

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-503780

(P2012-503780A)

(43) 公表日 平成24年2月9日 (2012. 2. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006. 01)	GO 1 N 33/569 E	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/04	4 B O 6 3
GO 1 N 33/542 (2006. 01)	GO 1 N 33/569 F	
GO 1 N 33/58 (2006. 01)	GO 1 N 33/542 A	
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/58 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-529234 (P2011-529234)	(71) 出願人	511074109
(86) (22) 出願日	平成21年9月24日 (2009. 9. 24)		ストラウス ホールディングス インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成23年5月13日 (2011. 5. 13)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベッドフォード オーク パーク ドライブ ワン 2階
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/058270	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02010/036827		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成22年4月1日 (2010. 4. 1)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/099, 830		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成20年9月24日 (2008. 9. 24)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 分析物を検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、標的の分子、細胞、またはウイルスの高感度かつ特異的な検出について改良された方法を提供する。本発明の方法は、標的に特異的な選択部分と複合体形成した個々の標識標的を検出するために大面積画像化を使用する。本発明では、光学色素および密度剤を含み得る1つまたは複数の液体層を介した標的特異的な選択の使用によって洗浄工程が除外される。洗浄を除外することにより、本発明は、機器工学を簡略化し、ユーザの工程および経費を最小限にする。本発明は、大面積で個々の標的を計数するために高感度画像分析を使用し、拡張可能であり、ならびに手動から高度な自動化にわたる複雑性のシステムで利用され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の1つまたは複数の標的を検出する方法であって、

- a) 検出表面を含む容器に $\geq 1\text{mm}$ の最短線寸法を有する検出域を提供する工程；
 - b) 容器内の液体上部層において、シグナリング部分、選択部分、および該標的を含む組成物を接触させ、該標的と該シグナリング部分または該選択部分との複合体を形成する工程；
 - c) 選択力を加えて該上部層の該選択部分を下部クッション層を通して移動させ検出表面と接触させる工程；ならびに
 - d) 検出域に対応する検出帯内で該シグナリング部分の個々の複合体を同時に検出することにより、 $5\times$ 未満の倍率で該標的を検出する工程
- を含み、洗浄工程を含まず、かつ該標的が少なくとも2つの直交次元で50ミクロン未満である、方法。

10

【請求項 2】

シグナリング部分が光子シグナリング特徴を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

シグナリング部分または選択部分がカテゴリー結合分子とコンジュゲートする、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

カテゴリー結合分子が抗体、抗原、レクチン、核酸分子、リガンド、受容体、または小分子である、請求項3記載の方法。

20

【請求項 5】

下部クッション層がシグナリング部分を出入りする光の生成または透過に干渉する色素を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

シグナリング部分が特異的に標的に結合する、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

標的が細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

細胞が細菌細胞である、請求項7記載の方法。

30

【請求項 9】

細菌細胞が黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 細胞または炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) 細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

細胞の内部成分に特異的に結合する第2のシグナリング部分と細胞とを接触させる工程をさらに含む、請求項7記載の方法。

【請求項 11】

内部成分が核酸分子または脂質である、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

第2のシグナリング部分を光退色させる工程および上部層内または下部クッション層内で工程 (b) のシグナリング部分を検出する工程を工程 (c) の後にさらに含む、請求項10記載の方法。

40

【請求項 13】

標的が微生物細胞により分泌される分子である、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

シグナリング部分が蛍光粒子である、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

シグナリング部分がDNA染色剤を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 16】

工程 (b) の前に試料が微生物増殖培地と混合され、続いて1時間より長くインキュベ

50

ションされる、請求項1記載の方法。

【請求項17】

微生物増殖培地が抗生物質または微生物増殖阻害剤を含む、請求項16記載の方法。

【請求項18】

シグナリング部分または選択部分が容器内で乾燥形態にある、請求項1記載の方法。

【請求項19】

下部クッション層が容器内で乾燥形態にある、請求項1記載の方法。

【請求項20】

工程(b)において、標的を含む組成物が下部のクッションを水和させる、請求項19記載の方法。

10

【請求項21】

工程(b)において、標的を含む組成物が上部層および下部クッション層を水和させる、請求項20記載の方法。

【請求項22】

上部層がシグナリング部分を出入りする光の生成または透過に干渉する色素をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項23】

標的がヒト甲状腺刺激ホルモンまたは炭疽菌抗原から選択される、請求項1記載の方法。

。

【請求項24】

抗原が致死因子(LF)、防御抗原(PA)、およびポリ-D-γ-グルタミン酸(PDGA)カプセルポリペプチドから選択される、請求項23記載の方法。

20

【請求項25】

標的がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項26】

標的が生体液に存在するかまたは生体液から得られる、請求項1記載の方法。

【請求項27】

生体液がヒト全血、血清、血漿、粘液、または尿である、請求項26記載の方法。

【請求項28】

選択力が、重力、磁力、電位、遠心力、求心力、浮遊密度、濾過、または圧力である、請求項1記載の方法。

30

【請求項29】

シグナリング部分が、フルオロフォア、化学発光剤、生物発光剤、共鳴光散乱粒子、光吸収剤もしくは発色シグナリング剤、アップコンバーティング蛍光体を含む、請求項1記載の方法。

【請求項30】

選択部分が、磁気粒子、シリカ粒子、またはフェリチンを含む、請求項1記載の方法。

【請求項31】

選択部分が標的競合相手とコンジュゲートされ;工程(b)で形成される複合体が選択部分とシグナリング部分との間および標的とシグナリング部分との間であり;標的が選択部分と特異的に結合せず;かつ標的の検出が、標的の不在で形成される選択部分とシグナリング部分との複合体の量の減少により、間接的に起こる、請求項1記載の方法。

40

【請求項32】

容器が2mmを上回る画像化深度を有する画像化ウェルである、請求項1記載の方法。

【請求項33】

試料中の1つまたは複数の標的を検出する方法であって、

a) 検出表面を含む容器に ≥ 1 mmの最短線寸法を有する検出域を提供する工程;

b) 該容器内の液体において、1つまたは複数のシグナリング部分、選択部分、および該標的を含む組成物を接触させ、該標的と該シグナリング部分または選択部分との複合体を形成する工程;

50

c) 選択力を加えて該複合体を液体中を通過させ検出表面と接触させる工程;ならびに
d) 検出域に対応する検出帯内で該シグナリング部分の個々の複合体を同時に検出することにより、5×未満の倍率で該標的を検出する工程
を含み、洗浄工程を含まず、かつ該標的が少なくとも2つの直交次元で50ミクロン未満である、方法。

【請求項 3 4】

シグナリング部分が光子シグナリング特徴を含む、請求項33記載の方法。

【請求項 3 5】

シグナリング部分または選択部分がカテゴリー結合分子と結合する、請求項33記載の方法。

【請求項 3 6】

カテゴリー結合分子が抗体、抗原、レクチン、核酸分子、リガンド、受容体、または小分子である、請求項35記載の方法。

【請求項 3 7】

シグナリング部分が特異的に標的に結合する、請求項33記載の方法。

【請求項 3 8】

標的が細胞である、請求項33記載の方法。

【請求項 3 9】

細胞が細菌細胞である、請求項38記載の方法。

【請求項 4 0】

細菌細胞が黄色ブドウ球菌細胞または炭疽菌細胞である、請求項39記載の方法。

【請求項 4 1】

細胞の内部成分に特異的に結合する第2のシグナリング部分と細胞とを接触させる工程をさらに含む、請求項38記載の方法。

【請求項 4 2】

成分が核酸分子または脂質である、請求項41記載の方法。

【請求項 4 3】

第2のシグナリング部分を光退色させる工程および (a) のシグナリング部分を検出する工程を工程 (c) の後にさらに含む、請求項41記載の方法。

【請求項 4 4】

標的が、微生物細胞により分泌される分子である、請求項33記載の方法。

【請求項 4 5】

シグナリング部分が蛍光粒子である、請求項33記載の方法。

【請求項 4 6】

シグナリング部分がDNA染色剤を含む、請求項33記載の方法。

【請求項 4 7】

工程 (b) の前に試料が微生物増殖培地と混合され、続いて1時間より長くインキュベーションされる、請求項33記載の方法。

【請求項 4 8】

微生物増殖培地が抗生物質または微生物増殖阻害剤を含む、請求項47記載の方法。

【請求項 4 9】

シグナリング部分または選択部分が容器内で乾燥形態にある、請求項33記載の方法。

【請求項 5 0】

シグナリング部分または選択部分が工程 (b) 中に水和される、請求項49記載の方法。

【請求項 5 1】

液体が、シグナリング部分を出入りする光の生成または透過に干渉する色素をさらに含む、請求項33記載の方法。

【請求項 5 2】

検出工程 (d) が直接捕捉、磁気捕捉、または密度に基づく捕捉により標的を検出する工程を含む、請求項33記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 53】

標的がヒト甲状腺刺激ホルモンまたは炭疽菌抗原から選択される、請求項33記載の方法。

【請求項 54】

抗原が致死因子（LF）、防御抗原（PA）、およびポリ-D-γ-グルタミン酸（PDGA）カプセルポリペプチドから選択される、請求項53記載の方法。

【請求項 55】

標的がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）細胞である、請求項33記載の方法。

【請求項 56】

標的が生体液に存在するかまたは生体液から得られる、請求項33記載の方法。

10

【請求項 57】

生体液がヒト全血、血清、血漿、粘液、または尿である、請求項56記載の方法。

【請求項 58】

選択力が、重力、磁力、電位、遠心力、求心力、浮遊密度、濾過、または圧力である、請求項33記載の方法。

【請求項 59】

シグナリング部分が、フルオロフォア、化学発光剤、生物発光剤、共鳴光散乱粒子、光吸収剤もしくは発色シグナリング剤、またはアップコンバーティング蛍光体を含む、請求項33記載の方法。

【請求項 60】

選択部分が、磁気粒子、シリカ粒子、またはフェリチンを含む、請求項33記載の方法。

20

【請求項 61】

選択部分が標的競合相手とコンジュゲートされ;工程（b）で形成される複合体が選択部分とシグナリング部分との間および標的とシグナリング部分との間であり;標的が選択部分と特異的に結合せず;かつ標的の検出が標的の不在で形成される選択部分とシグナリング部分との複合体の量の減少により間接的に起こる、請求項33記載の方法。

【請求項 62】

容器が2mmを上回る画像化深度を有する画像化ウェルである、請求項33記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

30

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照により本明細書に組み入れられる2008年9月24日出願の米国仮出願第61/099,830号の恩典を主張する。

【0002】

背景

特定の標的を検出する重要性

特定の分子、細胞、およびウイルスの標的を検出する方法は、医学および獣医学の診断、環境試験、および産業品質管理にとって基本的手段である。臨床医学における特定の標的を検出する方法例は、市販の迅速妊娠検査、特定の抗生物質に対する感染体の耐性を決定するための微生物培養検査、および血液試料中の癌マーカーに関する高度に自動化された検査を含む。食物中の病原体汚染物質の検出、創薬の候補化合物のハイスループットスクリーニング、および薬剤中の活性成分の定量化は、特定の標的の存在を決定する方法に依存する工業生産用途を例示する。特定の標的の検査を要する環境用途は、給水汚染、空中生物学的脅威剤、および家庭真菌汚染の検出を含む。

40

【0003】

特定の標的を検出する方法の望ましい特性

特定の標的を検出する方法は正確であるべきであり、即ち高感度で特異的であるべきである。該方法は、標的が有意な量で存在する場合に標的を検出する程度に高感度であるべきである。また、特異的であるべきであり、標的が有意な量で存在しない場合には標的の

50

存在を示すべきでない。他の有益な特性は、潜在的な標的分析物の幅広さ、迅速な結果、使い易さ、費用対効果、標的定量化、および自動化を含む。種々の望ましい特性の重要性は、特定の用途および検査の場に依存し得る。

【0004】

標的の幅広さ

検査方法は広範な特定の標的を検出できるべきである。代表的な標的の種類は、ヒト細胞（例えば、HIV/AIDS診断におけるCD4+細胞）、細菌細胞（例えば、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus Aureus*）即ちMRSAまたは大腸菌（*E.coli*））、ウイルス（例えば、C型肝炎ウイルス）、プリオン（例えば、牛海綿状脳症病原体、「狂牛」病の原因）、高分子（例えば、タンパク質、DNA、RNA、炭水化物）、および小分子（例えば、化学療法薬、脂質、糖類、アミノ酸、ヌクレオチド）を含む。

10

【0005】

特定標的の標識

特定の細胞、ウイルス、または分子を検出するための一つの重要なアプローチは、標的に特異的に結合する光学的に検出可能な標識を用いて標的にタグを付けることである。標的に特異的な標識は、高分子（例えば、抗体、タンパク質受容体、核酸、炭水化物、およびレクチン）ならびに小分子（例えば、ホルモン、乱用薬物、代謝物）を含む様々な種類の標的結合部分を有し得る。標的に特異的な標識の検出可能なシグナリング部分は、蛍光、リン光、クロモゲニシティ（chromogenicity）、化学発光、光散乱、およびラマン散乱を含む様々なシグナリングモードを使用し得る。

20

【0006】

特異的に標識された標的の存在を決定する方法

特異的に標識された標的の分子、細胞、およびウイルスの存在について試料を検査するために、様々な方法が開発されてきた。技術は、収容する試料の種類、標的に対する標識の結合モード、標識により送達されるシグナルの種類、検出される複数の標識標的、結合標識と非結合標識を識別する方法、および特異的に標識された標的を検出するための技術において相違する。

【0007】

どの方法が使用されるかは、検出されるべき分析物の種類、検査の場、必要な自動化の程度、臨床的に意義のある濃度範囲、操作者の技能、および価格志向性に依存する。例えば、免疫測定法は検出用に標的に特異的な抗体を使用する。光学的に検出可能にするために、抗体は、放射性同位体、蛍光分子、化学発光分子、着色産物を産生する酵素、蛍光化合物で着色された粒子、共鳴光散乱粒子、または量子ドットを含むシグナリング部分に付着させ得る。抗体に基づく技術は、手動の側方流動、ELISA、フローサイトメトリー、直接蛍光免疫検定、ウェスタンブロット、および高度に自動化された主要な実験室方法を含む。同様に、特異的な核酸配列の検出は、核酸増幅、サザンブロットおよびノーザンブロット、ならびにインサイチュハイブリダイゼーションを含む方法を用いて、様々な種類のシグナル部分と関連する相補的な核酸プローブを使用し得る。

30

【0008】

標識された標的を計数するための画像化の利用

画像化は検出表面上で特異的に選択された標識標的を検出するための強力な方法である。画像化方法は、検出域の各点から発する光信号を画像の対応点に位置付ける。対照的に、非画像化検出方法は一般に全検出域から発する光信号を統合する。

40

【0009】

幾つかの画像化方法は個々の標識された標的分子を検出し計数し得る。特異的に標識された標的分子の計数は、検出域統合法と比較して非常に低い標的レベルでの検出をもたらし得る。画像に基づく標的計数方法の感度の利点は、主にバックグラウンドへの光信号は標的レベルが減少するにつれ本質的に一定であるという事実に起因する。対照的に、検出域統合法では、バックグラウンドへの信号は標的レベルが減少するにつれ減少する。

【0010】

50

方法の一種は、微視的ビームで検出域を体系的に走査することにより画像を構築する。走査方法は、全検出域における特異的に標識された標的を同時に計数するためにデジタルアレイ検出器（例えば、CCDカメラまたはCMOSカメラ）を使用する方法より時間がかかる。

【0011】

高感度な標的計数のための低倍率の大面积画像

個々の微視的標的を計数するために高倍率の顕微鏡を使用する方法が幾つかある。顕微鏡画像は、各画像が小面積しかサンプリングしないため、感度に欠ける。より大きな面積が連続して画像化され得るが、多数の画像収集は困難であり、費用および時間がかかる。あるいは、標識された微視的標的は個々に検出され低倍率の大面积画像を用いて計数され得る。低倍率の画像は単一の画像において比較的大面積で少数の微視的標的を計数し得る。

10

【0012】

大面积の自動化デジタル画像を使用する幾つかの方法は、個々の標識標的を同時に検出するために開発された。これらの方法は一般に毛細管室で標識標的を検出し、非結合標識を除去するために側方流動を使用する。他の側方流動法に関しては、この技術アプローチは自動化を複雑にし、簡便に分析され得る試料の体積を制限する。

【0013】

遊離標識および他の標識物から特異的に標識された標的を分離するための選択の使用

特異的に標識された標的を検出するために、方法は一般に結合標識から非結合標識および他の標識物を除去または識別しなければならない。一つの一般的なアプローチは標識標的複合体の物理的選択を用い、その後、遊離標識は反復洗浄により除去され得る。このアプローチは、効果的である一方、一般に手動方法では作業を要し、または自動化システムでは高性能の液体処理工学を要する。

20

【0014】

標識標的複合体の選択は、標的に特異的な結合部分で被覆された表面上の物理的捕捉（例えば、ELISAもしくは側方流動検定の捕捉抗体またはマイクロアレイ検定のDNAプローブ）により媒介され得る。同様に、遊離標識からの標識標的複合体の分離は、標的結合部分で被覆された選択粒子を用いて遂行され得る。例えば、磁気選択は、遊離標識を除去する洗浄工程中に標的に特異的な磁気粒子に結合した標識標的複合体を選択するために用いられ得る。

30

【0015】

側方流動法は、表面上の捕捉により選択される標識標的から遊離標識を洗浄するために毛細管流動を用いることにより、ある程度洗浄過程を簡略化し得る。この種類の洗浄は、追加のユーザ工程として洗浄溶液の追加を必要とし得る。側方流動法は高感度ではなく、一般に画像分析、自動化、または高処理量に適していない。

【0016】

特異的に標識された標的から遊離標識を除去するために洗浄を要しない方法

標識標的に特異的な結合部分と特異的に複合体形成した標的を検出する幾つかの方法が開発されてきた。方法の1種は標的分子に結合しない限り信号を発しない標識を使用する。これらの標識には、個々の標識標的の効率的な大面积検出に十分強力な信号を発しないという限度がある。洗浄を要しない別の方法は、非結合標識から標識標的複合体を分離するために液相障壁を通した選択を用いる。このアプローチは高感度画像分析よりむしろ検出域統合を用いるため高感度に欠ける。

40

【発明の概要】

【0017】

本発明は、標的の分子、細胞、またはウイルスの高感度かつ特異的な検出の改良法を提供する。本発明法は、標的に特異的な選択部分と複合体形成した個々の標識標的を検出するために大面积画像を使用する。本発明は、光学色素および密度剤を含み得る1つまたは複数の液体層を介した標的の特異的選択の使用によって洗浄工程を除外する。洗浄を除外す

50

ることにより、本発明は、機器工学を簡略化し、ユーザの工程および経費を最小限にする。本発明は、大面積で個々の標的を計数するために高感度画像分析を使用し、拡張可能であり、ならびに手動から高度な自動化までの複雑性にわたるシステムで利用され得る。

【0018】

一局面において、本発明は、検出表面を有する管に $\geq 1\text{mm}$ の最短線寸法を有する検出域を与え；管の液体上部層で、シグナリング部分（例えば光子シグナリング特徴を有する）、選択部分、および標的を含む組成物を接触させ、標的とシグナリング部分または選択部分との複合体を形成し；選択力を加えて上部層の選択部分を下部クッション層を介して移動させ検出表面と接触させ；ならびに検出域に対応する検出帯内でシグナリング部分を検出することによって標的を検出することにより、試料中において少なくとも2つの直交次元で例えば50ミクロン未満の1つまたは複数の標的を検出する方法を特徴とする。該方法は洗浄工程を含まない。下部クッション層はシグナリング部分を出入りする光の生成または透過を妨げる色素を含み得る。

