CARDを媒介する酵素である。1または複数のCARD基質を準備し、CARDを媒介する酵素によって上記CARD基質から生成される、1または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定する。

30

【0041】

方法のいくつかの実施形態では、少なくとも1つのイニシエーターを含む少なくとも1つのイニシエーター標識プローブ、0、1、または複数のハプテンで標識された第1ヘアピン単量体、0、1、または複数のハプテンで標識された第2ヘアピン単量体、並びに、0、1、または複数の標的分子を組み合わせる。この結果、上記少なくとも1つのイニシエーターを含む少なくとも1つのイニシエーター標識プローブが上記0、1、または複数の標的分子に結合する。上記第1ヘアピン単量体は上記少なくとも1つのイニシエーターに結合し、上記第2ヘアピン単量体は上記第1ヘアピン単量体に結合する。1または複数のレポーターで標識された抗ハプテン分子を準備する。上記レポーターは、CARDを媒介する酵素である。1または複数のCARD基質を準備し、CARDを媒介する酵素によって上記CARD基質から生成される、1または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定する。

40

【0042】

50

方法のいくつかの実施形態では、第1分割イニシエーターを含む第1分割イニシエータープローブ、第2分割イニシエーターを含む第2分割イニシエータープローブ、0、1、または複数の基質を含む第1ヘアピン単量体、0、1、または複数の基質を含む第2ヘアピン単量体、並びに標的分子を組み合わせる。この結果、上記第1分割イニシエータープローブが上記標的分子に結合し、上記第2分割イニシエータープローブが上記標的分子に結合する。上記第1ヘアピン単量体は上記第1分割イニシエーターおよび上記第2分割イニシエーターの両方に結合し、上記第2ヘアピン単量体は上記第1ヘアピン単量体に結合する。1または複数のレポーター体で標識された基質結合領域を準備する。上記基質結合領域は上記基質に結合する。上記レポーター体は、CARDを媒介する酵素である。1または複数のCARD基質を準備し、CARDを媒介する酵素によって上記CARD基質から生成される、1または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定する。

10

【0043】

方法のいくつかの実施形態では、第1分割イニシエーターを含む第1分割イニシエータープローブ、第2分割イニシエーターを含む第2分割イニシエータープローブ、第1分割基質を含む第1ヘアピン単量体、第2分割基質を含む第2ヘアピン単量体、並びに標的分子を組み合わせる。この結果、上記第1分割イニシエータープローブが上記標的分子に結合し、上記第2分割イニシエータープローブが上記標的分子に結合する。上記第1ヘアピン単量体が上記第1分割イニシエーターおよび上記第2分割イニシエーターの両方に結合し、上記第2ヘアピン単量体が上記第1ヘアピン単量体に結合し、第1分割基質および第2分割基質を含む完全基質が得られる。1または複数のレポーター体で標識された基質結合領域を添加する。上記基質結合領域は上記完全基質に結合する。上記レポーター体は、CARDを媒介する酵素である。1または複数のCARD基質を準備し、CARDを媒介する酵素によって上記CARD基質から生成される、1または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定する。

20

【0044】

いくつかの実施形態では、HCRプロセスは分割HCRプロセスとすることができる。いくつかの実施形態では、分割イニシエータープローブ対または分割イニシエータープローブセットは、それらの間に少量のオーバーラップを有することができる。いくつかの実施形態では、上記イニシエーターは、HCRヘアピンのインプットドメインよりも短いまたは長く、且つ／または、上記ヘアピンのインプットドメインに対する相補性が不完全であるが、上記ヘアピンのインプットドメインにハイブリダイズし、上記ヘアピンを開いてHCR重合カスケードを開始することができる。本明細書で提供される実施形態のいくつかでは、プローブユニット内の分割イニシエーターは、HCRヘアピンのオーバーラップ領域（例えば、1個、2個、またはそれ以上のヌクレオチド分だけオーバーラップしている領域）に相補的であるか、または、HCRヘアピンに実質的に相補的である（例えば、0個、1個、2個、少数（a few）、またはそれより多い数個（several）のミスマッチを除いて相補的）。

30

【0045】

いくつかの実施形態では、試料中への浸透を増強するため（シグナルを増加するため）、且つ／または、試料内のプローブの非特異的結合を低減するため（バックグラウンドを低減するため）、イニシエーター標識プローブ上のイニシエーターを遮蔽することができる。

40

いくつかの実施形態では、上記HCRプロセスは、触媒レポーター沈着（CARD）を媒介する酵素を含むレポーター体をリクルートする働きをする基質を含むことができるヘアピン標識を含むことができる。

【0046】

いくつかの実施形態では、レポーター分子に（またはレポーター体に）結合した標識プローブが個々のヘアピン上の分割基質と強く結合しないが、HCR重合後は、共局在化された完全基質が、レポーター分子に、（またはCARDシグナル増幅を媒介する酵素を含むレポーター体に、結合した標識プローブと強く結合するように、HCR増幅重合体内の

50

近接するヘアピンが完全基質を共局在化させるように、H C Rヘアピン標識に分割基質を含ませることができる。

【0047】

いくつかの実施形態では、上記H C Rプロセスは、触媒レポーター沈着（C A R D）を介したシグナル増幅の追加層を媒介する働きをする、1または複数のハプテン（例えば、図33A～33E、図34A～34C、図35-1～図35-2、図36A～36Bを参照）を含むことができる。

【0048】

いくつかの実施形態では、レポーター標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) 2個以上のH C R分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含むN個のプローブセット（各々はN個の標的種のうちの1つを標的とする）を準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) 上記N個のプローブセットのうちのM個に対応する、M個のH C Rアンプリファイアを準備すること（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターで標識されている）；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 上記M個のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること；g) 上記M個のシグナルを上記試料から除去すること；並びに、h) 所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程b～gのうちの1または複数を反復すること、を含む。

10

【0049】

いくつかの実施形態では、レポーター標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) 1または複数のイニシエーターをそれぞれ含む1または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含むN個のプローブセット（各々はN個の標的種のうちの1つを標的とする）を準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) 上記N個のプローブセットのうちのM個に対応する、M個のH C Rアンプリファイアを準備すること（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターで標識されている）；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 上記M個のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること；g) 上記M個のシグナルを上記試料から除去すること；並びに、h) 所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程b～gのうちの1または複数を反復すること、を含む。

20

30

【0050】

いくつかの実施形態では、レポーター標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) 1) 1または複数のイニシエーターをそれぞれ含む1または複数のH C Rイニシエーター標識プローブ、または、2) 2個以上のH C R分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む、N個のプローブセット（各々はN個の標的種のうちの1つを標的とする）を準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) 上記N個のプローブセットのうちのM個に対応する、M個のH C Rアンプリファイアを準備すること（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターで標識されている）；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 上記M個のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること；g) 上記M個のシグナルを上記試料から除去すること；並びに、h) 所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程b～gのうちの1または複数を反復すること、を含む。

40

【0051】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) 2個以上のH C R分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含むN個のプローブセット（各々はN個の標的種のうちの1つを標的とする）を準備すること；c) 上記試料を洗浄する

50

こと；d) 上記N個のプロブセットのうちのM個に対応する、M個のHCRアンプリファイアを準備すること（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターで標識されている）；e) 上記試料を洗浄すること；f) 上記M個のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること；g) 上記M個のシグナルを上記試料から除去すること；並びに、h) N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程b～gのうちの1または複数を反復すること、を含む。

【0052】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプロブユニットをそれぞれ含む1または複数のプロブセットを準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) 1または複数のHCRアンプリファイア（各々は1または複数のレポーターで標識されている）を準備すること；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 1または複数のレポーターからの1または複数のシグナルを検出すること；g) 所望により、1または複数のプロブセットを上記試料から除去すること；h) 所望により、1または複数のHCRアンプリファイアを上記試料から除去すること；i) 所望により、1または複数のレポーターを上記試料から除去すること；並びに、j) 所望により、1または複数のシグナルを上記試料から除去すること、を含む。上記のプロセス（上記工程全てまたはサブセット）を必要に応じて反復することができる。

【0053】

定義および実施形態

本明細書で使用される場合、「核酸」は、何らかの形態のDNAオリゴマーおよび／またはRNAオリゴマーを包含する。核酸は、塩基または骨格のいずれかに修飾を施したDNAまたはRNAの類似体も包含する。例えば、本明細書で使用される核酸は、ペプチド核酸（PNA）の使用を包含する。「核酸」という語は、キメラ分子も包含する。この表現には、人工的な構築物だけでなく、誘導体なども包含される。この表現には、例えば、DNA、RNA、2'-OMe-RNA、LNA、XNA、合成核酸類似体、およびPNAのうちの任意の1または複数が含まれる。

【0054】

「粘着末端」という語は、相補的な核酸配列とハイブリダイズすることが可能な核酸配列のことを指す。「粘着末端」の二次構造は、粘着末端が立体構造変化を起こすことなく、適切な反応条件下で相補的な核酸とハイブリダイズすることが可能であるようなものである。典型的には、粘着末端は一本鎖核酸である。

【0055】

「単量体」とは、個々の核酸オリゴマーである。典型的には、少なくとも2個の単量体がハイブリダイゼーション連鎖反応で使われるが、3個、4個、5個、6個、またはそれ以上の単量体が使われることもある。典型的には、各単量体は、HCR反応に使われている少なくとも1つの他の単量体と相補的である少なくとも1つの領域を含む。

【0056】

組成物は、a) 第1トーホールド（1851）および第1ステム部を含む第1インプットドメイン（1852）、b) 第1ヘアピンループ（1853）および上記第1ステム部に対する相補鎖を含む第1アウトプットドメイン（1854）、並びに、c) 第1レポーター分子（1850）、を含む、第1ヘアピン単量体（1510）を含むことができる（例えば、図13参照）。上記組成物は、a) 第2トーホールド（1951）および第2ステム部を含む第2インプットドメイン（1952）、b) 第2ヘアピンループ（1953）および上記第2ステム部に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン（1954）、並びに、c) 第2レポーター分子（1950）を含む、第2ヘアピン単量体（1610）をさらに含むことができる。

【0057】

いくつかの実施形態では、単量体は「準安定」である。すなわち、イニシエーターの非

存在下では、単量体が相補的な領域を含む他の単量体と結合することは速度論的に起こりにくい。「HCR」単量体は、イニシエーターである核酸に曝露されると集合して重合体を形成することができる単量体である。

【0058】

本明細書で使用される場合、「重合」とは、2つ以上の単量体が結合して重合体を形成することをいう。「重合体」は、共有結合、非共有結合、またはその両方を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、2種の単量体が交互にハイブリダイズして、ニックの入った二本鎖重合体を含む重合体を形成することができる。本明細書では、重合体は、「HCR産物」とも呼ばれる。

【0059】

「イニシエーター標識プローブ」は、1または複数の標的結合ドメイン、および1または複数のHCRイニシエーターを含む（例えば、図39A～図39Nおよび図42A～図42F）。

【0060】

分割イニシエータープローブは、1または複数の標的結合ドメイン、および1または複数の分割イニシエータードメインを含む（例えば、図3A～図3B、図5A～図5E、および図38-1～図38-2）。本明細書で使用される場合、「分割イニシエータープローブ」および「分割イニシエータープローブ」という語は交換可能である。

【0061】

「完全イニシエーター」は、2個以上の分割イニシエーターの組み合わせが、共局在化したときにHCR重合を開始できることに由来する。いくつかのイニシエーターは、HCR単量体のイニシエーター相補領域と相補的な核酸領域を含む。分割イニシエーターは、それ自体ではHCR重合を惹起するには不十分であるが、1つ（またはそれ以上）の他の分割イニシエーターと共局在化して完全イニシエーターを形成したとき、HCR重合を惹起することができるものである。

【0062】

「プローブユニット」は、プローブユニット内の分割イニシエータープローブ上の分割イニシエータードメインが共局在化して完全イニシエーターを形成できるように、2個以上の分割イニシエータープローブを含む。

【0063】

表1において、以下の語は、本明細書で使用される語の代替選択肢（文脈に応じて幅が変化し得る）として示される。最も広い語の開示は、最も広い概念を示すだけでなく、本明細書においてより狭い概念も示す。このアプローチおよび表は、単に、両方の選択肢をより簡潔に示すための略記として使用されているに過ぎない。

【0064】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

スプリットイニシエータープローブ	分割イニシエータープローブ
標的結合配列	標的結合セクション
近位部分配列	標的セクション
コグネイト近位標的部位	標的セクション
標的結合領域	標的結合セクション
HCRイニシエーター I 1	完全HCRイニシエーター
ヘアピンH 1	第 1 ヘアピン単量体
ヘアピンH 2	第 2 ヘアピン単量体
HCRヘアピン	ヘアピン単量体
スプリットイニシエータープローブ対	分割イニシエータープローブ対
コグネイト標的部位	標的セクション
イニシエーター I 1	完全HCRイニシエーター
プローブ 1	第 1 分割イニシエータープローブ
プローブ 2	第 2 分割イニシエータープローブ
自動バックグラウンド抑制	能動的バックグラウンド抑制
標準プローブ	イニシエーター標識プローブ

10

20

30

40

50

【0065】

本明細書で使用する場合、「基質」は、1) 標識プローブの基質結合領域の結合部位として機能するヘアピン上の基質ドメイン（例えば、図 18 C、図 18 E、および図 36 A のドメイン「e」）、2) CARD 酵素によって媒介された沈着レポーターとなる CARD 基質（例えば、図 33 A～図 33 E、図 34 A～図 34 C、図 36 A～図 36 B）、を表す場合がある。混乱を避けるために、用法（2）基質は、その文脈のために、CARD という単語が「基質」に付けられるように、「CARD 基質」と表記されることが意図されている。

【0066】

本明細書で使用されている節の見出しは構成のみを目的としており、記載された発明の主題を何ら限定するものではないと解すべきである。特許、特許出願、記事、書物、論文、およびインターネットウェブページを含むがこれらに限定はされない、引用された、および／または本願における、全ての文献または類似の資料は、あらゆる目的でその全体が参照によって明示的に援用される。援用された参考文献における語の定義が、本教示において提供される定義と異なるように見える場合、本教示において提供される定義を優先するものとする。わずかで実質的ではない逸脱も本明細書の本教示の範囲内であるように、

本教示で論じられる温度、濃度、時間などの前に暗黙の「約」が存在することは理解されたい。本願では、特に記載のない限り、単数形の使用は複数形を含む。また、「を含む (comprise)」、「を含む (comprises)」、「を含むこと (comprising)」、「を含有する (contain)」、「を含有する (contains)」、「を含有すること (containing)」、「を包含する (include)」、「を包含する (includes)」、および「を包含すること (including)」の使用は、限定を意図するものではない。上記の概要と下記の詳細な説明は共に例示と説明のみを目的としており、限定するものではないことを理解されたい。特に記載がない限り、本明細書で使用される専門用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に共通に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、非特許文献 2；非特許文献 3 を参照されたい。上記の概要と下記の詳細な説明は共に例示と説明のみを目的としており、特許請求されているような本発明を限定するものではないことを理解されたい。本願では、特に記載のない限り、単数形の使用は複数形を含む。では本願、特に記載のない限り、「または」の使用は「および／または」を意味する。さらに、「含むこと (including)」という語、並びに「含む (includes)」および「含まれる (included)」などの他の形の使用は、非限定的である。また、特に記載のない限り、「要素 (element)」または「成分 (component)」などの語は、1つのユニットから構成される要素および成分と、2つ以上のサブユニットから構成される要素および成分の両方を包含する。また、「一部分 (portion)」という語の使用は、部分の一部または部分の全体を含むことがある。

10

20

【0067】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の図のいずれか1つまたは複数の任意選択の要素は、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の図のいずれか1つまたは複数の他の任意選択の工程と組み合わせることができる。

【0068】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の図によって異なるいずれか1つまたは複数の要素は、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の図によって異なるいずれか1つまたは複数の他の工程と組み合わせることができる。

【0069】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の図によって異なるいずれか1つまたは複数の任意選択の要素は、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の図によって異なるいずれか1つまたは複数の他の任意選択の工程と組み合わせることができる。

30

【0070】

「工程」という語は、発生する、および／または実行することができる、動作を表す。複数の「工程」は、一度に、または重なり合った期間に、および／または順次に、発生し得ることに留意されたい。特に記載がない限り（本開示の文脈から明示的にも暗示的にも）、全ての選択肢は本明細書が意図するものである。さらに、特に記載がない限り、工程は、異なる順序で行われ、または反復され、または追加の介在もしくは重複する工程が追加され得る。

40

【0071】

ハイブリダイゼーション連鎖反応を介した試料中の標的分子の分析

いくつかの実施形態では、1または複数の HCR イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数の イニシエーター標識プローブを含むプローブセットを用いて標的が検出される（例えば、図 39A～図 39N、図 42A～図 42F、および図 43A）。いくつかの実施形態では、1または複数のプローブユニットを含むプローブセット（例えば、図 8A～図 8B および図 16A～図 16D のプローブセットを参照）を用いて試料中の標的が検出され、ここで、上記プローブユニットは 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブを含み（例えば、図 3A～図 5E、および図 17A～図 17C のプローブユニットを参照）、各 HCR 分割イニシエータープローブは標的結合領域、および分割イニシエーター（例え

50

ば、図 1 2 および図 1 7 A～図 1 7 C の分割イニシエータープローブを参照)を含む。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の各プローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合することで、分割イニシエーターの共局在化が起こり、H C R ヘアピンにハイブリダイズして H C R シグナル増幅を惹起することが可能な完全 H C R イニシエーターを形成する(例えば、図 3 A～図 5 E、図 8 A～図 8 B、図 1 6 A～図 1 6 D、図 2 1 A～図 2 2、図 2 7、および図 3 8-1～図 3 8-2 の完全 H C R イニシエーターを参照)。

【0072】

いくつかの実施形態では、H C R シグナル増幅は、約 5 倍、約 1 0 倍、約 1 5 倍、約 2 0 倍、約 2 5 倍、約 3 0 倍、約 4 0 倍、約 5 0 倍、約 7 5 倍、約 1 0 0 倍、約 5 0 0 倍、約 1 0 0 0 倍、もしくは約 2 0 0 0 倍に、または上記値のいずれか 2 つによって規定される範囲を有する値だけ、試料から生じるバックグラウンドよりもシグナルを高めることで、分子検出およびイメージング応用のために、S B 比を増加する。

【0073】

いくつかの実施形態では、プローブユニット内の標的結合領域は、標的のオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域に結合するように構成される(例えば、図 8 A～図 8 B、図 2 1 A～図 2 1 B、図 2 2、および図 2 7 を参照)。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは、H C R ヘアピンのオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計される(例えば、図 8 A～図 8 B、図 2 1 A～図 2 2、図 2 7、および図 2 8 を参照)。試料中で非特異的に結合する個々のプローブは、共局在化による完全 H C R イニシエーターの形成を起こさず、H C R シグナル増幅を抑制する。H C R アンプリファイアは、2 個以上の H C R ヘアピンを含む(例えば、図 8 A～図 8 B、図 1 8 A～図 1 8 F、および図 1 9 A～図 1 9 B の H C R アンプリファイアを参照)。いくつかの実施形態では、各 H C R ヘアピンは、一本鎖トールド、およびシステム部を有するインプットドメイン、並びに、一本鎖ループ、および上記システム部に対する相補鎖を有するアウトプットドメインを含む(例えば、図 8 A～図 8 B、図 1 3、図 1 4、図 1 8 A～図 1 8 F、および図 1 9 A～図 1 9 B の H C R ヘアピンを参照)。いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブ上の 1 または複数の H C R イニシエーターは、それぞれ、イニシエーターが第 1 H C R ヘアピンのインプットドメインにハイブリダイズし、第 1 ヘアピンを開いてそのアウトプットドメインを露出させ、このアウトプットドメインが第 2 H C R ヘアピンのインプットドメインにハイブリダイズし、第 2 ヘアピンを開いてそのアウトプットドメインを露出させ、といった重合工程の連鎖反応を開始し、ヘアピンが重合して標的に係留された H C R 増幅重合体となる連鎖反応を起こす(例えば、図 1 3、図 1 4、図 1 9 A～図 1 9 B、図 2 9 A、図 3 0 A、図 3 3 A、図 3 3 C～図 3 3 E、図 3 4 A、および図 4 1 A の増幅重合体を参照)。完全 H C R イニシエーターの非存在下では、H C R ヘアピンは速度論的にトラップされて重合を起こさず、バックグラウンドを抑制する。しかし、プローブユニット内の分割イニシエータープローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合して、共局在化により完全 H C R イニシエーターを形成した場合、完全 H C R イニシエーターは、完全イニシエーターが第 1 H C R ヘアピンのインプットドメインにハイブリダイズし、第 1 ヘアピンを開いてそのアウトプットドメインを露出させ、このアウトプットドメインが第 2 H C R ヘアピンのインプットドメインにハイブリダイズし、第 2 ヘアピンを開いてそのアウトプットドメインを露出させ、といった重合工程の連鎖反応を開始し、ヘアピンが重合して標的に係留された H C R 増幅重合体となる連鎖反応を起こす(例えば、図 8 A、図 1 3、図 1 4、図 1 8 C～図 1 8 F、および図 1 9 A～図 1 9 B の増幅重合体を参照)。いくつかの実施形態では、H C R ヘアピンは、レポーターをそれぞれ含む、または、1 または複数のレポーターを含む標識プローブをリクルートする基質(または分割基質)をそれぞれ含む、1 または複数の標識をさらに含む(例えば、図 1 8 A～図 1 8 F のレポーター標識 H C R ヘアピン、基質標識 H C R ヘアピン、および分割基質標識 H C R ヘアピンを参照)。いくつかの実施形態では、H C R ヘアピン上の 0、1、または複数の基質は、触媒レポーター沈着(C

10

20

30

40

50

A R D) を介したシグナル増幅の追加層を媒介する働き (例えば、図 3 3 A ~ 図 3 3 E、図 3 4 A ~ 図 3 4 D、および図 3 7 を参照) をするハプテン (例えば、図 3 5 - 1 ~ 図 3 5 - 2 を参照) を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、標識プローブは、1 または複数のレポーターを含み、H C R ヘアピン上の基質に相補的な、または、H C R 増幅重合体内の共局在化された完全基質に相補的な、基質結合領域をさらに含む (例えば、図 2 0 A ~ 図 2 0 F および図 3 6 A ~ 図 3 6 B の標識プローブを参照)。いくつかの実施形態では、試料中の標的に係留された H C R 増幅重合体に結び付いた 1 または複数のレポーターによって、シグナルが生成される。いくつかの実施形態では、シグナルが上記試料から除去される (例えば、図 2 3 参照)。いくつかの実施形態では、H C R シグナルが、同じ試料から 1 回または複数回、生成、検出、除去される (例えば、図 2 3 A ~ 図 2 3 O および図 4 0 A ~ 図 4 0 N を参照)。

10

【0074】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される図のいずれかで提供される任意の 1 または複数の工程を組み合わせ、本明細書で提供される他の方法の 1 つにすることができる。本明細書で使用される場合、特に記載がない限り、一連の図の総称指示 (例えば、図 1 8) は、その数字の中に含まれる異なる図の全て (例えば、図 1 8 A ~ 図 1 8 F)、それぞれを一緒に組み合わせたもの、それらのうちの 1 もしくは複数、または選択的にそれぞれ、を表す。

【0075】

H C R イニシエーター

イニシエーター標識プローブは、H C R 重合カスケードを開始することが可能な 1 または複数の H C R イニシエーターを含む。いくつかの実施形態では、イニシエーターは、ヘアピンのインプットドメインにハイブリダイズしてヘアピンを開き、H C R 重合カスケードを開始するように、H C R ヘアピンのインプットドメインと完全に相補的である。いくつかの実施形態では、イニシエーターは、H C R ヘアピンのインプットドメインと部分的に相補的であるが、ヘアピンのインプットドメインにハイブリダイズしてヘアピンを開き、H C R 重合カスケードを開始するように、十分に相補的である。いくつかの実施形態では、イニシエーターは、H C R ヘアピンのインプットドメインよりも短いかまたは長く、且つ／または、ヘアピンのインプットドメインに対する相補性が不完全であるが、ヘアピンのインプットドメインにハイブリダイズし、ヘアピンを開いて H C R 重合カスケードを開始することができる。いくつかの実施形態では、H C R イニシエーターは、ヘアピンのインプットドメインにハイブリダイズしてヘアピンを開き、H C R 重合カスケードを開始するように、H C R ヘアピンのインプットドメインと 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、または 1 0 0 % の相補性を有し得る。状況によっては、1 または複数のイニシエーターを含むイニシエーター標識プローブは、イニシエーターが試料の表面付近に非特異的に結合することにより、試料内への浸透が低減し得る。状況によっては、1 または複数のイニシエーターを含むイニシエーター標識プローブは、イニシエーターが試料内の D N A、R N A、タンパク質、または他の分子に非特異的に結合することにより、バックグラウンドの増大を引き起こす場合がある。いくつかの実施形態では、試料内への浸透を増強するため (シグナルを増加するため)、且つ／または、試料内のプローブの非特異的結合を低減するため (バックグラウンドを低減するため)、イニシエーター標識プローブ上のイニシエーターを塩基対合によって遮蔽する (例えば、図 4 4 A ~ 図 4 4 Z、図 4 5 A ~ 図 4 5 B、および図 4 6 A ~ 図 4 6 M を参照)。いくつかの実施形態では、イニシエーターはヘアピン構造によって遮蔽することができる (例えば、図 4 4 A ~ 図 4 4 E、図 4 4 K ~ 図 4 4 L、図 4 4 O ~ 図 4 4 P、図 4 4 S ~ 図 4 4 T、図 4 4 W ~ 図 4 4 X、図 4 6 A ~ 図 4 6 E、および図 4 6 M)。いくつかの実施形態では、イニシエーターは 1 または複数の補助オリゴによって遮蔽することができる (例えば、図 4 4 F ~ 図 4 4 J、図 4 4 M ~ 図 4 4 N、図 4 4 Q ~ 図 4 4 R、図 4 4 U ~ 図 4 4 V、図 4 4 Y ~ 図 4 4 Z、図 4 6 F ~ 図 4 6 J)。いくつかの実施形態では、イニシエーターは、イニシエーターを含むオリゴ内の自己相補性、および／または 1 もしくは複数の補助鎖に対する相補性によって遮蔽するこ

20

30

40

50

とができる（例えば、図 4 4 A～図 4 4 Z および 図 4 6 A～図 4 6 M）。

【0076】

HCR 分割イニシエータープローブを用いた自動バックグラウンド抑制

いくつかの実施形態では、HCR イニシエーター（I 1 または I 2）が一对のプローブに分割されることから（例えば、図 8 および 図 1 2 参照）、分割イニシエータープローブはバックグラウンドを自動的に抑制する。いくつかの実施形態では、プローブが近接したコグネイト結合部位において標的に特異的に結合する場合、標的は、プローブ対内の 2 つのプローブを共局在化させて、完全 HCR イニシエーターを形成する。いくつかの実施形態では、非特異的に結合する個々のプローブは HCR を惹起せず、これは、各プローブが HCR イニシエーターの一部だけしか有しておらず、完全 HCR イニシエーターが共局在化されない限り、HCR シグナル増幅が惹起されないためである。

10

【0077】

HCR ヘアピンを用いた自動バックグラウンド抑制

いくつかの実施形態では、HCR ヘアピンが速度論的にトラップされているために、HCR イニシエーター（I 1 または I 2）の非存在下では重合しないことから、HCR ヘアピンはバックグラウンドを自動的に抑制する。いくつかの実施形態では、分割イニシエータープローブ対内のプローブの両方が、標的上の近接したコグネイトな結合部位に特異的に結合する場合、得られる共局在化完全 HCR イニシエーター（I 1 または I 2）が係留された HCR 増幅重合体の成長を惹起する（例えば、図 8 参照）。試料内で非特異的に結合する個々の HCR ヘアピンは、速度論的にトラップされるため、HCR を惹起しない。

20

【0078】

HCR 分割イニシエータープローブおよび HCR ヘアピンを用いた自動バックグラウンド抑制

標的検出用の HCR 分割イニシエータープローブと、シグナル増幅用の HCR 増幅ヘアピンとを組み合わせることで、プロトコルを通して自動バックグラウンド抑制が可能となり、試薬が、試料内で非特異的に結合する場合あっても、バックグラウンドの増幅を起さなくなる。

【0079】

2 またはそれ以上の分割イニシエータープローブに分割された完全 HCR イニシエーター

30

各分割イニシエータープローブセットがプローブユニットとして完全 HCR イニシエーターを生成すると述べている（例えば、図 1 7 参照）。いくつかの実施形態では、完全 HCR イニシエーター（I 1 または I 2）が、一緒になって完全 HCR イニシエーターを構成するように（ $f_1 + f_2 = 1$ となるような、プローブ P 1 に対するフラクション f_1 と、プローブ P 2 に対するフラクション f_2 ）、完全 HCR イニシエーターの一部をそれぞれ有する分割イニシエータープローブ対によって生成され；この場合、プローブユニットは 2 つの分割イニシエータープローブである（例えば、図 1 7 A 参照）。完全 HCR イニシエーターが標的によって共局在化していない場合は HCR シグナル増幅が抑制されるように、フラクション f_1 およびフラクション f_2 は完全 HCR イニシエーターと比較して十分に小さい（例えば、 $f_1 = 0.5$ 、 $f_2 = 0.5$ ；または $f_1 = 0.45$ 、 $f_2 = 0.55$ ；または $f_1 = 0.4$ 、 $f_2 = 0.6$ ）。

40

【0080】

いくつかの実施形態では、HCR イニシエーター（I 1 または I 2）は、3 つの分割イニシエータープローブ（ $f_1 + f_2 + f_3 = 1$ となるような、プローブ P 1 に対してフラクション f_1 、プローブ P 2 に対してフラクション f_2 、プローブ 3 に対してフラクション f_3 ）に分割され；この場合、プローブユニットは 3 つの分割イニシエータープローブからなる。いくつかの実施形態では、HCR イニシエーター（I 1 または I 2）は、N 個の分割イニシエータープローブに分割され（ $f_1 + f_2 + \dots + f_N = 1$ となるような、プローブ P 1 に対してフラクション f_1 、プローブ P 2 に対してフラクション f_2 、 $\dots$ 、プローブ P N に対してフラクション f_N ；例えば、図 1 7 B 参照）、 $N = 2, 3, 4$

50

、またはそれ以上であり；この場合、プローブユニットはN個の分割イニシエータープローブからなる。これらのNの値がいずれの場合でも、完全HCRイニシエーターが標的に
よって共局在化していないなら、HCRシグナル増幅は抑制される。

【0081】

いくつかの実施形態では、プローブ対が標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合
することから得られた共局在化完全イニシエーターによってHCRシグナル増幅が惹起さ
れるように、プローブP1に対してのフラクションf1とプローブP2に対してのフラク
ションf2の合計($f1 + f2$)が1に十分に近い(例えば、 $f1 = 0.47$ 、 $f2 = 0.47$ 、 $f1 + f2 = 0.94$)ように、HCRイニシエーターの一部分をそれぞれ有す
るプローブ対(またはセット)によって完全HCRイニシエーターが生成される。いくつ
かの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエータープローブは、100%のH
CRイニシエーターに相当する完全HCRイニシエーターを生成する。いくつかの実施形
態では、プローブユニット内の分割イニシエータープローブは、分割イニシエータープロ
ーブが存在しない場合や、個々の分割イニシエータープローブは存在しているが、標的に
よって共局在化していない場合のシグナル増幅の速度と比較して、効率的なHCRシグナル
増幅を提供するのに十分な割合のHCRイニシエーターを生成する。いくつかの実施形
態では、プローブユニット内の共局在化したプローブによって生成される完全HCRイニ
シエーターの割合は、99%、95%、90%、80%、または60%であり、上記値の
いずれか1つを超える、または上記値のいずれか2つの間に規定される任意の範囲の完全
HCRイニシエーターを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニットは、2個、3
個、4個、5個、またはそれ以上の分割イニシエータープローブを含む。いくつかの実施
形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは、プローブユニット内のプローブ
が標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合することで共局在化した場合に、HCR
イニシエーターとして機能的であるのに十分となる。いくつかの実施形態では、HCRイ
ニシエーターは特定の長さ(例えば、15ヌクレオチド)の配列を有し得るが、プローブ
ユニット内の分割イニシエーターは全く同じ長さである必要はない。例えば、いくつか
の実施形態では、共局在化したときも、HCRイニシエーターとして機能する場合、分割イ
ニシエーターの組み合わせ後の長さは、14または13ヌクレオチドであり得る。

【0082】

いくつかの実施形態では、一緒になってHCRイニシエーターの機能を果たす限り、任
意の2個以上の分割イニシエーターを使用することができる。

【0083】

いくつかの実施形態では、プローブ対が標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合
することから得られた共局在化完全イニシエーターによってHCRシグナル増幅が惹起さ
れるように、プローブP1に対してのフラクションf1とプローブP2に対してのフラク
ションf2の合計($f1 + f2$)が1に十分に近い(例えば、 $f1 = 0.45$ 、 $f2 = 0.47$ 、 $f1 + f2 = 0.92$)ように、HCRイニシエーターの一部分をそれぞれ有し
、1または少数(a few)またはそれより多数個(several)の配列改変を
さらに含む、プローブ対によって完全HCRイニシエーターが生成される。いくつかの実
施形態では、プローブユニット内の分割イニシエータープローブは、HCRイニシエーター
と100%の配列同一性を有する完全HCRイニシエーターを生成する。いくつかの実
施形態では、プローブユニット内の分割イニシエータープローブは、分割イニシエーター
プローブが存在しない場合や、個々の分割イニシエータープローブは存在しているが、標
的によって共局在化していない場合のシグナル増幅の速度と比較して、効率的なHCRシ
グナル増幅を可能にするのに十分な、HCRイニシエーターに対する配列同一性を生成す
る。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の共局在化したプローブによって生成
される完全HCRイニシエーターは、HCRイニシエーターと99%、95%、90%、
80%、または60%の配列同一性を有し、上記値のいずれか1つを超える、または上記
値のいずれか2つの間に規定される任意の範囲を含む。

【0084】

S B 比を増強するための大型プローブセットの使用

シグナルはプローブユニットの数に伴い単調に増加するため、いくつかの実施形態では、1 標的分子当たり生成されるシグナルの数を増加させるために、標的の長さが許す場合（例えば、mRNA 標的、lncRNA 標的、gDNA 標的）に、複数のプローブユニットを含む大型プローブセットを使用することが有利である。自動的なバックグラウンド抑制によって、標的に特異的に結合するプローブユニットだけが HCR シグナル増幅を惹起するようになっているため、非特異的に結合するプローブを除去するためにプローブセット内の個々のプローブを検査することは通常は不要である。結果として、自動バックグラウンド抑制は、新規の標的に新規のプローブセットを用いる場合にプローブセットを最適化する必要性を除去することによって、使いやすさを増大する。シグナルがプローブセットのサイズに伴って単調増加し、バックグラウンドが全てのプローブ対において自動的に抑制されることから、S B 比を増加するためには、プローブセットのサイズを増加させることが通常は有利である。プローブセットは、2 個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットを含む（例えば、図 8 および図 16 を参照）。例えば、プローブセット中のプローブユニットの数は、1 ~ 1000、または 10 ~ 100、または 20 ~ 50、または 30 ~ 40 の範囲内とすることができる。プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B 比を 2 倍、または 5 倍、または 10 倍、または 100 倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のプローブユニットの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B 比を、2、または 5、または 10、または 50、または 100、または 200、または 500、または 1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

10

20

30

40

50

【0085】

試料中のトランスクリプトームおよび／またはゲノムによって限定されるプローブセットのサイズ

場合によっては、試料中の 1 つの標的を、配列的に近縁の試料中の 1 または複数の他の標的と区別することが望ましいことがある。例えば：1) 生物内の標的 mRNA が、当該生物内の別の mRNA に類似した配列を有している場合があり、当該標的 mRNA が他のスプライスバリエーションと区別する必要がある 1 つのスプライスバリエーションである可能性も含まれ、2) 標的 mRNA が、当該生物のトランスクリプトーム中の 1 または複数の他の RNA に対する配列類似性をそれぞれ有する複数の領域を含む場合があり、3) 標的 mRNA が別の種のトランスクリプトーム中の 1 または複数の RNA と配列的に類似した領域を有するように、ある生物に含まれる標的 mRNA が複数の試料中に存在している場合があり、4) ある生物内に含まれる標的 rRNA または gDNA が、試料中に含まれる他の生物内の rRNA または gDNA と配列的に類似している場合がある。標的核酸と、試料中に存在する他の全ての核酸とを区別する 1 つの方法は、試料中に存在するトランスクリプトームおよび／またはゲノムと比較して、標的核酸に対して選択的であるプローブ対のみを含む、標的核酸に対するプローブセットを設計することである。場合によっては、この選択性の必要条件がプローブセットのサイズを大きく制限する可能性がある。例えば、標的核酸の配列が試料中の 1 または複数の他の核酸に非常に類似しているため、プローブセットが 1 つの分割イニシエータープローブ対しか含まない場合がある。

【0086】

複数の分割イニシエータープローブ対を含むプローブセットを用いた協同的標的結合

標的核酸（例えば、RNA または DNA）と結合するプローブは、エネルギー的に、標的核酸内のネイティブな二次構造（すなわち、塩基対合しているもの）と競合する。例えば、単一のプローブは、主に標的内の別のドメインに塩基対合している標的核酸内のドメインには結合できない可能性がある。所与のプローブの結合効率は、プローブがコグネイトなプローブ結合部位に結合している標的分子の割合であり、ターゲットである上記部分のアクセス性、および、プローブとそのコグネイトなプローブ結合部位との間の親和性の程度などの要因によって、0 から 1 の間で変動する。複数の分割イニシエータープローブ

対を含むプローブセットを用いると、1つのプローブの標的に対する結合が、1または複数のその他のプローブの当該標的に対する結合効率を向上させ、プローブセット内のプローブが集団的に当該プローブセット内の他のプローブの結合効率を向上させる協同効果が得られる可能性がある。これにより、N個のプローブを含むプローブセットと比較して、N+M個のプローブを含むプローブセットは、より多くのシグナルを生成することができ、これは、M個の新規プローブがシグナルを生成するからだけでなく、N個の元々のプローブが標的に対してより高い結合効率を有することとなって、平均して1標的分子当たりでより多くのシグナルを生成するからでもある。

【0087】

ヘルパープローブを用いたシグナルの増加

10

1または複数のトランスクリプトームおよび／またはゲノムが試料中に存在するという状況の中では、標的核酸に対する選択性を維持するために、プローブセットサイズは、1個以下のプローブユニット、または2個以下のプローブユニット、またはN個以下のプローブユニットとなるように制限される場合があり、ここで、Nは、感度の配慮および／または標的核酸の長さに基づいて優先的に使用される、プローブユニット数N+Mよりも少ない。プローブセットのサイズが選択性の配慮によって制限されるこのシナリオにおいては、プローブセットがHCRシグナル増幅を惹起するためにM個より少ない完全イニシエーターを生成する可能性があるためと、M個の追加のプローブユニットがない場合、協同効果により、N個の残りのプローブユニットの結合効率が低下する可能性があるために、N+M個のプローブユニットを用いて同一標的を検出した場合と比べて、生成されるシグナルの量は少なくなる可能性がある。

20

【0088】

いくつかの実施形態では、プローブは、シグナルプローブとして分割イニシエーターを有する（例えば、図16A参照）。いくつかの実施形態では、プローブは、ヘルパープローブとして分割イニシエーターを有さない。選択性を減らさずにシグナルを増やすために、N個のプローブユニットを含むプローブセットを、M個のヘルパープローブで増強することができる（例えば、図16D参照）。

【0089】

例えば：1）固有のスプライスジャンクションを有する標的RNAを検出するために、プローブセットに、当該スプライスジャンクションに跨る標的に結合する1個のプローブユニットを含ませ、さらに、標的RNAの他の場所に結合して協同的にプローブユニットの結合効率を向上させる30個（または任意の数の）ヘルパープローブを含ませることで、選択性を減らさずにシグナルを増やすことができ；2）選択性の配慮からプローブセットが5個のプローブユニットを含むこととなる標的RNAまたは標的DNAを検出するために、プローブセットは45個のヘルパープローブをさらに含むことができ；3）選択性の配慮からプローブセットがN個のプローブユニット（Nは40個未満）を含むこととなる標的RNAまたは標的DNAを検出するために、プローブセットは40-N個のヘルパープローブをさらに含むことができ；4）選択性の配慮からプローブセットがN個のプローブユニットを含むこととなり、標的核酸の長さによりプローブの総数が2N+M個に制限される標的核酸を検出するために、プローブセットはM個のヘルパープローブをさらに含むことができる。

30

40

【0090】

いくつかの実施形態では、ヘルパープローブは、同じ標的核酸に対するシグナルプローブを設計するのに用いられたものよりも、選択性要件の厳密性を少なくして、標的核酸用に設計されることとなる。いくつかの実施形態では、ヘルパープローブは、試料中に存在するトランスクリプトームおよび／またはゲノム中の他のオフターゲット核酸に対して同等の選択性を有する場合であっても、標的核酸に対して使用されることとなる。いくつかの実施形態では、シグナルプローブ上の標的結合領域は、ヘルパープローブ上の標的結合領域と同じ長さである。いくつかの実施形態では、シグナルプローブ上の標的結合領域は、ヘルパープローブ上の標的結合領域よりも短いかまたは長い。いくつかの実施形態では

50

、標的結合領域は、異なるシグナルプローブおよび／またはヘルパープローブごとに、ある長さ（ヌクレオチド数）の範囲にわたって、変わる場合がある。いくつかの実施形態では、シグナルプローブと標的核酸との間の親和性は、ヘルパープローブと標的核酸との間の親和性と同等である。いくつかの実施形態では、シグナルプローブと標的核酸との間の親和性は、ヘルパープローブと標的核酸との間の親和性よりも、低いかまたは高い。

【0091】

1個または2個の分割イニシエーターを有するシグナルプローブを用いたシグナルの増加

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、一緒になって完全HCRイニシエーターを形成する2個の分割イニシエータープローブ（ $f_1 + f_2 = 1$ となるような、プローブP1に対するフラクション f_1 と、プローブP2に対するフラクション f_2 ）を含む。この状況において、各プローブは1つのプローブユニットに参加している。プローブユニット内の両方のプローブが所与の標的RNA分子に結合した場合、1つの完全HCRイニシエーターを生成し、プローブユニットに係留された1つのHCR増幅重合体を成長する。標的RNAの長さが、プローブセットのサイズを、 $2N$ 個のシグナルプローブに相当する N 個のプローブユニットとなるように制限する状況について考える。各シグナルプローブが1つのみのプローブユニットに参加している場合では、完全HCRイニシエーターの最大数は、標的mRNAがプローブセット内のシグナルプローブの全てに結合される場合に相当して、 N 個となる。これにより、標的RNAに係留されたHCR重合体の最大数は、 N 個となる。1標的分子当たりのシグナルを増加するために、今度は、プローブユニットが異なる2つとなることに寄与する、プローブが2個の分割イニシエーターを持つことができる場合を考える（例えば、図16C参照）。いくつかの実施形態では、以下の3つの可能性が企図される：

1. $2N$ 個全てのシグナルプローブが標的RNA中の近接する部分配列にハイブリダイズする実施形態では、標的の5'末端および3'末端におけるシグナルプローブはそれぞれ1個の隣接シグナルプローブを有し、間にある他の全てのシグナルプローブは2個の隣接シグナルプローブを有する。このシナリオでは、5'末端シグナルプローブおよび3'末端シグナルプローブ以外の各プローブが、プローブユニットが異なる2つとなることに寄与する2個の分割イニシエーターを持つ場合、プローブユニットの総数は、 N 個から $(2N - 1)$ 個に増加する。結果として、完全HCRイニシエーターの最大数は N 個から $(2N - 1)$ に増加し、標的RNAに係留されたHCR重合体の総数は N 個から $(2N - 1)$ 個に増加する。これにより、各シグナルプローブが1個の分割イニシエーターを持つ場合と比べて、1標的分子当たりに生成されるシグナルが増加する。

2. 別の実施形態では、試料中に存在するトランスクリプトームおよび／またはゲノムに起因する選択性の配慮から、プローブセットは、 $2N$ 個のシグナルプローブと、標的核酸中でプローブユニットが互いに近接しない N 個のプローブユニットとを含むことになり得る。このシナリオでは、各シグナルプローブは1個のみの分割イニシエーターを持ち、プローブユニットが1個のみとなることに寄与するため、完全HCRイニシエーターの最大数は N 個となり、係留されたHCR増幅重合体の最大数は N 個となる。

3. 別の実施形態では、中間の場合であるが、一部のシグナルプローブが2個以上の隣接シグナルプローブの近位であるため、 $2N$ 個のシグナルプローブは、 N と $2N - 1$ の中間の数のプローブユニットに参加することとなる。例えば、 $2N$ 個のシグナルプローブがあり、そのうちの M 個が標的の1つの部分に敷き詰められ（これらのシグナルプローブのうちの5'シグナルプローブおよび3'シグナルプローブは、1個の分割イニシエーターを有し、プローブユニットを1個にならしめ、その他の $M - 2$ 個のシグナルプローブは、2個の分割イニシエーターを有し、プローブユニットを2個にならしめる）、その他の L 個のプローブ（ $2N = M + L$ で L は偶数）がそれぞれ2つ1組で標的に結合し、各シグナルプローブが1つのみの他のシグナルプローブと近位である場合（ L 個のシグナルプローブのそれぞれは1個の分割イニシエーターを有し、プローブユニットを1個にならしめる）、プローブユニットの総数は、 $M - 1 + L / 2$ 個となり、 N と $2N - 1$ の間である。例

例えば、40個のシグナルプローブがあり（すなわち、 $N = 20$ ）、そのうちの20個が標的に近接して敷き詰められ（すなわち、 $M = 20$ ）、他の20個が近接対として標的に結合する（すなわち、 $L = 20$ ）場合、プローブユニットの総数は、 $M - 1 + L / 2 = 20 - 1 + 20 / 2 = 29$ となる。

【0092】

プローブユニットが3個以上のシグナルプローブ、例えば、3個のシグナルプローブ、または4個以上のシグナルプローブを含む、関連した場合には、2個の分割イニシエーターを含み、2個のプローブユニットに参加する（1プローブユニット当たり1個の分割イニシエーター）いくつかのプローブを使用することで、シグナルプローブの数を増やすことなく、プローブユニットの数を増やすことができる。

10

【0093】

2個のヘアピンを有するHCRアンプリファイア

いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアは、2個のヘアピン（H1およびH2；例えば、図8および図18を参照）を含む。いくつかの実施形態では、各ヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を有するインプットドメイン、並びに、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を有するアウトプットドメインを含む。HCRイニシエーター（I1またはI2）が存在しないと、ヘアピンH1およびヘアピンH2は準安定的に共存し、すなわち、速度論的にトラップされて重合しない。

【0094】

完全イニシエーターI1による開始

20

いくつかの実施形態では、イニシエーターI1は、ヘアピンH1のトーホールドに対して相補的なドメイン、およびH1のステム部に対して相補的なドメインを含む。H1ヘアピンが完全イニシエーターI1と出会った場合、完全イニシエーターI1はトーホールドを介した鎖置換によりヘアピンH1のインプットドメインにハイブリダイズし、ヘアピンH1を開いてヘアピンH1のアウトプットドメインを露出させ、複合体I1-H1を形成する。ヘアピンH1のアウトプットドメインは、ヘアピンH2のトーホールドに対して相補的なドメイン、およびH2のステム部に対して相補的なドメインを含む。H2ヘアピンがI1-H1複合体と出会った場合、H1の露出したアウトプットドメインがトーホールドを介した鎖置換によりヘアピンH2のインプットドメインにハイブリダイズし、ヘアピンH2を開いてヘアピンH2のアウトプットドメインを露出させ、複合体I1-H1-H2を形成する。ヘアピンH2のアウトプットドメインは、ヘアピンH1のトーホールドに対して相補的なドメイン、およびH1のステム部に対して相補的なドメインを含む。H1ヘアピンがI1-H1-H2複合体と出会った場合、H2の露出したアウトプットドメインがトーホールドを介した鎖置換によりヘアピンH1のインプットドメインにハイブリダイズし、ヘアピンH1を開いてヘアピンH1のアウトプットドメインを露出させ、複合体I1-H1-H2-H1を形成する。この重合プロセスは、H1重合工程とH2重合工程を交互に反復することで、I1-H1-H2-H1-H2-H1-H2-...という形態の重合体を生成でき、ヘアピンH1およびヘアピンH2の交互コピーをN個組み込んだ重合体の場合、 $I1 - (H1 - H2)_N$ と表すことができる。例えば、重合体は、数個のH1分子およびH2分子、または数十のH1分子およびH2分子、または数百のH1分子およびH2分子、または数千のH1分子およびH2分子、または数万のH1分子およびH2分子、またはそれ以上を組み込んでいる場合がある。重合体が、H1またはH2のいずれかで終わることも可能であるため、 $I1 - (H1 - H2)_N - H1$ および $I1 - (H1 - H2)_N - H1 - H2$ は共に可能であり、後者は $I1 - (H1 - H2)_{N+1}$ と等しい。

30

40

【0095】

完全イニシエーターI2による開始

いくつかの実施形態では、イニシエーターI2は、ヘアピンH2のトーホールドに対して相補的なドメイン、およびH2のステム部に対して相補的なドメインを含む。H2ヘアピンが完全イニシエーターI2と出会った場合、完全イニシエーターI2はトーホールドを介した鎖置換によりヘアピンH2のインプットドメインにハイブリダイズし、ヘアピン

50

H 2 を開いてヘアピン H 2 のアウトプットドメインを露出させ、複合体 I 2 - H 2 を形成する。H 1 ヘアピンが I 2 - H 2 複合体と出会った場合、H 2 の露出したアウトプットドメインがトーホールドを介した鎖置換によりヘアピン H 1 のインプットドメインにハイブリダイズし、ヘアピン H 1 を開いてヘアピン H 1 のアウトプットドメインを露出させ、複合体 I 2 - H 2 - H 1 を形成する。H 2 ヘアピンが I 2 - H 2 - H 1 複合体と出会った場合、H 1 の露出したアウトプットドメインがトーホールドを介した鎖置換によりヘアピン H 2 のインプットドメインにハイブリダイズし、ヘアピン H 2 を開いてヘアピン H 2 のアウトプットドメインを露出させ、複合体 I 2 - H 2 - H 1 - H 2 を形成する。この重合プロセスは、H 1 重合工程と H 2 重合工程を交互に反復することで、I 2 - H 2 - H 1 - H 2 - H 1 - H 2 - H 1 ... という形態の重合体を生成でき、H 2 および H 1 の交互コピーを N 個組み込んだ重合体の場合、 $I 2 - (H 2 - H 1)_N$ と表すことができる。例えば、重合体は、数個の H 1 分子および H 2 分子、または数十の H 1 分子および H 2 分子、または数百の H 1 分子および H 2 分子、または数千の H 1 分子および H 2 分子、または数万の H 1 分子および H 2 分子、またはそれ以上を組み込んでいる場合がある。重合体が、H 1 または H 2 のいずれかで終わることも可能であるため、 $I 2 - (H 2 - H 1)_N - H 2$ および $I 2 - (H 2 - H 1)_N - H 2 - H 1$ は共に可能であり、後者は $I 2 - (H 2 - H 1)_{N+1}$ と等しい。

10

【0096】

4 個のヘアピンを有する HCR アンプリファイア

いくつかの実施形態では、HCR アンプリファイアは、2 個を超えるヘアピンを含むことができる。例えば、HCR アンプリファイアは、4 個のヘアピン H 1、H 2、H 3、H 4 を含む場合がある（例えば、図 19 参照）。2 ヘアピン型 HCR の場合と同様に、各ヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を有するインプットドメイン、並びに、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を有するアウトプットドメインを含む。HCR イニシエーター（I 1、I 2、I 3、または I 4）が存在しないと、ヘアピン H 1、H 2、H 3、H 4 は準安定的に共存し、すなわち、速度論的にトラップされて重合しない。ヘアピン H 1 のアウトプットドメインは、ヘアピン H 2 のトーホールドに対して相補的なドメイン、および H 2 のステム部に対して相補的なドメインを含む。ヘアピン H 2 のアウトプットドメインは、ヘアピン H 3 のトーホールドに対して相補的なドメイン、および H 3 のステム部に対して相補的なドメインを含む。ヘアピン H 3 のアウトプットドメインは、ヘアピン H 4 のトーホールドに対して相補的なドメイン、および H 4 のステム部に対して相補的なドメインを含む。ヘアピン H 4 のアウトプットドメインは、ヘアピン H 1 のトーホールドに対して相補的なドメイン、および H 1 のステム部に対して相補的なドメインを含む。イニシエーター I 1 は、ヘアピン H 1 のトーホールドに対して相補的なドメイン、および H 1 のステム部に対して相補的なドメインを含む。イニシエーター I 2 は、ヘアピン H 2 のトーホールドに対して相補的なドメイン、および H 2 のステム部に対して相補的なドメインを含む。イニシエーター I 3 は、ヘアピン H 3 のトーホールドに対して相補的なドメイン、および H 3 のステム部に対して相補的なドメインを含む。イニシエーター I 4 は、ヘアピン H 4 のトーホールドに対して相補的なドメイン、および H 4 のステム部に対して相補的なドメインを含む。2 ヘアピン型 HCR の場合と似て、ヘアピン H 1 が完全 HCR イニシエーター I 1 と出会うと、完全イニシエーター I 1 がヘアピン H 1 を開いて、H 1 アウトプットドメインが露出した複合体 I 1 - H 1 を形成し、この H 1 アウトプットドメインがヘアピン H 2 を開いて、H 2 アウトプットドメインが露出した複合体 I 1 - H 1 - H 2 を形成し、この H 2 アウトプットドメインがヘアピン H 3 を開いて、アウトプットドメインを露出させ、H 3 アウトプットドメインが露出した複合体 I 1 - H 1 - H 2 - H 3 を形成し、この H 3 アウトプットドメインがヘアピン H 4 を開いて、H 4 アウトプットドメインが露出した複合体 I 1 - H 1 - H 2 - H 3 - H 4 を形成し、この H 4 アウトプットドメインがヘアピン H 1 を開いて、H 1 アウトプットドメインが露出した複合体 I 1 - H 1 - H 2 - H 3 - H 4 - H 1 を形成する、などによって、H 1、H 2、H 3、および H 4 の交互重合工程を介した重合が起こり、 $I 1 - H 1 - H 2 - H 3 - H 4 -$

20

30

40

50

H 1 - H 2 - H 3 - H 4 - H 1 - H 2 - H 3 - H 4 ... という形態の重合体が生成され、H 1、H 2、H 3、および H 4 の交互コピーを N 個組み込んだ重合体の場合は、 $I 1 - (H 1 - H 2 - H 3 - H 4)_N$ と表すことができる。重合体が、H 1、H 2、H 3、または H 4 で終わることも可能であるため、 $I 1 - (H 1 - H 2 - H 3 - H 4)_N - H 1$ 、 $I 1 - (H 1 - H 2 - H 3 - H 4)_N - H 1 - H 2$ 、 $I 1 - (H 1 - H 2 - H 3 - H 4)_N - H 1 - H 2 - H 3$ 、および $I 1 - (H 1 - H 2 - H 3 - H 4)_N - H 1 - H 2 - H 3 - H 4$ は全て可能であり、最後は $I 1 - (H 1 - H 2 - H 3 - H 4)_{N+1}$ と等しい。H C R 重合は、コグネイトな完全イニシエーター (I 1、I 2、I 3、または I 4) のいずれかによって惹起されることが可能である。例えば、完全イニシエーター I 3 によるイニシエーターであれば、 $I 3 - (H 3 - H 4 - H 1 - H 2)_N$ という形態の重合体を生成することができる。4 個のヘアピンを有する H C R アンプリファイアは、単量体状態では存在せず、重合体状態では存在するシグナルを生成する場合に好都合である (例えば、図 19 B は、ヘアピンが増幅重合体内で共局在した場合だけ、共局在化により F R E T シグナルを生成する F R E T 対を図示しており、試料から洗浄除去されない未使用ヘアピンは F R E T に参加することはなく、従ってバックグラウンドの生成が回避されるため、無洗浄法の基礎を提供するものである)。

10

【0097】

2 個以上のヘアピンを有する H C R アンプリファイア

より一般化すると、いくつかの実施形態では、H C R アンプリファイアは、M 個の H C R ヘアピン (H 1、H 2、...、H M) を含んでもよく、M は 2 以上の整数である。H C R イニシエーター (I 1、I 2、...、I M) が存在しないと、ヘアピン H 1、H 2、...、H M は準安定的に共存し、すなわち、速度論的にトラップされて重合しない。コグネイトな完全 H C R イニシエーターが存在すると、2 ヘアピン型または 4 ヘアピン型の H C R に類似した交互重合工程を介して重合が生じる。例えば、イニシエーター I 1 は、H 1、H 2、...、H M の交互コピーを N 個組み込んだ重合体の場合、 $I 1 - (H 1 - H 2 - \dots - H M)_N$ という形態の重合体の成長をもたらす。重合体が、H 1、H 2、...、H M で終わることも可能であるため、 $I 1 - (H 1 - H 2 - \dots - H M)_N - H 1$ 、 $I 1 - (H 1 - H 2 - \dots - H M)_N - H 1 - H 2$ 、...、および $I 1 - (H 1 - H 2 - \dots - H M)_N - H 1 - H 2 - \dots - H M$ は全て可能であり、最後は $I 1 - (H 1 - H 2 - \dots - H M)_{N+1}$ と等しい。H C R 重合は、コグネイトな完全イニシエーター (I 1、I 2、...、I M) のいずれかによって惹起されることが可能である。例えば、完全イニシエーター I 3 によるイニシエーターであれば、 $I 3 - (H 3 - \dots - H M - H 1 - H 2)_N$ という形態の重合体を生成することができる。

20

30

【0098】

H C R ヘアピン 標識

所与の H C R アンプリファイアにおいて、各 H C R ヘアピンは 0 個、1 個、または複数個の標識を含む。アンプリファイア内の異なるヘアピン上の標識は、同じであっても異なってもよい。例えば、ヘアピン H 1 および H 2 を含むアンプリファイアは、以下の場合が考えられる：1) H 1 上および H 2 上に同じ標識を有する、2) H 1 上および H 2 上に異なる標識を有する、3) H 1 上に標識を有するが、H 2 上には標識を有さない、4) H 2 上に標識を有するが、H 1 上には標識を有さない、5) H 1 上にも H 2 上にも標識を有さない、6) H 1 上に 0 個、1 個、または複数個の標識を有し、そのうちの 0 個、1 個、または複数個は、H 2 上の 0 個、1 個、または複数個の標識と同じであっても異なってもよい。同様に、ヘアピン H 1、H 2、H 3、H 4 を含む H C R アンプリファイアの場合、各ヘアピンは、0 個、1 個、または複数個の標識 (例えば 3 個、5 個、または 10 個の標識) を含んでもよく、そのうちの 0 個、1 個、または複数個は、その他の各ヘアピン上の 0 個、1 個、または複数個の標識と同じであってもよい。いくつかの実施形態では、所与のヘアピンの標識の 1 または複数は、ヘアピンおよび/またはヘアピン標識の混合物中で固有のものとすることができる。いくつかの実施形態では、混合物中には 1 個、10 個、100 個、1000 個、10,000 個、100,000 個、またはそれ以上

40

50

の固有の標識が存在する（上記数値のうちの任意の２つの間と規定される任意の範囲を含む）。

【００９９】

レポーターとしてのＨＣＲヘアピン標識

いくつかの実施形態では、ＨＣＲヘアピン標識は、例えば、シグナルを生成することによって、シグナルを変化させることによって、または、シグナルを除去することによって、シグナルの測定を容易にするレポーター分子を含んでいてもよい。

例えば、レポーターは、フルオロフォア、発色団、発光団、蛍光体、ＦＲＥＴ対、いくつかのＦＲＥＴ対、クエンチャー、フルオロフォア／クエンチャー対、希土類元素または化合物、放射性分子、磁性分子、またはシグナルの測定を促す任意の他の分子とすることができる。

【０１００】

基質としてのＨＣＲヘアピン標識

いくつかの実施形態では、ＨＣＲヘアピン標識は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介するレポーター体をリクルートする働きをする基質を含んでいてもよい。

例えば：

１．ヘアピン標識は、上記レポーター体として、１または複数のレポーターで、または、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介する働きをする１または複数の基質もしくはレポーター体で、直接標識されている抗ＤＩＧ抗体をリクルートする、ジゴキシゲニン（ＤＩＧ）を含むことができる。

２．ヘアピン標識は、１または複数のレポーターを有する標識プローブ内のドメインに対し完全または部分配列相補性を有する基質として働く核酸ドメインを含むことができる（例えば、図１８Ｃ）。

３．ヘアピン標識は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を媒介する働きをする１または複数の基質を有する、標識プローブ内のドメインに対し完全または部分配列相補性を有する基質として働く、核酸ドメインを含むことができる。

４．ヘアピン標識は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介するレポーター体に対する基質として働く核酸ドメインを含むことができる。

５．ヘアピン標識は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を間接的に媒介するレポーター体をリクルートする働きをする基質を含むことができる。

６．ヘアピン標識は、ヘアピン標識付近における触媒レポーター沈着（ＣＡＲＤ）を媒介する酵素を含むレポーター体をリクルートする働きをする基質を含むことができる（例えば、図３６Ａ）。

７．ヘアピン標識は、上記レポーター体として、１または複数のレポーターで、または、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介する働きをする１または複数の基質もしくはレポーター体で、直接標識されているストレプトアビジンをリクルートする、ビオチンを含むことができる。

８．ヘアピン標識は、ＣＡＲＤシグナル増幅を介したヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介する抗ハプテン抗体または抗ハプテンナノボディをリクルートするハプテンを含むことができる。例えば、抗ハプテン抗体またはナノボディは、ＣＡＲＤを媒介する酵素であるレポーター体を含んでいてもよい（例えば、図３３Ａ～図３３Ｅ）。

９．ヘアピン標識は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介する抗ハプテンをリクルートするハプテンを含むことができる。例えば、抗ハプテンは、ＣＡＲＤを媒介する酵素であるレポーター体を含んでいてもよい（例えば、図３４Ａ～図３４Ｃ）。

１０．ヘアピン標識は、レポーター分子をヘアピン付近に沈着するためのＣＡＲＤシグナル増幅を媒介する酵素を含むことができる。

１１．ヘアピン標識は、ハプテン付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接

10

20

30

40

50

的に媒介する、0個、1個、または複数個のハプテン（例えば、図35-1～図35-2）を含むことができる。

【0101】

いくつかの実施形態では、ヘアピン標識は、レポーターで標識された抗ハプテン（例えば、抗体、ナノボディ、ストレプトアビジン、または別の分子）をリクルートするハプテンを含むことができる。

【0102】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態では、触媒レポーター沈着（CARD）を媒介し、信号ゲインをさらに高くするために、HCRシグナル増幅が用いられる。いくつかの実施形態では、さらに高いシングルゲイン（single gain）とは、約5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約40倍、約50倍、約75倍、約100倍、約500倍、約1000倍、約2000倍、約5000倍、もしくは約10,000倍、または上記値のいずれか2つによって規定される範囲を有する値である。

【0103】

いくつかの実施形態では、レポーター分子に結合した標識プローブ分子が個々のヘアピン上の分割基質と強く結合しないが、HCR重合後は、共局在化した完全基質が、レポーター分子に結合した標識プローブ（例えば、図18D）と、またはCARDシグナル増幅を媒介する酵素を含むレポーター体（例えば、図36B）に、強く結合するように、HCR増幅重合体内の近接するヘアピンが完全基質を共局在化させるように、HCRヘアピン標識に分割基質を含ませてもよい。

