

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7145517号

(P7145517)

(45)発行日 令和4年10月3日(2022.10.3)

(24)登録日 令和4年9月22日(2022.9.22)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/53

D

G 0 1 N 33/566 (2006.01)

G 0 1 N 33/566

C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6813

Z

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6876

Z

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00

A

請求項の数 15 (全43頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-549000(P2019-549000)

(86)(22)出願日 平成30年3月7日(2018.3.7)

(65)公表番号 特表2020-511648(P2020-511648
A)

(43)公表日 令和2年4月16日(2020.4.16)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/021356

(87)国際公開番号 WO2018/165309

(87)国際公開日 平成30年9月13日(2018.9.13)

審査請求日 令和3年2月19日(2021.2.19)

(31)優先権主張番号 62/468,578

(32)優先日 平成29年3月8日(2017.3.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 507238218

ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ
ィ オブ ミシガン

アメリカ合衆国 4 8 1 0 9 - 2 5 9 0

ミシガン、アナーバー、ヒューロン パ
ークウェイ 1 6 0 0、セカンド フロアー

(74)代理人 110000338

特許業務法人HARAKENZO WO
RLD PATENT & TRADEM
ARK(72)発明者 ジョンソン・バック, アレクサンダー
エドモンド

アメリカ合衆国, 4 8 1 0 9 - 2 5 9 0

ミシガン州, アナーバー, ヒューロン
パークウェイ 1 6 0 0, セカンド フロ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 分析物の検出

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の分析物を特徴付ける方法であって、

(a) 表面上の(x、y)位置の関数として、固体支持体である前記表面に固定化され
た分析物についてのクエリープローブ事象の時間依存シグナルを記録する工程であって、
ここで、(i) 前記事象は、前記固体支持体である表面上の、(x、y)座標によって同定され
る各離散的な位置で生じる、クエリープローブが分析物と結合することおよび／またはクエ
リープローブが分析物から解離することを意味し、(ii) 前記クエリープローブ事象の時間依存シグナルを記録する工程は、分析物につ
いてのシグナルを単一分子感度で測定する工程を含み、(iii) 前記クエリープローブは、 0.5 min^{-1} より大きい分析物についての結
合定数および／または解離定数を有する、低親和性クエリープローブであり、(iv) 前記(x、y)位置はサブピクセル精度で特定される、
工程と、

(b) (x、y)位置によって事象をローカルクラスタにクラスタ化する工程と、

(c) 前記分析物を特徴付けるために、各事象クラスタについての動態パラメータを計
算する工程と、

を含み、

前記方法は、前記表面における前記時間依存シグナルの強度変化を(x、y)位置の関

10

20

数として含む差分強度のマップを計算する工程をさらに含み、かつ、

各クエリープローブ事象の前記 (x、y) 位置は、重心決定、ガウス関数への最小二乗フィッティング、エアリーディスク関数への最小二乗フィッティング、多項式関数への最小二乗フィッティング、または最尤推定を使用して、前記差分強度のプロファイルを処理することによって特定される、方法。

【請求項 2】

クラスタ化された事象は単一の分析物分子についての結合事象を表す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記分析物を特徴付けることは、前記試料中の前記分析物の存在、不存在、濃度、または数を示すことを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記分析物はポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記方法は、前記ポリペプチド上の翻訳後修飾の有無を示す、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記翻訳後修飾は、前記クエリープローブによる前記ポリペプチドとの一過性の会合を媒介する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

化学親和性タグは、前記翻訳後修飾と前記クエリープローブとの間の一過性の会合を媒介する、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記化学親和性タグは核酸である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記分析物は核酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記クエリープローブによる前記分析物との一過性の会合は、前記分析物の共有結合修飾によって区別可能に影響される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記クエリープローブは核酸またはアプタマーである、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記クエリープローブは、低親和性抗体、抗体断片、またはナノボディである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記クエリープローブは、DNA 結合タンパク質、RNA 結合タンパク質、または DNA 結合リボ核タンパク質複合体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記分析物は表面固定化の前に担体の存在下で熱変性または化学的変性に供される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記分析物は高分子複合体の構成要素である、請求項 1 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔関連出願の相互参照〕

本出願は、2017年3月8日に提出された米国仮特許出願第62/468,578号に基づく優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

〔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、米国国立衛生研究所によって授与された助成金GM062357の下で、また米国海軍の海軍研究事務所によって授与された助成金W911NF-12-1-042

50

0の下で、政府の支援を受けて成されたものである。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

〔技術分野〕

本明細書では、分析物の検出に関連する技術が提供され、特に、検出プローブの一過性の結合に基づく技術を使用して、核酸、タンパク質、小分子、および他の分子などの分析物を検出するための方法、システム、組成物、およびキットが提供されるが、これらに限定されない。

【0004】

〔背景技術〕

複雑な混合物中の低濃度の分析物を検出および定量することは、生物学的研究および臨床診断において多くの用途を有する。多くの重要な生物学的分析物は、疾患および他の生物学的状態のバイオマーカーである。例えば、血液、尿、唾液、および他の体液中に発癌性突然変異を有する循環核酸の小画分の検出は、ある種の癌の発生率と相関してきた。さらに、前立腺特異抗原（PSA）およびインターロイキンのようなタンパク質分析物もまた、現在のまたは潜在的な臨床的および研究的重要性を有する。小分子代謝産物のレベルは、生物学的系における健康および薬物処理に関する情報を提供する。抗体、アプタマー、核酸、および他の親和性試薬は、分子の診断および研究においてこれらのアッセイに広く使用されている。

【0005】

低存在量の分子分析物の検出における課題は、感度と特異度との間のトレードオフである。すなわち、アッセイの感度が増加するにつれて、偽陽性の可能性が増加し、これは特異度を減少させる。例えば、一般的なELISA（酵素結合免疫吸着法、enzyme-linked immunosorbent assay）法における偽陽性は、一次抗体または二次抗体のアッセイ表面への非特異的結合から生じ、したがって、意図される標的分析物が存在しない場合にシグナルを生じる。そのような場合、検出器感度またはシグナル増幅効率を改善すると、真陽性および偽陽性の検出事象の両方を増加させ、特異度が低下する。ブロッキング溶液との表面のインキュベーション、厳密な洗浄手順、およびシグナルを生成するために標的分析物に共同で結合しなければならないスプリットプローブの使用を含む、偽陽性事象を減少させるための方策が開発されているが、それにもかかわらず、現在のアプローチは、偽陽性シグナルを実際には完全に排除することができないので、偽陽性に悩まされている。その結果、単一分子レベルで標的分析物を高い特異度で検出することは、多くのクラスのバイオマーカーについては依然として不明である。

【0006】

〔発明の概要〕

これまでに、クエリープローブの一過性の結合についての強度対時間データの動力学的モデリングおよび分析を使用して核酸を検出するための方策が記載されてきた（Johnson-Buck et al.(2015)Nat. Biotechnol. 33:730-32;米国特許出願公開第20160046988号、国際特許出願PCT/US2017/016977を参照のこと。これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。対照的に、本技術は、いくつかの実施形態において、低親和性クエリープローブの各結合および解離事象の空間的および時間的座標を特定し、次いで、位置によって結合事象をクラスタ化し、そして各クラスタ事象を動力学的分析に供する（例えば、単位時間当たりの標的分子当たりの事象間の滞留時間または事象の数の平均、中央値、最大値、最小値、標準偏差、または他の測定基準を特定する）ことによって、表面に安定的に結合した標的分析物を検出するための新規な方法を提供する。この方法は、単一の標的分析物に対するクエリープローブの複数の結合事象にわたる位置対時間統計の蓄積が単一の結合事象、観察領域にわたる結合事象の累積数、または観察領域にわたるプローブシグナルの累積数のいずれよりも、分析物の同一性においてより大きな信頼性を生じるため、非特異的プローブ結合と標的分析物へのプローブの結合との間の識別を可能にする。さらに、この方法は、検出装置の分解能限界を超えて

10

20

30

40

50

「超分解能」測定を提供するために、（全体的なシグナル強度ではなく）強度変動に基づく空間位置情報およびクラスタ化を使用する。したがって、いくつかの実施形態では、本技術は、過去に公開された方法（図2）よりも高いダイナミックレンジを提供し、標的分析物への特異的結合と、検出プローブの像面または他の表面結合分析物への非特異的結合との識別を改善する（図3）。特に、標的結合からのシグナルの密接にクラスタ化された空間的局在化および標的へのプローブ結合の別個の速度的挙動を使用して、非特異的（例えば、偽陽性）シグナルからの標的シグナルの改善された識別を提供する。いくつかの実施形態では、広い検出器領域にわたってクエリープローブ結合事象に適用される場合、この方法は、単一分子のレベルで1つ以上の標的分析物をデジタル的に計数する際に使用できる。

10

【0007】

本技術は、バックグラウンド結合に対する分析物の改善された識別、密接に関連する分析物間の改善された識別、および非常に希釈されたまたは低容量の検体の分析（例えば、同じ分析物の分析のための従来の技術と比較して改善された感度および／または特異度を有する）を含むが、これらに限定されない、従来の技術を超える利点を提供する。

【0008】

したがって、いくつかの実施形態では、本技術は、試料中の分析物を特徴付ける方法を提供する。

【0009】

本技術は、検出される分析物に限定されない。例えば、実施形態は、核酸、ポリペプチド、炭水化物、多糖、脂肪酸、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質、小分子、代謝産物、補因子などである分析物の検出を提供する。

20

【0010】

いくつかの実施形態では、クエリープローブおよび／または捕捉プローブは、核酸、ポリペプチド（例えば、抗体、抗体断片、線形抗体、一本鎖抗体、または他の抗原結合抗体誘導体；酵素；特異性を有する分析物を認識する結合タンパク質）である。分析物が炭水化物または多糖を含むいくつかの実施形態では、前記クエリープローブは、レクチンまたは炭水化物結合抗体などの炭水化物結合タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、炭水化物単量体間の特定のグリコシド結合またはグリコシド結合の組の存在は、クエリープローブ結合の識別可能なパターンを生じる。いくつかの実施形態では、前記捕捉プローブは、ウサギモノクローナル抗体であり、いくつかの実施形態では、前記クエリープローブは、マウスモノクローナル抗体である。

30

【0011】

例えば、いくつかの実施形態では、方法は、表面上の（ x 、 y ）位置の関数として、前記表面に固定化された分析物についてのクエリープローブ事象の時間依存シグナルを記録する工程と、（ x 、 y ）位置によって事象をローカルクラスタにクラスタ化する工程と、前記分析物を特徴付けるために、各事象クラスタについての動態パラメータを計算する工程とを含む。いくつかの実施形態では、前記表面は固体支持体である。いくつかの実施形態では、前記表面は拡散性である。いくつかの実施形態では、クエリープローブ事象の時間依存シグナルを記録する工程は、分析物についてのシグナルを単一分子感度で測定する工程を含む。いくつかの実施形態では、方法は前記表面における前記時間依存シグナルの強度変化を（ x 、 y ）位置の関数として含む差分強度のマップを計算する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、（ x 、 y ）位置はサブピクセル精度で特定される。

40

【0012】

いくつかの実施形態では、クラスタ化された事象は単一の分析物分子についての結合事象を表す。いくつかの実施形態では、前記分析物を特徴付けることは、前記試料中の分析物の存在、不存在、濃度、または数を示すことを含む。いくつかの実施形態では、分析物はポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、前記方法が、前記ポリペプチド上の翻訳後修飾の有無を示す。いくつかの実施形態では、翻訳後修飾は、前記クエリープローブによる前記ポリペプチドとの一過性の会合を媒介する。いくつかの実施形態では、化学親

50

和性タグは、前記翻訳後修飾と前記クエリープローブとの間の一過性の会合を媒介する。いくつかの実施形態では、化学親和性タグは核酸である。いくつかの実施形態では、前記分析物は核酸である。いくつかの実施形態では、前記クエリープローブによる前記分析物との一過性の会合は、前記分析物の共有結合修飾によって区別可能に影響される。いくつかの実施形態において、前記クエリープローブは核酸またはアプタマーである。いくつかの実施形態では、前記クエリープローブは、低親和性抗体、抗体断片、またはナノボディである。いくつかの実施形態では、前記クエリープローブは、DNA結合タンパク質、RNA結合タンパク質、またはDNA結合リボ核タンパク質複合体である。

【0013】

いくつかの実施形態では、各クエリープローブ事象の前記(x、y)位置は、重心決定、ガウス関数への最小二乗フィッティング、エアリーディスク関数への最小二乗フィッティング、多項式関数(例えば、放物線)への最小二乗フィッティング、または最尤推定を使用して、前記差分強度のプロファイルを処理することによって特定される。いくつかの実施形態において、前記分析物は表面固定化の前に担体の存在下で熱変性に供される。いくつかの実施形態において、前記分析物は表面固定化の前に担体の存在下で化学的変性に供され、例えば、前記分析物は、尿素、ホルムアミド、塩化グアニジウム、高イオン強度、低イオン強度、高pH、低pH、またはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)のような変性剤で変性される。

【0014】

さらなる実施形態は、試料中の分析物を定量化するためのシステムを提供する。例えば、いくつかの実施形態では、システムは、分析物を表面に安定的に固定化する機能と、低親和性で標的分析物に結合する自由に拡散するクエリープローブと、クエリープローブ事象および分析物に対するクエリープローブ事象の空間位置を記録する検出システムと、を含む。いくつかの実施形態では、システムは、前記標的分析物への反復的な結合および解離事象の空間的位置およびタイミングに従って、前記標的分析物の個々の分子コピーを同定するための分析手順をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記クエリープローブは、核酸またはアプタマーである。いくつかの実施形態では、前記クエリープローブは、低親和性抗体、抗体断片、またはナノボディである。システムのいくつかの実施形態では、前記クエリープローブおよび/または捕捉プローブは、DNA結合タンパク質、RNA結合タンパク質、またはDNA結合リボ核タンパク質複合体である。いくつかの実施形態では、前記クエリープローブおよび/または前記捕捉プローブは、核酸、ポリペプチド(例えば、抗体、抗体断片、線形抗体、一本鎖抗体、または他の抗原結合抗体誘導体；酵素；特異性を有する前記分析物を認識する結合タンパク質)であり、前記分析物が炭水化物または多糖を含むいくつかの実施形態では、前記クエリープローブは、レクチンまたは炭水化物結合抗体などの炭水化物結合タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、炭水化物単量体間の特定のグリコシド結合またはグリコシド結合の組の存在は、クエリープローブ結合の識別可能なパターンを生じる。いくつかの実施形態では、前記捕捉プローブは、ウサギモノクローナル抗体であり、いくつかの実施形態では、前記クエリープローブは、マウスモノクローナル抗体である。

【0015】

いくつかのシステム実施形態では、前記分析物は、前記標的分析物に安定的に結合する表面結合捕捉プローブによって表面に安定的に固定化される。いくつかの実施形態では、前記捕捉プローブは、高親和性抗体、抗体断片、またはナノボディである。いくつかの実施形態では、前記分析物は、前記標的分析物を前記表面に架橋する共有結合によって前記表面に安定的に固定化される。いくつかの実施形態において、前記分析物は表面固定化の前に担体の存在下で熱変性に供される。いくつかの実施形態において、前記分析物は表面固定化の前に、担体の存在下で化学的変性に供され、例えば、前記分析物は、尿素、ホルムアミド、塩化グアニジウム、高イオン強度、低イオン強度、高pH、低pH、またはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)のような変性剤で変性される。追加の実施形態は、本明細書に含まれる教示に基づいて、関連技術の当業者には明らかであろう。

【0016】

〔図面の簡単な説明〕

本技術のこれらおよび他の特徴、態様、および利点は、以下の図面を参照してより良く理解されるであろう。

【0017】

図1は、本明細書に記載された技術の方法の実施形態のステップと、本明細書に記載された技術の実施形態の開発中に収集された実験データとを示す概略図である。

【0018】

図2は、本明細書中に記載された実験の間に収集されたデータについての、シグナル（「許容カウント」）対ピコモル単位での濃度のプロットである。このプロットは、本明細書に記載の技術のダイナミックレンジ（塗りつぶされた正方形）が従来の方法（白丸）と比較して改善されていることを示している。

10

【0019】

図3A～Bは、標的分析物のみの存在下（図3A）および介在するバックグラウンド分析物の存在下であるが、標的分析物の非存在下（図3B）で、本明細書中に記載される実験の間に同定された結合事象クラスターの図を示す。図3Aは、標的分析物からの有意な陽性シグナルを示す。この方法の特異度のために、図3Bでは、標的分析物のシグナルは検出されなかった。実験は、本明細書中に記載される技術の実施形態の高い特異度を示す。

【0020】

図面は必ずしも一定の縮尺で描かれているわけではなく、図面中の物体同士は必ずしも互いに対して一定の縮尺で描かれているわけでもないことが理解されるべきである。図面は、本明細書に記載された装置、システム、および方法の様々な実施形態に明確さおよび理解をもたらすことを意図した描写である。可能な限り、全図面を通じて、同一または同様の部材を表すために同一の参照番号が使用されている。さらに、図面は、本教示の範囲を何ら限定するものではないことが理解されるべきである。

20

【0021】

〔詳細な説明〕

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される技術は、1つ以上のクエリープローブとの、安定な（平衡の、熱力学的な）、ではなく、一過性の（例えば、動力学的な）相互作用を有する生体分子分析物を検出することに関する。分析物は、捕捉プローブを用いて表面上に固定化され、次いで、一時的に結合するクエリープローブを用いて検出される。本技術は、分析物、捕捉プローブ、またはクエリープローブに限定されない。例えば、いくつかの実施形態では、クエリープローブは、抗体、ナノボディ、ポリペプチド、オリゴペプチド、またはアプタマーであり、例えば、いくつかの実施形態では、分析物は、核酸、タンパク質、ペプチド、脂質、小分子、代謝産物、または任意の分子もしくは化合物である。

30

【0022】

先行技術とは対照的に、本明細書に記載の技術は、プローブ-標的相互作用の動態挙動を分析することによって、密接に関連する分析物（例えば、リン酸化されたタンパク質標的およびリン酸化されていないタンパク質標的）を任意の精度で区別する。

40

【0023】

様々な実施形態において、アッセイ条件は、クエリープローブによる標的分析物との相互作用が一過性のものとなるよう制御される。例えば、いくつかの実施形態では、本技術は、プローブと分析物との一過性の相互作用が生じる条件を提供するために、以下のうちの1つ以上を含む。（1）クエリープローブが標的と弱く相互作用するように（例えば、ナノモル親和性範囲で）クエリープローブを設計すること、（2）クエリープローブが標的分析物と弱く相互作用するように温度を制御すること、（3）溶液条件、例えば、イオン強度、イオン組成、カオトロピック剤の添加、競合プローブの添加などを制御して、クエリープローブが標的分析物と弱く相互作用するようにすること。