10

【0019】

関連局面において、本発明は、検出表面を有する管に $\geq 1\text{mm}$ の最短線寸法を有する検出域を与え；管の液体中で、1つまたは複数のシグナリング部分（例えば光子シグナリング特徴を有する）、選択部分、および標的を含む組成物を接触させ、標的とシグナリング部分または選択部分との複合体を形成し；選択力を加えて液体を介して複合体を移動させ検出表面と接触させ；ならびに検出域に対応する検出帯内でシグナリング部分を検出することによって標的を検出することにより、試料中において少なくとも2つの直交次元で例えば50ミクロン未満の1つまたは複数の標的を検出する方法を特徴とする。該方法は洗浄工程を含まない。

20

【0020】

本発明の種々の態様において、シグナリング部分または選択部分は、抗体、抗原、レクチン、核酸分子、リガンド、受容体、または小分子などのカテゴリー結合分子とコンジュゲートする。好ましくは、シグナリング部分は特異的に標的と結合する。検出帯におけるシグナリング部分と標的との個々の複合体は、例えば光電子アレイ検出器を用いて、同時に検出され得る。好ましくは、検出は、 $5\times$ 未満の倍率、例えば0倍率を用いる。例示的な標的は、細菌細胞（例えば黄色ブドウ球菌細胞もしくは炭疽菌（*Bacillus anthracis*））などの細胞、または微生物細胞により分泌された分子である。細胞が検出される場合、該方法は、細胞の内部構成要素（例えば核酸分子または脂質）と特異的に結合する第2シグナリング部分と細胞とを接触させる工程をさらに含み得る。第2シグナリング部分は光退色し得る。該方法は光退色後に元のシグナリング部分を検出する工程を含み得る。例示的なシグナリング部分は蛍光粒子およびDNA染色剤である。試料は、例えば抗生物質または微生物増殖阻害剤を含む、微生物増殖培地と混合した後、選択部分またはシグナリング部分と接触させる前に1時間より長くインキュベーションされ得る。シグナリング部分または選択部分は管内で乾燥形態であり得る。下部クッション層は、存在する場合、管内で乾燥形態であり得る。標的を含む組成物は管内の乾燥形態の任意試薬を水和させ得る。ある態様において、組成物は、2つの液体層が産生されるように、下部のクッションもシグナリング部分および選択部分も水和させる。標的は、生体液、例えばヒトの全血、血清、血漿、粘液、もしくは尿に存在し得る、またはそれらから入手し得る。例示的な選択力は、重力、磁力、電位、遠心力、求心力、浮遊密度、濾過、および圧力を含む。シグナリング部分は、フルオロフォア、化学発光剤、生物発光剤、共鳴光散乱粒子、光吸収もしくは発色性のシグナリング剤、またはアップコンバーティング蛍光体を含み得る。選択部分は、磁気粒子、シリカ粒子、またはフェリチンを含み得る。例示的な管は2mmを上回る画像深度を有する画像ウェルである。

30

40

【0021】

該方法は競合検定として利用され得る。選択部分が標的競合相手とコンジュゲートする場合、選択部分とシグナリング部分および標的とシグナリング部分との間で複合体が形成され、標的は選択部分と特異的に結合せず、標的の検出は標的の不在下で形成される選択

50

部分とシグナリング部分との複合体の量の減少により間接的に起こる。

【0022】

試験用の試薬の幾つかまたは全ては試験装置に包含し得る。試薬の幾つかまたは全ては、ユーザにより手動で、または自動機器により、混合され得る。試験装置は単一の容器であり得る。あるいは、例えば下記の1つまたは複数を含む複合カートリッジであり得る:搭載ポンプ、流体力学チャンネル、弁、試薬貯蔵部、電子機器、検出器、試料入力モジュール、および廃棄モジュール。

【0023】

ある態様において、該方法はシグナリング部分として標識粒子を利用する。標識粒子と標的との接触は標的:標識粒子複合体の形成を生じる。標識粒子は、例えば100未満など、特定の標識比率を生じる量で、該方法において利用され得る。

10

【0024】

画像化とは検出域からの画像の同時収集を意味する。

【0025】

洗浄とは、容器または表面から、標的からの望ましくない構成要素を含む液体を物理的に除去するための過程を意味し、望ましくない構成要素とは対照的に、標的は容器内または表面上で保持され、選択され、または捕捉される。

【0026】

洗浄を要しない検査とは、標的が洗浄工程を用いずに検出される検査を意味する。

【0027】

分析器または画像分析器とは、本明細書で定義されるように、検出域の同時画像化を可能にするアレイ光検出器および画像光学を有する装置を意味する。分析器は、選択力を選択部分に加えるためのモジュールを含む検出、伝達、またはインキュベーションを強化する多数の他の機能を有し得る。

20

【0028】

ウェルとは液体を保持し得る管を意味する。ウェルは一般に $\geq 1\text{mm}$ のウェル深度を有する。

【0029】

画像化ウェルとは、標識標的が画像化により検出され得るウェルを意味する。画像化ウェルは検出表面を有し、画像分析器は該表面上で標識標的粒子を検出し得る。検出表面と画像分析器の光検出器との間にある物質は標識標的の画像検出を支持する光学特性を有する。例えば、該物質は、一般に透明であり、装置のシグナリング部分のシグナリング特徴に対応するスペクトル領域において低い光学バックグラウンドを有する。

30

【0030】

画像化ウェル深度とは、検出表面に垂直な軸に沿った画像化ウェルの高さを意味する。

【0031】

クッション、濃度クッション、液体クッション、クッション層、または液体濃度クッションとは、上部層より高濃度の実質的に液体層を意味する（例えば、液体層が上部層より少なくとも1%、2%、5%、8%、10%、15%、20%、30%、35%、40%、もしくは50%、またはそれ以上の濃度を有する）。本発明において、クッションは検出表面と試料および検査試薬を含む液体層との間にある画像化ウェルで見出される。このクッションは検査試薬と検出表面との間に物理的分離を提供する。選択を用いて、選択部分と複合体形成した標識標的はクッションを通して移動し画像化用の検出表面上に沈殿する。選択部分と複合体形成しないシグナリング部分はクッションの高濃度液体層により検出帯から排除される。

40

【0032】

色素とはシグナリング部分を出入りする光の生成または透過を妨げ且つ反応に添加される物質または混合物を意味する。色素は検出帯の外部から発するシグナルを減少または除去する一方、検出帯内のシグナリング部分に由来するシグナルの検出を認める。蛍光シグナリング部分を含む装置に関しては、色素は蛍光励起周波数、蛍光発光周波数、または両

50

方の光を吸収し得る。光散乱および吸光度を含む種々の色素特性はこの目的に有用であり得る。種々の態様において、色素は少なくとも50%、75%、85%、90%、95%、または更に99%までシグナルを減少させる。

【0033】

染色クッションとは色素を含むクッションを意味する。染色クッションは（染色クッションの濃度の機能として）検出帯からバルク反応の物理的排除を同時に提供する一方、（高濃度層に含まれる色素の機能として）上部反応から検出器へのシグナル伝達を妨げるまたは減少させる。

【0034】

サンプリング装置とは試料を採取するために用いられる装置を意味する。サンプリング装置の例は、スワブ、毛細管、拭き取り繊維、ビーカー、多孔性フィルター、吸湿性フィルター、およびピペットチップを含む。

10

【0035】

標的とは、試料中に潜在的に存在する細胞、ウイルス、分子（例えば、タンパク質、DNA、RNA、または炭水化物などの高分子、および例えば、化学治療薬、脂質、糖、アミノ酸、またはヌクレオチドなどの小分子）、または分子複合体を意味し、その存在は本発明により試験される。

【0036】

標的競合相手とは、カテゴリー結合分子への結合に関して標的と競合する細胞、ウイルス、分子（例えば、タンパク質、DNA、RNA、または炭水化物などの高分子、および例えば、化学治療薬、脂質、糖、アミノ酸、またはヌクレオチドなどの小分子）、または分子複合体を意味する。標的競合相手は、選択部分とコンジュゲートするかまたは安定に付着する標的であり得る。

20

【0037】

標的のカテゴリーとは、多重標的が本発明を用いて構築される試験の目的で同一とみなされるように、多重標的により共有される1つまたは複数の特徴を意味する。例えば、全てのHIVウイルスを検出するために設計された試験に関しては、カテゴリーはHIVである。このような試験は、HIV-1およびHIV-2の変異体を区別することなく、全てのHIVウイルスを検出する。この場合において、標的のカテゴリーはHIV-1もHIV-2も含む。別の試験の目標はHIV-1とHIV-2を識別することであり得る。この場合において、HIVの各型は異なるカテゴリーとみなされる。試験の目標がC.アルビカンズ（C. albicans）を検出することである場合、C.アルビカンズに特異的に結合するという共通の特性を共有するため試験目的で同一とみなされる3つのプローブは、標的分子の同一カテゴリーに入るとみなされる。

30

【0038】

カテゴリー結合分子は、カテゴリーに特異的な結合部位に特異的に結合する分子または分子複合体を意味する。カテゴリー結合分子の例は、ゲノムDNAにハイブリダイズする核酸プローブ；タンパク質上の部位に特異的に結合するために選択されたまたはインビトロで「進化した」核酸アプタマー；細胞性抗原または血清タンパク質に結合する抗体；および上皮増殖因子などのリガンドまたはホルモン受容体もしくはアビジンなどの結合分子に特異的に結合するビオチンである。異なる非重複カテゴリーに特異的な結合部位に結合する場合、2つのカテゴリー結合分子は異なる。カテゴリー結合分子は、例えば、カテゴリー結合オリゴヌクレオチド、プローブ、抗体、リガンドなど、分子組成に従って呼ばれ得る。本発明の「抗体」という用語は、例えば、分子または分子複合体に対する特異性によって結合可能な任意のポリペプチドを含み、例えば、完全無傷抗体、キメラ抗体、二特異性抗体、二重特異性抗体、Fab断片、F(ab')₂分子、一本鎖Fv（scFv）分子、タンデムscFv分子、およびアプタマーを含む。完全無傷抗体は、マウスモノクローナル抗体（mAb）などのモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体を含む。抗体は合成的に誘導された配列も含み得る。

40

【0039】

特異的に結合するとは、カテゴリー結合分子が 10^{-6} M未満、より好ましくは 10^{-7} M、 10^{-8}

50

M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} M未満、および最も好ましくは 10^{-13} M、 10^{-14} M、または 10^{-15} Mの解離定数で分子または分子複合体と結合することを意味する。標的のカテゴリに対するカテゴリ結合分子の特異的な結合は、試験により走査されるカテゴリのメンバーである本質的に全ての標的に対してだが（例えば、少なくとも約70%、80%、90%、95%、99%以上の標的がカテゴリ結合分子に結合する）、試料中に存在する可能性がある実質的に他の分子に対してではない（例えば、約1%、5%、10%、15%、20%、または25%未満の非標的分子がカテゴリ結合分子に結合する）結合条件下で起こり得る。走査カテゴリ内の標的と結合するカテゴリ結合分子の数は、このようなカテゴリ内にはない標的による結合数と比較して、通常2倍、5倍、10倍、または50倍を上回る。

【0040】

10

捕捉分子とは、表面、膜、または粒子でない他のマトリクスに安定的に結合するカテゴリ結合分子を意味する。

【0041】

シグナル要素とは、検出可能なシグナルを直接生成する分子または粒子を意味する。「直接生成する」という語句は、シグナル要素が検出可能なシグナルの直接の発生源または重要なモジュレータであるという事実に言及する。従って、シグナルがフルオロフォアから生じる光子である場合、フルオロフォアは、光子の直接発生源であるため、シグナル要素である。シグナルがRLS粒子により散乱される光子である場合、RLS粒子はシグナル要素である。あるいは、シグナルがホースラディッシュペルオキシダーゼ酵素の発色沈降産物から光透過または散乱される場合、発色産物はシグナル要素である。

20

【0042】

シグナル要素の特徴は、このような要素が、各部分が全体に匹敵する（特徴において、必ずしも強度でない）シグナルを生成するような部分に分割され得ないことである。従って、直径2nmの量子ドットはシグナル要素であり、分割につれ、得られるナノ結晶の特徴（発光スペクトル）を変化させる。フルオレセインなどの蛍光色素で含浸させた5 μ m粒子は、各部分が無傷粒子に匹敵するシグナリング特徴を有するような部分に分割され得るため、シグナリング要素ではない。フルオレセイン分子は、対照的に、シグナリング要素である。シグナル生成酵素（例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ）の検出可能な産物もシグナル要素とみなされる。このようなシグナル要素（または前駆体からシグナル要素への化学変換がある場合はそれらの前駆体）は、拡散性物質、不溶性産物、および/または不安定な中間体であり得る。例えば、アルカリホスファターゼ酵素は化学発光物質のCDP-Star（NEN; カタログ番号NEL-601）を活性化産物に変換し、該産物は光子を放出するシグナル要素である。

30

【0043】

シグナリング部分は、1つまたは複数のシグナル要素を含むまたは（酵素の場合）産生する分子、粒子、もしくは物質を意味し、カテゴリ結合分子に安定して付着するまたはし得る。シグナリング部分は、共有結合あるいは非共有結合のいずれかで、および直接的あるいは間接的のいずれかで（例えば、1つまたは複数のアダプターもしくは「化学リンカー」部分を介して、または同一粒子にコンジュゲートする両部分により）カテゴリ結合分子に付着し得る。シグナリング部分の例は、カルボキシル化量子ドット; 核酸プローブまたは抗体プローブに結合するために修飾されたTexas Redなどのフルオロフォア; ストレプトアビジンで被覆された蛍光ポリスチレン粒子（ビオチン化カテゴリに特異的な結合タンパク質とコンジュゲートし得る）; それぞれが蛍光修飾ヌクレオチドの尾部をもつ幾つかのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズでき且つ5'末端にカテゴリに特異的な結合オリゴヌクレオチドを含む反復核酸配列を含むローリングサークル複製産物を含む。シグナリング部分は物理的に異なる要素を含み得る。例えば、ある場合には、シグナリング部分はカテゴリ結合分子（例えば抗体）にコンジュゲートする酵素（例えば、アルカリホスファターゼ）である。アルカリホスファターゼの基質（例えば、NENおよびRocheからそれぞれCDP-StarまたはBM紫）がシグナル要素（例えば、光子を放出する不安定な中間体、または沈殿可能な発色産物）である産物に変換される場合に、シグナルが発生する。カ

40

50

テゴリー結合分子、酵素シグナリング部分、および基質が、異なる時間に反応に適用されることは稀ではない。

【0044】

粒子は50ミクロン未満のサイズであるマトリクスを意味する。粒子の集団またはバッチのサイズは、粒子の試料に関する直交次元の最長対の平均測定値として定義される。直交次元の最長対は粒子の直交次元の対であり、その長さの合計は粒子のそのような合計全体の最大値である。2つの粒子の試料が1ミクロン×2ミクロンおよび2ミクロン×3ミクロンの直交次元の最長対をそれぞれ有する場合、直交次元の最長対の平均測定値は2ミクロンである（ $(1+2+2+3)/4=2$ ミクロン）。粒子の試料に関する直交次元の最長対の平均測定値は、例えば50ミクロン未満、20ミクロン未満、または5ミクロン未満である。

10

【0045】

多数の粒子は幾つかの固体の特徴を有する。しかしながら、剛性でない分子足場または複合体も粒子として定義される。例えば、デンドリマーまたは他の分岐分子構造は粒子とみなされる。同様に、リボソームは他の種類の粒子である。粒子はシグナル要素と会合またはコンジュゲートし得る。粒子はしばしばそれらの寸法または形状を反映する用語で呼ばれる。例えば、所定軸に沿って1ミクロン未満の粒子に言及するためにナノスフェア、ナノ粒子、またはナノビーズという用語が用いられる。同様に、所定軸に沿って1ミリメートル未満の粒子に言及するために、ミクロスフェア、マイクロ粒子、またはマイクロビーズという用語が用いられる。粒子の例は、ラテックス粒子、ポリアクリルアミド粒子、マグネタイト微粒子、磁性流体（磁気ナノ粒子）、量子ドットなどを含む。

20

【0046】

標識粒子とは、標的に特異的に結合しシグナルを発生し得る粒子を意味する。標識粒子はシグナリング部分にもカテゴリー結合分子にもコンジュゲートする。

【0047】

標的:標識粒子複合体とは1つまたは複数の標的が特異的に結合する標識粒子を意味する。

【0048】

標識率とは接触工程中の標識粒子に対する標的の比率を意味する。例えば、 1×10^7 標識粒子が 1×10^6 標的を含む試料と接触する場合、標識率は0.1である。標識率を計算する目的で、標識粒子に特異的に結合し得る標的のみが考慮される。例えば、物理的に近づき難い標的（例えば、細胞内区画で隔離される）は、計算に含まれない。

30

【0049】

シグナル要素またはシグナル部分のシグナル特徴は、他のシグナル要素またはシグナリング部分から識別するのに役立つシグナル要素またはシグナリング部分により発生するシグナルの局面を意味する。例えば、フルオレセインおよびローダミンで標識されたシグナリング部分のシグナル特徴は蛍光である。無線トランスポンダーの特徴は無線周波数である。光子シグナリング特徴の例は蛍光、光散乱、リン光、反射率、吸光度、化学発光、および生物発光である。光子シグナリング特徴の後2例を除く全ては外部照明に依存する（例えば、白色光源、レーザー光源、または日光）。対照的に化学発光および生物発光は外部の光源と無関係なシグナリング特徴である。

40

【0050】

シグナル特性とは、試験において標的のカテゴリーに結合するシグナリング部分の組み合わせの特徴的なシグナリングの性質を意味する。抗体の1種がフルオレセイン分子にコンジュゲートし且つ抗体の3種がローダミン分子とコンジュゲートする、4種類の抗体に結合する標的は、フルオレセインおよびローダミンの吸光度および発光スペクトルの加重の組み合わせにより記載されるシグナル特性を有する。

【0051】

選択力とは標的を捕捉、分離、移動、または隔離するために用いられる力を意味する。選択力の例は、重力、磁力、電位、遠心力、求心力、浮遊密度、および圧力を含む。標的は標的単独に作用する選択力により動員され得る。あるいは、選択力は選択部分と関連す

50

る標的に特異的に作用し得る（下記の定義を参照）。

【0052】

標的を動員するための選択力の適用例は、標的の遠心分離；磁気粒子に結合する標的の磁気選択；金属粒子で標識された標的の重力沈降；および真空濾過による多孔性膜上の標的の沈着を含む。選択力の利用の更なる例は下記の例に含まれる。

【0053】

選択部分は、カテゴリー結合分子にコンジュゲートでき且つ選択力により選択的に捕捉、分離、移動、または隔離する能力をカテゴリー結合分子に与える原子、分子、粒子、または他の実体を意味する。カテゴリー結合分子：選択部分複合体が標的に特異的に結合する場合、標的は一般に選択力により選択的に捕捉、分離、移動、または隔離され得る。選択は、選択部分と関連しない実体より選択部分および関連部分に、選択力による動員に対する感受性を優先的に与えることに言及する。

10

【0054】

常磁性粒子およびフェリチンは選択部分の例である。溶液に沈む濃厚シリカ粒子は別種類の選択部分である。このような粒子は、カテゴリー結合分子で被覆され微生物標的と結合する場合、標的を水溶液に沈殿させ、他の試料の非結合構成要素から結合標的を分離する。

【0055】

選択特徴は、選択部分を捕捉、選択、または移動するのに役立つ選択部分の単数または複数の局面を意味する。例えば、常磁性粒子の選択特徴は磁力である。水溶液に急速に沈むシリカ粒子の選択特徴は密度である。