【0104】

ハプテンおよび抗ハプテン

いくつかの実施形態では、ハプテンを含む基質であるヘアピン標識は、例えば、ジゴキシゲニン（digoxigenin）（DIG）、ジニトロフェニル（DNP）、フルオロフォア、ビオチン、または任意の小分子、生体分子、または抗ハプテンをリクルートすることができる非生体分子とすることができる。抗ハプテンの例としては、ハプテンと選択的に結合する、抗体、ナノボディ、ストレプトアビジン、アプタマー、または任意の他の分子もしくは分子複合体が挙げられる。

【0105】

標識プローブ

いくつかの実施形態では、標識プローブは、基質結合領域、および1または複数のレポーター（例えば、図18C～図18Eおよび図20を参照）またはレポーター体（例えば、図33A～図33Eおよび図34A～図34Dを参照）を含む。いくつかの実施形態では、標識プローブは、1個のレポーター分子で標識された、構造化されていない鎖を含む（例えば、図20A参照）。いくつかの実施形態では、標識プローブは、複数のレポーター分子を含む（例えば、図20B参照）。いくつかの実施形態では、標識プローブは、ブロッカー鎖（クエンチャーに結合している）にハイブリダイズした標識鎖（レポーターに結合している）を含む（例えば、図20C参照）。いくつかの実施形態では、標識プローブは、ヘアピン構造（例えば、図20Dの標識プローブを参照）、または他の分子内塩基対合を有する。いくつかの実施形態では、ヘアピン標識プローブは、1または複数のレポーター、クエンチャー、および／またはFRET対に結合している（例えば、図20Eおよび図20Fを参照）。いくつかの実施形態では、標識プローブは、HCRヘアピン上のハプテン標識を認識し、さらに、CARDを媒介する酵素を含むレポーター体を含む、抗ハプテン抗体またはナノボディを含む（例えば、図33A～図33E）。いくつかの実施形態では、標識プローブは、HCRヘアピン上のハプテン標識を認識し、さらに、CARDを媒介する酵素を含むレポーター体を含む、抗ハプテン体を含む（例えば、図34A～図34D）。いくつかの実施形態では、標識プローブは、HCRヘアピン上の基質標識を認識する、または、HCR増幅重合体内に共局在化した完全基質を認識し、さらに、CARDを媒介する酵素を含むレポーター体を含む、基質相補鎖を含む（例えば、図36A～図36B）。

【0106】

HCRを介した触媒レポーター沈着（CARD）のための酵素

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、CARD基質を触媒することでヘアピンの近傍にレポーターを沈着させる酵素を含むレポーター体による触媒レポーター沈着（CARD）を介して、シグナル増幅を媒介する（例えば、図33A～図33E、図34A～図34C、図36A～図36Bを参照）。例えば：

1. 上記酵素は、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）（または複数のHRP酵素を含むポリマーHRP）であって、CARD-基質に対して作用してAEC、DAB、TMB、もしくはステイイエローなどの色素生産性レポーターの沈着を触媒するもの、または、CARD-基質を触媒してフルオロフォア（fluophore）標識チラミドなどの蛍光レポーターの沈着を触媒するもの、または、ビオチン標識チラミドなどのハプテン標識CARD-基質の沈着を触媒し、ハプテンがヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を媒介する働きをするもの、とすることができる。

2. 上記酵素は、アルカリホスファターゼ（AP）（または複数のAP酵素を含むポリマーAP）であって、CARD-基質に作用して、レポーター、例えば、限定はされないが、BCIP/NBT、BCIP/TNBT、ナフトールAS-MXリン酸塩+ファストブルーBB、ナフトールAS-MXリン酸塩+ファストレッドTR、ステイグリーンなどの色素生産性レポーター、の沈着を触媒するもの、とすることができる。

3. 上記酵素は、グルコースオキシダーゼであって、CARD-基質に作用して、レポーター、例えばNBT、の沈着を触媒するもの、とすることができる。

4. 上記酵素は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介する任意の分子または複合体とすることができる。

【0107】

いくつかの実施形態では、CARDを媒介する酵素は、レポーター沈着後に非活性化（不活性化と呼ばれる場合もある）される（例えば、化学変性または熱変性を用いて）。例えば、CARDを媒介する酵素は、以下の任意の組み合わせを用いて非活性化することができる。

1. 熱（例えば、65℃以上）

2. 固定液（例えば、4%PFA）

3. 酸（例えば、0.1Mグリシン塩酸塩+1%Tween（登録商標）20（pH2.2）、0.2N HCl、10%酢酸、10mM HCl）

4. 他の化学物質（例えば、過酸化水素（H₂O₂）、過酸化水素+フェノール、アジ化ナトリウム、DEPC、MAB+10mM EDTA）

【0108】

いくつかの実施形態では、HRPはH₂O₂を用いて不活性化される。いくつかの実施形態では、APは、熱と酸の組み合わせを用いて不活性化される。いくつかの実施形態では、APは、固定液により不活性化される。いくつかの実施形態では、CARDを媒介する酵素を非活性化させることで、HCRを介したCARDを利用した多重標的分析を可能にするために、異なる標的に対して、異なる基質と組み合わせで同じ酵素を用いた、反復的なCARDが可能となる。いくつかの実施形態では、CARDを媒介する酵素を非活性化させることで、HCRを介したCARDを利用した多重標的分析を可能にするために、異なる標的に対して、異なる基質と組み合わせで異なる酵素を用いた、反復的なCARDが可能となる。

【0109】

いくつかの実施形態では、CARDは、染色された試料を10年間以上保存することを可能にし、バイオ医薬品の規制要件に準拠した再イメージングを可能にする。いくつかの実施形態では、CARDベースの染色試料は、1年間、2年間、3年間、4年間、5年間、6年間、7年間、8年間、9年間、10年間、11年間、12年間、13年間、14年間、15年間、またはそれ以上の期間、十分に安定であり、さらにバイオ医薬品の規制要件に準拠している。いくつかの実施形態では、CARDは、ホルマリン固定パラフィン包

10

20

30

40

50

埋 (F F P E) 試料を数十年間保存することを可能にする。いくつかの実施形態では、C A R D は、病理試料を数十年間保存することを可能にし、後向きの科学研究や医学的研究を可能にする。いくつかの実施形態では、C A R D 染色は、保管用 (a r c h i v a l) 試料の長期保存を可能にする

【 0 1 1 0 】

標的の種類

いくつかの実施形態では、イニシエーター標識 H C R プローブは、1 または複数の標的結合領域を含み、1 または複数の H C R イニシエーターをさらに含む。いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブは、以下を含む標的を検出することができる：

1. R N A 分子 (例えば、m R N A、r R N A、l n c R N A、s i R N A、s h R N A、マイクロ R N A、ノンコーディング R N A、合成 R N A、または修飾 R N A)、D N A 分子、非天然核酸分子、タンパク質分子、小分子、生体分子、化学修飾生体分子、非生体分子を含むがこれらに限定はされない、任意の分子
2. R N A、D N A、タンパク質、小分子、生体分子、および / または非生体分子の任意の組み合わせを含む分子複合体 (例えば、R N A / R N A 複合体、R N A / タンパク質複合体、D N A / タンパク質複合体、および R N A / D N A / タンパク質複合体、タンパク質 / タンパク質複合体)。

【 0 1 1 1 】

分割イニシエーター H C R プローブは、1 または複数の標的結合領域を含み、1 または複数の分割イニシエーター領域をさらに含む。プローブユニットは、プローブユニット内の分割イニシエータープローブが組み合わさることで完全 H C R イニシエーターを形成するように、2 個以上の分割イニシエータープローブを含む。プローブユニットは、以下を含む標的を検出することができる：

1. R N A 分子 (例えば、m R N A、r R N A、l n c R N A、s i R N A、s h R N A、マイクロ R N A、ノンコーディング R N A、合成 R N A、または修飾 R N A)、D N A 分子、非天然核酸分子、タンパク質分子、小分子、生体分子、化学修飾生体分子、非生体分子を含むがこれらに限定はされない、任意の分子
2. R N A、D N A、タンパク質、小分子、生体分子、および / または非生体分子の任意の組み合わせを含む分子複合体 (例えば、R N A / R N A 複合体、R N A / タンパク質複合体、D N A / タンパク質複合体、および R N A / D N A / タンパク質複合体、タンパク質 / タンパク質複合体)
3. プローブユニットを含む分割イニシエータープローブが、近位の分子または複合体の集合内部の各々の標的に結合した場合に、プローブユニット内の分割イニシエーターが共局在化して完全 H C R イニシエーターを形成することができるような、近位の分子または複合体の任意の集合。

【 0 1 1 2 】

本明細書で提供される実施形態のいずれかでは、プローブユニット内の分割イニシエーターは、H C R ヘアピンの非オーバーラップ領域 (例えば、0 個、1 個、2 個、またはそれ以上のヌクレオチドによって隔てられた領域) に相補的であるように設計され (または相補的であり)、または、H C R ヘアピンのオーバーラップ領域 (例えば、1 個、2 個、またはそれ以上のヌクレオチド分だけオーバーラップしている領域) に相補的であるように設計され (または相補的である)、または、H C R ヘアピンに実質的に相補的 (例えば、0 個、1 個、2 個、少数 (a f e w)、またはそれより多い数個 (s e v e r a l) のミスマッチを除いて相補的) であるように設計される (または相補的である)。

【 0 1 1 3 】

本明細書で提供される実施形態のいずれかでは、プローブユニット内の標的結合領域は、標的の非オーバーラップ領域 (例えば、0 ヌクレオチド、1 ヌクレオチド、2 ヌクレオチド、もしくはそれ以上のヌクレオチドだけ隔てられている領域、または、0 n m、1 n m、2 n m、もしくはそれ以上隔てられている領域) に結合するように構成されており、または、標的のオーバーラップ領域 (例えば、1 ヌクレオチド、2 ヌクレオチド、もしくは

はそれ以上のヌクレオチドだけオーバーラップしている領域、または、1 nm、2 nm、もしくはそれ以上オーバーラップしている領域）に結合するように構成されている。

【0114】

シグナルプローブは、標的のオーバーラップ領域もしくは非オーバーラップ領域に結合するように構成されており、且つ／または、HCRヘアピンのオーバーラップ領域もしくは非オーバーラップ領域にハイブリダイズする分割イニシエーターを有するように設計されている

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、標的結合領域および分割イニシエーターをそれぞれ含む、2個以上の分割イニシエータープローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは：

1. HCRヘアピンの近接領域に対して相補的であるように設計されているか、
2. または、HCRヘアピンの非オーバーラップ領域（例えば、0ヌクレオチド、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドだけ隔てられている領域）に対して相補的であるように設計されているか、
3. または、HCRヘアピンのオーバーラップ領域（例えば、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドだけオーバーラップしている領域）に対して相補的であるように設計されているか、
4. または、HCRヘアピンに対して実質的に相補的（例えば、0個、1個、2個、少数（a few）、またはそれより多い数個（several）のミスマッチを除いて相補的）であるように設計されているか、
5. または、HCRヘアピンの近接領域にハイブリダイズするように設計されているか、
6. または、HCRヘアピンの非オーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計されているか、
7. または、HCRヘアピンのオーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計されているか、
8. または、HCRヘアピンの近接領域に対して相補的な配列を有するように設計されているか、
9. または、HCRヘアピンの非オーバーラップ領域に対して相補的な配列を有するように設計されているか、
10. または、HCRヘアピンのオーバーラップ領域に対して相補的な配列を有するように設計されているか、
11. または、HCRヘアピンの近接領域に対して実質的に相補的な配列を有するように設計されているか、
12. または、HCRヘアピンの非オーバーラップ領域に対して実質的に相補的な配列を有するように設計されているか、
13. または、HCRヘアピンのオーバーラップ領域に対して実質的に相補的な配列を有するように設計されている。

【0115】

いくつかの実施形態では、プローブユニット内の標的結合領域は：

1. 標的の近接領域に結合するように構成されているか、
2. または、標的の非オーバーラップ領域（例えば、0ヌクレオチド、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、もしくはそれ以上のヌクレオチドだけ隔てられている領域、または、0 nm、1 nm、2 nm、もしくはそれ以上隔てられている領域）に結合するように構成されているか、
3. または、標的のオーバーラップ領域（例えば、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、もしくはそれ以上のヌクレオチドだけオーバーラップしている領域、または、1 nm、2 nm、もしくはそれ以上オーバーラップしている領域）に結合するように構成されているか、
4. 標的の近接領域に結合するように設計されているか、
5. または、標的の非オーバーラップ領域に結合するように設計されているか、

6. または、標的のオーバーラップ領域に結合するように設計されているか、
7. または、標的の近接領域にハイブリダイズする配列を有するように設計されているか、
8. または、標的の非オーバーラップ領域にハイブリダイズする配列を有するように設計されているか、
9. または、標的のオーバーラップ領域にハイブリダイズする配列を有するように設計されている。

【0116】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、2個の分割イニシエータープローブを含む。この2個の分割イニシエータープローブが、コグネイトな標的に結合して、完全HCRイニシエーターを共局在化する。共局在化した完全HCRイニシエーターが、コグネイトなHCRヘアピンに結合してHCR重合を惹起し、一方の分割イニシエーターはヘアピンにハイブリダイズして第1二本鎖を形成し、他方の分割イニシエーターはヘアピンにハイブリダイズして第2二本鎖を形成する。いくつかの実施形態では、これら2つの二本鎖間にはエネルギー的に起こりにくい接続がある。いくつかの実施形態では、ヘアピンのオーバーラップ領域に結合するように分割イニシエーターを構成することで、ヘアピン中の接続の位置、並びに接続付近の2個のプローブおよびヘアピンの三次構造を弛緩させて、エネルギー的により生じやすい高次構造にし、共局在化した完全イニシエーターとHCRヘアピンとの間の親和性を増加させ、所与の期間中に生成される増幅されたHCRシグナルの量を増加させることができる（例えば、図27および図28）。いくつかの実施形態では、2個のプローブとコグネイトな標的との間の親和性は、これらの分子間の接続を弛緩させてエネルギー的に生じやすい高次構造にするために、2個のプローブの標的結合領域を標的のオーバーラップ領域に結合するように構成することで、増加させることができる。

【0117】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、2個、3個、4個、5個、10個、20個、または100個、またはそれ以上のプローブセットを用いて、同じ試料中の異なる標的に結合させる多重実験であって、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、または100個、またはそれ以上のプローブセットは1または複数のイニシエーター標識プローブを含む、多重実験用に設計される。いくつかの実施形態では、プローブセットは、2個、3個、4個、5個、10個、20個、または100個、またはそれ以上のプローブセットを同じ試料中で使用する多重実験であって、プローブセットの1%超、2%超、5%超、10%超、30%超、50%超、または100%超が1または複数のイニシエーター標識プローブを含む、多重実験用に設計される。

【0118】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、2個、3個、4個、5個、10個、20個、または100個、またはそれ以上のプローブセットを用いて、同じ試料中の異なる標的に結合させる多重実験であって、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、または100個、またはそれ以上のプローブセットが、HCRヘアピンのオーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計された分割イニシエーターを含む1または複数のプローブユニットを含む、多重実験用に設計される。いくつかの実施形態では、プローブセットは、2個、3個、4個、5個、10個、20個、または100個、またはそれ以上のプローブセットを同じ試料中で使用する多重実験であって、プローブセットの1%超、2%超、5%超、10%超、30%超、50%超、または100%超が、HCRヘアピンのオーバーラップ領域に対して相補的であるように設計された配列を有する分割イニシエーターを含む1または複数のプローブユニットを含む、多重実験用に設計される。

【0119】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、2個、3個、4個、5個、10個、20個、または100個、またはそれ以上のプローブセットを用いて、同じ試料中の異なる標的に結合させる多重実験であって、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、ま

たは100個、またはそれ以上のプローブセットが、標的のオーバーラップ領域に結合するように設計された標的結合領域を含む1または複数のプローブユニットを含む、多重実験用に設計される。いくつかの実施形態では、プローブセットは、3個、4個、5個、10個、20個、または100個、またはそれ以上のプローブセットを同じ試料中で使用する多重実験であって、プローブセットの1%超、2%超、5%超、10%超、30%超、50%超、または100%超が、標的のオーバーラップ領域に結合するように設計された標的結合領域を含む1または複数のプローブユニットを含む、多重実験用に設計される。

【0120】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、2個、3個、4個、5個、10個、20個、または100個、またはそれ以上のプローブセットを用いて、同じ試料中の異なる標的に結合させる多重実験であって、1または複数のプローブセットが1または複数のイニシエーター標識プローブを含み、1または複数のプローブセットが2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む、多重実験用に設計される。いくつかの実施形態では、プローブセットは、2個、3個、4個、5個、10個、20個、または100個、またはそれ以上のプローブセットを同じ試料中で使用する多重実験であって、プローブセットの0.1%超、1%超、2%超、5%超、10%超、30%超、または50%超が1または複数のイニシエーター標識プローブを含み、プローブセットの0.1%超、1%超、2%超、5%超、10%超、30%超、または50%超が2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む、多重実験用に設計される。

【0121】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、HCRヘアピンのオーバーラップ領域に結合するように設計された分割イニシエーターであって、上記オーバーラップ領域は1塩基、または2塩基、または3塩基、または4塩基、または5塩基、またはそれ以上の塩基だけオーバーラップしている、分割イニシエーターを含む。

【0122】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、標的のオーバーラップ領域に結合するように設計された標的結合領域であって、上記オーバーラップ領域は少なくとも0.1nm、または少なくとも0.2nm、または少なくとも0.3nm、または少なくとも0.5nm、または少なくとも1nm、または少なくとも2nm、または少なくとも3nm、または少なくとも5nmだけオーバーラップしている、標的結合領域を含む。いくつかの実施形態では、プローブユニットは、標的のオーバーラップ領域に結合するように設計された配列を含む標的結合領域であって、上記オーバーラップ領域は少なくとも1塩基、または2塩基、または3塩基、または4塩基、または5塩基、またはそれ以上の塩基だけオーバーラップしている、標的結合領域を含む。

【0123】

イニシエーター標識プローブの材料および組成

いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブは、1または複数の標的結合ドメイン、および1または複数のHCRイニシエーターを含む（例えば、図39A～図39Nおよび図42A～図42F）。各ドメインは、DNA、RNA、2'OMe-RNA、PNA、XNA、化学修飾核酸、合成核酸類似体、アミノ酸、合成アミノ酸類似体、および／または、当該ドメインの目的に適した任意の他の分子を含む、1または複数の材料から構成されていてもよい。例えば：

1. イニシエーター標識プローブは、DNAから構成される1または複数のイニシエーター、およびDNAから構成される標的結合ドメインを含んでいてもよい。
2. イニシエーター標識プローブは、DNAから構成される1または複数のイニシエーター、およびアミノ酸から構成される標的結合ドメイン（例えば、抗体またはナノボディまたは抗体断片）を含んでいてもよい。
3. イニシエーター標識プローブは、合成核酸類似体から構成されるイニシエーター、およびDNAと2'OMe-RNAの組み合わせから構成される標的結合ドメインを含ん

でいてもよい。

4. イニシエーター標識プローブは、2'OMe-RNAから構成されるイニシエーター、およびRNAとタンパク質の組み合わせから構成される標的結合ドメインを含んでいてもよい。

5. イニシエーター標識プローブは、DNAから構成されるイニシエーター、およびPNAから構成される標的結合ドメインを含んでいてもよい。

6. イニシエーター標識プローブは、任意の核酸または核酸類似体から構成される1または複数のイニシエーター、および標的分子と結合するのに好適な材料の任意の組み合わせから構成される1または複数の標的結合ドメインを含んでいてもよい。

【0124】

いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブは、共有結合分子を1個含んでいてもよいし、または、非共有結合的に相互作用して複合体を形成する分子（それぞれ共有結合的に繋がっている）を2個以上含んでいてもよい。例えば：

1. イニシエーター標識プローブは、DNAから構成される標的結合ドメインに共有結合的に連結したDNAから構成されるイニシエーターを含んでいてもよい。

2. イニシエーター標識プローブは、標的結合ドメインがgRNA:dCas9複合体（または別のCasを用いたgRNA:Cas複合体）を含むように、ガイドRNA（gRNA）に非共有結合的に結合したdCas9（または別のCas）に共有結合的に連結した、DNAから構成される1または複数のイニシエーターを含んでいてもよい。

3. イニシエーター標識プローブは、標的結合ドメインがgRNA:dCas9複合体（または別のCasを用いたgRNA:Cas複合体）を含むように、dCas9（または別のCas）に非共有結合的に結合したgRNAに共有結合的に連結した、DNAから構成される1または複数のイニシエーターを含んでいてもよい。

4. イニシエーター標識プローブは、1または複数の分子を含む標的結合ドメインに共有結合的に連結または非共有結合的に結合した、核酸または核酸類似体から構成されるイニシエーターを含んでいてもよい。

【0125】

分割イニシエータープローブの材料および組成

いくつかの実施形態では、分割イニシエータープローブは、1または複数の標的結合ドメイン、および1または複数の分割イニシエータードメインを含む（例えば、図3A～図3B、図5A～図5E、および図38-1～図38-2）。各ドメインは、DNA、RNA、2'OMe-RNA、PNA、XNA、化学修飾核酸、合成核酸類似体、アミノ酸、合成アミノ酸類似体、および／または、当該ドメインの目的に適した任意の他の分子を含む、1または複数の材料から構成されていてもよい。例えば：

1. 分割イニシエータープローブは、DNAから構成される1または複数の分割イニシエータードメイン、およびDNAから構成される標的結合ドメインを含んでいてもよい。

2. 分割イニシエータープローブは、DNAから構成される1または複数の分割イニシエータードメイン、およびアミノ酸から構成される標的結合ドメイン（例えば、抗体、またはナノボディ、または抗体断片）を含んでいてもよい。

3. 分割イニシエータープローブは、合成核酸類似体から構成される分割イニシエータードメイン、およびDNAと2'OMe-RNAの組み合わせから構成される標的結合ドメインを含んでいてもよい。

4. 分割イニシエータープローブは、2'OMe-RNAから構成される分割イニシエータードメイン、およびRNAとタンパク質の組み合わせから構成される標的結合ドメインを含んでいてもよい。

5. 分割イニシエータープローブは、DNAから構成される分割イニシエータードメイン、およびPNAから構成される標的結合ドメインを含んでいてもよい。

6. 分割イニシエータープローブは、任意の核酸または核酸類似体から構成される1または複数の分割イニシエータードメイン、および標的分子と結合するのに好適な材料の任意の組み合わせから構成される1または複数の標的結合ドメインを含んでいてもよい。

【0126】

いくつかの実施形態では、分割イニシエータープローブは、共有結合分子を1個含んでいてもよいし、または、非共有結合的に相互作用して複合体を形成する分子（それぞれ共有結合的に繋がっている）を2個以上含んでいてもよい。例えば：

1. 分割イニシエータープローブは、DNAから構成される標的結合ドメインに共有結合的に連結したDNAから構成される分割イニシエータードメインを含んでいてもよい。
2. 分割イニシエータープローブは、標的結合ドメインがgRNA:dCas9複合体（または別のCasを用いたgRNA:Cas複合体）を含むように、ガイドRNA（gRNA）に非共有結合的に結合したdCas9（または別のCas）に共有結合的に連結した、DNAから構成される1または複数の分割イニシエータードメインを含んでいてもよい。
3. 分割イニシエータープローブは、標的結合ドメインがgRNA:dCas9複合体（または別のCasを用いたgRNA:Cas複合体）を含むように、dCas9（または別のCas）に非共有結合的に結合したgRNAに共有結合的に連結した、DNAから構成される1または複数の分割イニシエータードメインを含んでいてもよい。
4. 分割イニシエータープローブは、1または複数の分子を含む標的結合ドメインに共有結合的に連結または非共有結合的に結合した、核酸または核酸類似体から構成される分割イニシエータードメインを含んでいてもよい。プローブユニット内の各分割イニシエータープローブは、プローブユニット内の他の分割イニシエータープローブと、材料組成が同じであっても異なってもよい。プローブユニット内の各分割イニシエータープローブは、同じ標的分子上の異なる検出部位に、または標的分子複体内の異なる検出部位に、または近位の分子もしくは複体の標的集合内の異なる検出部位に、結合する標的結合領域を有していてもよい。

【0127】

分割イニシエータープローブおよびHCRシグナル増幅を用いた無洗浄シグナル生成

いくつかの実施形態では、未使用のプローブおよびアンプリファイアが試料から除去されない無洗浄プロトコルを用いてシグナルを生成するのに、分割イニシエータープローブおよびHCRアンプリファイアを使用する。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の2個以上の分割イニシエータープローブはそれぞれ、個々の分割イニシエータープローブが効率的にHCRシグナル増幅を惹起するには十分ではないが、各プローブの標的結合ドメインが標的上のコグネイトな検出部位に結合すると、分割イニシエーターが共局在化して完全HCRイニシエーターを形成し、係留されたHCR増幅重合体の成長を惹起するように、分割イニシエーターおよび標的結合領域を含む。いくつかの実施形態では、各HCRヘアピンは、1もしくは複数のレポーター、および／または、1または複数のクエンチャー、および／もしくは、1または複数のFRET対の成分で標識されている。いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアは、交互にH1およびH2を重合する工程である重合カスケードを起こして、係留されたHCR増幅重合体を成長させる、2つのHCRヘアピン、H1およびH2を含む。いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアは、交互にH1、H2、H3、およびH4を重合する工程である重合カスケードを起こして、係留されたHCR増幅重合体を成長させる、4つのHCRヘアピン、H1、H2、H3、およびH4を含む。いくつかの実施形態では、HCRヘアピン上の1または複数のレポーターは、重合前はクエンチ状態であり、重合後は非クエンチ状態である。いくつかの実施形態では、FRET対を含む2つのレポーターは、HCR重合前は効率的なFRETを実行するのに十分に近接していないが、重合後は効率的なFRETを実行するのに十分に近接する。いくつかの実施形態では、HCRシグナル生成は、a) HCR単量体が、HCR重合体と連結するために開く際に起こす立体構造変化、および／または、b) HCR重合体内の2個以上のHCRヘアピンの共局在化によって、試料中の総HCRシグナルがHCR重合後よりもHCR重合前により低くなるように、高次構造依存的である。いくつかの実施形態では、HCRシグナルは、係留されたHCR増幅重合体の成長によって標的の部位で濃縮される。いくつかの実施形態では、未使用のプローブおよびアンプリフ

ファイアが試料から除去されない無洗浄プロトコルを用いてシグナルを生成するのに、分割イニシエータープローブおよびHCRアンプリファイアを使用する。いくつかの実施形態では、生細胞、生体、組織切片、脳スライス、バルク溶液、固定細胞、固定組織、固定胚のいずれかの内部に1または複数の標的を含む試料において、無洗浄プロトコルを用いてシグナルを生成するために、分割イニシエータープローブおよびHCRアンプリファイアを使用する。いくつかの実施形態では、標的は、架橋されておらず、且つ／または、試料内で固定されておらず、且つ／または、固相に捕捉されていない。いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、HCR増幅によって完全基質が共局在化するような、分割基質である、標識を含む（例えば、図18F参照）。いくつかの実施形態では、標識プローブは、標識鎖がHCR増幅重合体内で共局在化した完全体にハイブリダイゼーションする場合に、ブロッカー鎖が標識鎖から除去され、レポーターがクエンチャーから分離され、シグナルが生成されるように、ブロッカー鎖（クエンチャーに結合）にハイブリダイズしている標識鎖（レポーターに結合）を含む。

10

【0128】

試料からのシグナルの除去

いくつかの実施形態では、HCRシグナルがシグナル検出後に試料から除去される（例えば、図23A～図23Nおよび図40A～図40Nを参照）。試料中のシグナルを生成しているレポーターの数を減少させる任意の方法によって、シグナルは試料から除去できる。例えば：

- ・光および／または化学試薬を用いて蛍光レポーター分子を光退色させること（例えば、図23Aおよび図40Aを参照）、
- ・レポーターをHCRヘアピンから化学切断し、試料から洗浄すること（例えば、TCEP）（例えば、図23Bおよび図40Bを参照）、
- ・レポーターを標識プローブから化学切断し、試料から洗浄すること（例えば、図23Cおよび図40Cを参照）、
- ・ヘアピンを化学切断してHCR増幅重合体を断片化し、それらの断片を試料から洗浄すること（例えば、図23Dおよび図40Dを参照）、
- ・プローブを化学的に切断して標的からHCR増幅重合体の係留を解き、係留を解かれた増幅重合体を試料から洗浄すること（例えば、図23Eおよび図40Eを参照）、
- ・補助鎖を用いてヘアピンをHCR増幅重合体から脱ハイブリダイズし、ヘアピンを試料から洗浄すること（例えば、図23F、図40Fおよび図40Nを参照）、
- ・補助鎖を用いて標識プローブをHCR増幅重合体から脱ハイブリダイズし、標識プローブを試料から洗浄すること（例えば、図23Gおよび図40Gを参照）、
- ・化学変性剤および／または高音を用いてHCR増幅重合体を脱安定化させた後、ヘアピンを試料から洗浄すること（例えば、図23Hおよび図40Hを参照）、
- ・化学変性剤および／または高音を用いてプローブとその標的間の相互作用を脱安定化させた後、係留を解かれた増幅重合体を試料から洗浄すること（例えば、図23Iおよび図40Iを参照）、
- ・化学変性剤および／または高音を用いて標識プローブとその基質間の相互作用を脱安定化させた後、標識プローブを試料から洗浄すること（例えば、図23Jおよび図40Jを参照）、
- ・酵素を用いて増幅重合体および／またはプローブを分解し、分解された分子を試料から洗浄すること（例えば、図23Kおよび図40K～図40Mを参照）、
- ・デオキシリボヌクレアーゼを用いてDNA増幅重合体および／またはDNAプローブおよび／またはDNA標的を分解し、得られた分子を試料から洗浄すること（例えば、図23K、図40K～図40Mを参照）、
- ・RNaseを用いてRNA標的を分解した後、係留を解かれた増幅重合体を試料から洗浄すること（例えば、図23Lおよび図40K～図40Mを参照）、
- ・プロテアーゼを用いてタンパク質標的を分解した後、係留を解かれた増幅重合体を試料から洗浄すること（例えば、図23Mおよび図40K～図40Mを参照）、

20

30

40

50

- ・RNAseの組み合わせを用いてRNA標的を分解し、デオキシリボヌクレアーゼを用いてDNA増幅重合体および／またはDNAプローブを分解し、得られた分子を試料から洗浄すること（例えば、図23Nおよび図40K～図40Mを参照）、
- ・プロテアーゼの組み合わせを用いてタンパク質標的を分解し、デオキシリボヌクレアーゼを用いてDNA増幅重合体および／またはDNAプローブおよび／またはDNA標的を分解し、得られた分子を試料から洗浄すること（例えば、図23Oおよび図40K～図40Mを参照）、
- ・上記方法の2つ以上を同時または別々に用いること。

【0129】

アッセイ形式

いくつかの実施形態では、HCRシグナルは、以下を含むがこれらに限定はされない、種々のアッセイ形式で測定することができる：プロット、ノーザンプロット、ウェスタンプロット、サザンプロット、スポットプロット、ペーパーアッセイ、フローサイトメトリーアッセイ、蛍光フローサイトメトリーアッセイ、細胞分取アッセイ、蛍光標識細胞分取アッセイ、磁気活性細胞分取アッセイ、顕微鏡アッセイ、光学顕微鏡アッセイ、落射蛍光顕微鏡アッセイ、共焦点顕微鏡アッセイ、光シート顕微鏡アッセイ、マイクロアレイアッセイ、ビーズベースアッセイ、質量分析アッセイ、蛍光顕微鏡アッセイ、質量分析顕微鏡アッセイ、質量分析フローサイトメトリーアッセイ、蛍光アッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、比色分析、電気化学的インピーダンスアッセイ、電気化学的発光アッセイ、エネルギー散逸アッセイ、ヒトの眼を用いたアッセイ、携帯電話のカメラを用いたアッセイ、ゲル電気泳動アッセイ、インサイツハイブリダイゼーション（ISH）アッセイ、RNA-ISHアッセイ、DNA-ISHアッセイ、免疫組織化学（IHC）アッセイ、オートラジオグラフィアッセイ、またはHCR増幅重合体によって生成されたシグナルを検出することが可能な任意のアッセイ。

【0130】

試料の種類

いくつかの実施形態では、HCRイニシエーター標識プローブおよび／またはHCR分割イニシエータープローブを、HCR増幅ヘアピンと共に用いて、試料中の、分子、複合体、または近位の分子もしくは複合体の集合を含む標的を検出することができる。標的分子は、例えば以下を含む試料内に含有されている場合がある：細菌、ゼブラフィッシュ胚、ニワトリ胚、マウス胚、ヒト生検標本、ヒト組織切片、FFPE組織切片、尿試料、血液試料、便試料、マウス組織切片、脳スライス、ウニ胚、線虫の幼虫、ショウジョウバエ胚、モデル生物、非モデル生物、多種生物混合物、未知生物を含有する環境試料、生物の共同体（例えば、別の生物の腸内原生生物および細菌の混合物）、シロアリ、マイクロバイオーム、臨床検体、診断試料、痰試料、腫瘍生検標本、研究試料、ヒト由来の物質を含む試料、ペット（例えば、イヌ、ネコ、ウサギ、トカゲ、ヘビ、または魚）由来の物質を含む試料、野生動物（例えば、チーター、ゾウ、サイ、またはチンパンジー）由来の物質を含む試料、絶滅動物（例えば、マンモス、ドードー、オオウミガラス、トリケラトプス、またはリョコウバト）由来の物質を含む試料、生細胞（例えば、細菌または培養哺乳類細胞）、または生体（例えば、生きているマウスまたは生きているヒト）。

【0131】

いくつかの実施形態では、標的は試料内で溶解状態で遊離していてもよい。例えば、標的は試験管、細胞、胚、生物、組織切片、生物標本などの試料内で溶解状態で遊離していてもよい。

【0132】

いくつかの実施形態では、標的は、固相に共有結合的または非共有結合的に付着した1または複数の捕捉プローブに共有結合的に架橋または非共有結合的に結合していてもよい。例えば、マイクロアレイまたはビーズに共有結合的に連結された捕捉プローブに直接的または間接的に結合していてもよい。

【0133】

いくつかの実施形態では、標的は、固相に直接的または間接的に、固定、共有結合的に架橋、または非共有結合的に結合していてもよい。例えば、標的は、スライド、プロット、膜、紙基材、または任意の他の基材に、結合、固定、または共有結合的に架橋結合していてもよい。標的は、細胞、胚、生物、組織切片、生物標本、または任意の他の試料に、固定または共有結合的に連結していてもよい。標的は、固定および透過処理される、固定されているが透過処理はされていない、または、固定されていないが透過処理はされている試料内で共有結合していてもよい。

【0134】

いくつかの実施形態では、標的は、生細胞、生きている胚、生体、生きている生態系、または生物の共同体（例えば、哺乳動物の腸内のマイクロバイーム）内で遊離していてもよい。標的は、細胞もしくは生物と結び付いているがその外側にあってもよく、または、細胞もしくは生物内部に含有されていてもよい。標的は、生細胞、生きている胚、生体、生きている生態系、または生きている生物共同体内部で、共有結合的に架橋していてもよい。標的は、試料内の1または複数の細胞型内に存在していても、存在していなくてもよい。標的は、試料内の1種または複数種の生物内に存在していても、存在していなくてもよい。標的は、標的分子との類似度が異なる1または複数のオフターゲットを含有する試料中に存在していてもよい。標的は、展伸された試料内に存在していてもよい。標的は、圧縮された試料内に存在していてもよい。分子間の空間的隔離を増加する目的で、標的を検出する前に試料を展伸してもよい。分子間の空間的隔離を減少する目的で、標的を検出する前に試料を圧縮してもよい。試料を展伸する際に試料中の分子間の相対位置を維持するように、標的および／または他の分子を展伸された試料に架橋してもよい。試料を展伸する際に試料中の分子の相対位置および／または配向を維持しながら試料を展伸するように、標的および／または他の分子を、ゲル、マトリックス、または試料に導入された他の試薬に架橋してもよい。試料は、試料内の異なる組織および／または臓器において、異なる展伸係数および／または圧縮係数で、別個に展伸および／または圧縮してもよい。

【0135】

試料の固定

いくつかの実施形態では、標的分子を、その後の実験工程中に保持されるように、試料に架橋することができる。例えば、標的分子を、化学試薬（例えば、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、EDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド））を用いて、試料に架橋することができる。

【0136】

試料の透過処理

いくつかの実施形態では、標的分子のHCRプローブおよびアンプリファイアへのアクセス性を増強するために、試料を処理することができる。例えば、試料（例えば、細胞、組織切片、または全載胚）を、化学試薬（例えば、メタノール、エタノール、洗浄剤）または酵素（例えば、プロテアーゼK）を用いて透過処理することができる。標的アクセス性は、試料の均質化、顕微解剖、エレクトロポレーション、切片作製、加熱処理（例えば、非特許文献4）、および／または、マイクロ波処理（例えば、非特許文献5）によっても増強することができる。別の選択肢として、化学トランスフェクション試薬を用いて、細胞膜を通過させて、HCRプローブおよびアンプリファイアを送達することがある。

【0137】

未結合試薬を試料から除去するための試料の洗浄

いくつかの実施形態では、未使用のイメージング試薬を試料から洗浄することで、バックグラウンドを低減することができる。例えば、プローブ、HCRイニシエーター標識プローブ、HCR分割イニシエータープローブ、HCR増幅ヘアピン、増幅試薬、標識プローブ、抗体、および／または他のイメージング試薬を試料から除去するために、洗浄を用いることができる。特異的に結合したイメージング試薬は大部分が除去されず（シグナルを保持）、非特異的に結合したイメージング試薬は大部分が除去される（バックグラウンドを低減）ように、化学試薬を用いてある温度で、洗浄を実行することができる。例えば

、洗浄用緩衝液としては、変性剤（例えば、ホルムアミド、尿素）、塩緩衝液（例えば、塩化ナトリウムクエン酸ナトリウム（SSC）、リン酸緩衝生理食塩水（PBS））、酸（例えば、クエン酸）、界面活性剤（例えば、Tween（登録商標）20、トリトン-X、SDS）、またはブロッキング剤（例えば、tRNA、サケ精子DNA、BSA、フィコール、ポリビニルピロリドン（polyvinylpyrrolidone）、ヘパリン）を挙げることができる。洗浄用緩衝液を洗浄温度（例えば、25～80℃）と組み合わせることで、洗浄の厳密性を最適化することができる。

【0138】

正確度および精度の高い標的定量化

いくつかの実施形態では、HCRプローブおよびHCRアンプリファイアは、解剖学的背景での標的分子の定量分析を可能にし、1イメージングボクセル当たりの標的分子の数におよそ比例して変化するシグナルを生成する。この定量的な特性は、イメージングの際に3つのレベルで起こるシグナルの総和から得られる：

1）標的分子ごとの1もしくは複数のイニシエーター標識プローブまたは標的分子ごとの1もしくは複数のプローブユニット（2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む）の総和。

2）イニシエーター標識プローブに、または、完全イニシエーターを共局在化する分割イニシエータープローブのプローブユニットに係留された増幅重合体ごとの複数のHCR増幅ヘアピンの総和。

3）イメージングピクセル中の0、1、またはそれ以上の標的分子の総和。

隣接ピクセルの強度の平均となるイメージングボクセルを規定することで、細胞内解像度を維持しながらも、定量精度をさらに増加させることができる。例えば、細胞内解像度での、正確度および精度の高い定量的画像化が、図11A～図11BではmRNA標的の場合で、また、図41A～図41Cではタンパク質標的の場合で、示されている。HCRシグナルの定量的性質は、HCRプローブの結合特性、HCR増幅ヘアピンの重合特性、および中心極限定理から得られ、画像取得時および取得後の総和および平均化を活かして、標的量におよそ比例して変化するシグナルを生成する。同じ定量特性が、データ収集時および／またはデータ収集後（例えば、フローサイトメーターまたはプロットスキャナーによる）に総和および／または平均化が行われる他のアッセイ形式に適用される。

【0139】

イニシエーター標識プローブを用いた多重化

いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブを含むHCRプローブセットおよびHCRヘアピンを含むHCRアンプリファイアを、多重標的分析（例えば、イメージング、プロッティング、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、ゲル分析、または任意の他の分析様式を介した標的分析）に使用することができ、複数の標的が同一試料内で同時に分析される。対象となるN個の標的種の一部または全てと、0、1、またはそれ以上の追加の対象でないオフターゲット種を含む試料について考える。各標的は、コグネイトな標的と選択的に結合する1または複数のイニシエーター標識プローブ（各々は1または複数のHCRイニシエーターを含む）を含むプローブセットを用いて検出することができる。いくつかの実施形態では、N個の標的種ごとのプローブセットを、HCRアンプリファイアごとに異なるHCRイニシエーターで標識する。例えば、標的1は、HCRアンプリファイア1用のHCRイニシエーターで標識されたプローブセット1で検出することができ、標的2は、HCRアンプリファイア2用のHCRイニシエーターで標識されたプローブセット2で検出することができるなど、プローブセットNがHCRアンプリファイアN用のHCRイニシエーターで標識される。

【0140】

いくつかの実施形態では、N個のプローブセットは、他のプローブセットおよび／または標的が試料内に存在しているか否かに関わらず、各プローブセットがそのコグネイトな標的と選択的に結合するように、オルソゴナルに作動する。いくつかの実施形態では、N個のアンプリファイアは、1）各アンプリファイア用のヘアピンがコグネイトなHCRイ

ニシエーターの非存在下では準安定に共存するように、且つ、2) 各アンプリファイアが、他のアンプリファイアが試料内に存在しているか否かに関わらず、コグネイトなイニシエーターが存在しているならば選択的に惹起され重合するように、オルソゴナルに作動する。

【0141】

いくつかの実施形態では、分析法が、他の標識が試料内に存在しているか否かに関わらず、各HCRアンプリファイアによって生成されたシグナルを測定できるように、各HCRアンプリファイアによって担持される標識はオルソゴナルである（例えば、蛍光顕微鏡法を用いて識別できる蛍光ラベル、または、マスサイトメトリーを用いて識別できる希土類標識）。

10

【0142】

例えば、イニシエーター標識プローブと、全ての標的に対する同時HCRシグナル増幅を用いた多重イメージングを、図29、図30、図41、および図43に示す。

【0143】

いくつかの実施形態では、N個の標的種（種類 $j = 1, \dots, N$ ）に対する多重標的分析は、以下の通りに達成できる：

1. N個のオルソゴナルなHCRイニシエーター標識プローブセットを用いて、全ての標的を同時に検出する（標的種 $j = 1, \dots, N$ の場合、プローブセット j のイニシエーター標識プローブが標的 j に結合する）、
2. N個のオルソゴナルなHCRアンプリファイアを用いて、全ての標的種のシグナルを同時に増幅する（ $j = 1, \dots, N$ の場合、アンプリファイア j からのヘアピンがイニシエーター j に応答して重合し、標的タイプ j に係留された増幅重合体 j を形成する）、
3. 標的種 $j = 1, \dots, N$ の場合、測定装置を用いて試料を分析し、アンプリファイア j の1もしくは複数ヘアピンによって直接担持される、または、アンプリファイア j の1もしくは複数のヘアピンに間接的に結合している、レポーター j を検出する。

20

【0144】

分割イニシエータープローブを用いた多重化

いくつかの実施形態では、分割イニシエータープローブを含むHCRプローブセットおよびHCRヘアピンを含むHCRアンプリファイアを、多重標的分析（例えば、イメージング、プロッティング、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、ゲル分析、または任意の他の分析様式を介した標的分析）に使用することができ、複数の標的が同一試料内で同時に分析される。対象となるN個の標的種の一部または全てと、0、1、またはそれ以上の追加の対象でないオフターゲット種を含む試料について考える。各標的は、それぞれの結合したプローブユニットが完全HCRイニシエーターを共局在化させるように、コグネイトな標的と選択的に結合する1または複数のプローブユニット（各々は2個以上の分割イニシエータープローブを含む）を含むプローブセットを用いて検出することができる。いくつかの実施形態では、N個の標的種ごとのプローブセットが、HCRアンプリファイアごとに異なる完全HCRイニシエーターを共局在化させる。例えば、標的1は、HCRアンプリファイア1用の1または複数の完全HCRイニシエーターを共局在化させるプローブセット1で検出することができ、標的2は、HCRアンプリファイア2用の1または複数の完全HCRイニシエーターを共局在化させるプローブセット2で検出することができるなど、プローブセットNがHCRアンプリファイアN用の1または複数の完全HCRイニシエーターを共局在化させる。

30

40

【0145】

いくつかの実施形態では、N個のプローブセットは、他のプローブセットおよび／または標的が試料内に存在しているか否かに関わらず、各プローブセットがそのコグネイトな標的と選択的に結合するように、オルソゴナルに作動する。いくつかの実施形態では、N個のアンプリファイアは、1) 各アンプリファイア用のヘアピンがコグネイトな標的によって共局在化したコグネイトな完全イニシエーターの非存在下では準安定に共存するように、且つ、2) 各アンプリファイアが、他のアンプリファイアが試料内に存在しているか

50

否かに関わらず、コグネイトな完全イニシエーターがそのコグネイトな標的によって共局在化しているならば選択的に惹起され重合するように、オルソゴナルに作動する。

【0146】

いくつかの実施形態では、分析法が、他の標識が試料内に存在しているか否かに関わらず、各HCRアンプリファイアによって生成されたシグナルを測定できるように、各HCRアンプリファイアによって担持される標識はオルソゴナルである（例えば、蛍光顕微鏡法を用いて識別できる蛍光ラベル、または、マスサイトメトリーを用いて識別できる希土類標識）。

【0147】

例えば、分割イニシエータープローブと、全ての標的に対する同時HCRシグナル増幅を用いた多重イメージングを、図10および図11に示す。

【0148】

いくつかの実施形態では、N個の標的種（種類 $j = 1, \dots, N$ ）に対する多重標的分析は、以下の通りに達成できる：

1. N個のオルソゴナルなHCR分割イニシエータープローブセットを用いて、全ての標的を同時に検出する（標的種 $j = 1, \dots, N$ の場合、プローブセット j のプローブユニットごとに完全HCRイニシエーター j を共局在化させるように、プローブセット j の分割イニシエータープローブが標的 j に結合する）、

2. N個のオルソゴナルなHCRアンプリファイアを用いて、全ての標的種のシグナルを同時に増幅する（ $j = 1, \dots, N$ の場合、アンプリファイア j からのヘアピンが完全HCRイニシエーター j に応答して重合し、標的タイプ j に係留された増幅重合体 j を形成する）、

3. 標的種 $j = 1, \dots, N$ の場合、測定装置を用いて試料を分析し、アンプリファイア j の1もしくは複数ヘアピンによって直接担持される、または、アンプリファイア j の1もしくは複数のヘアピンに間接的に結合している、レポーター j を検出する。

【0149】

イニシエーター標識プローブと分割イニシエータープローブの組み合わせを用いた多重化

いくつかの実施形態では、1または複数の標的（種類が異なる可能性がある）を検出するためにイニシエーター標識プローブを用いて、また、1または複数の他の標的（種類が異なる可能性がある）を検出するために分割イニシエータープローブを用いて、試料において多重分析を行う。例えば、同じ試料において、1または複数のタンパク質標的および1または複数のスモールRNA標的は、オルソゴナルなイニシエーター標識プローブで検出することができ、1または複数のmRNA標的および／またはDNA標的は、オルソゴナルな分割イニシエータープローブで検出することができ、1または複数の複合体標的（2個以上の非共有結合的に連結した分子の複合体を含む）は分割イニシエータープローブで検出することができる。いくつかの実施形態では、標的ごとのプローブセット（1または複数のイニシエーター標識プローブまたは2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む）は、オルソゴナルなシグナルを（直接的または間接的に）生成するオルソゴナルなHCRアンプリファイアを惹起する。いくつかの実施形態では、HCRシグナル増幅を全ての標的種に対して同時に行う。

【0150】

例えば、1または複数の標的用のイニシエーター標識プローブおよび1または複数の標的用の分割イニシエータープローブと、全ての標的に対する同時HCRシグナル増幅を用いた多重イメージングを、図31および図32に示す。

【0151】

スペクトルイメージングを用いた多重化

いくつかの実施形態では、スペクトル分析を用いて、互いに識別可能な標識の数を増やすことができる。例えば、2つのフルオロフォアは、帯域フィルターを用いた発光強度の測定がその2つの標識を識別できないような重なり合う発光スペクトルを有する場合、標

10

20

30

40

50

識の発光スペクトルが相当に重なり合っている異なる波長における複数の発光測定を用いて2つの標識由来のシグナルを識別するスペクトルイメージングを用いて、識別することができる。スペクトルイメージングを用いて、いくつかの実施形態では、10種の蛍光色素のスペクトル識別が可能であり、または、20種の蛍光色素のスペクトル識別が可能であり、または、30種以上の蛍光色素のスペクトル識別が可能である。

【0152】

マルチレポーター重合体を用いたハイブリッドスペクトルを用いた多重化

HCR重合はH1重合工程とH2重合工程を交互に行うことで進行するため、得られるHCR増幅重合体は、1)同数のH1ヘアピンおよびH2ヘアピンを含むか、2)H1ヘアピンを1つ多く含むか、または3)H2ヘアピンを1つ多く含む。重合体の長さが増加するにつれて、重合体におけるH1ヘアピンの割合は0.5に近づき、重合体におけるH2ヘアピンの割合も0.5に近づく。いくつかの実施形態では、ヘアピンH1をレポーターR1で標識し、ヘアピンH2をレポーターR2で標識する。HCR増幅重合体によって生成されるシグナルは、新規のハイブリッドスペクトルを有するレポーターR1およびレポーターR2によって生成される1:1ブレンドのシグナルである。別々のスペクトルを有するN個のレポーターセットについて考える。N個のレポーターを用いることで、N個のレポーターセットから選択することができる異なるレポーター対の数に相当する、 $N * (N - 1) / 2$ 個のハイブリッドスペクトルをつくることができる。例えば：1)6個のレポーターでは、 $6 * 5 / 2 = 15$ 個のハイブリッドレポータースペクトルをつくるのが可能であり、2)8個のレポーターでは、 $8 * 7 / 2 = 28$ 個のハイブリッドレポータースペクトルをつくるのが可能であり、3)15個のレポーターでは、 $15 * 14 / 2 = 105$ 個のハイブリッドレポータースペクトルをつくるのが可能であり、4)50個のレポーターでは、 $50 * 49 / 2 = 1225$ 個のハイブリッドレポータースペクトルをつくるのが可能であり、5)100個のレポーターでは、 $100 * 99 / 2 = 4950$ 個のハイブリッドレポータースペクトルをつくるのが可能である。

【0153】

NUPACKを用いたオルソゴナルなHCRアンプリファイアのコンピュータ配列設計
いくつかの実施形態では、一連のオルソゴナルなHCRアンプリファイア（基質および／または補助鎖を有する、またはそれを有さない）は、NUPACKソフトウェアスイートに含まれる反応経路デザイナーを用いて設計される⁵⁶、⁵⁷。いくつかの実施形態では、配列設計は、反応経路における要素ステップを表すとともに、グローバルなクロストークをモデル化するために、一連のターゲットテストチューブを用いた多状態最適化問題として定式化される⁵⁶。いくつかの実施形態では、各要素ステップチューブは、所与のステップの経路上ハイブリダイゼーション産物に相当する一連の望ましいオンターゲット複合体（各々は標的二次構造および標的濃度を有する）、並びに、所与の工程の経路上反応物および経路外ハイブリダイゼーションクロストークに相当する一連の望ましくないオフターゲット複合体（各々は消失しつつある標的濃度を有する）を含む⁵⁶。このシナリオでは、これらの要素ステップチューブは、コグネイトな反応物のコグネイトな生成物への完全変換を促し、これらの同じ反応物間の局所的なハイブリダイゼーションクロストークに対抗する。いくつかの実施形態では、N個のオルソゴナルな系を同時に設計するために、要素ステップチューブはオルソゴナルな系ごとに指定される。いくつかの実施形態では、系間の経路外相互作用に対抗して設計するために、1つのグローバルクロストークチューブも指定される⁵⁶。いくつかの実施形態では、グローバルクロストークチューブでは、オンターゲット複合体は、全ての系の全ての要素ステップの間に生成される全ての反応性種に相当する（例えば、重合を介して開いたHCRヘアピンの一本鎖アウトプットドメイン）。いくつかの実施形態では、グローバルクロストークチューブでは、オフターゲットの複合体は、これらの反応性種間の非コグネイト相互作用に相当する。いくつかの実施形態では、グローバルクロストークチューブ集団は、反応性種が形成することを意図されているコグネイトな生成物（オンターゲットにもオフターゲットにも見えない）を除外している。このシナリオでは、グローバルクロストークチューブ内の全ての反応性種は、

強制的に、反応を行わない（望ましいオンターゲットとして残る）ように、またはクロストーク反応（望ましくないオフターゲットを形成する）を行うようにすることができ、配列最適化の際のグローバルクロストークを最小化するための礎となる。いくつかの実施形態では、配列設計は、反応経路に固有の相補性の束縛を受けて行われる（例えば、図1Aでは、ドメイン「a」はドメイン「a*」に相補的であり、ドメイン「b」はドメイン「b*」に相補的である）^{5 6}。いくつかの実施形態では、配列は、マルチチューブアンサンプルにわたり誤対合したヌクレオチドの平均割合を定量化するアンサンプルディフェクトを低減することによって最適化される^{5 6}。いくつかの実施形態では、ディフェクトの重さをアンサンプルディフェクト内に適用し、設計エフォートを優先する^{5 6}。アンサンプルディフェクトの最適化は、経路上要素ステップを明示的に設計するポジティブ設計パラダイムと、経路外クロストークに対抗して明示的に設計されるネガティブ設計パラダイムの両方を実行する^{5 6}。

10

【0154】

反復レポーター検出を用いた多重化

いくつかの実施形態では、同じN個の標識を用いて連続的な分析ラウンドにおいて複数の標的を検出し、試料内で分析できる標的の数を増やすことができる。例えば、N個の標的を、N個の標識を用いてイメージングした後、シグナルを試料から除去し、同じN個の標識を用いて別の一連のN個の標的を検出することができる。このアプローチは、1) 各種標的種の発現レベルが高い、低い、標的種内で変動する、および／または異なる標的種間で変動するかどうかに関わらず、2) 各種標的種の発現パターンが試料内で空間的にオーバーラップしているか、またはオーバーラップしていないかに関わらず、同じ試料中の複数の標的種をイメージングするために適用可能である。反復レポーター検出を用いる多重分析の方法の例としては、下記の方法A～Tに記載されるものが挙げられるが、これらに限定はされない。いくつかの実施形態では、下記の方法A～Tの工程の1つ、複数、および／または全てにおいて、プローブ種の選択は、異なる標的ごとに異ならせることができ、所望により、任意のプロセスの中で混ぜることができる。方法A～Tのいくつかの実施形態では、1) 全ての標的をイニシエーター標識プローブで検出してもよいし、あるいは、2) 全ての標的を分割イニシエータープローブで検出してもよいし、あるいは、3) 1または複数の標的をイニシエーター標識プローブで検出し、他の標的を分割イニシエータープローブで検出してもよい。このように、本明細書における一方の選択肢の開示は、他方の選択肢、およびそれらを組み合わせた選択肢を提供している。例えば、「a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、またはb) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含むN個のプローブセットを準備すること」という記載は、N個のプローブセットのうちの任意の1つがどちらかのタイプ（aまたはb）である可能性を意味しており、全てのプローブセットが同じタイプである（全てタイプaまたは全てタイプbである）可能性と、一部のプローブセットが一方のタイプであり、一部のプローブセットが他方のタイプである（一部がタイプaであり、一部がタイプbである）可能性を含む。本明細書の開示において、この文脈で「または…のいずれか」が示される実施形態のいずれについても、上記のタイプは混ぜることができる（特に記載がない限り）ことが理解される。

20

30

40

【0155】

いくつかの実施形態では、以下の方法A～Tのいずれか1つは、CARD、酵素非活性化、および／または反復CARDと組み合わせることができる。「所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復CARDによるさらなる改変がなされた」という表現が使用される場合、論じられている実施形態のいずれも、CARD、酵素非活性化、および／または反復CARDを含む論じられた実施形態のいずれか1つまたは複数と組み合わせることもできることを述べている。これは、本明細書で提供される種々の方法のさらなる組み合わせを明示的に可能にするものである。同様に、「所望により、多重化、CARD、酵素非活性化、反復CARD、反復レポーター検出、および／または反復シグナル除去によるさらなる改変がなされた」という表現が使用される場合、論じられている実

50

施形態のいずれも、多重化、CARD、酵素非活性化、反復CARD、反復レポーター検出、および／または反復シグナル除去を含む論じられた実施形態のいずれか1つまたは複数と組み合わせることもできることを述べている。これらの表現は、他の開示部分を反復するのではなく参照によって依拠することで、開示を簡略化するための略記法として使用されている。

【0156】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の方法のいずれか1つまたは複数の任意選択の工程は、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の方法のいずれか1つまたは複数の他の任意選択の工程と組み合わせることができる。

【0157】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の方法によって異なるいずれか1つまたは複数の工程は、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の方法によって異なるいずれか1つまたは複数の他の工程と組み合わせることができる。

【0158】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の方法によって異なるいずれか1つまたは複数の任意選択の工程は、本明細書におけるいずれか1つまたは複数の方法によって異なるいずれか1つまたは複数の他の任意選択の工程と組み合わせることができる。

【0159】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法A（実施例15）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復CARDによるさらなる改変が可能である）である：

1. 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、またはb) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. レポーターで標識されたHCRアンプリファイアを準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 上記レポーターからのシグナルを検出すること。

【0160】

いくつかの実施形態では、方法A（実施例15）は、工程A1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程A2：所望により、上記試料を固定すること；工程A3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程A4：a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエータープローブ（例えば、図3、図4、図5、および図17のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図16のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備すること；工程A5：所望により上記試料を洗浄すること；工程A6：レポーターで標識されたHCRアンプリファイアを準備すること（例えば、図8および図18のレポーター標識アンプリファイアを参照）；工程A7：所望により上記試料を洗浄すること；工程A8：上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む（図26A参照）。

【0161】

いくつかの実施形態では、方法A（例えば、その一例は実施例15に示されている）は、工程A1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程A2：上記試料を固定すること；工程A3：上記試料を透過処理すること；工程A4：a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、

10

20

30

40

50

図 4 1 A、図 4 2 A～4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ (例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニットを参照) をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット (例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照) のいずれかを含有するプローブセットを準備すること; 工程 A 5: 上記試料を洗浄すること; 工程 A 6: レポーターで標識された H C R アンプリファイアを準備すること (例えば、図 8 および図 1 8 のレポーター標識アンプリファイアを参照); 工程 A 7: 上記試料を洗浄すること; 工程 A 8: 上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む (図 2 6 A 参照)。

【0162】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法としては、以下を含む方法 B (例えば、実施例 1 6) (所望により、C A R D、酵素非活性化、および/または反復 C A R D によるさらなる改変が可能である) が挙げられる:

10

1. 最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む N 個のプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. 上記 N 個のプローブセットに対応する、N 個の H C R アンプリファイアを準備すること (各々は別々のレポーターで標識されている)
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 上記 N 個の別々のレポーターからの N 個のシグナルを検出すること。

20

【0163】

いくつかの実施形態では、方法 B (例えば、実施例 1 6) は、工程 B 1: 最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること; 工程 B 2: 所望により、上記試料を固定すること; 工程 B 3: 所望により、上記試料を透過処理すること; 工程 B 4: a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ (例えば、図 3 9 A～3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A～4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ (例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニットを参照) をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット (例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照)、のいずれかをそれぞれ含む N 個のプローブセットを準備すること; 工程 B 5: 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 B 6: 上記 N 個のプローブセットに対応する、N 個の H C R アンプリファイアを準備すること (各々は別々のレポーターで標識されている) (例えば、図 8 および図 1 8 のレポーター標識 H C R アンプリファイアを参照); 工程 B 7: 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 B 8: 上記 N 個の別々のレポーターからの N 個のシグナルを検出すること、を含む (図 2 6 B 参照)。

30

【0164】

いくつかの実施形態では、方法 B (例えば、実施例 1 6) は、工程 B 1: 最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること; 工程 B 2: 上記試料を固定すること; 工程 B 3: 上記試料を透過処理すること; 工程 B 4: a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ (例えば、図 3 9 A～3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A～4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ (例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニットを参照) をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット (例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照) のいずれかをそれぞれ含む N 個のプローブセットを準備すること; 工程 B 5: 上記試料を洗浄すること; 工程 B 6: 上記 N 個のプローブセットに対応する、N 個の H C R アンプリファイアを準備すること (各々は別々のレポーターで標識されている) (例えば、図 8 および図 1 8 のレポーター標識 H C R アンプリファイアを参照);

40

50

工程 B 7 : 上記試料を洗浄すること ; 工程 B 8 : 上記 N 個の別々のレポーターからの N 個のシグナルを検出すること、を含む (図 2 6 B 参照) 。

【 0 1 6 5 】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法 C (例えば、実施例 1 7) (所望により、CARD、酵素非活性化、および / または反復 CARD によるさらなる改変が可能である) である :

- 1 . 最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する
- 2 . 所望により、上記試料を固定すること
- 3 . 所望により、上記試料を透過処理すること
- 4 . a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセット (上記 N 個の標的種のうちの 1 つを標的にする) を準備すること
- 5 . 所望により上記試料を洗浄すること
- 6 . 上記準備されたプローブセットに対応する HCR アンプリファイア (レポーターで標識されている) を準備すること
- 7 . 所望により上記試料を洗浄すること
- 8 . 上記レポーターからのシグナルを検出すること
- 9 . 上記シグナルを上記試料から除去すること
- 1 0 . 所望により、N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 C 4 ~ C 9 のうちの 1 または複数を反復すること。

10

20

【 0 1 6 6 】

いくつかの実施形態では、方法 C (例えば、実施例 1 7) は、工程 C 1 : 最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること ; 工程 C 2 : 所望により、上記試料を固定すること ; 工程 C 3 : 所望により、上記試料を透過処理すること、工程 C 4 : a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ (例えば、図 3 9 A ~ 3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A ~ 4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ (例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニットを参照) をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット (例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照)、のいずれかを含むプローブセット (上記 N 個の標的種のうちの 1 つを標的にする) を準備すること ; 工程 C 5 : 所望により上記試料を洗浄すること、工程 C 6 : 上記準備されたプローブセットに対応する HCR アンプリファイア (レポーターで標識されている) (例えば、図 8 および図 1 8 のレポーター標識 HCR アンプリファイアを参照) を準備すること ; 工程 C 7 : 所望により上記試料を洗浄すること、工程 C 8 : 上記レポーターからのシグナルを検出すること ; 工程 C 9 : 上記シグナルを上記試料から除去すること (例えば、図 2 3 参照) ; 工程 C 1 0 : 所望により、N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 C 4 ~ C 9 のうちの 1 または複数を反復すること、を含む (図 2 6 C 参照) 。

30

【 0 1 6 7 】

いくつかの実施形態では、方法 C (例えば、実施例 1 7) は、工程 C 1 : 最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること ; 工程 C 2 : 上記試料を固定すること ; 工程 C 3 : 上記試料を透過処理すること、工程 C 4 : a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ (例えば、図 3 9 A ~ 3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A ~ 4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ (例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニットを参照) をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット (例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照)、のいずれかを含むプローブセット (上記 N 個の標的種のうちの 1 つを標的にする) を準備すること ; 工程 C 5 : 上記試料を洗浄すること、工程 C 6 : 上記準備されたプローブセットに対応する HCR アンプリファイア (レポーターで標識されている) (例えば、図 8 および図 1 8 のレポーター標識 HCR アンプリファイアを参照) を準備すること ; 工程 C 7 : 上記試料を洗浄すること、工程 C 8 : 上記レポーターからの