【0024】

50

いくつかの実施形態では、本技術は、フォトリソグラフィおよび／または超音波エネルギーを使用することを含む。例えば、いくつかの実施形態では、フォトリソグラフィが特定の位置における材料、特により大きな粒子の濃度を促進する。いくつかの実施形態では、超音波が、例えば単純な拡散を超えて混合速度を増加させることによって、例えば動力学的関連を調節するために、混合を促進する。

【0025】

いくつかの実施形態では、クエリープローブの標的分析物への結合が、全内部反射蛍光顕微鏡法または単一分子に感度がある別の技術によって測定される。

【0026】

様々な実施形態のこの詳細な説明において、説明の目的のために、開示された実施形態の完全な理解を提供するために、多数の特定の詳細が記載される。しかしながら、当業者は、これらの様々な実施形態がこれらの特定の詳細を伴って、または伴わずに実施され得ることを理解するであろう。他の例では、構造およびデバイスがブロック図形式で示される。さらに、当業者は、方法が提示され、実行される特定の順序が例示的なものであり、順序を変更することができ、それでもなお、本明細書で開示される様々な実施形態の精神および範囲内にあることが企図されることを容易に理解することができる。

【0027】

特許、特許出願、記事、本、論文、およびインターネットウェブページを含む（が、これらに限定されない）、本出願において引用される全ての文献および類似の資料は、任意の目的のために、それらの全体が参照により明示的に組み込まれる。別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本明細書で説明される様々な実施形態が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。組み込まれた参考文献における用語の定義が、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が優先されるものとする。本明細書で使用されるセクションの見出しは、編成目的のためだけのものであり、記載された対象を限定するものとして解釈されるべきでは決していない。

【0028】

〔定義〕

本技術の理解を容易にするために、いくつかの用語および語句を以下に定義する。詳細な説明の全体にわたって、追加の定義を述べる。

【0029】

この明細書および特許請求の範囲の全体を通して、以下の用語は、文脈がそうでないことを明示しない限り、ここで明示的に関連付ける意味をとる。本明細書で使用される語句「一実施形態において」は、必ずしも同じ実施形態を指すものではないが、そうであってもよい。さらに、本明細書で使用される語句「別の実施形態において」は、必ずしも異なる実施形態を指すものではないが、そうであってもよい。したがって、以下で説明するように、本発明の範囲または精神から逸脱することなく、本発明の様々な実施形態を容易に組み合わせることができる。

【0030】

さらに、本明細書で使用される用語「または」「あるいは」「もしくは」（or）は、包含的な選択性機能語であり、文脈がそうでないことを明示しない限り、「および／または」という用語と同等である。用語「に基づく」は、排他的ではなく、文脈がそうでないことを明示しない限り、記載されていない追加の要因に基づくことが可能である。さらに、本明細書全体を通して、単数形の表現（「a」、「an」、および「the」）の意味は、複数の意味を含む。「において（in）」の意味は、「において（in）」および「上において（on）」を含む。

【0031】

本明細書中で使用される場合、用語「被験者」および「患者」は、植物、微生物、および動物（例えば、イヌ、ネコ、家畜、およびヒトなどの哺乳動物）を含む任意の生物をいう。

10

20

30

40

50

【0032】

本明細書および特許請求の範囲における用語「試料」は、その最も広い意味で使用される。いくつかの実施形態では、試料が動物細胞または動物組織であるか、あるいは動物細胞または動物組織を含む。いくつかの実施形態において、試料は任意の源から得られた検体または培養物（例えば、微生物学的培養物）、ならびに生体試料および環境試料を含む。生体試料は、植物または動物（ヒトを含む）から得てもよく、流体、固体、組織、および気体を包含する。環境試料には、表面物質、土壌、水、および工業試料などの環境物質が含まれる。これらの例は、本技術に適用可能な試料の種類を限定するものと解釈されるべきではない。

【0033】

本明細書中で使用される場合、「生体試料」は、生物学的組織または流体の試料をいう。例えば、生体試料は、動物（ヒトを含む）から得られる試料；流体、固体、または組織試料；ならびに液体および固体の食品および飼料製品ならびに乳製品、野菜、肉および肉副産物、ならびに廃棄物などの成分であり得る。生体試料は、家畜の様々なファミリーのすべて、ならびに有蹄動物、クマ、魚、ウサギ目の動物、げっ歯類などの動物を含む（が、これらに限定されない）野良のまたは野生の動物から得ることができる。生体試料の例としては、組織の断片、血液、血液画分、血漿、血清、尿、または他の周辺の源もしくは細胞培養物、細胞コロニー、単細胞、または単細胞の収集物からの試料が挙げられる。さらに、生体試料は、上述の試料のプールまたは混合物を含む。生体試料は、被験者から細胞の試料を除去することによって提供され得るが、以前に単離された試料を使用することによっても提供され得る。例えば、組織試料は、従来の生検技術によって、疾患を有することが疑われる被験者から除去され得る。いくつかの実施形態において、血液試料は、被験者から採取される。患者からの生体試料は、疾患に冒されていることが疑われている被験者からの試料を意味する。

【0034】

環境試料には、表面物質、土壌、水、および工業試料などの環境物質、ならびに食品および乳製品の処理機器、装置、設備、器具、使い捨ておよび非使い捨て品から得られる試料が含まれる。これらの例は、本発明に適用可能な試料の種類を限定するものとして解釈すべきではない。

【0035】

本明細書で使用される用語「標識」は、検出可能な（好ましくは、定量可能な）効果を提供するために使用可能であり、核酸またはタンパク質に結合させることが可能な、任意の原子、分子、分子錯体（例えば、金属キレート）、またはコロイド粒子（例えば、量子ドット、ナノ粒子、微粒子など）をいう。標識には、色素（例えば、光学的に検出可能な標識、蛍光色素または蛍光部分など）、放射性標識（例えば、 ^{32}P ）、結合部分（例えば、ビオチン）、ハプテン（例えば、ジゴキシゲニン）、発光部分、リン光部分、光学的に検出可能な部分、または蛍光発生部分）、マスタグ、および単独の蛍光色素、または蛍光共鳴エネルギー転写（FRET）によって発光スペクトルを抑制または移動可能な部分と組合せた蛍光色素が含まれるが、これらに限定されない。標識は、蛍光、冷光、放射能、比色、重量測定、X線回折または吸収、磁気、酵素活性、質量の特性または質量によって影響される挙動（例えば、MALDI飛行時間質量分析；蛍光偏光）などによって検出可能なシグナルを提供し得る。標識は、荷電部分（正または負の電荷）であってもよく、あるいは電荷中性であってもよい。標識を含む配列が検出可能である限り、標識は、核酸配列またはタンパク質配列を含み得るか、または核酸配列またはタンパク質配列からなり得る。

【0036】

「支持体」または「固体支持体」は、本明細書で使用される場合、核酸分子、微粒子などが固定化されてもよく、例えば、それらが共有結合または非共有結合で結合されてもよく、またはそれらが部分的または完全に埋め込まれてもよく、その結果、それらが自由に拡散するか、または互いに対して移動することが大部分または完全に防止されるようなマ

10

20

30

40

50

トリックスを指す。

【0037】

本明細書中で使用される場合、「部分」は、何かを2つ以上の部分に分け得るときの1部分を意味し、例えば、オリゴヌクレオチド、分子、化学基、ドメイン、プローブなどの様々な部分のうちの1つをいう。

【0038】

本明細書中で使用される場合、「核酸」または「核酸配列」は、ピリミジンおよび／またはプリン塩基、好ましくはシトシン、チミン、およびウラシル、ならびにアデニンおよびグアニンのポリマーまたはオリゴマーをそれぞれいう (Albert L. Lehninger, Principles of Biochemistry, 793-800 (Worth Pub. 1982) を参照のこと)。本技術は、任意のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはペプチド核酸成分、およびこれらの塩基のメチル化、ヒドロキシメチル化、またはグリコシル化形態などの任意の化学変異体を意図する。ポリマーまたはオリゴマーは、組成物が不均一であっても均一であってもよく、天然に存在する源から単離されてもよく、または人工的もしくは合成的に製造されてもよい。さらに、核酸は、DNAもしくはRNA、またはそれらの混合物であってもよく、ホモ二重鎖、ヘテロ二重鎖、およびハイブリッド状態を含む、一本鎖または二本鎖の形態で永久的または遷移的に存在してもよい。いくつかの実施形態では、核酸または核酸配列は、例えば、DNA/RNA螺旋、ペプチド核酸 (PNA)、モルホリノ、ロックド核酸 (LNA)、および／またはリボザイムなどの他の種類の核酸構造を含む。従って、用語「核酸」または「核酸配列」はまた、天然ヌクレオチド (例えば、「ヌクレオチド類似体」) と同じ機能を示し得る非天然ヌクレオチド、改変ヌクレオチド、および／または非ヌクレオチド構築ブロックを含む鎖を包含し得、さらに、本明細書中で使用される用語「核酸配列」は、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、およびそれらの断片または部分、ならびに、一本鎖または二本鎖であり得、センス鎖またはアンチセンス鎖を表す、ゲノム由来または合成由来のDNAまたはRNAをいう。

【0039】

本明細書中で使用される場合、用語「ヌクレオチド類似体」は、修飾された、または、非天然に存在するヌクレオチドをいい、限定はされないが、7-デアザプリン (すなわち、7-デアザ-dATP および 7-デアザ-dGTP) などの、変性したスタッキング相互作用を有する類似体；選択的な水素結合の構成を有する塩基類似体 (例えば、Iso-C、Iso-G、および、S. Benner に付与され、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 6,001,983 号に記載されたその他の非標準の塩基対)；非水素結合類似体 (例えば、2,4-ジフルオロトルエンなどの、無極性の、芳香族ヌクレオシド類似体。2,4-ジフルオロトルエンは、B. A. Schweitzer and E. T. Kool, J. Org. Chem., 1994, 59, 7238-7242, B. A. Schweitzer and E. T. Kool, J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 1863-1872 に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる)；5-ニトロインドールおよび3-ニトロピロールなどの「普遍的な」塩基；普遍的なプリンおよびピリミジン (それぞれ、「K」および「P」ヌクレオチドなど。P. Kong et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17, 10373-10383, P. Kong et al., Nucleic Acids Res., 1992, 20, 5149-5152)。ヌクレオチド類似体には、糖部分に修飾を有するヌクレオチド、例えばジデオキシヌクレオチドおよび2'-O-メチルヌクレオチドが含まれる。ヌクレオチド類似体には、デオキシリボヌクレオチドの修飾形態ならびにリボヌクレオチドが含まれる。

【0040】

「ペプチド核酸」は、ペプチド状のポリアミド骨格を組み込む擬態DNAを意味する。

【0041】

本明細書中で使用される場合、用語「相補的」または用語「相補性」は、塩基対合則によって関連付けられるポリヌクレオチド (例えば、オリゴヌクレオチド捕捉プローブ、クエリープローブ、または核酸である標的分析物などのヌクレオチドの配列) に関して使用される。例えば、配列「5'-A-G-T-3'」は、配列「3'-T-C-A-5'」と相補

10

20

30

40

50

的である。相補性は「部分的」であってもよく、核酸の塩基のいくつかのみが、塩基対合則に従ってマッチしてもよい。または、核酸間で「完全な」または「全体的な」相補性が存在してもよい。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に大きく影響する。これは、増幅反応、ならびに核酸間の結合に依存する検出方法において特に重要である。いずれのタームもまた、個々のヌクレオチドに関して、特にポリヌクレオチドの文脈内で使用され得る。例えば、オリゴヌクレオチド内の特定のヌクレオチドは、残りのオリゴヌクレオチドと核酸鎖との間の相補性とは対照的に、または比較して、別の核酸鎖内のヌクレオチドに対するその相補性またはその欠如について注目され得る。

【0042】

ある文脈において、用語「相補性」および関連用語（例えば、「相補的」、「相補体」）は、水素結合、例えば、ワトソン-クリック塩基対形成または他の塩基対形成によって塩基対形成することができるヌクレオチドを介して、他の核酸配列に結合することができる核酸配列のヌクレオチドをいう。例えば、互いに相補的である塩基対を形成できるヌクレオチドは、シトシンおよびグアニン、チミンおよびアデニン、アデニンおよびウラシル、ならびにグアニンおよびウラシルの各対である。相補性の割合は、核酸配列の全長にわたって計算する必要はない。相補性の割合は、例えば、最初の塩基対ヌクレオチドから始まり、最後の塩基対ヌクレオチドで終わる、塩基対である核酸配列の特定の領域に限定され得る。本明細書で使用される核酸配列の相補体は、一方の配列の5'末端が他方の配列の3'末端と対合するように核酸配列に位置合わせされたときに、「逆平行会合」となるオリゴヌクレオチドをいう。天然の核酸には一般に見出されない特定の塩基が本発明の核酸に含まれていてもよく、例えば、イノシンおよび7-デアザグアニンを含んでいてもよい。相補性は完全である必要はなく、安定な二重鎖は、ミスマッチ塩基対または非マッチ塩基を含み得る。核酸技術の分野の当業者は、例えば、オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドの塩基組成および配列、イオン強度、ならびにミスマッチ塩基対の発生率を含む多くの変数を考慮して、二重鎖安定性を経験的に特定することができる。

【0043】

したがって、いくつかの実施形態では、「相補的」は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、またはそれ以上の核酸塩基の領域にわたって、第2の核酸塩基配列の相補体と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一である、または2つの配列が厳密なハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする第1の核酸塩基配列をいう。「完全に相補的」とは、第1の核酸の各ヌクレオチドが、第2の核酸中の対応する位置で各核酸塩基と対合することが可能であることを意味する。例えば、ある実施形態において、各核酸塩基が核酸に対して相補性を有するオリゴヌクレオチドは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、またはそれ以上の核酸塩基の領域にわたって、核酸の相補体と同一である核酸塩基配列を有する。

【0044】

「ミスマッチ」とは、第2の核酸の対応する位置で核酸塩基と対合することが不可能な第1の核酸の核酸塩基を意味する。

【0045】

用語「ドメイン」は、ポリペプチドに関して使用される場合、独特の構造的および／または機能的特性を有するポリペプチドのサブセクションをいい、典型的には、この特性は、多様なポリペプチドにわたって類似する。サブセクションは、典型的には隣接するアミノ酸を含むが、フォールディングまたは他の形態によって共に作用し、または、近接するアミノ酸を含んでいてもよい。タンパク質ドメインの例としては、膜貫通ドメイン、グリ

10

20

30

40

50

コシル化部位などが挙げられる。

【0046】

用語「遺伝子」は、RNA、またはポリペプチドもしくはその前駆体（例えば、プロインスリン）の生成に必要なコード配列を含む核酸（例えば、DNAまたはRNA）配列をいう。機能的ポリペプチドは、ポリペプチドの所望の活性または機能的特性（例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達など）が保持される限り、全長コード配列によって、またはコード配列の任意の部分によってコードされ得る。用語「部分」は、遺伝子に関して使用される場合、その遺伝子の断片をいう。断片のサイズは、数ヌクレオチドから、遺伝子配列全体から1ヌクレオチドを引いたものまでの範囲であってもよい。したがって、「遺伝子の少なくとも一部を含むヌクレオチド」は、遺伝子の断片または遺伝子全体を含み得る。

10

【0047】

用語「遺伝子」はまた、構造遺伝子のコード領域を包含し、遺伝子が全長mRNAの長さに対応するように、5'末端および3'末端の両方のコード領域に隣接して、両方の端部で約1kbの距離にわたって位置する配列を含む。コード領域の5'に位置し、mRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列と呼ばれる。コード領域の3'または下流に位置し、mRNA上に存在する配列は、3'非翻訳配列と呼ばれる。用語「遺伝子」は、遺伝子のcDNA型およびゲノム型の両方を含む。遺伝子のゲノム型またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」もしくは「介在配列」と呼ばれる非コード配列で中断されたコード領域を含む。イントロンは、核RNA（hnRNA）に転写される遺伝子のセグメントであり、イントロンがエンハンサーのような調節エレメントを含み得る。イントロンは、核転写産物または一次転写産物から除去または「スプライスアウト」される。したがって、イントロンは、メッセンジャーRNA（mRNA）転写産物には存在しない。mRNAは、新生ポリペプチドにおけるアミノ酸の配列または順序を特定するように翻訳中に機能する。

20

【0048】

イントロンを含むことに加えて、遺伝子のゲノム形態はまた、RNA転写物上に存在する配列の5'末端および3'末端の両方に位置する配列を含み得る。これらの配列は、「フランキング」配列または領域と呼ばれる（これらのフランキング配列は、mRNA転写産物上に存在する非翻訳配列の5'または3'に位置する）。5'フランキング領域は、遺伝子の転写を制御または遺伝子の転写に影響するプロモーターおよびエンハンサーのような制御配列を含み得る。3'フランキング領域は、転写の終結、転写後切断、およびポリアダニル化を引き起こす配列を含み得る。

30

【0049】

用語「野生型」は、天然に存在する源から単離された場合の特徴を有する遺伝子または遺伝子産物をいう。野生型遺伝子は、集団において最も頻繁に観察され、従って、遺伝子の「正常」または「野生型」形態と任意に呼ばれる。対照的に、用語「修飾された」、「突然変異体」、または「多形型」は、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較した場合に、配列および／または機能特性（すなわち、変質された特徴）における修飾を示す遺伝子または遺伝子産物をいう。天然に存在する突然変異体を単離することができることに留意されたい。これらは、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較した場合に、それらが変質した特性を有するという事実によって同定される。したがって、用語「変異体」および「突然変異体」は、ヌクレオチド配列に関して使用される場合、別の、通常は関連するヌクレオチド酸配列と1つ以上のヌクレオチドが異なる核酸配列をいう。「変異」は、2つの異なるヌクレオチド配列間の差異であり、いくつかの実施形態では、1つの配列が参照配列である。

40

【0050】

用語「対立遺伝子」は、遺伝子における様々な変異をいい、変異は変異体および突然変異体、多形性遺伝子座および単一ヌクレオチド多形性遺伝子座、フレームシフトおよびスプライス変異を含むが、これらに限定されない。対立遺伝子は、集団において天然に存在