20

【0056】

おおよそ平面の表面または基質とは、表面上の任意の1mm×1mm平方の点から架空平面上の最接近点までの距離を測定した場合、平均距離の絶対値が50マイクロメートル未満であるように、架空平面と平行に配列され得る表面を意味する。

【0057】

検出表面とは、本発明の幾つかの態様において、標的が沈着するおおよそ平面の基質の表面を意味する。光子シグナリング特徴を用いる態様において、検出表面が光学的に透明である場合、検出は検出表面のいずれかの面によって達成される。検出表面が不透明である場合、検出は標的が沈着する検出表面の面によって達成される。

30

【0058】

検出域とは、本発明により同時に分析される検出表面または検出帯の区域を意味する。検出域は通常その最長線寸法において1mmより大きく、例えば5mm、10mm、または15mmより大きい。例えば、収集レンズおよびCCDチップを含む光学装置により同時に画像化されるスライドガラスの切片は0.8cm×0.5cmである。従って、検出域は0.4cm²である。

【0059】

検出帯は標的が検出され得る容積を意味する。検出帯は検出域と同じ寸法を有するが、標識粒子が検出され同定され得る深度に対応する深度を有する。検出帯の深度は、従って、陽性シグナルを記録するために用いられる限界基準に依存する。光検出が用いられる場合、検出帯の深度は場の光学的深さに依存する。

40

【0060】

検出域の最長寸法とは、検出域の周囲の2点間に引かれ得る最大長の線を意味する。例えば、検出域が0.3cm×0.4cmの長方形である場合、検出域の最長寸法は対角線の0.5cmである。検出域が長さ7mmの長半径および長さ2.5mmの短半径の楕円である場合、検出域の最長寸法は14mmである。

【0061】

検出域の最短寸法とは、検出域の周囲の2点間に引かれ得る最小長の線を意味する。例えば、検出域が0.3cm×0.4cmの長方形である場合、検出域の最短寸法は0.3cmである。検出域が長さ7mmの長半径および長さ2.5mmの短半径の楕円である場合、検出域の最短寸法は5mmである。

50

【0062】

大面積検出または大面積画像化とは、微視的標的を検出する方法であって、検出域（検出装置により同時に分析される区域）が標的よりはるかに大きい方法を意味する。大面積検出の検出域は $\geq 1\text{mm}$ の線寸法を有する。対照的に、微視的標的は実質的により小さく、通常少なくとも2つの直交次元で $50\text{ }\mu\text{m}$ 未満である。大面積検出の例はCCDカメラを用いて直径 9mm の検出域を画像化する工程； 1cm の長さを有するCCD線スキャナーを用いて走査することにより $2\text{cm} \times 1\text{cm}$ の長方形を画像化する工程；写真フィルム上への直接暴露を用いて微生物標的を含む $4\text{cm} \times 4\text{cm}$ フィルターを画像化する工程；ならびに高速側方流動片試験において $1\text{cm} \times 3\text{cm}$ 試験面積上で微視的標的に対応する有色点を視覚的に検出する工程を含む。

【0063】

コンジュゲートするまたは安定的に会合するとは、会合の平均半減期が 4°C のPBSで少なくとも1日である2つの実体間の物理的会合を意味する。

【0064】

検出面積の一片において標的を同時に検出するとは、おおよそ平面の検出表面の一片から一工程でシグナルを検出することを意味する。CCDチップ、視覚的検出、または光ダイオード系シグナル統合を用いた検出面積における標的の大面積画像化は、同時検出の例である。

【0065】

試料とは標的の存在に関して本発明により調査される物質を意味する。

【0066】

直接視覚的検出とは装着型補正レンズ以外の機器に頼らない視覚的検出を意味する。例えば、直接視覚的検出は幾つかの高速側方流動試験において金ナノ粒子の帯赤色反射シグナルを検出するために用いられ得る。

【0067】

光電検出器とは、光子シグナルを電気シグナルに変換する人工装置または機器を意味する。光電検出器の例は、CCD検出器、光電子増倍管検出器、および光ダイオード検出器、例えばアバランシェ光ダイオードを含む。

【0068】

照射するとは、電磁放射を用いた照射を意味する。様々な波長の電磁放射が照射に用いられ得る。例えば、スペクトルのX線、UV、可視、または赤外線領域における波長での放射を含む。照射光は必ずしも可視範囲でないことに留意せよ。

【0069】

光子シグナリング特徴をもつシグナル要素またはシグナリング部分とは、光子の放出、反射、散乱、屈折、吸収、捕捉、もしくは転送、または光子運動の任意の他の変調もしくは組み合わせにより検出可能なシグナル要素またはシグナリング部分を意味する。光子シグナリング特徴を有するシグナル要素またはシグナリング部分の幾つかの例は、フルオロフォアTexas Red（蛍光シグナリング特徴）；CDP-Star（化学発光シグナリング特徴）；ルシフェラーゼ（生物発光シグナリング特徴）；共鳴光散乱粒子（光散乱シグナリング特徴）；BM紫（光吸収または発色シグナリング特徴）；およびアップコンバーティング蛍光体（2つの長波長光子の吸収および一つのより短波長光子の放出）を含む。

【0070】

PBSは、 120mM NaCl、 2.7mM KClおよび 10mM リン酸緩衝液（ナトリウム塩）を含む pH 7.4のリン酸緩衝生理食塩水溶液である。

【0071】

PBS-TBPは、 2mg/ml BSA、 0.05% Tween 20および 0.05% v/v Proclin（登録商標）300を含む 120mM NaCl、 2.7mM KClおよび 10mM リン酸緩衝液（ナトリウム塩）を含む pH 7.4のリン酸緩衝生理食塩水溶液である。

【0072】

Tris-TBPは 2mg/ml BSA、 0.05% Tween 20および 0.05% v/v Proclin（登録商標）300を含む pH 7.4の 20mM Tris HCLである。

10

20

30

40

50

【0073】

EDACは(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドである。

【0074】

BSAはウシ血清アルブミンである。

【0075】

CCDは電荷結合素子である。

【0076】

CFUはコロニー形成単位である(生菌細胞数に対応する細菌濃度の測定)。

【0077】

HBVはB型肝炎ウイルスである。

10

【0078】

HCVはC型肝炎ウイルスである。

【0079】

HIVはヒト免疫不全ウイルスである。

【0080】

TSHは甲状腺刺激ホルモンである。

【0081】

特に断りのない限り、本明細書に記載される微生物株は、American Type Culture Collection(ATCC)、Manassas、VAから入手する。

【図面の簡単な説明】

20

【0082】

【図1】特異的標識対非特異的標識を示す。

【図2】試料と他の反応成分との接触方法を示す。

【図3】標的捕捉の異なる方法を示す。

【図4】蛍光DNA染色を用いた黄色ブドウ球菌の標識-黄色ブドウ球菌DNAのSYTO-13(登録商標)染色の相対ログ蛍光強度を示す。

【図5】蛍光ナノ粒子とコンジュゲートさせたニワトリ抗プロテインA抗体を用いた黄色ブドウ球菌の標識を示す。抗体で被覆した蛍光粒子により染色した黄色ブドウ球菌細胞の相対ログ蛍光強度を示す。

【図6】フローサイトメトリーによる黄色ブドウ球菌に特異的な蛍光粒子の結合効率の測定を示す。

30

【図7】抗黄色ブドウ球菌抗体で被覆した磁気粒子の試験を示す。バイオアッセイは磁気選択後の磁気粒子数対黄色ブドウ球菌の磁気捕捉率を示す。

【図8】Chromotrope 2R色素は撮像装置で用いられる励起フィルターおよび放出フィルターの通過光に対応する波長の光を吸収する。

【図9】色素は蛍光粒子からのシグナルを減衰させるために使用され得る。

【図10】磁気捕捉および色素を用いたヒト血清におけるヒト甲状腺刺激ホルモン(hTSH)の検定を示す。

【図11】ヒト甲状腺刺激ホルモン検定試薬を用いた色素およびクッションの効果を証明する色素-クッション試薬の試験を示す。

40

【図12】TSH検定試薬を用いた色素およびクッションの効果を証明する色素クッション試薬の試験を示す。hTSHに関する磁気選択実験を示す。

【図13】試料が全血である場合に2層系を形成するために必要な密度剤の濃度を示す。

【図14】色素クッションでの選択後の個々の蛍光微粒子の計数による全血におけるhTSHの高感度検出を示す。

【図15】磁気捕捉、クッション色素試薬、磁性担体を用いるヒト全血におけるヒト甲状腺刺激ホルモン(hTSH)の検出(実施例8)を示す。

【図16】分散磁気捕捉およびクッション色素試薬を用いるヒト血漿におけるヒト甲状腺刺激ホルモン(hTSH)の検定(実施例9)を示す。

【図17】分散磁気捕捉およびクッション色素試薬を用いるヒト血漿におけるヒト甲状腺

50

刺激ホルモン（hTSH）の検定（実施例9）を示す。

【図18】磁気捕捉およびクッション色素試薬を用いるヒト血漿における炭疽細菌致死因子（LF）の検出（実施例10）を示す。

【図19】磁気捕捉およびクッション色素試薬を用いるヒト血漿における炭疽細菌致死因子（LF）の検出（実施例10）を示す。

【図20】磁気捕捉およびクッション色素試薬を用いるヒト血漿における炭疽細菌防御抗原（PA）の検出（実施例11）を示す。

【図21】磁気捕捉およびクッション色素試薬を用いるヒト血漿における炭疽細菌防御抗原（PA）の検出（実施例11）を示す。

【図22】ヒト尿における炭疽細菌ポリ-D-γ-グルタミン酸（PDGA）カプセルポリペプチドの検出（実施例12）を示す。

【図23】ヒト尿における炭疽細菌ポリ-D-γ-グルタミン酸（PDGA）カプセルポリペプチドの検出（実施例12）を示す。

【図24】自動分析によるヒト全血における炭疽細菌致死因子の検出（実施例13）を示す。

【図25】細菌タンパク質炭疽菌ポリ-D-γ-グルタミン酸カプセルポリペプチドの検出による競合免疫測定（実施例14）を示す。

【図26】ヒトTSHおよび炭疽細菌PAおよびPDGAに関する陽性および陰性の内部検定対照（実施例15）を示す。

【図27】色素クッションでの磁気選択後のDNA染色で標識された個々の黄色ブドウ球菌細胞の計数（実施例16）を示す。

【図28】DNA染色および特異的磁石による非特異的標識を用いた黄色ブドウ球菌色素クッション検出の特異性（実施例16）を示す。

【図29】非特異的Sybr Green DNA染色を用いた検出および色素クッション試薬を用いた磁気選択による黄色ブドウ球菌色素の検出（実施例16）を示す。

【図30】蛍光ナノ粒子とコンジュゲートさせたニワトリ抗プロテインA抗体を用いた黄色ブドウ球菌細胞の標識（実施例17）を示す。

【図31】特異的標識、すなわち蛍光ナノ粒子とコンジュゲートさせたニワトリ抗プロテインA抗体を用いた黄色ブドウ球菌検出の特異性（実施例17）を示す。

【図32】蛍光粒子とコンジュゲートさせたニワトリ抗プロテインA抗体を用いた検出および色素クッション試薬を用いた磁気選択による黄色ブドウ球菌細胞の検出（実施例17）を示す。

【図33】細胞の選択的増殖および免疫検出によるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の検出プロトコル（実施例18）を示す。

【図34】細胞の選択的増殖および免疫検出によるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の検出（実施例18）を示す。

【図35】試薬の安定化-ヒト甲状腺刺激ホルモン試薬の凍結乾燥（実施例19）を示す。

【図36】凍結乾燥試薬を利用したヒト甲状腺刺激ホルモンの検定（実施例19）を示す。

【図37】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌試薬の試薬-凍結乾燥の安定化（実施例20）を示す。

【図38】凍結乾燥試薬を利用した黄色ブドウ球菌の検定（実施例20）を示す。

【図39】選択複合体の移動によるビオチンの特異的検出（実施例21）を示す。

【図40】光退色を利用した検定における黄色ブドウ球菌の特異的検出（実施例22）を示す。

【図41】標識が光退色しやすい場合の画像中のデブリを同定するための光退色の利用（実施例23）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0083】

発明の詳細な説明

発明の概観

10

20

30

40

50

本発明は、個々の標識標的を計数するための高感度大面積および洗浄工程を要しない方法論を用いて微視的標的（細胞、ウイルス、分子（例えば、タンパク質、DNA、RNA、もしくは炭水化物などの高分子、および、例えば化学療法薬、脂質、糖、アミノ酸、もしくはヌクレオチドなどの小分子）、または分子複合体）の存在に関して試料を試験する。本発明のこれらの特性は、正確、高感度、特異的、迅速、使い易い、および費用効果的な試験を可能にする一方、機器工学を簡略化し、ユーザの工程を最小限にする。該方法は、参照により本明細書に組み入れられる2009年9月24日に出願され、標題が「Imaging analyzer for testing analytes」の国際出願第_____号および本明細書に記載される画像分析器、ならびに/または参照により本明細書に組み入れられる2009年9月24日に出願され、標題が「Kits and devices for detecting analytes」の国際出願第_____号および本明細書に記載されるキットもしくは装置を用いて実施され得る。

10

【0084】

該方法の重要な機能および特性の幾つかは下記の節に記載される：

1. 試料
2. 標的
3. 試料処理
4. 試験装置
5. 標識
6. 選択
7. 検定形式
8. 接触
9. 沈着
10. 標識標的の識別
11. 検出
12. 分析
13. アセンブリ。

20

【0085】

1. 試料

標的を潜在的に含み本発明により試験され得る試料は、液体、固体、気体、または3つ全ての組み合わせであり得る。試料の種類は、臨床（例えば、血液または尿）、製造（例えば、食品または医薬）、および環境（例えば、空気、地表、または水）を含む。試料は、例えば溶質および僅かな微粒子を含む液体など、実質的に均一であり、または試料は、土壌などの環境試料から粘土懸濁液もしくは他の粒子など、不均一であり得る。試料は、1つまたは複数の標的を含み、ならびに標的は天然もしくは合成の標的、または天然および合成の標的の混合物であり、例えば血液試料はホルモン（天然物質）も合成薬も含み得る。

30

【0086】

本発明を用いて試験され得る試料の供給源は、ヒト、動物、植物を含むことができ、試料の種類は、尿、血液、胆液、滑膜関節液、血清、血漿、髄液、羊水、汗、鼻呼吸液、膈分泌物、精液、創傷滲出液、唾液および気管支肺胞洗浄液、節足動物もしくは軟体動物の血リンパ、または植物から得られる細胞液などの流体を含み得る。試料は、ヒトまたは他の生物からの固体、ならびに排泄物などの液体または固体の特徴を有し得る試料、清澄液から硬質固体まで変化し得る試料、および骨、毛髪、乾燥細胞、皮膚の試料、生の、凍結または固定した病理試料、および鼻、鼻咽頭、咽喉、腋窩、会陰または直腸の部位から採取したスワブなどの他試料も含み得る。他の生体試料は、腸内ガスまたは口腔または鼻腔から収集され得る気体など、生物起源からの気体を含む。

40

【0087】

試料は、天然、産業、または商業的な供給源からの物質を含み、食品、飲料、動物飼料、化粧品、医薬もしくは獣医用品、肥料、ポリマー、プラスチック、ゴム、木製品もしくは紙製品、繊維、およびヒトもしくは動物の局所使用もしくは内服用の製品、または上記

50

のいずれかの中間体などの、原料、製造過程の製品、工業製品、または最終産物を含む。他の試料の種類は、細胞培養上清、インビトロ増殖細胞などの研究室もしくは試験室から得られる物質、研究もしくは試験に用いられるマウスまたはモルモットなどの動物から得られる試料、または試験目的で栽培もしくは採取した植物試料を含む。試料は、細菌または化学物質について観測される湖または川の水試料、化学物質、毒素または微生物に関して試験される土壌などの自然源から得られる液体、固体または気体を含み得る。

【0088】

環境モニタリングまたは化学モニタリング用の工業装置または医療機器から得られるような製造環境モニタリング試料も、本発明を用いて試験され得る。例えば、試料は食品または飲料の製造または貯蔵に用いられる機器の表面を拭き取るまたは綿球で採取することにより得られ得る。

10

【0089】

試料は、例えば発酵培養液、血液感染者からの血液試料、または幾つかの食品などに生きている微生物を含み得る。

【0090】

試料の体積はリットルからナノリットルまで変化し得る。例えば、混入物質の存在についての飲料水の試験において、試料は数リットルの水であり；試料は存在し得る任意の標的を濃縮するために処理され得る。逆に、研究者が生きたマウスに及ぼす毒素または医薬の影響について長期研究することを望み且つ試料がマウスから得られる全血である場合、試料体積を限定することが望ましい。

20

【0091】

2. 標的

標的は、試料中に潜在的に存在する細胞、ウイルス、分子（例えば、タンパク質、DNA、RNA、もしくは炭水化物などの高分子、および、例えば化学療法薬、脂質、糖、アミノ酸、もしくはヌクレオチドなどの小分子）、または分子複合体であり、その存在が本発明により試験される。多数の異なる種類の標的が本発明を用いて検出およびまたは定量化され得る。多数の異なる種類の標的を選択的に検出する能力は本発明の利点である。

【0092】

標的は様々なサイズであり得る。ヒトの卵細胞または巨核球などの標的は直径100ミクロン以上であり；循環腫瘍細胞は数ミクロンであり；細菌は直径1ミクロンであり；一方、タンパク質または核酸の標的は数ナノメートルから数百ナノメートルのサイズに変化し得る。抗生物質、毒素および農薬などのより小さな標的は10ナノメートル以下のサイズであり得る。

30

【0093】

標的は様々な量であり得る。例えば、血液試料中に存在する細菌またはウイルスの濃度は、10mL当たり1未満の細胞またはCFUまたはウイルスから1mL当たり 1×10^6 より多くのCFUまたはウイルス粒子まで変化し；同様に、甲状腺刺激ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピンまたは前立腺特異的抗原などのタンパク質濃度は非常に変化し得る。例えば、血清中のヒト絨毛性ゴナドトロピン濃度は、5mIU/mL未満から150,000mIU/mLより多くまで4桁より大きく変化し得る。

40

【0094】

標的は多細胞生物の細胞または細胞断片であり得る。細胞標的の例は、精子、花粉、真菌または植物の孢子などの細胞、血液または他の生体液から得られる細胞を含み得る。例えば、CD4+細胞および循環腫瘍細胞は血液中で見出され；前者はHIV試験で用いられ、後者は癌診断に役立ち得る。細胞断片の例は、血小板、ヒト血液の正常成分、および試料処理から生じる核、ミトコンドリア、リソソーム、またはペルオキシソームなどの細胞成分を含む。

【0095】

標的は、微生物、または細胞壁の断片などの微生物の一部、または2つまたは以上の微生物の凝集であり得る。微生物は、ウイルス、細菌、細菌孢子、始原細菌、真菌、原生生

50

物、または線虫、カイアシ、もしくはワムシなどの多細胞微生物を含み得る。環境土壌試料またはヒト消化系の試料などの多数の試料において、微生物は微粒子に結合し得るか、または混合細菌叢の一部として存在し得る。

【0096】

標的は、生体高分子または人工高分子であり、異なる種類の高分子間で、または異なる種類の高分子と補欠分子族により共有結合的に修飾された酵素などの非高分子化合物との間で共有結合性あるいは非共有結合性のいずれかの核酸、タンパク質およびペプチド、多糖類、および複合体を含み得る。標的は、UV放射により損傷したDNA分子など、損傷した生体高分子も含み得る。高分子標的は、合成オリゴヌクレオチドなど、合成化合物を含むよう修飾された生体高分子の合成高分子および合成類似体も含み、それらは通常天然で見出されない部分も含み得る。レトロ-リベルソ (retro-reverso) ペプチドなどのペプチドおよびペプチド類似体は標的であり得る他の化合物群である。