40

50

シグナルを検出すること；工程 C 9：上記シグナルを上記試料から除去すること（例えば、図 2 3 参照）；工程 C 1 0：N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 C 4～C 9 のうちの 1 または複数を反復すること、を含む（図 2 6 C 参照）。

【0168】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法 D（例えば、実施例 1 8）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復 CARD によるさらなる改変が可能である）である：

1. 最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む M 個のプローブセット ($M \leq N$ の場合；各々は M 個の標的種のうちの 1 つを標的にする) を準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. 上記 M 個のプローブセットに対応する、M 個の HCR アンプリファイア（各々は別々のレポーターで標識されている）を準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 上記 M 個の別々のレポーターに対応する M 個のシグナルを検出すること
9. 上記 M 個のシグナルを上記試料から除去すること
10. 所望により、N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 4～9 のうちの 1 または複数を反復すること。

10

20

【0169】

いくつかの実施形態では、方法 D（例えば、実施例 1 8）は、工程 D 1：最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 D 2：所望により、上記試料を固定すること；工程 D 3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程 D 4：a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ（例えば、図 3 9 A～3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A～4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む M 個のプローブセット ($M \leq N$ の場合；各々は M 個の標的種のうちの 1 つを標的にする) を準備すること；工程 D 5：所望により上記試料を洗浄すること；工程 D 6：上記 M 個のプローブセットに対応する、M 個の HCR アンプリファイア（各々は別々のレポーターで標識されている）（例えば、図 8 および図 1 8 のレポーター標識 HCR アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 D 7：所望により上記試料を洗浄すること；工程 D 8：上記 M 個の別々のレポーターに対応する M 個のシグナルを検出すること；工程 D 9：上記 M 個のシグナルを上記試料から除去すること（例えば、図 2 3 参照）；工程 D 1 0：所望により、N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 4～9 のうちの 1 または複数を反復すること、を含む（図 2 6 D 参照）。

30

40

【0170】

いくつかの実施形態では、方法 D（例えば、実施例 1 8）は、工程 D 1：最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 D 2：上記試料を固定すること；工程 D 3：上記試料を透過処理すること；工程 D 4：a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ（例えば、図 3 9 A～3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A～4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む M 個のプローブセット ($M \leq N$ の場合；各々は M 個の標的種のうちの 1 つを標的にする) を準備すること；工程 D 5：上記試

50

料を洗浄すること；工程 D 6：上記 M 個のプローブセットに対応する、M 個の H C R アンプリファイア（各々は別々のレポーターで標識されている）（例えば、図 8 および図 1 8 のレポーター標識 H C R アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 D 7：上記試料を洗浄すること；工程 D 8：上記 M 個の別々のレポーターに対応する M 個のシグナルを検出すること；工程 D 9：上記 M 個のシグナルを上記試料から除去すること（例えば、図 2 3 参照）；工程 D 1 0：N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 4 ～ 9 のうちの 1 または複数を反復すること、を含む（図 2 6 D 参照）。

【0 1 7 1】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法 E（例えば、実施例 1 9）（所望により、C A R D、酵素非活性化、および／または反復 C A R D によるさらなる改変が可能である）である：

10

1. 最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む N 個のプローブセット（各々は N 個の標的種のうちの 1 つを標的とする）を準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. 上記プローブセットのうちの 1 つに対応する H C R アンプリファイア（レポーターで標識されている）を準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 上記レポーターからのシグナルを検出すること
9. 上記シグナルを上記試料から除去すること
- 1 0. 所望により、N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 6 – 9 のうちの 1 または複数を反復すること。

20

【0 1 7 2】

いくつかの実施形態では、方法 E（例えば、実施例 1 9）は、工程 E 1：最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 E 2：所望により、上記試料を固定すること；工程 E 3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程 E 4：a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 3 9 A ～ 3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A ～ 4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む N 個のプローブセット（各々は N 個の標的種のうちの 1 つを標的とする）を準備すること；工程 E 5：所望により上記試料を洗浄すること；工程 E 6：上記プローブセットのうちの 1 つに対応する H C R アンプリファイア（レポーターで標識されている）（例えば、図 8 および図 1 8 のレポーター標識アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 E 7：所望により上記試料を洗浄すること；工程 E 8：上記レポーターからのシグナルを検出すること；工程 E 9：上記シグナルを上記試料から除去すること（例えば、図 2 3 参照）；工程 E 1 0：所望により、N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 6 – 9 のうちの 1 または複数を反復すること、を含む（図 2 6 E 参照）。

30

40

【0 1 7 3】

いくつかの実施形態では、方法 E（例えば、実施例 1 9）は、工程 E 1：最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 E 2：上記試料を固定すること；工程 E 3：上記試料を透過処理すること；工程 E 4：a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 3 9 A ～ 3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A ～ 4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニット

50

を参照)をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット(例えば、図8および図16のプローブセットを参照)、のいずれかをそれぞれ含むN個のプローブセット(各々はN個の標的種のうちの1つを標的とする)を準備すること;工程E5:上記試料を洗浄すること;工程E6:上記プローブセットのうちの1つに対応するHCRアンプリファイア(レポーターで標識されている)(例えば、図8および図18のレポーター標識アンプリファイアを参照)を準備すること;工程E7:上記試料を洗浄すること;工程E8:上記レポーターからのシグナルを検出すること;工程E9:上記シグナルを上記試料から除去すること(例えば、図23参照);工程E10:N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程6~9のうちの1または複数を反復すること、を含む(図26E参照)。

【0174】

10

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法F(例えば、実施例20)(所望により、CARD、酵素非活性化、および/または反復CARDによるさらなる改変が可能である)である:

1. 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含むN個のプローブセット(各々はN個の標的種のうちの1つを標的とする)を準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. 上記N個のプローブセットのうちのM個に対応する、M個のHCRアンプリファイア($M \leq N$ の場合;各々は別々のレポーターで標識されている)を準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 上記M個のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること
9. 上記M個のシグナルを上記試料から除去すること
10. 所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程6~9のうちの1または複数を反復すること。

20

【0175】

いくつかの実施形態では、方法F(例えば、実施例20)は、工程F1:最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること;工程F2:所望により、上記試料を固定すること;工程F3:所望により、上記試料を透過処理すること;工程F4:a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ(例えば、図39A~39N、図41A、図42A~42F、および図43Aのプローブを参照)、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエータープローブ(例えば、図3、図4、図5、および図17のプローブユニットを参照)をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット(例えば、図8および図16のプローブセットを参照)、のいずれかをそれぞれ含むN個のプローブセット(各々はN個の標的種のうちの1つを標的とする)を準備すること;工程F5:所望により上記試料を洗浄すること;工程F6:上記N個のプローブセットのうちのM個に対応する、M個のHCRアンプリファイア($M \leq N$ の場合;各々は別々のレポーターで標識されている)(例えば、図8および図18のレポーター標識アンプリファイアを参照)を準備すること;工程F7:所望により上記試料を洗浄すること;工程F8:上記M個のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること;工程F9:上記M個のシグナルを上記試料から除去すること(例えば、図23参照);工程F10:所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程6~9のうちの1または複数を反復すること、を含む(図26F参照)。

30

40

【0176】

いくつかの実施形態では、方法F(例えば、実施例20)は、工程F1:最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること;工程F2:上記試料を固定すること;工程F3:上記試料を透過処理すること;工程F4:a) 1または

50

複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 3 9 A ～ 3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A ～ 4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む N 個のプローブセット（各々は N 個の標的種のうちの 1 つを標的とする）を準備すること；工程 F 5：上記試料を洗浄すること；工程 F 6：上記 N 個のプローブセットのうちの M 個に対応する、M 個の H C R アンプリファイア（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターで標識されている）（例えば、図 8 および図 1 8 のレポーター標識アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 F 7：上記試料を洗浄すること；工程 F 8：上記 M 個のレポーターに対応する M 個のシグナルを検出すること；工程 F 9：上記 M 個のシグナルを上記試料から除去すること（例えば、図 2 3 参照）；工程 F 1 0：N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 6 ～ 9 のうちの 1 または複数の反復すること、を含む（図 2 6 F 参照）。

10

【0 1 7 7】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法 G（例えば、実施例 2 1）（所望により、C A R D、酵素非活性化、および／または反復 C A R D によるさらなる改変が可能である）である：

1. 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む 1 または複数のプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. 1 または複数の H C R アンプリファイア（各々は 1 または複数のレポーターで標識されている）を準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 1 または複数のレポーターからの 1 または複数のシグナルを検出すること
9. 所望により、1 または複数のプローブセットを上記試料から除去すること
- 1 0. 所望により、1 または複数の H C R アンプリファイアを上記試料から除去すること
- 1 1. 所望により、1 または複数のレポーターを上記試料から除去すること
- 1 2. 所望により、1 または複数のシグナルを上記試料から除去すること
- 1 3. 所望により、工程 2 ～ 1 2 のいずれかを任意の順序で 1 回または複数回反復すること。

20

30

【0 1 7 8】

いくつかの実施形態では、方法 G（例えば、実施例 2 1）は、工程 G 1：1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 G 2：所望により、上記試料を固定すること；工程 G 3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程 G 4：a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 3 9 A ～ 3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A ～ 4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む 1 または複数のプローブセットを準備すること；工程 G 5：所望により上記試料を洗浄すること；工程 G 6：1 または複数の H C R アンプリファイア（各々は 1 または複数のレポーターで標識されている）（例えば、図 8 および図 1 8 のレポーター標識 H C R アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 G 7：所望により上記試料を洗浄すること；工程 G 8：1 または複数のレポーターからの 1 または複数のシグナルを検出すること；工程 G 9：所望により、1 または複数のプローブセットを上記試料から除去すること；工程 G 1 0；

40

50

所望により、1または複数のH C Rアンプリファイアを上記試料から除去すること；工程G 1 1：所望により、1または複数のレポーターを上記試料から除去すること；工程G 1 2：所望により、1または複数のシグナルを上記試料から除去すること（例えば、図2 3参照）；工程G 1 3：所望により、工程2～1 2のいずれかを任意の順序で1回または複数回反復すること、を含む（図2 6 G参照）。

【0 1 7 9】

いくつかの実施形態では、方法G（例えば、実施例2 1）は、工程G 1：1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程G 2：上記試料を固定すること；工程G 3：上記試料を透過処理すること；工程G 4：a）1または複数のH C Rイニシエーター標識プローブ（例えば、図3 9 A～3 9 N、図4 1 A、図4 2 A～4 2 F、および図4 3 Aのプローブを参照）、または、b）2個以上のH C R分割イニシエータープローブ（例えば、図3、図4、図5、および図1 7のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図1 6のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む1または複数のプローブセットを準備すること；工程G 5：上記試料を洗浄すること；工程G 6：1または複数のH C Rアンプリファイア（各々は1または複数のレポーターで標識されている）（例えば、図8および図1 8のレポーター標識H C Rアンプリファイアを参照）を準備すること；工程G 7：上記試料を洗浄すること；工程G 8：1または複数のレポーターからの1または複数のシグナルを検出すること；工程G 9：1または複数のプローブセットを上記試料から除去すること；工程G 1 0：1または複数のH C Rアンプリファイアを上記試料から除去すること；工程G 1 1：1または複数のレポーターを上記試料から除去すること；工程G 1 2：1または複数のシグナルを上記試料から除去すること（例えば、図2 3参照）；工程G 1 3：工程2～1 2のいずれかを任意の順序で1回または複数回反復すること、を含む（図2 6 G参照）。

【0 1 8 0】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法H（例えば、実施例2 2）（所望により、C A R D、酵素非活性化、および／または反復C A R Dによるさらなる改変が可能である）である：

1. 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a）1または複数のH C Rイニシエーター標識プローブ、またはb）2個以上のH C R分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかを含有するプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. 基質で標識されたH C Rアンプリファイアを準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること
9. 所望により上記試料を洗浄すること
- 1 0. 上記レポーターからのシグナルを検出すること。

【0 1 8 1】

いくつかの実施形態では、方法H（例えば、実施例2 2）は、工程H 1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程H 2：所望により、上記試料を固定すること；工程H 3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程H 4：a）1または複数のH C Rイニシエーター標識プローブ（例えば、図3 9 A～3 9 N、図4 1 A、図4 2 A～4 2 F、および図4 3 Aのプローブを参照）、または、b）2個以上のH C R分割イニシエータープローブ（例えば、図3、図4、図5、および図1 7のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図1 6のプローブセットを参照）、のいずれかを含有するプローブセットを準備すること；工程H 5：所望により上記試料を洗浄すること；工程H 6：基質で標識されたH C R

アンプリファイアを準備すること（例えば、図 18 の基質標識 H C R アンプリファイアを参照）；工程 H 7：所望により上記試料を洗浄すること；工程 H 8：上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること（例えば、図 20 の標識プローブを参照）；工程 H 9：所望により上記試料を洗浄すること；工程 H 10：上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む（図 26 H 参照）。

【0182】

いくつかの実施形態では、方法 H（例えば、実施例 22）は、工程 H 1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 H 2：上記試料を固定すること；工程 H 3：上記試料を透過処理すること；工程 H 4：a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A～39 N、図 41 A、図 42 A～42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備すること；工程 H 5：上記試料を洗浄すること；工程 H 6：基質で標識された H C R アンプリファイア（例えば、図 18 の基質標識 H C R アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 H 7：上記試料を洗浄すること；工程 H 8：上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図 20 の標識プローブを参照）を準備すること；工程 H 9：上記試料を洗浄すること；工程 H 10：上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む（図 26 H 参照）。

10

20

【0183】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法 I（例えば、実施例 23）（所望により、C A R D、酵素非活性化、および／または反復 C A R D によるさらなる改変が可能である）である：

1. 最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む N 個のプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. 上記 N 個のプローブセットに対応する N 個の H C R アンプリファイア（各々は別々の基質で標識されている）を準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 上記 N 個の別々の基質に対応する N 個の標識プローブ（各々は別々のレポーターに結合している）を準備すること
9. 上記 N 個の別々のレポーターからの N 個のシグナルを検出すること。

30

【0184】

いくつかの実施形態では、方法 I（例えば、実施例 23）は、工程 I 1：最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 I 2：所望により、上記試料を固定すること；工程 I 3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程 I 4：a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A～39 N、図 41 A、図 42 A～42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む N 個のプローブセットを準備すること；工程 I 5：所望により上記試料を洗浄すること；工程 I 6：上記 N 個のプローブセットに対応する N 個の H C R アンプリファイア（各々は別々の基質で標識されている）（例えば、図 18 の基質標識 H C R アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 I 7：所望により上記試料を洗浄すること；工程 I 8：上記 N 個の別々

40

50

の基質に対応するN個の標識プローブ（各々は別々のレポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備すること；工程I9：上記N個の別々のレポーターからのN個のシグナルを検出すること、を含む（図26I参照）。

【0185】

いくつかの実施形態では、方法I（例えば、実施例23）は、工程I1：最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程I2：上記試料を固定すること；工程I3：上記試料を透過処理すること；工程I4：a）1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b）2個以上のHCR分割イニシエータープローブ（例えば、図3、図4、図5、および図17のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図16のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含むN個のプローブセットを準備すること；工程I5：上記試料を洗浄すること；工程I6：上記N個のプローブセットに対応するN個のHCRアンプリファイア（各々は別々の基質で標識されている）（例えば、図18の基質標識HCRアンプリファイアを参照）を準備すること；工程I7：上記試料を洗浄すること；工程I8：上記N個の別々の基質に対応するN個の標識プローブ（各々は別々のレポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備すること；工程I9：上記N個の別々のレポーターからのN個のシグナルを検出すること、を含む（図26I参照）。

【0186】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法J（例えば、実施例24）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復CARDによるさらなる改変が可能である）である：

1. 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a）1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、またはb）2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含むN個のプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. 上記N個のプローブセットに対応するN個のHCRアンプリファイア（各々は別々の基質で標識されている）を準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 上記N個の別々の基質のうちのM個に対応するM個の標識プローブ（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターと結合している）を準備すること
9. 所望により上記試料を洗浄すること
10. 上記M個の別々のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること
11. 上記M個のシグナルを上記試料から除去すること
12. 所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程8～11のうちの1または複数を反復すること。

【0187】

いくつかの実施形態では、方法J（例えば、実施例24）は、工程J1：最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程J2：所望により、上記試料を固定すること；工程J3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程J4：a）1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b）2個以上のHCR分割イニシエータープローブ（例えば、図3、図4、図5、および図17のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図16のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含むN個のプローブセットを準備すること；工程J5：所望により上記試料を洗浄すること；工程J6

：上記 N 個のプローブセットに対応する N 個の H C R アンプリファイア（各々は別々の基質で標識されている）（例えば、図 18 の基質標識 H C R アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 J 7：所望により上記試料を洗浄すること；工程 J 8：上記 N 個の別々の基質のうちの M 個に対応する M 個の標識プローブ（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターと結合している）（例えば、図 20 の標識プローブを参照）を準備すること；工程 J 9：所望により上記試料を洗浄すること；工程 J 10：上記 M 個の別々のレポーターに対応する M 個のシグナルを検出すること；工程 J 11：上記 M 個のシグナルを上記試料から除去すること（例えば、図 23 参照）；工程 J 12：所望により、N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 J 8～J 11 のうちの 1 または複数を反復すること、を含む（図 26 J 参照）。

10

【0188】

いくつかの実施形態では、方法 J（例えば、実施例 24）は、工程 J 1：最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 J 2：上記試料を固定すること；工程 J 3：上記試料を透過処理すること；工程 J 4：a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A～39 N、図 41 A、図 42 A～42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む N 個のプローブセットを準備すること；工程 J 5：上記試料を洗浄すること；工程 J 6：上記 N 個のプローブセットに対応する N 個の H C R アンプリファイア（各々は別々の基質で標識されている）（例えば、図 18 の基質標識 H C R アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 J 7：上記試料を洗浄すること；工程 J 8：上記 N 個の別々の基質のうちの M 個に対応する M 個の標識プローブ（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターと結合している）（例えば、図 20 の標識プローブを参照）を準備すること；工程 J 9：上記試料を洗浄すること；工程 J 10：上記 M 個の別々のレポーターに対応する M 個のシグナルを検出すること；工程 J 11：上記 M 個のシグナルを上記試料から除去すること（例えば、図 23 参照）；工程 J 12：N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 J 8～J 11 のうちの 1 または複数を反復すること、を含む（図 26 J 参照）。

20

【0189】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法 K（例えば、実施例 25）（所望により、C A R D、酵素非活性化、および／または反復 C A R D によるさらなる改変が可能である）である：

30

1. 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む 1 または複数のプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. 1 または複数のプローブセットに対応する 1 または複数の H C R アンプリファイア（各々は基質で標識されている）を提供すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ（各々はレポーターに結合している）を準備すること
9. 所望により上記試料を洗浄すること
10. 1 または複数のレポーターに対応する 1 または複数のシグナルを検出すること
11. 1 または複数のシグナルを上記試料から除去すること
12. 所望により、工程 4～11 のいずれかを任意の順序で 1 回または複数回反復する

40

50

こと。

【0190】

いくつかの実施形態では、方法K（例えば、実施例25）は、工程K1：1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程K2：所望により、上記試料を固定すること；工程K3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程K4：a）1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b）2個以上のHCR分割イニシエータープローブ（例えば、図3、図4、図5、および図17のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図16のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む1または複数のプローブセットを準備すること；工程K5：所望により上記試料を洗浄すること；工程K6：1または複数のプローブセットに対応する1または複数のHCRアンプリファイア（各々は基質で標識されている）（例えば、図18の基質標識HCRアンプリファイアを参照）を提供すること；工程K7：所望により上記試料を洗浄すること；工程K8：1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々はレポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備すること；工程K9：所望により上記試料を洗浄すること；工程K10：1または複数のレポーターに対応する1または複数のシグナルを検出すること；工程K11：1または複数のシグナルを上記試料から除去すること（例えば、図23参照）；工程K12：所望により、工程K4～K11のいずれかを任意の順序で1回または複数回反復すること、を含む（図26K参照）。

10

20

【0191】

いくつかの実施形態では、方法K（例えば、実施例25）は、工程K1：1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程K2：上記試料を固定すること；工程K3：上記試料を透過処理すること；工程K4：a）1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b）2個以上のHCR分割イニシエータープローブ（例えば、図3、図4、図5、および図17のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図16のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む1または複数のプローブセットを準備すること；工程K5：上記試料を洗浄すること；工程K6：1または複数のプローブセットに対応する1または複数のHCRアンプリファイア（各々は基質で標識されている）（例えば、図18の基質標識HCRアンプリファイアを参照）を提供すること；工程K7：上記試料を洗浄すること；工程K8：1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々はレポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備すること；工程K9：上記試料を洗浄すること；工程K10：1または複数のレポーターに対応する1または複数のシグナルを検出すること；工程K11：1または複数のシグナルを上記試料から除去すること（例えば、図23参照）；工程K12：工程K4～K11のいずれかを任意の順序で1回または複数回反復すること、を含む（図26K参照）。

30

【0192】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法L（例えば、実施例26）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復CARDによるさらなる改変が可能である）である：

40

1. 1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a）1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、b）2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む1または複数のHCRプローブセットを準備すること

50

5. 1 または複数のプローブセットに対応する 1 または複数の H C R アンプリファイア（各々は 1 または複数のレポーターおよび／または 1 または複数の基質で標識されている）を準備すること
6. 所望により、1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ（各々は 1 または複数のレポーターに結合している）を準備すること
7. 1 または複数のシグナルを検出すること
8. 所望により上記試料を洗浄すること
9. 所望により、1 または複数のシグナルを上記試料から除去すること
10. 所望により、1 または複数のレポーターを上記試料から除去すること
11. 所望により、1 または複数の標識プローブを上記試料から除去すること
12. 所望により、1 または複数の H C R アンプリファイアを上記試料から除去すること
13. 所望により、1 または複数のプローブセットを上記試料から除去すること
14. 所望により、上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること。

10

20

30

【0193】

いくつかの実施形態では、方法 L（例えば、実施例 26）、工程 L 1：1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 L 2：所望により、上記試料を固定すること；工程 L 3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程 L 4：a）1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A～39 N、図 41 A、図 42 A～42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b）2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む 1 または複数の H C R プローブセットを準備すること；工程 L 5：1 または複数のプローブセットに対応する 1 または複数の H C R アンプリファイア（各々は 1 または複数のレポーターおよび／または 1 または複数の基質で標識されている）（例えば、図 8 および図 18 の H C R アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 L 6：所望により、1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ（各々は 1 または複数のレポーターに結合している）（例えば、図 20 の標識プローブを参照）を準備すること；工程 L 7：1 または複数のシグナルを検出すること；工程 L 8：所望により上記試料を洗浄すること；工程 L 9：所望により、1 または複数のシグナルを上記試料から除去すること（例えば、図 23 参照）；工程 L 10：所望により、1 または複数のレポーターを上記試料から除去すること；工程 L 11：所望により、1 または複数の標識プローブを上記試料から除去すること；工程 L 12：所望により、1 または複数の H C R アンプリファイアを上記試料から除去すること；工程 L 13：所望により、1 または複数のプローブセットを上記試料から除去すること；工程 L 14：所望により、上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること、を含む（図 26 L 参照）。

【0194】

いくつかの実施形態では、方法 L（例えば、実施例 26）は、工程 L 1：1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 L 2：上記試料を固定すること；工程 L 3：上記試料を透過処理すること；工程 L 4：a）1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A～39 N、図 41 A、図 42 A～42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b）2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む 1 または複数の H C R プローブセットを準備すること；工程 L 5：1 または複数のプローブセットに対応する 1 または複数の H C R アンプリファイア（各々は 1 または複数のレポーターおよび／または 1 または複数の基質で標識されている）（例えば、図 8 および図 18 の H C R アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 L 6：1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ（各々は 1 または複数のレポーターに結合している）（例えば、図 20 の標識プロ

40

50

ープを参照)を準備すること;工程 L 7: 1 または複数のシグナルを検出すること;工程 L 8: 上記試料を洗浄すること;工程 L 9: 1 または複数のシグナルを上記試料から除去すること(例えば、図 23 参照);工程 L 10: 1 または複数のレポーターを上記試料から除去すること;工程 L 11: 1 または複数の標識プローブを上記試料から除去すること;工程 L 12: 1 または複数の HCR アンプリファイアを上記試料から除去すること;工程 L 13: 1 または複数のプローブセットを上記試料から除去すること;工程 L 14: 上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること、を含む(図 26 L 参照)。

【0195】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法 M (例えば、実施例 27) (所望により、CARD、酵素非活性化、および/または反復 CARD によるさらなる改変が可能である)である:

10

1. 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. 工程 5 ~ 9 のいずれかを任意の順序で 1 回または複数回実行すること:
5. a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む 1 または複数の HCR プローブセットを準備すること
6. 1 または複数のシグナルを直接的または間接的に生成する 1 または複数の HCR アンプリファイアを準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 1 または複数のシグナルを検出すること
9. 所望により、1 または複数のシグナルを除去すること。

20

【0196】

いくつかの実施形態では、方法 M (例えば、実施例 27) は、工程 M 1: 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること;工程 M 2: 所望により、上記試料を固定すること;工程 M 3: 所望により、上記試料を透過処理すること;工程 M 4: 工程 M 5 ~ M 9 のいずれかを任意の順序で 1 回または複数回実行すること;工程 M 5: a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ(例えば、図 39 A ~ 39 N、図 41 A、図 42 A ~ 42 F、および図 43 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ(例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照)をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット(例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照)、のいずれかをそれぞれ含む 1 または複数の HCR プローブセットを準備すること;工程 M 6: 1 または複数のシグナルを直接的または間接的に生成する 1 または複数の HCR アンプリファイア(例えば、図 8、図 18、および図 20 を参照)を準備すること;工程 M 7: 所望により上記試料を洗浄すること;工程 M 8: 1 または複数のシグナルを検出すること;工程 M 9: 所望により、1 または複数のシグナルを除去すること(例えば、図 23 参照)、を含む(図 26 M 参照)。

30

【0197】

いくつかの実施形態では、方法 M (例えば、実施例 27) は、工程 M 1: 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること;工程 M 2: 上記試料を固定すること;工程 M 3: 上記試料を透過処理すること;工程 M 4: 工程 M 5 ~ M 9 のいずれかを任意の順序で 1 回または複数回実行すること;工程 M 5: a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ(例えば、図 39 A ~ 39 N、図 41 A、図 42 A ~ 42 F、および図 43 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ(例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照)をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット(例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照)、のいずれかをそれぞれ含む 1 または複数の HCR プローブセットを準備すること;工程 M 6: 1 または複数のシグナルを直接的または間接的に生成す

40

50

る 1 または複数の H C R アンプリファイア（例えば、図 8、図 1 8、および図 2 0 を参照）を準備すること；工程 M 7：上記試料を洗浄すること；工程 M 8：1 または複数のシグナルを検出すること；工程 M 9：1 または複数のシグナルを除去すること（例えば、図 2 3 参照）、を含む（図 2 6 M 参照）。

【0198】

いくつかの実施形態では、標的分析法は、以下を含む方法 N（例えば、実施例 2 8）（所望により、C A R D、酵素非活性化、反復 C A R D、反復レポーター検出、および／または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である）である：

1. 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、のいずれかを含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、プローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. レポーターおよび／または基質で標識された H C R アンプリファイアを準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること
9. 所望により上記試料を洗浄すること
10. 上記レポーターからのシグナルを検出すること。

10

20

【0199】

いくつかの実施形態では、方法 N（例えば、実施例 2 8）は、工程 N 1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 N 2：所望により、上記試料を固定すること；工程 N 3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程 N 4：a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 3 9 A～3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A～4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図 2 2 のプローブユニットを参照）1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備すること；工程 N 5：所望により上記試料を洗浄すること；工程 N 6：レポーターおよび／または基質で標識された H C R アンプリファイア（例えば、図 8 および図 1 8 の H C R アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 N 7：所望により上記試料を洗浄すること；工程 N 8：所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図 2 0 の標識プローブを参照）を準備すること；工程 N 9：所望により上記試料を洗浄すること；工程 N 10：上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む（図 2 6 N 参照）。

30

【0200】

いくつかの実施形態では、方法 N（例えば、実施例 2 8）は、工程 N 1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 N 2：上記試料を固定すること；工程 N 3：上記試料を透過処理すること；工程 N 4：a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 3 9 A～3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A～4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図 2 2 のプローブユニットを参照）1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備すること；工程 N 5：上記試料を洗浄すること；工程 N 6：レポーターおよび／または基質で標識された H C R

40

50

アンプリファイア（例えば、図 8 および図 18 の HCR アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 N7：上記試料を洗浄すること；工程 N8：上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図 20 の標識プローブを参照）を準備すること；工程 N9：上記試料を洗浄すること；工程 N10：上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む（図 26 N 参照）。

【0201】

いくつかの実施形態では、標的分析法は、以下を含む方法 O（例えば、実施例 29）（所望により、CARD、酵素非活性化、反復 CARD、反復レポーター検出、および／または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である）である：

1. 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが HCR ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1 または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. レポーターおよび／または基質で標識された HCR アンプリファイアを準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること
9. 所望により上記試料を洗浄すること
10. 上記レポーターからのシグナルを検出すること。

【0202】

いくつかの実施形態では、方法 O（例えば、実施例 29）は、工程 O1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 O2：所望により、上記試料を固定すること；工程 O3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程 O4：a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A～39 N、図 41 A、図 42 A～42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが HCR ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図 21 のプローブユニットを参照）1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備すること；工程 O5：所望により上記試料を洗浄すること；工程 O6：レポーターおよび／または基質で標識された HCR アンプリファイア（例えば、図 8 および図 18 の HCR アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 O7：所望により上記試料を洗浄すること；工程 O8：所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図 20 の標識プローブを参照）を準備すること；工程 O9：所望により上記試料を洗浄すること；工程 O10：上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む（図 26 O 参照）。

【0203】

いくつかの実施形態では、方法 O（例えば、実施例 29）は、工程 O1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程 O2：上記試料を固定すること；工程 O3：上記試料を透過処理すること；工程 O4：a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A～39 N、図 41 A、図 42 A～42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが HCR ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図 21 のプローブユニットを参照）1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 お

よび図 16 のプローブセットを参照)、のいずれかを含むプローブセットを準備すること; 工程 O5: 上記試料を洗浄すること; 工程 O6: レポーターおよび/または基質で標識された HCR アンプリファイア (例えば、図 8 および図 18 の HCR アンプリファイアを参照) を準備すること; 工程 O7: 上記試料を洗浄すること; 工程 O8: 上記基質に対応する標識プローブ (レポーターに結合している) (例えば、図 20 の標識プローブを参照) を準備すること; 工程 O9: 上記試料を洗浄すること; 工程 O10: 上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む (図 26 O 参照)。

【0204】

いくつかの実施形態では、標的分析法は、以下を含む方法 P (例えば、実施例 30) (所望により、CARD、酵素非活性化、反復 CARD、反復レポーター検出、および/または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である) である:

1. 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが HCR ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1 または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. レポーターおよび/または基質で標識された HCR アンプリファイアを準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 所望により、上記基質に対応する標識プローブ (レポーターに結合している) を準備すること
9. 所望により上記試料を洗浄すること
10. 上記レポーターからのシグナルを検出すること。

【0205】

いくつかの実施形態では、方法 P (例えば、実施例 30) は、工程 P1: 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること; 工程 P2: 所望により、上記試料を固定すること; 工程 P3: 所望により、上記試料を透過処理すること; 工程 P4: a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ (例えば、図 39 A~39 N、図 41 A、図 42 A~42 F、および図 43 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが HCR ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている (例えば、図 27 のプローブユニットを参照) 1 または複数のプローブユニット (例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照)、のいずれかを含むプローブセットを準備すること; 工程 P5: 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 P6: レポーターおよび/または基質で標識された HCR アンプリファイア (例えば、図 8 および図 18 の HCR アンプリファイアを参照) を準備すること; 工程 P7: 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 P8: 所望により、上記基質に対応する標識プローブ (レポーターに結合している) (例えば、図 20 の標識プローブを参照) を準備すること; 工程 P9: 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 P10: 上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む (図 26 P 参照)。

【0206】

いくつかの実施形態では、方法 P (例えば、実施例 30)、工程 P1: 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること; 工程 P2: 上記試料を固定すること; 工程 P3: 上記試料を透過処理すること; 工程 P4: a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ (例えば、図 39 A~39 N、図 41 A、図 42 A~42 F

、および図 4 3 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている(例えば、図 2 7 のプローブユニットを参照) 1 または複数のプローブユニット(例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照)、のいずれかを含むプローブセットを準備すること; 工程 P 5 : 上記試料を洗浄すること; 工程 P 6 : レポーターおよび/または基質で標識された H C R アンプリファイア(例えば、図 8 および図 1 8 の H C R アンプリファイアを参照)を準備すること; 工程 P 7 : 上記試料を洗浄すること; 工程 P 8 : 上記基質に対応する標識プローブ(レポーターに結合している)(例えば、図 2 0 の標識プローブを参照)を準備すること; 工程 P 9 : 上記試料を洗浄すること; 工程 P 1 0 : 上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む(図 2 6 P 参照)。

10

【0207】

いくつかの実施形態では、標的分析法は、以下を含む方法 Q (例えば、実施例 3 1) (所望により、C A R D、酵素非活性化、反復 C A R D、反復レポーター検出、および/または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である)である:

1. 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1 または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. レポーターおよび/または基質で標識された H C R アンプリファイアを準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 所望により、上記基質に対応する標識プローブ(レポーターに結合している)を準備すること
9. 所望により上記試料を洗浄すること
10. 上記レポーターからのシグナルを検出すること。

20

30

【0208】

いくつかの実施形態では、方法 Q (例えば、実施例 3 1) は、工程 Q 1 : 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること; 工程 Q 2 : 所望により、上記試料を固定すること; 工程 Q 3 : 所望により、上記試料を透過処理すること; 工程 Q 4 : a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ(例えば、図 3 9 A ~ 3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A ~ 4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている(例えば、図 2 1 のプローブユニットを参照)、1 または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備すること; 工程 Q 5 : 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 Q 6 : レポーターおよび/または基質で標識された H C R アンプリファイア(例えば、図 8 および図 1 8 の H C R アンプリファイアを参照)を準備すること; 工程 Q 7 : 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 Q 8 : 所望により、上記基質に対応する標識プローブ(レポーターに結合している)(例えば、図 2 0 の標識プローブを参照)を準備すること; 工程 Q 9 : 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 Q 1 0 : 上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む

40

50

(図 2 6 Q 参照)。

【0209】

いくつかの実施形態では、方法 Q (例えば、実施例 3 1) は、工程 Q 1: 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること; 工程 Q 2: 上記試料を固定すること; 工程 Q 3: 上記試料を透過処理すること; 工程 Q 4: a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ (例えば、図 3 9 A ~ 3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A ~ 4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている (例えば、図 2 1 のプローブユニットを参照)、1 または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備すること; 工程 Q 5: 上記試料を洗浄すること; 工程 Q 6: レポーターおよび / または基質で標識された H C R アンプリファイア (例えば、図 8 および図 1 8 の H C R アンプリファイアを参照) を準備すること; 工程 Q 7: 上記試料を洗浄すること; 工程 Q 8: 上記基質に対応する標識プローブ (レポーターに結合している) (例えば、図 2 0 の標識プローブを参照) を準備すること; 工程 Q 9: 上記試料を洗浄すること; 工程 Q 1 0: 上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む (図 2 6 Q 参照)。

10

【0210】

いくつかの実施形態では、標的分析法は、以下を含む方法 R (例えば、実施例 3 2) (所望により、C A R D、酵素非活性化、反復 C A R D、反復レポーター検出、および / または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である) である:

20

1. 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが H C R ヘアピン上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1 または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. レポーターおよび / または基質で標識された H C R アンプリファイアを準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 所望により、上記基質に対応する標識プローブ (レポーターに結合している) を準備すること
9. 所望により上記試料を洗浄すること
- 1 0. 上記レポーターからのシグナルを検出すること。

30

【0211】

いくつかの実施形態では、方法 R (例えば、実施例 3 2) は、工程 R 1: 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること; 工程 R 2: 所望により、上記試料を固定すること; 工程 R 3: 所望により、上記試料を透過処理すること; 工程 R 4: a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ (例えば、図 3 9 A ~ 3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A ~ 4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが H C R ヘアピン上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている (例えば、図 2 2 のプローブユニットを参照)、1 または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備すること; 工程 R 5: 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 R 6: レポーターおよび / ま

40

50

たは基質で標識されたHCRアンプリファイア（例えば、図8および図18のHCRアンプリファイアを参照）を準備すること；工程R7：所望により上記試料を洗浄すること；工程R8：所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備すること；工程R9：所望により上記試料を洗浄すること；工程R10：上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む（図26R参照）。

【0212】

いくつかの実施形態では、方法R（例えば、実施例32）は、工程R1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程R2：上記試料を固定すること；工程R3：上記試料を透過処理すること；工程R4：a）1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b）2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターがHCRヘアピン上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図22のプローブユニットを参照）、1または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備すること；工程R5：上記試料を洗浄すること；工程R6：レポーターおよび／または基質で標識されたHCRアンプリファイア（例えば、図8および図18のHCRアンプリファイアを参照）を準備すること；工程R7：上記試料を洗浄すること；工程R8：上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備すること；工程R9：上記試料を洗浄すること；工程R10：上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む（図26R参照）。

【0213】

いくつかの実施形態では、標的分析法は、以下を含む方法S（例えば、実施例33）（所望により、CARD、酵素非活性化、反復CARD、反復レポーター検出、および／または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である）である：

1. 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a）1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、b）2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターがHCRヘアピン上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. レポーターおよび／または基質で標識されたHCRアンプリファイアを準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること
9. 所望により上記試料を洗浄すること
10. 上記レポーターからのシグナルを検出すること。

【0214】

いくつかの実施形態では、方法S（例えば、実施例33）は、工程S1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程S2：所望により、上記試料を固定すること；工程S3：所望により、上記試料を透過処理すること；工程S4：a）1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b）2個以上のHCR分割イニシエータープローブをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ

上の標的結合領域が上記標的上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターがH C Rヘアピン上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図3、図4、図5、図17のプローブユニットを参照）、1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図16のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備すること；工程S5：所望により上記試料を洗浄すること；工程S6：レポーターおよび／または基質で標識されたH C Rアンプリファイア（例えば、図8および図18のH C Rアンプリファイアを参照）を準備すること；工程S7：所望により上記試料を洗浄すること；工程S8：所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備すること；工程S9：所望により上記試料を洗浄すること；工程S10：上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む（図26S参照）。

10

【0215】

いくつかの実施形態では、方法S（例えば、実施例33）は、工程S1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；工程2：上記試料を固定すること；工程S3：上記試料を透過処理すること；工程S4：a）1または複数のH C Rイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b）2個以上のH C R分割イニシエータープローブをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターがH C Rヘアピン上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図3、図4、図5、図17のプローブユニットを参照）、1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図16のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備すること；工程S5：上記試料を洗浄すること；工程S6：レポーターおよび／または基質で標識されたH C Rアンプリファイア（例えば、図8および図18のH C Rアンプリファイアを参照）を準備すること；工程S7：上記試料を洗浄すること；工程S8：上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備すること；工程S9：上記試料を洗浄すること；工程S10：上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む（図26S参照）。

20

30

【0216】

いくつかの実施形態では、反復レポーター検出を用いる多重分析法は、以下を含む方法T（例えば、実施例34）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復CARDによるさらなる改変が可能である）である：

1. 1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること
2. 所望により、上記試料を固定すること
3. 所望により、上記試料を透過処理すること
4. a）1または複数のH C Rイニシエーター標識プローブ、または、b）2個以上のH C R分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターはH C Rヘアピン上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む1または複数のプローブセットを準備すること
5. 所望により上記試料を洗浄すること
6. 1または複数のレポーターおよび／または基質でそれぞれ標識された1または複数のH C Rアンプリファイアを準備すること
7. 所望により上記試料を洗浄すること
8. 所望により、1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々は

40

50

1 または複数のレポーターに結合している)を準備すること

9. 所望により上記試料を洗浄すること

10. 1 または複数のレポーターからのシグナルを検出すること

11. 所望により、1 または複数のシグナルを上記試料から除去すること

12. 所望により、1 または複数のレポーターを上記試料から除去すること

13. 所望により、1 または複数の標識プローブを上記試料から除去すること

14. 所望により、1 または複数のアンプリファイアを上記試料から除去すること

15. 所望により、1 または複数のプローブセットを上記試料から除去すること

16. 所望により、上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること。

【0217】

いくつかの実施形態では、方法 T (例えば、実施例 34) は、工程 T1: 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること; 工程 T2: 所望により、上記試料を固定すること; 工程 T3: 所望により、上記試料を透過処理すること; 工程 T4: a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ (例えば、図 39A~39N、図 41A、図 42A~42F、および図 43A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは HCR ヘアピン上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている (例えば、図 3、図 4、図 5、図 17、図 21、図 22、図 27 のプローブユニットを参照)、1 または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む 1 または複数のプローブセットを準備すること; 工程 T5: 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 T6: 1 または複数のレポーターおよび/または基質でそれぞれ標識された 1 または複数の HCR アンプリファイア (例えば、図 8 および図 18 の HCR アンプリファイアを参照) を準備すること; 工程 T7: 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 T8: 所望により、1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ (各々は 1 または複数のレポーターに結合している) (例えば、図 20 の標識プローブを参照) を準備すること; 工程 T9: 所望により上記試料を洗浄すること; 工程 T10: 1 または複数のレポーターからのシグナルを検出すること; 工程 T11: 所望により、1 または複数のシグナルを上記試料から除去すること (例えば、図 23 参照); 工程 T12: 所望により、1 または複数のレポーターを上記試料から除去すること; 工程 T13: 所望により、1 または複数の標識プローブを上記試料から除去すること; 工程 T14: 所望により、1 または複数のアンプリファイアを上記試料から除去すること; 工程 T15: 所望により、1 または複数のプローブセットを上記試料から除去すること; 工程 T16: 所望により、上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること、を含む (図 26 T 参照)。

【0218】

いくつかの実施形態では、方法 T (例えば、実施例 34) は、工程 T1: 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること; 工程 T2: 上記試料を固定すること; 工程 T3: 上記試料を透過処理すること; 工程 T4: a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ (例えば、図 39A~39N、図 41A、図 42A~42F、および図 43A のプローブを参照)、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは HCR ヘアピン上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている (例えば、図 3、図 4、図 5、図 17、図 21、図 22、図 27 のプローブユニットを参照)、1 または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む 1 または複数のプローブセットを準備すること; 工程 T5: 上記試料を洗浄すること; 工程 T6: 1 または複数のレポーターおよび/または基質でそれぞれ標識された 1 または複数の HCR

10

20

30

40

50

アンプリファイア（例えば、図 8 および図 18 の H C R アンプリファイアを参照）を準備すること；工程 T 7：上記試料を洗浄すること；工程 T 8：1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ（各々は 1 または複数のレポーターに結合している）（例えば、図 20 の標識プローブを参照）を準備すること；工程 T 9：上記試料を洗浄すること；工程 T 10：1 または複数のレポーターからのシグナルを検出すること；工程 T 11：1 または複数のシグナルを上記試料から除去すること（例えば、図 23 参照）；工程 T 12：1 または複数のレポーターを上記試料から除去すること；工程 T 13：1 または複数の標識プローブを上記試料から除去すること；工程 T 14：1 または複数のアンプリファイアを上記試料から除去すること；工程 T 15：1 または複数のプローブセットを上記試料から除去すること；工程 T 16：所望により、上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること、を含む（図 26 T 参照）。

10

【0219】

単一分子バーコーディングを用いた多重化

いくつかの実施形態では、標的分子の種ごとに異なるバーコードを形成するように、異なる分析ラウンドで異なる標的種に対して用いられる標識が変化するように、複数の分析ラウンドで各標的分子を分析することによって、試料中の分析可能な標的の数を増やすことができる。次いで、所与の標的分子に対するバーコードをシグナル測定 of バーコードとして読み取る。例えば、各標的分子のシグナルを回折限界ドットとして読み取るための 1 分子イメージングを用いて、3 ラウンドのイメージングを検討する。所与の標的の種類ごとに、プローブセット中の各プローブユニットが、標的の種類およびイメージングのラウンドに応じて赤色レポーターまたは緑色レポーターのいずれかで標識された H C R ヘアピンを含む H C R アンプリファイアに対応する完全 H C R イニシエーターを共局在化させるように、1 または複数のプローブユニットを含むプローブセットを割り当てることを考える。次に、例えば、1 型の標的分子はバーコード（赤色、赤色、緑色；赤色レポーターで標識された H C R アンプリファイアを用いる 1 ラウンド目に対する赤色ドット、赤色レポーターで標識された H C R アンプリファイアを用いる 2 ラウンド目に対する赤色ドット、緑色レポーター（*re p o r t e r*）で標識された H C R アンプリファイアを用いる 3 ラウンド目に対する緑色ドットを表す）で読み取ることができ、2 型の標的分子はバーコード（赤色、緑色、赤色）を持たせることができ、3 型の標的分子はバーコード（赤色、赤色、赤色）を持たせることができ、4 型の標的分子はバーコード（緑色、赤色、緑色）を持たせることができる、などである。

20

30

【0220】

いくつかの実施形態では、バーコーディングラウンドの一部のみで各標的分子を検出することによって、試料中の分析可能な標的の数を増やすことができる。例えば、4 ラウンドでの実験では、1 型の標的分子はバーコード（赤色、――、――、赤色；1 ラウンド目に対する赤色ドット、2 ラウンド目に対するドットなし、3 ラウンド目に対するドットなし、4 ラウンド目に対する赤色ドットを表す）で読み取ることができ、2 型の標的分子はバーコード（緑色、赤色、――、――）で読み取ることができる、などである。

【0221】

追加の実施形態

本明細書で提供される実施形態および／または方法のいずれも、以下のいずれかと共に、またはその代替形態で、用いることができる。すなわち、例えば、上記の方法は、下記の組成物または方法のいずれかを用いることができる。同様に、上記の方法は、下記の方法を採用した方法も提供するものと、または、下記の方法の一部であるとして、理解されるべきである。

40

【0222】

同様に、本明細書で提供される実施形態および／または方法は、当該方法に関係する実施形態、例えば、組成物、当該方法の構成要素、キットなど、も提供すると理解されるべきである。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される 1 または複数の方法および／または工程の成分のいずれも、上記成分のうちの 1 または複数（および、所望により、標

50

的または標的配列または試料)を含むキットとして提供することができる。

【0223】

組成物

組成物のいくつかの実施形態を、図12および図13、並びに本願で提供される他の図で概説する。いくつかの実施形態では、第1分割イニシエーター(1151)を含む第1分割イニシエータープロープ(1190)、および第2分割イニシエーター(1251)を含む第2分割イニシエータープロープ(1290)を含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、第1分割イニシエーターおよび第2分割イニシエーター(1151、1251)が一緒になって完全イニシエーター(1050)を形成し、そこから、第1ヘアピン単量体および第2ヘアピン単量体(1510、1610)を介したHCRが進行可能である。いくつかの実施形態では、第1分割イニシエータープロープ(1190)が第1標的結合セクション(1141)をさらに含み、第2分割イニシエータープロープ(1290)が第2標的結合セクション(1241)をさらに含み、第1標的結合セクション(1141)は第1標的セクション(1100)に結合するように構成され、第2標的結合セクション(1241)は第2標的セクション(1200)に結合するように構成される。両方の分割イニシエータープロープが両方の標的に結合している場合に、(分割イニシエータープロープ内の)第1分割イニシエーターおよび第2分割イニシエーターが、完全イニシエーター(1050)を形成するのに十分に近接しており、その完全イニシエーターからHCRが開始可能であるように、これらの標的結合セクションは標的分子上で効果的に隣接して位置する。いくつかの実施形態では、これらの分割イニシエータープロープは、HCR重合のためのヘアピン単量体と一緒に、キットとして提供することができる。

10

20

【0224】

いくつかの実施形態では、第1ヘアピン単量体(1510)、第2ヘアピン単量体(1610)、第1分割イニシエーター(1151)を含む第1分割イニシエータープロープ(1190)、および第2分割イニシエーター(1251)を含む第2分割イニシエータープロープ(1290)を含む、組成物が提供される。いくつかの実施形態では、第1分割イニシエーターおよび第2分割イニシエーター(1151、1251)が一緒になって完全イニシエーター(1050)を形成し、そこから、第1ヘアピン単量体および第2ヘアピン単量体(1510、1610)を介したHCRが進行可能である。

30

【0225】

いくつかの実施形態では、上記分割イニシエータープロープおよび上記ヘアピン単量体を、同時に同一試料に導入することができる。いくつかの実施形態では、上記分割イニシエータープロープを上記試料に導入し、洗浄した後、上記ヘアピン単量体を上記試料に導入し、洗浄することができる。いくつかの実施形態では、上記分割イニシエータープロープおよびヘアピン単量体を、異なる時間に上記試料に導入することができる。

【0226】

いくつかの実施形態では、上記ヘアピン単量体(第1および第2、並びに所望によりそれ以上のヘアピン単量体)の重合が、検出可能なシグナル伝達現象をもたらすように、上記ヘアピン単量体の1または複数に、レポーター分子を含ませることができる。いくつかの実施形態では、上記レポーター分子は、上記ヘアピン単量体と共有結合的に結び付けることができる。いくつかの実施形態では、上記レポーター分子は、重合後のHCR重合体に後から結合させることができる(例えば、事後ハイブリダイゼーションイベントで)。いくつかの実施形態では、第1ヘアピン単量体(1510)は、標識結合部位(図示せず)に対する相補鎖にハイブリダイズするように構成された、標識結合部位(図示せず)を含む。いくつかの実施形態では、標識結合部位に対する相補鎖は、レポーター分子をさらに含む。

40

【0227】

いくつかの実施形態では、a)第1トーホールド(1851)および第1ステム部(1755)を含む第1インプットドメイン(1852)、b)第1ヘアピンループ(185

50

3) および上記第1ステム部に対する相補鎖(1756)を含む第1アウトプットドメイン(1854)、並びに、c) 第1レポーター分子(1850)を含む、第1ヘアピン単量体(1510)を含む、組成物が提供される。上記組成物は、a) 第2トーホールド(1951)および第2ステム部(1855)を含む第2インプットドメイン(1952)、b) 第2ヘアピンループ(1953)および第2ステム部(1856)に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン(1954)、並びに、c) 第2レポーター分子(1950)を含む、第2ヘアピン単量体(1610)をさらに含むことができる。上記組成物は、a) 第1分割イニシエーター(1151)を含む第1分割イニシエータープロープ(1190)、および、b) 第2分割イニシエーター(1251)を含む第2分割イニシエータープロープ(1290)をさらに含むことができる。上記で言及したように、第1ヘアピン単量体および第2ヘアピン単量体は、第1分割イニシエータープロープおよび第2分割イニシエータープロープと一緒に、または第1分割イニシエータープロープおよび第2分割イニシエータープロープとは別々に、試料に導入することができる。いくつかの実施形態では、各単量体を、一緒に供給するが、第1分割イニシエータープロープおよび第2分割イニシエータープロープからは分離させることができる。いくつかの実施形態では、ヘアピン単量体および分割イニシエータープロープを、同時に同一試料に導入することができる。いくつかの実施形態では、ヘアピン単量体および分割イニシエータープロープを、同一試料に、ただし異なる重なりなしの時間に、導入することができる(未結合分子を除去するための洗浄を含む)。

10

20

【0228】

いくつかの実施形態では、第1ステム部は、第2ステム部と同じ配列を有する。いくつかの実施形態では、第1ステム部に対する相補鎖は、第2ステム部に対する相補鎖と同じ配列を有する。いくつかの実施形態では、第1ステム部に対する相補鎖は、第2ステム部に対する相補鎖と同じ配列を有し、第1ステム部は、第2ステム部と同じ配列を有する。いくつかの実施形態では、2つのヘアピン単量体のトーホールド配列は同じであり、2つのヘアピン単量体のループ配列は同じである(ただし、2つのヘアピン単量体の方向は逆向きであるため、2つのヘアピン単量体は同一ではない)。

【0229】

いくつかの実施形態では、第1トーホールド(1851)は、第2ヘアピンループに対して相補的である。いくつかの実施形態では、第2トーホールドは、第1ヘアピンループに対して相補的である。いくつかの実施形態では、この循環性は、ハイブリダイゼーション連鎖反応の発生を可能にする。いくつかの実施形態では、第1トーホールドは、第2ヘアピンループに対して100%相補的ではないが、ハイブリダイゼーションを可能にするのには十分なものである。

30

【0230】

いくつかの実施形態では、3つ以上の異なるインプットドメインを使用することができる、例えば、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、100個、1000個、2000個、4000個、またはそれ以上のインプットドメインを使用することができる。いくつかの実施形態では、各インプットドメインに対応する数のサブパートを使用することができる。

40

【0231】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物のいずれかは、第1標的セクション(1100)および第2標的セクション(1200)を含む標的分子(1020)を含む(例えば、図12に図示)。いくつかの実施形態では、標的分子は、追加の標的セクション、例えば、3個の標的セクション、4個の標的セクション、5個の標的セクション、6個の標的セクション、7個の標的セクション、またはそれ以上(例えば、10個、50個、100個など)の標的セクションを含む。いくつかの実施形態では、標的セクションの数は、対応する数の標的結合セクション(例えば、1141、1241)が存在することを意味する。いくつかの実施形態では、これは、初期の完全イニシエーター形成の特異性/選択性をより大きくすることを可能にする(上記標的セクションに結合するために、よ

50

り多くの標的結合セクションを必要とするため）。いくつかの実施形態では、これは、一度に2以上の標的配列を並行にアッセイすることを可能にする（2個以上の標的結合セクション／分割イニシエータープローブをそれぞれ含む、複数の標的の一度のアッセイを可能にする）。

【0232】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1分割イニシエータープローブ（1190）のいずれかが、第1標的結合セクション（1141）をさらに含み、本明細書に記載の第2分割イニシエータープローブ（1290）のいずれかが、第2標的結合セクション（1241）をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1標的結合セクション（1141）は、第1標的セクション（1100）に結合するように構成される。いくつかの実施形態では、第2標的結合セクション（1241）は、第2標的セクション（1200）に結合するように構成される。いくつかの実施形態では、第1分割イニシエータープローブおよび第2分割イニシエータープローブは、追加の標的結合セクションを含み、例えば、2個の標的結合セクション、3個の標的結合セクション、4個の標的結合セクション、5個の標的結合セクション、10個、20個、30個、40個、50個、100個、1000個、10,000個、またはそれ以上の標的結合セクションを含む。

10

【0233】

いくつかの実施形態では、第1標的結合セクションは、選択的タンパク質間相互作用を通じて（第1標的結合セクションとしての抗体を介してなど）第1標的セクションに結合するように構成される。いくつかの実施形態では、第1標的結合セクションは、選択的核酸-タンパク質相互作用を通じて（第1標的結合セクションとしてのアプタマーを介してなど）第1標的セクションに結合するように構成される。いくつかの実施形態では、第2標的結合セクションは、選択的タンパク質間相互作用を通じて（第2標的結合セクションとしての抗体を介してなど）第2標的セクションに結合するように構成される。いくつかの実施形態では、第2標的結合セクションは、選択的核酸-タンパク質相互作用を通じて（第2標的結合セクションとしてのアプタマーを介してなど）第2標的セクションに結合するように構成される。いくつかの実施形態では、第1標的結合セクションは、ハイブリダイゼーションを通じて第1標的セクションに結合するように構成される。いくつかの実施形態では、第2標的結合セクションは、ハイブリダイゼーションを通じて第2標的セクションに結合するように構成される。いくつかの実施形態では、第1標的結合セクションは、共有結合またはイオン結合を通じて第1標的セクションに結合するように構成される。いくつかの実施形態では、第2標的結合セクションは、共有結合またはイオン結合を通じて第2標的セクションに結合するように構成される。

20

30

【0234】

いくつかの実施形態では、有無をモニターすることが可能な任意のレポーター分子を使用することができる。いくつかの実施形態では、レポーター分子は、得られた重合体の可視化を可能にする、フルオロフォアなどの蛍光分子、すなわち比色用化合物、を含む。いくつかの実施形態では、レポーター分子は、直接的に観察可能なものである。いくつかの実施形態では、レポーター分子は、間接的に観察可能なものである。いくつかの実施形態では、レポーター分子は、酵素を含むか、酵素的なものであり、且つ／あるいは、HCR重合後の酵素的シグナル伝達を媒介することができる。いくつかの実施形態では、レポーター作用は、触媒レポーター沈着（「CARD」）によって達成される。いくつかの実施形態では、各ヘアピン単量体上の標識結合部位は、相補鎖を標識結合部位に結合させることができ、上記標識結合部位に対する相補鎖はレポーター分子を含む。いくつかの実施形態では、ヘアピン単量体または標識結合部位に対する相補鎖に担持される1種類のレポーター分子は、HCR重合体／標的分子付近に沈着した2種類目のレポーター分子がその後検出されるように、HCR重合後の酵素的シグナル増幅（CARD）を媒介することができる。いくつかの実施形態では、レポーター分子は、発光分子、FRET分子、フルオロフォア／クエンチャー分子対、または他の検出可能なマーカーのうちの少なくとも1つである。いくつかの実施形態では、レポーター分子は、第二分子（二次抗体など）を重合イ

40

50

ベントの検出に使用可能にすることができる。いくつかの実施形態では、ヘアピン単量体は、ヘアピン単量体はクエンチされるが、HCR重合時に起こる高次構造変化が蛍光性HCR増幅重合体をもたらすように、レポーター分子（例えば、フルオロフォアおよびクエンチャー）で標識することができる。

【0235】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される1または複数の方法および／または工程におけるいずれの成分も、1または複数の上記成分（および、所望により、標的または標的配列または試料）を含む組成物として提供することができる。いくつかの実施形態では、図1A、図1B、図2A、図2B、図3A、図3B、図4A、図4B、図4C、図4D、図5A、図5B、図5C、図5D、図5E、図8A、図8B、図12、図13、図14、図15、図16A、図16B、図16C、図16D、図17A、図17B、図17C、図18A、図18B、図18C、図18D、図18E、図18F、図19A、図19B、図20A、図20B、図20C、図20D、図20E、図20F、図21A、図21B、図22、図23A、図23B、図23C、図23D、図23E、図23F、図23G、図23H、図23I、図23J、図23K、図23L、図23M、図23N、図23O、図27、図28A、図29A、図29B、図30A、図30B、図31A、図32A、図33A、図33B、図33C、図33D、図33E、図34A、図34B、図34C、図35-1、図35-2、図36A、図36B、図37A、図38-1、図38-2、図39A、図39B、図39C、図39D、図39E、図39F、図39G、図39H、図39I、図39J、図39K、図39L、図39M、図39N、図40A、図40B、図40C、図40D、図40E、図40F、図40G、図40H、図40I、図40J、図40K、図40L、図40M、図40N、図41A、図42A、図42B、図42C、図42D、図42E、図42F、図43A、図44A、図44B、図44C、図44D、図44E、図44F、図44G、図44H、図44I、図44J、図44K、図44L、図44M、図44N、図44O、図44P、図44Q、図44R、図44S、図44T、図44U、図44V、図44W、図44X、図44Y、図44Z、図46A、図46B、図46C、図46D、図46E、図46F、図46G、図46H、図46I、図46J、図46K、図46L、および／または図46Mのいずれか1つまたは複数における分子または分子の組み合わせのいずれか1つまたは複数は、それらの表記された構造成分を組成物として企図している。

10

20

30

【0236】

いくつかの実施形態では、組成物または成分は、試料に添加されるものである。いくつかの実施形態では、組成物または成分は、図に示された方法の各工程で添加されるものである。いくつかの実施形態では、組成物または成分は、反応で最初に添加されるもの、且つ／または、図に示された任意の反応工程で添加されるものである。いくつかの実施形態では、組成物は、図1A、図1B、図2A、図2B、図3A、図3B、図4A、図4B、図4C、図4D、図5A、図5B、図5C、図5D、図5E、図8A、図8B、図12、図13、図14、図15、図16A、図16B、図16C、図16D、図17A、図17B、図17C、図18A、図18B、図18C、図18D、図18E、図18F、図19A、図19B、図20A、図20B、図20C、図20D、図20E、図20F、図21A、図21B、図22、図23A、図23B、図23C、図23D、図23E、図23F、図23G、図23H、図23I、図23J、図23K、図23L、図23M、図23N、図23O、図27、図28A、図29A、図29B、図30A、図30B、図31A、図32A、図33A、図33B、図33C、図33D、図33E、図34A、図34B、図34C、図35-1、図35-2、図36A、図36B、図37A、図38-1、図38-2、図39A、図39B、図39C、図39D、図39E、図39F、図39G、図39H、図39I、図39J、図39K、図39L、図39M、図39N、図40A、図40B、図40C、図40D、図40E、図40F、図40G、図40H、図40I、図40J、図40K、図40L、図40M、図40N、図41A、図42A、図42B、図42C、図42D、図42E、図42F、図43A、図44A、図44B、図44C、図

40

50

図 4 4 D、図 4 4 E、図 4 4 F、図 4 4 G、図 4 4 H、図 4 4 I、図 4 4 J、図 4 4 K、図 4 4 L、図 4 4 M、図 4 4 N、図 4 4 O、図 4 4 P、図 4 4 Q、図 4 4 R、図 4 4 S、図 4 4 T、図 4 4 U、図 4 4 V、図 4 4 W、図 4 4 X、図 4 4 Y、図 4 4 Z、図 4 6 A、図 4 6 B、図 4 6 C、図 4 6 D、図 4 6 E、図 4 6 F、図 4 6 G、図 4 6 H、図 4 6 I、図 4 6 J、図 4 6 K、図 4 6 L、および／または図 4 6 Mのいずれか 1 つに示されるような、標的への分子のハイブリダイゼーションを含むものである。