50

し得るか、または集団における任意の特定の個体の生存期間の間に生じ得る。

【0051】

本明細書中で使用される場合、用語「ハイブリダイゼーション」は、相補的核酸の対合に関して使用される。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの強度（例えば、核酸間の会合の強度）は、核酸間の相補性の程度、関与する状態の厳密性、および形成されたハイブリッドの T_m などの因子によって影響される。「ハイブリダイゼーション」方法は、1つの核酸を別の相補的核酸（例えば、相補的ヌクレオチド配列を有する核酸）にアニーリングすることを含む。相補的配列を含む核酸の2つのポリマーが塩基対合相互作用によって互いを見つけ、アニールする能力は、よく認識されている現象である。Marmur and Lane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:453 (1960)、およびDoty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:461(1960)による「ハイブリダイゼーション」プロセスの最初の報告に続いて、このプロセスは改良されて、現代生物学の必要不可欠なツールとなっている。

10

【0052】

本明細書中で使用される場合、用語「 T_m 」は、「融解温度」に関して使用される。融解温度は、二本鎖核酸分子の集団が半分解離して一本鎖になる温度である。核酸の T_m を計算するためのいくつかの式は、当技術分野で周知である。標準的な参考文献に示されるように、 T_m 値の簡単な推定値は、核酸が1MのNaCl水溶液中にある場合には、 $T_m = 81.5 + 0.41 * (\%G + C)$ の式で計算し得る（例えば、Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization (1985)を参照）。他の参考文献（例えば、Allawi and SantaLucia, Biochemistry 36: 10581-94 (1997)）には、構造的特性、環境的特性、および配列特性を考慮して T_m を計算する、より精巧な計算が挙げられている。例えば、いくつかの実施形態では、これらの計算が（例えば、実施例で使用されるような）短い核酸プローブおよび標的についての T_m の改善された推定値を提供する。

20

【0053】

用語「タンパク質」および用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合を介して結合するアミノ酸を含む化合物をいい、交換可能に用いられる。遺伝子によってコードされる「タンパク質」または「ポリペプチド」は、遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に限定されず、タンパク質の翻訳後修飾を含む。用語「アミノ酸配列」が、タンパク質分子のアミノ酸配列を指すように本明細書中に記載されている場合、「アミノ酸配列」、および「ポリペプチド」または「タンパク質」などの類似の用語は、アミノ酸配列を、記載されたタンパク質分子と関連する完全な天然のアミノ酸配列に限定することを意味するものではない。さらに、「アミノ酸配列」は、タンパク質をコードする核酸配列から推定することができる。従来の1文字および3文字のアミノ酸コードは、本明細書中で以下のように使用される。アラニン：Ala、A；アルギニン：Arg、R；アスパラギン：Asn、N；アスパラギン酸：Asp、D；システイン：Cys、C；グルタミン酸：Glu、E；グルタミン：Gln、Q；グリシン：Gly、G；ヒスチジン：His、H；イソロイシン：Ile、I；ロイシン：Leu、L；リジン：Lys、K；メチオニン：Met、M；フェニルアラニン：Phe、F；プロリン：Pro、P；セリン：Ser、S；スレオニン：Thr、T；トリプトファン：Trp、W；チロシン：Tyr、Y；バリン：Val、V。本明細書中で使用される場合、コードXaaおよびコードXは、任意のアミノ酸をいう。

30

40

【0054】

用語「変異体」および用語「突然変異体」は、ポリペプチドに関して使用する場合、別のアミノ酸、通常は関連するポリペプチドと、1つ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸配列をいう。

【0055】

本明細書において使用される用語「融解」は、核酸に関して使用される場合、二本鎖核酸または核酸の領域が、一本鎖核酸または核酸領域に解離することをいう。

50

【0056】

本明細書において使用される場合、「クエリープローブ」または「リーダープローブ」は、分析物を認識する（例えば、分析物と結合する、例えば、分析物と特異的に結合する）任意の実体（例えば、分子、生体分子など）である。例示的な実施形態では、クエリープローブは、分析物を認識するタンパク質である。いくつかの他の例示的な実施形態では、クエリープローブは、分析物を認識する核酸（例えば、DNA、RNA、DNAおよびRNAを含む核酸、修飾された塩基および／または塩基間に修飾された結合を含む核酸、例えば、上述した核酸、核酸アプタマー）である。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、例えば、本明細書に記載されるような蛍光部分などの検出可能な標識で標識される。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、2つ以上のタイプの分子（例えば、タンパク質、核酸、化学リンカー、または化学部分のうちの2つ以上）を含む。

10

【0057】

本明細書において使用される場合、「事象」は、例えば、クエリープローブの分析物に対する結合および／またはクエリープローブの分析物からの解離を示す検出可能な特性をモニターすることによって測定されるような、クエリープローブが分析物と結合すること、またはクエリープローブが分析物から解離することをいう。

【0058】

本明細書において使用される場合、「捕捉プローブ」は、分析物を認識する（例えば、分析物と結合する、例えば、分析物と特異的に結合する）、また分析物を固体支持体に連結させる、任意の実体（例えば、分子、生体分子など）である。例示的な実施形態では、捕捉プローブは、分析物を認識するタンパク質である。他の例示的な実施形態では、捕捉プローブは、分析物を認識する核酸（例えば、DNA、RNA、DNAおよびRNAを含む核酸、修飾された塩基および／または塩基間に修飾された結合を含む核酸、例えば、上述した核酸、核酸アプタマー）である。いくつかの実施形態では、捕捉プローブは、例えば、本明細書に記載の蛍光部分などの検出可能な標識で標識される。いくつかの実施形態において、捕捉プローブは、2つ以上のタイプの分子（例えば、タンパク質、核酸、化学リンカー、または化学部分のうちの2つ以上）を含む。

20

【0059】

本明細書において使用される場合、用語「感度」は、試料が分析物を含む場合にアッセイが分析物について陽性の結果を与える確率をいう。感度は、真陽性結果の数を真陽性および偽陰性の合計で割ったものとして計算される。感度は、アッセイがどのくらい良好に分析物を検出するかの尺度である。

30

【0060】

本明細書において使用される場合、用語「特異度」は、試料が分析物を含まない場合にアッセイが陰性の結果を与える確率をいう。特異度は、真陰性結果の数を真陰性および偽陽性の合計で割ったものとして計算される。特異度は、本発明の方法が、分析物を含む試料から、分析物を含まない試料をどのくらい良好に排除するかの尺度である。

【0061】

本明細書中で使用される場合、「平衡定数」(K_{eq})、「平衡会合定数」(K_a)、および「会合結合定数」（または「結合定数」(K_B))は、平衡でのAおよびBの以下の結合反応について交換可能に用いられる。

40

【0062】

【数1】



【0063】

ここで、AおよびBは、互いに会合する2つの実体（例えば、捕捉プローブおよび分析物、クエリープローブおよび分析物）であり、 $K_{eq} = [AB] / ([A] \times [B])$ である。解離定数は、 $K_D = 1 / K_B$ である。 K_D は、1つの結合パートナーAの、結合する

50

パートナーBに対する親和性を表すための有益な方法であり、例えば、数 K_D は、有意な量のABを生じるために必要とされるAまたはBの濃度を表す。 $K_{eq} = k_{off} / k_{on}$; $K_D = k_{off} / k_{on}$ 。

【0064】

本明細書において使用される場合、互いに会合する2つの実体からの生成物（例えば、上述の式によるAおよびBからのABの形成）の「有意な量」は、AまたはBの遊離濃度のうちの少ない方以上のABの濃度をいう。

【0065】

本明細書において使用される場合、「ナノモル親和性範囲」は、ナノモル範囲に平衡解離定数 K_D （例えば、 k_{off} / k_{on} の比）を有する2つの成分の会合をいい、例えば、 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-5} M$ の解離定数（ K_D ）（例えば、いくつかの実施形態において、 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6} M$ ）である。解離定数は、モル単位（M）を有する。解離定数が小さいほど、2つの成分（例えば、捕捉プローブおよび分析物、クエリープローブおよび分析物）の間の親和性は高くなる。

【0066】

本明細書中で使用される場合、「弱い親和性」または「弱い結合」または「弱い会合」は、約100ナノモル（例えば、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、または500ナノモル）および／またはいくつかの実施形態では、1ナノモル～10マイクロモルの範囲の K_D を有する会合をいう。

【0067】

用語「特異的結合」または用語「特異的に結合」は、互いに会合する2つの成分AおよびBの相互作用に関して使用される場合、溶液中の他の類似の成分、例えば、AまたはBではない溶液中の少なくとも1つの他の分子種とのAまたはBの相互作用の K_D よりも小さい K_D を有するAおよびBの会合をいう。

【0068】

本明細書で使用される場合、「存在」または「非存在」（あるいは、「存在する」または「存在しない」）は、特定の实体（例えば、分析物）の量またはレベルを表すために相対的な意味で使用される。例えば、分析物が試料中に「存在する」という場合、この分析物のレベルまたは量が、所定の閾値を越えていることを意味し、逆に、分析物が試料中に「存在しない」という場合、この分析物のレベルまたは量が、所定の閾値によりも下であることを意味する。所定の閾値は、分析物を検出するために使用される特定の試験に関連する検出可能性の閾値、または任意の他の閾値であってもよい。分析物が試料中で「検出される」場合、それは試料中に「存在する」；分析物が「検出されない」場合、それは試料中に「存在しない」。さらに、分析物が「検出される」か、または分析物が「存在する」試料は、分析物について「陽性」である試料である。分析物が「検出されない」か、または分析物が「存在しない」試料は、分析物について「陰性」である試料である。

【0069】

本明細書において使用する場合、「増加」または「減少」は、これまでに測定された変数の値に対する、あらかじめ決められた値に対する、および／または標準対照の値に対する、変数の値における、検出可能な（例えば、測定された）正または負の変化をいう。増加は、これまでに測定された変数の値、あらかじめ決められた値、および／または標準対照の値に対して、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは50%、さらにより好ましくは2倍、さらにより好ましくは少なくとも5倍、最も好ましくは少なくとも10倍の正の変化である。同様に、減少は、これまでに測定された変数の値、あらかじめ決められた値、および／または標準対照の値の、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは50%、さらにより好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%の負の変化である。「より多い」または「より少ない」などの、定量的な変化または差異を示す他の用語は、本明細書において、上記と同じように使用される。

【0070】

用語「検出アッセイ」は、分析物が存在するかしないか、または分析物の活性もしくは効果を検出するための、あるいは分析物の変異体が存在するかしないかを検出するためのアッセイをいう。

【0071】

「システム」は、各構成要素が全体内の少なくとも1つの他の構成要素と相互作用するか、または関連する全体を含む、現実のまたは抽象的な構成要素の組を示す。

【0072】

いくつかの実施形態では、本技術は、抗体成分または部分、例えば、抗体またはその断片もしくは誘導体を含む。本明細書において使用される場合、「抗体」は、「免疫グロブリン」（例えば、IgG、IgM、IgA、IgD、IgE）としても知られているが、ジスルフィド結合によって互いに連結された2本の重鎖と、それぞれがジスルフィド結合によって重鎖に連結された2本の軽鎖とを含む。抗体の特異性は、抗体の抗原結合部位（またはパラトープ）と抗原決定基（またはエピトープ）との間の構造的相補性にある。抗原結合部位は、主に超可変または相補性決定領域（CDRs）からの残基から構成される。しばしば、非超可変またはフレームワーク領域からの残基が、全体的なドメイン構造に影響を及ぼすため、結合部位に影響を及ぼす。いくつかの実施形態は、抗体の断片、例えば、免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含み、例えば当該分子と抗原との間の特異的相互作用を可能にする任意のタンパク質またはポリペプチド含有分子を含む。免疫グロブリン分子の一部は、重鎖または軽鎖またはそのリガンド結合部分、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク領域、あるいはその任意の一部の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含み得るが、これらに限定されない。このような断片は、当該分野で公知であるように、および／または本明細書中に記載されるように、酵素的開裂、合成または組換え技術によって生成され得る。抗体はまた、1つ以上の終止コドンが天然の終止部位の上流に導入されている抗体遺伝子を使用して、種々の切断型で生成され得る。抗体の種々の部分は、従来技術によって化学的に結合され得るか、または遺伝子工学技術を使用して連続したタンパク質として調製され得る。

【0073】

抗体の断片には、（例えば、パパイシン消化による）Fab断片、（例えば、ペプシン消化による）F(ab')₂断片、（例えば、ペプシン消化および部分還元による）Fab'断片、および（例えば、分子生物学技術による）Fv断片またはscFv断片が含まれるが、これらに限定されない。

【0074】

Fab断片は、抗体をプロテアーゼパパイシンで処理することによって得ることができる。また、Fabは、原核生物発現系または真核発現系のベクターに抗体のFabをコードするDNAを挿入し、ベクターを原核生物または真核に導入してFabを発現させることによって生成してもよい。F(ab')₂は、抗体をプロテアーゼペプシンで処理することによって得てもよい。また、F(ab')₂は、チオエーテル結合またはジスルフィド結合を介してFab'を結合することによって生成することができる。Fabは、F(ab')₂を還元剤、例えばジチオトレイトールで処理することによって得てもよい。また、Fab'は、抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物の発現ベクターまたは真核生物の発現ベクターに挿入し、ベクターを原核生物または真核生物に導入して発現させることによって生成することができる。Fv断片は、ペプシンによる制限切断（例えば、4℃およびpH4.0）によって生成してもよい。（「冷ペプシン消化」と呼ばれる方法）。Fv断片は、強力な非共有相互作用によって共に保持された重鎖可変ドメイン（V_H）および軽鎖可変ドメイン（V_L）からなる。scFv断片は、上述のようにV_HドメインおよびV_LドメインをコードするcDNAを得て、scFvをコードするDNAを構築し、原核生物の発現ベクターまたは真核生物の発現ベクターにDNAを挿入し、次いで発現ベクターを原核生物または真核生物に導入してscFvを発現させることによって生成してもよい。

【0075】

一般に、抗体は、通常、当技術分野で現在よく知られている多くの従来技術を使用して

、任意の抗原に対して生じさせることができる。

【0076】

本明細書で使用される場合、用語「共役された」は、1つの分子または薬物が物理的にまたは化学的に別の分子または薬物に結合するか、または付着することを意味する。共役の例には、共有結合および静電複合体化が含まれる。用語「複合体化された」、用語「と複合体化された」、および用語「共役された」は、本明細書において交換可能に使用される。

【0077】

本明細書で使用される場合、「安定的な相互作用」または「安定的に結合された」相互作用ということは、相互作用の熱力学的平衡条件下で比較的持続性のある会合をいう。いくつかの実施形態では「安定的な相互作用」が約 10^{-9} M未満の K_D 、またはいくつかの実施形態では、 10^{-8} M未満の K_D を有する2つの成分間の相互作用である。いくつかの実施形態では、「安定的な相互作用」が1/時未満の解離速度定数 k_{off} 、または、いくつかの実施形態では、1/分未満の解離速度定数 k_{off} を有する。いくつかの実施形態では、「安定的な相互作用」は、「一過性の相互作用」ではないと定義される。いくつかの実施形態では、「安定的な相互作用」は、共有結合によって媒介される相互作用、および、典型的には K_D 値によって記載されないが、それぞれの相互作用当たり約1分（例えば、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、または180秒）より長い、2つの実体間の平均会合寿命を伴う他の相互作用を含む。

【0078】

いくつかの実施形態では、「安定的な相互作用」と「一過性の相互作用」との間の区別は、 K_D および/または k_{off} のカットオフ値、および/または会合を示す別の動力学的または熱力学的値によって決定され、カットオフは、 K_D および/または k_{off} 、あるいは会合を示す別の動力学的または熱力学的値の絶対的な用語で記載される場合、そうでなければ異なって特徴付けられ得る安定的な相互作用と一過性の相互作用とを区別するために使用される。例えば、 K_D 値によって特徴付けられる「安定的な相互作用」は、さらにより安定的な別の相互作用との関連においては、「一過性の相互作用」として特徴付けられてもよい。当業者は、安定相互作用と一過性の相互作用の他の相対比較、例えば、 K_D 値によって特徴付けられる「一過性の相互作用」は、さらにより一過性である（安定性が低い）別の相互作用との関連において「安定的な相互作用」として特徴付けられてもよいことを理解するであろう。

【0079】

本明細書中で使用される場合、「部分」は、何かを2つ以上の部分に分け得るときの1部分をいい、例えば、オリゴヌクレオチド、分子、化学基、ドメイン、プローブ、「R」基、ポリペプチドなどの様々な部分のうちの1部分をいう。

【0080】

本明細書中で使用される場合、いくつかの実施形態において、「シグナル」は、アッセイされる試料の1つ以上の特性（例えば、分析物へのクエリープローブの結合および/または分析物からのクエリープローブの解離）に関連する、時間的に変化する量である。シグナルは、時間ドメインにおいて連続的であってもよいし、時間ドメインにおいて離散的であってもよい。数学的抽象化として、連続時間シグナルのドメインは、実数の集合（またはその間隔）であり、離散時間シグナルのドメインは、整数の集合（またはその間隔）である。離散シグナルは、連続シグナルの「デジタルサンプリング」を介して生じることが多い。例えば、オーディオシグナルは、導線の電圧レベルを規則的な間隔で、例えば50マイクロ秒毎に読み取ることによってデジタル化することができるような、導線の連続的に変動する電圧からなる。結果として得られる数のストリームは、離散時間デジタルシグナルとして記憶される。いくつかの実施形態では、シグナルは、空間（例えば、 x 、 y 座標、例えば、 x 、 y 、 z 座標）の位置の関数として記録される。いくつかの実施形態で

は、シグナルは、時間の関数として記録される。いくつかの実施形態では、シグナルは、時間および位置の関数として記録される。

【0081】

本明細書で使用される用語「実質的に」は、広義の用語であり、その通常の意味で使用され、主に特定されるものであるが、必ずしも完全に特定されるものではないことを含むが、これに限定されない。

【0082】

本明細書で使用される用語「アルゴリズム」は、広義の用語であり、その通常の意味で使用され、例えば、コンピュータ処理を使用して、情報を1つの状態から別の状態に変換することに関与する計算プロセス（例えば、プログラム）を含むが、これに限定されない。

【0083】

〔記述〕

ここでの開示は、ある図示された実施形態について言及するが、これらの実施形態は単なる例として示されたものであって、限定する目的で示されたものではないことを理解されたい。