10

【0097】

標的は天然分子または合成分子であり得る。天然化合物の例は、ビタミン、ホルモン、神経伝達物質、脂質、アミノ酸、糖類、二次代謝産物、毒素、およびフェロモンを含む。合成分子の例は、農薬、化学中間物質、単量体、可塑剤、界面活性剤、および他の工業製品を含む。標的はまた医薬化合物、例えば薬であり得る。

【0098】

タンパク質は本発明を用いて検出または定量化され得る。タンパク質は、例えば、サイトカイン、ホルモン、酵素、構造タンパク質、受容体などを含む。タンパク質標的は修飾も受け得る。糖尿病の診断および治療に用いられるマーカーである血中グリコシル化ヘモグロビン量など、このような修飾の存在は興味深い。タンパク質は、他のタンパク質と、あるいは核酸もしくはFAD等の低分子量分子などの他分子との様々な複合体で生じ得る。

20

【0099】

酵素の場合、酵素（一次標的）あるいは酵素の産物（二次標的）を検出するために役立ち得る。例えば、ラクタマーゼの検出は、ベンジルペニシリンなどのラクタム系抗生物質を提供し、ならびにベンジルペニシロ酸を検出することにより遂行され得る。

【0100】

3. 試料処理

試料は、試験される試料および検定に応じて様々な方法で検定に提示され得る。これらは、輸送媒体のスワブまたはサンプリング部位から得られるスワブ; 全血、血清または血漿の管; ランスの使用後に指先に提示される全血滴、または耳たぶもしくは前腕などの他の表面に提示される全血滴; 容器に存在する定形または形を成さない便; 濾紙または膜などの輸送媒体上にスポットされる全血などの試料; 皮膚または他の体表面上に存在する涙または汗滴を含むがこれらに限定されない。

30

【0101】

試料処理は試料の性質および試験必要条件に応じて幾つかの機能を有し得るが、一般に試験用に標的の可用性を改良するのに役立つ。理想的には、試料処理はユーザ側に最小限の労力を要求する。試料処理は様々な時間で且つ様々な場所で生じ得る。試料処理は、試料が試験部位に到達する前に、収集地点で或いは輸送中に生じ、または試料処理は試験過程の一部として生じ、または試料処理は試験部位だが試験過程の一部としてではなく生じ得る。試料処理は2つまたはそれ以上の個別の段階または工程で行われ、例えば、収集地で標的を保存するための処理、および標的を検定に適用できるようにするための試験地での更なる処理であり得る。

40

【0102】

試料処理は試料収集の一部として行われ得る。例えば、採血管がEDTAを含む場合、血液の凝固は収集中妨げられ; ユーザは適切な収集管を選択するだけである。

【0103】

幾つかの試料処理操作は、固体、半固体、または液体マトリクスからまたは収集装置からの標的の抽出を含む。例えば、骨試料中の標的を検出する試験は、検定できるようにす

50

るよう標的を液相に可溶化するために、ならびに検定の感度を向上するよう標的を濃縮するために、機械的破碎および液体抽出の工程を含む。試料の濾過または遠心分離を含む他の過程は、可溶性試料から微粒子を除去し均一な液体の試験を可能にするために用いられ得る。これは、血漿または血清を産生するための血液処理を含み、またはC.ディフィシレ (C.difficile) 毒素に関する試験前に糞便試料からの固体の除去を含み得る。試料処理方法は、精製、スワブまたはフィルターなどのサンプリング装置からの溶出、バッチまたは連続モードでの遠心分離、電気泳動または発汗、クロマトグラフィー、抽出または水性もしくは有機希釈剤もしくは溶媒との混合、ポリマーまたは塩を用いる二相分配、均質化または破碎のための超音波処理、微生物を破碎するために例えばフレンチプレスを用いた圧力などの工程を含み得る。機械的試料処理は、篩を用いた分別;切断、細断、押圧または圧搾、および研磨などの機械的破碎を含む。

10

【0104】

他の処理操作は試料の希釈もしくは濃縮または試験用試料の他の調整を含む。例えば、多量の水試料に存在する低濃度の微生物を検出するための試験は、濾過および濃縮の工程を含み得る。試料の貯留または組み合わせは総数または必要な試験を減らすために実施され得る。試料処理は試験結果の質を向上するためにも用いられ得る。時には、試料は試料処理なしで試験に適し得るが、処理は結果の質を向上する。例えば、血中または血漿中のタンパク質標的の検出は試料処理なしで可能であり得るが、検定の感度は遠心分離などの工程により向上し得る。従って、試料処理の量および種類は、試料の性質、標的の性質、ならびに速度、使い易さ、費用効果、再現性、無干渉、解像度ならびに感度により決定される。

20

【0105】

試料処理は様々な化学物質の添加を含み得る。例えば、酸または塩基の添加により試料のpHを調整すること、またはNaClの添加により塩濃度を調整すること、または標的あるいは他の物質を沈殿させるために試薬を添加することが必要であり得る。化学物質の添加は数工程を同時に起こさせ得る。例えば、ポリマーの添加により、試料が二相系を形成し、標的が一相に濃縮され、干渉物質は他相に濃縮される。化学物質は試料を着色するために添加され、例えば、色の付加はユーザが試料を同定する助けとなり得る。界面活性剤は、細胞の溶解をもたらすため（例えばサポニンは細菌細胞の溶解なしに哺乳動物細胞を溶解するために添加され得る）、成分を可溶化するため、または濾過などの他の工程中に試料の湿潤もしくは流れを改善するために添加され得る。化学物質は前処理として他の工程前に添加され、例えば界面活性剤は濾過前に試料を可溶化するために添加され得る。

30

【0106】

酵素は試料処理工程の一部として様々な理由で添加され得る。組織の解離は細胞を試験に適応させるために必要であり得る。また、リゾチームまたはリソスタフィンなどのある種の酵素が細菌の細胞壁を分解することは周知であり、これらの酵素の添加は細菌細胞の内部から標的を遊離させるために使用され得る。ヌクレアーゼは、例えば処理後の生体試料の粘度を低下させるために、試料処理中に添加され得る。酵素は基質を標的に変換するためにも使用され得る。

【0107】

試料処理は標的の分解または修飾を防ぐために用いられ得る。例えば、プロテアーゼ阻害剤は、タンパク質標的がプロテアーゼによって分解され検出不能にさせないことを保証するために、収集時に試料に添加され得る。Proclin（登録商標）またはアジ化ナトリウムなどの保存剤も、生物の増殖を防止するために任意の時点で添加され得る。例えば、多数の微生物がプロテアーゼおよびヌクレアーゼを分泌することは周知であり、これらの酵素は対象の標的を分解し得る。試料処理は試料が加熱または冷却される工程を含み得る。例えば、試料の冷凍は試料収集と試験の間に微生物の増殖を阻害するために用いられ;凍結は不安定な標的の分解を防ぐために用いられ得る。

40

【0108】

試料が微生物を含む場合、生物の増殖または選択的増殖を可能にする条件下で試料を処

50

理するために役立ち得る。例えば、細菌が血中に存在するか否かを決定する試験において、一つの細菌が数ミリリットルの体積の試料に存在するか否かを知ることが有用であり得る。この場合、試料のインキュベーションは、細菌増殖培地への希釈の有無にかかわらず、細菌が分裂増殖するのを可能にする。他の微生物を含み得る試料中に存在する特定の微生物の検出などの場合には、対象の生物のみが生存するように試料を処理すること、または生物の特定の増殖性質を示す増殖条件に試料をさらすことが有用であり得る。例えば、血液試料中のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の存在を検出するために、抗生物質を含む増殖培地と試料とを混合することが有用であり、そのためメチシリン耐性生物は増殖するがメチシリン感受性生物は増殖しない。

【0109】

試料処理方法は組み合わせられ得る。例えば、微粒子を除去するために、試料を遠心分離または濾過し、次いで干渉物質を除去し、ならびに濃縮してクロマトグラフィーで標的を精製することが必要である。処理工程は手動でまたは自動化装置により実施され得る。

【0110】

4. 試験装置

本発明は多数の構成の試験装置で実施され得る。本発明工程を実施するために、装置は、一般に、試料と他成分とを互いに接触させる反応ウェル、および検出器により個々の標識標的複合体を画像化する検出面を含む画像化ウェルを含む。検出面は検出帯から検出器へのシグナル伝送を可能にする。画像化ウェルは反応ウェルとしても役立ち得る。あるいは、試験装置は個別の反応ウェルおよび画像化ウェルを含み得る。または、2種類のウェルを含む個別の装置が用いられ得る。試験反応は反応ウェルから画像化ウェルに手動または自動で移動し得る。

【0111】

反応ウェルおよび画像化ウェルは他の機能にも役立ち得る。例えば、焦点合わせを助けるために、または分析中の画像のアラインメントを可能にするために、画像化ウェルの検出面の中または近くに基準マークがあり得る。または容器はバイオハザード試料の封じ込め用に設計され得る。試験装置のウェルは試験成分を含むために製造され、後の試薬添加工程を減らし得る。試験装置は使い捨てであるか（即ち、一度使用すると廃棄される）、または洗浄し再使用され得る。

【0112】

試験装置の材料および製造方法は、試験装置の機能必要条件、費用、および製造の複雑性に基づいて選択される。例えば、透明な低蛍光プラスチックは一般に画像化ウェルを構築するために使用される。費用は汎用プラスチックおよび大量生産法を用いて最小限にし得る。一つの有用な種類の容器は射出成形などの大量法により形成されるポリスチレンなどの低価格材料から作られ、部品当たり低価格である極めて再生可能な部品をもたらす。

【0113】

5. 標識

反応における標的の存在を検出するために、標的はシグナリング部分と接触し複合体形成する。検出帯内の標識標的は画像化の際に検出可能なシグナルを生じる。

【0114】

標的標識工程に有用なシグナリング部分は、蛍光、光散乱、ラマン散乱、リン光、発光、化学発光、生物発光、および色を含む様々なシグナリング特徴を有し得る。

【0115】

様々な種類のシグナリング部分は、下記の実施例で証明されるように、検定と併せて使用され得る。これらは、フルオレセイン、ローダミン、Cy（登録商標）色素系（GE healthcare）およびAlexa（登録商標）系（Invitrogen）などの蛍光色素を含み、タンパク質または核酸と化学カップリングするために修飾され得る単一フルオロフォア；核酸と複合体形成した場合に蛍光性を示すヨウ化プロピジウムもしくはSYBR（登録商標）およびSYTO（登録商標）染色（Invitrogen）などの蛍光核酸染色剤；緑色蛍光タンパク質またはフィコビリタンパク質と類似する蛍光タンパク質；ならびに量子ドットを含むがこれらに限定さ

10

20

30

40

50

れない。より高い強度のシグナルは多重フルオロフォアをシグナリング部分に組み込むことにより生成し得る。例えば、蛍光標識ポリマー、および蛍光微粒子は多重フルオロフォアを有し高強度のシグナルを生成し得る。化学発光、生物発光、または発色シグナルを生成する酵素は、適切な基質とインキュベートした場合に、基質の存在下において、シグナリング部分も含み得る。一般に、シグナリング部分は試験される試料の性質（例えば内在蛍光）および検出方法（例えば特定のフィルターセットを通るCCD系画像化）を考慮して選択される。

【0116】

本発明の幾つかの態様において、特異的な標識が標的を選択的に標識するために使用される。特異的な標識は、上記に記載する1つまたは複数のシグナリング部分とコンジュゲートまたは安定的に会合した1つまたは複数のカテゴリー結合分子を含む。カテゴリー結合分子の例は、抗体（標的が抗原である場合）；抗原（標的が抗体である場合）；レクチン（標的が適切な糖部分を含む場合）；対象の標的配列に相補的な核酸プローブ；受容体（標的が受容体のリガンドである場合）；およびリガンド（標的が受容体である場合）を含む。

10

【0117】

シグナリング部分とカテゴリー結合分子との共有結合法は結合する2つの部分で利用できる化学基に基づいて選択される。Hemanson (Bioconjugate Techniques by Greg T. Hermanson and Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking by Shan S. Wong) などの参照文献により、当業者は様々なコンジュゲーション方法を利用できる。通常用いられる一つの方法において、化学的に活性化されたシグナリング部分（例えばN-ヒドロキシスクシンイミドで修飾された蛍光粒子または色素分子）は、分子をコンジュゲートさせるのに適した反応条件下で特異的な結合部分（例えば抗体）の遊離アミノ基にコンジュゲートする。他の一般的なよくある方法では、蛍光標識ヌクレオチドは、プローブが合成される際に、オリゴヌクレオチドプローブに取り込まれる。

20

【0118】

幾つかのシグナリング部分複合体はシグナリング部分とカテゴリー結合分子との間の非共有結合により形成され得る。例えば、蛍光ポリスチレン微粒子の場合、安定的に会合標識された特異的な結合部分は微粒子の表面上に特異的な結合部分を吸着させることにより生じ得る。

30

【0119】

共有結合と安定な非共有結合性会合との組み合わせもシグナリング部分複合体を生成するために用いられ得る。例えば、カテゴリー結合分子はビオチンと化学的にコンジュゲートし、シグナリング部分はストレプトアビジンまたはアビジンと化学的にコンジュゲートし得る。これらの成分が接触すると、特異的な標識が形成される。この種類の特異的標識は試験が実施される前に形成され、または該成分は、特異的標識が反応中に産生されるように、反応に個別に添加され得る。

【0120】

本発明の幾つかの態様は、カテゴリー結合分子と複合体形成しない標識を利用する。これらの非特異的標識は一般に試料中の化学分類もしくは機能分類の分子と結合または反応させることにより検出可能なシグナルを生じる。図1は特異的標識と非特異的標識の差異を説明する。非特異的標識の一種は試料中に存在する遍在化学基を化学的に修飾し、標的を含み得る。例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドで活性化された蛍光色素は試料全体の遊離アミンと結合でき、標的が試料中に存在し遊離アミンを含む場合、蛍光標識される。あるいは、N-ヒドロキシスクシンイミドで活性化されたビオチンはビオチンを試料全体の遊離アミンと結合させるために使用され得る。この場合、標的および試料の他のアミン含有成分はビオチンまたはストレプトアビジンと複合体形成したシグナリング部分の添加により標識され得る。核酸標識剤（例としてヨウ化プロピジウムならびにSYTOおよびSYBRの色素系を含む、Invitrogenから）は試料中の全ての接近可能な核酸を標識するために使用でき、核酸を含む場合の標的を含む。非特異的標識の別例は、標的が生細胞である場合の

40

50

試料中の全ての代謝活性な細胞の標識である。これは、生細胞株または生細胞により代謝されシグナリング部分を産生するフルオレセイン二酢酸などの代謝色素の使用により達成され得る。

【0121】

6. 選択

本発明は一般に画像化用に検出帯に標識標的を沈着させ遊離シグナリング部分からの境界を分離または識別するために選択を用いる。

【0122】

様々な選択的特徴が本発明で用いられ、それぞれが特定の一式の選択部分と関連し得る。選択的特徴は、磁気選択、重力あるいは遠心分離による浮遊密度に基づく選択、電気泳動、誘電泳動、濾過、および固体相上への単純捕捉を含むがこれらに限定されない。

10

【0123】

選択部分は選択的特徴と対応した選択圧と適合するように選択される。磁気選択に関しては、適合する選択部分は超常磁性粒子、磁性流体、およびフェリチンを含む。密度に基づく選択に関しては、適合する選択部分は総じて反応より高密度であり、シリカ粒子、メラミン粒子、ポリスチレン粒子、または他の高密度粒子などの部分を含む。濾過は、標識標的がその寸法によりまたは特定の種類のフィルターへの結合能により選択され得る場合に選択様式として使用され得る。捕捉選択様式は表面上に固定された捕捉分子による標識標的複合体の特異的または非特異的な捕捉を含む。捕捉選択は結合剤が検出帯でまたはその近くで固定される場合に本発明で最も有用であり、その結果、標識標的複合体の捕捉は画像化用の検出帯内で該複合体を固定する。

20

【0124】

本発明の多数の態様において、例えば磁気選択の場合、選択過程は選択可能な複合体を産生するために標識標的と選択部分との結合で達成される。他の場合において、標識標的の選択的特徴により、選択は選択可能な複合体の予備形成なしに実施できる。例えば、特異的に標識された細菌の濾過は、選択過程で標的の寸法を利用して標識標的を含む全ての細菌をフィルター上に選択し、画像化によって標識標的を同定する。

【0125】

選択部分は特異的または非特異的に標的に結合し得る。標的に特異的な選択部分複合体は1つまたは複数のカテゴリーに特異的な結合部分と結合した選択部分を有する。抗TSH抗体コンジュゲート磁気粒子は標的に特異的な選択部分複合体の例である。カテゴリーに特異的な選択部分複合体は標的に結合するが試料中に存在する他の成分に結合しない。非特異的選択部分複合体も産生され、標的を含む試料中の広範な種類の成分に結合する。非特異的選択部分複合体の一例は、ポリアニオン性標的を含む試料中の全てのポリアニオン性成分に結合するポリカチオンとコンジュゲートした磁気粒子である。

30

【0126】

標的特異的および非特異的な選択部分複合体の産生。標的特異的および非特異的な選択部分の産生方法は上記の標識の節で特異的標識の産生に関して記載したものと同一であり得る。特異的または非特異的な結合部分は選択部分と共有結合または非共有結合し成分間で安定な会合を形成する。時には、選択部分の結合特徴は選択部分に内在するものである。例えば、ポリカチオン性選択剤が望ましい場合、それ自体ポリカチオン性である粒子が更なる修飾なしに使用され得る。

40

【0127】

共有結合および非共有結合の安定な会合の組み合わせも標的に特異的な選択部分を生成するために用いられ得る。例えば、カテゴリー結合分子はビオチンと化学的にコンジュゲートし、選択部分はストレプトアビジンまたはアビジンと化学的にコンジュゲートし得る。この種類の標的特異的シグナリング部分は試験が実施される前に形成され、または標的特異的シグナリング部分が反応中に産生されるように成分が個別に反応に添加され得る。

【0128】

7. 検定形式

50

本発明は広範囲の標的を検出し得る。多数の態様は、「サンドウィッチ」形式で実施され、標的は、画像化法による検出を可能にするために標識され、画像化できるように検出帯内での標識標的の沈着を可能にするために選択部分とさらに複合体形成する。標識および選択の方法の的確な選択は、試料の性質、用いられる検出方法、および標的自体の性質に依存する。

【0129】

特異的結合部分との反応に関して、標的は3つの種類に分類される：小分子標的、反復決定基なしの高分子標的、および多価標的。

【0130】

小分子（ハプテン）は一般に一つの特異的な結合部分によってのみ結合し得る。これにより、シグナリング部分および選択部分と結合したカテゴリー結合部分による同時結合はできない。本発明において、小分子の検出は、標的の添加が検出帯内でのシグナリング部分の捕捉を阻害する競合形式によって達成され得る。小分子の検出に関して本発明の3つの基本的な競合形式態様がある。一つの競合形式態様において、シグナリングおよび選択に用いられるカテゴリー結合分子は互いに相補的であり、一方のカテゴリー結合分子は標的競合相手であり、他方は標的または標的競合相手と結合するカテゴリー結合分子である。試料中に標的がない場合、シグナリング部分と選択部分は互いに直接結合し、その結果、本発明の沈着工程が実施される場合、測定可能なシグナルが検出帯に沈着し画像化され得る。標的分子が試料中に存在する場合、シグナリング部分と選択部分との複合体の形成が阻害され、その結果、検出帯に沈着するシグナル量は反応に添加される標的量の逆関数である。第2の競合検定態様において、シグナリング部分も選択部分も標的競合相手とコンジュゲートする。シグナリング部分と捕捉部分との架橋は反応に供給される少なくとも2価のカテゴリー特異的分子（例えば抗体）により達成される。架橋反応は2価のカテゴリー特異的結合分子と添加標的の結合により阻害され、標的が反応に存在する場合にシグナル量の減少をもたらす。第3の競合態様（c）において、シグナリング部分と選択部分は、標的と結合し得るカテゴリー結合分子とそれぞれ結合する。少なくとも2価の標的競合相手コンジュゲートの添加は選択可能なシグナル-選択部分複合体の形成を誘導する。また、シグナリング部分と選択部分との架橋複合体の形成は標的の添加により減少する。