【0237】

いくつかの実施形態では、組成物または成分は、図 1 A、図 1 B、図 2 A、図 2 B、図 3 A、図 3 B、図 4 A、図 4 B、図 4 C、図 4 D、図 5 A、図 5 B、図 5 C、図 5 D、図 5 E、図 8 A、図 8 B、図 1 2、図 1 3、図 1 4、図 1 5、図 1 6 A、図 1 6 B、図 1 6 C、図 1 6 D、図 1 7 A、図 1 7 B、図 1 7 C、図 1 8 A、図 1 8 B、図 1 8 C、図 1 8 D、図 1 8 E、図 1 8 F、図 1 9 A、図 1 9 B、図 2 0 A、図 2 0 B、図 2 0 C、図 2 0 D、図 2 0 E、図 2 0 F、図 2 1 A、図 2 1 B、図 2 2、図 2 3 A、図 2 3 B、図 2 3 C、図 2 3 D、図 2 3 E、図 2 3 F、図 2 3 G、図 2 3 H、図 2 3 I、図 2 3 J、図 2 3 K、図 2 3 L、図 2 3 M、図 2 3 N、図 2 3 O、図 2 7、図 2 8 A、図 2 9 A、図 2 9 B、図 3 0 A、図 3 0 B、図 3 1 A、図 3 2 A、図 3 3 A、図 3 3 B、図 3 3 C、図 3 3 D、図 3 3 E、図 3 4 A、図 3 4 B、図 3 4 C、図 3 5 - 1、図 3 5 - 2、図 3 6 A、図 3 6 B、図 3 7 A、図 3 8 - 1、図 3 8 - 2、図 3 9 A、図 3 9 B、図 3 9 C、図 3 9 D、図 3 9 E、図 3 9 F、図 3 9 G、図 3 9 H、図 3 9 I、図 3 9 J、図 3 9 K、図 3 9 L、図 3 9 M、図 3 9 N、図 4 0 A、図 4 0 B、図 4 0 C、図 4 0 D、図 4 0 E、図 4 0 F、図 4 0 G、図 4 0 H、図 4 0 I、図 4 0 J、図 4 0 K、図 4 0 L、図 4 0 M、図 4 0 N、図 4 1 A、図 4 2 A、図 4 2 B、図 4 2 C、図 4 2 D、図 4 2 E、図 4 2 F、図 4 3 A、図 4 4 A、図 4 4 B、図 4 4 C、図 4 4 D、図 4 4 E、図 4 4 F、図 4 4 G、図 4 4 H、図 4 4 I、図 4 4 J、図 4 4 K、図 4 4 L、図 4 4 M、図 4 4 N、図 4 4 O、図 4 4 P、図 4 4 Q、図 4 4 R、図 4 4 S、図 4 4 T、図 4 4 U、図 4 4 V、図 4 4 W、図 4 4 X、図 4 4 Y、図 4 4 Z、図 4 6 A、図 4 6 B、図 4 6 C、図 4 6 D、図 4 6 E、図 4 6 F、図 4 6 G、図 4 6 H、図 4 6 I、図 4 6 J、図 4 6 K、図 4 6 L、および／または図 4 6 Mのいずれか 1 つに示されるような、方法またはプロトコルの最終工程中のものである。

【0238】

いくつかの実施形態では、組成物または成分は、適切な（標的と付着または結合した標識を有するもの）図 1 A、図 1 B、図 2 A、図 2 B、図 3 A、図 3 B、図 4 A、図 4 B、図 4 C、図 4 D、図 5 A、図 5 B、図 5 C、図 5 D、図 5 E、図 8 A、図 8 B、図 1 2、図 1 3、図 1 4、図 1 5、図 1 6 A、図 1 6 B、図 1 6 C、図 1 6 D、図 1 7 A、図 1 7 B、図 1 7 C、図 1 8 A、図 1 8 B、図 1 8 C、図 1 8 D、図 1 8 E、図 1 8 F、図 1 9 A、図 1 9 B、図 2 0 A、図 2 0 B、図 2 0 C、図 2 0 D、図 2 0 E、図 2 0 F、図 2 1 A、図 2 1 B、図 2 2、図 2 3 A、図 2 3 B、図 2 3 C、図 2 3 D、図 2 3 E、図 2 3 F、図 2 3 G、図 2 3 H、図 2 3 I、図 2 3 J、図 2 3 K、図 2 3 L、図 2 3 M、図 2 3 N、図 2 3 O、図 2 7、図 2 8 A、図 2 9 A、図 2 9 B、図 3 0 A、図 3 0 B、図 3 1 A、図 3 2 A、図 3 3 A、図 3 3 B、図 3 3 C、図 3 3 D、図 3 3 E、図 3 4 A、図 3 4 B、図 3 4 C、図 3 5 - 1、図 3 5 - 2、図 3 6 A、図 3 6 B、図 3 7 A、図 3 8 - 1、図 3 8 - 2、図 3 9 A、図 3 9 B、図 3 9 C、図 3 9 D、図 3 9 E、図 3 9 F、図 3 9 G、図 3 9 H、図 3 9 I、図 3 9 J、図 3 9 K、図 3 9 L、図 3 9 M、図 3 9 N、図 4 0 A、図 4 0 B、図 4 0 C、図 4 0 D、図 4 0 E、図 4 0 F、図 4 0 G、図 4 0 H、図 4 0 I、図 4 0 J、図 4 0 K、図 4 0 L、図 4 0 M、図 4 0 N、図 4 1 A、図 4 2 A、図 4 2 B、図 4 2 C、図 4 2 D、図 4 2 E、図 4 2 F、図 4 3 A、図 4 4 A、図 4 4 B、図 4 4 C、図 4 4 D、図 4 4 E、図 4 4 F、図 4 4 G、図 4 4 H、図 4 4 I、図 4 4 J、図 4 4 K、図 4 4 L、図 4 4 M、図 4 4 N、図 4 4 O、図 4 4 P、図 4 4 Q、図 4 4 R、図 4 4 S、図 4 4 T、図 4 4 U、図 4 4 V、図 4 4 W、図 4 4 X、図 4 4 Y、図 4 4 Z、図 4 6 A、図 4 6 B、図 4 6 C、図 4 6 D、図 4 6 E、図 4 6 F、図 4 6 G、図 4 6 H、図 4 6 I、図 4 6 J、図 4 6 K、図 4 6 L、および／または図 4 6 Mのいずれか 1 つに示されるような

、標的と付着または結合した標識を有するものである。

【0239】

方法

いくつかの実施形態では、方法が提供される。上記方法は、(i) 第1分割イニシエータープロープ、(1190) 第2分割イニシエータープロープ(1290)、第1ヘアピン単量体(1510)、第2ヘアピン単量体(1610)、および標的分子(1020)を準備すること、(ii) 結合を可能にするためにインキュベーションすること、(iii) シグナルを検出すること、を含む。

【0240】

いくつかの実施形態では、HCRを実行する方法が提供される。上記方法は、(i) 第1分割イニシエーター(1151)および第2分割イニシエーター(1251)を試料に添加し、第1分割イニシエーター(1151)および第2分割イニシエーター(1251)と一緒にして完全HCRイニシエーターとすること、(ii) 上記完全HCRイニシエーターの存在下でHCRを発生させるために、一連のHCRヘアピン単量体を上記試料に添加すること、を含む。上記一連のHCRヘアピン単量体は、HCRを介して重合するように構成される。

【0241】

いくつかの実施形態では、方法が提供される。上記方法は、(a) I. 第1分割イニシエーター(1151)を含む第1分割イニシエータープロープ(1190)、II. 第2分割イニシエーター(1251)を含む第2分割イニシエータープロープ(1290)、を準備すること、を含む。上記方法は、III. a. 第1トーホールド(1851)および第1ステム部(1755)を含む第1インプットドメイン(1852)、b. 第1ヘアピンループ(1853)および上記第1ステム部に対する相補鎖(1756)を含む第1アウトプットドメイン(1854)、並びに、c. 第1レポーター分子(1850)を含む、第1ヘアピン単量体(1510)、を準備することをさらに含む。さらに、IV. a. 第2トーホールド(1951)および第2ステム部(1855)を含む第2インプットドメイン(1952)、b. 第2ヘアピンループ(1953)および第2ステム部(1856)に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン(1954)、並びに、c. 第2レポーター分子(1950)を含む、第2ヘアピン単量体(1610)が準備される。さらに、V. 標的分子(1020)が準備される。上記方法は、(b) 上記の準備された第1分割イニシエータープロープおよび第2分割イニシエータープロープを、標的と一緒にインキュベーションすること、をさらに含む。本明細書に記載されたように、上記分割イニシエータープロープは、2つの分割イニシエーターを共局在させることにより、完全イニシエーターを形成するように、標的結合セクションをさらに含むことができる。

【0242】

いくつかの実施形態では、標的を含む可能性がある試料に分割イニシエータープロープを最初に添加し、バルク溶液を洗い流し、結合した分割イニシエータープロープを維持し、ヘアピン単量体を添加することで、標的に特異的に結合した分割イニシエータープロープは分割イニシエーターを共局在化してHCRを惹起するが、一方で、非特異的に結合した単独の分割イニシエータープロープは完全イニシエーターを共局在化させず、HCRを惹起しないようにすることができる。

【0243】

本明細書に記載の方法のいずれにおいても、以下のうちのいずれの1または複数を検出および／または定量することができる：分子、DNA分子、RNA分子、タンパク質分子、小分子、合成分子、または分子複合体。いくつかの実施形態では、標的は、タンパク質の複合体、またはタンパク質と核酸の複合体などの、2つ以上の標的である。すなわち、タンパク質の結び付きを、本発明の分割イニシエーター法によって定量することができる。いくつかの実施形態では、無機物または非有機物も定量することができる。いくつかの実施形態では、いずれの標的も、分割イニシエータープロープの一部をなすことができる当該標的に結合可能な対応する標的結合セクションが存在する限り、検出することができ

る。いくつかの実施形態では、上記標的は任意の核酸分子である。いくつかの実施形態では、上記標的はタンパク質である。いくつかの実施形態では、上記標的は、mRNA、miRNA、lncRNA、rRNA、ノンコーディングRNA、またはゲノムDNAのうちの少なくとも1つからなる。いくつかの実施形態では、上記標的は、アミノ酸配列から構成される。いくつかの実施形態では、上記標的は、分子の複合体から構成される。いくつかの実施形態では、上記標的は、インビトロ、インサイツ、またはインビボの、DNA、RNA、タンパク質、または小分子の標的分子または複合体のうちの少なくとも1つである。いくつかの実施形態では、上記標的は、DNA標的分子、RNA標的分子、タンパク質標的分子、または小分子標的分子のうちの少なくとも1つで構成される、分子の複合体である。いくつかの実施形態では、上記標的は、インビトロ、インサイツ、またはインビボの、分子または複合体を含む。

10

【0244】

いくつかの実施形態では、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ対内の標的結合部位が複体内のそれらの標的部位に特異的に結合した場合に、HCRイニシエーターの半分が2つ近接し、完全イニシエーターがHCRシグナル増幅を開始可能にするように、標的分子を分子の複合体とすることができる。図5は、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブを用いた標的複合体の検出（パネルa）、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）核酸プローブを用いた標的核酸複合体の検出（パネルb）、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）抗体プローブを用いた標的タンパク質複合体の検出（パネルc）、一次抗体プローブおよび分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）二次抗体プローブを用いた標的タンパク質複合体の検出（パネルd）、スプリットイニシエーター抗体および核酸プローブを用いた標的タンパク質／核酸複合体の検出（パネルe）を示している。

20

【0245】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、DNAインサイツハイブリダイゼーション（ISH）、RNAインサイツハイブリダイゼーション（ISH）、またはタンパク質免疫組織化学（IHC）を含む、DNA標的、RNA標的、タンパク質標的、または小分子標的をイメージングするためのインサイツ法の一部として用いることができる。

【0246】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、1または複数の上記成分を標的に適用することをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記標的は水和している。いくつかの実施形態では、上記標的は溶液中に存在するが、固相に固定することができる。いくつかの実施形態では、上記標的は溶液中に存在する。いくつかの実施形態では、上記標的はビーズまたは他の担体上に固定される。いくつかの実施形態では、上記担体はメッシュまたはゲルまたは剛体面である。いくつかの実施形態では、上記標的は固定されない。いくつかの実施形態では、上記検出はインビボ、インビトロ、またはインサイツで起こる。いくつかの実施形態では、上記標的がビーズまたはマイクロアレイ上に固定されるインビトロ法を含むHCR法が提供される。いくつかの実施形態では、上記標的はビーズ上に固定される。いくつかの実施形態では、上記標的はマイクロアレイ上に固定される。いくつかの実施形態では、上記標的が固定化されないインビボ法またはインビトロ法を含むHCR法が提供される。いくつかの実施形態では、上記標的が固定化されるインビボ法またはインビトロ法を含むHCR法が提供される。

30

40

【0247】

いくつかの実施形態では、インキュベーションによって、第1分割イニシエータープローブ（1190）が標的分子に結合し、第2分割イニシエータープローブ（1290）が標的分子に結合する。上記標的分子は、単一分子または複数の互いに結び付いた分子とすることができる。いくつかの実施形態では、インキュベーションは室温で行う。いくつかの実施形態では、インキュベーションは4℃で行う。いくつかの実施形態では、インキュベーションは37℃で行う。いくつかの実施形態では、インキュベーションは45℃で行

50

う。いくつかの実施形態では、インキュベーションは50℃で行う。いくつかの実施形態では、インキュベーションは55℃で行う。いくつかの実施形態では、インキュベーションは60℃で行う。いくつかの実施形態では、インキュベーションは少なくとも1分間のインキュベーション時間を含み、例えば、5分間、15分間、30分間、または1時間のインキュベーション時間を含む。いくつかの実施形態では、上記インキュベーション時間は1時間を超えるものであり、例えば、2時間、4時間、12時間、16時間、または24時間である。いくつかの実施形態では、インキュベーションは、0%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション用緩衝液中で行う。いくつかの実施形態では、インキュベーションは、ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション用緩衝液中で行う。いくつかの実施形態では、ホルムアミドのパーセント濃度は1%~80%であり、例えば、10%~70%、または30%~60%である。いくつかの実施形態では、上記ハイブリダイゼーション用緩衝液は、クエン酸を含む。いくつかの実施形態では、クエン酸のモル濃度は1nM~30nMであり、例えば、5nM~15nMまたは8nM~12nMである。いくつかの実施形態では、上記ハイブリダイゼーション用緩衝液は、Tween（登録商標）を含む。いくつかの実施形態では、Tween（登録商標）のパーセント濃度は0%~1.0%であり、例えば、0.05%~0.5%である。いくつかの実施形態では、上記ハイブリダイゼーション用緩衝液は、ヘパリンを含む。いくつかの実施形態では、ヘパリンの濃度は20μg/mL~80μg/mLであり、例えば、30μg/mL~70μg/mLであり、例えば、40μg/mL~60μg/mLである。いくつかの実施形態では、上記ハイブリダイゼーション用緩衝液は、デンハート液を含む。いくつかの実施形態では、上記ハイブリダイゼーション用緩衝液は、デキストラン硫酸を含む。いくつかの実施形態では、デキストラン硫酸のパーセント濃度は1%~60%であり、例えば、40%~60%である。

10

20

30

40

50

【0248】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかの第1分割イニシエーター（1151）は、第1分割イニシエータープロープ（1190）の一部であり、第2分割イニシエーター（1251）は、第2分割イニシエータープロープ（1290）の一部である。いくつかの実施形態では、第1分割イニシエータープロープ（1190）は、第1標的結合セクション（1141）をさらに含み、第2分割イニシエータープロープ（1290）は、第2標的結合セクション（1241）をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1標的結合セクション（1141）は、第1分割イニシエータープロープ（1190）と第2分割イニシエータープロープ（1290）が共に標的（1020）に特異的に結合した場合に、標的上で第2標的結合セクション（1241）に隣接して結合するように構成される。

【0249】

「近接する」という語は、第1分割イニシエータープロープおよび第2分割イニシエータープロープが結合していること（並びに／または第1標的結合セクションおよび第2標的結合セクションが結合していること）に対して用いているが、第1イニシエータープロープおよび第2イニシエータープロープが、HCRを惹起可能な完全イニシエーターを形成するのに十分に互いに近接している限り、結合は直接隣接している必要はない。いくつかの実施形態では、第1標的結合セクションは、第2標的結合セクションの少なくとも10アミノ酸以内に結合し、例えば、5アミノ酸以内または1アミノ酸以内に結合する。いくつかの実施形態では、第1標的結合セクションは、第2標的結合セクションの少なくとも10ヌクレオチド以内に結合し、例えば、5ヌクレオチド以内または1ヌクレオチド以内に結合する。いくつかの実施形態では、第1イニシエータープロープおよび第2分割イニシエータープロープ（並びに／または第1標的結合セクションおよび第2標的結合セクション）は、互いに2Å以内、5Å以内、10Å以内、50Å以内、100Å以内、1000Å以内である。いくつかの実施形態では、2つの標的セクション間のスペースを増やすために、第1分割イニシエータープロープおよび第2分割イニシエータープロープはスペーサーを含むことができる。そのようなスペーサーに追加の核酸配列を含ませることで

、第1標的セクションおよび第2（または追加の）標的セクションの位置の自由度を高めることができる。いくつかの実施形態では、標的上の各標的セクションは、2個以上の分割イニシエーターに完全イニシエーターを共局在させるのに十分に互いに近位にある。

【0250】

いくつかの実施形態では、第1分割イニシエータープローブ（1190）は、2個以上の標的結合セクションを含み、例えば、2個の標的結合セクション、3個の標的結合セクション、4個の標的結合セクション、または5個の標的結合セクションを含む。これにより、複数存在する可能性がある標的を一度にアッセイすることが可能となる。いくつかの実施形態では、第1分割イニシエータープローブ（1190）は、5個を超える標的結合セクションを含む。いくつかの実施形態では、第2分割イニシエータープローブ（1290）は、2個以上の標的結合セクションを含み、例えば、2個の標的結合セクション、3個の標的結合セクション、4個の標的結合セクション、または5個の標的結合セクションを含む。いくつかの実施形態では、第2分割イニシエータープローブ（1290）は、5個を超える標的結合セクションを含む。

10

【0251】

いくつかの実施形態では、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ対の各々の中の標的結合セクション（例えば、領域）は、DNA、RNA、2'OMe-RNA、PNA、アミノ酸、または任意の合成核酸類似体、または任意の合成アミノ酸類似体から構成することができる。図4は、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブを用いた標的分子の検出（パネルa）、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）核酸プローブを用いた標的mRNAの検出（パネルb）、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）抗体プローブを用いた標的タンパク質の検出（パネルc）、並びに、一次抗体プローブおよびスプリットイニシエーター二次抗体プローブを用いた標的タンパク質の検出（パネルd）を図示している。それぞれの場合で、プローブ対がコグネイトな標的分子に選択的に結合することで、完全HCRイニシエーターの半分が2つ共局在化し、係留されたHCR増幅重合体の成長が惹起される。分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ対内の標的結合部位がタンパク質または小分子上のそれらの標的部位に特異的に結合した場合に、HCRイニシエーターの半分が2つ近接し、完全イニシエーターがHCRシグナル増幅を開始可能にするように、標的分子をタンパク質または小分子とすることができる。

20

30

【0252】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピン単量体は、蛍光性ではないレポーター分子（例えば、同位体的に純粋な希土類元素、発色団など）で標識されていてもよい。

【0253】

スキームEについて、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブがその標的セクション（例えば、コグネイトな近位の標的部位）に特異的に塩基対合した場合に、HCRイニシエーターの半分が2つ共局在化するように、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ対内の各プローブは、標的結合部位およびHCRイニシエーターの半分を含み；この機能性は、標的結合部位およびイニシエーター断片を種々の立体配置で分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ対内に配置することによって達成することができる（図3）。

40

【0254】

いくつかの実施形態では、両方のプローブが近位にある場合に初めてHCR増幅が開始されるように、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ対内のHCRイニシエーターは、2個のプローブ間で分割することができる（半々である必要はない）。

【0255】

いくつかの実施形態では、HCRイニシエーターは、2個以上の分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ間で分割することができる。

【0256】

50

いくつかの実施形態では、1または複数の分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ対を含む分割イニシエータープローブセット（またはプローブセット）を用いて、標的mRNAを検出することができ；各プローブ対は、標的mRNAの異なる部分配列に対する標的結合部位を含む。分割イニシエータープローブセット内では、各分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ対が共局在化して同一のHCRイニシエーター配列を形成するため、同じ標的mRNAに結合した複数のプローブ対からHCR増幅重合体を同時に成長させることが可能である。

【0257】

いくつかの実施形態では、標的分子は、mRNA、miRNA、lncRNA、rRNA、ゲノムDNA、または任意の核酸分子とすることができる。

10

【0258】

いくつかの実施形態では、ペア内の2個の分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ間で分割されたイニシエーターは、HCR増幅を開始することが可能な、DNA、RNA、2'OMe-RNA、PNAから構成されたものでも、または任意の合成重合体であってもよい。

【0259】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、複数の第1分割イニシエーター（1151）および第2分割イニシエーター（1251）を追加することを含み、例えば、10個、20個、50個、100個、1000個、10,000個などを追加することを含む。

20

【0260】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、各段階の後に洗浄を伴う、2段階アプローチから構成することができる。いくつかの実施形態では、標的は固定化されており、且つ／または、試料は固定されている。いくつかの実施形態では、第1段階は、分割イニシエータープローブを標的に結合すること、および未結合の分割イニシエータープローブを洗浄除去することを含む検出段階であり、第2段階は、HCR増幅を行う増幅段階である。この後に、未重合のHCR単量体（ヘアピン単量体など）の洗浄除去を行うことができる。いくつかの実施形態では、各段階の後に2回以上の洗浄があり、例えば、2回の洗浄、3回の洗浄、4回の洗浄、または5回の洗浄がある。いくつかの実施形態では、HCR法は洗浄を伴わずに1段階から構成される。

30

【0261】

いくつかの実施形態では、ヘアピン単量体それ自体にレポーター分子を直接挿入するのではなく、HCRヘアピン単量体は標識結合部位を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、試料を洗浄して未重合のHCRヘアピン単量体を除去すること、標識結合部位に対する相補鎖およびレポーター分子を含む標識プローブを添加すること；未結合の標識プローブを洗浄除去すること、並びに、上記レポーター分子の有無を検出すること、をさらに含む。いくつかの実施形態では、標識プローブは、ヘアピン単量体が閉じている場合はフルオロフォアがクエンチされるが、標識プローブがHCR重合体上の標識結合部位と結合するとフルオロフォアがクエンチされないように、フルオロフォア（fluorophore）／クエンチャー対をさらに含むヘアピン分子である。いくつかの実施形態では、標識プローブがHCR重合体上の標識結合部位と結合した場合に、クエンチャーで標識された鎖が移動し、フルオロフォアで標識された鎖がHCR重合体上の標識結合部位に結合するように、標識プローブは、一方の鎖がフルオロフォアを担持し、他方の鎖がクエンチャーを担持している二重鎖である。いくつかの実施形態では、HCR重合体上の標識結合部位に標識プローブが結合すると、FRET対の2つの部分が近接してFRETを起こすことができるように、ヘアピン単量体はFRET対の一方の部分であるレポーターを担持し、標識プローブはFRET対の他方の部分を担持する。いくつかの実施形態では、洗浄による未重合のHCRヘアピン単量体の除去は、未重合のHCRヘアピン単量体の50%超を除去する結果となり、例えば、55%超、60%超、65%超、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超、99%超、99.

40

50

9 % 超、99 . 99 % 超、99 . 999 % 超、または99 . 9999999 % 超を除去する結果となる。

【0262】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される洗浄のいずれも、分割イニシエーター（および／または分割イニシエータープローブ）の50 % 超の除去をもたらすことができ、例えば、55 % 超、60 % 超、65 % 超、70 % 超、75 % 超、80 % 超、85 % 超、90 % 超、95 % 超、99 % 超、99 . 9 % 超、99 . 99 % 超、99 . 999 % 超、または99 . 9999999 % 超の除去をもたらすことができる。

【0263】

いくつかの実施形態では、洗浄は、標的に特異的に結合していないプローブの少なくとも50 ~ 99 % の除去をもたらす。いくつかの実施形態では、洗浄は、上記プローブの50 % 超の除去をもたらす、例えば、55 % 超、60 % 超、65 % 超、70 % 超、75 % 超、80 % 超、85 % 超、90 % 超、または95 % 超、99 % 超、99 . 9 % 超、99 . 99 % 超、99 . 999 % 超、または99 . 9999999 % 超の除去をもたらす。

【0264】

本明細書に記載の方法のいずれかは、第1洗浄をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、第1洗浄は、未結合の第1分割イニシエータープローブ（1190）および未結合の第2分割イニシエータープローブ（1290）を、第1標的分子を含有する試料から除去するものである。いくつかの実施形態では、第1洗浄後、標的分子上の共局在化した第1イニシエータープローブおよび第2イニシエータープローブが第1ヘアピン単量体（1510）によって結合し、これが次に第2ヘアピン単量体（1610）によって結合し、HCR増幅がもたらされる。いくつかの実施形態では、第1洗浄後、未結合のヘアピン単量体が試料から洗浄される。いくつかの実施形態では、上記方法は、追加の洗浄を含み、例えば、2回の洗浄、3回の洗浄、4回の洗浄、5回の洗浄、6回の洗浄、または7回の洗浄を含む。いくつかの実施形態では、上記方法は、7回より多い洗浄を含む。

【0265】

いくつかの実施形態では、分割イニシエーターは、1 ~ 1000ヌクレオチド長とすることができ、例えば、10 ~ 80ヌクレオチド長、10 ~ 60ヌクレオチド長、10 ~ 50ヌクレオチド長、20 ~ 50ヌクレオチド長、20 ~ 30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、分割イニシエーターは、任意の機能的な長さとすることができ、

【0266】

いくつかの実施形態では、各標的セクションは、1 ~ 1000ヌクレオチド長とすることができ、例えば、10 ~ 80ヌクレオチド長、10 ~ 60ヌクレオチド長、10 ~ 50ヌクレオチド長、20 ~ 50ヌクレオチド長、20 ~ 30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、標的セクションは、任意の機能的な長さとすることができ、

【0267】

いくつかの実施形態では、各標的結合セクションは、1 ~ 1000ヌクレオチド長とすることができ、例えば、10 ~ 80ヌクレオチド長、10 ~ 60ヌクレオチド長、10 ~ 50ヌクレオチド長、20 ~ 50ヌクレオチド長、20 ~ 30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、標的結合セクションは、任意の機能的な長さとすることができ、いくつかの実施形態では、標的結合セクションおよび／または標的セクションは、核酸ではないため、本明細書に記載されるようなタンパク質などとすることができ、いくつかの実施形態では、標的結合セクションは、それぞれ、個々の原子から数百kDa（例えば、抗体など）またはそれ以上の長さまで、とすることができ、

【0268】

いくつかの実施形態では、各完全イニシエーターは、完全イニシエーターを形成している分割イニシエーターの合計と同じ長さとすることができ、いくつかの実施形態では、各分割イニシエーターは、完全イニシエーターのサイズの半分程度とすることができ、いくつかの実施形態では、分割イニシエーターの分割サイズは、完全イニシエーターを完成させるための分割イニシエーターの数によって決まる。すなわち、2個、3個、4個、

5 個などの分割イニシエーターが 1 個の完全イニシエーターで使用される場合、当該イニシエーターの 1 / 2、1 / 3、1 / 4、1 / 5 などが、各分割イニシエーターに存在することとなる。いくつかの実施形態では、イニシエーターのサイズは、各分割イニシエーターに等分割される必要はない。完全イニシエーターのサイズは、当該完全イニシエーターを介して H C R が起こることを可能にするのに適したものである。

【0269】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法および／または組成物のいずれかは、少なくとも 1 個の追加の分割イニシエータープロープを加えることを含み、例えば、3 個の分割イニシエーターを加えること、4 個の分割イニシエーターを加えること、5 個の分割イニシエーターを加えること、6 個の分割イニシエーターを加えること、7 個の分割イニシエーターを加えること、8 個の分割イニシエーターを加えること、9 個の分割イニシエーターを加えること、10 個の分割イニシエーターを加えること、11 個の分割イニシエーターを加えること、12 個の分割イニシエーターを加えること、または、14 個の分割イニシエーターを加えること、15 個の分割イニシエーターを加えること、を含む。いくつかの実施形態では、15 個を超える分割イニシエーターが加えられ、例えば、16 ~ 100 個の分割イニシエーター、またはそれ以上、例えば、500 個、1000 個などの分割イニシエーターが加えられる。

【0270】

いくつかの実施形態では、標的分子 (1020) は、第 1 標的セクション (1100) および第 2 標的セクション (1200) を含む。第 1 分割イニシエータープロープ (1190) は、第 1 標的結合セクション (1141) を含むことができ、第 2 分割イニシエータープロープ (1290) は第 2 標的結合セクション (1241) を含む。第 1 標的セクション (1100) は、第 1 標的結合セクション (1141) に結合する (または結合される) ように構成され、第 2 標的セクション (1200) は、第 2 標的結合セクション (1241) に結合する (または結合される) ように構成される。

【0271】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、第 1 ヘアピン単量体 (1510) を第 1 分割イニシエーター (1151) および第 2 分割イニシエーター (1251) の両方に結合すること、第 2 ヘアピン単量体 (1610) を第 1 ヘアピン単量体 (1510) に結合すること、並びに、シグナルを検出すること、をさらに含む。第 1 ヘアピン単量体および第 2 ヘアピン単量体が、ハイブリダイゼーション連鎖反応を経ることで、第 1 ヘアピン単量体および／または第 2 ヘアピン単量体の一方または両方と結び付いているレポーター分子を加える、且つ／または、その量を濃縮することを介して、シグナルを生成または増幅することができる。

【0272】

ヘアピン単量体の添加および／または検出の前に、洗浄工程を行うことができる。いくつかの実施形態では、上記方法は、未結合の第 1 分割イニシエータープロープおよび第 2 分割イニシエータープロープを、標的を含有する試料から除去するための洗浄を含む。いくつかの実施形態では、上記方法は、2 回以上の洗浄、例えば、2 回の洗浄、3 回の洗浄、4 回の洗浄、または 5 回の洗浄を含む。いくつかの実施形態では、試料および／または洗浄後液の中に残った、標的に特異的結合していない個々の分割イニシエータープロープは、完全イニシエーターを共局在化させないため、H C R を惹起しない。

【0273】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、追加の第 1 ヘアピン単量体 (1510) を第 2 ヘアピン単量体 (1610) (既に第 1 ヘアピン単量体に結合している) に結合することを含む。これにより、H C R 重合を介して単量体鎖の延長を達成することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも 10 個の第 1 ヘアピン単量体を追加する。いくつかの実施形態では、少なくとも 100 個の第 1 ヘアピン単量体を追加し、例えば、1000 個、10000 個などの第 1 ヘアピン単量体を追加する。いくつかの実施形態では、上記方法は、第 2 ヘアピン単量体に既に結合している追加の第 1 ヘアピン

単量体に、追加の第2ヘアピン単量体を結合することを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも10個の第2ヘアピン単量体を追加する。いくつかの実施形態では、少なくとも100個の第2ヘアピン単量体を追加し、例えば、1000個、10000個などの第2ヘアピン単量体を追加する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかは、第1ヘアピン単量体の添加と第2ヘアピン単量体の添加を交互に行うことにより重合体が成長するように、完全イニシエーターが第1ヘアピン単量体(1510)と結合し、この第1ヘアピン単量体(1510)が第2ヘアピン単量体(1610)と結合し、この第2ヘアピン単量体(1610)が別の第1ヘアピン単量体と結合し、この別の第1ヘアピン単量体が別の第2ヘアピン単量体と結合し、といった、重合イベントの交互性カスケードを含む。いくつかの実施形態では、上記交互性カスケードは、3個以上のヘアピン単量体の結合を含み、例えば、3個のヘアピン単量体、4個のヘアピン単量体、5個のヘアピン単量体、6個のヘアピン単量体、7個のヘアピン単量体、8個のヘアピン単量体、9個のヘアピン単量体、10個のヘアピン単量体、100個、1000個、10000個、100000個、1000000個、またはそれ以上のヘアピン単量体結合を含む。

10

【0274】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の結合反応のいずれかにおいて、結合はハイブリダイゼーションを含む。いくつかの実施形態では、結合は選択的なタンパク質間相互作用を含む。いくつかの実施形態では、結合は選択的な核酸-タンパク質相互作用を含む。いくつかの実施形態では、結合はイオン結合を含む。いくつかの実施形態では、結合は共有結合を含む。

20

【0275】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法または組成物のいずれかにおいて、レポーター分子は蛍光分子である。いくつかの実施形態では、レポーター分子は、第1ヘアピン単量体および第2ヘアピン単量体によって重合体構成が達成された場合に、ヘアピン単量体上の蛍光分子が脱クエンチされる、クエンチされた構成またはFRET構成を含む。いくつかの実施形態では、レポーター分子は非蛍光分子である。いくつかの実施形態では、レポーター分子は希土類元素である。

【0276】

いくつかの実施形態では、第1ヘアピン単量体および第2ヘアピン単量体は、重合体として結合した場合にFRET対を形成する。いくつかの実施形態では、FRET対は、ヘアピン単量体が開いて重合する際に起こるクエンチングまたはFRETにおける変化に起因して形成される。そのため、いくつかの実施形態では、ヘアピン単量体は、FRETを可能にするように構成される(例えば、モニター対象のFRETにおける変化のための近接要件およびレポーター分子対合要件を満たすヘアピン単量体)。

30

【0277】

いくつかの実施形態では、第1分割イニシエータープローブ(1190)は、アミノ酸配列を含むことができ、第2分割イニシエータープローブ(1290)は、アミノ酸配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、上記プローブは、標的配列にハイブリダイズするための核酸配列も含むこととなる。これらは、第1標的結合セクションおよび第2標的結合セクションであり得る。いくつかの実施形態では、標的結合セクションは、第1標的セクションおよび第2標的セクション(1100および1200)に対して相補的である。いくつかの実施形態では、第1分割イニシエータープローブおよび第2分割イニシエータープローブは、第1分割イニシエーターおよび第2分割イニシエーターも含むこととなり、上記第1分割イニシエーターおよび第2分割イニシエーターは、共局在化した場合に完全イニシエーターを形成する適切な長さの核酸配列を与えるヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、第1分割イニシエータープローブ(1190)は核酸配列を含み、第2分割イニシエータープローブ(1290)は核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1分割イニシエーターおよび第2分割イニシエーター(1151、1251)は、第1ヘアピン単量体(1510)と塩基対合することができる。いくつかの実施形態では、第1分割イニシエータープローブは、以下のうちの1または複数を

40

50

含み：DNA、RNA、2' Ome-RNA、LNA、合成核酸類似体、アミノ酸、合成アミノ酸類似体、およびPNA；第2分割イニシエータープローブは、以下のうちの1または複数を含む：DNA、RNA、2' Ome-RNA、LNA、合成核酸類似体、アミノ酸、合成アミノ酸類似体、およびPNA。

【0278】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の洗浄緩衝液のいずれかは、ホルムアミドを含む。いくつかの実施形態では、ホルムアミドのパーセント濃度は0%~80%であり、例えば、10%~70%、または30%~60%である。いくつかの実施形態では、洗浄用緩衝液はクエン酸を含む。いくつかの実施形態では、クエン酸のモル濃度は1 nM~30 nMであり、例えば、5 nM~15 nMまたは8 nM~12 nMである。いくつかの実施形態では、洗浄用緩衝液は、Tween（登録商標）を含む。いくつかの実施形態では、Tween（登録商標）のパーセント濃度は0%~1.0%であり、例えば、0.05%~0.5%である。いくつかの実施形態では、洗浄用緩衝液は、ヘパリンを含む。いくつかの実施形態では、ヘパリンの濃度は20 µg/mL~80 µg/mLであり、例えば、30 µg/mL~70 µg/mLであり、例えば、40 µg/mL~60 µg/mLである。

10

【0279】

分割イニシエーターは他のコンディショナルプローブとは異なる。例えば、いくつかの実施形態では、分割イニシエーターは、高次構造変化プローブ（例えば、図2のスキームB）ではない。いくつかの実施形態では、分割イニシエーターは2つの別々の核酸鎖を含むものである。いくつかの実施形態では、分割イニシエーターは、少なくとも2つの異なる標的セクションに対する少なくとも2つの別々の結合イベントに依存する（ただし、上記2つのセクションは1つの分子上にあってもよい）。

20

【0280】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、ハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）を介したインサイツシグナル増幅のためのSB比を改善するために用いることができる。

【0281】

図18Cは、HCR、特に、分割イニシエータープローブと標識結合部位を有するヘアピン単量体とを用いた3段階インサイツHCRプロトコルを含むさらなる実施形態を図示している。検出段階：分割イニシエータープローブ対を標的mRNAにハイブリダイズさせ、使われなかったプローブを試料から洗浄する。各分割イニシエータープローブセットは、標的mRNA内の異なる部分配列に選択的に結合する1または複数のプローブ対を含む。プローブ対内の各プローブは、HCRイニシエーターI1の一部を有する（例えば、1/2）。プローブ対内の2つのプローブがそれらのコグネイトな標的結合部位に選択的にハイブリダイズすることで、完全HCRイニシエーターI1の半分が2つ共局在化する。増幅段階：完全HCRイニシエーターI1によって、係留された増幅重合体の自己集合を惹起し、使われなかったH1ヘアピン単量体およびH2ヘアピン単量体を試料から洗浄する。各ヘアピン単量体は標識結合部位を有する。標識結合部位は得られるHCR増幅重合体を装飾する。標識段階：標識結合部位に対する相補鎖を含み、且つ、フルオロフォアレポーターをさらに含む標識プローブを、増幅重合体にハイブリダイズした後、未結合の標識プローブを試料から洗浄する。星はフルオロフォアを表す。所望の結果に応じて、各段階を反復しても、組み合わせても、あるいは分離してもよい。いくつかの実施形態では、各段階は記載された順序で起こる。

30

40

【0282】

図15は、簡略化したHCRヘアピンを用いてHCR機序を示している。コグネイトなイニシエーターを検出すると、準安定性の蛍光性ヘアピンが自己集合して蛍光性増幅重合体になる。イニシエーターI1は、一本鎖トーホールド「a」への塩基対合によりヘアピンH1と核形成し、ヘアピンを開く分枝点移動を仲介し、一本鎖セグメント「a*-b*」を含有する複合体I1・H1を形成する。この複合体が、トーホールド「a」への塩基

50

対合によって第2ヘアピン単量体（ヘアピンH2）と核形成し、ヘアピンを開く分枝点移動が仲介せられ、一本鎖セグメント「 $b^* - a^*$ 」を含有する複合体 $I_1 \cdot H_1 \cdot H_2$ が形成される。このようにしてイニシエーター配列が再生成され、これが、H1重合工程とH2重合工程とを交互に行う連鎖反応の基礎となる。星はフルオロフォアを表す。矢印は各鎖の3'末端を表す。なお、これら2つのヘアピンは、同じ配列ドメインを有するが、鎖の方向性が反対である（5'から3'に向かうヘアピン単量体H1の場合は $a - b - a^* - b^*$ ）および（3'から5'に向かうヘアピン単量体H2の場合は $a - b - a^* - b^*$ ）。

【0283】

いくつかの実施形態では、「ドメインa」はドメイン「c」と同じである（例えば、図13に示されているように）。すなわち、両方のヘアピンが同じループ配列およびトールド配列を用いている。これは、より少ない配列空間を用いて同じ機能性を達成する標準的なHCRのケースの特殊なケースである。

【0284】

F i s h

いくつかの実施形態では、上記方法は、バイオテクノロジープロトコルの一部である。いくつかの実施形態では、上記方法は、蛍光インサイツハイブリダイゼーション法（FISH）の一部とすることができる。蛍光インサイツハイブリダイゼーション法は、細胞内、組織内、器官内、生物内、および生態系内の標的mRNAの発現パターンを明らかにすることにより（1～7）、内在性生物学的回路網の空間的構成への重大な観察手段を生物学者に提供する。試料内の自家蛍光が少ない場合、1または複数の蛍光レポーター分子をそれぞれ有し、且つ、標的mRNAの一部と相補的な標的結合配列をそれぞれ含む、1または複数の核酸プローブを含む分割イニシエータープローブセットを用いて、十分なシグナルを生成することができ（8～14）；全載脊椎動物胚および厚い脳切片を含む多くの条件で、このアプローチは十分なシグナルを生じないため、SB比を増加させるためにインサイツシグナル増幅を媒介するプローブを代わりに使用する（3、6、7、11、15～31）。

【0285】

いくつかの実施形態では、上記方法は、高いSB比で試料内の標的mRNAをマッピングすることを可能にする。いくつかの実施形態では、FISH法がインサイツシグナル増幅を組み込んでおり、その場合、試料内の全ての蛍光は、増幅されたシグナルか、何らかの形態のバックグラウンドのいずれかである。

【0286】

増幅されたシグナル

プローブがそのコグネイトな標的に特異的にハイブリダイズした後、標的分子の部位で蛍光性増幅産物の生成を媒介すると、増幅されたシグナルが生成される。

【0287】

バックグラウンド

試料内の他の全ての蛍光は何らかの形態のバックグラウンドである。

【0288】

自家蛍光

自家蛍光は試料に固有のバックグラウンド蛍光である。

【0289】

増幅されたバックグラウンド

プロトコルのいずれかの段階における試薬の非特異的結合が、プロトコルのその後の段階で増幅産物の生成をもたらすと、増幅されたバックグラウンドが生成される。

【0290】

非増幅バックグラウンド

蛍光性試薬が試料内で非特異的に結合するが、増幅産物の生成をもたらさない場合、非増幅バックグラウンドが生成される。

【0291】

10

20

30

40

50

これにより、この手法の成績は、うまくいくもの（増幅シグナルの生成）とうまくいかないもの（3つの発生源のいずれかからのバックグラウンドの生成：自家蛍光、非増幅バックグラウンド、増幅バックグラウンド）の両方に依存する。画像内のボクセルにおいて高いS/B比を達成するには、ボクセル内の総バックグラウンドよりも大幅に高い増幅シグナルを生成することが有用である。

【0292】

ハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）の機序に基づいたプログラム可能なインサイツ増幅（32）が、多様な生物において、簡単な多重化、深い試料浸透、高いS/B比、および細胞内解像度を可能にする（33～35）。HCRアンプリファイアとしては、コグネイトなイニシエーター鎖（I1；図1a）の非存在下では準安定に共存している2つの速度論的にトラップされた核酸ヘアピン分子（H1およびH2）が挙げられる。イニシエーターが到着すると連鎖反応が惹起され、H1ヘアピンおよびH2ヘアピンが順次核形成して開き、集合して、長いニックの入った二本鎖増幅重合体になる（32）。インサイツHCRで用いる場合、mRNA標的と相補的なDNAプローブが、準安定なフルオロフォア標識DNAヘアピンが自己集合して係留された蛍光性増幅重合体になる連鎖反応を惹起するDNA HCRイニシエーターを有する（図1b）。標的RNAの数とは無関係に、同じ2段階インサイツハイブリダイゼーションプロトコルが使用され（図1c）：検出段階では、全ての分割イニシエータープローブセットを同時にハイブリダイズさせ；増幅段階では、オルソゴナルなHCRアンプリファイアが同時に作動する。

【0293】

HCRは、分子プログラミング分野およびダイナミック核酸ナノテクノロジー分野の原理を利用して、様々な技術的環境において等温の無酵素シグナル増幅を提供し（36～39）、特にインサイツ増幅の需要に適している（33、34）。第一に、HCRはプログラム可能であり、独立に動作し、スペクトル的に異なるフルオロフォアを有するオルソゴナルなアンプリファイアを使用した簡単な多重化の基礎を提供する。標的mRNAの数に依存しない2段階プロトコルの使用は、どのようなサンプルにも好都合であるが、連続多重化プロトコルの間に損傷を受けやすいウニ胚などのデリケートな試料には必須である。第二に、HCRヘアピン単量体は、コグネイトなイニシエーターを有するプローブと出会うまで自己集合しないため、標的分子の部位で明るい増幅重合体を成長させる前に、試料に深く浸透することが可能である。二本鎖システムを有する構造化ヘアピンの増幅試薬を用いることで、試料内の非特異的なハイブリダイゼーションの可能性が低減され、また複数のオルソゴナルなアンプリファイアの設計がより容易になる。増幅重合体が数百のフルオロフォアを担持できること（34）から、自家蛍光が高い場合でも（例えば、全載脊椎動物胚（34、40、41）、または環境試料や他の生物に含まれる細菌（42～44）においても）、高いS/B比を達成することが可能である。第三に、HCR増幅重合体は開始プローブに係留されたままであるため、シグナルが標的から拡散するのを防ぎ、細胞内解像度につながる。第四に、HCRアンプリファイアの配列はmRNA標的配列に依存しないので、既に検証済みのアンプリファイア（34）を改変することなく新規の研究に使用することができる。新規の標的mRNAをマッピングするために必要なものは、既存のDNA HCRアンプリファイア用のDNAイニシエーターを有する新規のDNA分割イニシエータープローブセットだけである。まとめると、インサイツHCRの特性は、多様な生物において、簡単な多重化、深い試料浸透、高いS/B比、細胞内解像度をもたらす、生物学者に生物学的回路網の空間構成を知るための飛躍的に改善された観察手段を提供する。以下、HCRインサイツシグナル増幅を用いたS/B比を最適化するための異なるアプローチを採用した、5つのスキーム（A、B、C、D、E）について説明する（図2）。図1bに示す標準的なインサイツHCRアプローチ（34）は、スキームAに相当する。

【0294】

スキームA：二段階プロトコル：非構造化プローブを用いた標的検出、その後、HCRヘアピン単量体を用いたプローブ検出およびHCR増幅。非構造化プローブは、標的結合セクション（例えば、標的結合配列）および非構造化HCRイニシエーター配列を含む。

イニシエーターは、プローブがコグネイトな標的mRNAとハイブリダイズするか否かに関わらずHCRを開始するためにアクセス可能である。HCRヘアピン単量体同士は、コグネイトなHCRイニシエーターによって開始された場合以外では、ほとんど相互作用せず；開始は、連続的なヘアピンの核形成と開裂による重合を引き起こし、イニシエーターと塩基対合したHCR増幅重合体をもたらす。

【0295】

段階1：非構造化プローブを用いた標的検出：プローブを固定された試料内でハイブリダイズさせ、未使用のプローブを洗浄除去する。プローブは大部分がコグネイトな標的mRNAに結合するが、無視できない割合のプローブが試料内の他の部分と結合する。試料内に残っているプローブは、コグネイトな標的mRNAに結合しているか否かに関わらず、ステージ2で増幅を惹起する。

10

【0296】

段階2：HCRヘアピン単量体を用いたプローブ検出およびHCR増幅：HCRヘアピン単量体を固定された試料内でハイブリダイズさせ、未使用のヘアピンを洗浄除去する。試料内のプローブは、係留されたHCR増幅重合体の成長を惹起し、標的分子に結合したプローブの位置では増幅されたシグナルを生成し、試料内の他の場所に結合したプローブの位置では増幅されたバックグラウンドを生成する。試料内で非特異的に結合するHCRヘアピン単量体はHCR重合を惹起しないため、増幅されたバックグラウンドの生成に寄与することはなく、無視できる量の未増幅バックグラウンドをもたらす。

【0297】

20

性能への影響：スキームAは、段階2で増幅されたバックグラウンドを発生させる、段階1での非特異的なプローブ結合に対して脆弱である。プローブが構造化されないため、スキームAには、標的結合配列とHCRイニシエーター配列が独立しており；その結果、検証済みのHCRイニシエーターとHCRヘアピン単量体を、HCRイニシエーターとHCRヘアピン単量体の配列を変更することなく、多様な新規プローブと標的に使うことができるという利点がある。

【0298】

スキームB：二段階プロトコル：ヘアピンプローブを用いた標的検出、その後、HCRヘアピン単量体を用いたプローブ検出およびHCR増幅。ヘアピンプローブは、標的結合セクション（例えば、標的結合配列）およびHCRイニシエーター配列を含み、HCRイニシエーターはヘアピンプローブ内の塩基対合により最初はアクセスできず；ヘアピンプローブがそのコグネイトな標的mRNAに塩基対合すると、プローブが高次構造を変化させて、HCRイニシエーターがアクセス可能となり、HCR増幅を開始することが可能になる。HCRヘアピン単量体同士は、コグネイトなHCRイニシエーターによって開始された場合以外では、ほとんど相互作用せず；開始は、連続的なヘアピンの核形成と開裂による重合を引き起こし、イニシエーターと塩基対合したHCR増幅重合体をもたらす。

30

【0299】

段階1：ヘアピンプローブを用いた標的検出：プローブを固定された試料内でハイブリダイズさせ、未使用のプローブを洗浄除去する。プローブは大部分がコグネイトな標的mRNAに結合するが、無視できない割合のプローブが試料内の他の部分と結合する。コグネイトな標的mRNAにハイブリダイズしたプローブは、高次構造を変化させて、アクセス可能なHCRイニシエーターを露出させ、段階2で増幅されたシグナルの生成をもたらす。試料内の他の場所に結合したプローブはアクセス不可なHCRイニシエーターを有するため、HCR増幅を惹起せず、段階2での増幅されたバックグラウンドの生成を回避する。

40

【0300】

段階2：HCRヘアピン単量体を用いたプローブ検出およびHCR増幅：HCRヘアピン単量体を固定された試料内でハイブリダイズさせ、未使用のヘアピンを洗浄除去する。そのコグネイトな標的にハイブリダイズしたプローブは、係留されたHCR増幅重合体の成長を惹起し、標的分子の位置に増幅されたシグナルを生成する。試料内の他の場所に結

50

合したプローブは、増幅を惹起せず、増幅されたバックグラウンドの生成を回避する。試料内で非特異的に結合するH C Rヘアピン単量体はH C R重合を惹起しないため、増幅されたバックグラウンドの生成に寄与することはなく、無視できる量の未増幅バックグラウンドをもたらす。

【0301】

性能への影響：段階2で非特異的に結合したプローブがH C R増幅を惹起しないため、スキームBは段階1での非特異的なプローブ結合に対して脆弱ではない。これにより、スキームBは、試薬がプロトコルのどの段階で非特異的に結合しても、増幅されたバックグラウンドをほとんど生成させることがないという特性を有する。スキームBの欠点は、ヘアピンプローブを用いると、標的結合配列とH C Rイニシエーター配列との間にある程度の配列相補性があるということである。結果として、標的結合セクション（例えば、標的結合配列）を変更するには、H C Rイニシエーター配列とH C Rヘアピン単量体配列を変更することが必要であり、これが、スキームAの簡易性と比べると不便である。

10

【0302】

スキームC：三段階プロトコル：非構造化プローブ対を用いた標的検出、その後、非構造化ブリッジを用いたプローブ対検出、その後、H C Rヘアピン単量体を用いたブリッジ検出およびH C R増幅。非構造化プローブは2つ一組であり；各プローブは、標的結合セクション（例えば、標的結合配列）と、構造化されていない核形成配列の半分を含み；プローブ対内の2つのプローブについては、2つのプローブがそれらの標的セクション（例えば、コグネイトな標的部位）に特異的に結合した場合に、2つの核形成配列の半分が近接するように、2つの標的結合セクション（例えば、標的結合配列）は、標的m R N Aの標的セクション（例えば、近接する部分配列）に相補的である。非構造化ブリッジ鎖は、2つの核形成配列の半分に相補的な近接結合配列を含み；非構造化ブリッジ鎖は、ブリッジ鎖がそのコグネイトな核形成部位に特異的に塩基対合しているか否かに関わらずH C Rを惹起するためにアクセス可能なH C Rイニシエーターも含む。H C Rヘアピン単量体同士は、コグネイトなH C Rイニシエーターによって開始された場合以外では、ほとんど相互作用せず；開始は、連続的なヘアピンの核形成と開裂による重合を引き起こし、イニシエーターと塩基対合したH C R増幅重合体をもたらす。

20

【0303】

段階1：非構造化プローブ対を用いた標的検出：プローブを固定された試料内でハイブリダイズさせ、未使用のプローブを洗浄除去する。プローブ対は大部分がそれらの標的セクション（例えば、コグネイトな標的部位）に塩基対合し、2つの核形成配列の半분을共局在化させ；無視できない割合のプローブが試料内の他の場所に結合するが、非特異的に結合したプローブは2つの核形成配列の半분을ほとんど共局在化させない。

30

【0304】

段階2：非構造化ブリッジを用いたプローブ対検出：隣接した標的セクション（例えば、コグネイトな標的部位）に特異的に塩基対合したコグネイトなプローブ対によって形成された完全核形成配列に、ブリッジ鎖の大部分が安定に塩基対合するような実験条件下で、非構造化ブリッジ鎖を固定された試料内でハイブリダイズさせ；さらに、上記実験条件は、ブリッジ鎖の大部分が、パートナープローブと近接していない個々のプローブが有する半核形成部位には安定に塩基対合しないような実験条件である。無視できない割合のブリッジが試料内で非特異的に結合し；非特異的に結合したブリッジは段階3でH C R増幅を惹起し、増幅されたバックグラウンドを生成する。

40

【0305】

段階3：H C Rヘアピン単量体を用いたブリッジ検出およびH C R増幅：H C Rヘアピン単量体を固定された試料内でハイブリダイズさせ、未使用のヘアピンを洗浄除去する。試料内のブリッジ鎖が係留されたH C R増幅重合体の成長を惹起し；近接した標的セクション（例えば、コグネイトな標的部位）に塩基対合したコグネイトなプローブ対によって形成されたコグネイトな核形成部位にブリッジ鎖が塩基対合している場合、これらの重合体は増幅されたシグナルを表す。ブリッジ鎖が試料内の他の場所に結合している場合、こ

50

これらの重合体は増幅されたバックグラウンドに相当する。試料内で非特異的に結合する H C R ヘアピン単量体は H C R 重合を惹起しないため、増幅されたバックグラウンドの生成に寄与することはなく、無視できる量の未増幅バックグラウンドをもたらす。

【0306】

性能への影響：段階 2 でブリッジは孤立プローブに安定にほとんど塩基対合しないため、スキーム C は段階 1 での非特異的なプローブ結合に対して脆弱ではない。しかし、スキーム C は、段階 3 で増幅されたバックグラウンドを発生させる、段階 2 でのブリッジの非特異的結合に対しては脆弱である。なお、スキーム C の段階 2 の非構造化ブリッジには、スキーム A の段階 1 の非構造化プローブと同じ概念的な脆弱さがある。スキーム A と比較したスキーム C の利点は、スキーム C を用いると、ブリッジ配列ライブラリーを所与の種での使用用に最適化することができ、その後、ブリッジ配列を変更することなく、多様な新規のプローブおよび標的に対してそれらのブリッジ配列を用いることができる点である。これに対して、スキーム A では、それぞれの新規プローブ配列を、所与の種での使用のために最適化する必要がある。しかし、スキーム C により最適化されたブリッジ配列を用いても、無視できない割合のブリッジが試料内で非特異的に結合し、プロトコルの次の段階で増幅されたバックグラウンドを生成する。同様に、スキーム A を用いて最適化されたプローブ配列を用いても、無視できない割合のプローブが試料内で非特異的に結合し、プロトコルの次の段階で増幅されたバックグラウンドを生成する。

【0307】

スキーム D：三段階プロトコル：非構造化プローブ対を用いた標的検出、その後、ヘアピンブリッジを用いたプローブ対検出、その後、H C R ヘアピン単量体を用いたブリッジ検出および H C R 増幅。非構造化プローブは 2 つ一組であり；各プローブは、標的結合セクション（例えば、標的結合配列）と、構造化されていない核形成配列の半分を含み；プローブ対内の 2 つのプローブについては、2 つのプローブがそれらの標的セクション（例えば、コグネイトな標的部位）に特異的に結合した場合に、2 つの核形成配列の半分が近接するように、2 つの標的結合セクション（例えば、標的結合配列）は、標的 m R N A の標的セクション（例えば、近接する部分配列）に相補的である。ヘアピンブリッジは、2 つの核形成配列の半分に相補的な近接結合配列を含み；ヘアピンブリッジは、ヘアピンブリッジ内の塩基対合により最初はアクセスできない H C R イニシエーターも含み；ヘアピンブリッジがそのコグネイトな核形成配列の半分の両方に塩基対合すると、ブリッジが高次構造を変化させて、H C R イニシエーターがアクセス可能になり、H C R 増幅を惹起することが可能になる。H C R ヘアピン単量体同士は、コグネイトな H C R イニシエーターによって開始された場合以外では、ほとんど相互作用せず；開始は、連続的なヘアピンの核形成と開裂による重合を引き起こし、イニシエーターと塩基対合した H C R 増幅重合体をもたらす。

【0308】

段階 1：非構造化プローブ対を用いた標的検出：プローブを固定された試料内でハイブリダイズさせ、未使用のプローブを洗浄除去する。プローブ対は大部分がそれらの標的セクション（例えば、コグネイトな標的部位）に塩基対合し、2 つの核形成配列の半분을共局在化させ；いくつかのプローブが試料内の他の場所に結合するが、非特異的に結合したプローブは 2 つの核形成配列の半분을ほとんど共局在化させない。

【0309】

段階 2：ヘアピンブリッジを用いたプローブ対検出：ヘアピンブリッジ鎖を固定された試料内でハイブリダイズさせ、未使用のブリッジを洗浄除去する。ヘアピンブリッジ鎖の大部分が、近接標的セクション（例えば、コグネイトな標的部位）に特異的に塩基対合したコグネイトなプローブ対によって形成された完全核形成配列に、安定に塩基対合し；特異的に結合したヘアピンブリッジは、高次構造を変化させて、アクセス可能な H C R イニシエーターを露出させ、段階 3 で増幅されたシグナルの生成をもたらす。試料内の他の場所に結合したヘアピンブリッジはアクセス不可な H C R イニシエーターを有し、H C R 増幅を惹起せず、段階 3 での増幅されたバックグラウンドの生成を回避する。

【0310】

段階3：HCRヘアピン単量体を用いたブリッジ検出およびHCR増幅：HCRヘアピン単量体を固定された試料内でハイブリダイズさせ、未使用のヘアピンを洗浄除去する。露出したHCRイニシエーターと特異的に結合したヘアピンブリッジは、係留された蛍光性増幅重合体の成長を惹起し、標的分子の位置に増幅されたシグナルを生成する。試料内で非特異的に結合するHCRヘアピン単量体はHCR重合を惹起しないため、増幅されたバックグラウンドの生成に寄与することではなく、無視できる量の未増幅バックグラウンドをもたらす。

【0311】

性能への影響：段階2でヘアピンブリッジは孤立プローブに安定にほとんど塩基対合しないため、スキームDは段階1での非特異的なプローブ結合に対して脆弱ではない。さらに、段階3で非特異的に結合したヘアピンブリッジは増幅を惹起しないため、スキームDは段階2での非特異的なヘアピンブリッジ結合に対して脆弱ではない。これにより、スキームDは、試薬がプロトコルのどの段階で非特異的に結合しても、増幅されたバックグラウンドをほとんど生成させることがないという重要な特性を、スキームBと共有している。スキームBと比較したスキームDの利点は、ブリッジ核形成部位が、それ故HCRイニシエーター配列およびHCRヘアピン単量体配列が、プローブの標的結合部位と独立しており；その結果、検証済みのHCRイニシエーターとアンプリファイアを、HCRイニシエーターとアンプリファイアの配列を変更することなく、多様な新規プローブと標的に使うことができる点である。

【0312】

スキームBと比較したスキームDの欠点は、2段階から3段階への段階数の増加である。

【0313】

スキームE：二段階プロトコル：非構造化分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ対を用いた標的検出、その後、HCRヘアピン単量体を用いたプローブ対検出およびHCR増幅。非構造化分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）（別名、分割イニシエーター）プローブは2つ一組であり；各プローブは、標的結合セクション（例えば、標的結合配列）と、非構造化HCRイニシエーターの半分を含み；プローブ対内の2つのプローブについては、2つのプローブがそれらの標的セクション（例えば、コグネイトな標的部位）に特異的に結合した場合に、2つのHCRイニシエーターの半分が近接するように、2つの標的結合セクション（例えば、標的結合配列）は、標的mRNAの標的セクション（例えば、近接する部分配列）に相補的である。HCRヘアピン単量体同士は、コグネイトなHCRイニシエーター（完全イニシエーター）によって開始された場合以外では、ほとんど相互作用せず；開始は、連続的なヘアピンの核形成と開裂による重合を引き起こし、イニシエーター（完全イニシエーター）と塩基対合したHCR増幅重合体をもたらす。

【0314】

段階1：非構造化分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ対を用いた標的検出：プローブを固定された試料内でハイブリダイズさせ、未使用のプローブを洗浄除去する。プローブ対は大部分がそれらの標的セクション（例えば、コグネイトな標的部位）に塩基対合し、2つのHCRイニシエーターの半分以上を共局在化させ；いくらかのプローブが試料内の他の場所に結合するが、非特異的に結合したプローブは2つのHCRイニシエーターの半分以上をほとんど共局在化させない。

【0315】

段階2：HCRヘアピン単量体を用いたプローブ対検出およびHCR増幅：HCRヘアピン単量体を固定された試料内でハイブリダイズさせ、未使用のヘアピンを洗浄除去する。標的セクション（例えば、コグネイトな標的部位）に特異的にハイブリダイズしたプローブ対は2つのHCRイニシエーターの半分以上を共局在化させ、係留された蛍光性HCR増幅重合体の成長を協同的に惹起し、標的分子の位置に増幅されたシグナルを生成する。非

特異的に結合したプローブは、2つのHCRイニシエーターの半分を共局在化させず、HCR増幅を惹起しないため、増幅されたバックグラウンドの生成を回避する。試料内で非特異的に結合するHCRヘアピン単量体はHCR重合を惹起しないため、増幅されたバックグラウンドの生成に寄与することではなく、無視できる量の未増幅バックグラウンドをもたらす。

【0316】

性能への影響：段階2で孤立した分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブはHCR増幅を惹起しないため、スキームEは段階1での非特異的なプローブ結合に対して脆弱ではない。これにより、スキームEは、プロトコルの全ての段階で能動バックグラウンド抑制が可能であり、試薬がプロトコルのどの段階で非特異的に結合しても、増幅されたバックグラウンドをほとんど生成させることがないという重要な特性を、スキームBおよびスキームDと共有している。

【0317】

スキームDと比較したとき、スキームEには特に、HCRヘアピン単量体がヘアピンブリッジの役割を果たすため、ヘアピンブリッジを分離する必要がなく、プロトコルの段階数を3段階から2段階に減らすという利点がある。スキームCと比較したとき、スキームDおよびスキームEには特に、ブリッジが、非特異的に結合した場合に、増幅されたバックグラウンドの生成に寄与しないという利点がある。スキームBと比較したとき、スキームEには特に、HCRイニシエーター配列およびHCRヘアピン単量体配列がプローブの標的結合セクション（例えば、標的結合配列）と独立しているという利点がある。結果として、検証済みのHCRイニシエーターおよびHCRヘアピン単量体を、HCRイニシエーター配列およびHCRヘアピン単量体配列を変更することなく、多様な新規のプローブおよび標的に使用することができる。全体的として、スキームEには、スキームA、B、C、およびDの全ての利点があり、いずれの欠点もない：2段階プロトコルの簡単さ、検証済みのHCRイニシエーターおよびHCRヘアピン単量体を新規の標的配列に再利用できる多用途性、並びに、試薬がプロトコルのどの段階で試料内で非特異的に結合しても、増幅されたバックグラウンドの生成を回避するロバスト性。

【0318】

図1は、ハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）を介したインサイト増幅を図示している。（a）HCRの機序。コグネイトなイニシエーターを検出すると、準安定性の蛍光性ヘアピンが自己集合して蛍光性増幅重合体になる。イニシエーターI1は、一本鎖トーホールド「a」への塩基対合により第1ヘアピン単量体（例えば、ヘアピンH1）と核形成し、ヘアピンを開く分枝点移動を仲介し、一本鎖セグメント「c* - b*」を含有する複合体I1 H1を形成する。この複合体が、トーホールド「c」への塩基対合によって第2ヘアピン単量体（ヘアピンH2）と核形成し、ヘアピンを開く分枝点移動を仲介し、一本鎖セグメント「b* - a*」を含有する複合体I1 H2を形成する。このようにしてイニシエーター配列が再生成され、これが、H1重合工程とH2重合工程とを交互に行う連鎖反応の基礎となる。星はフルオロフォアを表す。矢印は各鎖の3'末端を表す。（b）インサイトハイブリダイゼーションプロトコル（スキームAの標準プローブを使用）

【0319】

検出段階に関しては：分割イニシエータープローブセットをmRNA標的にハイブリダイズし、未使用のプローブを試料から洗浄する。増幅段階に関しては：イニシエーターが係留された蛍光性増幅重合体の自己集合を惹起し、未使用のヘアピンは試料から洗浄される。（c）実験のタイムライン。標的mRNAの数にかかわらず、同じ2段階プロトコルが使用される。多重実験（三色を用いた例が図示されている）において、異なる標的mRNAに対する分割イニシエータープローブセット（1セット当たり5本のプローブが図示）は、スペクトルが異なるフルオロフォアで標識された直交HCR増幅カスケードを惹起する直交イニシエーターを有する。