【0084】

〔ポアソン過程〕

本技術の実施形態は、標的分析物に結合するクエリープローブの特徴的な動態を記録することによる単一分子認識に関する。特定の実施形態では、このプロセスは、ポアソン過程である。ポアソン過程は、事象（例えば、検出可能に標識された（例えば、蛍光性）クエリープローブの固定化された標的分析物への一過性の結合）が所定の時間間隔内に生じる発生の回数および時間をカウントする連続時間確率過程である。連続する事象の各ペアの間の時間間隔は、指数分布を有し、各間隔は、他の間隔とは独立であると見なされる。ポアソン分布は、所定の数の事象が既知の平均速度で、最後の事象以降の時間と独立して生じる場合に、所定の時間間隔内に生じる所定の数の事象の確率を表す離散確率分布である。ポアソン分布はまた、距離、面積、または体積などの他の特定の時間間隔における事象の数に使用することもできる。

【0085】

ポアソン分布は、試行回数 n が多く、成功確率 p が小さく、プロダクト $np = \lambda$ が中程度である通常の二項分布の特殊なケースである。ポアソン過程では、任意の時間 t における事象の数 N が j である確率が、ポアソン確率分布 $P_j(t)$ に従う。

【0086】

〔数2〕

$$P_j(t) = \frac{e^{-\lambda t} (\lambda t)^j}{j!}, j = 0, 1, 2, \dots \quad (1).$$

【0087】

すなわち、時間 t までに生じる事象の数 N は、パラメータ λt を有するポアソン分布を有する。ポアソン過程およびポアソン分布に関連する統計的および数学的方法は、当技術分野で知られている。例えば、"Stochastic Processes(i): Poisson Processes and Markov Chains" in Statistics for Biology and Health - Statistical Methods in Bioinformatics (Ewans and Grant, eds.), Springer (New York, 2001), page 129 et seq.を参照のこと。この全体が参照により本明細書に組み込まれる。MatlabおよびRなどのソフトウェアパッケージを使用して、ポアソン過程、ポアソン確率、およびポアソン分布に関連する数学的および統計的方法を実行してもよい。

【0088】

〔検出の動態〕

本技術の特定の実施形態は、クエリープローブと検出されるべき分析物との相互作用の動態を分析することによって分析物を検出することに関する。クエリープローブ Q （例え

ば、平衡濃度 $[Q]$) と標的分析物 T (例えば、平衡濃度 $[T]$) との相互作用について、反応速度定数 k_{on} は、分析物 T にハイブリッド化されたプローブ Q を含む複合体 QT の時間依存形成を表す。特定の実施形態において、 QT 複合体の形成は、クエリープローブの濃度に依存し、 $M^{-1}min^{-1}$ (など) の単位を有する二次速度定数に関連する一方、 QT 複合体の形成は、 QT 複合体の形成に関連する疑似一次速度定数である k_{on} によって十分に表される。よって、本明細書中で使用されるように、 k_{on} は、見かけ (「疑似」) 一次速度定数である。

【0089】

同様に、運動速度定数 k_{off} は、複合体 QT によるプローブ Q および分析対象物 T への時間依存的解離を表す。運動速度は、典型的には本明細書において、 min^{-1} または s^{-1} の単位で示される。結合状態 (τ_{on}) でのクエリープローブ Q の「滞留時間」は、クエリープローブ Q が分析物 T に結合して QT 複合体を形成する各場合の間に、プローブ Q が分析物 T にハイブリダイズされる時間間隔 (例えば、時間の長さ) である。非結合状態 (τ_{off}) でのクエリープローブ Q の「滞留時間」は、クエリープローブ Q が分析物に結合して QT 複合体を形成する各場合の間に、プローブ Q が分析物 T にハイブリダイズされない時間間隔 (例えば、時間の長さ) である (例えば、クエリープローブ Q の標的分析物 T への連続する結合事象の間で、クエリープローブ Q が標的分析物 T から解離される時間)。滞留時間は、多数の結合および非結合事象を統合した平均または加重平均として与えられてもよい。

【0090】

さらに、いくつかの実施形態では、プローブ (例えば、検出可能に標識されたクエリープローブ (例えば、蛍光プローブ)) の標的分析物への反復された確率的結合は、単位時間当たり一定の確率で起こるポアソン過程としてモデル化され、単位時間当たりの結合事象および解離事象の数 (N_{b+d}) の標準偏差は、 $(N_{b+d})^{1/2}$ として増加する。従って、統計的ノイズは、観測時間が増加するにつれて、 N_{b+d} のより小さな一部となる。したがって、観察は、標的結合と標的外結合との間の識別を達成するために、いくつかの実施形態において必要に応じて延長される。また、取得時間が増加するにつれて、 N_{b+d} ヒストグラムにおけるシグナルピークおよびバックグラウンドピークは、ますます分離され、シグナル分布の幅は、動態モンテカルロシミュレーションと一致して、 N_{b+d} の平方根として増加する。

【0091】

さらに、いくつかの実施形態において、アッセイ条件は、バックグラウンド結合から標的分析物へのクエリープローブ結合事象を識別することを改善するために、動態挙動を調整するように制御される。例えば、いくつかの実施形態では、本技術は、例えば、標的分析物と弱く相互作用するように設計されたクエリープローブを使用すること (例えば、ナノモル親和性範囲で)、クエリープローブが標的分析物と弱く相互作用するように温度を制御すること、溶液条件、例えば、イオン強度、イオン組成、カオトロピック剤の添加、および競合するプローブの添加を制御すること、などのアッセイ条件の制御を含む。

【0092】

[分析物]

本技術は、検出される、定量される、同定される、または他で特徴付けられる (例えば、存在、非存在、量、濃度、状態) 分析物に限定されない。本明細書で使用される用語「分析物」は、広義の用語であり、その通常の意味で使用され、分析することができる生体液体 (例えば、血液、間質液、脳脊髄液、リンパ液、または尿) などの試料中の物質または化学成分をいうことを含むが、これらに限定されない。分析物は、天然に存在する物質、人工物質、代謝産物、および／または反応生成物を含むことができる。いくつかの実施形態では、分析物は、塩、糖、タンパク質、脂肪、ビタミン、またはホルモンを含む。いくつかの実施形態において、分析物は、生体試料中に天然に存在する (例えば、「内因性」である)。例えば、いくつかの実施形態において、分析物は、代謝産物、ホルモン、抗原、抗体などである。あるいは、いくつかの実施形態において、分析物は、生物学的生物 (

例えば、「外因性」）、例えば、薬物、薬物代謝産物、薬物前駆体（例えば、プロドラッグ）、画像化のための造影剤、放射性同位体、化学物質などに導入される。薬物および医薬組成物の代謝産物もまた、意図される分析物である。

【0093】

いくつかの実施形態では、分析物は、ポリペプチド、核酸、小分子、脂質、炭水化物、多糖、脂肪酸、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質、有機分子、無機分子、補因子、医薬、生物活性物質、細胞、組織、生物などである。いくつかの実施形態では、分析物は、ポリペプチド、核酸、小分子、脂質、炭水化物、多糖、脂肪酸、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質、有機分子、無機分子、補因子、医薬、生物活性物質、細胞、組織、生物などを含む。いくつかの実施形態では、分析物は、ポリペプチド、核酸、小分子、脂質、炭水化物、多糖、脂肪酸、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質、有機分子、無機分子、補因子、医薬、生物活性物質、細胞、組織、生物などのうちの1つ以上の組み合わせを含む。

10

【0094】

いくつかの実施形態において、分析物は、多分子複合体の一部であり、例えば、マルチタンパク質複合体、核酸／タンパク質複合体、分子機械、オルガネラ（例えば、血漿中の無細胞ミトコンドリア、色素体、ゴルジ、小胞体、液胞、ペルオキシソーム、リソソーム、および／または核）、細胞、ウイルス粒子、組織、生物、または、捕捉され得、そして本明細書中に記載される技術による分析に従う任意の高分子複合体もしくは構造または他の実体（例えば、リボソーム、スプライソソーム、ボルト、プロテアソーム、DNAポリメラーゼIIIホロ酵素、RNAポリメラーゼIIIホロ酵素、対称性ウイルス性カプシド、GroEL／GroES；膜タンパク質複合体：光化学系I、ATPシンターゼ、ヌクレオソーム、中心小体、および微小管形成中心（MTOC）、細胞骨格、べん毛、核小体、ストレス顆粒、生殖細胞顆粒、神経型輸送顆粒）の一部である。例えば、いくつかの実施形態では、多分子複合体が単離され、本技術は、多分子複合体に関連する（例えば、その成分である）1つ以上の分子（分析物）を特徴付け、同定し、定量し、および／または検出することに使用される。いくつかの実施形態では、細胞外小胞が単離され、本技術は、小胞に関連する1つ以上の分子（分析物）を特徴付け、同定し、定量し、および／または検出することに使用される。いくつかの実施形態では、本技術は、小胞内に存在するタンパク質（例えば、表面タンパク質）および／または分析物（例えば、本明細書中に記載されるタンパク質、核酸、または他の分析物）を特徴付け、同定し、定量し、および／または検出することに使用される。いくつかの実施形態では、小胞は、分析前に固定化され、透過化される。

20

30

【0095】

いくつかの実施形態において、分析物は、クエリープローブ結合のための部位を提供するために化学的に修飾される。例えば、いくつかの実施形態において、強塩基性条件下でのホスホセリンおよびホストレオニンのベータ脱離を使用して、アルケンを導入し、続いて、求核試薬（例えば、ジチオール）をアルケンにマイケル付加する。次いで、残りの遊離チオールを、オリゴヌクレオチドクエリープローブに相補的な配列を有するマレイミド含有オリゴヌクレオチドへの共役のために使用する。次いで、翻訳後修飾ホスホセリンおよびホストレオニンを、クエリープローブを用いてプローブし、本明細書に記載のように分析することができる。

40

【0096】

本明細書中で使用される場合、「分析物を検出する」または「物質を検出する」は、分析物自体を直接検出すること、または、その副産物を検出することによって分析物を間接的に検出することを含むことが理解されるであろう。

【0097】

〔捕捉〕

本技術の実施形態は、分析物の捕捉を含む。いくつかの実施形態では、分析物は捕捉され、固定化される。いくつかの実施形態において、分析物は、固体支持体に安定的に付着される。いくつかの実施形態では、固体支持体は、固体支持体に接触するバルク液相に対

50

して不動である。いくつかの実施形態では、固体支持体は、固体支持体と接触するバルク液相内で拡散可能である。

【0098】

いくつかの実施形態では、表面または他の固体基質への標的分析物の安定的な付着が、高い親和性または不可逆的相互作用によってもたらされる（例えば、本明細書で使用される場合、「不可逆的相互作用」は、観察時間よりも長い解離半減期を有する相互作用をいい、例えば、いくつかの実施形態では、時間は1～5分（例えば、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、または600秒、またはより長い）である）。本技術は、分析物の捕捉に使用される構成要素および／または方法に関して限定されない。例えば、安定的な付着は、種々の方法によって実現される。当該方法は、以下の1つ以上を含むが、これに限定されない。

【0099】

いくつかの実施形態では、分析物が、約1ナノモル（nM）未満（例えば、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5ナノモル未満）の分析物の解離定数（ K_D ）、および、約 1 min^{-1} 未満（例えば、約1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5 min^{-1} 未満）の分析物の解離速度定数を有する表面結合捕捉プローブによって固定化される。具体例としての表面結合捕捉プローブは、例えば、抗体、抗体断片、ナノボディまたは他のタンパク質；高親和性DNA結合タンパク質またはリボ核タンパク質複合体（例えばCas9、dCas9、Cpf1、転写活性化因子、または転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALENs））；オリゴヌクレオチド、小有機分子；または金属イオン複合体である。

【0100】

いくつかの実施形態では、分析物は、表面への直接的な非共有結合によって（例えば、分析物と表面、例えば、ガラス表面またはナイロン、ニトロセルロース、またはポリビニリデンジフルオリド膜との間の相互作用によって）固定化される。

【0101】

いくつかの実施形態では、分析物は、分析物の固体支持体への化学結合によって（例えば、共有結合によって）固定化される。いくつかの実施形態では、分析物は、例えば、カルボジイミド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（NHS）エステル、マレイミド、ハロアセチル基、ヒドラジド、またはアルコキシアミンによって固体支持体に化学的に連結される。いくつかの実施形態では、分析物は、表面および／または表面に付着した捕捉プローブへの標的分析物の放射線（例えば、紫外線）誘導架橋によって固定化される。いくつかの実施形態では、捕捉プローブは、ウサギモノクローナル抗体である。分析物が炭水化物または多糖を含むいくつかの実施形態では、捕捉プローブは、レクチンまたは炭水化物結合抗体などの炭水化物結合タンパク質を含む。

【0102】

あるいは、上述のように、固体支持体に接触するバルク相に対して比較的静止している固体支持体に標的分析物を固定化する代わりに、いくつかの実施形態は、自由に拡散する粒子と接触するバルク流体相内で拡散する、自由に拡散する粒子と標的分析物が会合することを提供する。したがって、いくつかの実施形態では、標的分析物が自由に拡散する基板に共有結合または非共有結合される。いくつかの実施形態では、自由に拡散する基板が、例えば、コロイド粒子（例えば、約10～1000nm（例えば、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、または1000nm）の直径を

有する粒子)である。いくつかの実施形態では、自由に拡散する基板は、例えば、ポリスチレン、シリカ、デキストラン、金、またはDNAオリガミを含む、および／またはそれらから作製される。いくつかの実施形態では、標的分析物は、クエリープローブの拡散に対してゆっくりと拡散する自由に拡散する粒子と会合し、例えば、標的分析物は、クエリープローブの拡散係数の約10%未満(例えば、15、14、13、12、11、10、5、10.4、10.3、10.2、10.1、10.0、9.9、9.8、9.7、9.6、9.5、または9.0%以下)の拡散係数を有する。

【0103】

さらに、いくつかの実施形態では、標的分析物は、自由に拡散する粒子と会合し、標的分析物の位置は、クエリープローブ結合の観察および／または記録とは独立して観察可能および／または記録可能である。例えば、いくつかの実施形態において、検出可能な標識(例えば、蛍光物質、蛍光タンパク質、量子ドット)は、例えば、標的分析物の検出および局在化のために、標的分析物に共有結合または非共有結合で付着される。したがって、いくつかの実施形態では、標的分析物の位置およびクエリープローブ結合事象の位置は、同時にかつ独立して測定される。

【0104】

[クエリー]

本技術の実施形態は、分析物に一時的かつ反復的に結合するクエリープローブ(例えば、検出可能に標識されたクエリープローブ)、例えば、観察窓当たり数回(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10回以上)標的分析物に結合し、標的分析物から解離するクエリープローブを含む。いくつかの実施形態において、クエリープローブは、アッセイ条件下で、約1ナノモルを超える(例えば、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9または5.0ナノモル以上の)分析物についての解離定数(K_D)を有する。いくつかの実施形態において、クエリープローブは、約 1 min^{-1} より大きい(例えば、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、または 5.0 min^{-1} 以上の)分析物についての結合定数および／または解離定数を有する。

【0105】

本技術は、クエリープローブに限定されない。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、抗体または抗体断片である。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、低親和性抗体または抗体断片である。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、ナノボディ、DNA結合タンパク質もしくはタンパク質ドメイン、メチル化結合ドメイン(MBD)、キナーゼ、ホスファターゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、酵素、またはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、標的分析物と相互作用するオリゴヌクレオチドである。例えば、いくつかの実施形態では、クエリープローブは、標的分析物にハイブリダイズして、観察が行われる温度の約10℃以内の融解温度を有する二重鎖を形成するオリゴヌクレオチド(例えば、室温で行われる観察のための約7~12ヌクレオチド)である。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、モノヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、小有機分子(例えば、約2000ダルトン未満、例えば、2100、2050、2000、1950、1900、1850、1800、1750、1700、1650、1600、1550、1500ダルトン以下の分子量を有する分子)である。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、医薬品、例えば、薬物または他の生物活性分子である。いくつかの実施形態では、ク

クエリープローブは、金属イオン複合体である。いくつかの実施形態において、クエリープローブは、メチル結合ドメイン（例えば、MBD1）である。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、本明細書に記載されるような検出可能な標識で標識される。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、検出可能な標識に共有結合的に連結される。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、検出可能な標識と間接的および／または非共有結合的に連結され、かつ／または会合される。いくつかの実施形態では、検出可能な標識は蛍光性である。

【0106】

いくつかの実施形態において、クエリープローブは、マウスモノクローナル抗体である。

【0107】

分析物が炭水化物または多糖を含むいくつかの実施形態では、クエリープローブは、レクチンまたは炭水化物結合抗体などの炭水化物結合タンパク質を含む。

【0108】

〔検出〕

本技術は、例えば、類似の分析物の存在下での標的分析物の検出、および、いくつかの実施形態では、バックグラウンドノイズの存在下での標的分析物の検出を提供する。いくつかの実施形態では、標的分析物へのクエリープローブの一過性の結合から生じるシグナルは、非結合性クエリープローブによって生成されるシグナルと区別可能である（例えば、結合事象の間のシグナル強度の局所的変化を観察、モニタリング、および／または記録することによって）。いくつかの実施形態では、クエリープローブ（例えば、蛍光標識クエリープローブ）の標的分析物への一過性の結合の観察は、例えば、全反射照明蛍光（TIRF）または近TIRF顕微鏡法、ゼロモード導波路（ZMW）、ライトシート顕微鏡法、誘導放出抑制（STED）顕微鏡法、または共焦点顕微鏡法などの技術によって提供される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される技術は、標的分析物に結合していない場合に消光される蛍光発光、および／または標的分析物に結合している場合に消光される蛍光発光を有するクエリープローブを使用する。

【0109】

本技術は、例えば、平面または体積における特定の空間座標で観察される面積の離散領域および／または体積の慎重な(discreet)領域内の分析物へのクエリープローブの一過性の結合の位置を特定し、観察することを含む。いくつかの実施形態では、結合または解離事象（例えば、限定されたシグナル、検出器ノイズ、または検出器における空間のビンニングによる）の空間座標を特定する際の誤差は、固定化された（例えば、表面結合した）標的分析物間の平均間隔に対して小さい（例えば、最小化される、排除される）。広視野蛍光顕微鏡法の使用を含むいくつかの実施形態では、固定化された（例えば、表面結合した）標的分析物間の平均距離より大きくなく、多くの蛍光光子（いくつかの実施形態では、100を超える、例えば、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、または130以上）が検出時点ごとに集められる、検体平面内の有効な検出器ピクセル寸法を使用することによって、測定誤差が最小化され、かつ／または排除される。