【0131】

高分子標的は一般に独立したカテゴリー特異的結合部分（多重同一サブユニットのない大半のタンパク質および反復配列のない核酸配列を含む）に少なくとも2つの非重複結合部位を収容するほど大きい。反復配列または決定基のない高分子標的は、カテゴリー特異的結合分子を含み且つ標的の非重複領域に結合する結合分子の使用により検出され、シグナリング部分も選択部分も互いに干渉することなく標的と複合体形成できる。アミノ酸またはヌクレオチドの反復配列をもつ高分子、少なくとも2つの同一なサブユニットをもつ多量体タンパク質、および特異的結合決定基の多重コピーをもつウイルスまたは細胞は、一つの標的に複数のカテゴリー特異的結合剤の結合を提供し、シグナリング部分と選択部分の両方にコンジュゲートした一つのカテゴリー特異的結合部分の使用は可能だが必要としない。

【0132】

8. 接触

接触工程により、選択部分と複合体形成した標識標的を形成できる。標識標的の形成および選択部分と複合体形成した標的の形成は、任意順序で連続して起き得る、または同時に起き得る。

【0133】

当業者は、反応の速度、再現性、安定性または質を向上するために追加成分が添加され得ることを理解するであろう。これらの追加成分は、反応のpHを制御するための緩衝剤、ならびに希釈剤、界面活性剤、および成分間の非特異的結合を減らし、反応における標的の可用性を増強し、複合体形成の効率を増すために、または他の目的で他の添加剤を含み得る。追加成分の選択の論拠は、Christopher Price & David Newman, Principles and P

10

20

30

40

50

ractice of Immunoassayなどの参照文献で論議されている。

【0134】

標的、標識、選択部分、および追加成分を含む反応成分は、様々な物理的配置およびプレセンブリの程度ならびに様々な順序で反応に添加され得る。逐次反応が望ましい場合、次の（例えば、選択部分および任意に追加の添加剤の）添加がなされる前に一次成分のインキュベーションが実施され得る（例えば、標的、添加剤および標識の混合物）。全成分は、反応ウェルに個別に添加される各成分とともに液体形態で添加され得る。あるいは、液体成分は予混合され液体添加工程をより少なくし得る。あるいは、反応の供給成分の幾つかまたは全て（例えば、試料以外の全成分）は反応に添加する前に凍結乾燥または乾燥され、乾燥は各成分について個別にまたは成分の混合物について実施され得る。乾燥は、反応ウェル中にケーキの形態で試薬を乾燥し、大量の試薬を乾燥し乾燥粉末を分注し、または単位用量試薬球を凍結乾燥し球を反応ウェルに分注することを含む、多数の形式で実施され得る。乾燥試薬の再構成は、試料単独の添加、または試料および希釈剤の添加によるものであり得る。図2は反応への成分添加の幾つかの態様を説明する。

10

【0135】

試料および試薬成分の添加は、操作者により手動で、液流を操るために機器もしくはカートリッジを使用して自動で、または自動法および手動法の組み合わせにより実施され得る。試薬は、操作者または大量の自動機器に供給されならびに反応時間で分注され、または使い捨て反応ウェルまたはカートリッジ内に予め分注され搭載され得る。

【0136】

混合方法は、反応を均一にし、および/または反応速度を増大するために、反応に任意に適用され得る。混合は、攪拌、試料への機械的混合器（例えばプロペラ）の包含を含む方法、または外部から適用される超音波もしくは圧電混合装置により達成され得る。

20

【0137】

インキュベーション時間は、好ましくは完了まで、または標識標的-選択部分複合体の検出可能量が検出標的の最小量で検出帯に沈着し検出器により画像化され得る十分な反応程度まで、接触反応を起こさせるために提供される。

【0138】

本発明の接触工程が実施された後、反応混合物は、未反応の標的、標識、および選択剤とともに、標識標的-選択部分複合体、選択部分に結合しない標識標的、標識に結合しない標識-選択部分複合体を含む一連の反応産物を含む。これらの反応物質および反応産物は一般に混合物全体に均一な様式で分散する。

30

【0139】

9. 沈着

本発明の態様は、画像化用の検出帯内で標識標的を沈着する工程を含む。代替として、本発明の方法は試料における標的の存在の代理として検出帯内で標的競合相手の検出を含み得る（標的競合相手は検出表面上に沈着してもしなくてもよい）。用いられる沈着様式は使用される選択部分の種類による。選択様式の例は図3で説明される。

【0140】

直接捕捉の場合、選択部分は、検出帯内で被覆またはコンジュゲートした、例えば画像ウィンドウの内表面上に直接コンジュゲートした、または画像ウィンドウとコンジュゲートしたリンカーもしくは間隔ポリマー上にコンジュゲートした、カテゴリーに特異的または非特異的な結合部分からなる。この場合、標的と選択部分の接触および複合体の沈着の実行は一工程で起きる。

40

【0141】

濾過が標識された濾過性複合体を検出帯内に沈着させる様式である場合、標識標的または標識標的-選択部分複合体の寸法または他の性質が、標識標的または標識標的-選択部分複合体の検出帯内に置かれたフィルター上への沈着をもたらす。

【0142】

他の沈着様式は、標識標的と複合体形成する一組の選択部分を含む選択部分への力の適

50

用を要し、検出帯内でそれらを沈着させる。磁気選択の場合、磁氣的に反応する選択部分は磁力の適用により検出帯内に沈着する。適用される力が実質的に均一であり、検出表面に直交する力のベクトルを有する場合、例えば適切な配置で画像化ウェルを永久磁石の配列上に配置することにより、標識複合体の沈着が検出ウィンドウにわたって本質的に均一であり得る。検出域にわたる標識標的の均一な沈着は、標的が分散して標識物の計数が可能になるため、反応中の標的を計数するのに有用であり得る。磁力が画像化ウィンドウの平面にわたって不均一である場合、標識複合体は検出帯内にパターンで沈着し得る（図3）。例えば、画像化ウィンドウの寸法より小さな寸法の強力磁石の使用は、画像化ウィンドウの境界内に点状でまたは積み重なって、標識標的と複合体形成するものを含む磁気反応性選択部分の沈着をもたらし得る。不均一様式でのこの標識標的の沈着は、検出帯内で検出される複数の標識が標識標的-選択部分複合体の成分であるため、データ分析に有用であり得る。

10

【0143】

密度分離。重力は、検定で用いられる選択部分が反応液より高密度である場合、および検出帯が反応ウェルの底部にある場合、沈着力として用いられ得る。この場合、沈着は、選択部分と結合する任意の標識標的とともに選択部分を検出帯に沈降させることにより達成され、該検出帯で画像化され得る。あるいは、遠心分離力が高密度選択部分に適用され、検出帯への沈着を促進し得る。反応ウェルの形状は密度媒介性選択過程において沈着様式を制御するために利用され得る。ウェルの底部にある平面の画像域は、高密度選択部分および選択部分と会合する結合標識標的の均一な沈着をもたらし、得られる画像中の対象物を計数し易くさせる。非平面表面は反応ウェルの最低点で複合体の沈着を生じるよう設計され、選択部分と結合した標識標的と反応混合物中の非結合標識との幾何学的識別を可能にする（図3）。

20

【0144】

沈着は、特に反応を行う容器の寸法により反応中の標識の全てが検出帯内に入る場合、本発明の範囲内で必ずしも必要とは限らない。この場合、標識標的-選択部分複合体と非結合標識とを識別するために別の方法が使用される。

【0145】

10. 標識標的の識別

本発明は、標的との結合の結果として検出帯で沈着したシグナリング部分と選択された標的と結合していない標識とを識別する方法を改良した。結合標識と遊離標識の識別は、本発明の検定が短いインキュベーション時間で高感度を有するように設計される場合に必要のため、標識が標的を超過して存在する場合に特別な問題である。結合標識と遊離標識の識別の改良は、バックグラウンドシグナル（標識標的-選択部分複合体によるものでない画像中で検出されるシグナル）の減少により本発明の検定の感度および特異性を向上させる。複合体は上記の沈着工程により検出帯で物理的に濃縮されるが、検出帯内の非結合標識も検出帯外部の非結合標識も検出可能な光シグナルを画像に提供し得る。

30

【0146】

画像化用の光学スクリーンとしての色素。本発明は洗浄工程を用いることなく結合標識と遊離標識とを識別することにより、本発明の使い易さを増大させる。本発明の検定への適切な色素の組み込みは、検出帯の標識と検出帯にない標識との識別を高めるために光学的分離装置として用いられ得る。光学的検出が画像化に用いられる場合、反応媒体は励起光または他の照明光ならびに画像化シグナルを生じる反射光または放射光に実質的に透過性であり、検出帯の外部にある非結合標識が大量の非特異的光学シグナルを画像に提供し得ることが理解される。これは図9および図11の左画像で説明される。画像化前の反応への色素の包含は検出帯の外部に存在する非結合標識により生じるシグナルを減らすために用いられ得る。適切な濃度の色素は検出表面でまたは該表面近くの検出帯で蛍光の検出を可能にする一方、残りの溶液中の非結合標識からのシグナリング寄与を遮蔽する。シグナリング部分が蛍光である場合、使用する色素は、蛍光シグナリング部分の励起波長または発光波長に重なる光の吸光度を有し、または励起光も放射光も吸収し得る。図8は、実施

40

50

例でシグナリング部分として使用されるInvitrogenの黄緑色のFluospheres（登録商標）の画像検出に用いられる励起および放射フィルターの透過プロファイルと重ね合わせた、一つのこのような色素であるChromotrope 2Rの吸光度スペクトルを示す。図9は、ウェルへのChromotrope 2R色素の添加が検出帯の外部の標識から生じるシグナルから検出域を遮蔽することを説明する。驚くべきことに、色素の添加が検出帯内での蛍光粒子の識別を依然可能にすることが図で理解できる。

【0147】

反応に添加される色素の濃度は検出帯の深度を制御するために操作され得る。好ましい色素濃度で、約50~100ミクロンの検出表面内のシグナリング部分が識別できる一方、検出表面から約100ミクロンより遠いシグナリング部分の寄与は最小限に抑える。色素により与えられる光学的遮蔽率は色素の光を吸収する能力および試料を通過する光と出会う色素分子の数（路長）に関連する。色素濃度があまりに低い場合、より多くの上部非結合シグナリング部分からのシグナルが検出される一方、色素濃度があまりに高い場合、画像表面に近接する標識標的からのシグナルが減少するであろう。実際には、画像システムの視野の深度に関わらず、反応で使用される色素の濃度は光学的に検出帯を規定するために用いられ得る。

【0148】

色素は反応順中任意の時点で反応に添加され得る。幾つかの態様は反応の添加剤として色素を組み込み得る。他の態様において、色素は接触工程が完了した後に添加される。色素は下記に記載するクッション態様での成分でもあり得る。

【0149】

本発明の色素は単一の色素または適切な波長の光を吸収するよう設計された色素の混合物であり；適切な色素の選択は使用されるシグナリング部分および適用される光学画像システムによる。例えば、黄緑色蛍光Fluospheres（登録商標）に関して、515nmの発光極大および505nmの励起極大で、 $475 \pm 29.5\text{nm}$ の励起帯域通過フィルターおよび $535 \pm 25\text{nm}$ の発光フィルターを備えた画像システムを用いて、Chromotrope 2RまたはAcid Red 1の色素は光学的遮蔽効果を生じるための適切な色素の2つの例である。当業者はこの目的に適した他の色素を見出すことができるであろう。Floyd Green's The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators (Aldrich Chemical Company, Inc. 1990) のような参考文献は、本発明に役立つ多数の可能な色素を列記している。

【0150】

シグナリングの光学的遮蔽に有用な他の種類の色素が想定され得る。シグナリング部分とその色により識別される場合、検出される色に相補的な波長の光を吸収する色素は本発明の態様で光学的遮蔽として作用することが予期される。光散乱粒子は呈色反応の光学的遮蔽用の「色素」としても使用され得る。黒色墨汁を含む黒色粒子は様々な波長の光を吸収し、光学的遮蔽も提供し得る。

【0151】

鉄含有磁気粒子が選択部分として使用される場合において、反応における多数の磁気粒子の使用は検出帯に不透明粒子の層を沈着させ得る。この層の光の通過は塞がれ、磁気粒子層と画像表面との間に存在するシグナリング部分のみが画像化される。

【0152】

検出帯から非結合シグナリング部分を排除するためのクッションの使用。色素添加により対処できる検出帯の外部の非結合シグナリング部分によりもたらされるシグナルに加えて、非結合標識が反応体積全体にわたるランダム分布の関数として検出帯内でも見出され得る。この標識は画像中の特異的に沈着したシグナリング部分と光学的に識別できず、検出の感度を下げる。

【0153】

本発明の方法内で、非結合シグナルは検出帯から反応の非選択成分を排除することにより検出帯内で最小限に抑えられ得る。これは、選択部分を検出帯内に沈着させる過程を始める前に、バルク反応より高密度で且つ検出帯と少なくとも同じ深さの液体層をバルク反

10

20

30

40

50

応と画像表面との間に配置することにより達成され得る。反応混合物と画像ウィンドウの間の高密度層すなわち「クッション」の使用は幾つかの方法で本発明の検定に組み込まれ得る。バルク反応が画像表面と直接接触しないことが望ましいが必要ではない。高密度層すなわち「クッション」は画像ウェル内に配置され、次いで反応混合物がその上に積層され得る。これは、反応混合物と検出表面との接触を回避するので、一つの好ましいアプローチであり、その結果、シグナリング部分は沈着によってのみ検出帯に入る。別の好ましい態様において、高密度クッションを生成することが必要な成分は画像ウェル内に予め分注し乾燥し、その結果、乾燥物質は上記の接触工程で反応のインキュベーション中再構成され、少なくとも検出帯の体積を満たす高密度下層を形成する。好ましくない代替法において、高密度クッションは画像ウェルのバルク反応下で積層し、選択部分の沈着が始まる前に検出帯を占有し得る。

10

【0154】

それぞれの場合において、選択部分の沈着は、それらと結合した任意の標識標的とともに、バルク反応混合物から検出帯内に存在する高密度クッション層内への選択部分の移送を惹起する。この過程は検出帯内で見出される非結合標識の量を最小限に抑えるため、画像化により検出可能である。

【0155】

様々な高密度物質が検出帯内で高密度層を構成するために使用され得る。水より高密度で水と混ざらない液体が一つの代替物である。7.5% w/vから35% w/vの濃度のスクロース、10%以上、より好ましくは15%以上、最も好ましくは15~30%の濃度の商標名Optiprep（登録商標）のイオジキサノール、ジアトリゾエートすなわちPercoll（登録商標）など、高い溶質濃度を含む溶液が、高密度下部層を生成するために使用され得る。高密度の溶液を作製するために溶解し得る他の溶質は、NaCl、MgCl、Ficoll、CsCl、メトリザミド、またはアルブミンを含む。下部溶液が2層間の混合が最小限であるバルク反応の密度と十分に相違し、且つ反応の特定成分がクッションを通して自然に堆積しないことが好ましい。例えば、下部溶液（高密度層すなわちクッション）は上部層より少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、10.0、12.0、15.0、もしくは20.0kg/L、またはそれ以上である密度を有し得る。検出帯内での標識選択部分複合体の沈着を回避するために高密度溶は粘度が低いことも好ましい。高密度層の上部バルク反応と画像表面の分離を維持する能力は図8で説明され、高密度クッション層の上に積層される全血は画像ウェルの底部に堆積しない。

20

30

【0156】

検出帯のみが励起源により照射されるように検出器が構成される場合、高密度下部層は検出帯でのシグナリング部分の選択的画像化を可能にするのに十分であり得る。これは、検出ウィンドウの平面に平行して励起光のビームを提供し、検出ウィンドウで蛍光シグナルを検出することにより達成され得る。このアプローチはバルク反応における上部シグナリング部分の光学的寄与を最小限に抑える。

【0157】

色素クッション層。高密度クッション層と色素添加の組み合わせは、反応の非結合シグナリング部分によるバックグラウンドシグナルの効率的な減少を提供する。クッションは非結合シグナリング部分が検出帯に出現するのを妨げる一方、色素は上部バルク反応の非結合シグナルによるシグナルの検出を妨げることにより、検出帯内に沈着する選択部分と複合体形成した標識標的のシグナリング寄与を分離する。上記に記載するクッションの態様は本発明の色素クッションの態様において使用する本発明の色素と組み合わせられ得る。クッション試薬への色素添加の直接的な例は図11で説明される。色素クッションの使用例は、下記の実施例8から13および15から20で説明される。それらは、ヒト甲状腺刺激ホルモン、炭疽菌のタンパク質およびポリペプチド抗原を含む様々な標的とともに、ヒト全血、血清、血漿および尿を含む様々な試料型において、ならびに黄色ブドウ球菌およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）細胞の検出において、この形式の使用を証明する。0.5 μ M 蛍光粒子、0.2 μ M 蛍光粒子、およびSYBR核酸染色を含む、3つの異なるシグナリング

40

50

部分が実施例で使用される。

【0158】

検出帯の体積と少なくとも等しい体積を占める染色高密度層は画像ウェルに位置し、本発明の沈着工程が実施される前に、反応混合物がその上に積層する。あるいは、画像化帯内での染色高密度層の形成に必要な物質は、反応混合物が混合物のインキュベーション中に染色高密度層を再構成し標識標的-シグナリング部分複合体を形成させるといった方法で、画像ウェル内へ乾燥され得る。染色高密度クッション層を反応混合物と画像表面との間に敷くことは可能である一方、反応混合物の非結合標識が反応中に画像表面と直接接触しないことが好ましい。

【0159】

検出帯の光退色。洗浄を要しない本発明の別の態様は、蛍光シグナリング部分が蛍光部分の励起波長の光に暴露することにより光退色し得る反応において色素添加を利用する。反応は画像ウェルで実行され得る。色素は接触工程中あるいは反応の接触工程後に反応に取り込まれる。上部シグナリング部分を光退色させることなく検出帯内に存在するシグナリング部分を光退色させるような方法で光が検出帯に適用される。沈着工程が実行され、他の蛍石が予め光退色した検出帯内へ標識標的-選択部分を沈着させる。検出帯が画像化される場合、検出されるシグナルは標識標的-選択部分複合体に起因し、結合標識画分からのシグナルの高感度検出を可能にする一方、反応液体の物理的操作なしに単一反応混合物の非結合標識からのシグナルを排除する。

【0160】

本発明の別の態様は試料中の微生物細胞を計数するのに有用である。この態様は、反応の可溶性標的との反応による画分から標的細胞による標識標的-選択部分複合体の画分を識別するために、光退色を用いる。一例は、細菌細胞壁のプロテインAを光退色を受けにくい蛍光粒子で標識することにより黄色ブドウ球菌細胞を検出する反応である。選択は超常磁性微粒子上でプロテインAと反応する抗体により達成される。黄色ブドウ球菌を含む試料は遊離プロテインAも含み、これはこの形式において標識標的-選択部分複合体の形成を惹起し得る。画像で検出されるどのシグナルが反応中の細胞によるものであるか、およびそれが可溶性物質によるものであるかを知ることが望ましい場合、細胞は、シグナリング粒子と同じフィルターセットにより検出可能であるが光退色を受けやすい核酸染色でさらに標識され得る。色素クッションを通して検出帯内への標識標的-シグナリング部分複合体の沈着後、検出帯は画像化され、標識細胞も複合シグナリング粒子も検出される。検出帯は次いで標識細胞の光退色を惹起するのに十分な光に曝され、他の画像が得られる。第1画像と第2との差異は細胞により形成される複合体を示す。