【0320】

図 2 は、5 つのスキームについて、上記の図解を概略形式で示している。スキーム A：二段階プロトコル：非構造化プローブを用いた標的検出、その後、H C R ヘアピン単量体を用いたプローブ検出および H C R 増幅。スキーム B：二段階プロトコル：ヘアピンプローブを用いた標的検出、その後、H C R ヘアピン単量体を用いたプローブ検出および H C R 増幅。スキーム C：三段階プロトコル：非構造化プローブ対を用いた標的検出、その後、非構造化ブリッジを用いたプローブ対検出、その後、H C R ヘアピン単量体を用いたブリッジ検出および H C R 増幅。スキーム D：三段階プロトコル：非構造化プローブ対を用いた標的検出、その後、ヘアピンブリッジを用いたプローブ対検出、その後、H C R ヘアピン単量体を用いたブリッジ検出および H C R 増幅。スキーム E：二段階プロトコル：非構造化分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ対を用いた標的検出、その後、H C R ヘアピン単量体を用いたプローブ対検出および H C R 増幅。矢印は各鎖の 3' 末端を表す。

10

【0321】

図 3：スプリットイニシエータープローブ対内の 2 つの標的結合部位および 2 つの分割イニシエーター（H C R イニシエーター断片）の別構成。各構成（1、2、3、4、5）において、プローブ対内の各プローブは、完全 H C R イニシエーターの半分（別名、H C R イニシエーター I 1 の半分）を有しており；対内の 2 つのプローブがコグネイトな標的分子に特異的結合すると、完全 H C R イニシエーターの半分（別名、H C R イニシエーター I 1 の半分）が 2 つ共局在化することとなる。矢印は各鎖の 3' 末端を表す。

20

【0322】

図 4 は、スプリットイニシエータープローブが標的分子によって共局在化される追加の実施形態を示している。（a）分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ。第 1 分割イニシエータープローブ（プローブ 1）および第 2 分割イニシエータープローブ（プローブ 2）はそれぞれ、H C R イニシエーター I 1 の半分以上を有しており；第 1 分割イニシエータープローブ（プローブ 1）および第 2 分割イニシエータープローブ（プローブ 2）が標的分子に選択的に結合すると、これらの 2 つの H C R イニシエーター I 1 の半分は共局在化する。（b）分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）核酸プローブ。核酸プローブ 1 および核酸プローブ 2 はそれぞれ、H C R イニシエーター I 1 の半分以上を有しており；核酸プローブ 1 および核酸プローブ 2 が標的 m R N A に選択的に結合すると、これらの 2 つの H C R イニシエーター I 1 の半分が共局在化する。

30

（c）分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）抗体プローブ。抗体プローブ 1 および抗体プローブ 2 はそれぞれ、H C R イニシエーター I 1 の半分以上を有しており；抗体プローブ 1 および抗体プローブ 2 がタンパク質標的に選択的に結合すると、これらの 2 つの H C R イニシエーター I 1 の半分が共局在化する。（d）スプリットイニシエーター二次抗体プローブ。一次抗体プローブ 1 はタンパク質標的に選択的に結合し；二次抗体プローブ 2 および二次抗体プローブ 3 はそれぞれ、H C R イニシエーター I 1 の半分以上を有しており；二次抗体プローブ 2 および二次抗体プローブ 3 が一次抗体プローブ 1 に選択的に結合し、2 つの H C R イニシエーター I 1 の半分以上を共局在化させる。

【0323】

図 5 は、標的複合体によって共局在化された分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブに関する追加の実施形態を示している。（a）分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ。標的複合体は、分子 2 に結合した分子 1 を含み；第 1 分割イニシエータープローブ（プローブ 1）および第 2 分割イニシエータープローブ（プローブ 2）はそれぞれ、H C R イニシエーター I 1 の半分以上を有しており；プローブ 1 が標的複合体内の分子 1 に選択的に結合し、プローブ 2 が標的複合体内の分子 2 に選択的に結合すると、これらの 2 つの H C R イニシエーター I 1 の半分が共局在化する。（b）分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）核酸プローブ。標的複合体は、核酸標的 2 に結合した核酸標的 1 を含み；核酸プローブ 1 および核酸プローブ 2 はそれぞれ、H C R イニシエーター I 1 の半分以上を有しており；核酸プローブ 1 が標的複合体内の核酸標的 1 に選択的に結合し、核酸プローブ 2 が標的複合体内の核酸標的 2 に選

40

50

択的に結合すると、これらの2つのHCRイニシエーターI1の半分が共局在化する。(c) 分割イニシエーター(別名、スプリットイニシエーター)抗体プローブ。

【0324】

標的複合体はタンパク質標的2に結合したタンパク質標的1を含み;抗体第1分割イニシエータープローブ(プローブ1)および抗体第2分割イニシエータープローブ(プローブ2)はそれぞれ、HCRイニシエーターI1の半分を有しており;抗体第1分割イニシエータープローブ(プローブ1)が標的複合体内のタンパク質標的1に選択的に結合し、抗体第2分割イニシエータープローブ(プローブ2)が標的複合体内のタンパク質標的2に選択的に結合すると、これらの2つのHCRイニシエーターI1の半分が共局在化する。(d) 分割イニシエーター(別名、スプリットイニシエーター)二次抗体プローブ。標的複合体は、タンパク質標的2に結合したタンパク質標的1を含み;一次抗体第1分割イニシエータープローブ(プローブ1)は標的複合体内のタンパク質標的1に選択的に結合し、一次抗体第2分割イニシエータープローブ(プローブ2)は標的複合体内のタンパク質標的2に選択的に結合し;二次抗体プローブ3および二次抗体プローブ4はそれぞれ、HCRイニシエーターI1の半分を有しており;二次抗体プローブ3が一次抗体第1分割イニシエータープローブ(プローブ1)に選択的に結合し、二次抗体プローブ4が一次抗体第2分割イニシエータープローブ(プローブ2)に選択的に結合すると、これらの2つのHCRイニシエーターI1の半分が共局在化する。(e) 分割イニシエーター(別名、スプリットイニシエーター)抗体および核酸プローブ。標的複合体は核酸標的2に結合したタンパク質標的1を含み;抗体プローブ1および核酸プローブ2はそれぞれ、HCRイニシエーターI1の半分を有しており;抗体プローブ1が標的複合体内のタンパク質標的1に結合し、標的複合体内の核酸プローブ2が核酸標的2に結合すると、これらの2つのHCRイニシエーターI1の半分が共局在化する。

【0325】

図8の模式図は、分割イニシエーター(別名、スプリットイニシエーター)核酸プローブを用いた、核酸標的分子をイメージングするためのインサイツHCRを要約している(スキームE)。分割イニシエーター(別名、スプリットイニシエーター)プローブを用いたインサイツHCR(スキームE)。(a) 2段階インサイツHCRプロトコル。検出段階:分割イニシエーター(別名、スプリットイニシエーター)プローブ対を標的mRNAにハイブリダイズし、未使用のプローブを試料から洗浄する。各分割イニシエータープローブセットは、標的mRNA内の異なる部分配列に選択的に結合する1または複数のプローブ対を含む。プローブ対内の各プローブは、HCRイニシエーターI1の一部を有する。プローブ対内の2つのプローブがそれらのコグネイトな標的結合部位に選択的にハイブリダイズすると、HCRイニシエーターI1の一部が2つ共局在化する。増幅段階:完全HCRイニシエーターI1が係留された蛍光性増幅重合体の自己集合を惹起し、未使用のH1ヘアピンおよびH2ヘアピンは試料から洗浄する。星はフルオロフォアを表す。(b) 多重実験の実験タイムライン。標的mRNAの数に関わらず、2段階プロトコルを用いる。

【0326】

ヘアピン単量体

2種以上の別々の核酸ヘアピン単量体を、HCR反応で利用することが好ましい。それぞれのヘアピン単量体種は、典型的には、別のヘアピン単量体種の一部分に相補的な少なくとも1つの領域を含む。しかし、単量体は、単量体の1つの二次構造を崩せるイニシエーター分子の非存在下では、速度論的にトラップされて、系が平衡に達することができないように、設計される。これにより、単量体は、イニシエーターの非存在下では重合することができない。完全イニシエーター種が導入されると、上記2種以上の単量体による交互的な速度論的脱出の連鎖反応が惹起され、その結果、重合体が形成される。いくつかの実施形態では、2種のヘアピン単量体がイニシエーターの存在下で重合することで、ニックの入った二本鎖重合体が形成される。

【0327】

いくつかの実施形態では、ヘアピン構造を有する２種以上のヘアピン単量体を使用する。これらのヘアピン単量体は、長いステムによって保護されたループを含むことができる。いくつかの実施形態では、異なる二次構造を有する単量体が提供される。しかし、二次構造は、これらの単量体がイニシエーター核酸の非存在下では反応条件下において準安定であるようなものとすることができる。完全イニシエーターの存在下では、第１ヘアピン単量体が第２ヘアピン単量体種の粘着末端にハイブリダイズできるように、第１ヘアピン単量体の二次構造が変化する。これが今度は第２ヘアピン単量体の二次構造の変化をもたらし、その第２ヘアピン単量体は別の第１ヘアピン単量体にハイブリダイズして、このプロセスを継続することができる。このようにして、１コピーの第１ヘアピン単量体が１コピーのイニシエーターと相互作用すると、ヘアピン単量体が集合して、交互のヘアピン単量体種を含む重合体になることができるような、連鎖反応が生じる。

10

【０３２８】

所望の特性を達成するように単量体を設計するために、いくつかの基準を用いることができる。これらの基準としては、例示であって限定ではないが、配列対称性の最小限化、平衡状態で目的の二次構造をとる可能性、目的の構造に対する、平衡状態の誤対合ヌクレオチドの平均数に相当するアンサンブル欠陥、平衡状態の誤対合ヌクレオチドの濃度に対応する試験管アンサンブル欠陥、および、ハイブリダイゼーションキネティクスが挙げられる。

【０３２９】

単量体は、市販の核酸シンセサイザーを含む標準方法を用いて合成することができ、あるいは、インテグレートッド・DNA・テクノロジーズ社（コーラルビル、アイオワ州）などの商業的供給源から入手することができる。

20

【０３３０】

いくつかの実施形態では、HCRの結果として生じる重合体の分子量を増加させるために、化合物または分子で単量体を誘導体化する。単量体のハイブリダイゼーション能力に干渉しない位置で、単量体を誘導体化することが好ましい。いくつかの実施形態では、標識結合部位で単量体を誘導体化する。他の実施形態では、単量体は、得られた重合体の可視化を可能にする、フルオロフォアまたは比色用化合物を含む。

【０３３１】

イニシエーター

完全イニシエーターは核酸分子とすることができる。完全イニシエーターは、ヘアピン単量体の一部分に相補的であり、好ましくは、ヘアピン単量体が速度論的にトラップされた状態である間に完全イニシエーターとのハイブリダイゼーションに利用可能であるヘアピン単量体の一部分に相補的である。完全イニシエーターは、完全イニシエーターが粘着末端にハイブリダイズすることで、ヘアピン単量体における立体構造変化が引き起こされ、HCR連鎖反応が開始されるように、粘着末端に隣接したヘアピン単量体の一部分に相補的な配列を含むことも好ましい。例えば、完全イニシエーターは、上記のような、ヘアピン単量体の第１相補的領域に相補的な領域を含むことができる。

30

【０３３２】

いくつかの実施形態では、完全イニシエーターの配列は、第１ヘアピン単量体の粘着末端（イニシエーター相補的領域）および第１相補的領域に相補的である。本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、これは、第２ヘアピン単量体種の第２相補的領域の配列およびループにも影響することとなる。

40

【０３３３】

いくつかの実施形態では、完全イニシエーターは、試料中の検出対象の核酸または検出対象の核酸の一部分である。この場合、HCRヘアピン単量体を設計する際には、標的核酸の配列を考慮する。例えば、１つのヘアピン単量体のイニシエーター相補領域、好ましくは粘着末端は、標的核酸配列の一部分に相補的であるように設計される。第２ヘアピン単量体は第１ヘアピン単量体にハイブリダイズすることとなるため、第２ヘアピン単量体の配列は標的核酸の配列の少なくとも一部分も反映することにもなる。

50

【0334】

いくつかの実施形態では、HCRを核酸アプタマートリガーと組み合わせることで、多様な認識イベントの増幅が達成される。目的の分析物と特異的に結合することができるアプタマーが特定される。分析物は核酸に限定されず、例えば、ポリペプチドまたは小分子であってもよい。アプタマーは、分析物がアプタマーに結合していない場合はイニシエーターがHCRを促進できないように、イニシエーター領域を含む核酸に連結されている。

【0335】

HCRの検出

HCRの産物は、核酸を検出するための当業者に公知の方法によって容易に検出可能であり、例えば、アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、およびゲル充填キャピラリー電気泳動が挙げられる。重合体は、核酸を含んでいるため、エチジウムブロマイド染色などの標準的な技術によって可視化することができる。動的光散乱(DLS)、粘度測定、表色系、および蛍光分光法などの光散乱分光法を含む他の方法も、好適であり得る。より詳細に論じるが、インサイツイメージングおよび検出のためのいくつかの方法では、HCR産物は蛍光標識されている。

10

【0336】

いくつかの実施形態では、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)によってHCRをモニターする。HCRによる立体構造変化を、蛍光の変化を検出することによってモニターできるように、ある特定の単量体が蛍光色素で標識される。1つの実施形態では、ヘアピン分子対の一方は、イニシエーター鎖に相補的な領域と二本鎖領域との接合部においてフルオロフォアで標識されており、二本鎖領域の反対側でクエンチャー分子で標識されている。重合すると、フルオロフォアとクエンチャーが凝集した核酸構造において空間的に隔てられ、蛍光クエンチングが取り除かれる。この場合、1つのイニシエーターの存在は、HCRによって引き起こされる一連の蛍光イベントによって増幅される。インサイツイメージングと絡めた場合では、1つの標的分子の存在を、一連の蛍光イベントによって増幅することができる。加えて、インサイツイメージングの場合、未反応単量体における蛍光のクエンチングはバックグラウンドノイズを低減する。このため、未反応単量体を試料から除去する必要がない。

20

【0337】

相対的な標的の存在量は、標的を固定化した後(例えば、胚内での固定により、またはプロットへの架橋により、またはビーズへの結合により)、標的によって共局在化され、HCRを惹起し、標的の存在量に比例して変化するシグナルを生成する分割イニシエータープローブを用いて標的を検出することで、異なる試料において定量化することができる。試料のうちの1または複数が既知の標的の存在量を有する場合、他の試料において絶対定量化を実施できる。

30

【0338】

インサイツイメージングへの応用

HCRのいくつかの実施形態は、並行な多重化が可能である無酵素インサイツ増幅法を可能にする。さらに、分割イニシエータープローブによって惹起されるHCR増幅は、非特異的なプローブ結合からもたらされるバックグラウンドシグナルを低減するための手段を与える。分割イニシエータープローブは、コグネイトな標的に特異的に結合する場合のみ、完全イニシエーターを共局在化させる。これにより、標的が特異的に検出され、HCR単量体、好ましくは上記のようなヘアピン単量体から構成される、(標的に)係留された非共有結合性「重合体」の自己集合が起こった時かつその時に限り、分割イニシエータープローブはHCRを惹起する。重合体を検出できるように、並びに、標的の有無および／または位置を判定することができるように、HCR単量体を蛍光標識することができる。

40

【0339】

完全HCRイニシエーターによる惹起後の単量体の重合が検出可能なシグナルを生成し、このシグナルが単一のプローブが標的に結合することによって生じるシグナルと比較し

50

て増幅されることから、H C Rヘアピン単量体は「アンプリファイア」とも称される。アンプリファイアは、それぞれ、同じフルオロフォアで標識することもできるし、異なるフルオロフォアで標識することもできる。例えば、系は、標的毎に3つ以上の単量体種を使用し、少なくとも1種は蛍光標識されているように設計することができる。2種類のヘアピン単量体を含むH C Rアンプリファイアは、2種類のヘアピン単量体のそれぞれを標識する、種類の異なるフルオロフォアを有することができる。4種類のヘアピン単量体を含むH C Rアンプリファイアは、ヘアピン単量体の種類ごとに1種の、4種類の異なるフルオロフォアを有することができる。そのような場合、H C R増幅重合体は、既知の比（例えば、2種類の交互のヘアピン単量体から構成される重合体の場合は1：1、または、4種類の交互のヘアピン単量体から構成される重合体の場合は1：1：1：1）の複数種のフルオロフォアで装飾される。蛍光ラベルは当業者に周知であり、例えば、非特許文献6にあるものが挙げられる。

10

【0340】

いくつかの実施形態では、系内のアンプリファイアをフルオロフォアおよびクエンチャーの両方で標識することで、「分子ビーコン」に似た構築物を形成する（非特許文献7）。例えば、クエンチャーが、単量体がヘアピン形態である間は蛍光を減少させるが、単量体がH C R重合体に組み込まれた場合は蛍光を減少させないように、ヘアピン単量体はフルオロフォアおよびクエンチャーの両方を含むことができる。これにより、分子ビーコン型のH C R単量体は、試料中で非特異的に結合するものや単に未反応のままであるものなどの、あらゆる未重合の単量体から生じるバックグラウンドシグナルを減少させることができる。

20

【0341】

生物試料のイメージングのために、試料内へ浸透させるためにサイズが小さいアンプリファイア成分を使用することが、有利である場合がある。例えば、いくつかの実施形態では、約20ナノメートル未満のH C R成分が使用され、例えば、15 nm未満、10 nm未満、約8 nm～16 nmなどである。いくつかの実施形態では、H C Rヘアピン単量体は、約8 nm未満である。インサイツイメージングの標準的な手順を用いて、H C R産物を試料に進入させることができる。当業者は、H C R成分を試料に進入させることに適した方法を選択することができる。

【0342】

インサイツイメージングにおけるH C Rの利点としては、限定はされないが、存在している少量の分析物をベースとしてシグナルを迅速に増幅できること、および、同一試料内の多様な分析物をイメージングできることが挙げられる。

30

【0343】

本明細書に記載のように、インサイツ検出およびイメージングにH C Rを使用することには、いくつかの利点がある。2個以上の分割イニシエータープローブがそれらの標的セクション（例えば、コグネイトな標的部位）に特異的に結合した場合のみ、完全イニシエーターを共局在化させる分割イニシエータープローブを用いて、特異性は達成できる。プローブが標的に特異的に結合するまでイニシエーターを保護する、トリガーされたプローブを用いることで、特異性は達成できる。自己クエンチングH C R単量体は、自己集合して係留された増幅重合体になる際に分離されるフルオロフォア／クエンチャー対で標識することができる。この自動バックグラウンド抑制は、イメージング前に未使用の増幅成分を洗浄除去できないインビボ適用の場合に、特に有用である。トリガーされたプローブの概念をタンパク質および小分子の検出へと一般化する、構造切替アダプターを選択することで、汎用性を実現することができる（非特許文献8、および、非特許文献9）。好ましくは最大寸法が8～16 nmである、小型のプローブおよび増幅単量体が、試料浸透を促す。等温条件がH C R増幅に理想的であり、固定された試料やその成分の形態へのダメージを避け、インビボでのイメージングを容易にする。例えば、スペクトルが異なるフルオロフォアを用いて、固有のコンビナトリアルシグネチャーを各H C R産物の構造に直接組み込むなど、同時に動作する独立したH C Rアンプリファイアの使用により、多重化は無

40

50

理なく実現される。所定の有限サイズの係留重合体へと指数関数的に成長させる非線形 HCR 機構を用いて、高感度な定量的増幅を達成することができる。最後に、核酸アンプリファイア成分を使用することで、インビボ適用のための生体適合性は達成される。

【0344】

複数の分析物のイメージング

HCR 増幅は複数の標的を同時に増幅することを可能にする。いくつかの分析物（例えば、遺伝子転写物またはタンパク質）を標的とした HCR を同時に利用できる。いくつかの実施形態では、各 HCR 系は、スペクトルによって識別可能な色素で標識される。従って、分析物の数は、利用可能な、スペクトルによって識別可能な色素の数と等しい。多くの状況で、これは十分な数である。

【0345】

複数の mRNA またはタンパク質の発現を研究するには、オルソゴナルな HCR アンプリファイアを同時に用いて、全ての認識事象の多重増幅を行うことが望ましい。供給が限られたスペクトルの異なるフルオロフォアを用いてイメージングすることができる異なる標的の数を増やすために、Levsky および共同研究者（非特許文献 10）の非増幅コンビナトリアル多重化アプローチを、異なる固有の色素の組み合わせで各アンプリファイアの単量体を標識することによって、HCR 増幅に適合することができる。最低 2 色のバーコードの使用は、特異的に結合していないプローブから生じた単色シグナルをふるい分けるための基礎となる。

【0346】

従って、いくつかの実施形態では、各標的に対して 1 つのみのプローブ対が使用され、異なる固有の色素組み合わせで各 HCR アンプリファイアの単量体を標識することで、コンビナトリアル多重化が実行される。

【0347】

HI ヘアピンと H2 ヘアピンが異なる色素で末端標識されている場合、HCR 産物は定義上、同数の各色素を担持することになる。一般に、N 個のスペクトル的に異なるフルオロフォアは、2 色アンプリファイアと、 $T: N! / [(N-2)! 2!]$ 個の標的に対応するために使用できる（例えば、6 標的の場合は 4 色素、10 標的の場合は 5 色素）。しかし、このアプローチを用いたバックグラウンド診断としてコンビナトリアルバーコードを採用しないので、単色アンプリファイアで標的の数を $T = N! / [(N-2)! 2! + N]$ 個に増やすことができる（例：10 標的の場合は 4 色素、15 標的の場合は 5 色素）。さらに、HCR 単量体を複数の色素で標識することにより、対応可能な標的の数を $T = \sum_{i=1}^N N! / [(N-i)! i!] = 2^N - 1$ まで増やすことができる（例えば、15 標的の場合は 4 色素、31 標的の場合は 5 色素）。また、1 アンプリファイア当たり M 個のヘアピンを使用した HCR 系も設計可能である。

【0348】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるいずれか 1 つまたは複数の方法のいずれか 1 つまたは複数の任意選択の工程は、本明細書におけるいずれか 1 つまたは複数の方法のいずれか 1 つまたは複数の他の任意選択の工程と組み合わせることができる。

【0349】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるいずれか 1 つまたは複数の方法によって異なるいずれか 1 つまたは複数の工程は、本明細書におけるいずれか 1 つまたは複数の方法によって異なるいずれか 1 つまたは複数の他の工程と組み合わせることができる。

【0350】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるいずれか 1 つまたは複数の方法によって異なるいずれか 1 つまたは複数の任意選択の工程は、本明細書におけるいずれか 1 つまたは複数の方法によって異なるいずれか 1 つまたは複数の他の任意選択の工程と組み合わせることができる。

【0351】

繰り返し適用の実施形態－方法 1

10

20

30

40

50

【0352】

いくつかの実施形態では、レポーター標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。

【0353】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む、N個のプローブセット（各々はN個の標的種のうちの1つを標的とする）を準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) 上記N個のプローブセットのうちのM個に対応する、M個のHCRアンプリファイアを準備すること（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターで標識されている）；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 上記M個のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること；g) 上記M個のシグナルを上記試料から除去すること；並びに、h) 所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程b～gのうちの1または複数を反復すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢i)のいくつかと選択肢ii)のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

10

【0354】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアはさらに、CARDまたは反復CARDを媒介する。

20

【0355】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む、N個のプローブセット（各々はN個の標的種のうちの1つを標的とする）を準備すること；c) 上記試料を洗浄すること；d) 上記N個のプローブセットのうちのM個に対応する、M個のHCRアンプリファイアを準備すること（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターで標識されている）；e) 上記試料を洗浄すること；f) 上記M個のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること；g) 上記M個のシグナルを上記試料から除去すること；並びに、h) N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程b～gのうちの1または複数を反復すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢i)のいくつかと選択肢ii)のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

30

40

【0356】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、

50

各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、H C R アンプリファイアはさらに、C A R D または反復 C A R D を媒介する。

【0357】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数は、1 ～ 1 0 0 0、または 1 0 ～ 1 0 0、または 2 0 ～ 5 0、または 3 0 ～ 4 0 の範囲内とすることができる。プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、S B 比を 2 倍、または 5 倍、または 1 0 倍、または 1 0 0 倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のイニシエーター標識プローブの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、S B 比を、2、または 5、または 1 0、または 5 0、または 1 0 0、または 2 0 0、または 5 0 0、または 1 0 0 0、またはそれ以上になるように増加させることができる。

10

【0358】

いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブは、1 または複数の標的結合ドメイン、および 1 または複数の H C R イニシエーターを含む（例えば、図 3 9 A ～ 図 3 9 N および図 4 2 A ～ 図 4 2 F）。

【0359】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1 または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のプローブユニットの数は、1 ～ 1 0 0 0、または 1 0 ～ 1 0 0、または 2 0 ～ 5 0、または 3 0 ～ 4 0 の範囲内とすることができる。プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B 比を 2 倍、または 5 倍、または 1 0 倍、または 1 0 0 倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のプローブユニットの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B 比を、2、または 5、または 1 0、または 5 0、または 1 0 0、または 2 0 0、または 5 0 0、または 1 0 0 0、またはそれ以上になるように増加させることができる。

20

【0360】

いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢 i)（1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ）のいくつかと、選択肢 i i)（2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット）のいくつかが、一緒に使用される。いくつかの実施形態では、N 個のプローブセットが使用される場合、例えば、1 : 1 0 0 0 比、1 : 1 0 0 比、1 : 5 0 比、1 : 2 5 比、1 : 2 0 比、1 : 1 0 比、1 : 5 比、1 : 4 比、1 : 3 比、1 : 2 比、1 : 1 比、2 : 1 比、3 : 1 比、4 : 1 比、5 : 1 比、1 0 : 1 比、2 0 : 1 比、2 5 : 1 比、5 0 : 1 比、1 0 0 : 1 比、1 0 0 0 : 1 比、または、上記比の任意の 2 つの間と規定される任意の範囲が得られるように、N 個のプローブセットの全てを選択肢 i) とするか、または、N 個のプローブセットの全てを選択肢 i i) とするか、または、選択肢 i) と選択肢 i i) の混合を使用する。これらの混合および比は、2 以上のプローブセットが使用される本明細書で提供される実施形態のいずれにも適用できる。

30

40

【0361】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニットは、一緒になって完全 H C R イニシエーターを形成する 2 個の分割イニシエータープローブ（ $f_1 + f_2 = 1$ となるような、プローブ P 1 に対するフラクション f_1 と、プローブ P 2 に対するフラクション f_2 ）を含む。

【0362】

いくつかの実施形態では、H C R 分割イニシエータープローブは、標的結合領域、およ

50

び分割イニシエーターを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の各プローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合することで、分割イニシエーターの共局在化が起こり、HCRヘアピンにハイブリダイズしてHCRシグナル増幅を惹起することが可能な完全HCRイニシエーターを形成する（例えば、図3A～図5E、図8A～図8B、図16A～図16D、図21A～図22、および図27の完全HCRイニシエーターを参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の標的結合領域は、標的のオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域に結合するように構成される（例えば、図8A～図8B、図21A～図21B、図22、および図27を参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは、HCRヘアピンのオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計される（例えば、図8A～図8B、図21A～図22、および図27を参照）。試料中で非特異的に結合する個々のプローブは、共局在化による完全HCRイニシエーターの形成を起こさず、HCRシグナル増幅を抑制する。

10

【0363】

いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアは、2個以上のHCRヘアピンを含む（例えば、図8A～図8B、図18A～図18F、および図19A～図19BのHCRアンプリファイアを参照）。

【0364】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。

20

【0365】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。

【0366】

いくつかの実施形態では、各HCRヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を有するインプットドメイン、並びに、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を有するアウトプットドメインを含む（例えば、図8A～図8B、図13、図14、図18A～図18F、および図19A～図19BのHCRヘアピンを参照）。完全HCRイニシエーターの非存在下では、HCRヘアピンは速度論的にトラップされて重合を起こさず、バックグラウンドを抑制する。しかし、プローブユニット内の分割イニシエータープローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合して、共局在化により完全HCRイニシエーターを形成した場合、完全HCRイニシエーターは、完全イニシエーターが第1HCRヘアピンのインプットドメインにハイブリダイズし、第1ヘアピンを開いてそのアウトプットドメインを露出させ、このアウトプットドメインが第2HCRヘアピンのインプットドメインにハイブリダイズし、第2ヘアピンを開いてそのアウトプットドメインを露出させ、といった重合工程の連鎖反応を開始し、ヘアピンが重合して標的に係留されたHCR増幅重合体となる連鎖反応を起こす（例えば、図8A、図13、図14、図18C～図18F、および図19A～図19Bの増幅重合体を参照）。いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、レポーターをそれぞれ含む、または、1または複数のレポーターを含む標識プローブをリクルートする基質（または分割基質）をそれぞれ含む、1または複数の標識をさらに含む（例えば、図18A～図18Fのレポーター標識HCRヘアピン、基質標識HCRヘアピン、および分割基質標識HCRヘアピンを参照）。

30

40

【0367】

いくつかの実施形態では、標識プローブは、1または複数のレポーターを含み、HCRヘアピン上の基質に相補的な、または、HCR増幅重合体内の共局在化された完全基質に相補的な、基質結合領域をさらに含む（例えば、図20A～図20Fの標識プローブを参照）。いくつかの実施形態では、試料中の標的に係留されたHCR増幅重合体に結び付いた1または複数のレポーターによって、シグナルが生成される。いくつかの実施形態では、シグナルが上記試料から除去される（例えば、図23A～図23Oおよび図40A～図40Nを参照）。いくつかの実施形態では、HCRシグナルが、同じ試料から1回または

50

複数回、生成、検出、除去される（例えば、図 23A～図 23O、図 26A～図 26T、および図 40A～図 40Nを参照）。

【0368】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、レポーターをさらに含む。例えば、レポーターは、フルオロフォア、発色団、発光団、蛍光体、FRET対、いくつかのFRET対、クエンチャー、フルオロフォア／クエンチャー対、希土類元素または化合物、放射性分子、磁性分子、またはシグナルの測定を促す任意の他の分子とすることができる。

【0369】

方法 2

いくつかの実施形態では、レポーター標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。

10

【0370】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1または複数のプローブセットを準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) 1または複数のHCRアンプリファイア（各々は1または複数のレポーターで標識されている）を準備すること；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 1または複数のレポーターからの1または複数のシグナルを検出すること；g) 所望により、1または複数のプローブセットを上記試料から除去すること；h) 所望により、1または複数のHCRアンプリファイアを上記試料から除去すること；i) 所望により、1または複数のレポーターを上記試料から除去すること；並びに、j) 所望により、1または複数のシグナルを上記試料から除去すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢i)のいくつかと選択肢ii)のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

20

【0371】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアはさらに、CARDまたは反復CARDを媒介する。

30

【0372】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1または複数のプローブセットを準備すること；c) 上記試料を洗浄すること；d) 1または複数のHCRアンプリファイア（各々は1または複数のレポーターで標識されている）を準備すること；e) 上記試料を洗浄すること；f) 1または複数のレポーターからの1または複数のシグナルを検出すること；g) 1または複数のプローブセットを上記試料から除去すること；h) 1または複数のHCRアンプリファイアを上記試料から除去すること；i) 所望により、1または複数のレポーターを上記試料から除去すること；並びに、j) 1または複数のシグナルを上記試料から除去すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢i)のいくつかと選択肢ii)のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

40

50

【0373】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアはさらに、CARDまたは反復CARDを媒介する。

10

【0374】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数は、1～1000、または10～100、または20～50、または30～40の範囲内とすることができる。プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、SB比を2倍、または5倍、または10倍、または100倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のイニシエーター標識プローブの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、SB比を、2、または5、または10、または50、または100、または200、または500、または1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

20

【0375】

いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブは、1または複数の標的結合ドメイン、および1または複数のHCRイニシエーターを含む（例えば、図39A～図39Nおよび図42A～図42F）。

【0376】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のプローブユニットの数は、1～1000、または10～100、または20～50、または30～40の範囲内とすることができる。プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、SB比を2倍、または5倍、または10倍、または100倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のプローブユニットの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、SB比を、2、または5、または10、または50、または100、または200、または500、または1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

30

【0377】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、2個以上のHCR分割イニシエータープローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニットは、一緒になって完全HCRイニシエーターを形成する2個の分割イニシエータープローブ（ $f_1 + f_2 = 1$ となるような、プローブP1に対するフラクション f_1 と、プローブP2に対するフラクション f_2 ）を含む。

40

【0378】

いくつかの実施形態では、HCR分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の各プローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合することで、分割イニシエーターの共局在化が起こり、HCRヘアピンにハイブリダイズしてHCRシグナル増幅を惹起することが可能な完全HCRイニシエーターを形成する（例えば、図3A～図5E、図8A～図8B、図16A～図16D、図21A～図22、および図27の完全HCRイニシエーター

50

ーを参照)。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の標的結合領域は、標的のオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域に結合するように構成される(例えば、図8A～図8B、図21A～図21B、図22、および図27を参照)。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは、HCRヘアピンのオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計される(例えば、図8A～図8B、図21A～図22、および図27を参照)。試料中で非特異的に結合する個々のプローブは、共局在化による完全HCRイニシエーターの形成を起こさず、HCRシグナル増幅を抑制する。

【0379】

いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアは、2個以上のHCRヘアピンを含む(例えば、図8A～図8B、図18A～図18F、および図19A～図19BのHCRアンプリファイアを参照)。

【0380】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、一本鎖トールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。

【0381】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。

【0382】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、1または複数のレポーターをさらに含む。いくつかの実施形態では、1または複数のレポーターは、フルオロフォア、発色団、発光団、蛍光体、FRET対、いくつかのFRET対、クエンチャー、フルオロフォア/クエンチャー対、希土類元素または化合物、放射性分子、磁性分子、またはシグナルの測定を促す任意の他の分子である。

【0383】

方法3

いくつかの実施形態では、基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。

【0384】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、N個のプローブセットを準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) 上記N個のプローブセットに対応する、N個のHCRアンプリファイアを準備すること(各々は別々の基質で標識されている)；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 上記N個の基質のうちのM個に対応する、M個の標識プローブを準備すること($M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターと結合している)；g) 所望により上記試料を洗浄すること；h) 上記M個の別々のレポーターに対応するM個のシグナルを検出すること；i) 上記M個のシグナルを上記試料から除去すること、並びに；j) 所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程f～iのうちの1または複数を反復すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢i)のいくつかと選択肢ii)のいくつかが用いられる(当該プローブセットに関して)。

【0385】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、H C R アンプリファイアはさらに、C A R D または反復 C A R D を媒介する。

【0386】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること； b) i) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、i i) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、N 個のプローブセットを準備すること； c) 上記試料を洗浄すること； d) 上記 N 個のプローブセットに対応する、N 個の H C R アンプリファイアを準備すること（各々は別々の基質で標識されている）； e) 上記試料を洗浄すること； f) 上記 N 個の基質のうちの M 個に対応する、M 個の標識プローブを準備すること（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターと結合している）； g) 上記試料を洗浄すること； h) 上記 M 個の別々のレポーターに対応する M 個のシグナルを検出すること； i) 上記 M 個のシグナルを上記試料から除去すること、並びに； j) N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 f ~ i のうちの 1 または複数を反復すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢 i) のいくつかと選択肢 i i) のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

【0387】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2 個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2 個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、H C R アンプリファイアはさらに、C A R D または反復 C A R D を媒介する。

【0388】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数は、1 ~ 1000、または 10 ~ 100、または 20 ~ 50、または 30 ~ 40 の範囲内とすることができる。プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、S B 比を 2 倍、または 5 倍、または 10 倍、または 100 倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のイニシエーター標識プローブの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、S B 比を、2、または 5、または 10、または 50、または 100、または 200、または 500、または 1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

【0389】

いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブは、1 または複数の標的結合ドメイン、および 1 または複数の H C R イニシエーターを含む（例えば、図 39 A ~ 図 39 N および図 42 A ~ 図 42 F）。

【0390】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1 または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のプローブユニットの数は、1 ~ 1000、または 10 ~ 100、または 20 ~ 50、または 30 ~ 40 の範囲内とすることができる。プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B 比を 2 倍、または 5 倍、または 10 倍、または 100 倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のプローブユニットの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、およ

び試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B比を、2、または5、または10、または50、または100、または200、または500、または1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

【0391】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、2個以上のH C R分割イニシエータープローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニットは、一緒になって完全H C Rイニシエーターを形成する2個の分割イニシエータープローブ ($f_1 + f_2 = 1$ となるような、プローブP 1に対するフラクション f_1 と、プローブP 2に対するフラクション f_2)を含む。

10

【0392】

いくつかの実施形態では、H C R分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の各プローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合することで、分割イニシエーターの共局在化が起こり、H C RヘアピンにハイブリダイズしてH C Rシグナル増幅を惹起することが可能な完全H C Rイニシエーターを形成する（例えば、図3 A～図5 E、図8 A～図8 B、図16 A～図16 D、図21 A～図22、および図27の完全H C Rイニシエーターを参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の標的結合領域は、標的のオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域に結合するように構成される（例えば、図8 A～図8 B、図21 A～図21 B、図22、および図27を参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは、H C Rヘアピンのオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計される（例えば、図8 A～図8 B、図21 A～図22、および図27を参照）。試料中で非特異的に結合する個々のプローブは、共局在化による完全H C Rイニシエーターの形成を起こさず、H C Rシグナル増幅を抑制する。

20

【0393】

いくつかの実施形態では、H C Rアンプリファイアは、2個以上のH C Rヘアピンを含む（例えば、図8 A～図8 B、図18 A～図18 F、および図19 A～図19 BのH C Rアンプリファイアを参照）。

【0394】

いくつかの実施形態では、H C Rヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。

30

【0395】

いくつかの実施形態では、H C Rヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。

【0396】

いくつかの実施形態では、H C Rヘアピンは、基質をさらに含む。いくつかの実施形態では、上記基質は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介するレポーター体をリクルートする働きをする。

【0397】

いくつかの実施形態では、ヘアピン標識は、上記レポーター体として、1または複数のレポーターで、または、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介する働きをする1または複数の基質で、直接標識されている抗D I G抗体をリクルートする、ジゴキシゲニン (D I G) を含むことができる。

40

【0398】

いくつかの実施形態では、ヘアピン標識は、1または複数のレポーターをさらに含む標識プローブ内のドメインに対し完全または部分配列相補性を有する基質として働く核酸ドメインを含むことができる。

【0399】

いくつかの実施形態では、ヘアピン標識は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局

50

在化を媒介する働きをする1または複数の基質を有する、標識プローブ内のドメインに対し完全または部分配列相補性を有する基質として働く、核酸ドメインを含むことができる。

【0400】

いくつかの実施形態では、ヘアピン標識は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介するレポーター体に対する基質として働く核酸ドメインを含むことができる。

【0401】

いくつかの実施形態では、ヘアピン標識は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を間接的に媒介するレポーター体をリクルートする働きをする基質を含むことができる。

【0402】

いくつかの実施形態では、ヘアピン標識は、ヘアピン付近におけるレポーター分子の沈着をもたらすCARD-基質を触媒する酵素を含むレポーター体をリクルートする働きをする基質を含むことができる（例えば、33A～33E、34A～34C、36A～36Bを参照）。例えば：

1. 上記酵素は、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）（または複数のHRP酵素を含むポリマーHRP）であって、CARD-基質に対して作用してAEC、DAB、TMB、もしくはステイイエローなどの色素生産性レポーターの沈着を触媒するもの、または、CARD-基質を触媒してフルオロフォア（fluophore）標識チラミドなどの蛍光レポーターの沈着を触媒するもの、または、ビオチン標識チラミドなどのハプテン標識CARD-基質の沈着を触媒し、ハプテンがヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を媒介する働きをするもの、とすることができる。

2. 上記酵素は、アルカリホスファターゼ（AP）（または複数のAP酵素を含むポリマーAP）であって、CARD-基質に作用して、レポーター、例えば、限定はされないが、BCIP/NBT、BCIP/TNBT、ナフトールAS-MXリン酸塩+ファストブルーBB、ナフトールAS-MXリン酸塩+ファストレッドTR、ステイグリーンなどの色素生産性レポーター、の沈着を触媒するもの、とすることができる。

3. 上記酵素は、グルコースオキシダーゼであって、CARD-基質に作用して、レポーター、例えばNBT、の沈着を触媒するもの、とすることができる。

4. 上記酵素は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介する任意の分子または複合体とすることができる。

【0403】

いくつかの実施形態では、標識プローブは、1または複数のレポーターを含み、HCRヘアピン上の基質に相補的な、または、HCR増幅重合体内の共局在化された完全基質に相補的な、基質結合領域をさらに含む（例えば、図20A～図20Fの標識プローブを参照）。いくつかの実施形態では、試料中の標的に係留されたHCR増幅重合体に結び付いた1または複数のレポーターによって、シグナルが生成される。いくつかの実施形態では、シグナルが上記試料から除去される（例えば、図23A～図23Oおよび図40A～図40Nを参照）。いくつかの実施形態では、HCRシグナルが、同じ試料から1回または複数回、生成、検出、除去される（例えば、図23A～図23O、図26A～図26T、および図40A～図40Nを参照）。

【0404】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、レポーターをさらに含む。例えば、レポーターは、フルオロフォア、発色団、発光団、蛍光体、FRET対、いくつかのFRET対、クエンチャー、フルオロフォア/クエンチャー対、希土類元素または化合物、放射性分子、磁性分子、またはシグナルの測定を促す任意の他の分子とすることができる。

【0405】

方法4

いくつかの実施形態では、基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。

【0406】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1または複数のプローブセットを準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) 1または複数のプローブセットに対応する1または複数のHCRアンプリファイア（各々は基質で標識されている）を準備すること；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々はレポーターに結合している）を準備すること；g) 所望により上記試料を洗浄すること；h) 1または複数のレポーターに対応する1または複数のシグナルを検出すること；i) 1または複数のシグナルを上記試料から除去すること；並びに、j) 所望により、工程b～iのいずれかを任意の順序で1回または複数回反復すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢i)のいくつかと選択肢ii)のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

10

【0407】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアはさらに、CARDまたは反復CARDを媒介する。

20

【0408】

いくつかの実施形態では、基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1または複数のプローブセットを準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) 1または複数のプローブセットに対応する1または複数のHCRアンプリファイア（各々は基質で標識されている）を準備すること；e) 上記試料を洗浄すること；f) 1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々はレポーターに結合している）を準備すること；g) 上記試料を洗浄すること；h) 1または複数のレポーターに対応する1または複数のシグナルを検出すること；i) 1または複数のシグナルを上記試料から除去すること；並びに、j) 工程b～iのいずれかを任意の順序で1回または複数回反復すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢i)のいくつかと選択肢ii)のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

30

40

【0409】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的

50

について独立して選択される。いくつかの実施形態では、H C R アンプリファイアはさらに、C A R D または反復 C A R D を媒介する。

【0410】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数は、1 ~ 1000、または 10 ~ 100、または 20 ~ 50、または 30 ~ 40 の範囲内とすることができる。プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、S B 比を 2 倍、または 5 倍、または 10 倍、または 100 倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のイニシエーター標識プローブの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、S B 比を、2、または 5、または 10、または 50、または 100、または 200、または 500、または 1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

10

【0411】

いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブは、1 または複数の標的結合ドメイン、および 1 または複数の H C R イニシエーターを含む（例えば、図 39 A ~ 図 39 N および図 42 A ~ 図 42 F）。

【0412】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1 または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のプローブユニットの数は、1 ~ 1000、または 10 ~ 100、または 20 ~ 50、または 30 ~ 40 の範囲内とすることができる。プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B 比を 2 倍、または 5 倍、または 10 倍、または 100 倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のプローブユニットの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B 比を、2、または 5、または 10、または 50、または 100、または 200、または 500、または 1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

20

【0413】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニットは、一緒になって完全 H C R イニシエーターを形成する 2 個の分割イニシエータープローブ（ $f_1 + f_2 = 1$ となるような、プローブ P 1 に対するフラクション f_1 と、プローブ P 2 に対するフラクション f_2 ）を含む。

30

【0414】

いくつかの実施形態では、H C R 分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の各プローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合することで、分割イニシエーターの共局在化が起こり、H C R ヘアピンにハイブリダイズして H C R シグナル増幅を惹起することが可能な完全 H C R イニシエーターを形成する（例えば、図 3 A ~ 図 5 E、図 8 A ~ 図 8 B、図 16 A ~ 図 16 D、図 21 A ~ 図 22、および図 27 の完全 H C R イニシエーターを参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の標的結合領域は、標的のオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域に結合するように構成される（例えば、図 8 A ~ 図 8 B、図 21 A ~ 図 21 B、図 22、および図 27 を参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは、H C R ヘアピンのオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計される（例えば、図 8 A ~ 図 8 B、図 21 A ~ 図 22、および図 27 を参照）。試料中で非特異的に結合する個々のプローブは、共局在化による完全 H C R イニシエーターの形成を起こさず、H C R シグナル増幅を抑制する。

40

【0415】

50

いくつかの実施形態では、H C R アンプリファイアは、2 個以上の H C R ヘアピンを含む（例えば、図 8 A ～図 8 B、図 1 8 A ～図 1 8 F、および図 1 9 A ～図 1 9 B の H C R アンプリファイアを参照）。

【0 4 1 6】

いくつかの実施形態では、H C R ヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。

【0 4 1 7】

いくつかの実施形態では、H C R ヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に對する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。

【0 4 1 8】

いくつかの実施形態では、H C R ヘアピンは、基質をさらに含む。いくつかの実施形態では、上記基質は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介するレポーター体をリクルートする働きをする。

【0 4 1 9】

いくつかの実施形態では、標識プローブは、基質結合領域およびレポーターを含む（例えば、図 1 8 C ～E および図 2 0 を参照）。例えば、レポーターは、フルオロフォア、発色団、発光団、蛍光体、F R E T 対、いくつかの F R E T 対、クエンチャー、フルオロフォア／クエンチャー対、希土類元素または化合物、放射性分子、磁性分子、またはシグナルの測定を促す任意の他の分子とすることができる。

【0 4 2 0】

方法 5

いくつかの実施形態では、レポーターおよび／または基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。

【0 4 2 1】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) i) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、i i) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1 または複数の H C R プローブセットを準備すること；c) 1 または複数のプローブセットに對する 1 または複数の H C R アンプリファイア（各々は 1 または複数のレポーターおよび／または 1 または複数の基質で標識されている）を準備すること；d) 所望により、1 または複数の基質に對する 1 または複数の標識プローブ（各々は 1 または複数のレポーターに結合している）を準備すること；e) 1 または複数のシグナルを検出すること；f) 所望により上記試料を洗浄すること；g) 所望により、1 または複数のシグナルを上記試料から除去すること；h) 所望により、1 または複数のレポーターを上記試料から除去すること；i) 所望により、1 または複数の標識プローブを上記試料から除去すること；j) 所望により、1 または複数の H C R アンプリファイアを上記試料から除去すること；k) 所望により、1 または複数のプローブセットを上記試料から除去すること；並びに、l) 所望により、上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢 i) のいくつかと選択肢 i i) のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

【0 4 2 2】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に對して使用されるプローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に對して使用されるプローブセットは、2 個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2 個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に對して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的

10

20

30

40

50

について独立して選択される。いくつかの実施形態では、H C R アンプリファイアはさらに、C A R D または反復 C A R D を媒介する。

【0423】

いくつかの実施形態では、レポーターおよび／または基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) i) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、i i) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1 または複数の H C R プローブセットを準備すること；c) 1 または複数のプローブセットに対応する 1 または複数の H C R アンプリファイア（各々は 1 または複数のレポーターおよび／または 1 または複数の基質で標識されている）を準備すること；d) 1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ（各々は 1 または複数のレポーターに結合している）を準備すること；e) 1 または複数のシグナルを検出すること；f) 上記試料を洗浄すること；g) 1 または複数のシグナルを上記試料から除去すること；h) 所望により、1 または複数のレポーターを上記試料から除去すること；i) 1 または複数の標識プローブを上記試料から除去すること；j) 1 または複数の H C R アンプリファイアを上記試料から除去すること；k) 1 または複数のプローブセットを上記試料から除去すること；並びに、l) 上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢 i) のいくつかと選択肢 i i) のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

10

20

【0424】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2 個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2 個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、H C R アンプリファイアはさらに、C A R D または反復 C A R D を媒介する。

30

【0425】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数は、1 ～ 1 0 0 0、または 1 0 ～ 1 0 0、または 2 0 ～ 5 0、または 3 0 ～ 4 0 の範囲内とすることができる。プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、S B 比を 2 倍、または 5 倍、または 1 0 倍、または 1 0 0 倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のイニシエーター標識プローブの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、S B 比を、2、または 5、または 1 0、または 5 0、または 1 0 0、または 2 0 0、または 5 0 0、または 1 0 0 0、またはそれ以上になるように増加させることができる。

40

【0426】

いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブは、1 または複数の標的結合ドメイン、および 1 または複数の H C R イニシエーターを含む（例えば、図 3 9 A ～ 図 3 9 N および図 4 2 A ～ 図 4 2 F）。

【0427】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1 または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のプローブユニットの数は、1 ～ 1 0 0 0、または 1 0 ～ 1 0 0、または 2 0 ～ 5 0、または 3 0 ～ 4 0 の範囲内とすることができる。

50

る。プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B 比を 2 倍、または 5 倍、または 10 倍、または 100 倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のプローブユニットの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B 比を、2、または 5、または 10、または 50、または 100、または 200、または 500、または 1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

【0428】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニットは、一緒になって完全 H C R イニシエーターを形成する 2 個の分割イニシエータープローブ ($f_1 + f_2 = 1$ となるような、プローブ P 1 に対するフラクション f_1 と、プローブ P 2 に対するフラクション f_2) を含む。

10

【0429】

いくつかの実施形態では、H C R 分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の各プローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合することで、分割イニシエーターの共局在化が起こり、H C R ヘアピンにハイブリダイズして H C R シグナル増幅を惹起することが可能な完全 H C R イニシエーターを形成する（例えば、図 3 A ~ 図 5 E、図 8 A ~ 図 8 B、図 16 A ~ 図 16 D、図 21 A ~ 図 22、および図 27 の完全 H C R イニシエーターを参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の標的結合領域は、標的のオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域に結合するように構成される（例えば、図 8 A ~ 図 8 B、図 21 A ~ 図 21 B、図 22、および図 27 を参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは、H C R ヘアピンのオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計される（例えば、図 8 A ~ 図 8 B、図 21 A ~ 図 22、および図 27 を参照）。試料中で非特異的に結合する個々のプローブは、共局在化による完全 H C R イニシエーターの形成を起こさず、H C R シグナル増幅を抑制する。

20

【0430】

いくつかの実施形態では、H C R アンプリファイアは、2 個以上の H C R ヘアピンを含む（例えば、図 8 A ~ 図 8 B、図 18 A ~ 図 18 F、および図 19 A ~ 図 19 B の H C R アンプリファイアを参照）。

30

【0431】

いくつかの実施形態では、H C R ヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。

【0432】

いくつかの実施形態では、H C R ヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に對する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。

【0433】

いくつかの実施形態では、H C R ヘアピンは、1 または複数のレポーター、および／または、1 または複数の基質をさらに含む。

40

【0434】

いくつかの実施形態では、標識プローブは、基質結合領域、および 1 または複数のレポーターを含む。

【0435】

方法 6

いくつかの実施形態では、レポーターおよび／または基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。

【0436】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1 または複数の標的と、標的ではない他の

50

分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) 工程 c～g のいずれかを任意の順序で1回または複数回実行すること；c) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1または複数のHCRプローブセットを準備すること；d) 1または複数のシグナルを直接的または間接的に生成する1または複数のHCRアンプリファイアを準備すること；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 1または複数のシグナルを検出すること；並びに、g) 所望により、1または複数のシグナルを除去すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢 i) のいくつかと選択肢 ii) のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

10

【0437】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアはさら

20

【0438】

いくつかの実施形態では、レポーターおよび／または基質標識ヘアピンによる反復シグナル検出法が提供される。いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) 工程 c～g のいずれかを任意の順序で1回または複数回実行すること；c) i) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ、または、ii) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、をそれぞれ含む、1または複数のHCRプローブセットを準備すること；d) 1または複数のシグナルを直接的または間接的に生成する1または複数のHCRアンプリファイアを準備すること；e) 上記試料を洗浄すること；f) 1または複数のシグナルを検出すること；並びに、g) 1または複数のシグナルを除去すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢 i) のいくつかと選択肢 ii) のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

30

【0439】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアはさら

40

【0440】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数は、1～1000、または10～100、または20～50、または30～40の範囲内とすることができる。プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加さ

50

せることで、SB比を2倍、または5倍、または10倍、または100倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のイニシエーター標識プローブの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、SB比を、2、または5、または10、または50、または100、または200、または500、または1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

【0441】

いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブは、1または複数の標的結合ドメイン、および1または複数のHCRイニシエーターを含む（例えば、図39A～図39Nおよび図42A～図42F）。

10

【0442】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のプローブユニットの数は、1～1000、または10～100、または20～50、または30～40の範囲内とすることができる。プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、SB比を2倍、または5倍、または10倍、または100倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のプローブユニットの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、SB比を、2、または5、または10、または50、または100、または200、または500、または1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

20

【0443】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、2個以上のHCR分割イニシエータープローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニットは、一緒になって完全HCRイニシエーターを形成する2個の分割イニシエータープローブ（ $f_1 + f_2 = 1$ となるような、プローブP1に対するフラクション f_1 と、プローブP2に対するフラクション f_2 ）を含む。

【0444】

いくつかの実施形態では、HCR分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の各プローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合することで、分割イニシエーターの共局在化が起こり、HCRヘアピンにハイブリダイズしてHCRシグナル増幅を惹起することが可能な完全HCRイニシエーターを形成する（例えば、図3A～図5E、図8A～図8B、図16A～図16D、図21A～図22、および図27の完全HCRイニシエーターを参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の標的結合領域は、標的のオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域に結合するように構成される（例えば、図8A～図8B、図21A～図21B、図22、および図27を参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは、HCRヘアピンのオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計される（例えば、図8A～図8B、図21A～図22、および図27を参照）。試料中で非特異的に結合する個々のプローブは、共局在化による完全HCRイニシエーターの形成を起こさず、HCRシグナル増幅を抑制する。

30

40

【0445】

いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアは、2個以上のHCRヘアピンを含む（例えば、図8A～図8B、図18A～図18F、および図19A～図19BのHCRアンプリファイアを参照）。

【0446】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、一本鎖トールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。

【0447】

50

いくつかの実施形態では、H C Rヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。

【0448】

いくつかの実施形態では、H C Rヘアピンは、1または複数のレポーター、および／または、1または複数の基質をさらに含む。

【0449】

方法7

いくつかの実施形態では、オーバーラップ結合部位を含むH C R法が提供される。

【0450】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) 2個以上のH C R分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1または複数のプローブユニットを含むプローブセットを準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) レポーターおよび／または基質で標識されたH C Rアンプリファイアを準備すること；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること；g) 所望により上記試料を洗浄すること；並びに、h) 上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む。

【0451】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) 2個以上のH C R分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1または複数のプローブユニットを含むプローブセットを準備すること；c) 上記試料を洗浄すること；d) レポーターおよび／または基質で標識されたH C Rアンプリファイアを準備すること；e) 上記試料を洗浄すること；f) 上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること；g) 上記試料を洗浄すること；並びに、h) 上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む。いくつかの実施形態では、オーバーラップは、1個、2個、3個、4個、または5個のヌクレオチドとすることができる。

【0452】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のプローブユニットの数は、1～1000、または10～100、または20～50、または30～40の範囲内とすることができる。プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B比を2倍、または5倍、または10倍、または100倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のプローブユニットの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B比を、2、または5、または10、または50、または100、または200、または500、または1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

【0453】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、2個以上のH C R分割イニシエータープローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニットは、一緒になって完全H C Rイニシエーターを形成する2個の分割イニシエータープローブ（ $f_1 + f_2 = 1$ となるような、プローブP1に対するフラクション f_1 と、プローブP2に対するフラクション f_2 ）を含む。

【0454】

いくつかの実施形態では、H C R分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の各プローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合することで、分割イニシエーターの共

10

20

30

40

50

局在化が起こり、H C RヘアピンにハイブリダイズしてH C Rシグナル増幅を惹起することが可能な完全H C Rイニシエーターを形成する（例えば、図3 A～図5 E、図8 A～図8 B、図16 A～図16 D、図21 A～図22、および図27の完全H C Rイニシエーターを参照）。

【0455】

いくつかの実施形態では、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は、標的のオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域に結合するように構成される（例えば、図8 A～図8 B、図21 A～図21 B、図22、および図27を参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは、H C Rヘアピンのオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計される（例えば、図8 A～図8 B、図21 A～図22、および図27を参照）。試料中で非特異的に結合する個々のプローブは、共局在化による完全H C Rイニシエーターの形成を起こさず、H C Rシグナル増幅を抑制する。

10

【0456】

いくつかの実施形態では、H C Rアンプリファイアは、2個以上のH C Rヘアピンを含む（例えば、図8 A～図8 B、図18 A～図18 F、および図19 A～図19 BのH C Rアンプリファイアを参照）。

【0457】

いくつかの実施形態では、H C Rヘアピンは、一本鎖トールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。

20

【0458】

いくつかの実施形態では、H C Rヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。

【0459】

いくつかの実施形態では、H C Rヘアピンは、レポーターおよび／または基質をさらに含む。

【0460】

いくつかの実施形態では、標識プローブは、基質結合領域およびレポーターを含む。

【0461】

いくつかの実施形態では、ヘアピン標識は、ヘアピン付近におけるレポーター分子の沈着をもたらすCARD-基質を触媒する酵素を含むレポーター体をリクルートする働きをする基質を含むことができる（例えば、33 A～33 E、34 A～34 C、36 A～36 Bを参照）。例えば：

30

1. 上記酵素は、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）（または複数のHRP酵素を含むポリマーHRP）であって、CARD-基質に対して作用してAEC、DAB、TMB、もしくはステイイエローなどの色素生産性レポーターの沈着を触媒するもの、または、CARD-基質を触媒してフルオロフォア（fluophore）標識チラミドなどの蛍光レポーターの沈着を触媒するもの、または、ビオチン標識チラミドなどのハプテン標識CARD-基質の沈着を触媒し、ハプテンがヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を媒介する働きをするもの、とすることができる。

40

2. 上記酵素は、アルカリホスファターゼ（AP）（または複数のAP酵素を含むポリマーAP）であって、CARD-基質に作用して、レポーター、例えば、限定はされないが、BCIP／NBT、BCIP／TNBT、ナフトールAS-MXリン酸塩+ファストブルーBB、ナフトールAS-MXリン酸塩+ファストレッドTR、ステイグリーンなどの色素生産性レポーター、の沈着を触媒するもの、とすることができる。

3. 上記酵素は、グルコースオキシダーゼであって、CARD-基質に作用して、レポーター、例えばNBT、の沈着を触媒するもの、とすることができる。

4. 上記酵素は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介する任意の分子または複合体とすることができる。

【0462】

50

方法 8

いくつかの実施形態では、オーバーラップ結合部位を含む H C R 法が提供される。

【0463】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1 または複数のプローブユニットを含むプローブセットを準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) レポーターおよび／または基質で標識された H C R アンプリファイアを準備すること；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること；g) 所望により上記試料を洗浄すること；並びに、h) 上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む。

10

【0464】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること；b) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1 または複数のプローブユニットを含むプローブセットを準備すること；c) 上記試料を洗浄すること；d) レポーターおよび／または基質で標識された H C R アンプリファイアを準備すること；e) 上記試料を洗浄すること；f) 上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）を準備すること；g) 上記試料を洗浄すること；並びに、h) 上記レポーターからのシグナルを検出すること、を含む。

20

【0465】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1 または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のプローブユニットの数は、1～1000、または10～100、または20～50、または30～40の範囲内とすることができる。プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B 比を2倍、または5倍、または10倍、または100倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のプローブユニットの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、S B 比を、2、または5、または10、または50、または100、または200、または500、または1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

30

【0466】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニットは、一緒になって完全 H C R イニシエーターを形成する2個の分割イニシエータープローブ（ $f_1 + f_2 = 1$ となるような、プローブ P 1 に対するフラクション f_1 と、プローブ P 2 に対するフラクション f_2 ）を含む。

【0467】

いくつかの実施形態では、H C R 分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の各プローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合することで、分割イニシエーターの共局在化が起こり、H C R ヘアピンにハイブリダイズして H C R シグナル増幅を惹起することが可能な完全 H C R イニシエーターを形成する（例えば、図 3 A～図 5 E、図 8 A～図 8 B、図 16 A～図 16 D、図 21 A～図 22、および図 27 の完全 H C R イニシエーターを参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の標的結合領域は、標的のオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域に結合するように構成される（例えば、図 8 A～図 8 B、図 21 A～図 21 B、図 22、および図 27 を参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは、H C R ヘアピンのオーバーラップ

40

50

領域または非オーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計される（例えば、図 8 A～図 8 B、図 2 1 A～図 2 2、および図 2 7 を参照）。試料中で非特異的に結合する個々のプローブは、共局在化による完全 H C R イニシエーターの形成を起こさず、H C R シグナル増幅を抑制する。

【0 4 6 8】

いくつかの実施形態では、H C R アンプリファイアは、2 個以上の H C R ヘアピンを含む（例えば、図 8 A～図 8 B、図 1 8 A～図 1 8 F、および図 1 9 A～図 1 9 B の H C R アンプリファイアを参照）。

【0 4 6 9】

いくつかの実施形態では、H C R ヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。

【0 4 7 0】

いくつかの実施形態では、H C R ヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。

【0 4 7 1】

いくつかの実施形態では、H C R ヘアピンは、レポーター（reported）および／または基質をさらに含む。いくつかの実施形態では、レポーターは、フルオロフォア、発色団、発光団、蛍光体、F R E T 対、いくつかの F R E T 対、クエンチャー、フルオロフォア／クエンチャー対、希土類元素または化合物、放射性分子、磁性分子、またはシグナルの測定を促す任意の他の分子である。いくつかの実施形態では、上記基質は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介するレポーター体をリクルートする働きをする。

【0 4 7 2】

いくつかの実施形態では、標識プローブは、基質結合領域およびレポーターを含む（例えば、図 1 8 C～E および図 2 0 を参照）。例えば、レポーターは、フルオロフォア、発色団、発光団、蛍光体、F R E T 対、いくつかの F R E T 対、クエンチャー、フルオロフォア／クエンチャー対、希土類元素または化合物、放射性分子、磁性分子、またはシグナルの測定を促す任意の他の分子とすることができる。

【0 4 7 3】

いくつかの実施形態では、ヘアピン標識は、ヘアピン付近におけるレポーター分子の沈着をもたらす C A R D - 基質を触媒する酵素を含むレポーター体をリクルートする働きをする基質を含むことができる（例えば、3 3 A～3 3 E、3 4 A～3 4 C、3 6 A～3 6 B を参照）。例えば：

1. 上記酵素は、西洋わさびペルオキシダーゼ（H R P）（または複数の H R P 酵素を含むポリマー H R P）であって、C A R D - 基質に対して作用して A E C、D A B、T M B、もしくはステイイエローなどの色素生産性レポーターの沈着を触媒するもの、または、C A R D - 基質を触媒してフルオロフォア（fluophore）標識チラミドなどの蛍光レポーターの沈着を触媒するもの、または、ビオチン標識チラミドなどのハプテン標識 C A R D - 基質の沈着を触媒し、ハプテンがヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を媒介する働きをするもの、とすることができる。