【0110】

いくつかの実施形態において、検出可能な（例えば、蛍光性）クエリープローブは、固体支持体の表面に近いとき（例えば、固体支持体の表面の約100nm以内）、蛍光発光シグナルを生成する。結合していないとき、クエリープローブは、迅速に拡散し、よって個々に検出されない。したがって、結合していない状態にある場合、クエリープローブは、低レベルの拡散バックグラウンド蛍光を生成する。その結果、いくつかの実施形態では、結合クエリープローブの検出は、全反射照明蛍光顕微鏡法（TIRF）、HiLo顕微鏡法（例えば、US20090084980、EP2300983 B1、WO2014018584 A1、WO2014018584 A1参照のこと。参照により本明細書に組み込まれる）、共焦点走査顕微鏡法、または固体支持体の表面付近または表面上のクエリープローブ分子のみを照射する（例えば、励起する）照射スキームを含む他の技術の使

10

20

30

40

50

用を含む。したがって、いくつかの実施形態では、表面付近または表面上の固定化した標的に結合するクエリープローブのみが、単一分子由来であると確認できる、点状発光シグナル（例えば、スポット）を生成する。

【0111】

いくつかの実施形態では、クエリープローブは、発光波長を有する蛍光標識を含む。蛍光標識の発光波長での蛍光発光の検出は、クエリープローブが固定化された標的分析物に結合していることを示す。クエリープローブの標的分析物への結合は、「結合事象」である。本技術のいくつかの実施形態では、結合事象は、定義された閾値よりも大きい測定強度を有する蛍光発光を有する。例えば、いくつかの実施形態では、結合事象は、バックグラウンド蛍光強度（例えば、標的分析物の非存在下で観察される蛍光強度）を超える蛍光強度を有する。いくつかの実施形態では、結合事象は、バックグラウンド蛍光強度（例えば、標的分析物の非存在下で観察される蛍光強度）を少なくとも1、2、3、4以上の標準偏差である蛍光強度を有する。いくつかの実施形態では、結合事象は、バックグラウンド蛍光強度（例えば、標的分析物の非存在下で観察される蛍光強度）を少なくとも2標準偏差上回る蛍光強度を有する。いくつかの実施形態では、結合事象は、バックグラウンド蛍光強度（例えば、標的分析物の非存在下で観察される平均蛍光強度）の少なくとも1.5、2、3、4、または5倍である蛍光強度を有する。

【0112】

したがって、いくつかの実施形態では、定義された閾値を超える（例えば、バックグラウンド強度よりも少なくとも2標準偏差大きい）強度を有するクエリープローブの発光波長で蛍光を検出することは、結合事象が（例えば、標的分析物が固定化されている固体支持体上の離散的な位置で）起こったことを示す。また、いくつかの実施形態において、定義されている閾値を超える（例えば、バックグラウンド強度よりも少なくとも2標準偏差大きい）強度を有するクエリープローブの発光波長で蛍光を検出することは、結合事象が開始したことを示す。したがって、いくつかの実施形態では、定義されている閾値を超える（例えば、バックグラウンド強度よりも少なくとも2標準偏差大きい）強度を有するクエリープローブの発光波長での蛍光が存在しないことを検出することは、結合事象が終了した（例えば、クエリープローブが標的分析物から解離した）ことを示す。結合事象が開始した時点と結合事象が終了した時点との間の時間の長さ（例えば、定義された閾値を超える（例えば、バックグラウンド強度よりも少なくとも2標準偏差大きい）強度を有する蛍光プローブの発光波長における蛍光が検出される時間の長さ）は、結合事象の滞留時間である。「遷移」は、標的分析物へのクエリープローブの結合および解離（例えば、オン／オフ事象）、例えば、クエリープローブが結合状態から解離すること、またはクエリープローブが非結合状態から標的分析物と会合することを指す。

【0113】

本技術による方法は、「獲得時間」（例えば、数十～数百～数千秒、例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60秒；例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または0分；例えば、1、1.5、2、2.5、または3時間の時間間隔）である定義された時間間隔中に、固体支持体上の各離散的な位置（例えば、x、y座標によって同定される位置）で生じるクエリープローブ結合事象の数をカウントすることを含む。いくつかの実施形態では、取得時間は、約1～10秒～1～10分（例えば、約1～100秒、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、または100秒、例えば、1～100分、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、または100分）である。

【0114】

さらに、結合事象の間にクエリープローブが標的分析物に結合したままである時間の長さは、結合事象の「滞留時間」である。取得時間の間に検出された結合事象の数および／

10

20

30

40

50

または結合事象について記録された滞留時間の長さは、標的分析物へのクエリープローブ結合の特徴であり、したがって、標的分析物が上記離散的位置で固定化され、したがって標的分析物が試料中に存在することが示される。

【0115】

クエリープローブの固定化された標的分析物への結合および／またはクエリープローブの固定化された標的分析物からの解離は、モニターされ（例えば、光源を使用して蛍光プローブを励起し、結合クエリープローブからの蛍光発光を検出する、例えば、蛍光顕微鏡を使用する）、および／または、規定された時間間隔中（例えば、取得時間中）に記録される。クエリープローブが取得時間中に核酸に結合する回数、および／または、クエリープローブが各結合事象中に核酸に結合したままである時間の長さ、および、クエリープローブが各結合事象の間に核酸に結合しないままである時間の長さ（例えば、それぞれ、結合状態、非結合状態における「滞留時間」）が、（例えば、隠れマルコフモデルおよびポアソン統計を用いてデータを分析するために）例えば、コンピュータおよびソフトウェアを用いて特定される。

10

【0116】

いくつかの実施形態では、陽性および／または陰性対照試料を測定する（例えば、標的を含むまたは含まないことが知られている対照試料）。陰性対照試料において検出される蛍光は、「バックグラウンド蛍光」または「バックグラウンド（蛍光）強度」または「ベースライン」である。

【0117】

いくつかの実施形態では、クエリープローブの発光波長での蛍光強度の測定値を含むデータが、時間の関数として記録される。いくつかの実施形態では、結合事象の数および結合事象の滞留時間（例えば、各固定化された分析物について）は、データから特定される（例えば、蛍光強度が閾値バックグラウンド蛍光強度を超える回数および時間の長さを特定することによって）。いくつかの実施形態において、遷移（例えば、クエリープローブの結合および解離）は、標的分析物が固定化される固体支持体上の各離散的位置について計数される。いくつかの実施形態では、遷移の閾値数を使用して、固体支持体上の離散的位置における標的分析物の存在を、バックグラウンドシグナル、非標的分析物、および／またはクエリープローブの偽結合から識別する。

20

【0118】

いくつかの実施形態では、各固定化された標的についての遷移の数の分布が特定され、例えば、観察される各固定化された分析物について遷移の数が計数される。いくつかの実施形態では、ヒストグラムが生成される。いくつかの実施形態では、分布の特徴パラメータが特定され、例えば、分布の平均、中央値、ピーク、形状などが特定される。いくつかの実施形態では、データおよび／またはパラメータ（例えば、蛍光データ（例えば、時間ドメインの蛍光データ）、動態データ、分布の特徴パラメータなど）は、例えば、人工知能、パターン認識、機械学習、統計的推論、ニューラルネットなどを使用して、データのパターンおよび規則性を認識するアルゴリズムによって分析される。いくつかの実施形態では、分析が頻度論的分析の使用を含み、いくつかの実施形態では、分析がベイズ分析の使用を含む。いくつかの実施形態では、パターン認識システムは、既知の「トレーニング」データを使用して（例えば、教師あり学習を使用して）トレーニングされ、いくつかの実施形態では、それまで未知のパターンを発見するためにアルゴリズムが使用される（例えば、教師なし学習）。例えば、Duda, et al. (2001) Pattern classification (2nd edition), Wiley, New York; Bishop (2006) Pattern Recognition and Machine Learning, Springerを参照のこと。

30

【0119】

パターン認識（例えば、トレーニングセット、教師あり学習、教師なし学習、および未知の試料の分析を使用する）は、特定のパターンが、分析物の検出、定量化、および同定における使用を見出す特定の分析物の「フィンガープリント」を提供するように、同定されたパターンを分析物と関連付ける。

40

50

【0120】

いくつかの実施形態では、標的分析物から生成される分布は、非標的分析物から生成される分布、または標的分析物の非存在下で生成される分布とは有意に異なる。いくつかの実施形態では、複数の固定化された標的分析物について、遷移の平均数が決定される。いくつかの実施形態では、標的分析物を含む試料について観察される遷移の平均数は、時間の関数としてほぼ直線的に関連し、正の勾配を有する（例えば、遷移の平均数は時間の関数としてほぼ直線的に増加する）。

【0121】

いくつかの実施形態では、データは、統計（例えば、ポアソン統計）を使用して処理され、固体支持体上の各離散的な位置で時間の関数として生じる遷移の確率を決定する。いくつかの特定の実施形態では、固体支持体上の離散的な位置における時間の関数として生じる遷移事象の比較的一定の確率は、固体支持体上の上記離散的な位置における標的分析物の存在を示す。いくつかの実施形態では、事象数および経過時間に関連する相関係数は、固体支持体上の離散的な位置で時間の関数として生じる遷移事象の確率から計算される。いくつかの実施形態では、固体支持体上の離散的な位置で時間の関数として生じる遷移事象の確率から計算される場合の事象数および経過時間に関連する相関係数が0.95より大きいことは、固体支持体上の上記離散的な位置での標的分析物の存在を示す。

【0122】

いくつかの実施形態では、結合性クエリープローブ（ τ_{on} ）および非結合性クエリープローブ（ τ_{off} ）の滞留時間を使用して、試料中の標的分析物の存在を同定するために、および／または、標的分析物を含む試料を、非標的分析物を含むおよび／または標的分析物を含まない試料と区別する。例えば、標的分析物の τ_{on} は、非標的分析物の τ_{on} よりも大きく、標的分析物の τ_{off} は、非標的分析物の τ_{off} よりも小さい。いくつかの実施形態において、陰性対照および試料について τ_{on} および τ_{off} を測定することは、試料中の標的分析物の存在または非存在を示す。いくつかの実施形態において、複数の τ_{on} および τ_{off} 値は、固体支持上に画像化された複数のスポットの各々について、例えば、対照（例えば、陽性対照および／または陰性対照）および標的分析物を含むと思われる試料について特定される。いくつかの実施形態において、平均 τ_{on} および／または τ_{off} は、固体支持上に画像化された複数のスポットの各々について、例えば、対照（例えば、陽性対照および／または陰性対照）および標的分析物を含むと思われる試料について特定される。いくつかの実施形態では、全ての画像化されたスポットについての τ_{on} 対 τ_{off} （例えば、平均 τ_{on} および τ_{off} 、時間平均 τ_{on} および τ_{off} など）のプロットは、試料中の標的分析物の存在または非存在を示す。

【0123】

〔蛍光部分〕

いくつかの実施形態では、クエリープローブおよび／または分析物は、蛍光部分（例えば、「蛍光物質」または「蛍石」とも呼ばれる蛍光色素）を含む。種々様々の蛍光部分が当該分野で公知であり、蛍光部分を分析物および／またはクエリープローブに連結するための方法が公知である。

【0124】

蛍光部分として使用され得る化合物の例としては、キサンテン、アントラセン、シアニン、ポルフィリン、およびクマリン色素が挙げられるが、これらに限定されない。本技術で使用されるキサンテン色素の例としては、フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン（6-FAM）、5-カルボキシフルオレセイン（5-FAM）、5-または6-カルボキシ-4,7,2',7'-テトラクロロフルオレセイン（TET）、5-または6-カルボキシ-4,5,2',4',5',7'-ヘキサクロロフルオレセイン（HEX）、5'-または6'-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン（JOE）、5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン（ZOE）、ロードール、ロードミン、テトラメチルロードミン（TAMRA）、4,7-dクロロテトラメチルロードミン（DTAMRA）、ロードミンX（ROX）、およびテキサスレッドが挙げられ

るが、これらに限定されない。本発明で使用され得るシアニン色素の例としては、Cy 3、Cy 3 B、Cy 3 . 5、Cy 5、Cy 5 . 5、Cy 7、およびCy 7 . 5が挙げられるが、これらに限定されない。本技術で利用される他の蛍光部分および／または色素としては、エネルギー移動色素、複合色素、および蛍光シグナルを与える他の芳香族化合物が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、蛍光部分は量子ドットを含む。

【0125】

いくつかの実施形態では、蛍光部分は、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）、GFPの修飾された誘導体（例えば、S65Tを含むGFP、増強されたGFP（例えば、F64Lを含む））、または当該分野で公知の他のもの、例えば、青色蛍光タンパク質（例えば、EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ECFP、Cerulean、CyPet、mTurquoise2）、および黄色蛍光タンパク質誘導体（例えば、YFP、Citrine、Venus、YPet）などを含む。実施形態は、蛍光タンパク質が1つ以上のクエリープローブ、分析物、および／または捕捉プローブに共有結合または非共有結合され得ることを提供する。

【0126】

蛍光色素としては、Cy 5、ジクロロ[R110]、ジクロロ[R6G]、ジクロロ[TAMRA]、ジクロロ[ROX]等を含む、d-ローダミン受容体色素、フルオレセイン、6-FAM、5-FAM等を含むフルオレセインドナー色素；アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー、プロフラビン、pH7等を含むアクリジン；2-メチルベンゾオキサゾール、p-ジメチルアミノ安息香酸エチル、フェノール、ピロール、ベンゼン、トルエン等を含む芳香族炭化水素；オーラミンO、クリスタルバイオレット、クリスタルバイオレット、グリセロール、マラカイトグリーン等を含むアリールメチン色素；7-メトキシクマリン-4-酢酸、クマリン1、クマリン30、クマリン314、クマリン343、クマリン6等を含むクマリン色素；1, 1'-ジエチル-2, 2'-シアニンヨウ化物、クリプトシアニン、インドカルボシアニン(C3)色素、インドジカルボシアニン(C5)色素、インドトリカルボシアニン(C7)色素、オキサカルボシアニン(C3)色素、オキサジカルボシアニン(C5)色素、オキサトリカルボシアニン(C7)色素、ピナシアノールヨウ化物、全てのステイン(Stains all)、チアカルボシアニン(C3)色素、エタノール、チアカルボシアニン(C3)色素、n-プロパノール、チアジカルボシアニン(C5)色素、チアトリカルボシアニン(C7)色素等を含むシアニン色素；N, N'-ジフルオロボリル-1, 9-ジメチル-5-(4-ヨードフェニル)-ジピリン、N, N'-ジフルオロボリル-1, 9-ジメチル-5-[(4-(2-トリメチルシリルエチル))、N, N'-ジフルオロボリル-1, 9-ジメチル-5-フェニジピリン等を含むジピリン色素；4-(ジシアノメチレン)-2-メチル-6-(p-ジメチルアミノスチリル)-4H-ピラン(DCM)、アセトニトリル、4-(ジシアノメチレン)-2-メチル-6-(p-ジメチルアミノスチリル)-4H-ピラン(DCM)、メタノール、4-ジメチルアミノ-4'-ニトロスチルベン、メロシアニン540等を含むメロシアニン；4', 6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)、ジメチルスルホキシド、7-ベンジルアミノ-4-ニトロベンズ-2-オキサ-1, 3-ジアゾール、ダンシルグリシン、ダンシルグリシン、ジオキサソ、Hoechst 33258、DMF、Hoechst 33258、ルシファーイエローCH、ピロキシカム、硫酸キニーネ、硫酸キニーネ、スクアリウム色素I II等を含む、種々雑多な色素；2, 5-ジフェニルオキサゾール(POPO)、ビフェニル、POPOP、p-クアテルフェニル、p-テルフェニルなどを含むオリゴフェニレン；クレシルバイオレット過塩素酸塩、ナイルブルー、メタノール、ナイルレッド、エタノール、オキサジン1、オキサジン170等を含む、オキサジン；9, 10-ビス(フェニルエチル)アントラセン、9, 10-ジフェニルアントラセン、アントラセン、ナフタレン、ペリレン、ピレン等を含む多環芳香族炭化水素；1, 2-ジフェニルアセチレン、1, 4-ジフェニルブタジエン、1, 4-ジフェニルブタジイン、1,

10

20

30

40

50

6-ジフェニルヘキサトリエン、 β -カロテン、スチルベン等を含むポリエン／ポリイン；アントラキノン、アゾベンゼン、ベンゾキノ、フェロセン、リボフラビン、トリス（2，2'-ビピリジプルーテニウム(bipyridypruthenium)（I I））、テトラピロール、ビリルビン、クロロフィル a、ジエチルエーテル、クロロフィル a、メタノール、クロロフィル b、ジプロトン化テトラフェニルポルフィリン、ヘマチン、マグネシウムオクタエチルポルフィリン、マグネシウムオクタエチルポルフィリン（Mg OEP）、マグネシウムフタロシアニン（Mg Pc）、Pr OH、マグネシウムフタロシアニン（Mg Pc）、ピリジン、マグネシウムテトラメシチルポルフィリン（Mg TMP）、マグネシウムテトラフェニルポルフィリン（Mg TPP）、オクタエチルポルフィリン、フタロシアニン（Pc）、ポルフィン、ROX、TAMRA、テトラ- ϵ -ブチルアザポルフィン、テトラ- ϵ -ブチルナフタロシアニン、テトラキス（2，6-ジクロロフェニル）ポルフィリン、テトラキス（ α -アミノフェニル）ポルフィリン、テトラメシチルポルフィリン（TMP）、テトラフェニルポルフィリン（TPP）、ビタミンB12、亜鉛オクタエチルポルフィリン（Zn OEP）、亜鉛フタロシアニン（Zn Pc）、ピリジン、亜鉛テトラメシチルポルフィリン（Zn TMP）、亜鉛テトラメシチルポルフィリンラジカルカチオン、亜鉛テトラフェニルポルフィリン（Zn TPP）等を含む酸化還元活性のある発色団；エオシンY、フルオレセイン、塩基性エタノール、フルオレセイン、エタノール、ローダミン123、ローダミン6G、ローダミンB、ローズベンガル、スルホローダミン101等を含むキサンテン；またはこれらの混合物もしくは組み合わせ、またはこれらの合成誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0127】