【0161】

追跡移動による標識標的:選択部分複合体の識別。さらなる態様において、遊離標識からの結合標識の分離は、結合標識が結合する選択部分の選択性質を呈するという事実を利用して実施され得る。例えば、磁気粒子に対する標的により複合体形成した蛍光標識粒子は磁場により指向される運動の性質を得る。それぞれの結合および非結合標識が画像化されるように反応が構成される場合、次いで画像表面と実質的に平行な方向の力のベクトルで磁場が適用される際、磁気粒子と複合体形成した標識は磁力の方向に動く一方、非結合標識はランダムに動く。長い暴露が画像化に用いられる場合、移動するそれぞれの標識が画像上で筋または「彗星」として見られ得る。この態様は実施例21で説明される。あるいは、一連の画像は運動が磁場により指向される時間中に得られ、標識の動きは動きのビデオ記録で追跡され得る。

【0162】

この検定態様の一つの利点は、非破壊性であり、従って、結合反応の反応速度を決定するために用いられ得る。標的、標識および選択部分の反応の初期工程に、選択力の適用に反応して移動する少量の標識標的が観察される。反応が進行するにつれ、選択力に反応する標識の量が増大する。さらに、力ベクトルの方向は検出表面の平面に実質的に平行な力を維持しながら変化し、観察下のシグナリング部分の磁気反応性を確認し得る。

【0163】

この検定態様は選択部分として高密度粒子を用いても構築され得る。反応ウェルは反応チャンバーの中心の検定ウィンドウとともに構成され得る。それぞれの結合および非結合標識が画像化され得るように設計されたチャンバーは、検出ウィンドウとともに垂直位置で配置される場合、重力の力により高密度粒子を沈降させることにより、垂直に指向する検出ウィンドウを通して流れる。画像は、結合標識を運ぶ高密度粒子の画分、または検出ウィンドウの平面に平行して重力の方向で移動する結合標識の頻度を決定するために入手する。これらの画像は、画像上の力ベクトルの方向に指向する筋または「彗星」の生成またはビデオシーケンスによりシグナリング部分の動きを追跡分析できる長時間暴露した単一画像の形態であり得る。カートリッジは砂時計のように反転し、重力に反応するシグナリング部分の数についての一連の観察および高密度粒子の沈降による反応の連続混合に関する両可能性を提供する。

10

【0164】

11. 検出

本発明の方法において、検出帯に沈着する標識標的-選択部分複合体はデジタル画像の使用により検出される。シグナリング部分の検出に適したデジタル撮像装置が提供されなければならない。シグナリング部分が蛍光またはリン光である場合、適切な励起光源ならびに励起および放射フィルタも提供される。シグナリング部分が化学発光もしくは生物発光、または発色性である場合、高密度クッションはシグナルの生成に適切な基質および補因子も含む。

20

【0165】

本発明で用いる検出器は、適切なレンズ、光学フィルタおよび照明源を搭載する場合、検出帯に存在する標識のデジタル画像を作成し得る任意の検出器を含む。検出器は、CCDカメラ、CMOSカメラ、ライン走査カメラ、CMOSアバランシェ光ダイオード (APD's)、光ダイオードアレイ、光電子増倍管アレイ、または他の種類のデジタル画像検出器を含む。

【0166】

検出器は検出帯の1つまたは複数のデジタル画像を作成するために用いられる。これらは一つもしくは一連の単一画像または一式の連続画像（例えばビデオ）を含み得る。

【0167】

画像化は単一セットの画像化条件で実施され得るかまたは画像化条件は画像で変更され得る。例えば、多色蛍光画像化は、光学的に識別可能な個別のシグナリング部分が異なる標的を検出するためにそれぞれ用いられる場合、多重検出を検出するために用いられ得る。多重蛍光を画像化するために、励起光の波長および放射光用のフィルタセットは、同じ反応ウェル中の一連の異なるシグナリング部分を画像化するために変更され得る。

30

【0168】

時には、連続画像がデブリを識別するために用いられ得る。光退色を受けやすいシグナリング部分の場合、シグナリング部分によるシグナルを検出するが内在蛍光または光散乱により検出され得るデブリも含む初期画像が入手できる。シグナリング部分を光退色させるのに十分な励起光を提供した後、第2画像が得られ得る。第2画像の蛍光シグナルはデブリに起因し、特異的な標的捕捉の分析から除外され得る。実施例23はデブリ検出へのこの取り組みの説明を提供する。

40

【0169】

12. 分析

デジタル画像化の使用は本発明の検定のダイナミックレンジを拡大し得る。本発明の好ましい態様において、検出帯に沈着する個々の捕捉標的は、画像化される場合、デジタル画像に検出可能な対象物の生成をもたらす。検出されるべき個別の明るい対象物に関して十分に少ない対象物が画像に存在する場合、それぞれの対象物は画像中に斑点として同定され計数され得る。この取り組みは、検出される全シグナルが画像の総画素数のごく一部のみ占める場合でさえ、少数のシグナル部分の正確な計数を可能にする。画像のそれぞれの画素数の全シグナルが画像にわたって統合されるなら、特定のシグナルはバックグラウンド

50

ド範囲の強度の画素数のより多数のノイズで平均化することにより消失するであろう。検出対象物の数が増加するにつれ、これらの対象物からのシグナルが融合し始め、単一対象物の計数が不正確になる。この場合、シグナルの全強度は統合され、正確な定量化および画像化装置の完全なダイナミックレンジの使用を可能にする。

【0170】

標準曲線は、未知量の標的を含む試料のデジタル画像の分析から導き出されるシグナルを既知レベルの標的で生成されるシグナルと関連付けるために用いられ得る。非競合検定の態様の場合、特定のシグナルは試料中に存在する標的数とともに増加する。競合検定の場合、シグナルは試料中に存在する標的の量が増加するにつれ減少する。

【0171】

平行な内部対照の包含による試料干渉の検出。幾つかの試料が最適な分析条件下でさえ標的の検出を干渉し得ることは周知である。この干渉は、標的の不在下で高シグナルを惹起する陽性であり、または陽性試料を検出しない検定を惹起する陰性であり得る。実際の試料マトリクスにおける試験試料と平行して行う内部対照の追加は、真偽の試験結果を識別するために用いられ得る。この対照スキームの説明は図26で図解される。陽性対照（例えば、試験試料に所定量の標的を添加する）は、対照が試験試料に添加される場合に限定的な増分シグナルを加算することが予期される。陽性対照が検出されない場合、試料は負の干渉を有するとみなされ適切に解釈され得る。同様に、試料中の標的によるシグナルの生成を阻害するよう設計される陰性対照（例えば、標識を標的に結合させるために用いられる大量のカテゴリ特異的結合部分の添加による）は、陽性試料により生成するシグナルの減少をもたらすはずである。陰性対照ウェルにおけるシグナルの減少を示さない陽性試料は偽陽性であるか或いは極めて高い真陽性である。これらの代替物は試料の希釈により識別され得る。あるいは、陰性対照は標的と反応しない無関係な（シグナリング部分に特異的な捕捉部分複合体）を含み得る。実施例16は平行な内部の陽性および陰性の対照を用いて実施される検定を説明する。

【0172】

13. アセンブリ

本発明の反応は様々な方法でユーザに提示され得る。一般に、本発明に従った標的の検出に必要なそれぞれの成分がユーザに提供され、ユーザは標的の存在について試験されるべき試料を供給する。これらの成分は下記を含む：

接触反応の成分

- 画像化ウェルと分離した或いは組み合わされた反応ウェル
- 標的の検出の必要に応じて結合部分とコンジュゲートさせたシグナル部分
- 標的の検出の必要に応じて結合部分とコンジュゲートさせた選択部分
- 反応の最適性能に必要な添加剤
- 検出帯からバルク反応を光学的におよび/または物理的に分離するための色素、クッションおよび/または染色クッション。

【0173】

一式の態様において、反応成分は反応ウェルで試料と混合される。全反応物質が試料と混合された後に、反応は、選択部分が検出帯に沈着し画像化する前に、画像化ウェルに移される。液体成分のそれぞれが個別添加として反応ウェルに添加され得る。このアセンブリ方法は、実施例13のハイスループットサージ試験機器に具現化される。あるいは、液体は混合され1回または2回の添加として反応に添加され、本発明を実施するために必要な分注工程数を減らし得る。色素、クッション、または染色クッションは、実施例13で実証されるように、クッション上に積層される反応混合物とともに、液体として画像ウェル内に分注され得る、または画像ウェルで乾燥され、反応混合物の添加により再水和され得る。あるいは、反応成分は、乾燥または凍結乾燥の形態で反応ウェル内に予め分注され、試料または希釈剤および試料の添加により再水和された後、画像ウェル中の色素、クッション、または染色クッションに移され得る。乾燥は多数の方法で実施でき、反応ウェルでケーキの形態の試薬を乾燥する方法、大量の試薬を乾燥し乾燥粉末を分注する方法、または単

位用量の試薬球を凍結乾燥し、球を反応ウェル内に分注する方法を含む。

【0174】

本発明の実施は、染色クッションを含む成分の全てが予め分注され単一反応/画像化ウェルで乾燥させる場合に非常に簡略化される。染色クッションは検出表面に近接して乾燥され、その結果、反応中に再水和し画像表面を反応物質から保護する。乾燥した反応成分は、試料、希釈剤、または試料および希釈剤の添加で即時に再水和し、且つ再水和した色素クッションの上に個別の層を形成する形態で提供され得る。反応成分は、実施例20で実証されるように、乾燥クッションの上に直接積層されるケーキの形態であり得る、または単位用量試薬球として（実施例19）個別に乾燥され得る、もしくはバルク試薬として乾燥した染色クッションの上の反応ウェル内に分注される。この態様において、単一液体添加は本発明の工程の全てを実施するのに十分であり、1容器から別への試薬の移動は必要でない。この形式は、手動で、自動機器により、または内蔵型カートリッジでの流体移動により実施されることに適する。

10

【0175】

試料および試薬成分の添加は、操作者により手動で実施され、液体流動を操作するための機器もしくはカートリッジの使用により自動化され、または自動化と手動方法の組み合わせによるものであり得る。試薬は、操作者にまたは大量に自動化機器に供給され、反応の時に分注され得る、または使い捨ての反応ウェルまたはカートリッジ内に予め分注され得る。

20

【実施例】

【0176】

本発明は下記の非限定的態様に関してさらに記載する。特に断りのない限り、実施例で具体的に記載する方法のいずれの要素も本発明の方法で一般に用いられ得る。本方法を実施するための画像分析器、ソフトウェア、および装置についての更なる詳細は、2009年9月24日に出願され標題が「Imaging analyzer for testing analytes」の国際出願第____号、ならびに2009年9月24日に出願され標題が「Kits and devices for detecting analytes」の国際出願第____号にも記載され、両者は参照により本明細書に組み入れられる。

【0177】

実施例1. 蛍光DNA染色を用いた黄色ブドウ球菌の標識

30

この実施例は、画像化による検出用に細菌標的を標識する方法を実証する蛍光DNA染色を用いた黄色ブドウ球菌細菌細胞の標識を記載する。細菌標的の標識は、臨床、産業、および環境分析に適用されるように、多数の分析状況において重要である。蛍光色素を用いた細菌標識の利用は、非拡大画像を用いて細菌を容易に計数できる驚異的なシグナルが生成し得るため、本発明に照らして一般用途を有する。

【0178】

方法。SYTO-13（登録商標）を用いた黄色ブドウ球菌の標識は下記の通りに実施した。黄色ブドウ球菌（ATCC株29213）の培養物は対数増殖期に到達するまで35°Cで2時間Tryptic Soy Broth（Acumedia、カタログ番号7164A）で増殖した。細胞数はZeiss顕微鏡の血球計算盤で計数し、pH 7.4に調整したPBS-TBP溶液（10mMリン酸塩、140mM塩化ナトリウム、3mM塩化カリウム（Calbiochem、カタログ番号524650）、0.05% w/v Tween 20（Acros、カタログ番号2333600010）、2mg/mlウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich、カタログ番号A3059）および0.05% v/v ProClin（商標）300（Supelco、カタログ番号48912-U））で 1.67×10^8 細胞/mLに希釈した。SYTO-13（登録商標）（Invitrogen/Molecular Probes、カタログ番号S7575）は生理食塩水溶液（0.9% w/v 塩化ナトリウム、JT Baker、カタログ番号3629-07）で1:20に希釈した。標識反応混合物は6 μ L希釈黄色ブドウ球菌細胞溶液、10 μ Lの希釈SYTO-13（登録商標）溶液および984 μ L PBS-TBPを含有した。反応混合物は2分間インキュベートした。次に試料はPartec Cyflowフローサイトメーターセットで分析し300の利得設定で520nmの放射波長の緑色蛍光で誘発された。

40

【0179】

50

結果。図4はSYTO-13（登録商標）で標識されていない黄色ブドウ球菌細胞（左）対SYTO-13（登録商標）で標識された細胞（右）のログ蛍光強度を示す。標識細胞は520nmの蛍光により容易に検出されることが理解できる。

【0180】

結果。実施例1の結果は細菌細胞の標的が高い強度で蛍光標識され得ることを証明する。

【0181】

代替態様。後の実施例はSYTO-13（登録商標）などの核酸染色剤で標識された細菌が非拡大画像化技術により検出できることを証明するであろう。様々な波長の蛍光励起および放射で細菌細胞を蛍光標識するために他の核酸染色剤が同様な方法で用いられ；これらの染色剤は、染色剤のSYTO（登録商標）ファミリーの他のメンバー（Invitrogen）および核酸染色剤のSYBR（登録商標）ファミリーのメンバー、ヨウ化プロピジウム、またはヨウ化ヘキシジウムを含む。この種類の染色方法は試料中のあらゆる核酸を含む細胞を標識する。標的の特定カテゴリに関する検出の特異性は、下記の実施例で理解されるように、細胞の核酸に基づく標識とカテゴリ特異的選択方法とを組み合わせることにより強化され得る。これにより、例えば、標識細胞の混合物から細胞の一つの特定のカテゴリを検出でき、例えば創傷からの混合細菌培養物中における黄色ブドウ球菌の検出など、標的の特異的検出をもたらす。様々な選択方法が実施例4の代替態様として以下に記載される（例えば、黄色ブドウ球菌は、SYTO-13（登録商標）で標識され色素-クッション試薬を通して黄色ブドウ球菌抗体と結合した磁気粒子で選択され得る。以下の実施例18を参照）。化学的分類の他の種類はこの取り組みにより標識され、特異的選択により検出された後、画像化され；実施例はNile Redを用いたヒト血清リポタンパク質内の脂質の標識であり、続いて抗ヒトアポリリポタンパク質B抗体と結合させた磁気粒子を用いた特異的な低密度リポタンパク質の選択である。これにより、試料中の低密度リポタンパク質複合体の脂質含量を測定できる。多数の類似態様が容易に意図され得る。

【0182】

異なるシグナル特徴をもつ標識が使用され得る（例えば、蛍光、化学発光、光吸収、光散乱、リン光、酵素反応およびラマン散乱）。異なるシグナリング部分も用いられ（異なるシグナリング特徴をもつ）、例えばフルオレセイン二酢酸（フルオレセインエステラーゼ基質）、SYBR（登録商標）Green（登録商標）（蛍光DNA染色剤）、スーダンブラック（脂質染色）、不溶性産物を得る酵素基質、ポリスチレン粒子、蛍光色素を含むポリスチレン粒子、コロイド金およびその他である。

【0183】

記載される方法は、細胞、ウイルス、細胞小器官、リポタンパク質、ならびにタンパク質、オリゴヌクレオチド、脂質、オリゴ糖、および有機および無機の小分子を含む分子を含み得るがこれらに限定されない標的の標識に用いることができる。

【0184】

試料は標識前にも処理でき、例えば細胞はメタノールで固定され得る。DNAは抽出および精製され得る。

【0185】

実施例2. ニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA抗体とコンジュゲートさせた蛍光粒子の製造

この実施例はニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA抗体とコンジュゲートさせた蛍光粒子の製造を記載する。これらの粒子は、カテゴリ結合部分と複合体形成し従って標的に特異的に結合するシグナリング部分を含むため、黄色ブドウ球菌に特異的な標識として役立つ。これらの粒子は驚異的なシグナルを放射し非拡大画像化を用いて容易に計数できるため、標的に特異的な蛍光粒子は本発明に照らして一般用途を有する。

【0186】

粒子は、臨床、産業、および環境試料を含む多数の試料において低濃度の個々の細胞標的および分子標的を検出し計数するための方法で使用され得る。該方法は複合体基質にお

けるシグナルの安定度を向上するためにも用いられ得る（例えば、蛍光粒子の使用は試料中の非標的成分による消光を減少し得る）。

【0187】

方法。200nmの直径を有するカルボキシル化黄緑色蛍光粒子（FluoSpheres）（Invitrogen、カタログ番号8811）は洗浄しpH 5.5に調整した50mM 2-モルホリノエタンスルホン酸（Aldrich、カタログ番号69889）に1% w/vに再懸濁した。微粒子は次いでそれぞれ2mg/mLの最終濃度のスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド（Thermo Pierce、カタログ番号24510）および1-エチル-3-（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（Thermo Pierce、カタログ番号22980）の連続添加により活性化し、30分間インキュベートした。粒子は洗浄し、ニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA抗体（Meridian OEM、カタログ番号C5B01-296）は2.0mg/mLの最終濃度まで徐々に添加し；この混合物は室温で16時間混合しながらインキュベートした。混合物は次いで50mg/mLウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich、カタログ番号A3059）溶液と1:1で混合し2時間インキュベートした。インキュベーション後、pH 8.0に調整した1Mエタノールアミン（Sigma-Aldrich、カタログ番号E9508）溶液はエタノールアミンの最終濃度が100mMになるよう添加し、混合物は1時間インキュベートした。抗体で誘導体化された蛍光微粒子は次いで洗浄し、pH 7.8に調整した20mM Trisの溶液（JT Baker、カタログ番号4109-02）、0.05% w/v Tween 20（Acros、カタログ番号2333600010）、2mg/mLウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich、カタログ番号A3059）、0.05% w/v ProClin 300（Supelco、カタログ番号48912-U）に再懸濁し短時間超音波破碎して、Partec Cyflowフローサイトメーターにより確認されるように粒子が単量体であることを確実にした。

【0188】

代替態様。シグナリング部分複合体の製造については多数の方法が存在する。カテゴリー結合部分は受動吸着され得るまたは非共有結合または共有結合の化学リンカーを通じて結合し得る（例えば、抗体は、ポリスチレン粒子上に受動的に吸着され、非共有結合性ビオチン-ストレプトアビジン結合を通じて、またはカルボジイミド化学によるタンパク質のアミノ基とカルボキシル化粒子上の粒子のカルボキシレート基との共有結合を通じて結合し得る）。多数の有用なコンジュゲーション方法が知られている（Bioconjugate Techniques Hermanson 1996 Academic Press）。

【0189】

抗体（様々な免疫グロブリン型を含む）および他のタンパク質（例えば、レクチン、ホルモン受容体など）、オリゴヌクレオチドおよびこれらの合成類似体（例えばペプチド核酸、アプタマーなど）、オリゴ糖（例えば、ヘパリンなど）、有機ポリマー（例えば、硫酸デキストランなど）ならびに小分子（例えば薬、非ペプチドホルモン、ビオチン、色素など）を含むがこれらに限定されない異なるカテゴリー標識部分が用いられ得る。