2. 上記酵素は、アルカリホスファターゼ（A P）（または複数の A P 酵素を含むポリマー A P）であって、C A R D - 基質に作用して、レポーター、例えば、限定はされないが、B C I P / N B T、B C I P / T N B T、ナフトール A S - M X リン酸塩 + ファストブルー B B、ナフトール A S - M X リン酸塩 + ファストレッド T R、ステイグリーンなどの色素生産性レポーター、の沈着を触媒するもの、とすることができる。

3. 上記酵素は、グルコースオキシダーゼであって、C A R D - 基質に作用して、レポーター、例えば N B T、の沈着を触媒するもの、とすることができる。

4. 上記酵素は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介する任意の分子または複合体とすることができる。

【0 4 7 4】

方法 9

いくつかの実施形態では、反復シグナル検出によるオーバーラップ結合部位を含む H C R 法が提供される。

【0475】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、b) i) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、i i) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1 または複数のプローブセットを準備すること；c) 所望により上記試料を洗浄すること；d) 1 または複数のレポーターおよび／または基質でそれぞれ標識された 1 または複数の H C R アンプリファイアを準備すること；e) 所望により上記試料を洗浄すること；f) 所望により、1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ（各々は 1 または複数のレポーターに結合している）を準備すること；g) 所望により上記試料を洗浄すること；h) 1 または複数のレポーターからのシグナルを検出すること；i) 所望により、1 または複数のシグナルを上記試料から除去すること；j) 所望により、1 または複数のレポーターを上記試料から除去すること；k) 所望により、1 または複数の標識プローブを上記試料から除去すること；l) 所望により、1 または複数のアンプリファイアを上記試料から除去すること；m) 所望により、1 または複数のプローブセットを上記試料から除去すること；並びに、n) 所望により 上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢 i) のいくつかと選択肢 i i) のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

【0476】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2 個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1 または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2 個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、H C R アンプリファイアはさらに、C A R D または反復 C A R D を媒介する。

【0477】

いくつかの実施形態では、上記方法は、a) 1 または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、b) i) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ、または、i i) 2 個以上の H C R 分割イニシエーターをそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット、をそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている、1 または複数のプローブセットを準備すること；c) 上記試料を洗浄すること；d) 1 または複数のレポーターおよび／または基質でそれぞれ標識された 1 または複数の H C R アンプリファイアを準備すること；e) 上記試料を洗浄すること；f) 1 または複数の基質に対応する 1 または複数の標識プローブ（各々は 1 または複数のレポーターに結合している）を準備すること；g) 上記試料を洗浄すること；h) 1 または複数のレポーターからのシグナルを検出すること；i) 1 または複数のシグナルを

上記試料から除去すること；j）1または複数のレポーターを上記試料から除去すること；k）1または複数の標識プローブを上記試料から除去すること；l）1または複数のアンプリファイアを上記試料から除去すること；m）所望により、1または複数のプローブセットを上記試料から除去すること；並びに、n）上記工程のいずれかを任意の順序で反復すること、を含む。いくつかの実施形態では、複数のプローブセットが使用される場合、選択肢 i）のいくつかと選択肢 i i）のいくつかが用いられる（当該プローブセットに関して）。

【0478】

上記方法のいくつかの実施形態では、0、1、または複数の標的に対して使用されるプローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブをそれぞれ含み、0、1、または複数の他の標的に対して使用されるプローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、各プローブセットは、2個以上の分割イニシエータープローブをそれぞれ含む1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各標的に対して使用されるプローブセットの種類は、当該標的の詳細に基づいて、各標的について独立して選択される。いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアはさらに、CARDまたは反復CARDを媒介する。

【0479】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1または複数のイニシエーター標識プローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数は、1～1000、または10～100、または20～50、または30～40の範囲内とすることができる。プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、SB比を2倍、または5倍、または10倍、または100倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のイニシエーター標識プローブの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のイニシエーター標識プローブの数を増加させることで、SB比を、2、または5、または10、または50、または100、または200、または500、または1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

【0480】

いくつかの実施形態では、イニシエーター標識プローブは、1または複数の標的結合ドメイン、および1または複数のHCRイニシエーターを含む（例えば、図39A～図39Nおよび図42A～図42F）。

【0481】

いくつかの実施形態では、プローブセットは、1または複数のプローブユニットを含む。いくつかの実施形態では、プローブセット中のプローブユニットの数は、1～1000、または10～100、または20～50、または30～40の範囲内とすることができる。プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、SB比を2倍、または5倍、または10倍、または100倍、またはそれ以上に増加させることができる。プローブセット内のプローブユニットの数、試料に固有のバックグラウンドのレベル、および試料中の標的の存在量に基づいて、プローブセット中のプローブユニットの数を増加させることで、SB比を、2、または5、または10、または50、または100、または200、または500、または1000、またはそれ以上になるように増加させることができる。

【0482】

いくつかの実施形態では、プローブユニットは、2個以上のHCR分割イニシエータープローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニットは、一緒になって完全HCRイニシエーターを形成する2個の分割イニシエータープローブ（ $f_1 + f_2 = 1$ となるような、プローブP1に対するフラクション f_1 と、プローブP2に対するフラクション f_2 ）を含む。

【0483】

いくつかの実施形態では、HCR分割イニシエータープローブは、標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の各プローブが標的上の近接するコグネイトな結合部位に結合することで、分割イニシエーターの共局在化が起こり、HCRヘアピンにハイブリダイズしてHCRシグナル増幅を惹起することが可能な完全HCRイニシエーターを形成する（例えば、図3A～図5E、図8A～図8B、図16A～図16D、図21A～図22、および図27の完全HCRイニシエーターを参照）。いくつかの実施形態では、プローブユニット内の標的結合領域は、標的のオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域に結合するように構成される（例えば、図8A～図8B、図21A～図21B、図22、および図27を参照）。

10

【0484】

いくつかの実施形態では、プローブユニット内の分割イニシエーターは、HCRヘアピンのオーバーラップ領域または非オーバーラップ領域にハイブリダイズするように設計される（例えば、図8A～図8B、図21A～図22、および図27を参照）。試料中で非特異的に結合する個々のプローブは、共局在化による完全HCRイニシエーターの形成を起こさず、HCRシグナル増幅を抑制する。

【0485】

いくつかの実施形態では、HCRアンプリファイアは、2個以上のHCRヘアピンを含む（例えば、図8A～図8B、図18A～図18F、および図19A～図19BのHCRアンプリファイアを参照）。

20

【0486】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、一本鎖トーホールド、およびステム部を含むインプットドメインを含む。

【0487】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、一本鎖ループ、および上記ステム部に対する相補鎖を含むアウトプットドメインをさらに含む。

【0488】

いくつかの実施形態では、HCRヘアピンは、1または複数のレポーター、および／または、1または複数の基質をさらに含む。

【0489】

いくつかの実施形態では、標識プローブは、基質結合領域、および1または複数のレポーターを含む。

30

【0490】

本明細書における方法のいくつかの実施形態（例えば、方法1～9）では、標的は核酸配列である。非限定例としては、dsDNA、dsRNA、ssDNA、およびssRNAである。

【0491】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態（例えば、方法1または方法3）では、Nは1～1000である。いくつかの実施形態では、Nは、1～10、1～50、1～100、1～250、1～500、または1～750である。

40

【0492】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態（例えば、方法1または方法3）では、Mは2～10,000である。いくつかの実施形態では、Mは、1～10、1～50、1～100、1～250、1～500、1～750、1～1000、1～1250、1～2500、1～3750、1～5000、または1～7500である。

【0493】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、基質は、ハプテン、ジギシゲニン（DIG）、ジニトロフェニル（DNP）、フルオロフォア、ビオチン、4～50個のヌクレオチドを含む核酸ドメイン、レポーター分子の沈着を触媒する酵素をリクルートする基質、分割基質、レポーターの局在化を直接的または間接的に媒介する核酸ド

50

メインからなる群から選択される。

【0494】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、レポーターは、フルオロフォア、発色団、発光団、蛍光体、FRET対、いくつかのFRET対、クエンチャー、フルオロフォア／クエンチャー対、希土類元素または化合物、放射性分子、磁性分子である。

【0495】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、上記試料を固定することをさらに含む。

【0496】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、上記試料を透過処理することをさらに含む。

【0497】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、1または複数のシグナルを上記試料から除去することをさらに含む。

【0498】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、1または複数のレポーターを上記試料から除去することをさらに含む。

【0499】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、1または複数の標識プローブを上記試料から除去することをさらに含む。

【0500】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、1または複数のアンプリファイアを上記試料から除去することをさらに含む。

【0501】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、1または複数のプローブセットを上記試料から除去することをさらに含む。

【0502】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、上記工程のいずれかを任意の順序で反復することをさらに含む。

【0503】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、上記方法は、特許請求の範囲に記載されているようなアルファベット順に実行される。

【0504】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プローブユニットは、2個以上のHCR分割イニシエータープローブをそれぞれ含み、HCR分割イニシエータープローブは標的結合領域、および分割イニシエーターを含む。

【0505】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、オーバーラッピング結合が含まれ、オーバーラップは少なくとも1個、2個、または3個のヌクレオチドである。

【0506】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、ヘアピン標識は、ヘアピン付近におけるレポーター分子の沈着をもたらすCARD-基質を触媒する酵素を含むレポーター体をリクルートする働きをする基質を含むことができる（例えば、33A～33E、34A～34C、36A～36Bを参照）。例えば：

1. 上記酵素は、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）（または複数のHRP酵素を含むポリマーHRP）であって、CARD-基質に対して作用してAEC、DAB、TMB、もしくはステイイエローなどの色素生産性レポーターの沈着を触媒するもの、または、CARD-基質を触媒してフルオロフォア（fluophore）標識チラミドなどの蛍光レポーターの沈着を触媒するもの、または、ビオチン標識チラミドなどのハプテン標

10

20

30

40

50

識CARD-基質の沈着を触媒し、ハプテンがヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を媒介する働きをするもの、とすることができる。

2. 上記酵素は、アルカリホスファターゼ（AP）（または複数のAP酵素を含むポリマーAP）であって、CARD-基質に作用して、レポーター、例えば、限定はされないが、BCIP/NBT、BCIP/TNBT、ナフトールAS-MXリン酸塩+ファストブルーBB、ナフトールAS-MXリン酸塩+ファストレッドTR、ステイグリーンなどの色素生産性レポーター、の沈着を触媒するもの、とすることができる。

3. 上記酵素は、グルコースオキシダーゼであって、CARD-基質に作用して、レポーター、例えばNBT、の沈着を触媒するもの、とすることができる。

4. 上記酵素は、ヘアピン標識付近におけるレポーターの局在化を直接的または間接的に媒介する任意の分子または複合体とすることができる。

10

【0507】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、CARDを媒介するために使用される酵素は、レポーター沈着後に不活性化される（例えば、化学変性および／または熱変性を使用）。

【0508】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、ヘアピン標識は1または複数のハプテンを含み、上記1または複数のハプテンは1または複数の抗ハプテン一次抗体をリクルートし、上記1または複数の抗ハプテン一次抗体はCARDを媒介する酵素であるレポーター体で標識された1または複数の二次抗体をさらにリクルートする。

20

【0509】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、ヘアピン標識は1または複数の第1ハプテンを含み、上記1または複数の第1ハプテンは1または複数の抗第1ハプテン一次抗体をリクルートし、上記1または複数の抗第1ハプテン一次抗体は1または複数の第2ハプテンで標識された1または複数の第1二次抗体をさらにリクルートし、上記1または複数の第2ハプテンは1または複数の抗第2ハプテン一次抗体をさらにリクルートし、上記1または複数の抗第2ハプテン一次抗体はCARDを媒介する酵素である1または複数のレポーター体をそれぞれ含む1または複数の第2二次抗体をさらにリクルートする。

【0510】

本明細書における方法のいずれかのいくつかの実施形態では、ヘアピン標識は1または複数の第1ハプテンを含み、上記1または複数の第1ハプテンは1または複数の抗第1ハプテン一次抗体をリクルートし、上記1または複数の抗第1ハプテン一次抗体は1または複数の第2ハプテンで標識された1または複数の第1二次抗体をさらにリクルートし、上記1または複数の第2ハプテンは1または複数の抗第2ハプテン一次抗体をさらにリクルートし、上記1または複数の抗第2ハプテン一次抗体はCARDを媒介する酵素である1または複数のレポーター体をそれぞれ含む1または複数の第2二次抗体をさらにリクルートする。いくつかの実施形態では、上記第2ハプテンも、CARDを媒介する酵素であるレポーター体（例えば、HRPまたはAP）である。

30

【0511】

方法10

いくつかの実施形態では、方法は、第1分割イニシエーターを含む第1分割イニシエータープロンプ、第2分割イニシエーターを含む第2分割イニシエータープロンプ、第1ヘアピン単量体、第2ヘアピン単量体、および標的分子を準備すること、並びに、上記第1分割イニシエータープロンプおよび上記第2分割イニシエータープロンプを、上記標的と一緒にインキュベーションすること、を含む。いくつかの実施形態では、上記第1ヘアピン単量体は、第1トーホールドおよび第1ステム部を含む第1インプットドメイン、第1ヘアピングループおよび上記第1ステム部に対する相補鎖を含む第1アウトプットドメイン、並びに第1ハプテン分子を含む。いくつかの実施形態では、上記第2ヘアピン単量体は、第2トーホールドおよび第2ステム部を含む第2インプットドメイン、第2ヘアピングル

40

50

ープおよび上記第2ステム部に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン、並びに第2ハプテン分子を含む（例えば、図34B参照）。

【0512】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記インキュベーションは、上記第1分割イニシエータープローブを上記標的分子に結合させ、上記第2分割イニシエータープローブを上記標的分子に結合させるものである。

【0513】

いくつかの実施形態では、上記方法は、上記第1ヘアピン単量体を上記第1分割イニシエーターおよび上記第2分割イニシエーターの両方に結合させること、上記第2ヘアピン単量体を上記第1ヘアピン単量体に結合させること、1または複数のレポーター体で標識された抗ハプテン分子を準備すること、をさらに含む。いくつかの実施形態では、上記レポーター体は、CARDを媒介する酵素である。いくつかの実施形態では、上記方法は、1または複数のCARD基質を準備すること、並びに、上記CARDを媒介する酵素によって上記CARD基質から生成される、1または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定すること、をさらに含む（例えば、図34B参照）。

【0514】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記抗ハプテン分子は、抗ハプテン抗体である。上記方法のいくつかの実施形態では、上記抗ハプテン分子は、抗ハプテンナノボディである。上記方法のいくつかの実施形態では、上記抗ハプテン分子は、抗ハプテン抗体と抗ハプテンナノボディとを組み合わせたものである。

【0515】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記少なくとも1つの標的は、核酸である（例えば、図33B、図36A、および図36B参照）。

【0516】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記少なくとも1つの標的分子は、RNAである。いくつかの実施形態では、上記RNAは、一本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、上記RNAは、二本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、上記RNAは、一本鎖RNAおよび二本鎖RNAの両方である。

【0517】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記少なくとも1つの標的分子は、DNAである。いくつかの実施形態では、上記DNAは、一本鎖DNAである。いくつかの実施形態では、上記DNAは、二本鎖DNAである。いくつかの実施形態では、上記DNAは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAの両方である。

【0518】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記少なくとも1つの標的分子は、RNA分子の複合体（例えば、リボソームRNAとmRNA）である。いくつかの実施形態では、上記RNAは、一本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、上記RNAは、二本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、上記RNAは、一本鎖RNAおよび二本鎖RNAの両方である。

【0519】

方法11

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも1つのイニシエーターを含む少なくとも1つのイニシエーター標識プローブ、第1ヘアピン単量体、第2ヘアピン単量体、および、1または複数の標的分子を準備すること、並びに、上記少なくとも1つのイニシエーターを含む少なくとも1つのイニシエーター標識プローブを上記1または複数の標的分子と共にインキュベーションすること、を含む。いくつかの実施形態では、上記第1ヘアピン単量体は、第1トーホールドおよび第1ステム部を含む第1インプットドメイン、第1ヘアピングループおよび上記第1ステム部に対する相補鎖を含む第1アウトプットドメイン、並びに第1ハプテン分子を含む。いくつかの実施形態では、第2ヘアピン単量体は、第2トーホールドおよび第2ステム部を含む第2インプットドメイン、第2ヘアピングループお

よび上記第2ステム部に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン、並びに第2ハプテン分子を含む（例えば、図34A参照）。所望により、少なくとも1つのヘアピンが少なくとも1つのハプテンを有する限り、各ヘアピンは0、1、2、またはそれ以上のハプテンを有していてもよい。

【0520】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記インキュベーションは、上記少なくとも1つのイニシエーターを含む少なくとも1つのイニシエーター標識プローブを、上記1または複数の標的分子に結合させるものである。

【0521】

いくつかの実施形態では、上記方法は、上記第1ヘアピン単量体を上記少なくとも1つのイニシエーターに結合させること、上記第2ヘアピン単量体を上記第1ヘアピン単量体に結合させること、および、1または複数のレポーター体で標識された抗ハプテン分子を準備すること、をさらに含む。いくつかの実施形態では、上記レポーター体は、CARDを媒介する酵素である。いくつかの実施形態では、上記方法は、1または複数のCARD基質を準備すること、並びに、上記CARDを媒介する酵素によって上記CARD基質から生成される、1または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定すること、をさらに含む（例えば、図34A参照）。

【0522】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記抗ハプテン分子は、抗ハプテン抗体である。上記方法のいくつかの実施形態では、上記抗ハプテン分子は、抗ハプテンナノボディである。上記方法のいくつかの実施形態では、上記抗ハプテン分子は、抗ハプテン抗体断片である。上記方法のいくつかの実施形態では、上記抗ハプテン分子は、抗ハプテン抗体と抗ハプテンナノボディとを組み合わせたものである。

【0523】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記1または複数の標的分子は、タンパク質である（例えば、図33Cおよび図33Eを参照）。上記方法のいくつかの実施形態では、上記1または複数の標的分子は、マイクロRNA、スモールRNA、またはノンコーディングRNAである。

【0524】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記抗ハプテン分子は、抗ハプテン抗体である。上記方法のいくつかの実施形態では、上記抗ハプテン分子は、抗ハプテンナノボディである。上記方法のいくつかの実施形態では、上記抗ハプテン分子は、抗ハプテン抗体と抗ハプテンナノボディとを組み合わせたものである。

【0525】

いくつかの実施形態では、上記抗ハプテン抗体は、一次抗体である。いくつかの実施形態では、上記方法は、二次抗体をさらに含むか使用する。いくつかの実施形態では、上記抗ハプテン抗体は上記ハプテンと結合する一次抗体を含み、上記方法は上記一次抗体と結合する二次抗体（1または複数のレポーター体で標識されている）をさらに含む。

【0526】

方法12

いくつかの実施形態では、方法は、第1分割イニシエーターを含む第1分割イニシエータープローブ、第2分割イニシエーターを含む第2分割イニシエータープローブ、第1ヘアピン単量体、第2ヘアピン単量体、および標的分子を準備すること、並びに、上記第1分割イニシエータープローブおよび上記第2分割イニシエータープローブを、上記標的分子と一緒にインキュベーションすること、を含む。いくつかの実施形態では、上記第1ヘアピン単量体は、第1トーホールドおよび第1ステム部を含む第1インプットドメイン、第1ヘアピンループおよび上記第1ステム部に対する相補鎖を含む第1アウトプットドメイン、並びに基質を含む。いくつかの実施形態では、上記第2ヘアピン単量体は、第2トーホールドおよび第2ステム部を含む第2インプットドメイン、第2ヘアピンループおよび上記第2ステム部に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン、並びに上記基質を

含む。

【0527】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記インキュベーションは、上記第1分割イニシエータープローブを上記標的分子に結合させ、上記第2分割イニシエータープローブを上記標的分子に結合させるものである。

【0528】

いくつかの実施形態では、上記方法は、上記第1ヘアピン単量体を上記第1分割イニシエーターおよび上記第2分割イニシエーターの両方に結合させること、上記第2ヘアピン単量体を上記第1ヘアピン単量体に結合させること、1または複数のレポーター体で標識された基質結合領域であって、上記基質結合領域は上記基質に結合し、上記レポーター体はCARDを媒介する酵素である、基質結合領域を準備すること、1または複数のCARD基質を準備すること、上記CARDを媒介する酵素によって上記CARD基質から生成される、1または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定すること、をさらに含む。

10

【0529】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記少なくとも1つの標的は、核酸である（例えば、図33B、図36A、および図36Bを参照）。

【0530】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記少なくとも1つの標的分子は、RNAである。いくつかの実施形態では、上記RNAは、一本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、上記RNAは、二本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、上記RNAは、一本鎖RNAおよび二本鎖RNAの両方である。

20

【0531】

方法13

いくつかの実施形態では、方法は、第1分割イニシエーターを含む第1分割イニシエータープローブ、第2分割イニシエーターを含む第2分割イニシエータープローブ、第1ヘアピン単量体、第2ヘアピン単量体、および標的分子を準備すること、並びに、上記第1分割イニシエータープローブおよび上記第2分割イニシエータープローブを、上記標的と一緒にインキュベーションすること、を含む。いくつかの実施形態では、上記第1ヘアピン単量体は、第1トールドおよび第1ステム部を含む第1インプットドメイン、第1ヘアピンループおよび上記第1ステム部に対する相補鎖を含む第1アウトプットドメイン、並びに第1分割基質を含む。いくつかの実施形態では、第2ヘアピン単量体は、第2トールドおよび第2ステム部を含む第2インプットドメイン、第2ヘアピンループおよび上記第2ステム部に対する相補鎖を含む第2アウトプットドメイン、並びに第2分割基質を含む。

30

【0532】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記インキュベーションは、上記第1分割イニシエータープローブを上記標的分子に結合させ、上記第2分割イニシエータープローブを上記標的分子に結合させるものである。

【0533】

いくつかの実施形態では、上記方法は、上記第1ヘアピン単量体を上記第1分割イニシエーターおよび上記第2分割イニシエーターの両方に結合させること、上記第2ヘアピン単量体を上記第1ヘアピン単量体に結合させること、上記第1分割基質および上記第2分割基質を含む完全基質を得ること、1または複数のレポーター体で標識された基質結合領域であって、上記基質結合領域は上記完全基質に結合し、上記レポーター体はCARDを媒介する酵素である、基質結合領域を準備すること、1または複数のCARD基質を準備すること、上記CARDを媒介する酵素によって上記CARD基質から生成される、1または複数の沈着レポーターからのシグナルを測定すること、をさらに含む。

40

【0534】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記少なくとも1つの標的は、核酸である（例えば、図33B、図36A、および図36Bを参照）。

50

【0535】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記少なくとも1つの標的分子は、RNAである。いくつかの実施形態では、上記RNAは、一本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、上記RNAは、二本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、上記RNAは、一本鎖RNAおよび二本鎖RNAの両方である。

【実施例】

【0536】

下記の実施例は非限定的なものであり、当該技術分野の技術の範囲内の他の変法も企図されている。

【0537】

実施例1：未最適化プローブセットを用いた全載ニワトリ胚における2種の標的mRNAのイメージング

図6は、未最適化プローブセットを用いた全載ニワトリ胚における2種の標的mRNAのイメージングを示している。

【0538】

標準的なプローブ（別名、イニシエーター標識プローブ）（スキームA）を用いた場合、非特異的なプローブ結合によって、バックグラウンドが増幅され、SB比が低くなる。分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ（スキームE）を用いると、プロトコルの両段階中の自動バックグラウンド抑制により、非特異的なプローブ結合が、バックグラウンドの増幅を起こさなくなり、未最適化分割イニシエータープローブセットを用いた場合でも高いSB比が得られる。分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ（スキームE）の自動バックグラウンド抑制特性は、新規標的mRNAの発現パターンのマッピングを行う際に非常に有益であり、時間のかかる分割イニシエータープローブセットの最適化（すなわち、試料で非特異的に結合することが認められた不良プローブの除外）を必要とせずに、高品質な結果を迅速に得ることが可能となる。

【0539】

能動的バックグラウンド抑制の利点が図6に示されており、標準プローブ（別名、イニシエーター標識プローブ）（スキームA）または分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ（スキームE）のいずれかを含む未最適化プローブセットを用いた、全載ニワトリ胚における標的mRNAのイメージングが示されている。標的mRNA Dmbx1：ステージHH7の胚；標的mRNA Sox8：ステージHH10の胚。標準プローブ（別名、イニシエーター標識プローブ）（スキームA）では、未最適化分割イニシエータープローブセットを用いると、非特異的なプローブ結合をもたらす増幅されたバックグラウンドの生成に起因して、低SB比が認められた。分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ（スキームE）では、未最適化分割イニシエータープローブセットを用いていても、高SB比が認められる；試料において非特異的に結合するプローブは、2つのHCRイニシエーターの半分を共局在化させないため、HCRシグナル増幅を惹起せず、バックグラウンド増幅の発生が回避される。スキームAでは12種の非構造化プローブを含有するプローブセットが用いられ、それぞれのプローブは、標的mRNAの異なる部分配列に対する標的結合部位を含んでいる。スキームEでは12種のプローブ対を含有する分割イニシエータープローブセットが用いられ；これらの12対はスキームAの12種のプローブと同じ標的部分配列に対応している。参考画像はGEISHA（非特許文献11）から得た。

【0540】

実施例2：分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブを用いたHCRの協同的惹起

分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ（スキームE）を用いたHCRの協同的惹起（図7）。（a）分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ（スキームE）の標的を介した共局在化。分割イニシエーター（別名

10

20

30

40

50

、スプリットイニシエーター) プローブの P 1 および P 2 はそれぞれ、H C R イニシエーター I 1 の半分を有している。P 1 および P 2 が標的 m R N A に選択的に結合すると、これらの 2 つの H C R イニシエーター I 1 の半分が共局在化し、H C R 増幅カスケードの協同的な惹起が可能となる。

【0541】

(b) スプリットイニシエータープローブである P 1 および P 2 (スキーム E) を用いた H C R の協同的な惹起のインビトロ検証。反応条件：それぞれ 0.5 μ M のヘアピン H 1 およびヘアピン H 2 (レーン 1 ~ 7) ; それぞれ 5 nM のオリゴ I 1、P 1、P 2、および / または標的 (レーンはゲルに対し記載された通り) ; 5 S S C T 緩衝液; 室温で一晩反応。ヘアピン H 1 およびヘアピン H 2 は A l e x a 6 4 7 フルオロフォアで標識。d s D N A 1 k b ラダーは S Y B R G o l d で染色済み。レーン 1 : 準安定なヘアピン H 1 およびヘアピン H 2 は、H C R イニシエーター I 1 の非存在下では、それらの速度論的にトラップされた状態からの漏出が最も少ない。レーン 2 : H C R イニシエーター I 1 (オリゴである I 1) 存在下における H C R ヘアピン単量体 H 1 および H 2 の増幅重合体への完全変換。レーン 3 : 標的、並びに両方の分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブ P 1 および P 2 の存在下での、ヘアピン H 1 および H 2 の重合体への強い変換により、H C R の協同的な惹起が示されている。レーン 4 ~ 6 : プローブ P 1、プローブ P 2、または両プローブ P 1 および P 2 の存在下での、H C R ヘアピン単量体 H 1 および H 2 の重合体への変換は最少であり、能動的バックグラウンド抑制が示されている。レーン 7 : 標的単独の存在下では、H C R ヘアピン単量体 H 1 および H 2 の重合体への変換は最少である。

10

20

【0542】

(c) パネル c における重合体バンドの定量化。M u l t i G a u g e ソフトウェア (富士フイルム社 (F u j i P h o t o F i l m)) を用いて、レーン 1 ~ 7 の、重合体バンドの周囲の A l e x a 6 4 7 強度プロファイルを算出した。ピーク値を 0 として中央に置き、ゲル移動距離 ± 3 mm の各強度プロファイルを示している。M u l t i G a u g e を用いて、シグナルおよびバックグラウンドの自動検出により、定量化されたパーセンテージを算出し; 算出値をレーン 2 の測定値に対して正規化した。

【0543】

図 7 B のゲル試験により、分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブ (スキーム E) を用いた H C R の協同的な惹起が示された。レーン 1 は、H C R イニシエーター I 1 の非存在下では、ヘアピン H 1 および H 2 の速度論的にトラップされた状態からの漏出が最小であることを示している。陽性対照として、レーン 2 は、完全 H C R イニシエーター I 1 (I 1 は単一オリゴである) の存在下での、準安定な H C R ヘアピン単量体 H 1 および H 2 の重合体への変換を示している。

30

【0544】

分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブを使用すると、標的が分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブ P 1 および P 2 と一緒に存在していた場合、準安定な H C R ヘアピン単量体 H 1 および H 2 の重合体への強力な変換が認められた。しかし、P 1 もしくは P 2 が単独で存在している場合 (レーン 4 および 5)、または、P 1 および P 2 が共に存在しているが、標的が存在しない場合 (レーン 6) では、認められた重合体への変換は最少であった。

40

【0545】

これらの結果から、分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブ (スキーム E) の能動バックグラウンド抑制特性が示された。標的への選択的ハイブリダイゼーションを介して共局在化していないプローブは、主として、H C R 増幅を惹起しない。標的の非存在下では、P 1 および P 2 は、両方が溶解状態で存在していても H C R を惹起しないこと (レーン 6) は、分割イニシエータープローブが洗浄を行わない場合でも自動バックグラウンド抑制を可能にすることを示している。

【0546】

50

実施例 3：標準プローブおよび分割イニシエーター（別名スプリットイニシエーター）プローブの性能比較

図 9 は、全載ニワトリ胚における mRNA 標的のイメージングにおいて、プローブセットのサイズを増加させながら、標準プローブ（別名イニシエーター標識プローブ）（スキーム A）と分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ（スキーム E）の性能を比較している。標準プローブを用いた試験には、5 個のプローブからなる最適化プローブセットを使用し、これらのプローブを追加の未最適化プローブで増強し、10 個のプローブからなるプローブセットおよび 20 個のプローブからなるプローブセットを形成させた。分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブを用いた試験には、5 個、10 個、および 20 個のプローブ対を含み、各プローブ対が対応する標準プローブとおよそ同じ結合部位を標的とするプローブセットを使用した。標準プローブを用いた場合、プローブセットサイズを増加させると、一部の追加プローブが試料内で非特異的に結合した結果、バックグラウンドがかなり増加し（パネル a）、それに対応して S/B 比が減少した。

10

【0547】

これらのデータは、能動バックグラウンド抑制を可能にしない標準プローブ（別名イニシエーター標識プローブ）（スキーム A）を用いた、プローブセットの最適化の重要性を示している。プローブセット中に不良プローブが存在する場合、これらの不良プローブは、バックグラウンド増幅を起こすことにより成績を損なう。対照的に、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ（スキーム E）を用いると、プローブ対

20

【0548】

これらのデータは、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブを用いた自動バックグラウンド抑制の大きな有益性を示しており：分割イニシエータープローブセット中に不良プローブが存在する場合でも、バックグラウンド増幅を引き起こさないため、プローブセット最適化を行わずとも、プローブ数を増加させることで、S/B 比を増加させることが簡単になる。20 個のプローブ（標準プローブ）を含むプローブセットまたは 20 個のプローブ対（分割イニシエーター（スプリットイニシエーター）プローブ）を含むプローブセットを用いた代表的な画像がパネル c に示されている。これらの画像の代表的なピクセル強度分布がパネル d に示されている。分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブでは、バックグラウンドのピクセル強度分布とシグナル+バックグラウンドのピクセル強度分布は大部分が重なっていない。

30

【0549】

以下は図 9 について少しより多くの詳細を提供するものであり、標準プローブ（別名、イニシエーター標識プローブ）（スキーム A）および分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ（スキーム E）を用いた、バックグラウンドおよび S/B 比を示している。（a）5 個、10 個、または 20 個のプローブ（標準プローブ）を含むプローブセットを用いた蛍光バックグラウンドと、5 個、10 個、または 20 個のプローブ対（分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブ）を含むプローブセットを用いた蛍光バックグラウンドとの比較。未最適化標準プローブでは、非特異的なプローブ結合が起こり、バックグラウンド増幅が発生した。試料において非特異的に結合する未最適化分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブは、2 つの HCR イニシエーターの半分を共局在化させないため、HCR シグナル増幅を惹起せず、バックグラウンド増幅の発生が回避された。（b）パネル a の各プローブセットの S/B 比。S/B 比測定において、分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブと能動バックグラウンド抑制は、未最適化標準プローブよりも優れていた。（c）固定全載ニワトリ胚の神経堤における共焦点顕微鏡像。プローブセット：スキーム A の標準プローブには 20 個のプローブ、スキーム E の分割イニシエーター（別名、スプリットイニシエーター）プローブには 20 個のプローブ対。（d）シグナル+バックグラウンド（

40

50

パネル c の固体境界内のピクセル) およびバックグラウンド (パネル c の点線境界内のピクセル) のピクセル強度ヒストグラム。各画像において、固体境界内のピクセルの総数と点線境界内のピクセルの総数は同じである。固定された胚：ステージ HH 10。標的：Sox10。

【0550】

実施例 4：未最適化分割イニシエータープローブを用いた、SB 比の高い、全載ニワトリ胚における 4 つの標的 mRNA のイメージング

図 10 は、未最適化分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブ (スキーム E) を用いた、SB 比の高い、全載ニワトリ胚における 4 つの標的 mRNA のイメージングを示している。

【0551】

分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブの自動バックグラウンド抑制特性により、SB 比は、プローブセットの最適化を実施しなくとも、4 つの標的 mRNA で、およそ 25 ~ 60 の範囲である。

【0552】

図 10：プローブセット最適化を実施していない分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブ (スキーム E) を用いた、固定後の全載ニワトリ胚における、SB 比の高い、mRNA 発現の多重イメージング。(a) 4 種の標的 mRNA (FoxD3、EphA4、Sox10、Dmbx1) の発現の模式図。(b) 頭部および神経堤における 4 チャンネル共焦点顕微鏡像。(c) パネル b の指示領域のズーム。(b) パネル c からの 4 つの個々のチャンネルと SB 比測定値。プローブセット：1 標的当たり 12 ~ 20 対の未最適化分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブ。アンプリファイア：スペクトラル的に異なるフルオロフォアを有する 4 つのオルソゴナルな HCR アンプリファイア (1 標的当たり 1 つの HCR アンプリファイア)。固定された胚：ステージ HH 10。

【0553】

実施例 5：細胞内解像度での mRNA 発現の定量分析のための分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブを用いたインサイツ HCR

図 11 は、分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブ (スキーム E) を用いたインサイツ HCR が、全載ニワトリ胚内における細胞内解像度での mRNA 発現の定量分析を可能にすることを示している。

【0554】

各標的 mRNA は、それぞれ別々のスペクトラル的に異なる HCR アンプリファイアを惹起する 2 つの分割イニシエータープローブセットを用いて冗長検出された。正規化されたボクセル強度の 2 チャンネル散布図をプロットしたところ、およそ 0 の切片を有するタイトな直線関係が得られ、HCR シグナルがイメージングボクセル当たりの標的 mRNA の数に比例して変化することが示された。正確度は分布が直線的になり切片がなくなると向上し；精度は分散がよりタイトになるにつれて向上する。2 × 2 μm ボクセルによって細胞内解像度が得られた。

【0555】

これらの結果は、分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブを用いたインサイツ HCR が、プローブセット最適化を必要とせずに、解剖学的背景において、細胞内解像度で、mRNA 発現の、正確度と精度が高い相対的定量化を可能にすることを示している。

【0556】

図 11：固定全載ニワトリ胚における細胞内解像度での mRNA 発現の定量的画像化。(a) 標的 mRNA の 2 チャンネル冗長検出。標的：Dmbx1 および EphA4。共焦点顕微鏡：0.2 × 0.2 μm ピクセル。プローブセット：標的ごとのチャンネル当たり 20 対の分割イニシエーター (別名、スプリットイニシエーター) プローブ。アンプリファイア：標的ごとの、スペクトラル的に異なるフルオロフォアを有する 2 つのオルソゴナ

ルなHCRアンプリファイア。固定された胚：ステージHH10。(b)パネルbの選択領域内の $2 \times 2 \mu\text{m}$ ボクセルにおける高度に相関した正規化シグナル(ピアソン相関係数、 r)。

【0557】

実施例6：HCRヘアピンのオーバーラップ領域と相補的な分割イニシエータープローブと、HCRヘアピンの非オーバーラップ領域と相補的な分割イニシエータープローブの性能比較

図24のゲル試験では、HCRヘアピンH1のオーバーラップ領域と相補的な分割イニシエータープローブ(例えば、図21)と、HCRヘアピンH1の非オーバーラップ領域と相補的な分割イニシエータープローブ(例えば、図7A)の性能を比較している。

10

【0558】

反応条件：それぞれ $0.6 \mu\text{M}$ のヘアピンH1およびヘアピンH2(レーン1~11)；それぞれ 6 nM のオリゴI1、P1、P2、および／または標的(レーンはゲルに対し記載された通り)；5 S S C T緩衝液；室温で一晩反応。ヘアピンH1およびヘアピンH2はAlexa647フルオロフォアで標識。レーン1：準安定なヘアピンH1およびヘアピンH2は、HCRイニシエーターI1の非存在下では、それらの速度論的にトラップされた状態からの漏出が最も少ない。レーン2：HCRイニシエーターI1存在下におけるHCRヘアピン単量体H1およびH2の増幅重合体への変換。レーン3：標的単独の存在下では、HCRヘアピン単量体H1およびH2の重合体への変換は最少である。レーン4~6、8~10：HCRヘアピンH1の非オーバーラップ領域(レーン4~6)またはオーバーラップ領域(レーン8~10)と相補的な分割イニシエータープローブを用いた場合、プローブP1、プローブP2、または両プローブP1およびP2の存在下での、HCRヘアピン単量体H1およびH2の重合体への変換は最少であり、能動的バックグラウンド抑制が示されている。レーン7および11：標的、並びにHCRヘアピンH1の非オーバーラップ領域(レーン7)またはオーバーラップ領域(レーン11)と相補的なP1およびP2の両プローブの存在下での、ヘアピンH1およびヘアピンH2の重合体への変換。

20

【0559】

重合体バンドの定量化

MATLAB(登録商標)を用いて、レーン1~11の重合体バンド周囲のAlexa647強度プロファイルを算出した。ピーク値を0として中央に置き、ゲル移動距離 $\pm 3.3 \text{ mm}$ の各強度プロファイルを示している。MATLAB(登録商標)を用いて、シグナルおよびバックグラウンドの自動検出により、定量化されたパーセンテージを算出し；算出値をレーン2の測定値に対して正規化した。

30

【0560】

これらの結果から、標的、並びにHCRヘアピンH1のオーバーラップ領域と相補的なプローブP1およびP2の存在下でのヘアピンH1およびヘアピンH2の重合体への変換(レーン11；重合体に85.6%変換)が、HCRヘアピンH1の非オーバーラップ領域と相補的なプローブP1およびP2の場合(レーン7；重合体に54.7%変換)よりも、強力であることが明らかとなった。分割イニシエータープローブの能動バックグラウンド抑制特性は、両方のプローブタイプで同等である。

40

【0561】

実施例7：補助鎖を用いたHCR増幅重合体からのHCRヘアピンの脱ハイブリダイゼーション

図25Aは、補助鎖を用いたHCR増幅重合体からのHCRヘアピンの脱ハイブリダイゼーション(例えば、図23F参照)のインビトロ検証を示している。反応条件：それぞれ $0.6 \mu\text{M}$ のヘアピンH1およびヘアピンH2(レーン1~5)； $0.6 \mu\text{M}$ (レーン2)、 60 nM (レーン3)、および 6 nM (レーン4および5)のHCRイニシエーターI1； $6 \mu\text{M}$ (レーン5)の補助鎖；5 S S C T緩衝液；室温で一晩HCR増幅；室温で1時間補助鎖とインキュベーション。ヘアピンH1およびヘアピンH2はAlexa

50

6 4 7フルオロフォアで標識。レーン1：準安定なヘアピンH1およびヘアピンH2は、HCRイニシエーターI1の非存在下では漏出が最も少ない。レーン2：等モルのHCRイニシエーターI1濃度での短いHCR増幅重合体の形成。レーン3および4：より低いHCRイニシエーター濃度でのより長いHCR増幅重合体の形成。レーン5：補助鎖を用いたHCR増幅重合体からのヘアピンの脱ハイブリダイゼーションにより、H1、H2、および補助鎖からなる重合体断片が得られた。

【0562】

HCR増幅重合体からのHCRヘアピンの脱ハイブリダイゼーション（例えば、図25A）に使用された配列のいくつかの実施形態を下記の表2に示す。これらの配列は本明細書における方法のいずれの実施形態にも使用することができる。

【0563】

【表2】

表2

補助鎖核形成用の トーホールドを含む ヘアピンH1	5' — CGGGTTAAAGTTGAGTGGAGATATAGAGG CAGGGACAAAGTCTAATCCGTCCCTGCCT CTATATCTCCACTCTATCAT—3'（配列番号1）
ヘアピンH2	5' — GTCCCTGCCTCTATATCTCCACTCAACTT TAACCCGGAGTGGAGATATAGAGGCAGGG ACGGATTAGACTTT—3'（配列番号2）
イニシエーターI1	5' — GTCCCTGCCTCTATATCTCCACTCAACTT TAACCCG—3'（配列番号3）
補助鎖	5' — ATGATAGAGTGGAGATATAGAGGCAGGGA CGGATTAGACTTT—3'（配列番号4）

【0564】

図25Bでは、反復レポーター検出（図23Fおよび図26Gを参照）を用いたスライド上のFFPE培養ヒト細胞（HEK293）ペレットにおける3種の標的mRNAのイメージングが示された。標的mRNA：GAPDH、ACTB、U6。プローブセットは、3種全ての標的の場合で、検出段階で同時に導入した。第1ラウンドの増幅では、スペクトラル的に異なるフルオロフォアで標識されたアンプリファイア（GAPDHの場合はレポーター1（Alexa647）で標識されたアンプリファイア1、ACTBの場合はレポーター2（Alexa546）で標識されたアンプリファイア2）を用いて、GAPDHおよびACTBのみが検出された。GAPDHに使用されたアンプリファイア1のみ

が、補助鎖の核形成のためのトーホールドを含んでいた。画像取得後、試料をアンプリファイア1補助鎖と室温で1時間インキュベーションして、Alexa647標識ヘアピンをGAPDH mRNAに係留された増幅重合体から脱ハイブリダイズし；得られた重合体断片を試料から洗浄した。第2ラウンドの増幅では、GAPDHと同じレポーターで標識された異なるHCRアンプリファイア（レポーター1（Alexa647）で標識されたアンプリファイア3）をU6シグナル増幅に使用した。

【0565】

画像では、GAPDHに対する細胞内のレポーター1（Alexa647）シグナルが、アンプリファイア1補助鎖の添加とその後の洗浄により完全に除去されており、第2ラウンドのイメージングにおけるU6の核内のレポーター1（Alexa647）シグナルに置き換わっていることが示されている。ACTBシグナル強度（レポーター2（Alexa546）で標識されたアンプリファイア2）はイメージングのラウンド間で同等であった。

【0566】

実施例8：分割イニシエーターHCR抑制および分割イニシエーターHCR変換を増強するための協同的プローブ接続の最適化

図28は、分割イニシエーターHCR抑制（オフ状態）および分割イニシエーターHCR変換（オン状態）を増強するための協同的プローブ接続を示している。図28Aでは、分割イニシエータープローブのp1およびp2は、HCRヘアピンh1のオーバーラップ領域（h1におけるドメインuおよびドメインvと相補的なドメインu*およびドメインv*をそれぞれ含む）と相補的であることで、エネルギー的に起こりやすい高次構造への接続部の弛緩を可能にする。図28Bでは、様々なオーバーラップ度合い（u* = 0、1、または2ヌクレオチド、v* = 0、1、または2ヌクレオチド）のプローブを用いて、アガロースゲルによって、漏出（オフ状態）を定量している。個々のプローブp1またはp2によるHCR惹起を試験し（図28B左）、また、ゲルにおいて得られた重合バンドを定量化することによって（図28B右）、オフ状態の特徴付けを行っている。図28Cでは、様々なオーバーラップ度合い（u* = 0、1、または2ヌクレオチド、v* = 0、1、または2ヌクレオチド）のプローブを用いて、アガロースゲルによって、変換（オン状態）を定量している。プローブp1またはp2 + 標的によるHCR惹起を試験し（図28C左）、また、ゲルにおいて得られた重合バンドを定量化することによって（図28C右）、オン状態の特徴付けを行っている。図28における反応条件は、オフ状態の場合はそれぞれ500 nMの、オン状態の場合はそれぞれ60 nMの、ヘアピンh1およびヘアピンh2（全レーン）；0.01×ヘアピン濃度のイニシエーターi1、プローブp1およびプローブp2、並びに／またはDNA標的であった。

【0567】

様々な接続設計を試験することで、クリーンなオフ状態（分割イニシエーターHCR抑制は標準的イニシエーターHCR抑制の約0.5%である；図28Bの枠で囲った部分）と、強力なオン状態（分割イニシエーターHCR変換は標準的イニシエーターHCR変換の約99%である；図28Cの枠で囲った部分）とを有する、プローブp1およびプローブp2が得られている。これらの結果は、標準プローブ（v2.0）の分割イニシエータープローブ（v3.0）対との置き換えを、増幅後シグナルを大きく低減することなく（図28Cのレーン2とレーン6を比較）、増幅後バックグラウンドを劇的に低減する（図28Bのレーン2とレーン4およびレーン9を比較）ように設計できることを示している。このプローブ接続において、ドメイン寸法は、u* = 0ヌクレオチドおよびv* = 2ヌクレオチドであり、2ヌクレオチド分オーバーラップしているHCRヘアピンh1内の結合部位にハイブリダイズするプローブユニット内の分割イニシエーターに対応している。

【0568】

実施例9：タンパク質標的の多重免疫組織化学（IHC）HCRイメージング

図29および図30は、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）マウス脳切片におけるタンパク質標的の多重免疫組織化学（IHC）HCRイメージングを示している。

【0569】

図29は、イニシエーター標識一次抗体プローブを使用している。図29Aは、タンパク質検出段階（イニシエーター標識一次抗体プローブがタンパク質標的に結合する；洗浄）および増幅段階（イニシエーターがフルオロフォア標識HCRヘアピンの自己集合を惹起し、係留された蛍光性増幅重合体にする；洗浄）からなる2段階IHCプロトコルを示している。図29Bは、標的タンパク質の数とは無関係に同じ2段階プロトコルを使用している、多重化タイムラインを示している。図29Cは、FFPEマウス脳切片（4種の標的タンパク質：TH、GFAP、MBP、MAP2）の4チャンネル落射蛍光顕微鏡像を示しており、図29Dは、図29Dの指示領域のズームを示している。図29のアプローチには、異なるタンパク質標的に対する抗体プローブが、同時に、試料内で独立して作動するオルソゴナルなHCRイニシエーターを有する、イニシエーター標識一次抗体を用いた、高レベルの多重化を達成できるという利点がある。一次抗体を異なる生物で産生させる必要がなく、種々の標的に対する巨大な一次抗体ライブラリーを樹立する際に柔軟性を与える。

10

【0570】

図30は、未標識一次抗体プローブおよびイニシエーター標識二次抗体プローブを使用している。図30Aは、タンパク質検出段階（未標識一次抗体プローブがタンパク質標的に結合する；洗浄；イニシエーター標識二次抗体プローブが一次抗体プローブに結合する；洗浄）、および増幅段階（イニシエーターがフルオロフォア標識HCRヘアピンの自己集合を惹起し、係留された蛍光性増幅重合体にする；洗浄）からなる2段階IHCプロトコルを示している。図30Bは、標的タンパク質の数とは無関係に同じ2段階プロトコルを使用している、多重化タイムラインを示している。FFPEマウス脳切片における4重IHC。図30Cは、FFPEマウス脳切片（4種の標的タンパク質：TH、GFAP、PVAB、MBP）の4チャンネル落射蛍光顕微鏡像を示しており、図30Dは、図30Cの指示領域のズームを示している。

20

【0571】

図30のアプローチには、未標識一次抗体を改変なしで使用することができるという利点があり、異なる二次抗体が同時に試料内で独立して作動するオルソゴナルなHCRイニシエーターを有する、検証済みのイニシエーター標識二次抗体ライブラリーを使用することができるようになる。このアプローチでは、1種類のためのイニシエーター標識二次抗体が各一次抗体を検出するように、一次抗体は異なる生物で産生されなければならない。

30

【0572】

実施例10：HCR IHCによる細胞内解像度でのタンパク質発現の定量分析

図41は、HCR IHCが、解剖学的背景において、細胞内解像度でのタンパク質発現の定量分析を可能にすることを示している。各標的タンパク質は、それぞれ別々のスペクトラル的に異なるHCRアンプリファイアを惹起する2つのイニシエーター標識一次抗体プローブを用いて冗長検出された。正規化されたボクセル強度の2チャンネル散布図をプロットしたところ、およそ0の切片を有するタイトな直線関係が得られ、HCRシグナルがイメージングボクセル当たりの標的タンパク質の数に比例して変化することが示された。

40

【0573】

図41Aは、標的タンパク質の2チャンネル冗長検出を示している。オルソゴナルなスペクトラル的に異なるHCRアンプリファイアをそれぞれ惹起する、異なるエピトープと結合する2つのイニシエーター標識一次抗体プローブを用いて、標的タンパク質を検出している（Ch1：Alexa546、Ch2：Alexa647）。図41Bは、FFPEマウス脳切片の落射蛍光顕微鏡像を示している。図41Cは、図41Bの四角で囲った領域内の細胞内の $2 \times 2 \mu\text{m}$ ボクセルにおける、正規化後のシグナルの高度な相関（ピアソン相関係数、 r ）を示している。この散布図では、正確度は0切片の直線性に対応しており、精度は直線周囲の散乱に対応している。 $2 \times 2 \mu\text{m}$ ボクセルによって細胞内解像度を得られた。

50

【0574】

これらの結果は、HCR IHCが、解剖学的背景において、細胞内解像度でのタンパク質発現の、正確度と精度が高い相対的定量化を可能にすることを示している。

【0575】

実施例11：全てのmRNA標的およびタンパク質標的に対する同時のHCRシグナル増幅を含む多重化HCR RNA-ISHおよび多重化HCR IHC

図31および図32は、全てのmRNA標的およびタンパク質標的に対する同時のHCRシグナル増幅を含む多重化HCR RNA-ISHおよび多重化HCR IHCを示している。

【0576】

図31は、イニシエーター標識一次抗体プローブおよび分割イニシエーターDNAプローブを用いた多重HCR IHC+多重RNA-ISHを示している。図31Aは、タンパク質検出段階（イニシエーター標識一次抗体プローブはタンパク質標的と結合する；洗浄）、RNA検出段階（分割イニシエーターDNAプローブがRNA標的と結合する；洗浄）、および増幅段階（イニシエーターがフルオロフォア標識HCRヘアピンの自己集合を惹起し、係留された蛍光性増幅重合体にする；洗浄）からなる3段階のIHC+ISHプロトコルを示している。標的タンパク質および標的RNAの数にかかわらず、同じ3段階プロトコルが使用される。図31Bは、FFPEマウス脳切片の4チャンネル落射蛍光顕微鏡像（2種の標的タンパク質（TH、MBP）および2種の標的mRNA（Prkca、Slc17a7））を示しており、図31Cは、図31Bの指示領域のズームを示している。

10

20

【0577】

図32は、未標識一次抗体プローブ、イニシエーター標識二次抗体プローブ、および分割イニシエーターDNAプローブを用いた、多重HCR IHC+多重RNA-ISHを示している。図32Aは、タンパク質検出段階（未標識一次抗体プローブがタンパク質標的と結合する；洗浄；イニシエーター標識二次抗体プローブが一次抗体プローブと結合する；洗浄）、RNA検出段階（分割イニシエーターDNAプローブがRNA標的と結合する；洗浄）、および増幅段階（イニシエーターがフルオロフォア標識HCRヘアピンの自己集合を惹起し、係留された蛍光性増幅重合体にする；洗浄）からなる3段階のIHC+ISHプロトコルを示している。標的タンパク質および標的RNAの数にかかわらず、同じ3段階プロトコルが使用される。図32Bは、FFPEマウス脳切片の4チャンネル落射蛍光顕微鏡像（2種の標的タンパク質（TH、MBP）および2種の標的mRNA（Prkca、Slc17a7））を示しており、図32Cは、図32Bの指示領域のズームを示している。

30

【0578】

実施例12：HCR媒介性CARD RNA-ISH

図37は、FFPEマウス肝臓切片およびFFPEマウス腎臓切片におけるHCR媒介性CARD RNA-ISHを示している。図37Aは、HCR媒介性CARD RNA-ISHプロトコルを要約している模式図を示しており、2つのHCR分割イニシエータープローブをそれぞれ含む複数のプローブユニットを含むプローブセットを用いたRNA標的の検出、ハプテンとしてフルオロフォアであるAlexa488で標識されたヘアピンh1およびヘアピンh2を用いたHCRシグナル増幅、重合体HRP酵素で標識された抗Alexa488抗体を用いたハプテンへの結合、HRPによりHCR増幅重合体の付近にレポーターとして触媒的に沈着されるCARD基質DABの供給、を含む。図37B（左パネル）は、FFPEマウス腎臓切片およびFFPEマウス肝臓切片におけるGAPDH mRNA発現の明視野顕微鏡像を示しており；プローブの非存在下では、染色は起らない（右パネル）。

40

【0579】

実施例13：イニシエーター標識プローブを用いた多重化されたマイクロRNAおよびmRNAのRNA-ISH

50

図 4 3 は、イニシエーター標識プローブを用いた多重化されたマイクロRNAおよびmRNAのRNA-ISHを示している。マイクロRNA標的は、2'OMe-RNA標的結合ドメインおよびDNAイニシエーターを含むイニシエーター標識プローブを用いて検出した(図 4 3 A)。mRNA標的は、DNA標的結合ドメインおよび2つのDNAイニシエーター(標的結合ドメインの各末端に1つずつ;図 4 3 A)を含むイニシエーター標識プローブを用いて検出した。両クラスの標的RNA(マイクロRNAおよびmRNA)に対して同時にHCRシグナル増幅を行い、全載ゼブラフィッシュ胚において高いSB比を達成した。図 4 3 Bは、3種の標的マイクロRNA(miR-9、miR-96、miR-206)および1種の標的mRNA(hbae3)の発現地図を示している。胚は、受精の72時間後に固定し、共焦点顕微鏡でイメージングした(図 4 3 C)。

10

【0580】

実施例 1 4：遮蔽イニシエーター標識抗体プローブを用いたバックグラウンドの低減

図 4 5 は、全載ゼブラフィッシュ胚でのHCR IHCにおける、遮蔽をしていないイニシエーター標識抗体プローブと比較した、遮蔽イニシエーター標識抗体プローブを用いたバックグラウンドの低減を示している。いずれの場合でも、標的タンパク質のデスミンが、未標識一次抗体で検出され、この一次抗体がイニシエーター標識二次抗体(図 4 5 A)、またはイニシエーターへの塩基対合によってイニシエーターが部分的に遮蔽された遮蔽イニシエーター標識二次抗体(図 4 5 B)のいずれかと結合する。イニシエーター標識プローブと比較して、遮蔽イニシエーター標識プローブを使用すると、バックグラウンドの低減が認められ、このことは、プローブ上のイニシエーターの遮蔽が、非特異的結合を低減するために利用できることを示している。胚を、受精の27時間後に固定し、共焦点顕微鏡法でイメージングした。

20

【0581】

実施例 1 5：反復レポーター検出を用いる多重分析(方法A)(所望により、CARD、酵素非活性化、および/または反復CARDによるさらなる改変が可能である)

本実施例は、図 2 6 Aの方法を概説するものである。工程 A 1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程 A 2：上記試料を固定する；工程 A 3：所望により、上記試料を透過処理する。工程 A 4：a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ(例えば、図 3 9 A~3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A~4 2 F、および図 4 3 Aのプローブを参照)、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエータープローブ(例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7のプローブユニットを参照)をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット(例えば、図 8および図 1 6のプローブセットを参照)、のいずれかを含むプローブセットを準備する。工程 A 5：上記試料を洗浄する。工程 A 6：レポーターで標識されているHCRアンプリファイア(例えば、図 8および図 1 8のレポーター標識アンプリファイアを参照)を準備する。工程 A 7：上記試料を洗浄する；工程 A 8：上記レポーターからのシグナルを検出する。

30

【0582】

実施例 1 6：反復レポーター検出を用いる多重分析(方法B)(所望により、CARD、酵素非活性化、および/または反復CARDによるさらなる改変が可能である)

本実施例は、図 2 6 Bの方法を概説するものである。工程 B 1：最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程 B 2：所望により、上記試料を固定する。工程 B 3：所望により、上記試料を透過処理する。工程 B 4：a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ(例えば、図 3 9 A~3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A~4 2 F、および図 4 3 Aのプローブを参照)、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエータープローブ(例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7のプローブユニットを参照)をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット(例えば、図 8および図 1 6のプローブセットを参照)、のいずれかをそれぞれ含むN個のプローブセットを準備する。工程 B 5：所望により上記試料を洗浄する。工程 B 6：上記N個のプローブセットに対応するN個のHCRアンプリファイア(各々は別々のレポーターで標識されている)(例えば、図 8および図 1 8のレポーター標識HCRアンプリファイアを参照)を準備する

40

50

。工程 B 7：所望により上記試料を洗浄する。工程 B 8：上記 N 個の別々のレポーターからの N 個のシグナルを検出する。

【0583】

実施例 17：反復レポーター検出を用いる多重分析（方法 C）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復 CARD によるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図 26 C の方法を概説するものである。工程 C 1：最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程 C 2：所望により、上記試料を固定する。工程 C 3：所望により、上記試料を透過処理する。工程 C 4：a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A～39 N、図 41 A、図 42 A～42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセット（上記 N 個の標的種のうちの 1 つを標的にする）を準備する。工程 C 5：所望により上記試料を洗浄する。工程 C 6：上記準備されたプローブに対応する HCR アンプリファイア（レポーターで標識されている）（例えば、図 8 および図 18 のレポーター標識 HCR アンプリファイアを参照）を準備する。工程 C 7：所望により上記試料を洗浄する。工程 C 8：上記レポーターからのシグナルを検出する。工程 C 9：上記シグナルを上記試料から除去する（例えば、図 23 参照）。工程 C 10：所望により、N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 C 4～C 9 のうちの 1 または複数を反復する。

10

20

【0584】

実施例 18：反復レポーター検出を用いる多重分析（方法 D）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復 CARD によるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図 26 D の方法を概説するものである。工程 D 1：最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程 D 2：所望により、上記試料を固定する。工程 D 3：所望により、上記試料を透過処理する。工程 D 4：a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A～39 N、図 41 A、図 42 A～42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む M 個のプローブセット（ $M \leq N$ の場合；各々は上記 M 個の標的種のうちの 1 つを標的にする）を準備する。工程 D 5：所望により上記試料を洗浄する。工程 D 6：上記 M 個のプローブセットに対応する M 個の HCR アンプリファイア（各々は別々のレポーターで標識されている）（例えば、図 8 および図 18 のレポーター標識 HCR アンプリファイアを参照）を準備する；工程 D 7：所望により上記試料を洗浄する。工程 D 8：上記 M 個の別々のレポーターに対応する M 個のシグナルを検出する。工程 D 10：上記 M 個のシグナルを上記試料から除去する（例えば、図 23 参照）。工程 D 11：所望により、N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 4～9 のうちの 1 または複数を反復する。

30

【0585】

実施例 19：反復レポーター検出を用いる多重分析（方法 E）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復 CARD によるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図 26 E の方法を概説するものである。工程 E 1：最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程 E 2：所望により、上記試料を固定する。工程 E 3：所望により、上記試料を透過処理する。工程 E 4：a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A～39 N、図 41 A、図 42 A～42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む、N 個のプローブセット（各々

40

50

はN個の標的種のうちの1つを標的とする)を準備する。工程E5: 所望により上記試料を洗浄する。工程E6: 上記プローブセットのうちの1つに対応するHCRアンプリファイア(レポーターで標識されている)(例えば、図8および図18のレポーター標識アンプリファイアを参照)を準備する。工程E7: 所望により上記試料を洗浄する。工程E8: 上記レポーターからのシグナルを検出する。工程E9: 上記シグナルを上記試料から除去する(例えば、図23参照)。工程E10: 所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程6~9のうちの1または複数を反復する。

【0586】

実施例20: 反復レポーター検出を用いる多重分析(方法F)(所望により、CARD、酵素非活性化、および/または反復CARDによるさらなる改変が可能である)

本実施例は、図26Fの方法を概説するものである。工程F1: 最大N個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程F2: 所望により、上記試料を固定する。工程F3: 所望により、上記試料を透過処理する。工程F4: a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ(例えば、図39A~39N、図41A、図42A~42F、および図43Aのプローブを参照)、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエータープローブ(例えば、図3、図4、図5、および図17のプローブユニットを参照)をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット(例えば、図8および図16のプローブセットを参照)、のいずれかをそれぞれ含む、N個のプローブセット(各々はN個の標的種のうちの1つを標的とする)を準備する。工程F5: 所望により上記試料を洗浄する。工程F6: 上記N個のプローブセットのうちのM個に対応する、M個のHCRアンプリファイア($M \leq N$ の場合; 各々は別々のレポーターで標識されている)(例えば、図8および図18のレポーター標識アンプリファイアを参照)を準備する。工程F7: 所望により上記試料を洗浄する。工程F8: 上記M個のレポーターに対応するM個のシグナルを検出する。工程F9: 上記M個のシグナルを上記試料から除去する(例えば、図23参照)。工程F10: 所望により、N個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程6~9のうちの1または複数を反復する。

【0587】

実施例21: 反復レポーター検出を用いる多重分析(方法G)(所望により、CARD、酵素非活性化、および/または反復CARDによるさらなる改変が可能である)

本実施例は、図26Gの方法を概説するものである。工程G1: 1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程G2: 所望により、上記試料を固定する。工程G3: 所望により、上記試料を透過処理する。工程G4: a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ(例えば、図39A~39N、図41A、図42A~42F、および図43Aのプローブを参照)、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエータープローブ(例えば、図3、図4、図5、および図17のプローブユニットを参照)をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット(例えば、図8および図16のプローブセットを参照)、のいずれかをそれぞれ含む1または複数のプローブセットを準備する。工程G5: 所望により上記試料を洗浄する。工程G6: 1または複数のHCRアンプリファイア(各々は1または複数のレポーターで標識されている)(例えば、図8および図18のレポーター標識HCRアンプリファイアを参照)を準備する。工程G7: 所望により上記試料を洗浄する。工程G8: 1または複数のレポーターからの1または複数のシグナルを検出する。工程G9: 所望により、1または複数のプローブセットを上記試料から除去する。工程G10: 所望により、1または複数のHCRアンプリファイアを上記試料から除去する。工程G11: 所望により、1または複数のレポーターを上記試料から除去する。工程G12: 所望により、1または複数のシグナルを上記試料から除去する(例えば、図23参照)。工程G13: 所望により、工程2~12のいずれかを任意の順序で1回または複数回反復する。

【0588】

実施例22: 反復レポーター検出を用いる多重分析(方法H)(所望により、CARD、酵素非活性化、および/または反復CARDによるさらなる改変が可能である)