本技術の特定の実施形態に適切な、いくつかの部類の蛍光発生色素および特定の化合物が知られている：フルオレセイン、ローダミン、オレゴングリーン、エオシン、およびテキサスレッドなどのキサンテン誘導体；シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニン、およびメロシアニンなどのシアニン誘導体；ナフタレン誘導体（ダンシルおよびプロダン誘導体）；クマリン誘導体；ピリジルオキサゾール、ニトロベンズオキサジアゾール、およびベンズオキサジアゾールなどのオキサジアゾール誘導体；カスケードブルーなどのピレン誘導体；ナイルレッド、ナイルブルー、クレシルバイオレット、およびオキサジン170などのオキサジン誘導体；プロフラビン、アクリジンオレンジ、およびアクリジンイエローなどのアクリジン誘導体；オーラミン、クリスタルバイオレット、およびマラカイトグリーンなどのアリアルメチン誘導体；ポルフィン、フタロシアニン、ビリルビンなどのテトラピロール誘導体。いくつかの実施形態において、蛍光部分色素は、キサンテン、フルオレセイン、ローダミン、BODIPY、シアニン、クマリン、ピレン、フタロシアニン、フィコビリタンパク質、ALEXA FLUOR（登録商標）350、ALEXA FLUOR（登録商標）405、ALEXA FLUOR（登録商標）430、ALEXA FLUOR（登録商標）488、ALEXA FLUOR（登録商標）514、ALEXA FLUOR（登録商標）532、ALEXA FLUOR（登録商標）546、ALEXA FLUOR（登録商標）555、ALEXA FLUOR（登録商標）568、ALEXA FLUOR（登録商標）568、ALEXA FLUOR（登録商標）594、ALEXA FLUOR（登録商標）610、ALEXA FLUOR（登録商標）633、ALEXA FLUOR（登録商標）647、ALEXA FLUOR（登録商標）660、ALEXA FLUOR（登録商標）680、ALEXA FLUOR（登録商標）700、ALEXA FLUOR（登録商標）750、またはスクアライン色素である。いくつかの実施形態において、標識は、例えば、Haugland (September 2005) MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (10th ed.)に記載されるような蛍光検出可能部分であり、当該文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0128】

いくつかの実施形態において、標識（例えば、蛍光検出可能な標識）は、例えば、米国特許出願公開第20110223677号、第20110190486号、第20110

10

20

30

40

50

172420号、第20060179585号、および第20030003486号、および米国特許第7,935,822号に記載されるように、ATTO-TEC GmbH (Am Eichengang 50, 57076 Siegen, Germany)から入手可能なものである。これらの文献は全て、参照により本明細書に組み込まれる（例えば、ATTO 390、ATTO 425、ATTO 465、ATTO 488、ATTO 495、ATTO 514、ATTO 520、ATTO 532、ATTO Rho6G、ATTO 542、ATTO 550、ATTO 565、ATTO Rho3B、ATTO Rho11、ATTO Rho12、ATTO Thio12、ATTO Rho101、ATTO 590、ATTO 594、ATTO Rho13、ATTO 610、ATTO 620、ATTO Rho14、ATTO 633、ATTO 647、ATTO 647N、ATTO 655、ATTO Oxa12、ATTO 665、ATTO 680、ATTO 700、ATTO 725、ATTO 740）。

10

【0129】

当業者であれば、これらの範囲外の発光極大を有する色素も使用してもよいことを認識するであろう。場合によっては、500nm〜700nmの範囲の色素は可視スペクトルにあるという利点を有し、既存の光電子増倍管を使用して検出することができる。いくつかの実施形態では、広範囲の利用可能な色素により、検出範囲にわたって広がる発光波長を有する色素セットの選択ができる。多くの色素を識別することができる検出システムは、当該技術分野で知られている。

【0130】

20

〔方法〕

いくつかの実施形態は、反復クエリープローブ結合によって分析物を同定する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は分析物を固体支持体に固定化することを含む。いくつかの実施形態では、固体支持体が表面（例えば、実質的に平坦な表面、丸い表面）、例えば、バルク溶液、例えば、分析物を含むバルク溶液と接触する表面である。いくつかの実施形態では、固体支持体は、自由に拡散可能な固体支持体（例えば、ビーズ、コロイド粒子、例えば、約10〜1000nm（例えば、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、または1000nm）の直径を有するコロイド粒子）、例えば、バルク溶液、例えば、分析物を含むバルク溶液内で自由に拡散する。いくつかの実施形態では、分析物を固体支持体に固定化することは、固体支持体と分析物との間の共有結合相互作用を含む。いくつかの実施形態では、分析物を固体支持体に固定化することは、固体支持体と分析物との間の非共有相互作用を含む。いくつかの実施形態では、分析物（例えば、分子、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、脂質、代謝産物、薬物などの分子）は表面に安定的に固定化され、方法はクエリープローブの標的分析物への反復（例えば、一過性、低親和性）結合を含む。いくつかの実施形態では、方法は、クエリープローブの標的分析物への反復（例えば、一過性、低親和性）結合を検出することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、クエリープローブによる分析物への結合から生成されるシグナル（例えば、時間の関数としてのクエリープローブシグナルのデータセット）、および、分析物に結合するクエリープローブの表面上の空間位置を表す情報（例えば、座標、例えば、x、y座標）を含むデータセットを生成することを含む。いくつかの実施形態において、データセットは、例えば、クエリープローブ結合事象の空間分解能を改善するために、処理される（例えば、操作される、変換される、視覚化されるなど）。例えば、特定の実施形態では、データセット（例えば、時間の関数としてのクエリープローブシグナル、および、分析物に結合するクエリープローブの表面上の空間位置を表す情報（例えば、座標、例えば、x、y座標）を含む）が処理に供される。いくつかの実施形態では、処理は、時系列データの各フレーム内のクエリープローブ結合または解離事象を示す差分強度のプロファイルを生成するためのフレームごとの減算プロセスを含む。本明細書に記載される技術の開発中に収集されたデータは、差分強度のプロファイル

30

40

50

がクエリープローブ結合シグナル対位置マップよりも高い分解能を有することを示す。いくつかの実施形態では、各クエリープローブ結合および／または解離事象の空間位置（例えば、x、y 座標）を特定した後、複数の事象を空間位置に従ってクラスタ化し、各クラスタ内の事象の動態を、統計分析にかけて、事象のクラスタが所定の標的分析物に由来するかどうかを特定する。

【0131】

例えば、1つ以上の表面固定化または拡散標的分析物を定量するための方法のいくつかの実施形態は、例えば、単一分子感度で、固定化された標的分析物に対する1つ以上の一時的に結合するクエリープローブのシグナルを測定することを含む、1つ以上の工程を含む。いくつかの実施形態では、方法は、クエリープローブ結合とは独立して標的分析物を追跡すること（例えば、その位置を検出および／または記録すること）を含む。いくつかの実施形態では、方法は、位置（例えば、x、y 位置）の関数として表面での時間依存性プローブ結合シグナル強度変化を計算することをさらに含む。いくつかの実施形態では、位置（例えば、x、y 位置）の関数として表面での時間依存性クエリープローブ結合シグナル強度変化を計算することは、分析物へのクエリープローブ結合についての「差分強度のプロファイル」を生成する。いくつかの実施形態では、方法は、差分強度のプロファイルからサブピクセル精度で各クエリープローブ結合および解離事象（「事象」）の位置（例えば、x、y 位置）を特定することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、例えば、単一の固定化された標的分析物についての事象を関連付けるために、表面上の位置（例えば、x、y 位置）によって、事象をローカルクラスタにグループ化することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、クラスタが、特定の分析物、例えば、特定の分析物への一過性プローブ結合に由来するかどうかを特定するために、事象の各ローカルクラスタから動態パラメータを計算することを含む。

【0132】

方法の実施形態は、検出される分析物に限定されない。例えば、いくつかの実施形態では、分析物はポリペプチド、例えば、タンパク質またはペプチドである。いくつかの実施形態では、標的分析物は核酸である。いくつかの実施形態では、標的分析物は小分子である。

【0133】

いくつかの実施形態では、標的分析物とクエリープローブとの間の相互作用は、標的分析物の共有結合修飾によって区別可能に影響される。例えば、いくつかの実施形態では、分析物は、翻訳後修飾を含むポリペプチド、例えば、翻訳後修飾を含むタンパク質またはペプチドである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの翻訳後修飾は、クエリープローブによる分析物との一過性の結合に影響を及ぼし、例えば、クエリープローブシグナルは、ポリペプチド上の翻訳後修飾の有無の関数である。例えば、いくつかの実施形態では、分析物は、後成的修飾を含む核酸、例えば、メチル化塩基を含む核酸である。いくつかの実施形態では、分析物は、標的分析物の核酸塩基、リボース、またはデオキシリボース部分に対する共有結合修飾を含む核酸である。

【0134】

いくつかの実施形態では、核酸の修飾は、クエリープローブによる分析物との一過性の結合に影響を及ぼし、例えば、クエリープローブシグナルは核酸上の修飾の有無の関数である。

【0135】

いくつかの実施形態では、翻訳後修飾とクエリープローブとの間の一過性の相互作用は、化学親和性タグ、例えば核酸を含む化学親和性タグによって媒介される。

【0136】

いくつかの実施形態において、クエリープローブは、核酸またはアプタマーである。

【0137】

いくつかの実施形態では、クエリープローブは、低親和性抗体、抗体断片、またはナノボディである。

【0138】

いくつかの実施形態では、クエリープローブは、DNA結合タンパク質、RNA結合タンパク質、またはDNA結合リボ核タンパク質複合体である。

【0139】

いくつかの実施形態では、各結合または解離事象の位置、例えば(x, y)位置は、差分強度のプロファイル、重心決定、ガウス関数への最小二乗フィッティング、エアリーディスク関数への最小二乗フィッティング、多項式関数(例えば、放物線)への最小二乗フィッティング、または最尤推定に供することによって特定される。

【0140】

いくつかの実施形態では、捕捉プローブは、高親和性抗体、抗体断片、またはナノボディである。いくつかの実施形態では、捕捉プローブは、核酸である。いくつかの実施形態では、捕捉は、標的分析物を表面に架橋する共有結合によって媒介される。いくつかの実施形態において、標的分析物は、表面固定化の前に担体の存在下で熱変性に供される。いくつかの実施形態では、分析物は、表面固定化の前に担体の存在下で化学的変性に供され、例えば、分析物は、尿素、ホルムアミド、塩化グアニジウム、高イオン強度、低イオン強度、高pH、低pH、またはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)のような変性剤で変性される。

【0141】

[超解像度イメージング]

本技術は、分析物へのクエリープローブの一過性の結合によって生成されるシグナルの、分析物の同定、検出、定量化、および／または特徴付けに関する情報を提供するデータへの変換に基づく、分析物の超解像度の同定、検出、定量化、および／または特徴付けを提供する。いくつかの実施形態は、本明細書に記載される1つ以上の工程、例えば、本明細書に記載される1つ以上の順序付けられた工程を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の工程は、1つまたは複数の他の工程に依存し、それに続くが、いくつかの実施形態は、任意の特定の順序に関係なく、記載された工程のうちの1つまたは複数を含む。

【0142】

本明細書で使用される場合、用語「データセット」または用語「ムービー」は、センサアレイデータ(例えば、CCD、強化CCD、電子増倍CCD、CMOSセンサなど)の時系列を含むデータに関するものであり、センサアレイデータ(または「フレーム」)の時系列の各時点は、センサアレイ内の位置(例えばx, y座標)の関数としてのシグナル強度値のセットを含む。いくつかの実施形態では、(x, y)位置は、2次元センサアレイ内の水平(x)方向および垂直(y)方向、例えば、ムービーデータセットのフレーム内の、センサ素子(例えば、ピクセル)の座標をいう。

【0143】

いくつかの実施形態において、記載されるようなデータセットは、クエリープローブを含む試料から収集される(例えば、いくつかの実施形態は、クエリープローブを含む試料からデータセットを収集することを含む)。いくつかの実施形態では、試料は、分析物を含む。いくつかの実施形態では、試料は、分析物を含むと考えられる。いくつかの実施形態では、試料が分析物を含むかどうかは知られていない。

【0144】

いくつかの実施形態では、データセットの1つまたは複数のフレームが、例えば、撮像面の明らかな(x, y)運動をもたらす、センサに対する撮像面の横方向ドリフトについて補正される(例えば、いくつかの実施形態は、任意に、センサに対する撮像面のドリフトについて補正することを含む)。例えば、ほとんどの光学顕微鏡は、ムービーを取得する過程の間に投影画像を移動させ(例えば、数ナノメートルから数マイクロメートル)、結果として、実際には撮像面に対して静止している物体の見かけの運動をもたらすステジドリフトを示す(例えば、ムービーの1つ以上のフレームは、ムービーの1つ以上の他のフレームとずれている)。いくつかの実施形態では、データセットが補正されない場合、技術の分解能が低下し、これは、単一の固定化された標的分析物に対するクエリープロ

10

20

30

40

50

ープ結合事象の見かけの (x、y) 位置の分布を広げることによって、後続のクラスタ化操作をより困難にする。いくつかの実施形態では、ドリフト補正のための方法は、例えば、位置が独立して測定される基準マーカの使用（例えば、クエリープローブ結合を検出するために使用されるものと同じセンサを使用すること、および／または、クエリープローブ結合を検出するために使用されない他の独立したセンサを使用すること）を含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、1つ以上の基準マーカの位置は、各ムービーフレームにおける (x、y) ドリフトの範囲および方向を特定するために、経時的に追跡される。いくつかの実施形態では、ムービーの各フレーム N は、フレーム N のピクセル強度値のフレーム 1（ムービーの最初のフレーム）の強度値との最大相関を提供する (x、y) オフセットを特定するために分析される。

10

【0145】

いくつかの実施形態は、差分強度のマップムービーを生成することを含む。例えば、いくつかの実施形態は、ムービーの各フレーム N における各ピクセル P の強度値を、ムービーの次のフレーム N + 1 における同じピクセル P の対応する強度値から減算することを含む。これらの減算の結果は、元のムービーよりも1つ少ないフレームを含む差分強度のマップの時系列である。いくつかの実施形態は、ムービーの各フレーム N 内の各ピクセル P の強度値を、ムービーのフレーム N + 2、N + 3、N + 4、N + n 内の同じピクセル P の対応する強度値から減算して、元のムービーよりも2、3、4、または N 個少ないフレームを含む差分強度のマップの時系列を生成することを含む。

【0146】

20

いくつかの実施形態は、差分強度のマップの各フレーム内の各強度最大値（例えば、クエリープローブ結合事象に対応する）の位置、強度、および／またはフレーム数のうちの1つ以上を記録することを含む。いくつかの実施形態では、位置は、例えば、2次元ガウスフィッティング、重心フィッティング、または粒子の位置を特定するために使用される他の方法（例えば、いくつかの実施形態では、1ピクセル以下の誤差を有する）を含むデータの変換によって特定される。

【0147】

いくつかの実施形態は、差分強度のマップの各フレーム内の各強度最小値（例えば、クエリープローブ解離事象に対応する）の位置、強度（例えば、強度の絶対値）、および／またはフレーム数のうちの1つ以上を記録することを含む。いくつかの実施形態では、位置は、例えば、2次元ガウスフィッティング、重心フィッティング、または粒子の位置を特定するために使用される他の方法（例えば、いくつかの実施形態では、1ピクセル以下の誤差を有する）を含むデータの変換によって特定される。

30

【0148】

いくつかの実施形態は、任意で、ステップで計算されたドリフト補正を、差分強度のマップから特定された一連の (x、y) 位置に適用することを含む（例えば、いくつかの実施形態は、例えば、上述のように、横方向ドリフトについて差分強度のマップから特定された一連の (x、y) 位置を補正することを含む）。

【0149】

いくつかの実施形態は、強度最大値および／または強度最小値の (x、y) 位置を組み合わせることを含む。いくつかの実施形態は、クエリープローブ結合および解離事象の高密度の領域を同定するために、強度最大値および／または強度最小値の (x、y) 位置に対してクラスタリング分析（例えば、階層クラスタリング）を実行することをさらに含む。いくつかの実施形態では、クラスタリング分析は、各クラスタがセンサの限られた領域内で検出される1つ以上の結合および／または解離事象を含むクラスタを生成する。

40

【0150】

いくつかの実施形態では、任意で、複数の強度最大値（または複数の強度最小値）が各クラスタ内の差分強度のマップの連続するフレーム内で同定される場合、複数の強度最大値（または複数の強度最小値）は同じ結合事象（または解離事象）に対応するとみなされ、複数の強度最大値（または複数の強度最小値）の (x、y) 位置を平均し、複数の強度

50

最大値（または複数の強度最小値）の強度値を合計することによって組み合わせられる。

【0151】

いくつかの実施形態は、各クラスタ内の事象についての1つ以上の統計的尺度を計算することを含み、クエリープローブ結合および／または解離事象の数、所定の結合事象と次の解離事象との間のフレーム数の平均、中央値、最大、最小、範囲、および標準偏差のうちの1つ以上；所定の解離事象と次の結合事象との間のフレーム数の平均、中央値、最大、最小、範囲、および標準偏差のうちの1つ以上；クエリープローブ結合および解離事象の（ x 、 y ）位置の平均、中央値、最大、最小、範囲、および標準偏差のうちの1つ以上、ならびに／または、クエリープローブ結合および解離事象に関連するシグナル強度変化の平均、中央値、最大、最小、範囲、および標準偏差のうちの1つ以上を含むが、これらに限定されない。

10

【0152】

いくつかの実施形態は、クエリープローブ結合事象の各クラスタについて上述のように測定された統計を、標準物質（例えば、陽性対照）を使用して測定された統計と比較することを含む。いくつかの実施形態は、クエリープローブ結合事象の各クラスタについて上述のように測定された統計を、陰性対照（例えば、分析物を含まない、分析物に密接に関連する物質、修飾を含むおよび／または修飾を含まない分析物など）を使用して測定された統計と比較することを含む。いくつかの実施形態において、クエリープローブ結合事象の各クラスタについて上述のように測定された統計を、標準物質および／または陰性対照を使用して測定された統計と比較することを使用して、クエリープローブ結合事象のクラスタが、標的分析物の単一分子へのクエリープローブ結合から生じた可能性が高いかどうかを特定する。

20

【0153】

いくつかの実施形態は、標的分析物に対するクエリープローブ結合を表すデータセット中のクラスタの数を計算することを含む。いくつかの実施形態では、標的分析物に対するクエリープローブ結合を表すデータセット中のクラスタの数を計算することは、上述の統計学的試験の1つ以上を使用することを含む。いくつかの実施形態では、標的分析物に対するクエリープローブ結合を表すデータセット中のクラスタの数を計算することは、本方法によってアッセイされた画像化表面の領域中に存在する分析物の数（例えば、分析物の見かけの数）の尺度を提供する。いくつかの実施形態では、標的分析物に対するクエリープローブ結合を表すデータセット中のクラスタの数を計算することは、分析物の濃度の尺度を提供し、分析物が試料中に存在するかまたは存在しないかの指標を提供し、および／または試料中の分析物の状態（例えば、修飾された、修飾されていない）の指標を提供する。