【0190】

様々な特異性を有する特異的な標識が製造できる。シグナリング部分として蛍光粒子を用いる検定の特異性は粒子表面にコンジュゲートさせたカテゴリー結合分子の選択を通して制御される。例えば、抗TSH抗体の使用は、TSHを標識し画像化によりその検出を可能にする蛍光粒子を作製する。

【0191】

記載される方法は、細胞、ウイルス、細胞小器官、リボタンパク質、ならびにタンパク質、オリゴヌクレオチド、脂質、オリゴ糖、および有機および無機の分子を含む分子を含み得るがこれらに限定されない標的の標識で用いられ得る。

【0192】

標的についての検定の特異性は標的の標識と標的特異的選択法とを組み合わせることにより増強され得る（実施例1で論議され、実施例6、9～19、21～24で記載される）。

【0193】

例えば、蛍光、化学発光、光吸収、光散乱、リン光、酵素反応性およびラマン散乱など、異なるシグナル特徴が利用され得る。

【0194】

10

20

30

40

50

異なるシグナル特性の粒子は、異なるカテゴリー特異的結合分子とコンジュゲートし、単一反応における多重標的の同時検出を可能にし得る。異なるシグナリング部分も用いられ（異なるシグナリング特徴をもつ）、例えばフルオレセイン二酢酸（フルオレセインエステルゼ基質）、SYBR（登録商標）Green（蛍光DNA染色剤）、スーダンブラック（脂質染色）、不溶性産物を得る酵素基質、ポリスチレン粒子、蛍光色素を含むポリスチレン粒子、コロイド金などである。

【0195】

実施例3.細胞表面上のプロテインAに特異的に結合する蛍光ナノ粒子を用いた黄色ブドウ球菌細胞の標識

この実施例は標的に特異的な蛍光粒子を用いた黄色ブドウ球菌細胞の標識方法を記載する。これらの粒子は驚異的なシグナルを放射し非拡大画像化を用いて容易に計数できるため、標的に特異的な蛍光粒子の使用は本発明に照らして一般用途を有する。従って、該方法は、臨床、産業、および環境試料において低濃度で個々の細胞標的および分子標的を検出し計数するために用いられ得る。

【0196】

実施例はフローサイトメトリーを用いて黄色ブドウ球菌が標的に特異的な蛍光粒子で標識され得ることを実証する。

【0197】

方法。黄色ブドウ球菌は実施例2で記載したように製造された抗プロテインA抗体で被覆した蛍光粒子で標識した。黄色ブドウ球菌（ATCC株29213）の培養物は、対数増殖期（ $OD_{600}=0.3$ ）に到達するまで35°Cで2時間Tryptic Soy Broth（Acumedia、カタログ番号7164A）で増殖した。黄色ブドウ球菌細胞はZeiss顕微鏡の血球計算盤で計数し、PBS-TBP溶液で 1×10^7 細胞/mLに希釈した。これらの細胞は、1mLの希釈細胞を1.5 μ Lの4.67mMのヨウ化ヘキシジウムと室温で10分間インキュベートすることにより、ヨウ化ヘキシジウム（Molecular Probes、L-7005）で染色した。

【0198】

一連の黄色ブドウ球菌標識反応混合物は入力抗体被覆蛍光粒子の数を系列内で変動しながら構成された。50 μ Lの各混合物は、30 μ LのPBS-TBP、10 μ Lのヨウ化ヘキシジウムで染色した黄色ブドウ球菌細胞（ 1×10^7 細胞/mL）、および 0.5×10^{10} から 5×10^{10} 粒子/mLの濃度で実施例2の10 μ Lの抗体で被覆した蛍光粒子を含有した。反応は室温で30分間インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物は1mLのPBS-TBPに希釈しさらに2分間インキュベートした。試料は次いでPartec Cyflowフローサイトメーターセットで分析し、395の利得設定で590nmの放射波長をRed Fluorescenceで誘発した。それぞれのヘキシジウム標識細胞について捕捉された蛍光粒子数は単一粒子の蛍光測定から計算した。

【0199】

結果。図5は 1×10^{10} 抗体で被覆した蛍光粒子/mLを用いた黄色ブドウ球菌細胞の標識の結果を示す。パネルAは黄色ブドウ球菌細胞のみを有する反応のヒストグラムを示し、パネルBは蛍光粒子のみを有する反応のヒストグラムを示し、パネルCは黄色ブドウ球菌細胞および蛍光粒子を含む反応のヒストグラムを示す。反応混合物が細胞および蛍光物を含有した際に520nmの蛍光シグナルのみが観察されたことはデータから明らかである（パネルC）。細胞のみまたは蛍光粒子のみはバックグラウンドを上回るシグナルは全く無かった（パネルAおよびB）。図6は、1細胞当たりの結合粒子の平均数により示唆されるように、標識に使用される蛍光粒子の濃度への蛍光細胞標識の依存性を示す。標識は蛍光粒子1mL当たり 2×10^{10} 細胞の添加でほぼ飽和する。用いられる全ての粒子濃度で、多重粒子がそれぞれの黄色ブドウ球菌細胞に結合した。

【0200】

結論。このデータは細胞（例えば、黄色ブドウ球菌）を特異的に標識するために抗体で被覆した蛍光粒子の利用を実証する。次の実施例で示されるように、本明細書で用いられる標識方法は、本発明に照らして、標識標的を遊離のシグナリング部分および他の標識実体と識別する方法と組み合わせ得る。結果は1黄色ブドウ球菌細胞当たり18もの蛍光粒子

を用いる方法で得られ得る驚異的な標識を示す。

【0201】

代替態様。他の種類の検出可能な特異的標識がこの実施例で使用でき、異なる直径または異なるシグナリング特性の蛍光粒子を含む。他のシグナリング部分は特異的標識の作製に使用され、例えば、Alexa（登録商標）490蛍光標識抗体が黄色ブドウ球菌の検出に用いられ得る。

【0202】

異なるシグナル特徴をもつ標識が使用され得る（例えば、蛍光、化学発光、光吸収、光散乱、リン光、酵素反応性およびラマン散乱）。

【0203】

記載される方法は、細胞、ウイルス、細胞小器官、リボタンパク質、ならびにタンパク質、オリゴヌクレオチド、リボタンパク質、脂質、オリゴ糖、および有機および無機の小分子を含む分子を含み得るがこれらに限定されない標的の検出で用いられ得る。

【0204】

特異的選択部分の使用と組み合わせたこの標識方法は黄色ブドウ球菌細胞の画像化に基づく検出に用いられ得る。

【0205】

試料はまた標識前に処理され得る。例えば、細胞はメタノールで固定され得る。DNAは抽出および精製され得る。

【0206】

実施例4. 抗プロテインA抗体とコンジュゲートさせた磁気粒子の製造

実施例4は、黄色ブドウ球菌細胞の検出において特異的選択剤として用いられる黄色ブドウ球菌のプロテインAに対する抗体とコンジュゲートさせた磁気粒子の製造を記載する。この実施例は標的に結合する特異的選択部分の製造および機能性試験を記載する。

【0207】

特異的選択部分は標識標的-選択部分複合体を作製するために標識と組み合わせて用いられ得る。検出帯に沈着する場合、これらの複合体は画像化に基づく検出方法により検出され得る。

【0208】

該方法は複合体試料（例えば、血液、および尿、などの生体液、または乳、廃水、工業製品など）から標的を選択し濃縮するために用いられ得る。

【0209】

方法。ニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA抗体とコンジュゲートさせた磁気粒子を製造する方法およびそれらの機能性試験は以下に記載する。直径292nmのカルボキシル化磁気粒子（Ademtech、カタログ番号0213）は、洗浄し再懸濁しpH 5.5に調整された50mM 2-モルホリノエタンスルホン酸（Aldrich、カタログ番号69889）の1% w/v懸濁液を得た。微粒子は次いでそれぞれ2mg/mLの最終濃度のスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド（Thermo Pierce、カタログ番号24510）および1-エチル-3-（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（Thermo Pierce、カタログ番号22980）の連続添加により活性化され、30分間インキュベートした。粒子は次に洗浄し、ニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA抗体（Meridian OEM、カタログ番号C5B01-296）が0.5mg/mLの最終濃度に達するまで徐々に添加した。この混合物は室温で16時間混合しながらインキュベートした。インキュベーション後、反応混合物は等体積の50mg/mLウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich、カタログ番号A3059）溶液と混合し、さらに2時間インキュベートした。インキュベーション後、pH 8.0に調整した1Mエタノールアミン（Sigma-Aldrich、カタログ番号E9508）溶液は、エタノールアミンの最終濃度が100mMになるよう添加し1時間インキュベートした。抗体コンジュゲート磁石微粒子は次いで洗浄し、PBS-TBP溶液に再懸濁して短時間超音波破碎し、粒子が単量体であることを確実にした。製造後、抗体で被覆した磁気粒子は下記の通り生物検定で黄色ブドウ球菌を用いてそれらの捕捉効率を試験した。黄色ブドウ球菌（ATCC株29213）の培養物は対数増殖期に到達するまで35℃で2時間Tryptic Soy Broth（Acumedia、カタログ番

10

20

30

40

50

号7164A)で増殖させた。細胞数はZeiss顕微鏡の血球計算盤で計数し、PBS溶液(pH 7.4に調整した10mMリン酸塩、140mM塩化ナトリウム、3mM塩化カリウム(Calbiochem、カタログ番号524650))で 1.57×10^5 細胞/mLに希釈した。ニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA抗体磁気粒子は 0.625×10^9 から 5×10^9 粒子/mLまでの濃度系列にPBSで希釈した。50 μ Lの各反応に関して、10 μ Lの希釈黄色ブドウ球菌細胞(10,000細胞)、10 μ Lの磁気粒子および30 μ LのPBSは混合し15分間インキュベートした。インキュベーション後、20 μ Lの各反応混合物は96ウェル半面積直径透明プレート(Greiner、カタログ番号675001)のウェルにおいて70 μ Lのクッション溶液(30% Opti Prep(登録商標) Sigma、カタログ番号D1556からなる)上に積層した。磁気粒子、およびそれらと結合した細胞は棒磁石装置を用いて4分間磁気選択した。磁気選択後、非選択細胞を含む最上層は慎重に取り除いた後、磁気選択細胞を含む溶液部分(底部)はPBSで再構成した。両溶液のアリコートは次いで大豆トリプシン寒天プレート上に被覆し32.5℃で一晩インキュベートした。翌日に各プレート上のコロニー数は目視により計数し、磁気捕捉した黄色ブドウ球菌細胞(CFU)は下記の式で計算した。百分率磁気捕捉CFU = [磁気捕捉されたコロニー数 / (磁気捕捉されたコロニー数 + 磁気捕捉されていないコロニー数)] $\times$ 100。

10

【0210】

結果。図7は、検定に添加される磁気粒子数の関数としての黄色ブドウ球菌CFUの磁気捕捉を示す。これらの結果は、黄色ブドウ球菌細胞が抗プロテインA抗体被覆磁気ビーズを用いて特異的に捕捉され得ることを証明する。

【0211】

結果。結果は、細胞の標識に左右されない選択過程の検出法を用いて、黄色ブドウ球菌細胞を選択するためのニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA抗体コンジュゲート磁気粒子の利用を実証する。この実施例は、本発明の選択部分の製造方法を教示する。他の選択部分およびそれらの製造は容易に意図される。

20

【0212】

代替態様。黄色ブドウ球菌標的細胞の適切な標識方法と組み合わせた場合、この選択方法は画像化に基づく検出方法により試料中の黄色ブドウ球菌の存在を検出するために用いられ得る。密度(重力または遠心分離による選択)、濾過、画像化ウェル表面での捕捉、および電荷(電気泳動)を含む他の選択様式が用いられ得る。他の選択様式が用いられる場合、異なる選択部分が抗プロテインA抗体とコンジュゲートし得る。幾つかの態様において、選択は機器なしに実施され得る(例えば重力による選択)。

30

【0213】

異なる直径および組成(例えば、鉄、ニッケル、コバルトなどを含む金属、磁性流体)の常磁性粒子を含む選択部分の他の種類が磁気選択に用いられ得る。

【0214】

カテゴリー結合部分を選択部分と結合させるために(例えばシグナリング部分に関して実施例2の代替態様に記載したような)様々な製造方法が用いられ得る。

【0215】

抗体(様々な免疫グロブリン型を含む)および他のタンパク質(例えば、レクチン、ホルモン受容体など)、オリゴヌクレオチドおよびこれらの合成類似体(例えばペプチド核酸、アプタマーなど)、オリゴ糖(例えば、ヘパリンなど)、有機ポリマー(例えば、硫酸デキストランなど)ならびに小分子(例えば薬物、非ペプチドホルモン、バイオチン、色素など)を含むがこれらに限定されない異なるカテゴリー標識部分が用いられ得る。

40

【0216】

選択はカテゴリー内の特異的標的の選択の間中特異的であり得る(例えば、鼻試料の血液または黄色ブドウ球菌細胞から得られるヒト甲状腺刺激ホルモンの選択)。検定もまた標的の標識カテゴリーの選択の間中特異的であり得る(例えば、ヒト血漿から得られるリポタンパク質の選択)。

【0217】

記載される方法は、細胞、ウイルス、細胞小器官、リポタンパク質、ならびにタンパク

50

質、オリゴヌクレオチド、脂質、オリゴ糖、および有機および無機の小分子を含む分子を含み得るがこれらに限定されない様々な標的の検出で用いられ得る。

【0218】

実施例5. ヒト血清のヒト甲状腺刺激ホルモンの検定

この実施例は洗浄工程を含まない検定においてシグナルバックグラウンドを減らすための色素の使用を実証する。抗体結合磁気粒子の使用を通して、抗体結合蛍光粒子による標的の特異的標識の使用と標的の特異的選択とを組み合わせる。反応への色素の添加により、検出帯におけるシグナリング部分の検出を可能にする一方、検出帯の外部に存在する反応の非結合粒子によるシグナルを排除する。この実施例において、ヒト血清中のヒト甲状腺刺激ホルモン (hTSH) の検定は、記載色素の存在下で画像化されるマウスモノクローナル抗hTSH抗体で被覆した磁気粒子を用いる磁気選択と組み合わせたマウスモノクローナル抗hTSH抗体で被覆した蛍光粒子を用いた標識を利用する。

10

【0219】

検定の特異性は、シグナリング部分として用いる蛍光部分の励起および/または放射波長で吸収する色素の包含により増強される。この色素は、検出帯へのシグナリング標的複合体の画像化能を制限する。Chromotrope 2Rのスペクトルは図8に示す。実線はChromotrope 2R色素の測定吸収スペクトルを示す。撮像装置で用いられる励起および放射フィルターの伝送プロファイルは角括弧で示され、フィルターのFWHM仕様にわたる。

【0220】

方法。この実験において、色素が蛍光微粒子からのシグナルを減少させることが示される。ウェルは直径2mmの接着性シリコーンガasket (Grace) を備えた顕微鏡スライド上に形成された。40 μ Lの蛍光粒子 (Invitrogen、カタログ番号8813) のアリコートは溶液 (Sigma-Aldrich、C3143) 中に5.5mg/mL Chromotrope 2Rを含むまたは含まない。ウェルは次いでハイスループット自動化画像分析器で画像化された。この方法は、磁気捕捉および洗浄なしの色素の存在下における蛍光粒子標識を用いてヒト血清のhTSHの免疫検定のプロトコルを記載する。抗hTSH被覆蛍光粒子は下記の変更を加えて実施例2に記載するように調製した。すなわち、500nm蛍光粒子 (Invitrogen、カタログ番号8813) が使用され、抗体はマウスモノクローナル抗hTSH (Meridian OEM、カタログ番号MAT04-005) であった。抗hTSH被覆磁気粒子は下記の変更を加えて実施例4に記載するように調製した。すなわち、抗体はマウスモノクローナル抗hTSH (Thermo Seradyn、カタログ番号MIT-0409) であった。実験試料は予め内在性TSHを欠乏させたヒトプール血清に既知量の組み換えhTSH (Cell Sciences、カタログ番号CRT505B) に添加することにより作製した。反応は96ウェルマイクロタイタープレートで実施した。反応 (50 μ L) は、抗hTSH抗体で被覆した2 μ Lの蛍光粒子 (0.02% w/v)、抗hTSHで被覆した2 μ Lの磁気粒子 (0.25% w/v)、400mM 1,3ジアミノプロパンを含む21 μ Lの200mM EPPS緩衝液pH7.8、および異なる濃度のhTSHを含む25 μ Lの血清試料を含んだ。反応成分を混合した後、反応は大気温度で10分間インキュベートし、hTSHと蛍光粒子および磁気粒子との「サンドウィッチ」免疫複合体を形成した。インキュベーション後、50 μ Lの25mg/mL色素溶液 (Chromotrope 2R (Sigma-Aldrich) C3143)、PBS-TBPの0.5% w/v魚ゼラチン (Sigma-Aldrich、カタログ番号G7765) はウェルに添加した。プレートは次いで磁石が各ウェルの中心底部に位置する磁石アレイ上に設置された。磁気粒子-hTSH-蛍光粒子複合体の磁気選択10分後、プレートは自動画像分析器で0.1秒の露光時間で画像化された。個々の蛍光粒子は次いで画像ソフトウェアを用いて計数した。別の実験は上記の反応混合物を採取し、Chromotrope 2Rの存在下および不在下でクッション層の最上部にアリコートをピペット操作した。

20

30

40

【0221】

結果。図9は上記の第2実験に記載したように色素を用いたおよび用いないウェルの画像であり、選択標的-シグナリング部分複合体の検出を検出帯に限定するために色素が使用される本発明の一態様を実証する。図10のデータはhTSH免疫検定の用量応答曲線を示し、免疫検定が色素の存在下における非拡大画像化の実施により洗浄工程を組み込まずに実行され得ることを示唆する。

50

【0222】

結論。この結果は、本発明の態様として、色素の使用により、未反応のシグナリング部分を除去するための洗浄工程なしにユーザが免疫検定を実施できることを示唆する。記載する方法は、シグナリング複合体、選択部分、および検出帯の外部で遊離シグナリング部分および非選択シグナリング部分非標的複合体からのバックグラウンドを減らす色素の組み合わせを通して、低濃度の複合体マトリクスで標的を検出できる（図10）。

【0223】

代替態様。この実施例の方法は、実施例で用いる抗TSH抗体の代わりに他の適切なカテゴリー特異的結合部分を置換することにより、幅広い標的を検出するために用いられ得る。他の態様において、適切な色素の選択とともに、例えば、蛍光、化学発光、光吸収、光散乱、リン光、酵素反応性およびラマン散乱などの異なるシグナル特徴が用いられ得る。例えば、Toluidine Blue O色素はTexas Red蛍光標識（スルホローダミン）とともに使用され得る。

10

【0224】

実施例6. 未反応検定反応物質を除去するための洗浄工程がなく、非拡大画像化する完全な検定を実施できる色素-クッション試薬を用いた検定バックグラウンドの減少

この実施例において、本発明の実践に有用な色素-クッション試薬（例えば、色素および密度剤の混合物を含む試薬）が記載される。実施例は調製仕様を提供し、検定バックグラウンドを減少させ且つ検定反応物質を分離するための洗浄なしに一容器で検定を実施するために用いられ得る色素-クッション試薬の寄与を実証する。

20

【0225】

検出帯の外部に存在する非結合シグナリング部分は標的の非拡大画像にバックグラウンドを生じ得る。このバックグラウンドは画像化を検出帯に限定する色素の添加により減少し得る（実施例5）。本実施例において、本発明者らは、検出帯から非結合シグナリング部分を排除することによりシグナリングバックグラウンドをさらに減少させるために色素と密度剤との組み合わせを用い、選択過程により検出帯に沈着するシグナルのみを検出し得る。