本実施例は、図 26 H の方法を概説するものである。工程 H 1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程 H 2：所望により、上記試料を固定する。工程 H 3：所望により、上記試料を透過処理する。工程 H 4：a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A ~ 39 N、図 41 A、図 42 A ~ 42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備する。工程 H 5：所望により上記試料を洗浄する。工程 H 6：基質で標識された HCR アンプリファイア（例えば、図 18 の基質標識 HCR アンプリファイアを参照）を準備する。工程 H 7：所望により上記試料を洗浄する。工程 H 8：上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図 20 の標識プローブを参照）を準備する。工程 H 9：所望により上記試料を洗浄する。工程 H 10：上記レポーターからのシグナルを検出する。

10

【0589】

実施例 23：反復レポーター検出を用いる多重分析（方法 I）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復 CARD によるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図 26 I の方法を概説するものである。工程 I 1：最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程 I 2：所望により、上記試料を固定する。工程 I 3：所望により、上記試料を透過処理する。工程 I 4：a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A ~ 39 N、図 41 A、図 42 A ~ 42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む N 個のプローブセットを準備する。工程 I 5：所望により上記試料を洗浄する。工程 I 6：上記 N 個のプローブセットに対応する、N 個の HCR アンプリファイア（各々は別々の基質で標識されている）（例えば、図 18 の基質標識 HCR アンプリファイアを参照）を準備する。工程 I 7：所望により上記試料を洗浄する。工程 I 8：上記 N 個の別々の基質に対応する N 個の標識プローブ（各々は別々のレポーターに結合している）（例えば、図 20 の標識プローブを参照）を準備する。工程 I 9：上記 N 個の別々のレポーターからの N 個のシグナルを検出する。

20

30

【0590】

実施例 24：反復レポーター検出を用いる多重分析（方法 J）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復 CARD によるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図 26 J の方法を概説するものである。工程 J 1：最大 N 個の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程 J 2：所望により、上記試料を固定する。工程 J 3：所望により、上記試料を透過処理する。工程 J 4：a) 1 または複数の HCR イニシエーター標識プローブ（例えば、図 39 A ~ 39 N、図 41 A、図 42 A ~ 42 F、および図 43 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の HCR 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 17 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 16 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む N 個のプローブセットを準備する。工程 J 5：所望により上記試料を洗浄する。工程 J 6：上記 N 個のプローブセットに対応する、N 個の HCR アンプリファイア（各々は別々の基質で標識されている）（例えば、図 18 の基質標識 HCR アンプリファイアを参照）を準備する。工程 J 7：所望により上記試料を洗浄する。工程 J 8：上記 N 個の基質のうちの M 個に対応する、M 個の標識プローブ（ $M \leq N$ の場合；各々は別々のレポーターと結合している）（例えば、図 20 の標識プローブを参照）を準備する。工程 J 9：所望により上記試料を洗浄する。工程 J 10：上記 M 個の別々のレポーターに対応する M 個のシグナルを検出する。工程 J 11：上記 M 個のシグナルを上記試料から除去する（例えば、図 23 参照）。工程 J 12：所望により、N 個全ての標的についてシグナル検出が行われるまで工程 J 8 ~ J 11 のうちの 1

40

50

または複数を反復する。

【0591】

実施例25：反復レポーター検出を用いる多重分析（方法K）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復CARDによるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図26Kの方法を概説するものである。工程K1：1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程K2：所望により、上記試料を固定する。工程K3：所望により、上記試料を透過処理する。工程K4：a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエータープローブ（例えば、図3、図4、図5、および図17のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図16のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む1または複数のプローブセットを準備する。工程K5：所望により上記試料を洗浄する。工程K6：1または複数のプローブセットに対応する1または複数のHCRアンプリファイア（各々は基質で標識されている）（例えば、図18の基質標識HCRアンプリファイアを参照）を準備する。工程K7：所望により上記試料を洗浄する。工程K8：1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々はレポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備する。工程K9：所望により上記試料を洗浄する。工程K10：1または複数のレポーターに対応する1または複数のシグナルを検出する。工程K11：1または複数のシグナルを上記試料から除去する（例えば、図23参照）。工程K12：所望により、工程K4～K11のいずれかを任意の順序で1回または複数回反復する。

【0592】

実施例26：反復レポーター検出を用いる多重分析（方法L）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復CARDによるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図26Lの方法を概説するものである。工程L1：1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程L2：所望により、上記試料を固定する。工程L3：所望により、上記試料を透過処理する。工程L4：a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエータープローブ（例えば、図3、図4、図5、および図17のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図16のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む1または複数のHCRプローブセットを準備する。工程L5：1または複数のプローブセットに対応する1または複数のHCRアンプリファイア（各々は1または複数のレポーターおよび／または1または複数の基質で標識されている）（例えば、図8および図18のHCRアンプリファイアを参照）を準備する。工程L6：所望により、1または複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々は1または複数のレポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備する。工程L7：1または複数のシグナルを検出する。工程L8：所望により上記試料を洗浄する。工程L9：所望により、1または複数のシグナルを上記試料から除去する（例えば、図23参照）。工程L10：所望により、1または複数のレポーターを上記試料から除去する。工程L11：所望により、1または複数の標識プローブを上記試料から除去する。工程L12：所望により、1または複数のHCRアンプリファイアを上記試料から除去する。工程L13：所望により、1または複数のプローブセットを上記試料から除去する。工程L14：所望により、上記工程のいずれかを任意の順序で反復する。

【0593】

実施例27：反復レポーター検出を用いる多重分析（方法M）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復CARDによるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図26Mの方法を概説するものである。工程M1：1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程M2：所望により、

上記試料を固定する。工程 M 3：所望により、上記試料を透過処理する。工程 M 4：工程 M 5～M 9 のいずれかを任意の順序で 1 回または複数回実行する。工程 M 5：a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 3 9 A～3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A～4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブ（例えば、図 3、図 4、図 5、および図 1 7 のプローブユニットを参照）をそれぞれ含む 1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照）、のいずれかをそれぞれ含む 1 または複数の H C R プローブセットを準備する。工程 M 6：1 または複数のシグナルを直接的または間接的に生成する 1 または複数の H C R アンプリファイア（例えば、図 8、図 1 8、および図 2 0 を参照）を準備する。工程 M 7：所望により上記試料を洗浄する。工程 M 8：1 または複数のシグナルを検出する。工程 M 9：所望により、1 または複数のシグナルを除去する（例えば、図 2 3 参照）。

10

【0 5 9 4】

実施例 2 8：標的分析（方法 N）（所望により、C A R D、酵素非活性化、反復 C A R D、反復レポーター検出、および／または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図 2 6 N の方法を概説するものである。工程 N 1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程 N 2：所望により、上記試料を固定する。工程 N 3：所望により、上記試料を透過処理する。工程 N 4：a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 3 9 A～3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A～4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブをそれぞれ含む、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図 2 2 のプローブユニットを参照）、1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備する。工程 N 5：所望により上記試料を洗浄する。工程 N 6：レポーターおよび／または基質で標識された H C R アンプリファイア（例えば、図 8 および図 1 8 の H C R アンプリファイアを参照）を準備する。工程 N 7：所望により上記試料を洗浄する。工程 N 8：所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図 2 0 の標識プローブを参照）を準備する。工程 N 9：所望により上記試料を洗浄する。工程 N 1 0：上記レポーターからのシグナルを検出する。

20

30

【0 5 9 5】

実施例 2 9：標的分析（方法 O）（所望により、C A R D、酵素非活性化、反復 C A R D、反復レポーター検出、および／または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図 2 6 O の方法を概説するものである。工程 O 1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程 O 2：所望により、上記試料を固定する。工程 O 3：所望により、上記試料を透過処理する。工程 O 4：a) 1 または複数の H C R イニシエーター標識プローブ（例えば、図 3 9 A～3 9 N、図 4 1 A、図 4 2 A～4 2 F、および図 4 3 A のプローブを参照）、または、b) 2 個以上の H C R 分割イニシエータープローブをそれぞれ含む、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターが H C R ヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図 2 1 のプローブユニットを参照）、1 または複数のプローブユニット（例えば、図 8 および図 1 6 のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備する。工程 O 5：所望により上記試料を洗浄する。工程 O 6：レポーターおよび／または基質で標識された H C R アンプリファイア（例えば、図 8 および図 1 8 の H C R アンプリファイアを参照）を準備する。工程 O 7：所望により上記試料を洗浄する。工程 O 8：所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図 2 0 の標識プローブを参照）を準備する。工程 O 9：所望により上記試料を洗浄する。工程 O 1 0：上記レポーターからのシグナルを検出する。

40

50

【0596】

実施例30：標的分析（方法P）（所望により、CARD、酵素非活性化、反復CARD、反復レポーター検出、および／または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図26Pの方法を概説するものである。工程P1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程P2：所望により、上記試料を固定する。工程P3：所望により、上記試料を透過処理する。工程P4：a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエータープローブをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターがHCRヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図27のプローブユニットを参照）、1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図16のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備する。工程P5：所望により上記試料を洗浄する。工程P6：レポーターおよび／または基質で標識されたHCRアンプリファイア（例えば、図8および図18のHCRアンプリファイアを参照）を準備する。工程P7：所望により上記試料を洗浄する。工程P8：所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備する。工程P9：所望により上記試料を洗浄する。工程P10：上記レポーターからのシグナルを検出する。

10

20

【0597】

実施例31：標的分析（方法Q）（所望により、CARD、酵素非活性化、反復CARD、反復レポーター検出、および／または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図26Qの方法を概説するものである。工程Q1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程Q2：所望により、上記試料を固定する。工程Q3：所望により、上記試料を透過処理する。工程Q4：a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターがHCRヘアピン上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図21のプローブユニットを参照）、1または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備する。工程Q5：所望により上記試料を洗浄する。工程Q6：レポーターおよび／または基質で標識されたHCRアンプリファイア（例えば、図8および図18のHCRアンプリファイアを参照）を準備する。工程Q7：所望により上記試料を洗浄する。工程Q8：所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備する。工程Q9：所望により上記試料を洗浄する。工程Q10：上記レポーターからのシグナルを検出する。

30

40

【0598】

実施例32：標的分析（方法R）（所望により、CARD、酵素非活性化、反復CARD、反復レポーター検出、および／または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図26Rの方法を概説するものである。工程R1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程R2：所望により、上記試料を固定する。工程R3：所望により、上記試料を透過処理する。工程R4：a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b) 2個以上のHCR分割イニシ

50

エーターをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上のオーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターがHCRヘアピン上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図22のプローブユニットを参照）、1または複数のプローブユニット、のいずれかを含むプローブセットを準備する。工程R5：所望により上記試料を洗浄する。工程R6：レポーターおよび／または基質で標識されたHCRアンプリファイア（例えば、図8および図18のHCRアンプリファイアを参照）を準備する。工程R6：所望により上記試料を洗浄する。工程R8：所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備する。工程R9：所望により上記試料を洗浄する。工程R10：上記レポーターからのシグナルを検出する。

10

【0599】

実施例33：標的分析（方法S）（所望により、CARD、酵素非活性化、反復CARD、反復レポーター検出、および／または反復シグナル除去の多重化によるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図26Sの方法を概説するものである。工程S1：標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程2：所望により、上記試料を固定する。工程S3：所望により、上記試料を透過処理する。工程S4：a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b) 2個以上のHCR分割イニシエータープローブをそれぞれ含み、各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域が上記標的上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターがHCRヘアピン上の非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図3、図4、図5、図17のプローブユニットを参照）、1または複数のプローブユニット（例えば、図8および図16のプローブセットを参照）、のいずれかを含むプローブセットを準備する。工程S5：所望により上記試料を洗浄する。工程S6：レポーターおよび／または基質で標識されたHCRアンプリファイア（例えば、図8および図18のHCRアンプリファイアを参照）を準備する。工程S7：所望により上記試料を洗浄する。工程S8：所望により、上記基質に対応する標識プローブ（レポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備する。工程S9：所望により上記試料を洗浄する。工程S10：上記レポーターからのシグナルを検出する。

20

30

【0600】

実施例34：反復レポーター検出を用いる多重分析（方法T）（所望により、CARD、酵素非活性化、および／または反復CARDによるさらなる改変が可能である）

本実施例は、図26Tの方法を概説するものである。工程T1：1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備する。工程T2：所望により、上記試料を固定する。工程T3：所望により、上記試料を透過処理する。工程T4：a) 1または複数のHCRイニシエーター標識プローブ（例えば、図39A～39N、図41A、図42A～42F、および図43Aのプローブを参照）、または、b) 各プローブユニット内のプローブ上の標的結合領域は標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターはHCRヘアピン上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている（例えば、図3、図4、図5、図17、図21、図22、図27のプローブユニットを参照）、2個以上のHCR分割イニシエーターをそれぞれ含む1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む1または複数のプローブセットを準備する。工程T5：所望により上記試料を洗浄する。工程T6：1または複数のレポーターおよび／または基質でそれぞれ標識された1または複数のHCRアンプリファイア（例えば、図8および図18のHCRアンプリファイアを参照）を準備する。工程T7：所望により上記試料を洗浄する。工程T8：所望により、1または

40

50

複数の基質に対応する1または複数の標識プローブ（各々は1または複数のレポーターに結合している）（例えば、図20の標識プローブを参照）を準備する。工程T9：所望により上記試料を洗浄する。工程T10：1または複数のレポーターからのシグナルを検出する。工程T11：所望により、1または複数のシグナルを上記試料から除去する（例えば、図23参照）。工程T12：所望により、1または複数のレポーターを上記試料から除去する。工程T13：所望により、1または複数の標識プローブを上記試料から除去する。工程T14：所望により、1または複数のアンプリファイアを上記試料から除去する。工程T15：所望により、1または複数のプローブセットを上記試料から除去する。工程T16：所望により、上記工程のいずれかを任意の順序で反復する。

【0601】

上記の発明はある特定の好ましい実施形態の観点から説明されたが、当業者には他の実施形態が明らかであろう。さらに、本明細書の開示に鑑みて、他の組み合わせ、省略、置換、および変更が当業者には明らかであろう。したがって、本発明は、好ましい実施形態の記載によって限定されることは意図しておらず、添付の特許請求の範囲を参照することによって定義されることを意図している。本明細書で引用された全ての文献は、その全体が参照によって援用される。

【0602】

本明細書に提示された説明で使用される用語は、限定的または制限的に解釈されることを意図しておらず、特に記載がない限り、本明細書に照らして当業者によって理解されるであろう通常の意味を指すものである。さらに、実施形態は、いくつかの新規な特徴を含む、それらからなる、それらから本質的になる場合があるが、そのうちの単独の1つが、望ましい属性に全責任を負うものではなく、本明細書に記載された実施形態を實踐するために不可欠であると考えられるものでもない。本明細書で使用される場合、節の見出しは、構成のみを目的としており、記述された発明の主題を何ら限定するものではない解釈すべきである。特許、特許出願、記事、書物、論文、およびインターネットウェブページを含むがこれらに限定はされない、本願に引用された、全ての文献または類似の資料は、あらゆる目的でその全体が参照によって明示的に援用される。援用された参考文献における語の定義が、本教示において提供される定義と異なるように見える場合、本教示において提供される定義を優先するものとする。わずかで実質的ではない逸脱も本明細書の本教示の範囲内であるように、本教示で論じられる温度、濃度、時間などの前に暗黙の「約」が存在することは理解されたい。

【0603】

本開示は、特定の実施形態および例に関連してのものであるが、当業者であれば、本開示が、具体的に開示された実施形態を越えて、他の代替実施形態および／または実施形態の使用、並びにそれらの明らかな修正物および均等物に及ぶことが理解されるであろう。加えて、実施形態のいくつかの変形例が示され、詳細に説明されたが、本開示の範囲内である他の修正例が、本開示に基づいて当業者には容易に明らかになるであろう。また、実施形態の特定の特徵および態様の様々な組み合わせまたは副組み合わせがなされてもよく、その場合でも、本開示の範囲内に含まれることが企図される。開示された実施形態の様々な特徴および態様は、本開示の様々な様式または実施形態を形成するために、互いに組み合わせることができ、または互いに置換することができることを理解されたい。したがって、本明細書に開示された本開示の範囲は、上述した特定の開示された実施形態によって限定されるべきではないことが意図される。

【0604】

参考文献

1. 非特許文献12
2. 非特許文献13
3. 非特許文献14
4. 非特許文献15
5. 非特許文献16

10

20

30

40

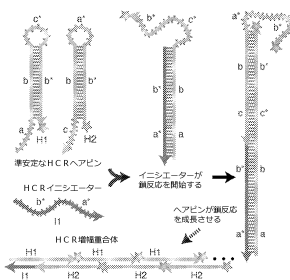
50

6 .	非特許文献 1 7	
7 .	非特許文献 1 8	
8 .	非特許文献 1 9	
9 .	非特許文献 2 0	
1 0 .	非特許文献 2 1	
1 1 .	非特許文献 2 2	
1 2 .	非特許文献 2 3	
1 3 .	非特許文献 2 4	
1 4 .	非特許文献 2 5	
1 5 .	非特許文献 2 6	10
1 6 .	非特許文献 2 7	
1 7 .	非特許文献 2 8	
1 8 .	非特許文献 2 9	
1 9 .	非特許文献 3 0	
2 0 .	非特許文献 3 1	
2 1 .	非特許文献 3 2	
2 2 .	非特許文献 3 3	
2 3 .	非特許文献 3 4	
2 4 .	非特許文献 3 5	
2 5 .	非特許文献 3 6	20
2 6 .	非特許文献 3 7	
2 7 .	非特許文献 3 8	
2 8 .	非特許文献 3 9	
2 9 .	非特許文献 4 0	
3 0 .	非特許文献 4 1	
3 1 .	非特許文献 4 2	
3 2 .	非特許文献 1	
3 3 .	非特許文献 4 3	
3 4 .	非特許文献 4 4	
3 5 .	非特許文献 4 5	30
3 6 .	非特許文献 4 6	
3 7 .	非特許文献 4 7	
3 8 .	非特許文献 4 8	
3 9 .	非特許文献 4 9	
4 0 .	非特許文献 5 0	
4 1 .	非特許文献 5 1	
4 2 .	非特許文献 5 2	
4 3 .	非特許文献 5 3	
4 4 .	非特許文献 5	
4 5 .	非特許文献 4	40
4 6 .	非特許文献 5 4	
4 7 .	非特許文献 5 5	
4 8 .	非特許文献 5 6	
4 9 .	非特許文献 5 7	
5 0 .	非特許文献 5 8	
5 1 .	非特許文献 5 9	
5 2 .	非特許文献 6 0	
5 3 .	非特許文献 6 1	
5 4 .	非特許文献 6 2	
5 5 .	非特許文献 6 3	50

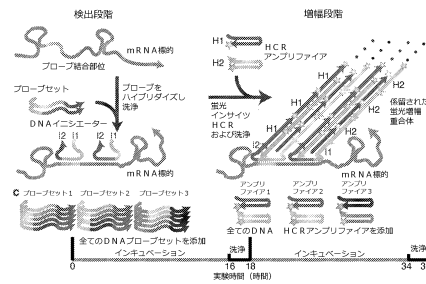
56. 非特許文献64
 57. 非特許文献65
 58. 非特許文献66

【図面】

【図1A】



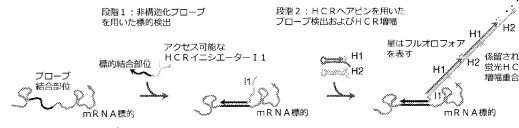
【図1B】



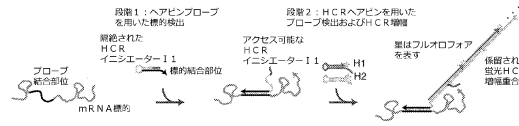
10

【図2A】

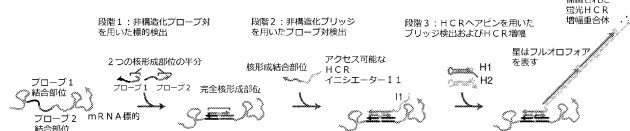
スキームA：2段階プロトコル



スキームB：2段階プロトコル



スキームC：3段階プロトコル

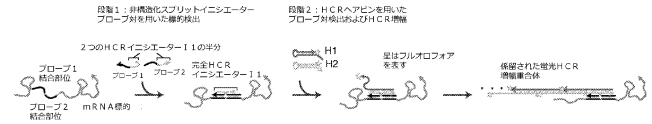


【図2B】

スキームD：3段階プロトコル



スキームE：2段階プロトコル



20

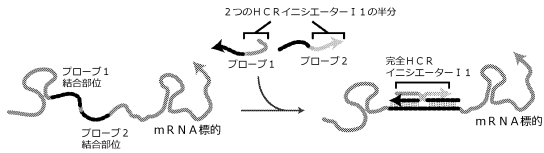
30

40

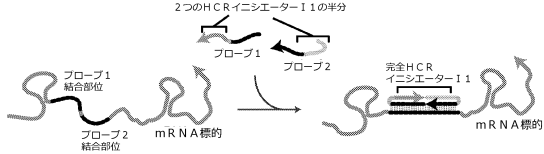
50

【図 3 A】

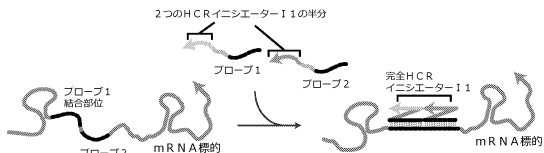
構成 1



構成 2

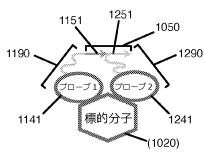


構成 3



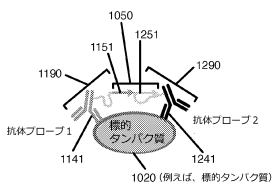
【図 4 A】

スプリットイニシエータープローブ



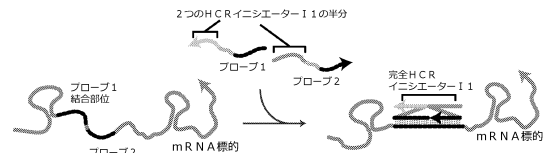
【図 4 C】

スプリットイニシエーター抗体プローブ

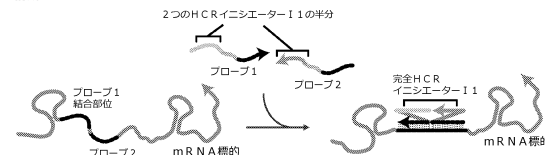


【図 3 B】

構成 4



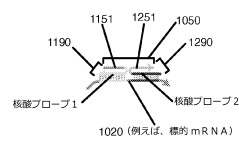
構成 5



10

【図 4 B】

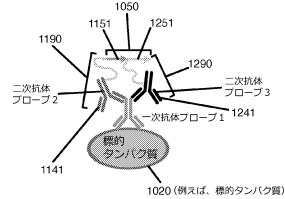
スプリットイニシエーター核酸プローブ



20

【図 4 D】

スプリットイニシエーター二次抗体プローブ



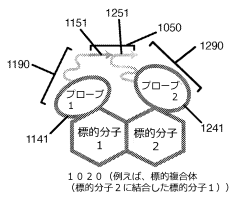
30

40

50

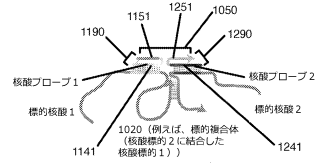
【図 5 A】

スプリットイニシエータープローブ



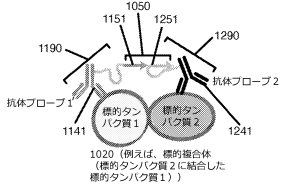
【図 5 B】

スプリットイニシエーター核酸プローブ



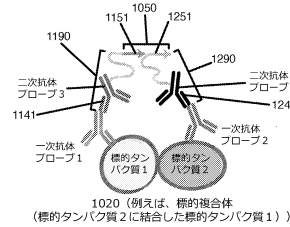
【図 5 C】

スプリットイニシエーター抗体プローブ



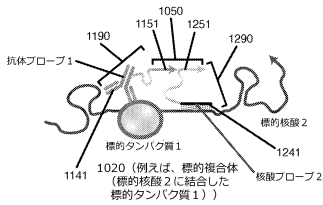
【図 5 D】

スプリットイニシエーター二次抗体プローブ



【図 5 E】

スプリットイニシエーター抗体および二次抗体プローブ

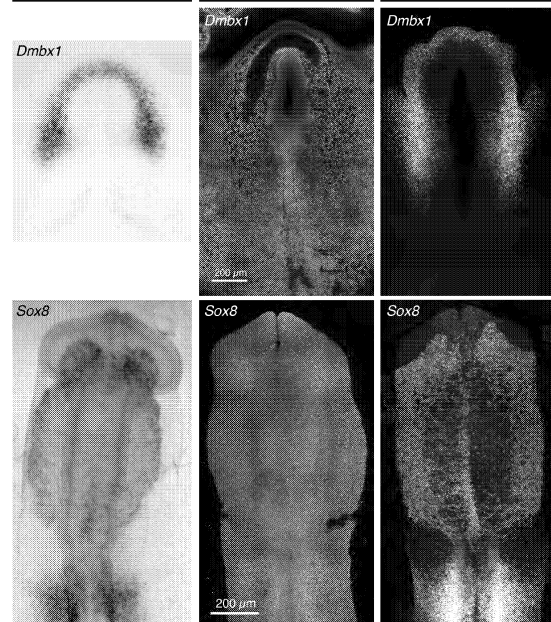


【図 6】

参照発現パターン (従来のインサートハイブリダイゼーション)

標準プローブ (スキーム A) (未最適化プローブセット)

スプリットイニシエータープローブ (スキーム E) (未最適化プローブセット)



10

20

30

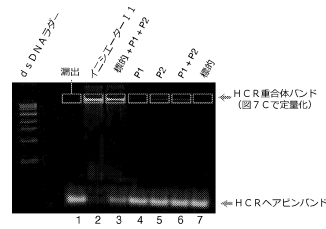
40

50

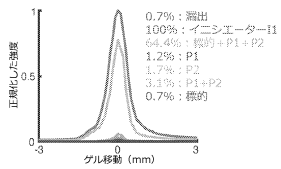
【図 7 A】



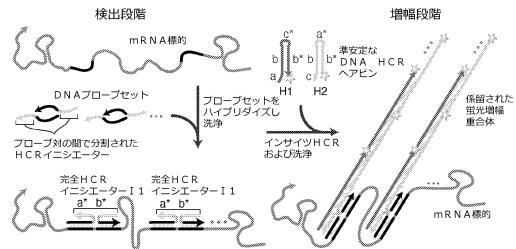
【図 7 B】



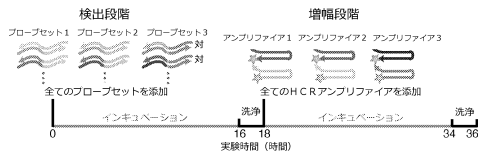
【図 7 C】



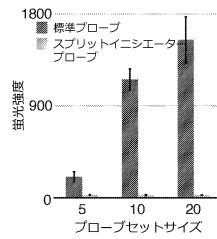
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 9 A】



10

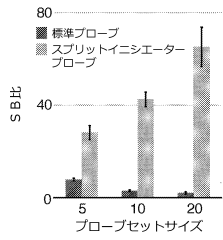
20

30

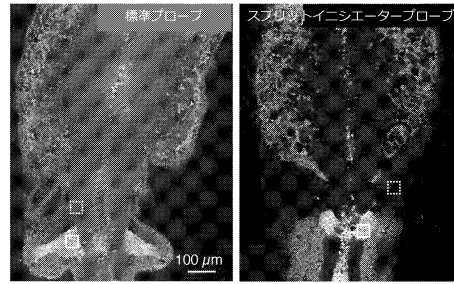
40

50

【図 9 B】

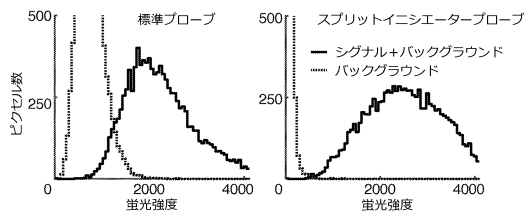


【図 9 C】

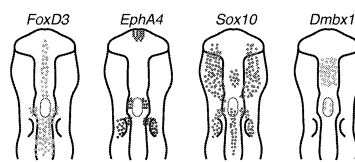


10

【図 9 D】

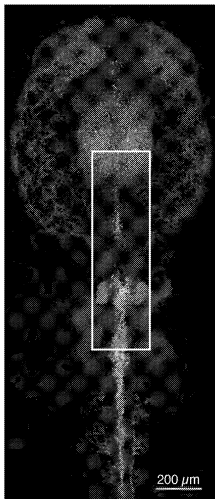


【図 10 A】

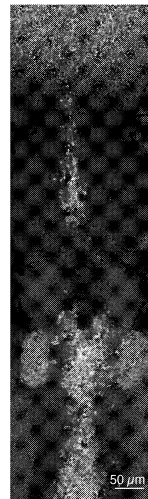


20

【図 10 B】



【図 10 C】

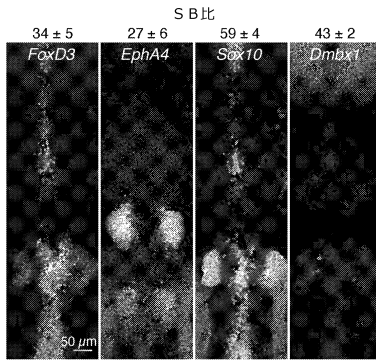


30

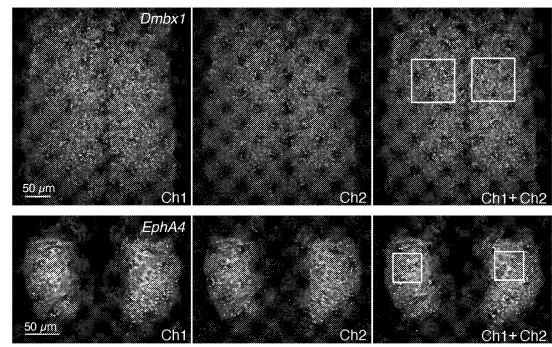
40

50

【図 10 D】

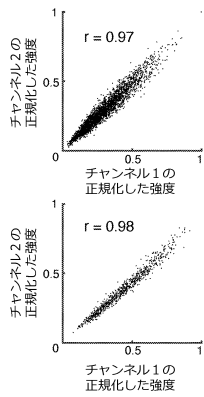


【図 11 A】

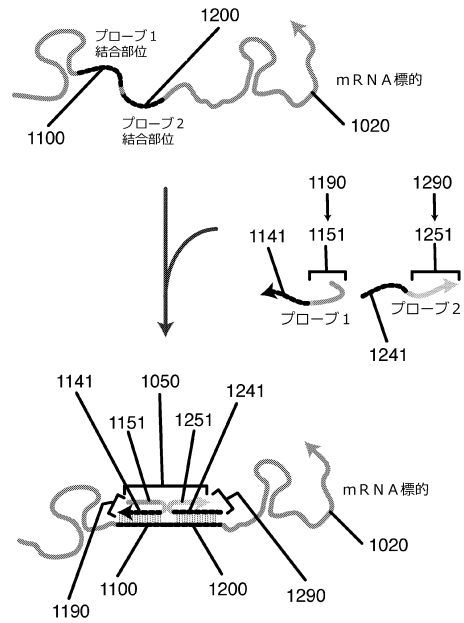


10

【図 11 B】



【図 12】



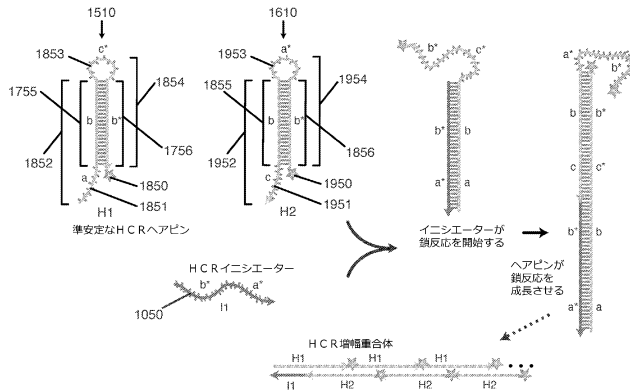
20

30

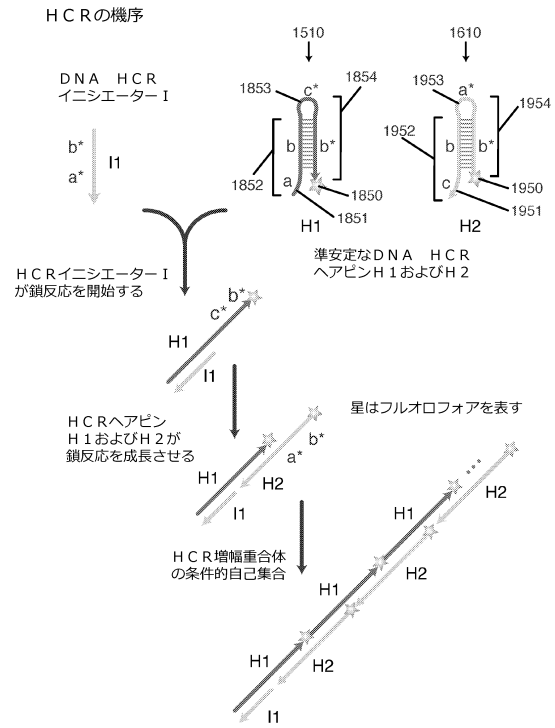
40

50

【図 13】



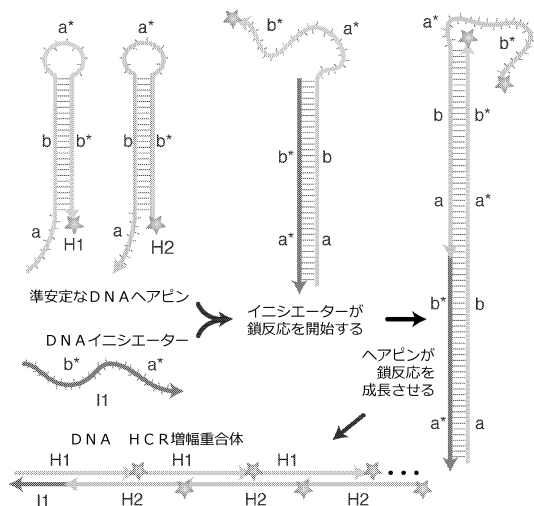
【図 14】



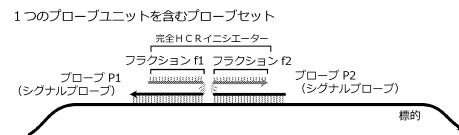
10

20

【図 15】



【図 16 A】



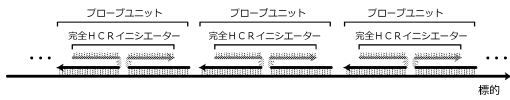
30

40

50

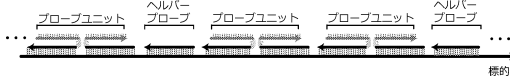
【図 16 B】

複数のプローブユニットを含むプローブセット



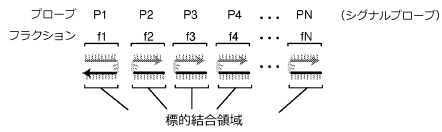
【図 16 D】

複数のプローブユニットおよびヘルパープローブを含むプローブセット



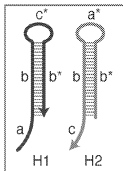
【図 17 B】

N個の分割イニシエータープローブを含むプローブユニット



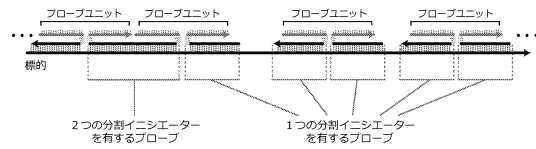
【図 18 A】

未標識HCRヘアピン



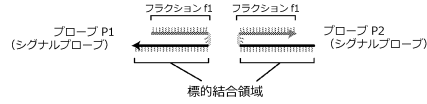
【図 16 C】

2つの分割イニシエーターを含み、2つのプローブユニットに参加するいくつかのプローブを含む複数のプローブユニットを含むプローブセット



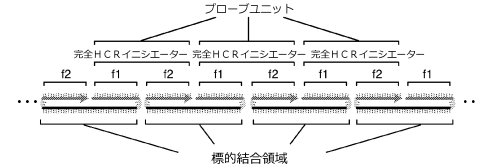
【図 17 A】

2つの分割イニシエータープローブを含むプローブユニット



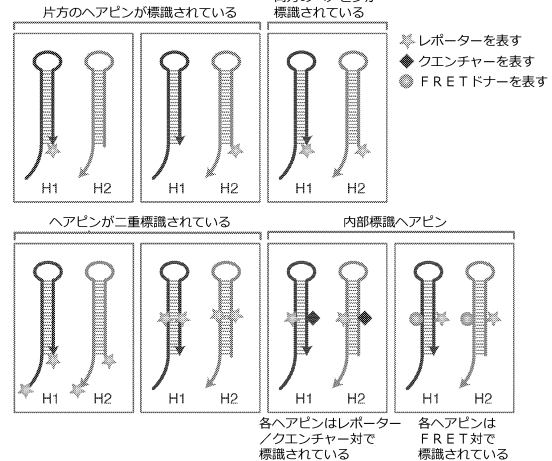
【図 17 C】

2つの分割イニシエーターを含み、2つのプローブユニットに参加するプローブ



【図 18 B】

レポーター標識HCRヘアピン



10

20

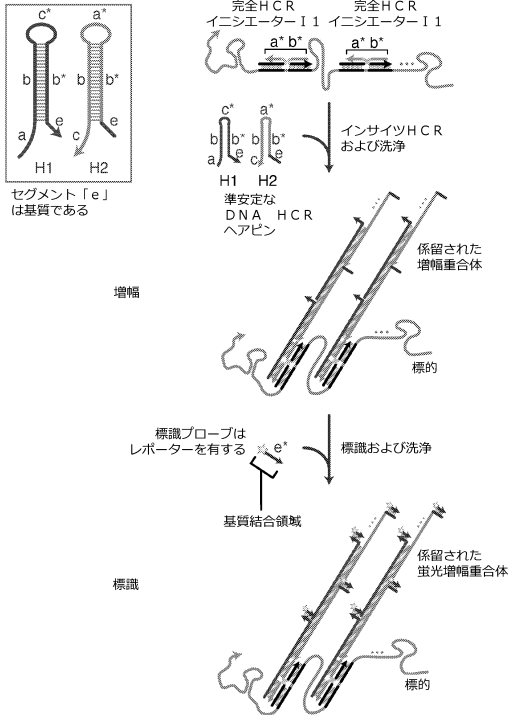
30

40

50

【図 18 C】

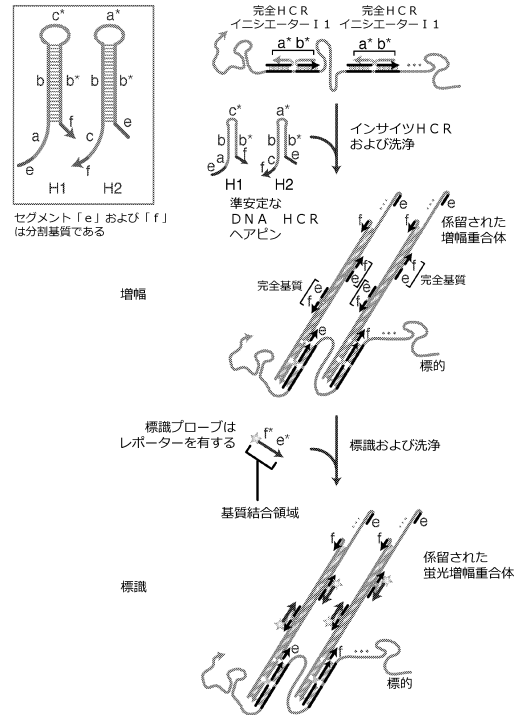
基質標識 HCR ヘアピン



10

【図 18 D】

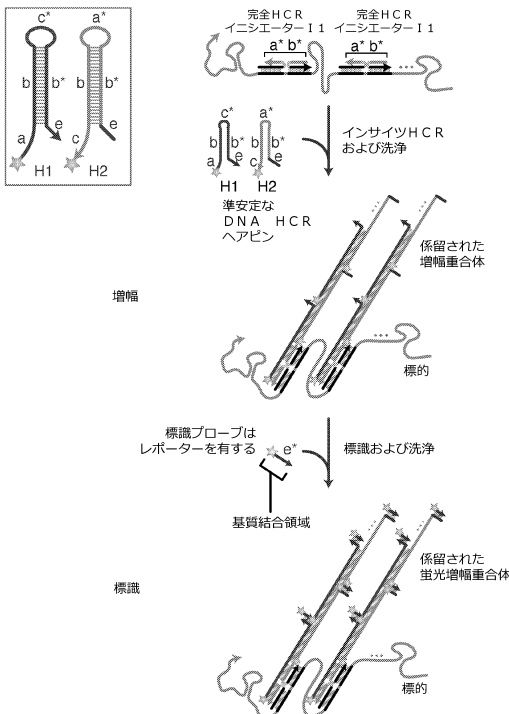
分割基質で標識された HCR ヘアピン



20

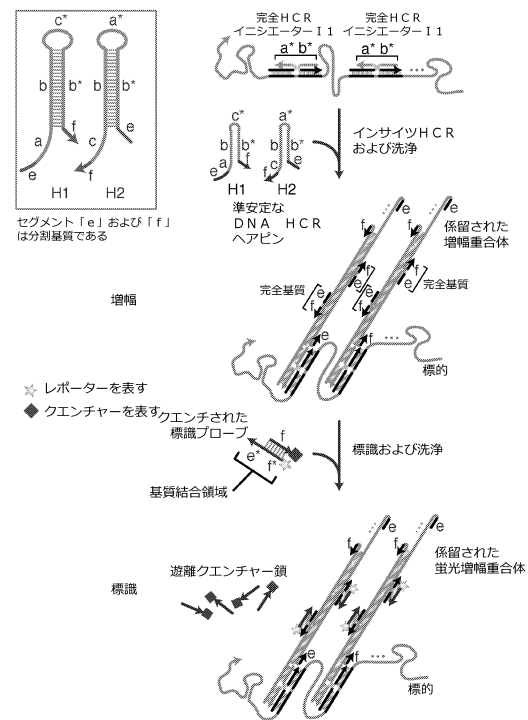
【図 18 E】

レポーターおよび基質で標識された HCR ヘアピン



30

【図 18 F】

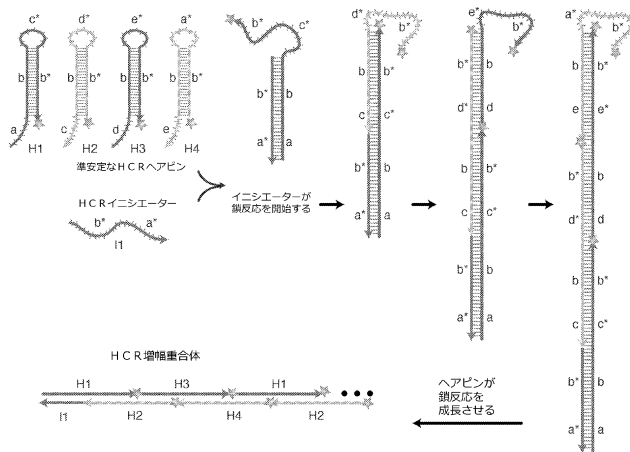
分割基質で標識された HCR ヘアピン
クエンチされた標識プローブによる無洗浄シグナル生成

40

50

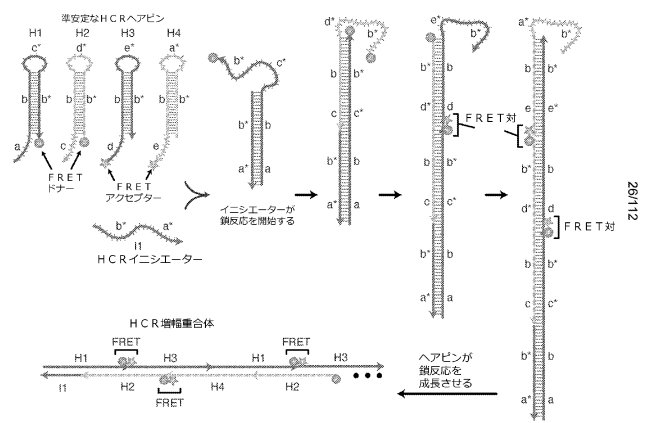
【図 19 A】

4つのレポーター標識HCRヘアピンを含むHCRアンプリファイア



【図 19 B】

FRETドナーまたはアクセプターで標識された4つのHCRヘアピンを含むHCRアンプリファイア

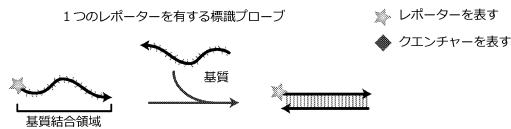


28/112

10

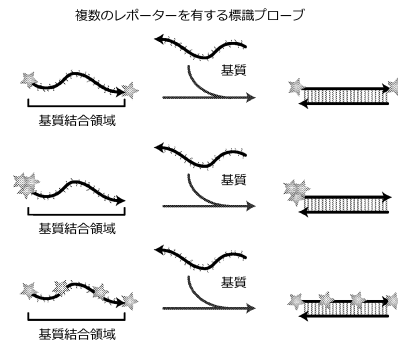
【図 20 A】

1つのレポーターを有する標識プローブ



【図 20 B】

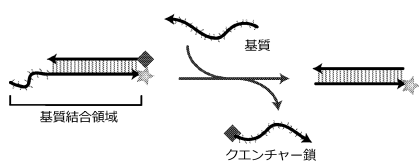
複数のレポーターを有する標識プローブ



20

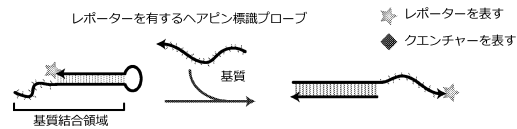
【図 20 C】

ブロッカー鎖（クエンチャーを有する）にハイブリダイズした標識鎖（レポーターを有する）を含む標識プローブ



【図 20 D】

レポーターを有するヘアピン標識プローブ



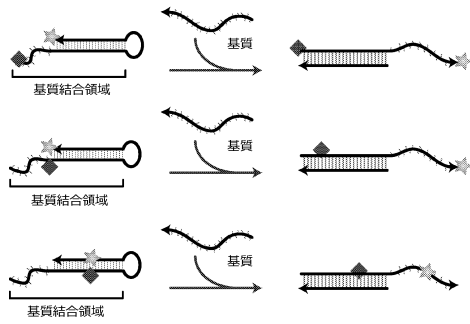
30

40

50

【図 20 E】

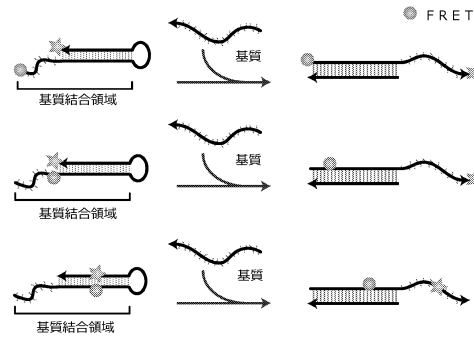
レポーターおよびクエンチャーを有するヘアピン標識プローブ



【図 20 F】

FRET対を有するヘアピン標識プローブ

★ レポーターを表す
● FRET ドナーを表す

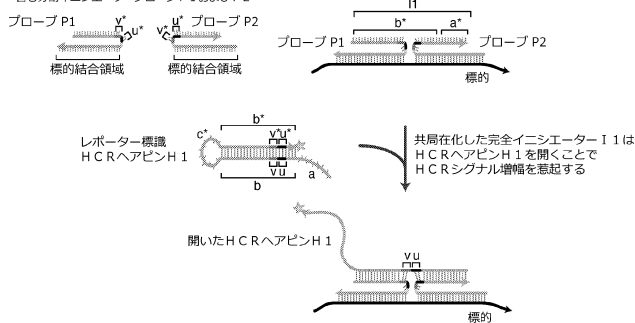


10

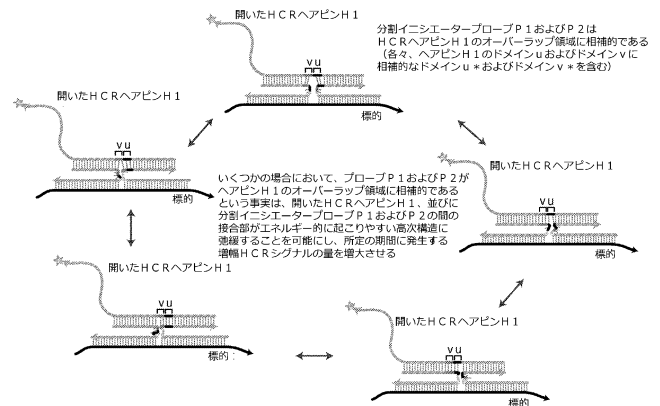
【図 21 A】

どちらのプローブも単独ではHCRヘアピンH1を開くことでHCRシグナル増幅を惹起しないように、完全HCRイニシエーターI1の一部分をそれぞれ含む分割イニシエータープローブP1およびP2

HCR分割イニシエータープローブP1およびP2は、標的との隣接する結合部位にハイブリダイズして完全HCRイニシエーターI1を共局在化させる



【図 21 B】



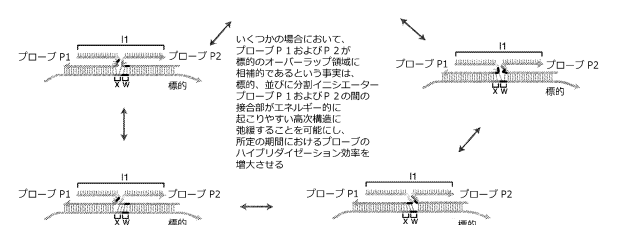
20

【図 22】

分割イニシエータープローブP1およびP2

HCR分割イニシエータープローブP1およびP2は、標的との隣接する結合部位にハイブリダイズして完全HCRイニシエーターI1を共局在化させる

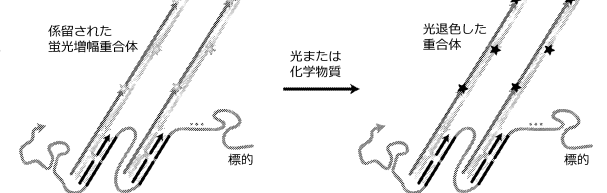
分割イニシエータープローブP1およびP2は、標的のオーバーラップ領域に相補的である(各々、標的のドメインwおよびドメインxに相補的なドメインw*およびドメインx*を含む)