30

【0154】

いくつかの実施形態は、任意で、上述のような分析物の見かけの数、濃度、状態、有無を、既知の分析物濃度についての分析物の見かけの数、濃度、状態、有無の以前に特定された値と比較することを含む。いくつかの実施形態は、試料中の標的分析物の濃度を特定するために、標準曲線（例えば、既知の濃度を有する標的分析物の標準物質を含む1つ以上の組成物を用いて生成される）を使用することを含む。

40

【0155】

いくつかの実施形態では、説明される方法のステップが、ソフトウェアコード、例えば、上述のようにデータを生成および／または変換するようにコンピュータおよび／またはマイクロプロセッサに命令する一連の手順ステップで実装される。いくつかの実施形態では、ソフトウェア命令は、例えば、BASIC、C、C++、Java（登録商標）、MATLAB、Mathematica、Perl、Python、またはRなどのプログラミング言語で符号化される。

【0156】

いくつかの実施形態では、分析物の超解像の同定、検出、定量化、および／または特徴付けの1つ以上のステップまたは構成要素が、モジュールシステムに接続された個々のソ

50

ソフトウェアオブジェクトにおいて提供される。いくつかの実施形態では、ソフトウェアオブジェクトが拡張可能であり、ポータブルである。いくつかの実施形態では、オブジェクトは、オブジェクトデータを変換するデータ構造および操作を含む。いくつかの実施形態では、物体がそれらのデータを操作し、それらの方法と呼び出すことによって使用される。したがって、実施形態は、例えば、操作可能な数字、形状、データ構造について、具体的な実体を模倣、モデル化、または提供するソフトウェアオブジェクトを提供する。いくつかの実施形態では、ソフトウェアオブジェクトは、コンピュータまたはマイクロプロセッサにおいて動作可能である。いくつかの実施形態では、ソフトウェアオブジェクトは、コンピュータ読み取り可能な媒体に格納される。

【0157】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明される方法のステップが、オブジェクトの方法として提供される。いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるデータおよび／またはデータ構造が、オブジェクトのデータ構造として提供される。

【0158】

いくつかの実施形態は、例えば、1つ以上のソフトウェアオブジェクトを含む、時系列のセンサレイデータを処理するためのオブジェクト指向パイプラインを提供することで、ドリフト補正されたデータセットおよび／または差分強度のマップムービーを生成し；1つ以上の強度最大値および／または強度最小値の位置、強度、および／またはフレーム番号のうちの1つ以上を同定し；例えば、2次元ガウスフィッティング、重心フィッティング、または粒子の位置を特定するために使用される他の方法を使用してデータを変換し；横方向ドリフトについて差分強度のマップから特定される一連の（x、y）位置を補正し；強度最大値および／または強度最小値の（x、y）位置を組み合わせ；複数の強度最大値（または複数の強度最小値）の強度値を合計し；各クラスタ内の事象についての1つ以上の統計的尺度を計算し；クエリープローブ結合事象の各クラスタについて上述したように測定された統計を、標準物質および／または陰性対照を使用して測定された統計と比較し；標的分析物に対するクエリープローブ結合を表すデータセット中のクラスタの数を計算して、例えば、本方法によってアッセイされた画像化表面の領域中に存在する分析物の数（例えば、分析物の見かけの数）の尺度、分析物の濃度の尺度、分析物が試料中に存在するか存在しないかの指標、および／または、試料中の分析物の状態の指標を生成し；ならびに／あるいは、上述のような分析物の見かけの数、濃度、状態、有無を、既知の分析物濃度についての分析物の見かけの数、濃度、状態、有無の以前に特定された値と比較することを含む。

【0159】

実施形態は、例えば、これらに限定されないが、Java（登録商標）、C++、C#、Python、PHP、Ruby、Perl、Object Pascal、Objective-C、Swift、Scala、Common Lisp、およびSmalltalkのような言語を使用して符号化されるような、ソフトウェアオブジェクトを生成および操作するコードの使用を含む。

【0160】

〔システム〕

本技術の実施形態は、分析物を検出するためのシステムに関する。例えば、いくつかの実施形態では、本技術が1つ以上の標的分析物を定量するためのシステムを提供し、当該システムは、標的分析物に安定的に結合する表面結合捕捉プローブまたは表面結合部分を含む。いくつかの実施形態では、表面結合捕捉プローブまたは表面結合部分は、結合部位、エピトープ、または認識部位（例えば、第1の結合部位、第1のエピトープ、または第1の認識部位）を介して分析物に安定的に結合する。いくつかの実施形態では、システムは、第2の結合部位、第2のエピトープ、または第2の認識部位において低親和性で標的分析物に結合するクエリープローブをさらに含む。いくつかの実施形態では、クエリープローブは、システムの表面に接触するバルク溶液中で自由に拡散可能である。さらに、いくつかのシステムの実施形態は、クエリープローブと標的分析物との相互作用からのシグ

10

20

30

40

50

ナルを記録する検出コンポーネントを含む。例えば、いくつかの実施形態では、検出コンポーネントは、クエリープローブと標的分析物との相互作用から生成される時間の関数として、シグナルの変化を記録する。いくつかの実施形態では、検出コンポーネントは、空間位置（例えば、 x 、 y 座標ペアとして）と、クエリープローブの上記標的分析物への結合事象、および上記標的分析物からの解離事象の強度とを記録する。いくつかの実施形態では、検出コンポーネントは、空間位置（例えば、 x 、 y 座標ペアとして）と、クエリープローブの上記標的分析物への結合事象、および上記標的分析物からの解離事象の開始時間および／または終了時間とを記録する。いくつかの実施形態では、検出コンポーネントは、空間位置（例えば、 x 、 y 座標ペアとして）と、クエリープローブの上記標的分析物への結合事象、および上記標的分析物からの解離事象の時間の長さとを記録する。

10

【0161】

システムの実施形態は、標的分析物の個々の分子を同定するための分析プロセス（例えば、分析プロセスを実行するようにマイクロプロセッサに指示する、例えば、ソフトウェアでコード化された一連の命令で具体化される）を含む。いくつかの実施形態では、分析プロセスは、入力データとして、上記標的分析物への反復的な結合事象および解離事象の空間位置データおよびタイミング（例えば、開始、終了、または時間の長さ）を使用する。

【0162】

システムの実施形態は、検出される分析物に限定されない。例えば、いくつかの実施形態では、分析物はポリペプチド、例えばタンパク質またはペプチドである。いくつかの実施形態では、標的分析物は核酸である。いくつかの実施形態では、標的分析物は小分子である。

20

【0163】

いくつかの実施形態では、標的分析物とクエリープローブとの間の相互作用は、標的分析物の共有結合修飾によって区別可能に影響される。例えば、いくつかの実施形態では、分析物は、翻訳後修飾を含むポリペプチド、例えば、翻訳後修飾を含むタンパク質またはペプチドである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの翻訳後修飾は、クエリープローブの分析物との一過性の結合に影響を及ぼし、例えば、クエリープローブシグナルは、ポリペプチド上の翻訳後修飾の有無の関数である。例えば、いくつかの実施形態では、分析物は、後成的修飾を含む核酸、例えば、メチル化塩基を含む核酸である。いくつかの実施形態では、核酸の修飾は、クエリープローブの分析物との一過性の結合に影響を及ぼし、例えば、クエリープローブシグナルは、核酸上の修飾の有無の関数である。

30

【0164】

いくつかの実施形態では、翻訳後修飾とクエリープローブとの間の一過性の相互作用は、化学親和性タグ、例えば核酸を含む化学親和性タグによって媒介される。

【0165】

いくつかの実施形態において、クエリープローブは、核酸またはアプタマーである。

【0166】

いくつかの実施形態では、クエリープローブは、低親和性抗体、抗体断片、またはナノボディである。

【0167】

いくつかの実施形態では、クエリープローブは、DNA結合タンパク質、RNA結合タンパク質、またはDNA結合リボ核タンパク質複合体である。

40

【0168】

いくつかの実施形態では、分析物は、標的分析物の核酸塩基、リボース、またはデオキシリボース部分に対する共有結合修飾を含む核酸である。

【0169】

いくつかの実施形態では、捕捉プローブは、高親和性抗体、抗体断片、またはナノボディである。いくつかの実施形態では、捕捉プローブは、核酸である。いくつかの実施形態では、捕捉は、標的分析物を表面に架橋する共有結合によって媒介される。いくつかの実施形態において、標的分析物は、表面固定化の前に担体の存在下で熱変性に供される。い

50

くつかの実施形態では、分析物は、表面固定化の前に担体の存在下で化学的変性に供され、例えば、分析物は、尿素、ホルムアミド、塩化グアニジウム、高イオン強度、低イオン強度、高pH、低pH、またはドデシル硫酸ナトリウム（SDS）のような変性剤で変性される。

【0170】

本技術のいくつかのシステムの実施形態は、標的分析物の検出および定量のためのコンポーネントを含む。本技術によるシステムは、例えば、固体支持体（例えば、顕微鏡スライド、カバーガラス、アビジン（例えば、ストレプトアビジン）共役顕微鏡スライドまたはカバーガラス、ゼロモード導波路アレイを含む固体支持体など）、および本明細書に記載のクエリープローブを含む。

10

【0171】

いくつかのシステム実施形態は、結合されたクエリープローブを励起する照射構成を含む蛍光顕微鏡である検出コンポーネント（例えば、プリズム型全内部反射蛍光（TIRF）顕微鏡、対物型TIRF顕微鏡、近TIRFまたはHiLo顕微鏡、共焦点レーザー走査顕微鏡、ゼロモード導波路、および／または、表面近傍の空間の小さな領域に照射を制限しながら、スライドまたはカバーガラスの大きな面積（ $>100\mu\text{m}^2$ ）を平行モニターできる照射構成）を含む。いくつかの実施形態は、蛍光検出器を含み、例えば、強化された電荷結合素子（ICCD）を含む検出器、電子増倍電荷結合素子（EM-CCD）、相補型金属酸化膜半導体（CMOS）、光電子増倍管（PMT）、アバランシェフォトダイオード（APD）、および／または、単一の発色団からの蛍光発光を検出できる他の検出器である。いくつかの特定の実施形態は、レンズなし映像のために構成されるコンポーネント、例えば、レンズなし顕微鏡、例えば、レンズを使用せず、検出器（例えば、CMOS）上に直接撮像するための検出器および／または撮像コンポーネントを含む。

20

【0172】

いくつかの実施形態は、例えば、データを処理するためのデータ取得および／または分析プロセスを制御するために、コンピュータおよびコンピュータが実行するための命令を符号化するソフトウェアを含む。

【0173】

いくつかの実施形態は、例えば、特定の波長の範囲または複数の波長の範囲内で蛍光を選択的に検出するために、レンズ、ミラー、ダイクロイックミラー、光学フィルタなどのオプティクスを含む。

30

【0174】

例えば、いくつかの実施形態では、コンピュータベースの分析ソフトウェアを使用して、検出アッセイによって生成された生データ（例えば、表面上の時間および／または位置（例えば、x、y座標）の関数としての、例えば、1つ以上の分析物の有無または量）を、臨床医の予測値のデータに変換する。臨床医は、任意の適切な手段を使用して予測データにアクセスすることができる。

【0175】

いくつかのシステム実施形態は、本技術の実施形態を実施し得るコンピュータシステムを含む。様々な実施形態では、コンピュータシステムが、情報を通信するためのバスまたは他の通信メカニズムと、情報を処理するためにバスに結合されたプロセッサとを含む。様々な実施形態では、コンピュータシステムは、バスに結合されたメモリ（ランダムアクセスメモリ（RAM）または他の動的記憶装置とすることができる）と、プロセッサによって実行される命令とを含む。メモリはまた、プロセッサによって実行されるべき命令の実行中に一時的変数または他の中間情報を記憶するために使用されることができる。様々な実施形態では、コンピュータシステムは、プロセッサのための静的情報および命令を記憶するためにバスに結合された読み取り専用メモリ（ROM）または他の静的記憶装置をさらに含むことができる。情報および命令を記憶するために、磁気ディスクまたは光ディスクなどの記憶装置を設け、バスに結合することができる。

40

【0176】

50

様々な実施形態では、コンピュータシステムは、コンピュータのユーザに情報を表示するために、ブラウン管（CRT）または液晶ディスプレイ（LCD）などのディスプレイにバスを介して結合される。英数字および他のキーを含む入力装置をバスに結合して、情報およびコマンド選択をプロセッサに通信することができる。別のタイプのユーザ入力デバイスは、方向情報およびコマンド選択をプロセッサに通信し、ディスプレイ上のカーソル移動を制御するための、マウス、トラックボール、またはカーソル方向キーなどのカーソル制御である。この入力装置は、典型的には第1の軸（例えば、x）と第2の軸（例えば、y）の2つの軸において2つの自由度を有し、これにより、装置は、平面内の位置を指定することができる。

【0177】

コンピュータシステムは、本技術の実施形態を実行することができる。本技術のある実装形態と一致して、メモリに含まれる1つ以上の命令の1つ以上の配列をプロセッサが実行することに応答して、コンピュータシステムによって結果を提供することができる。そのような命令は、記憶装置などの別のコンピュータ読み取り可能な媒体からメモリに読み込まれることができる。メモリに含まれる命令の配列の実行により、本明細書に記載される方法をプロセッサに実行させることができる。あるいは、本発明の教示を実施するために、ソフトウェア命令の代わりに、またはソフトウェア命令と組み合わせて、コンピュータに組み込まれている回路を使用することができる。したがって、本技術の実装は、ハードウェア回路およびソフトウェアのいかなる特定の組み合わせにも限定されない。

【0178】

用語「コンピュータ読み取り可能な媒体」は、本明細書で使用される場合、実行のためにプロセッサに命令を提供することに関与する任意の媒体をいう。このような媒体としては、多くの形態を取ることができ、不揮発性媒体、揮発性媒体、および伝送媒体が挙げられるが、これらに限定されない。不揮発性媒体の例としては、記憶装置などの光ディスクまたは磁気ディスクを挙げることができるが、これらに限定されない。揮発性媒体の例としては、ダイナミックメモリを挙げることができるこれに限定されない。伝送媒体の例としては、バスを構成するワイヤを含む、同軸ケーブル、銅線、および光ファイバを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0179】

コンピュータ読み取り可能な媒体の一般的な形態は、例えば、フロッピー（登録商標）ディスク、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ、または任意の他の磁気媒体、CD-ROM、任意の他の光媒体、パンチカード、紙テープ、穴のパターンを有する任意の他の物理媒体、RAM、PROM、およびEPROM、FLASH-EPROM、任意の他のメモリチップまたはカートリッジ、あるいはコンピュータが読み取ることができる任意の他の有形媒体を含む。

【0180】

様々な形態のコンピュータ読み取り可能な媒体が、実行のために1つ以上の命令の1つ以上の配列をプロセッサに送ることに関与することができる。例えば、命令を、最初に遠隔コンピュータの磁気ディスク上に送ることができる。リモートコンピュータは、命令をそのダイナミックメモリにロードし、ネットワーク接続（例えば、LAN、WAN、インターネット、電話回線）を介して命令を送信することができる。ローカルコンピュータシステムは、データを受信し、それをバスに送信することができる。バスは、メモリにデータを送ることができ、メモリからプロセッサが命令を取り出し、実行する。メモリによって受信された命令は、プロセッサによる実行の前または後のいずれかに、任意で記憶装置に記憶されてもよい。

【0181】

様々な実施形態によれば、方法を実行するためにプロセッサによって実行されるように構成された命令は、コンピュータ読み取り可能な媒体上に記憶される。コンピュータ読み取り可能な媒体は、デジタル情報を記憶するデバイスとすることができる。例えば、コンピュータ読み取り可能な媒体は、ソフトウェアを記憶するための当該技術分野で知られて

10

20

30

40

50

いるコンパクトディスク読み取り専用メモリ（ＣＤ－ＲＯＭ）を含む。コンピュータ読み取り可能な媒体は、実行されるように構成された命令を実行することに適したプロセッサによってアクセスされる。

【０１８２】

そのようなコンピュータシステムによれば、本明細書で提供される技術のいくつかの実施形態は、データ（例えば、分析物の有無、濃度）を収集、記憶、および／または分析するための機能をさらに含む。例えば、いくつかの実施形態は、例えば、命令を記憶および実行し、蛍光、画像データを分析し、データを使用して計算を実行し、データを変換し、データを記憶するための、プロセッサ、メモリ、および／またはデータベースを含むシステムを企図する。いくつかの実施形態では、アルゴリズムは、統計モデル（例えば、ポアソンモデルまたは隠れマルコフモデル）をデータに適用する。

10

【０１８３】

多くの診断は、１つ以上の核酸の存在またはヌクレオチド配列の特定を含む。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、１つ以上の分析物の有無、濃度、量、または配列特性を表す変数を含む式は、分析物の存在または品質を診断または評価するときに使用される値を生成する。したがって、いくつかの実施形態では、この値がデバイスによって、例えば、結果に関連するインジケータ（例えば、ＬＥＤ、ディスプレイ上のアイコン、サウンドなど）によって提示される。いくつかの実施形態では、デバイスは、値を記憶するか、値を送るか、または追加の計算のために値を使用する。いくつかの実施形態では、式は、１つ以上の分析物の有無、濃度、量、または特性を表す変数を含む。

20

【０１８５】

したがって、いくつかの実施形態では、本技術は、分析アッセイにおいて訓練されている可能性が低い臨床医が生データの理解する必要がない、というさらなる利点を提供する。データは、最も有用な形態で臨床医に直接提示される。臨床医は、その後、情報を利用して、被験者の治療を最適化することができる。本技術は、アッセイを実施する実験室、情報提供者、医療関係者、および／または被験者へ／から情報を受け取り、処理し、送ることができる任意の方法を企図する。例えば、本技術のいくつかの実施形態では、試料が被験者から得られ、生のデータを生成するために、世界の任意の場所（例えば、被験者が居住する国または情報が最終的に使用される国とは異なる国）に位置するプロファイリングサービス（例えば、医療施設の臨床検査室、ゲノムプロファイリング企業など）に提出される。試料が組織または他の生体試料を含む場合、被験者は、得られた試料をプロファイリングセンターに送るために医療センターを訪れてもよく、または被験者は自ら試料を収集し、プロファイリングセンターに直接送ってもよい。試料が以前に特定された生物学的情報を含む場合、情報は被験者によってプロファイリングサービスに直接送信されてもよい（例えば、情報を含む情報カードがコンピュータによってスキャンされてもよく、データは電子通信システムを使用してプロファイリングセンターのコンピュータに送られてもよい）。プロファイリングサービスによって受信されると、試料が処理され、被験者に望まれる診断または予後情報に特定のプロファイルが生成される。プロファイルデータは、その後、治療する臨床医による解釈に適したフォーマットで準備される。例えば、生の発現データを提供するのではなく、準備されたフォーマットは、特定の治療の選択肢についての推奨と共に、被験者についての診断またはリスク評価を表してもよい。データは、任意の適切な方法によって臨床医に表示されてもよい。例えば、いくつかの実施形態では、プロファイリングサービスが臨床医のために（例えば、治療の時点で）印刷することができ、またはコンピュータモニタ上で臨床医に表示することができるレポートを生成する。いくつかの実施形態では、情報は、最初に治療の時点で、または地域施設で分析される。生のデータは、その後、さらなる分析のために中央処理施設に送られ、および／または生のデータを臨床医または患者に有用な情報に変換する。中央処理施設は、プライバシー（全てのデータが均一のセキュリティプロトコルで中央施設に記憶される）、速度、およびデータ分析の均一性の利点を提供する。中央処理施設は、その後、被験者の治療後の

30

40

50

データの運命を制御することができる。例えば、電子通信システムを使用して、中央施設は、臨床医、被験者、または研究者にデータを提供することができる。いくつかの実施形態では、被験者が電子通信システムを使用してデータにアクセスすることができる。被験者は、結果に基づいてさらなる介入またはカウンセリングを選択することができる。いくつかの実施形態では、データは研究目的に使用される。例えば、データは、疾患に関連する特定の状態の有用な指標としてのマーカの含有または排除をさらに最適化するために使用されてもよい。

【0186】

〔試料〕

いくつかの実施形態において、分析物は、生体試料から単離される。分析物は、動物、植物、細菌、古細菌、真菌、または任意の他の生物から得られる任意の材料（例えば、細胞材料（生きているもの、または死んでいるもの）、細胞外物質、ウイルス物質、環境試料（例えば、メタゲノム試料）、合成物質（例えば、PCRまたは他の増幅技術によって提供されるようなアンプリコン））から得ることができる。本技術において使用するための生体試料は、ウイルス粒子またはその調製物を含む。分析物は、生物から直接、または生物から得られる生体試料、例えば、血液、尿、脳脊髄液、精液、唾液、痰、便、毛髪、汗、涙、皮膚、および組織から得ることができる。例示的な試料としては、全血、リンパ液、血清、血漿、口腔細胞、汗、涙、唾液、痰、毛髪、皮膚、生検材料、脳脊髄液（CSF）、羊水、精液、膣排泄物、漿液、滑液、心膜液、腹膜液、胸膜液、浸出液、滲出液、囊胞液、胆汁、尿、胃液、腸液、便試料、およびスワブ、吸引物（例えば、骨髓、細針など）、洗浄液（例えば、口腔、鼻咽頭、気管支、気管支肺胞、目、直腸、腸、膣、表皮などの）、呼気凝縮液、および／または他の検体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0187】

任意の組織または体液の検体は、本技術において使用するための分析物の源として使用されもよく、法医学の検体、保管された検体、保存された検体、および／または長期間保存された標本（例えば、新鮮凍結、メタノール／酢酸固定、またはホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体および試料）が挙げられる。分析物はまた、初代細胞培養物または細胞株などの培養細胞から単離することもできる。分析物が得られる細胞または組織は、ウイルスまたは他の細胞内病原体に感染させることができる。試料はまた、生物検体から抽出された全RNA、cDNAライブラリー、ウイルスDNA、またはゲノムDNAであってもよい。試料はまた、非細胞源から単離されたDNA、例えば、フリーザーに保存された増幅／単離されたDNAであってもよい。

【0188】

分析物（例えば、核酸分子、ポリペプチド、脂質）は、例えば、生体試料からの抽出によって、例えば、Maniatis, et al., (1982), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.（例えば、280～281頁を参照のこと）に記載されるような様々な技法によって得ることができる。

【0189】

いくつかの実施形態では、本技術は、例えば、標的分析物を含む分子の規定されたサイズ範囲を提供するために、分析物のサイズ選択を提供する。

【0190】

〔使用〕

様々な実施形態は、広範囲の分析物の検出に関する。例えば、いくつかの実施形態では、本技術は、核酸（例えば、DNAまたはRNA）を検出することにおいて使用される。いくつかの実施形態では、本技術は、特定の標的配列を含む核酸を検出することにおいて使用される。いくつかの実施形態では、本技術が特定の変異（例えば、一塩基多型、挿入、欠失、ミスセンス変異、ナンセンス変異、遺伝子再配列、遺伝子融合など）を含む核酸を検出することにおいて使用される。いくつかの実施形態では、本技術は、ポリペプチド（例えば、タンパク質、ペプチド）の検出に使用される。いくつかの実施形態では、本技術は、突然変異（例えば、置換、切断ポリペプチド、突然変異体または突然変異体ポリペ

10

20

30

40

50

プチドを含むポリペプチド)を含む核酸によってコードされるポリペプチドを検出することにおいて使用される。

【0191】

いくつかの実施形態において、本技術は、ポリペプチドに対する翻訳後修飾（例えば、リン酸化、メチル化、アセチル化、グリコシル化（例えば、O結合型グリコシル化、N結合型グリコシル化、ユビキチン化、官能基の付加（例えば、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化、プレニル化、ファルネシル化、ゲラニル化、ゲラニルゲラニル化、グリピエーション、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー形成）、ヒドロキシル化、ビオチン化、ペグ化、酸化、SUMO化、ジスルフィド架橋形成、ジスルフィド架橋切断、タンパク質切断、アミド化、硫酸化、ピロリドンカルボン酸形成を検出することにおいて使用される。いくつかの実施形態において、本技術は、これらの特徴の損失の検出、例えば、脱リン酸化、脱メチル化、脱アセチル化、脱グリコシル化、脱アミド化、脱ヒドロキシル化、脱ユビキチン化などにおいて使用される。いくつかの実施形態において、本技術は、DNAまたはRNAに対するエピジェネティックな修飾（例えば、メチル化（例えば、CpG部位のメチル化）、ヒドロキシメチル化）を検出することにおいて使用される。いくつかの実施形態では、本技術は、これらの特徴の損失、例えば、DNAまたはRNAの脱メチル化などを検出することにおいて使用される。いくつかの実施形態では、本技術は、クロマチン構造、ヌクレオソーム構造、ヒストン修飾などの改変を検出することにおいて、および核酸に対する損傷を検出することにおいて使用される。

【0192】

いくつかの実施形態では、本技術は、分子診断アッセイとして、例えば、少量の検体体積を有する試料（例えば、郵送サービスのための、例えば、血液の液滴）をアッセイするために使用される。いくつかの実施形態では、本技術は、非常に少量の分析物バイオマーカーの高感度検出を使用して、癌または感染性疾患の早期検出を可能にする。いくつかの実施形態において、本技術は、タンパク質バイオマーカーのエピジェネティックな修飾（例えば、翻訳後修飾）をアッセイするための分子診断において使用される。

【0193】

いくつかの実施形態では、本技術は、多分子複合体、例えば、マルチタンパク質複合体、核酸／タンパク質複合体、分子機械、オルガネラ（例えば、血漿中の、例えば、無細胞ミトコンドリア）、細胞、ウイルス粒子、生物、組織、または、捕捉することができ、本明細書に記載の技術による分析に従う任意の高分子構造または実体を特徴付けること（例えば、多分子複合体の1つ以上の成分を特徴付けること）において使用される。例えば、いくつかの実施形態では、多分子複合体が単離され、本技術は、多分子複合体に関連する1つ以上の分子（分析物）を特徴付け、同定し、定量化し、および／または検出することにおいて使用される。いくつかの実施形態では、細胞外小胞が単離され、本技術は、小胞に関連する1つ以上の分子（分析物）を特徴付け、同定し、定量化し、および／または検出することにおいて使用される。いくつかの実施形態では、本技術は、小胞内に存在するタンパク質（例えば、表面タンパク質）および／または分析物（例えば、本明細書に記載されるタンパク質、核酸、または他の分析物）を特徴付け、同定し、定量化し、および／または検出することにおいて使用される。いくつかの実施形態では、小胞が分析前に固定化され、透過化される。

【0194】

【例】

実施例1－反復クエリープローブ結合による表面固定化された標的の同定

本明細書に記載される技術の実施形態の開発中に、実験を行い、標的分析物（例えば、タンパク質、ペプチド、核酸などの分子）を表面に安定的に固定化した。その後、低親和性プローブを添加し、標的分析物への低親和性クエリープローブの反復結合を検出し、記録して、表面上の空間位置に対するクエリープローブシグナルのデータセットを生成した（図1を参照のこと）。

【0195】

10

20

30

40

50

実験中、表面上の位置に対するクエリープローブシグナル（会合（クエリープローブの分析物への結合）および解離事象）の時系列を含むデータを収集した。これらのデータは、各フレーム内のクエリープローブの結合事象または解離事象を示す差分強度のプロファイルを生成するために、フレーム毎の減算の方法を懇願して分析された。データのこの処理によって生成された差分強度のプロファイルは、初期のシグナル対位置マップ内の強度最大値よりもよく分解された強度最小値および最大値をもたらした。各事象の位置を（例えば、x、y座標を使用して）特定した後、すべての事象を空間位置に従ってクラスタ化し、各クラスタ内の事象の動態を統計解析にかけて、事象のクラスタが所定の標的分析物から生じるかどうかを特定する（図1）。

【0196】

実施例2－他の撮像方法との比較

本明細書に記載される技術の実施形態の開発中に、本明細書に記載される技術を使用して収集されたデータを他の画像化技術と比較するための実験を行った。具体的には、本明細書に記載されるように、DNA分析物を表面に固定化し、超解像画像化および事象クラスタ化を用いて画像化した（例えば、実施例1を参照のこと）。図2に示すように、本技術は、（例えば、US20160046988に記載されているような）回折限界画像化法（空の円）と比較して、差分強度のマップからのここに記載の超解像度画像化および事象クラスタ化（塗りつぶされた四角）を使用する場合、ピコモル範囲に存在するDNA標的分析物の測定のダイナミックレンジにおける改善を提供する。各個々の結合事象または解離事象の局在化、それに続く結合事象または解離事象のクラスタ化および動態分析は、表面上の複数の密接に配置した標的分析物の解像を可能にする。

【0197】

実施例3－アッセイの特異度

本明細書に記載の技術の開発中に、本明細書に記載の超解像度の画像化および事象クラスタ化技術の特異度を評価するために実験を行った。特に、突然変異配列を含む核酸の検出の特異度を、（1）既知濃度の突然変異配列のみ、または（2）10,000倍高い濃度の野生型配列のみのいずれかの存在下で検出された分子の数を比較することによって試験した。突然変異DNA配列の存在下では、画像化領域内において、結合事象（図3Aの濃い黒い点）のいくつか（例えば、約399）のクラスタが、突然変異配列と結合するクエリープローブに特徴的な動態を示した一方、非特異結合事象（図3Aの明るいグレーの丸）は、統計解析によって取り除く。対照的に、同じ実験を、突然変異体の非存在下および10,000倍高い濃度の野生型DNA配列の存在下で実施した場合、全てのクエリープローブ結合事象は、事象のローカルクラスタの統計解析によって除去され、偽陽性検出事象を生じない（図3B）。

【0198】

上記明細書に言及された全ての刊行物および特許は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。本技術の記載された組成物、方法、および使用の種々の改変および変更は、記載された技術の範囲および精神から逸脱することなく、当業者に明らかであろう。本技術は特定の例示的な実施形態に関連して記載されてきたが、特許請求の範囲に記載の本発明は、そのような特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解されたい。実際に、当業者に明らかな、本発明を実施するための記載された様式の種々の改変は、以下の特許請求の範囲内であることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0199】

【図1】本明細書に記載された技術の方法の実施形態のステップと、本明細書に記載された技術の実施形態の開発中に収集された実験データとを示す概略図である。

【図2】本明細書中に記載された実験の間に収集されたデータについての、シグナル（「許容カウント」）対ピコモル単位での濃度のプロットである。このプロットは、本明細書に記載の技術のダイナミックレンジ（塗りつぶされた正方形）が従来（白丸）と比較して改善されていることを示している。

10

20

30

40

50

【図 3 A】 標的分析物のみの存在下（図 3 A）および介在するバックグラウンド分析物の存在下であるが、標的分析物の非存在下（図 3 B）で、本明細書中に記載される実験の間に同定された結合事象クラスタの図を示す。図 3 A は、標的分析物からの有意な陽性シグナルを示す。この方法の特異度のために、図 3 B では、標的分析物のシグナルは検出されなかった。実験は、本明細書中に記載される技術の実施形態の高い特異度を示す。

【図 3 B】 標的分析物のみの存在下（図 3 A）および介在するバックグラウンド分析物の存在下であるが、標的分析物の非存在下（図 3 B）で、本明細書中に記載される実験の間に同定された結合事象クラスタの図を示す。図 3 A は、標的分析物からの有意な陽性シグナルを示す。この方法の特異度のために、図 3 B では、標的分析物のシグナルは検出されなかった。実験は、本明細書中に記載される技術の実施形態の高い特異度を示す。

10

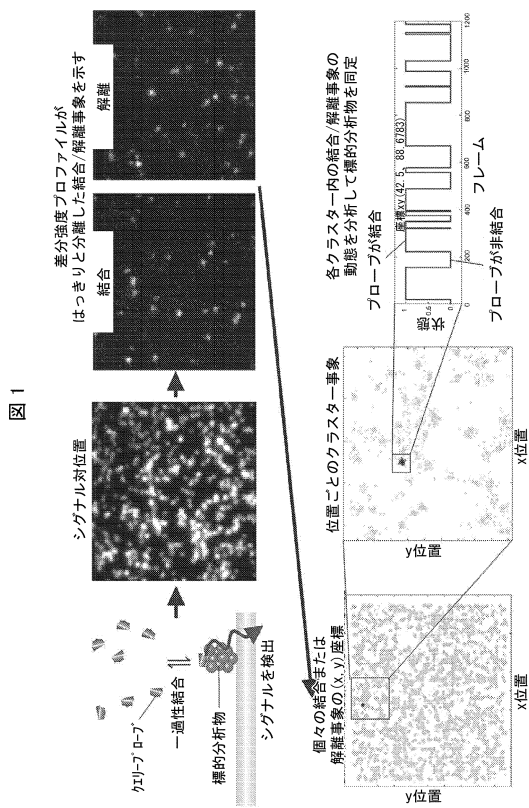
20

30

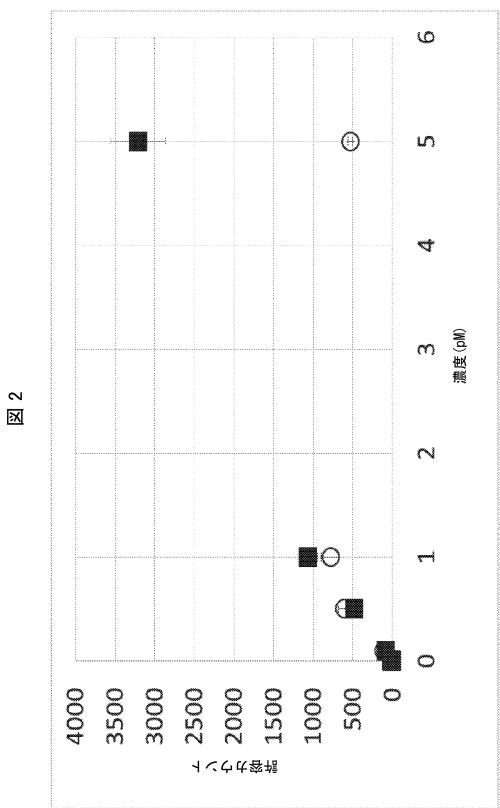
40

50

【図面】
【図 1】

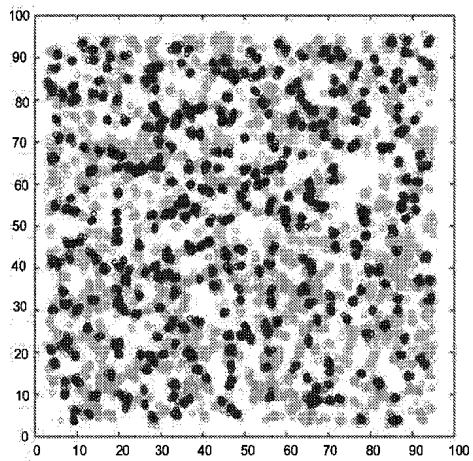


【図 2】



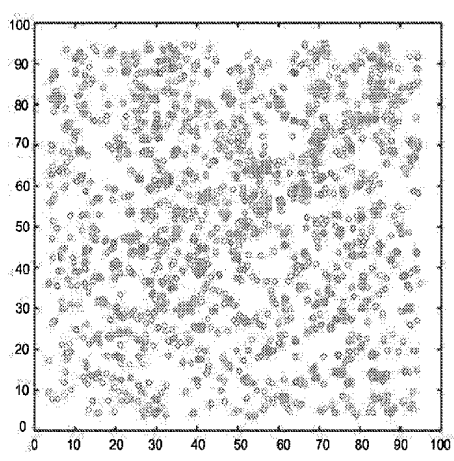
【図 3 A】

FIG. 3A



【図 3 B】

FIG. 3B



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

F I

C 1 2 M 1/34

F

C 1 2 M 1/34

Z

アー, シー／オー ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミシガン

(72)発明者 ウォルター, ニルス

アメリカ合衆国, 4 8 1 0 9 - 2 5 9 0 ミシガン州, アナーバー, ヒューロン パークウェイ 1
6 0 0, セカンド フロアー, シー／オー ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミシガン

(72)発明者 テワリ, ムネーシュ

アメリカ合衆国, 4 8 1 0 9 - 2 5 9 0 ミシガン州, アナーバー, ヒューロン パークウェイ 1
6 0 0, セカンド フロアー, シー／オー ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミシガン

審査官 海野 佳子

(56)参考文献

米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 6 5 5 9 7 (U S, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 0 4 6 9 8 8 (U S, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 4 4 8 6 3 (U S, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 1 6 9 9 0 3 (U S, A 1)

特表 2 0 1 6 - 5 3 2 6 8 9 (J P, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8