【図 23 A】

レポーターを光退色する

★ 蛍光レポーター
★ 光退色したレポーター



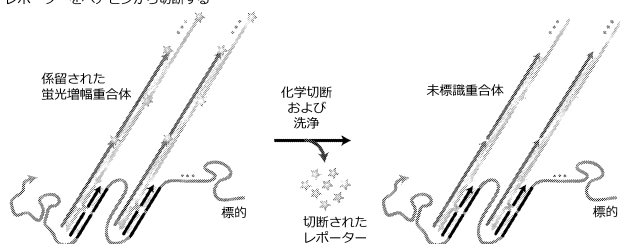
30

40

50

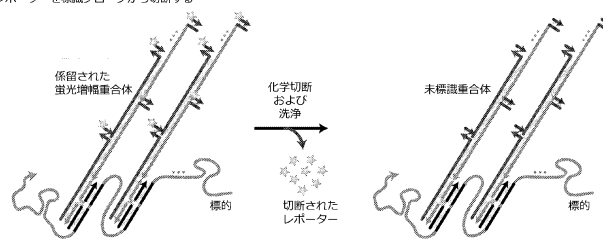
【图 23 B】

レポーターをヘアピンから切断する



【図 23 C】

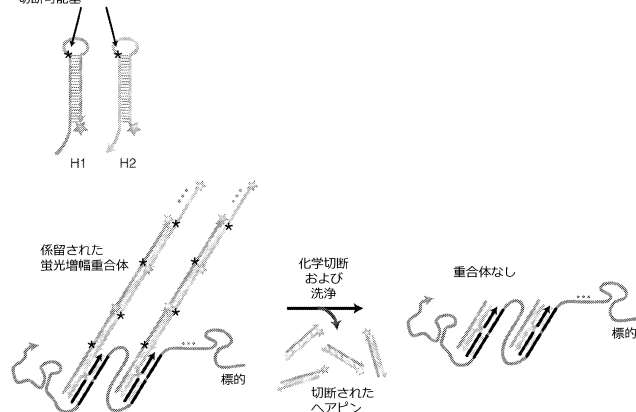
レポーターを標識プローブから切断する



【图 23 D】

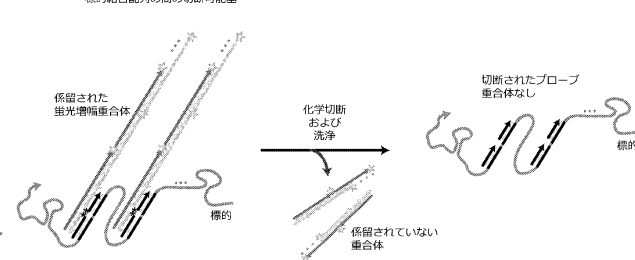
ヘアピンを切断する

核HCRへアピンのインプットドメイン
およびアウトプットドメインの間の
切断可能性



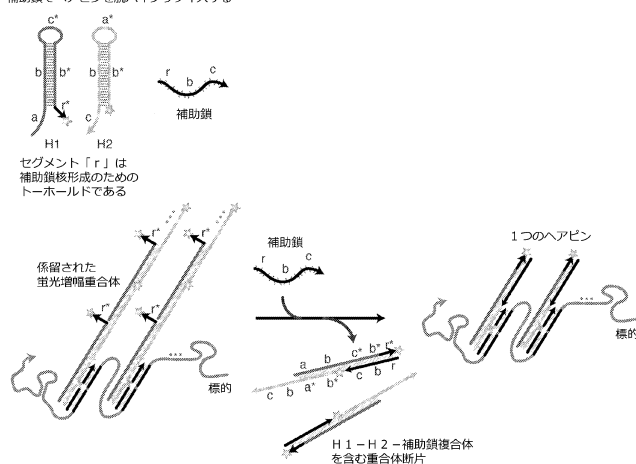
【図 23 E】

プローブを切断する



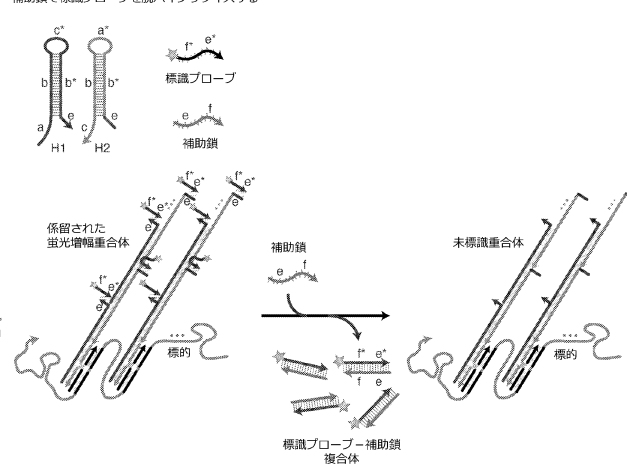
【図 23 F】

補助鎖でヘアピンを脱ハイブリダイズする



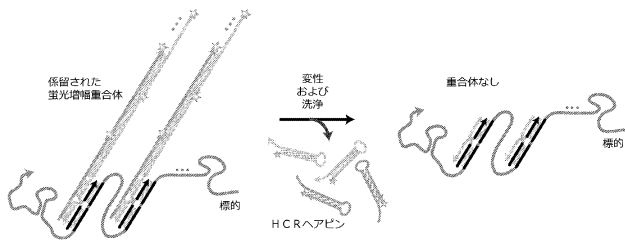
【図 23 G】

補助鎖で標識プローブを脱ハイブリダイズする



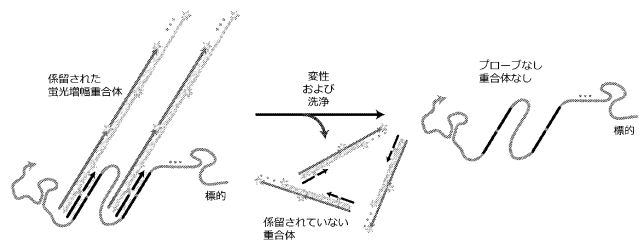
【図 23 H】

化学物質または高温で重合体からヘアピンを不安定化させる



【図 23 I】

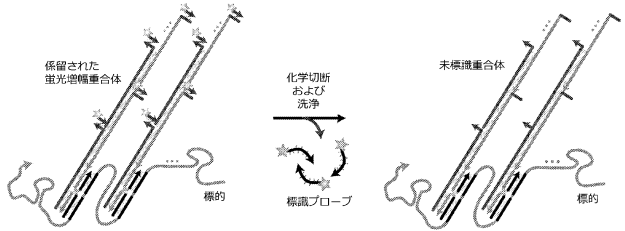
化学物質または高温で標的からプローブを不安定化させる



10

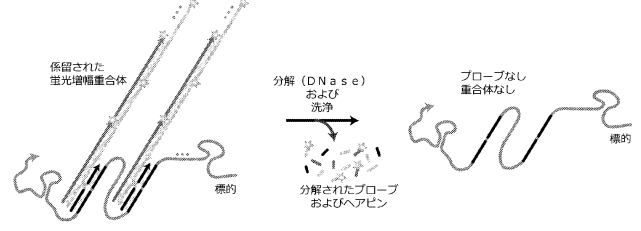
【図 23 J】

化学物質または高温で基質から標識プローブを不安定化させる



【図 23 K】

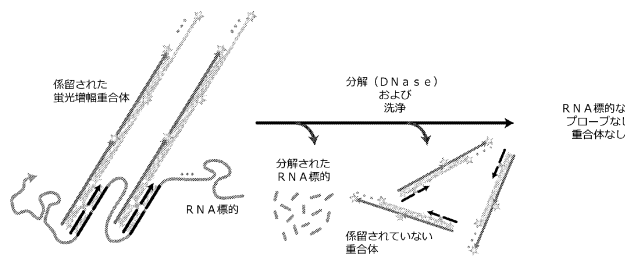
HCRプローブおよび重合体を酵素（例えば、DNase）で分解する



20

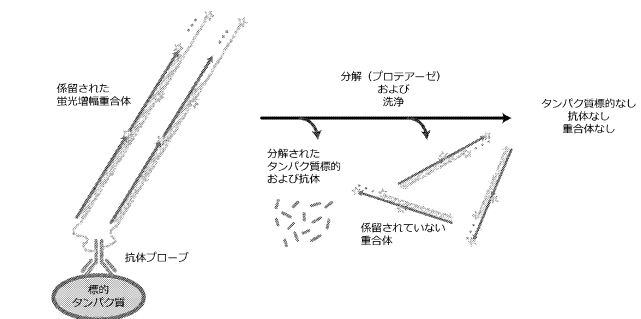
【図 23 L】

RNA標的をRNaseで分解



【図 23 M】

タンパク質標的および抗体をプロテアーゼで分解する



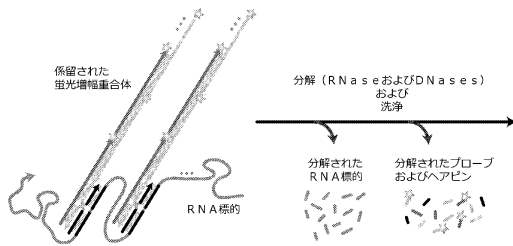
30

40

50

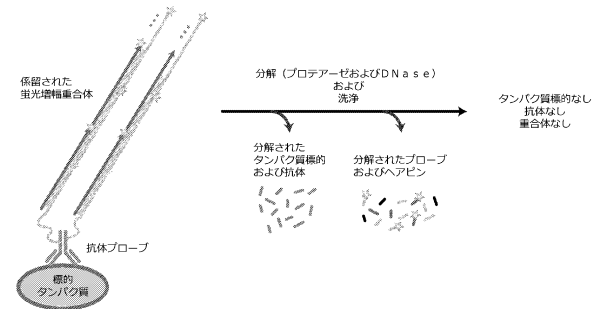
【図 2 3 N】

RNA 標的を RNase で分解し、HCR プローブおよびヘアピンを DNase で分解する



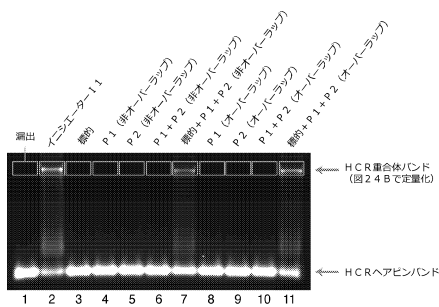
【図 2 3 O】

タンパク質標的および抗体をプロテアーゼで分解し、HCR プローブおよびヘアピンを DNase で分解する

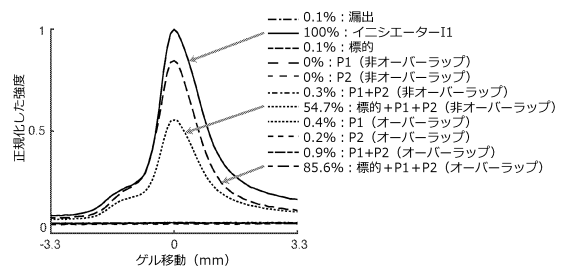


10

【図 2 4 A】

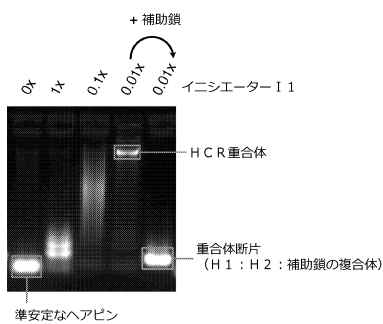


【図 2 4 B】

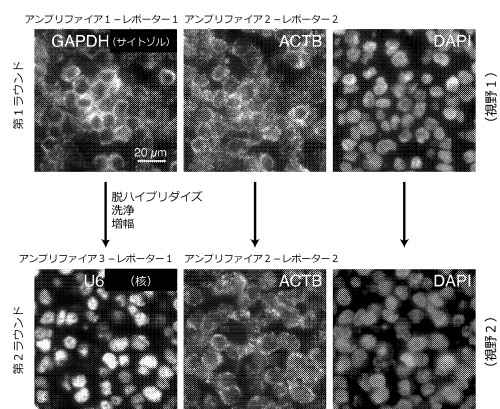


20

【図 2 5 A】



【図 2 5 B】



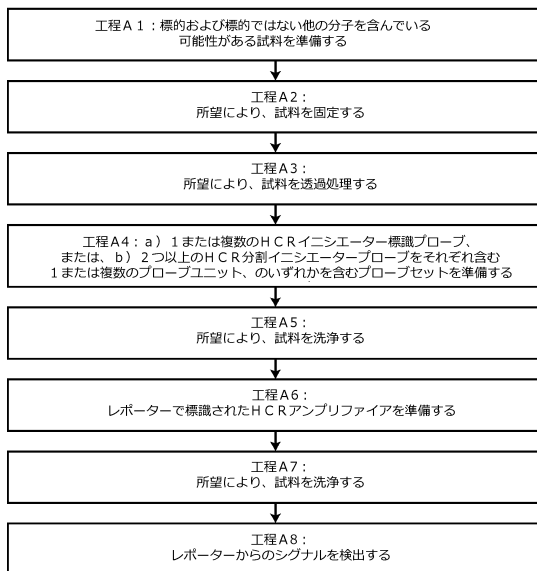
30

40

50

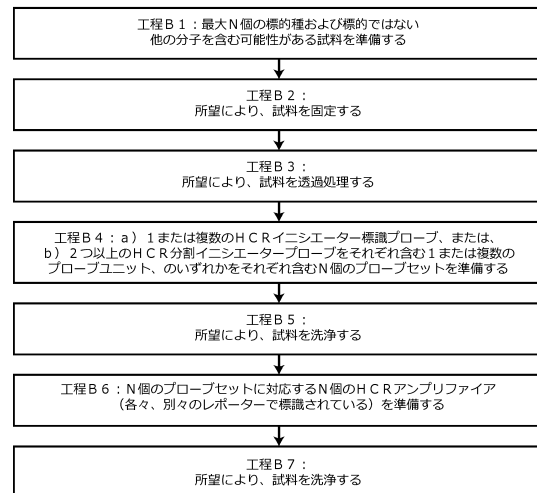
【図 26 A】

方法 A



【図 26 B】

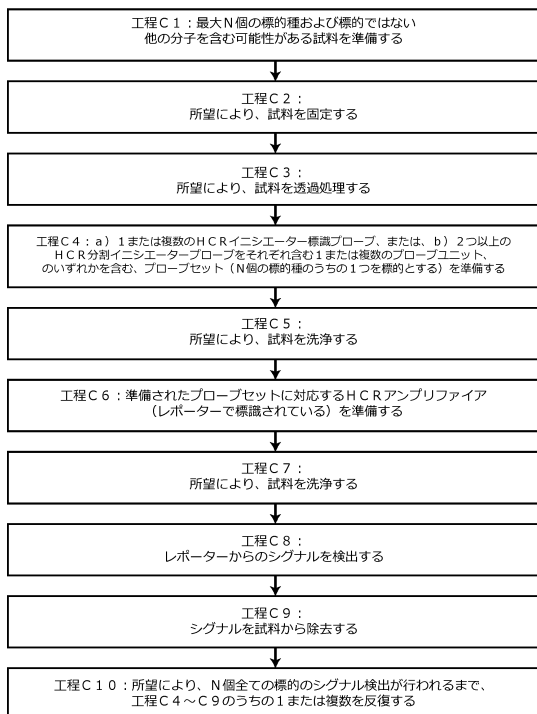
方法 B



10

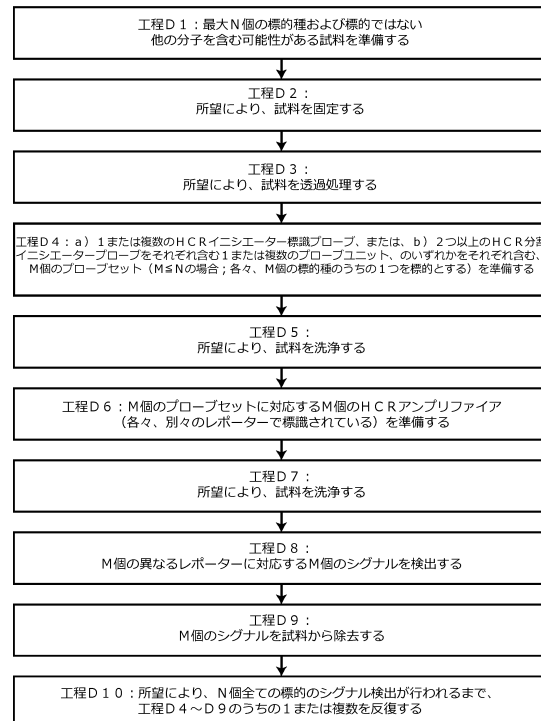
【図 26 C】

方法 C



【図 26 D】

方法 D



20

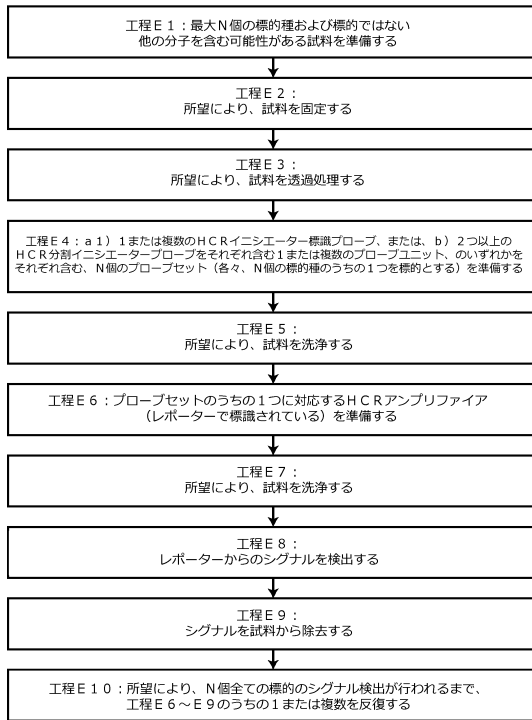
30

40

50

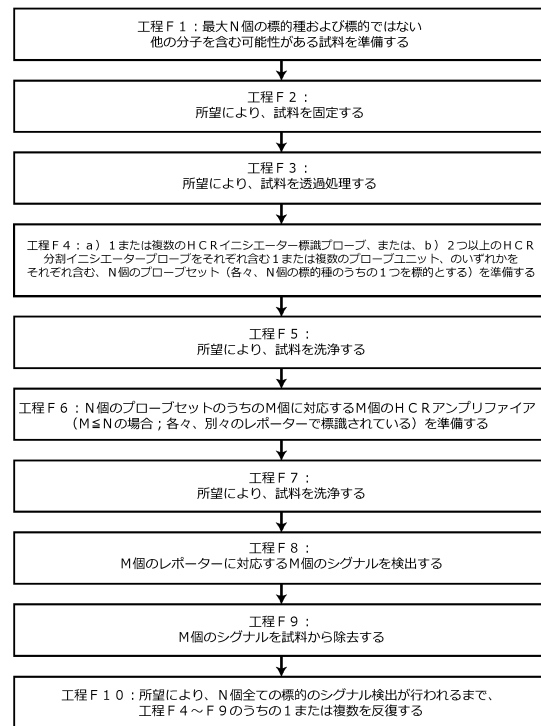
【図 26 E】

方法 E



【図 26 F】

方法 F

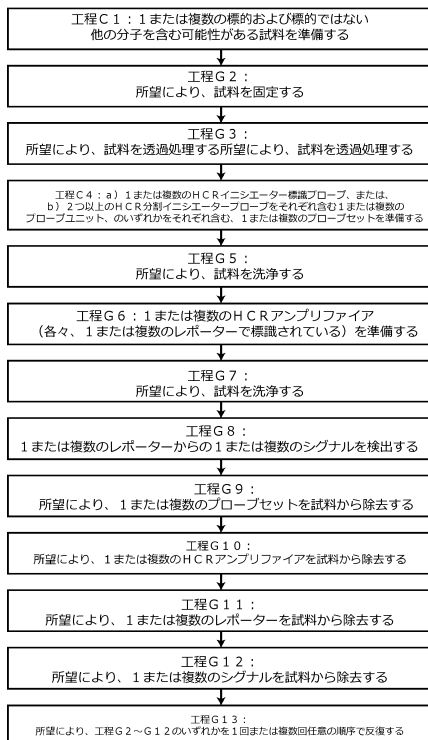


10

20

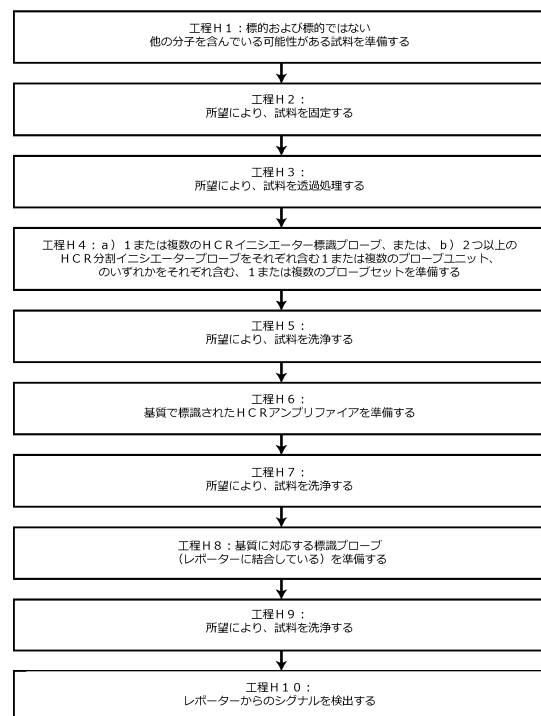
【図 26 G】

方法 G



【図 26 H】

方法 H



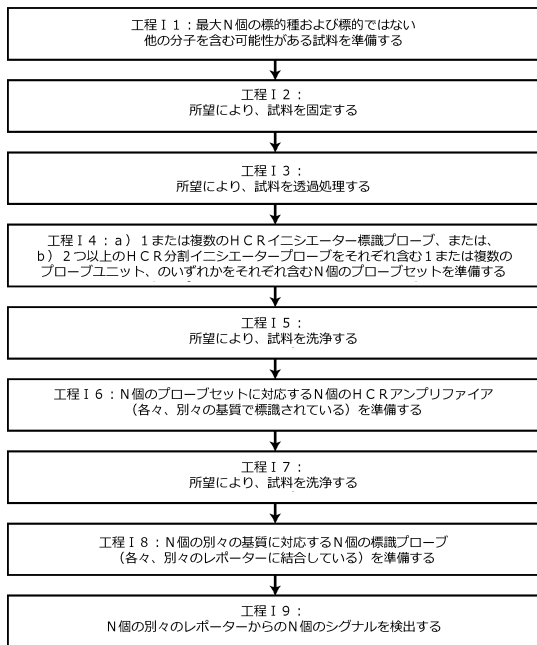
30

40

50

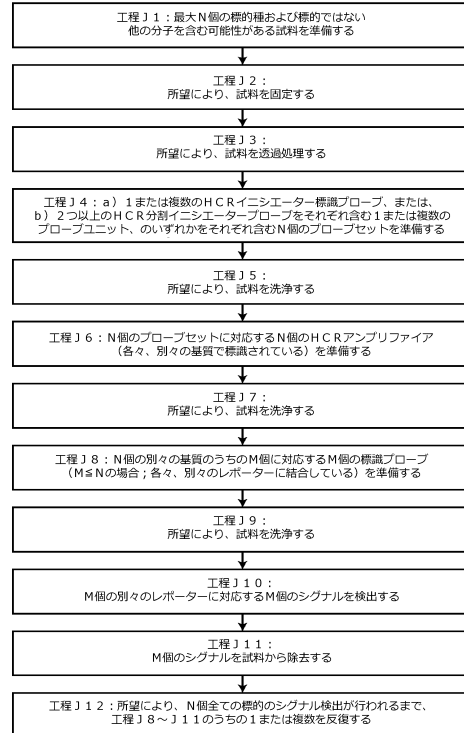
【図 26 I】

方法 I



【図 26 J】

方法 J

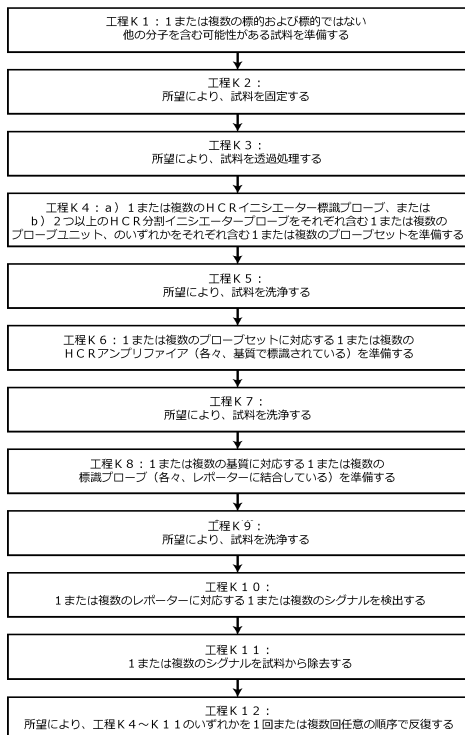


10

20

【図 26 K】

方法 K



【図 26 L】

方法 L



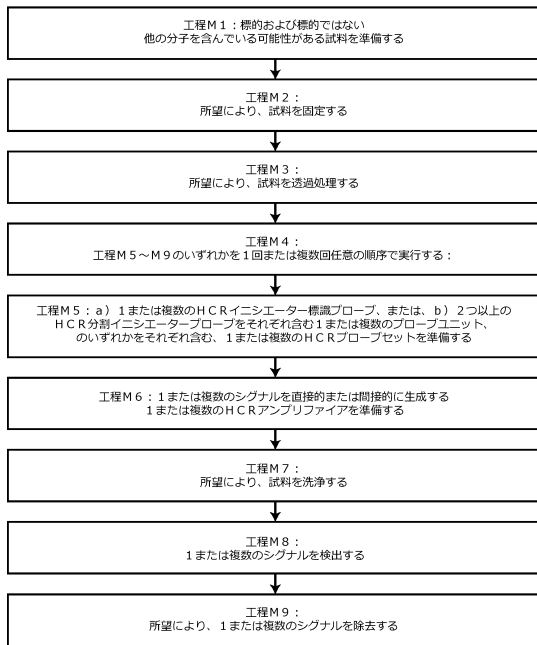
30

40

50

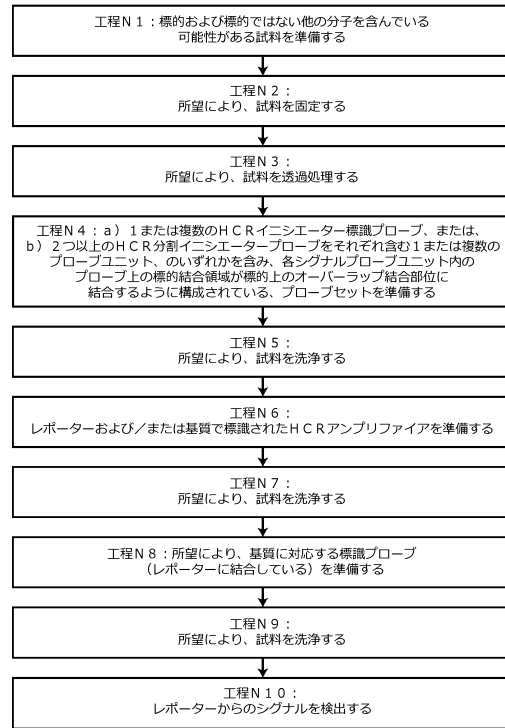
【図 26 M】

方法M



【図 26 N】

方法N

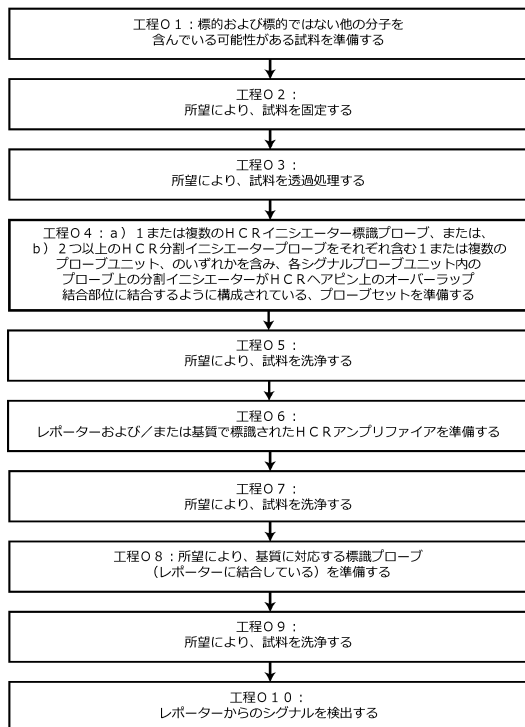


10

20

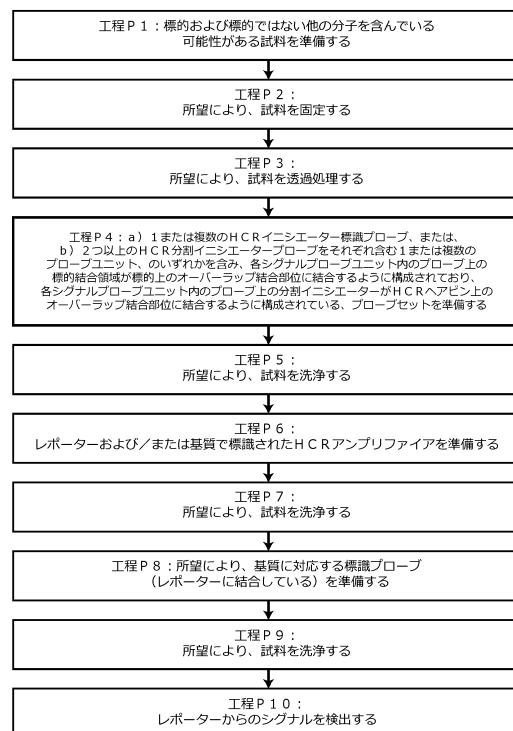
【図 26 O】

方法O



【図 26 P】

方法P



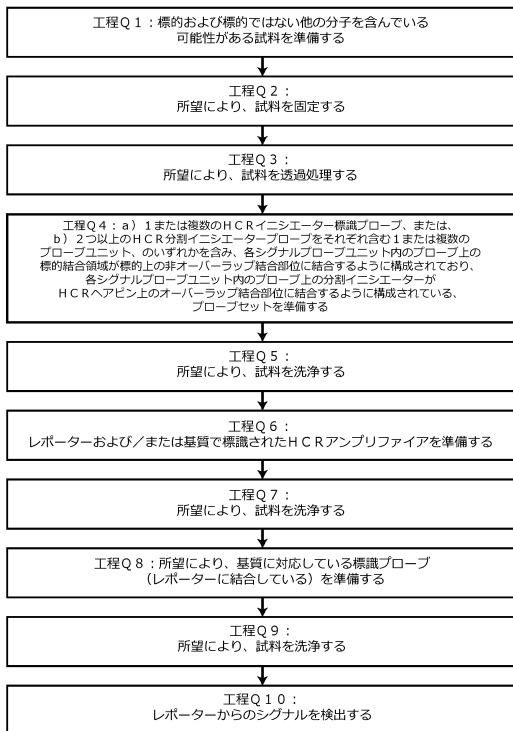
30

40

50

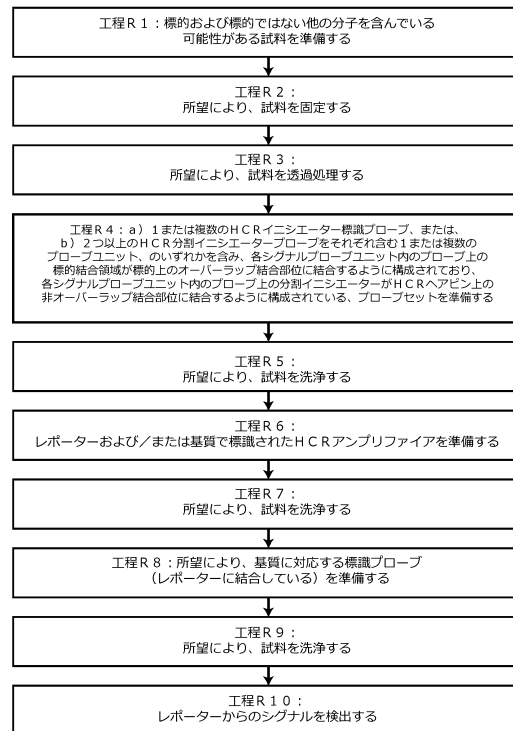
【図 26 Q】

方法 Q



【図 26 R】

方法 R

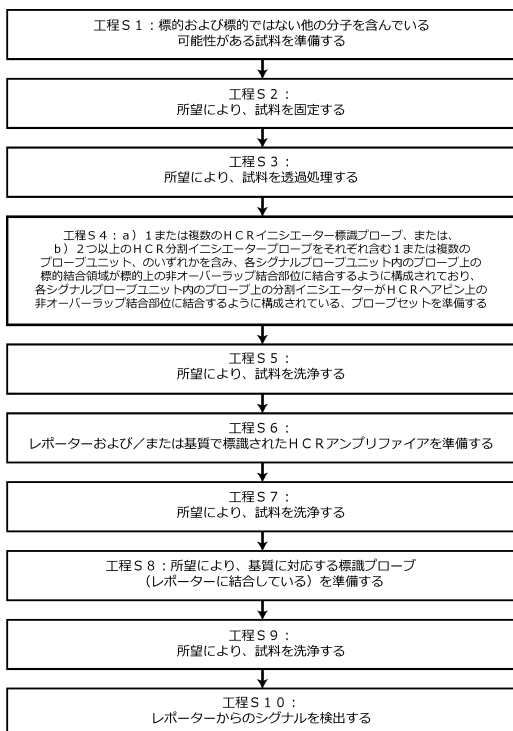


10

20

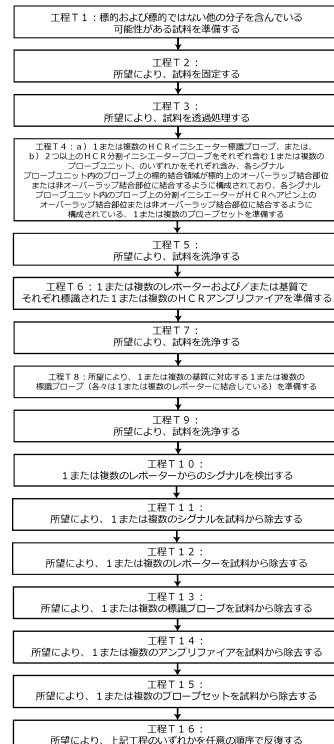
【図 26 S】

方法 S



【図 26 T】

方法 T

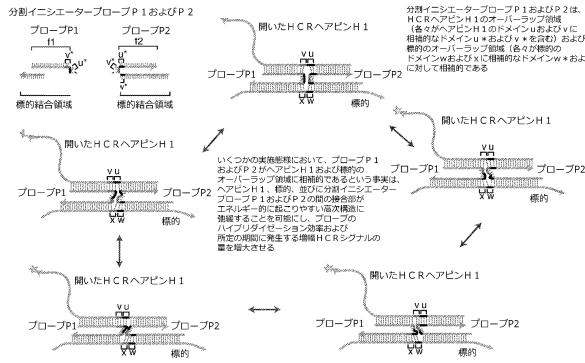


30

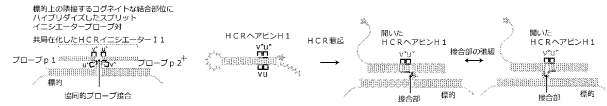
40

50

【図 27】

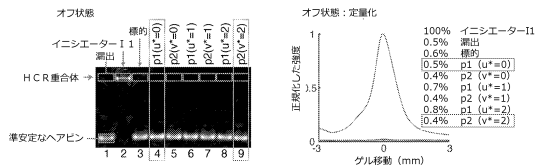


【図 28 A】

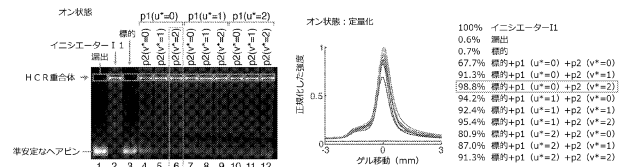


10

【図 28 B】

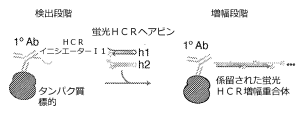


【図 28 C】



20

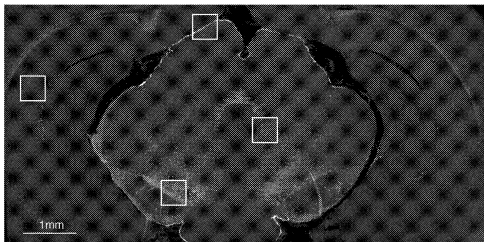
【図 29 A】



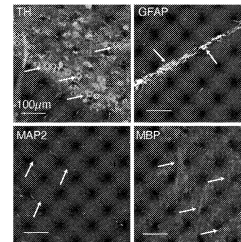
【圖 29 B】



【図 29 C】



【図 29 D】

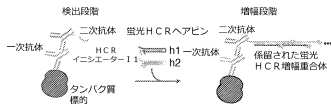


30

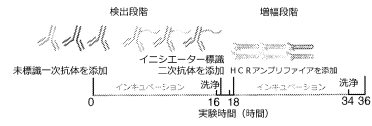
40

50

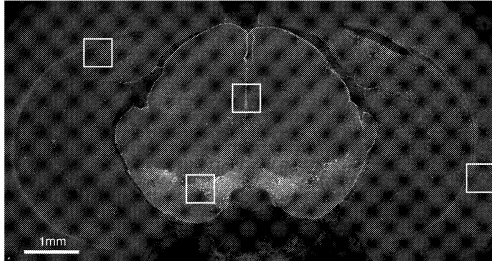
【図 30 A】



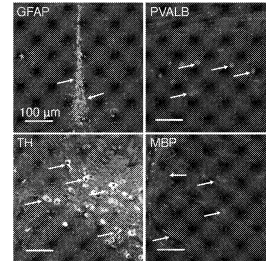
【図 30 B】



【図 30 C】

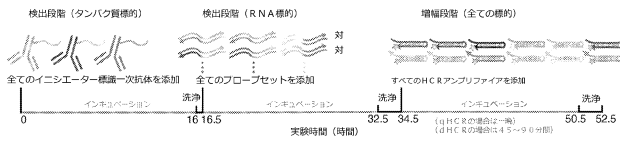


【図 30 D】

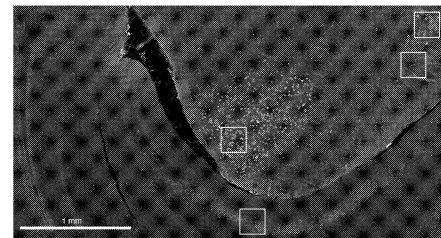


10

【図 31 A】

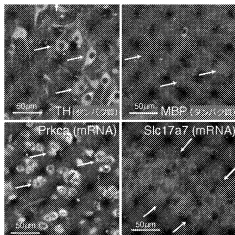


【図 31 B】

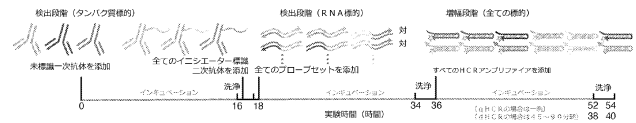


20

【図 31 C】



【図 32 A】

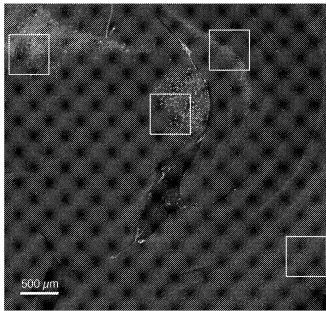


30

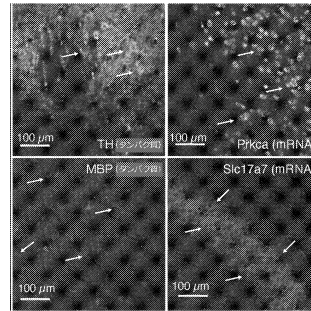
40

50

【図 3 2 B】

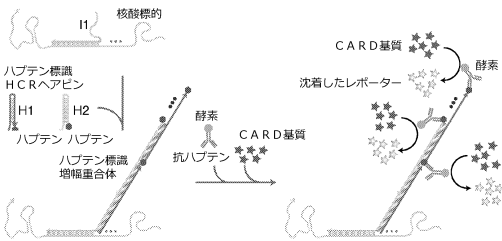


【図 3 2 C】

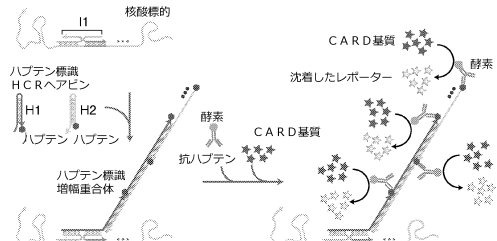


10

【図 3 3 A】

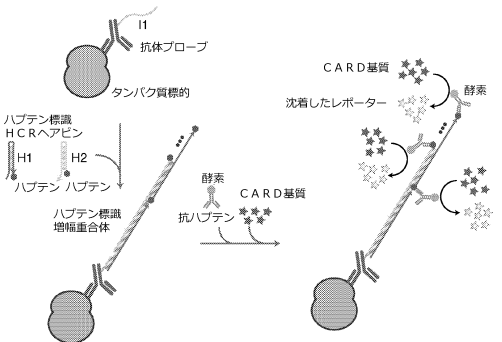


【図 3 3 B】

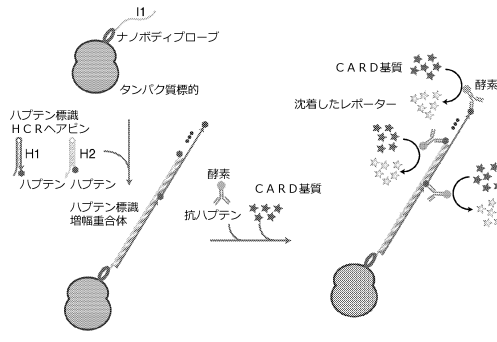


20

【図 3 3 C】



【図 3 3 D】

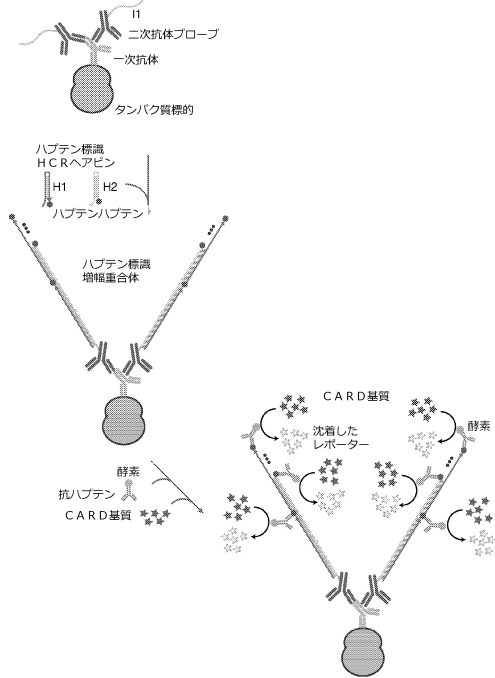


30

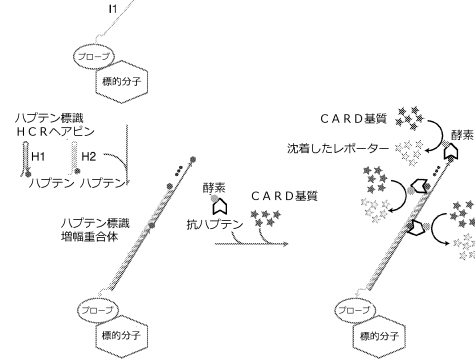
40

50

【図 3 3 E】



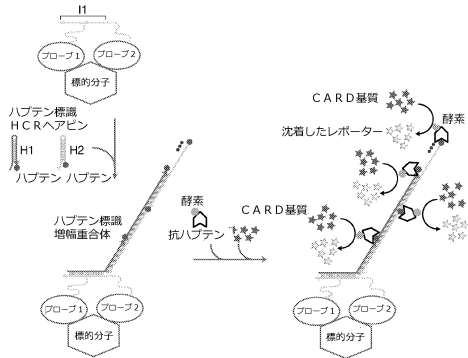
【図 3 4 A】



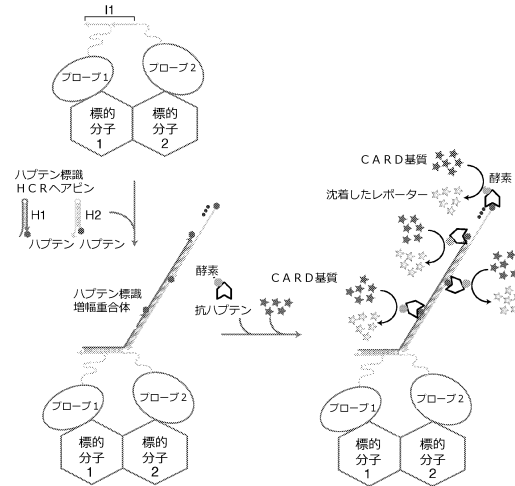
10

20

【図 3 4 B】



【図 3 4 C】

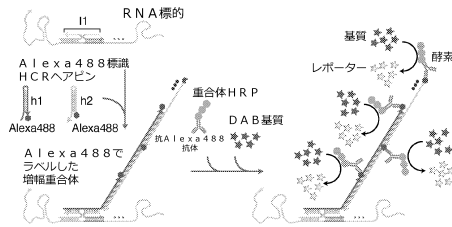


30

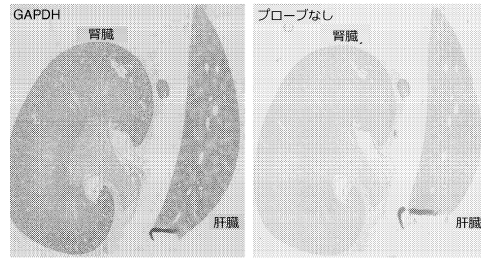
40

50

【図 37 A】

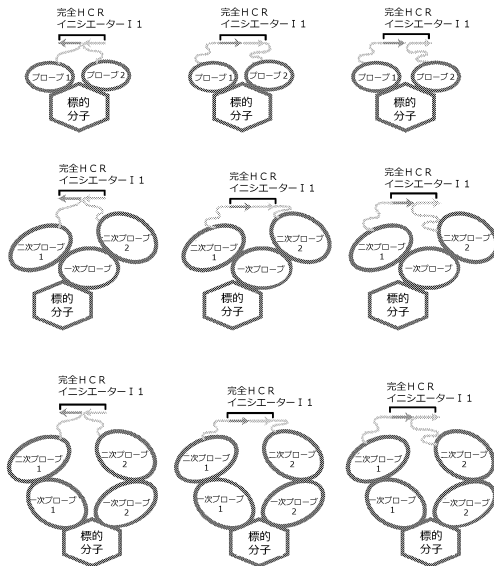


【図 37 B】



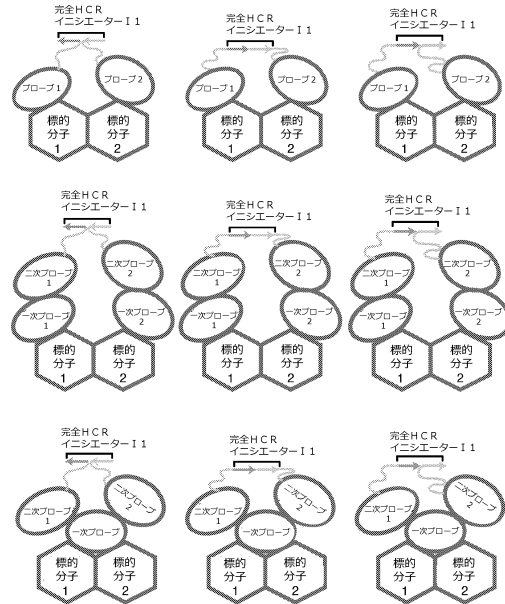
【図 38 - 1】

スプリットイニシエータープローブの構成

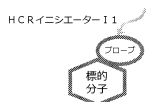


【図 38 - 2】

スプリットイニシエータープローブの構成



【図 39 A】

イニシエーター標識プローブ
1つのイニシエーター

【図 39 B】

イニシエーター標識プローブ
複数のイニシエーター

10

20

30

40

50

【図 39 C】

二次イニシエーター標識プローブ
1つのイニシエーター



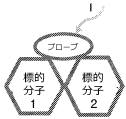
【図 39 D】

二次イニシエーター標識プローブ
複数のイニシエーター



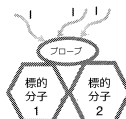
【図 39 E】

標的複合体に対して
イニシエーター標識プローブ
1つのイニシエーター



【図 39 F】

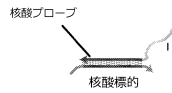
標的複合体に対して
イニシエーター標識プローブ
複数のイニシエーター



10

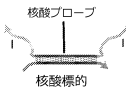
【図 39 G】

核酸プローブ
1つのイニシエーター



【図 39 H】

核酸プローブ
複数のイニシエーター



20

【図 39 I】

一次抗体プローブ
1つのイニシエーター



【図 39 J】

一次抗体プローブ
複数のイニシエーター

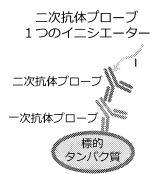


30

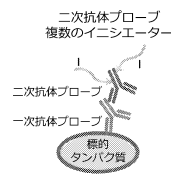
40

50

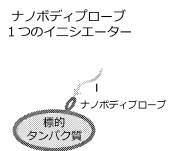
【図 39 K】



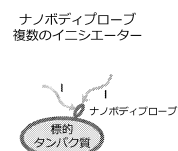
【図 39 L】



【図 39 M】

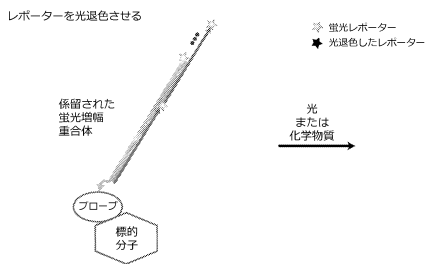


【図 39 N】

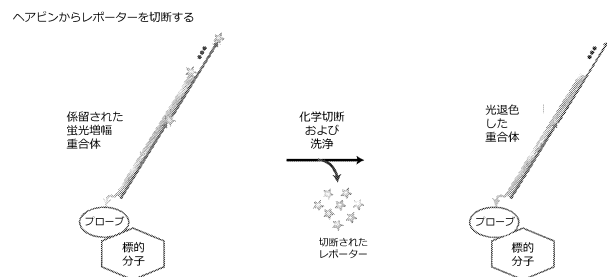


10

【図 40 A】



【図 40 B】



20

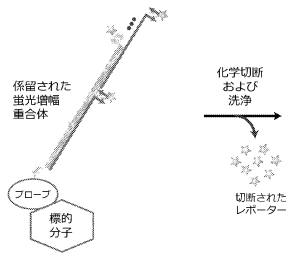
30

40

50

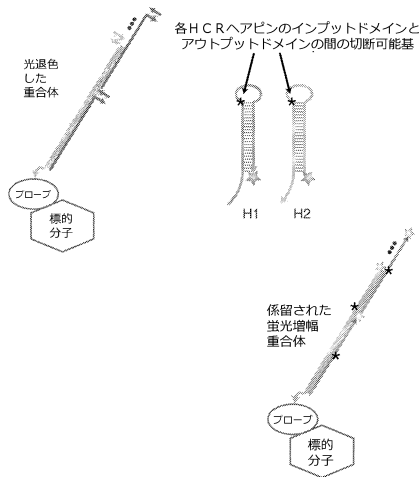
【図 40 C】

標識プローブからレポーターを切断する



【図 40 D】

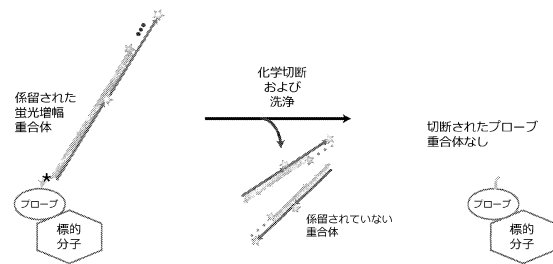
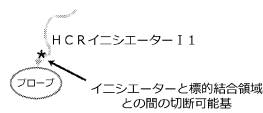
ヘアピンを切断する



10

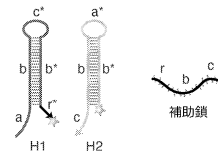
【図 40 E】

プローブを切断する

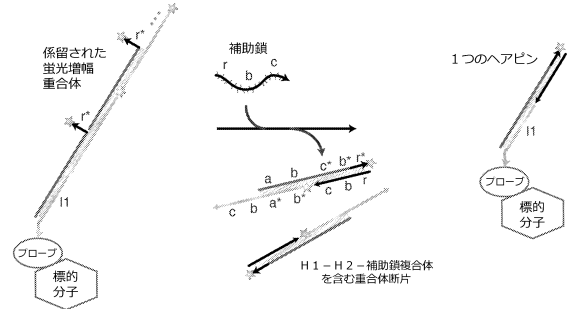


【図 40 F】

補助鎖でヘアピンを脱ハイブリダイズする



セグメント「r*」は補助鎖核形成のためのトールドである



20

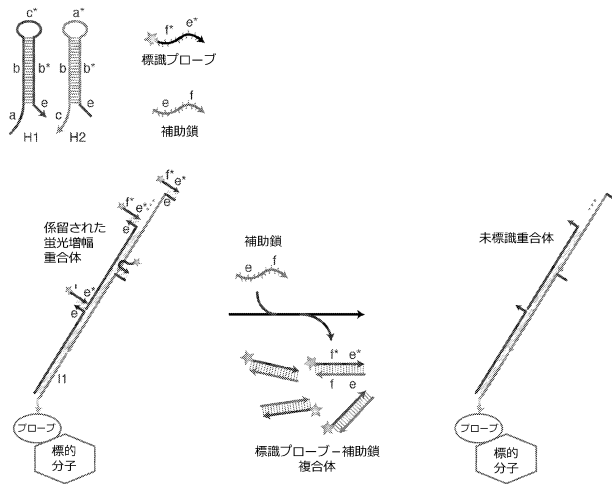
30

40

50

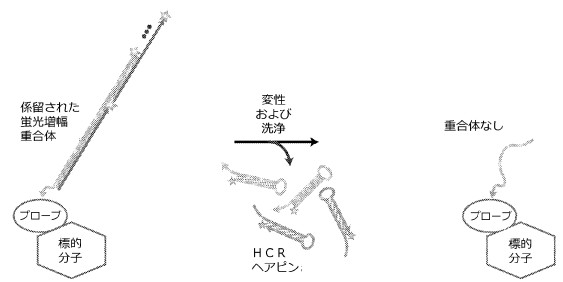
【図 40 G】

補助鎖で標識プローブを脱ハイブリダイズする



【図 40 H】

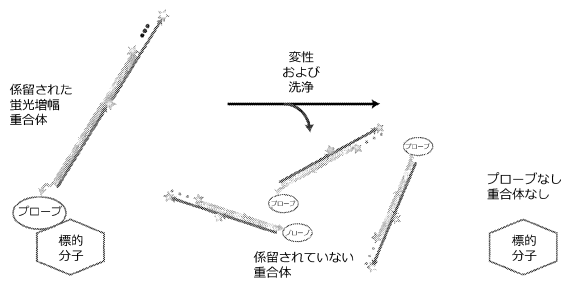
化学物質または高温で重合体からヘアピンを不安定化させる



10

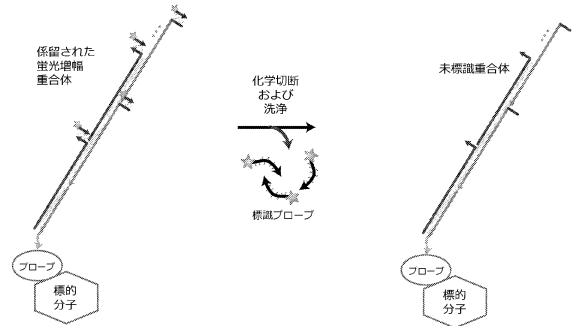
【図 40 I】

化学物質または高温で標的からプローブを不安定化させる



【図 40 J】

化学物質または高温で基質から標識プローブを不安定化させる



20

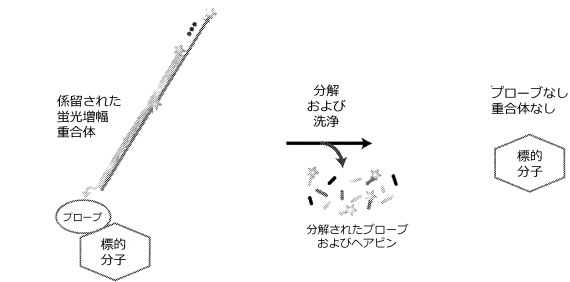
30

40

50

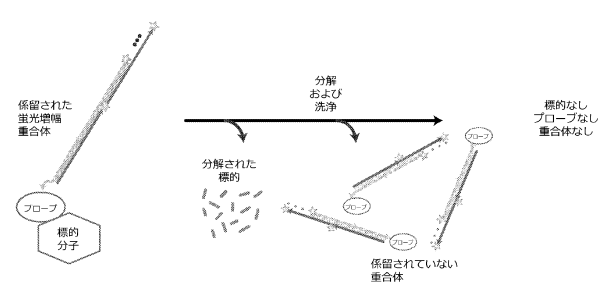
【図 40 K】

酵素（例えば、DNase、RNase、プロテアーゼ）でHCRプローブおよび重合体を分解する



【図 40 L】

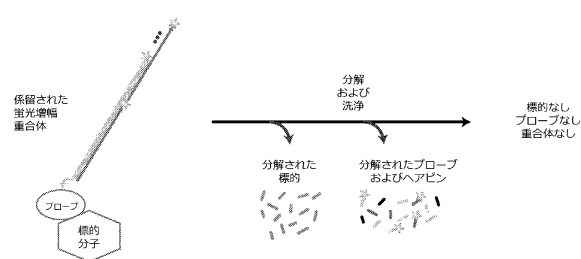
酵素（例えば、DNase、RNase、プロテアーゼ）で標的を分解する



10

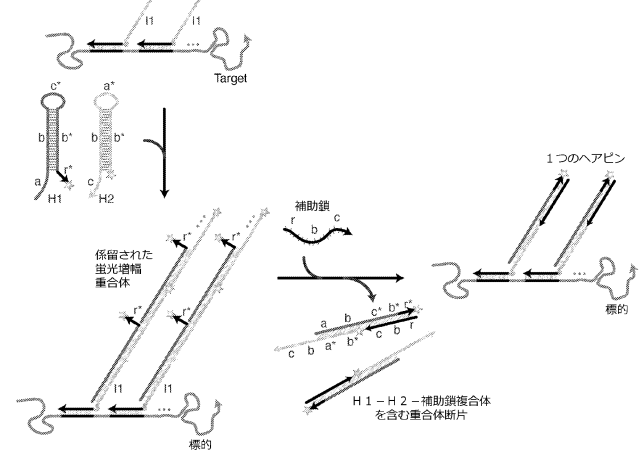
【図 40 M】

酵素（例えば、DNase、RNase、プロテアーゼ）で標的およびHCRプローブおよびヘパリンを分解する



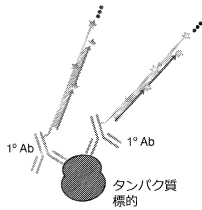
【図 40 N】

補助鎖でヘパリンを脱ハイブリダイズする
イニシエーター標識プローブ

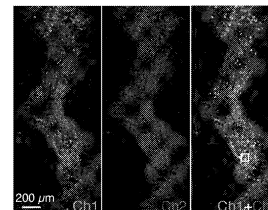


20

【図 41 A】



【図 41 B】

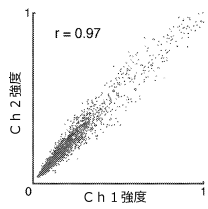


30

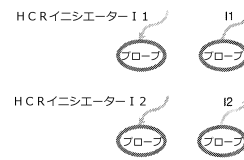
40

50

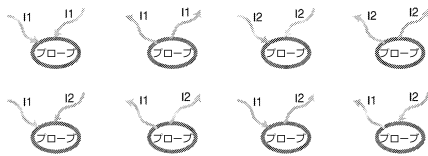
【図 4 1 C】



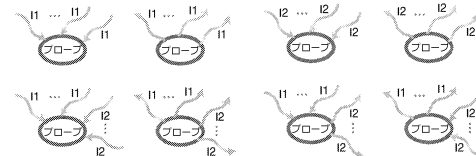
【図 4 2 A】



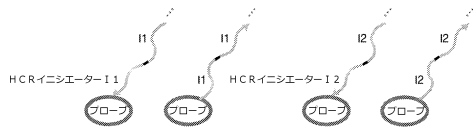
【図 4 2 B】



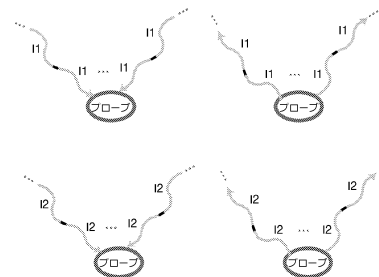
【図 4 2 C】



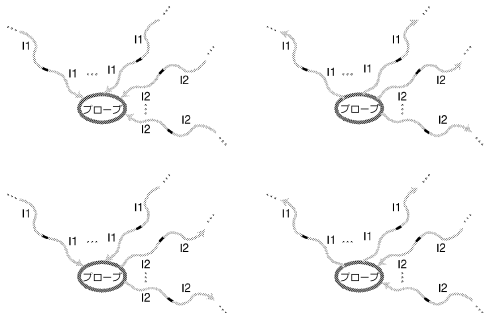
【図 4 2 D】



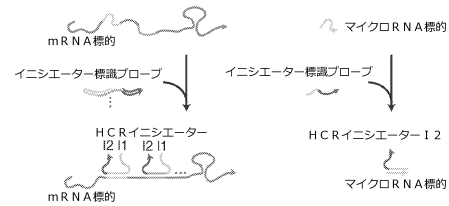
【図 4 2 E】



【図 4 2 F】



【図 4 3 A】



10

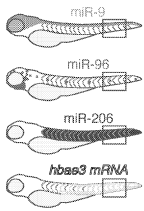
20

30

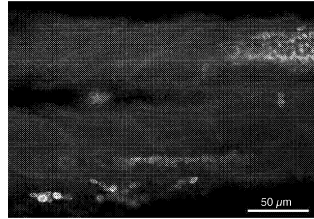
40

50

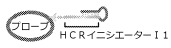
【図 4 3 B】



【図 4 3 C】



【図 4 4 A】

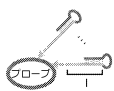


【図 4 4 B】

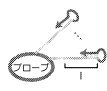


10

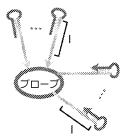
【図 4 4 C】



【図 4 4 D】



【図 4 4 E】



【図 4 4 F】

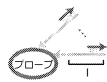


20

【図 4 4 G】



【図 4 4 H】

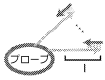


30

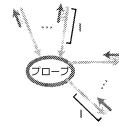
40

50

【図 4 4 I】

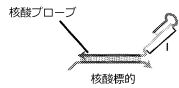


【図 4 4 J】



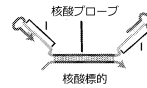
【図 4 4 K】

核酸プローブ
1つのイニシエーター



【図 4 4 L】

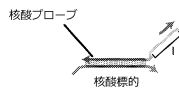
核酸プローブ
複数のイニシエーター



10

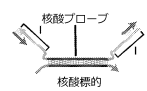
【図 4 4 M】

核酸プローブ
1つのイニシエーター



【図 4 4 N】

核酸プローブ
複数のイニシエーター



20

【図 4 4 O】

一次抗体プローブ
1つのイニシエーター



【図 4 4 P】

一次抗体プローブ
複数のイニシエーター



【図 4 4 Q】

一次抗体プローブ
1つのイニシエーター



【図 4 4 R】

一次抗体プローブ
複数のイニシエーター

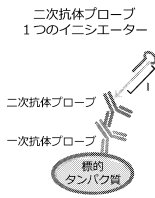


30

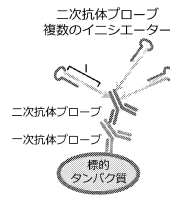
40

50

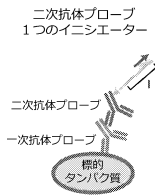
【図 4 4 S】



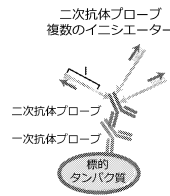
【図 4 4 T】



【図 4 4 U】

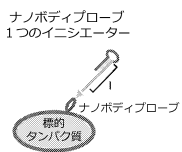


【図 4 4 V】

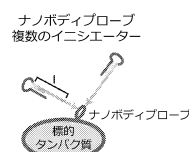


10

【図 4 4 W】

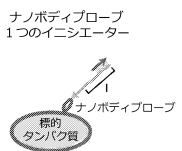


【図 4 4 X】

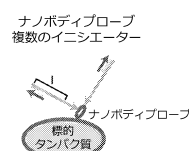


20

【図 4 4 Y】



【図 4 4 Z】



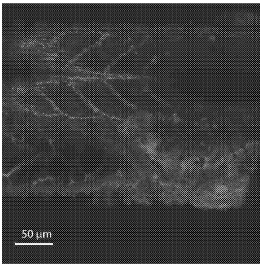
30

40

50

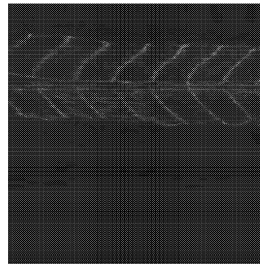
【図 4 5 A】

イニシエーター標識
二次抗体プローブ



【図 4 5 B】

遮蔽イニシエーター標識
二次抗体プローブ



10

【図 4 6 A】

HCRイニシエーター-I



【図 4 6 B】

HCRイニシエーター-I



【図 4 6 C】

HCRイニシエーター-I



【図 4 6 D】

HCRイニシエーター-I



20

【図 4 6 E】

HCRイニシエーター-I



【図 4 6 F】

HCRイニシエーター-I



【図 4 6 G】

HCRイニシエーター-I



【図 4 6 H】

HCRイニシエーター-I



30

【図 4 6 I】

HCRイニシエーター-I



【図 4 6 J】

HCRイニシエーター-I



40

50

【図 4 6 K】



【図 4 6 L】



【図 4 6 M】



【図 4 7】

補助鎖 形成のための トールドを含む ヘアピン H 1	5'- CGGGTTAAAGTTGAGTGGAGATATAGAGGCAGGGACA AAGTCTAATCCGCTCCCTGCCTCTATATCTCCACTCTATC AT-3' (SEQ ID NO: 1)
ヘアピン H 2	5'- GTCCCTGCCTCTATATCTCCACTCAACTTTAACC CGGA GTGGAGATATAGAGGCAGGACGGATTAGACTTT-3' (SEQ ID NO: 2)
イニシエーター I 1	5'-GTCCCTGCCTCTATATCTCCACTCAACTTTAACC G- 3' (SEQ ID NO: 3)
補助鎖	5'- ATGATAGAGTGGAGATATAGAGGCAGGACGGATTAG ACTTT-3' (SEQ ID NO: 4)

10

【配列表】

2023517054000001.app

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/20919

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12Q 1/682, C12Q 1/6816, C12Q 1/686, C12N 15/11 (2022.01)

CPC - C12Q 1/6897, C12N 15/111, C12N 15/113

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018/0010166 A1 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 11 January 2018 (11.01.2018) Abstract; Claim 2; Claim 9; Claim 11; Figure 1; para [0003]; para [0006]; para [0021]; para [0033]; para [0036]; para [0039]; para [0044]; para [0066]; para [0081]; para [0094]; para [0137]; para [0147]; para [0180]; para [0184]; para [0191]; para [0244]; para [0246]; para [0256]	1-2, 5-12, 26-28, 32-34
A	US 9,315,862 B2 (SMOLKE et al.) 19 April 2016 (19.04.2016) Abstract	1-2, 5-12, 26-28, 32-34

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 January 2022

Date of mailing of the international search report

FEB 14 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/20919

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/20919

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 13-25, 29-31, 35-38, 42-43, 47-48
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

-----Please see continuation in first extra sheet -----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-2, 5-9, (10-12)(in part), 26-28, 32-34
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/20919

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-2, 5-6, (10-12)(in part), directed to a method for repeated signal detection with a reporter-labeled hairpin.

Group II, claims 3-6, (10-12)(in part), directed to a method of repeated signal detection with substrate-labeled hairpins.

Group III, claims 7-9, 10 (in part), directed to a method of HCR involving overlapping binding sites.

Group IV, claims 26-28, 32-34, directed to a method of HCR, comprising hairpin monomers comprising a first and second hapten molecules.

Group V, claims 39-41, 44-46, directed to a method of HCR, comprising hairpin monomers comprising a first and second fractional substrates.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a method for repeated signal detection with a reporter-labeled hairpin, that is not required by Groups II-V.

Group II has the special technical feature of a method of repeated signal detection with substrate-labeled hairpins, that is not required by Groups I, III-V.

Group III has the special technical feature of a method of HCR involving overlapping binding sites, that is not required by Groups I-II, IV-V.

Group IV has the special technical feature of a method of HCR, comprising hairpin monomers comprising a first and second hapten molecules, that is not required by Groups I-III and V.

Group V has the special technical feature of a method of HCR, comprising hairpin monomers comprising a first and second fractional substrates, that is not required by Groups I-IV.

Common technical features:

Groups I-V share the common technical feature of:

- a method for repeated signal detection with a reporter-labeled hairpin, the method comprising:
- a) providing a sample possibly containing one or more targets as well as possibly other molecules that are not targets;
 - b) providing one or more probe sets each comprising either: i) one or more HCR initiator-labeled probes, or ii) one or more probe units each comprising two or more HCR fractional initiator probes;
 - c) optionally washing the sample;
 - d) providing one or more HCR amplifiers (each labeled with one or more reporters);
 - e) optionally washing the sample;
 - f) detecting one or more signals from one or more reporters;
 - g) optionally removing one or more probe sets from the sample;
 - h) optionally removing one or more HCR amplifiers from the sample;
- wherein a probe set comprises either:
- a) one or more HCR initiator-labeled probes, or
 - b) one or more probe units,
- wherein an HCR initiator-labeled probe comprises:
- one or more target-binding regions and
 - one or more initiators,
- wherein a probe unit comprises: two or more HCR fractional initiator probes,
- wherein an HCR fractional initiator probe comprises:
- a target-binding region and
 - a fractional initiator, and
- wherein an HCR amplifier comprises two or more HCR hairpins,
- wherein an HCR hairpin comprises an input domain comprising:
- a single-stranded toehold; and
 - a stem section,
- wherein an HCR hairpin further comprises an output domain comprising:
- a single-stranded loop; and
 - a complement to the stem section, and
- wherein an HCR hairpin further comprises a reporter.

-----please see continuation on next sheet -----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/20919

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

-----continued from previous sheet-----

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is anticipated by US 2018/0010166 A1 to California Institute of Technology (hereinafter "Caltech").

Caltech teaches a method for repeated signal detection with a reporter-labeled hairpin, (para [0003] - "The present invention relates generally to compositions and methods relating to the use of hybridization chain reaction."; para [0180] - "FIG. 15 depicts further embodiments involving HCR, in particular, a three-stage in situ HCR protocol using fractional initiator probes with hairpin monomers that carry label binding sites. Panel (a) Detection stage: ... Each of the stages may be repeated, combined, or separated depending upon the desired results. In some embodiments, the stages occur in the listed order.") the method comprising:

- a) providing a sample possibly containing one or more targets as well as possibly other molecules that are not targets;
- b) providing one or more probe sets each comprising either: i) one or more HCR initiator-labeled probes, or ii) one or more probe units each comprising two or more HCR fractional initiator probes (para [0036] - "In some embodiments a method of performing HCR is provided, the method comprising: adding a first fractional initiator and a second fractional initiator to a sample, wherein together the first and the second fractional initiators provide a full HCR initiator; and adding a set of HCR hairpin monomers to the sample so as to allow HCR to occur in the presence of the full HCR initiator.");
- c) optionally washing the sample (para [0039] - "In some embodiments a method is provided, wherein the method comprises a 2-stage approach with a wash after each stage, and wherein the target is immobilized, and wherein the sample is fixed.");
- d) providing one or more HCR amplifiers (each labeled with one or more reporters) (para [0191] - "An HCR amplifier includes two kinetically trapped nucleic acid hairpin molecules (H1 and H2) that co-exist metastably in the absence of a cognate initiator strand (1; FIG. 1A) ... Using in situ HCR, DNA probes complementary to mRNA targets carry DNA HCR initiators that trigger chain reactions in which metastable fluorophore-labeled DNA hairpins self-assemble into tethered fluorescent amplification polymers (FIG. 1b).");
- e) optionally washing the sample;
- f) detecting one or more signals from one or more reporters (para [0021] - "In some embodiments a method is provided that comprises:
 - a. providing:
 - i. a first fractional initiator probe
 - ii. a second fractional initiator probe
 - iii. a first hairpin monomer
 - iv. a second hairpin monomer, and
 - v. a target molecule;
 - b. incubating to allow for binding; and
 - c. detecting a signal.");
 - g) optionally removing one or more probe sets from the sample;
 - h) optionally removing one or more HCR amplifiers from the sample;
 wherein a probe set comprises either:
 - a) one or more HCR initiator-labeled probes, or
 - b) one or more probe units,
 wherein an HCR initiator-labeled probe comprises:
 - one or more target-binding regions and one or more initiators (para [0033] - "In some embodiments a method is provided, wherein following the first wash, colocalized first and second initiator probes on the target molecule are bound by the first hairpin monomer, which is then bound by the second hairpin monomer, resulting in HCR amplification.");
 - wherein a probe unit comprises: two or more HCR fractional initiator probes,
 - wherein an HCR fractional initiator probe comprises:
 - a target-binding region and
 - a fractional initiator, and
 - wherein an HCR amplifier comprises two or more HCR hairpins,
 - wherein an HCR hairpin comprises an input domain comprising:
 - a single-stranded toehold; and
 - a stem section,
 - wherein an HCR hairpin further comprises an output domain comprising:
 - a single-stranded loop; and
 - a complement to the stem section, and
 - wherein an HCR hairpin further comprises a reporter (Claim 9 - "The composition of claim 8, wherein the first fractional initiator probe further comprises a first target binding section and the second fractional initiator probe further comprises a second target binding section, wherein the first target binding section is configured to bind to the first target section and the second target binding section is configured to bind to the second target section."; para [0006] - "a first hairpin monomer, comprising: i. a first input domain, comprising a first toehold and a first stem section, ii. a first output domain, comprising a first hairpin loop and a complement to the first stem section, and iii. a first reporter molecule").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-V inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

*Continuation of Item 4 above: claims 13-25, 29-31, 35-38, 42-43, 47-48 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ピアース, ナイルズ エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 1 2 5 パサデナ イースト カリフォルニア ブールバード
1 2 0 0 エム/シー 6-3 2

(72)発明者 チェ, ハリー ミン タク

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 4 1 ロサンゼルス イーグル ロック ブールバード 5 0
1 5 スイート 3 0 1

F ターム (参考) 4B063 QA18 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR56 QR66 QR77 QS03
QS34 QS36 QX02

【要約の続き】

プローブを含み、H C R分割イニシエータープローブは標的結合領域、および分割イニシエーターを含み、プロ
ーブユニット内の標的結合領域は前記標的上のオーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合
するように構成されており、各プローブユニット内のプローブ上の分割イニシエーターは、H C Rヘアピン上の
オーバーラップ結合部位または非オーバーラップ結合部位に結合するように構成されている。いくつかの実施形
態として、1または複数の標的と、標的ではない他の分子とを含む可能性のある試料を準備すること、a) 1ま
たは複数のH C Rイニシエーター標識プローブ、またはb) 2個以上のH C R分割イニシエーターをそれぞれ含
む1または複数のプローブユニット、のいずれかをそれぞれ含む1または複数のプローブセットを準備すること
、1または複数のH C Rアンプリファイア（各々は1または複数のハプテンで標識されている）を準備すること
、C A R Dを媒介する酵素である1または複数のレポーター体で標識された1または複数の抗ハプテンを準備す
ること、1または複数のレポーターの沈着をもたらす1または複数のC A R D基質を準備すること、並びに、1
または複数のレポーターからの1または複数のシグナルを検出すること、を含む、ハプテン標識H C Rヘアピン
による、シグナル検出のための、H C R型触媒レポーター沈着（C A R D）法が包含される。