【0226】

方法。スクロース色素-クッション試薬は、2mg/mLのChromotrope 2R（Sigma-Aldrich、カタログ番号C3143）および60% wt/wtスクロース（JT Baker、カタログ番号4097-04）のTris-TBP溶液を用いて作製された。Optiprep（登録商標）色素-クッション試薬は、2mg/mLのChromotrope R2（Sigma-Aldrich、カタログ番号C3143）および25% v/v Optiprep（登録商標）（Sigma-Aldrich、カタログ番号D1556）のTris-TBP溶液を用いて作製された。

30

【0227】

一実験において、反応混合物（50 μ L）は、抗hTSH抗体で被覆した2 μ Lの蛍光粒子（0.02% w/v）、抗hTSHで被覆した2 μ Lの磁気粒子（0.25% w/v）、400mM 1,3ジアミノプロパンを含むpH 7.8の200mM EPPS緩衝液21 μ L、および異なる濃度のhTSHを含む25 μ Lの血清試料を含む。反応成分を混合した後、反応は大気温度で10分間インキュベートし、hTSHと蛍光粒子および磁気粒子との「サンドウィッチ」免疫複合体を形成した。インキュベーション後、25 μ Lの反応混合物は透明な底部をもつ黒色マイクロプレート（Corning、3881）においてChromotrope R2色素の存在下および不在下で30 μ Lのクッション試薬上に積層した。ウェルはハイスループット自動画像分析器で画像化した。

40

【0228】

別の実験において、上記の反応混合物（25 μ L）は色素クッション試薬（Chromotrope R2色素を含む）上に積層した。ウェルは次いでハイスループット自動画像分析器で画像化した。ウェルを画像化した後、これらのウェルは棒磁石装置を用いて磁気選択にかけられた。5分間の磁気選択工程後、同一のウェルが再画像化された。

【0229】

結果。図11は色素-クッション試薬における色素の存在が検出帯の外部から生じる任意のシグナルを完全に遮蔽することを示す。図12に示される結果は、蛍光粒子-TSH-磁気粒

50

子複合体の磁気選択により検出帯に沈着するシグナリング部分が色素の存在下で検出され得ることを実証する。

【0230】

結論。色素-クッションの組み合わせは、検出帯から高密度層により分離された未反応試薬および非標的複合体からのバックグラウンドを著しく減少させることが見られ得る。この実施例は、色素-クッション試薬の本発明への寄与を実証し、洗浄せずに非拡大画像化により標的の検出を可能にする。個々の蛍光シグナリング粒子は+標的画像で識別でき且つソフトウェアにより直接計数できる。

【0231】

代替態様。代替態様は、イオジキサノール、ジアトリゾ酸ナトリウム、ナトリウム、メトリザオエート (metrizaoate)、メトリザミド、スクロース、および他の糖類などの他の慣用される密度剤、オリゴ糖、合成ポリマー (例えばFicoll)、ならびに塩化セシウム、臭化カリウムなどの種々の塩などを含む他の密度剤も組み込み得る。

【0232】

代替態様は使用時にシグナリング部分のシグナリング特徴に適合させるために選択される他のシグナリング部分および他の色素を使用できる。例えば、Toluidine Blue O色素はTexas Red蛍光標識 (スルホローダミン) とともに使用され得る。

【0233】

実施例7. 色素クッション試薬による赤血球細胞懸濁液の視覚的実証

この実施例は、粒子などの固体および細胞を含み得る上部反応混合物と、検出表面に近接する検出帯との分離を維持するクッション試薬の能力を視覚的に実証する。検出帯からの上部反応を分離するためのクッションの使用は、全血試料中の赤血球細胞を適切な密度のクッションを含むウェルの底部に沈降するのを妨げる能力により証明される。

【0234】

方法。10、15、20、25、30、35、および40% v/v Optiprep (登録商標) (Sigma-Aldrich D1556) 溶液の20 μ LのアリコートはNunc384ウェル透明マイクロタイタープレートにピペット操作した。ウシ全血 (10 μ L) はOptiprep (登録商標) 溶液の最上部に積層し、15分間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルは任意の混合物について視覚的に試験しデジタルカメラを用いて撮影された。

【0235】

結果。図13に示される画像は、25% v/v以上のOptiprep (登録商標) 濃度が少なくとも15分間検出帯 (ウェルの底部) から全血試料を十分分離させることができることを実証する。

【0236】

結論。クッションの使用により上部試薬混合物と検出帯との分離が維持されることが見られ得る。試料から検出帯への成分の堆積を回避するのに加えて、標識粒子がこの実施例の赤血球細胞より密度が低いため、この密度範囲のクッションは検出帯からの非結合標識を排除する。非結合標識の排除は特異的に選択される標識の検出感度を増大する。本実施例は色素クッション試薬の機能を実証する本発明の態様である。

【0237】

代替態様。他の試薬は実施例の高密度クッションを生成するために使用され得る。それらが同様な密度のクッションを生成するために使用される場合、検出帯からの上部反応物質の分離は同様であろう。

【0238】

実施例8. ヒト全血におけるヒト甲状腺刺激ホルモンの検出

この実施例は、洗浄工程のない非拡大画像化によりヒト全血におけるヒト甲状腺刺激ホルモン (hTSH) の検定を記載する。検定は、シグナリング部分および選択部分をヒト全血試料に含まれるTSH分子と結合させるためにマウスモノクローナル抗hTSHで被覆した蛍光粒子および磁気粒子を使用する。蛍光粒子-TSH-磁気粒子複合体は色素クッションを通した磁気選択を用いて検出帯に沈着する。反応は反応ウェルで実行し、反応混合物は、磁気

選択が適用される前に、画像ウェルの色素クッションの最上部に移される。

【0239】

方法。一実験において、20 μ Lの反応混合物は、400mM 1,3ジアミノプロパン（Sigma-Aldrich、カタログ番号D230807）を含むpH 7.8の10 μ L 200mM EPPS（Sigma-Aldrich、カタログ番号E9502）緩衝液、抗hTSH抗体で被覆した2 μ Lの蛍光粒子（0.02% w/v）、抗hTSHで被覆した2 μ Lの磁気粒子（0.25% w/v）、1 μ Lの非被覆DynaL Dynabeads（登録商標）「担体」磁石（Dynabeads（7.2mg/mL）は使用前に15分間20mM Tris-TBP溶液で予めインキュベートした）、およびhTSHが予め添加された5 μ Lの全血試料を含んだ。反応混合物は10分間インキュベートした（なお、「担体」磁石は磁気選択工程を促進することが意図されるが、本発明を実践するのに必要ではない）。個別の384ウェル黒色ウェルポリスチレンプレートにおいて、10 μ Lの色素クッション試薬（2mg/ml Chromotrope 2Rを含む30% w/v Optiprep（登録商標））は特定のウェルに添加した。インキュベーションの終了時に、5 μ Lの各反応混合物アリコートは色素クッション層の最上部に積層し、プレートは平行な棒磁石を備えたプレートホルダー上に設置された。プレートおよび磁石装置は次いでハイスループット自動画像分析器に設置した。次にウェルは0.1秒の露光時間で上述の分析器で画像化した。個々の蛍光粒子は次いで画像ソフトウェアを用いて計数した。

10

【0240】

結果。図14のデータは標的の存在下および不在下における検定ウェルの非拡大画像の例を示す。図15は、自動化ソフトウェアを用いて画像を分析することにより作成される全血中のTSH検定に関する用量応答曲線データを示す。これらの2つの結果は、洗浄工程なしで非拡大画像化を用いた全血試料などの複合体マトリクスからのhTSHの特異的かつ高感度な検出を示す。

20

【0241】

結論。実施例8は、色素クッションおよび非拡大画像化の使用と組み合わせられた、シグナリング用の抗TSHコンジュゲート蛍光粒子および選択用の抗TSHコンジュゲート磁気粒子を用いる検定様式により、洗浄工程の必要性なしにヒト血液などの複合体マトリクスにおいてTSHを検出できることを実証する。

【0242】

それぞれの蛍光シグナリング粒子は+標的画像で識別され直接ソフトウェアにより計数できる。

30

【0243】

検定の特異性は色素-クッション試薬の包含により増強される。色素は標識として使用する蛍光部分の励起波長および/または放射波長で吸収する。この色素はシグナリング標的複合体を画像化する能力を検出帯に限定する。高密度クッションの追加により、選択不可能な複合体から選択可能な複合体を分離し、さらにバックグラウンドを減少できる。

【0244】

代替態様。他の態様は、異なるシグナリング部分、選択部分、ならびに色素およびクッション構成物質を利用し得る。

【0245】

他の態様は、細胞、ウイルス、細胞小器官、リポタンパク質、ならびにタンパク質、オリゴヌクレオチド、脂質、オリゴ糖、および有機および無機の小分子を含む分子を含む種々の異なる標的を検出するために同一の検定形式を使用し得る。

40

【0246】

該方法は全血、血漿、糞便、廃水、乳などを含む複合体マトリクスを用いて試料に適用可能である。

【0247】

試料はまた選択前に処理され得る。例えば、全血は遠心分離して細胞成分を除去でき、細胞はメタノールで固定でき、DNAは抽出精製でき、通常血清因子と結合することが見出されるホルモン、タンパク質およびビタミンは遊離でき、ならびに他の処理による。

【0248】

50

この検定が抗TSH蛍光粒子、抗TSH磁気粒子、および試料由来のTSHの同時接触を含む一方、本発明の検定は連続して実施できる。例えば、標的は抗TSH磁気粒子の添加前に抗TSH蛍光粒子で予め標識され得る。

【0249】

実施例9. ヒト血漿におけるヒト甲状腺刺激ホルモンの検出

この実施例は、洗浄工程のない非拡大画像化によりヒト血漿におけるヒト甲状腺刺激ホルモン (hTSH) の検定を記載する。検定は、シグナリング部分および選択部分をヒト全血試料に含まれるTSH分子と結合させるためにマウスモノクローナル抗hTSHで被覆した蛍光粒子および磁気粒子を使用する。蛍光粒子-TSH-磁気粒子複合体は色素クッションを通じた磁気選択を用いて検出帯に沈着する。反応は反応ウェルで実行し、反応混合物は、磁気選択が適用される前に、画像ウェルの色素クッションの最上部に移される。

10

【0250】

方法。一実験において、反応混合物 (20 μ L) は、400mM 1,3ジアミノプロパン (Sigma-Aldrich、カタログ番号D230807) を含むpH 7.8の10 μ L 200mM EPPS (Sigma-Aldrich、カタログ番号E9502) 緩衝液、抗hTSH抗体で被覆した2 μ Lの蛍光粒子 (0.02% w/v)、抗hTSHで被覆した2 μ Lの磁気粒子 (0.25% w/v)、および5 μ LのhTSH (実施例5で製造された抗hTSH抗体で被覆した磁気粒子を用いてhTSHを予め欠乏させたヒト血漿に添加される) を含んだ。反応は10分間インキュベートした。個別の384ウェル黒色ウェルポリスチレンプレートにおいて、10 μ Lの色素クッション試薬 (5mg/ml Chromotrope 2Rを含む30% w/v Optiprep (登録商標)) は特定のウェルに添加した。インキュベーションの終了時に、5 μ Lの各反応混合物アリコートは単一ウェルにおける色素クッション層の最上部に積層され、プレートは平行な棒磁石を備えたプレートホルダー上に設置された。プレートおよび磁石装置は次いでハイスループット自動画像分析器に設置した。ウェルは0.1秒の露光時間で上述の分析器で画像化した。個々の蛍光粒子は次いで画像ソフトウェアを用いて計数した。

20

【0251】

結果。図16のデータは標的の存在下および不在下における検定ウェルの非拡大画像の例を示す。図17は、自動化ソフトウェアを用いて画像を分析することにより作成される用量応答データを示す。これらの2つの結果は、洗浄工程なしで非拡大画像化を用いた血漿などの複合体マトリクスからのhTSHの特異的かつ高感度な検出を示す。

30

【0252】

結論。実施例9は、色素クッションおよび非拡大画像化の使用と組み合わせられた、シグナリング用の抗TSHコンジュゲート蛍光粒子および選択用の抗TSHコンジュゲート磁気粒子を用いる検定様式により、洗浄工程の必要性なしにヒト血漿などの複合体マトリクスにおいてTSHを検出できることを実証する。

【0253】

それぞれの蛍光シグナリング粒子は+標的画像で識別されソフトウェアにより直接計数できる。

【0254】

検定の特異性は色素-クッション試薬の包含により増強される。色素は標識として使用する蛍光部分の励起波長および/または放射波長で吸収する。この色素はシグナリング標的複合体を画像化する能力を検出帯に限定する。高密度クッションの追加により、選択不可能な複合体から選択可能な複合体を分離し、さらにバックグラウンドを減少できる。

40

【0255】

代替態様。他の態様は、異なるシグナリング部分、選択部分、ならびに色素およびクッション構成物質を利用し得る。

【0256】

他の態様は、細胞、ウイルス、細胞小器官、リボタンパク質、ならびにタンパク質、オリゴヌクレオチド、脂質、オリゴ糖、および有機および無機の小分子を含む分子を含む種々の異なる標的を検出するために同一の検定形式を用い得る。

50

【0257】

方法は全血、血漿、糞便、廃水、乳などを含む複合体マトリクスを用いて試料に適用可能である。

【0258】

試料はまた選択前に処理され得る。例えば、全血は遠心分離して細胞成分を除去でき、細胞はメタノールで固定でき、DNAは抽出精製でき、通常血清因子と結合することが見出されるホルモン、タンパク質およびビタミンは遊離でき、ならびに他の処理による。

【0259】

この検定が抗TSH蛍光粒子、抗TSH磁気粒子、および試料由来のTSHの同時接触を含む一方、本発明の検定は連続して実施できる。例えば、標的は抗TSH磁気粒子の添加前に抗TSH 10
蛍光粒子で予め標識され得る。

【0260】

実施例10. ヒト血漿における炭疽 (Anthrax) 致死因子の検出

この実施例は、ヒト血漿における細菌毒素である炭疽菌の致死因子の検定を記載する。検定は、シグナリング部分および選択部分をヒト血漿試料に含まれる致死因子分子と結合させるためにマウスモノクローナル抗炭疽致死因子で被覆した蛍光粒子および磁気粒子を使用する。蛍光粒子-致死因子-磁気粒子複合体は色素クッションを通した磁気選択を用いて検出帯に沈着する。反応は反応ウェルで実行し、反応混合物は、磁気選択が適用される前に、画像ウェルの色素クッションに積層される。

【0261】

方法。反応混合物 (50 μ L) は、400mM 1,3ジアミノプロパン (Sigma-Aldrich、カタログ番号D230807) を含むpH 7.8の10 μ L 200mM EPPS (Sigma-Aldrich、カタログ番号E9502) 緩衝液、被覆抗体として抗炭疽致死因子抗体で被覆した10 μ Lの蛍光粒子 (0.007% w/v)、抗炭疽致死f (IQ Corp.、カタログ番号LF-IQ) (抗炭疽致死因子抗体作用物質抗体 (下記の変更を加えて実施例4に記載するように調製した:被覆抗体として抗炭疽致死因子モノクローナル抗体) を用いて実施例2に記載のように調製した) で被覆した10 μ Lの磁気粒子 (0.05% w/v)、1mg/mLアルギン酸 (Sigma-Aldrich、カタログ番号A2158)、2.5% w/vポリビニルピロリドン (Sigma-Aldrich、カタログ番号PVP40)、0.5mg/mLウシガンマグロブリン (Lampire Laboratories、カタログ番号7400805)、および1mg/mLマウスガンマグロブリン (Jackson Immunoresearch、カタログ番号015-000-002) を含むpH 7.4の10 μ L 30
PBS緩衝液、ならびに組み換え炭疽致死因子 (List Laboratories、カタログ番号172b) を添加した10 μ Lのヒト血漿試料を含んだ。反応は10分間インキュベートした。透明な底部を備える個別の96ウェル黒色ウェルポリスチレンプレートにおいて、色素クッション試薬 (2mg/ml Chromotrope 2Rを含む15% Optiprep (登録商標)) は特定のウェルに添加した。インキュベーションの終了時に、40 μ Lの各反応混合物アリコートは色素クッション層の最上部に積層され、プレートは棒磁石上に設置された。プレートは次いでハイスループット自動画像分析器に設置した。ウェルは0.1秒の露光時間を用いて上述の分析器で画像化した。個々の蛍光粒子は次いでソフトウェアを用いて計数した。

【0262】

結果。図18は標的の存在下および不在下における検定ウェルの非拡大画像の例を示す。 40
図19は、自動化ソフトウェアを用いて画像を分析することにより作成される用量応答データを示す。これらの2つの結果は、洗浄工程なしで非拡大画像化を用いた血漿などの複合体マトリクスからの炭疽致死因子の特異的かつ高感度な検出を示す。

【0263】

結論。実施例10は、色素クッションおよび非拡大画像化の使用と組み合わせられた、シグナリング用の抗致死因子結合蛍光粒子および選択用の抗致死因子結合磁気粒子を用いる検定様式により、洗浄工程の必要性なしにヒト血漿などの複合体マトリクスにおいて炭疽致死因子を検出できることを実証する。

【0264】

低濃度の標的で、それぞれの蛍光シグナリング粒子は+標的画像で識別されソフトウェア 50

アにより直接計数できる。

【0265】

検定の特異性は色素-クッション試薬の包含により増強される。色素は標識として使用する蛍光部分の励起波長および/または放射波長で吸収する。この色素はシグナリング標的複合体を画像化する能力を検出帯に限定する。高密度クッションの追加により、選択不可能な複合体から選択可能な複合体を分離し、さらにバックグラウンドを減少できる。

【0266】

代替態様。他の態様は、異なるシグナリング部分、選択部分、ならびに色素およびクッション構成物質を利用し得る。

【0267】

他の態様は、細胞、ウイルス、細胞小器官、リポタンパク質、ならびにタンパク質、オリゴヌクレオチド、脂質、オリゴ糖、および有機および無機の小分子を含む分子を含む種々の異なる標的を検出するために同じ検定形式を用い得る。

【0268】

該方法は全血、血漿、糞便、廃水、乳などを含む複合体マトリクスを用いて試料に適用可能である。

【0269】

試料はまた選択前に処理され得る。例えば、全血は遠心分離して細胞成分を除去でき、細胞はメタノールで固定でき、DNAは抽出精製でき、通常血清因子と結合することが見出されるホルモン、タンパク質およびビタミンは遊離でき、ならびに他の処理による。

【0270】

この検定が抗標的蛍光粒子、抗標的磁気粒子、および試料由来の標的の同時接触を含む一方、本発明の検定は連続して実施できる。例えば、標的は抗標的磁気粒子の添加前に抗標的蛍光粒子で予め標識され得る。

【0271】

実施例11. ヒト血漿における炭疽防御抗原の検出

この実施例は、ヒト血漿における細菌毒素成分である炭疽菌の炭疽防御抗原の検定を記載する。検定は、シグナリング部分および選択部分をヒト血漿試料に含まれる防御抗原分子と結合させるためにマウスモノクローナル抗炭疽防御抗原で被覆した蛍光粒子および磁気粒子を使用する。蛍光粒子-防御抗原-磁気粒子複合体は色素クッションを通した磁気選択を用いて検出帯に沈着する。反応は反応ウェルで実行し、反応混合物は、磁気選択が適用される前に、画像ウェルの色素クッションに積層される。

【0272】

方法。反応混合物 (50 μ L) は、pH 7.8の20 μ L PBS-TBP+400mM 1,3ジアミノプロパン (Sigma-Aldrich、カタログ番号D230807)、抗炭疽防御抗原抗体で被覆した10 μ Lの蛍光粒子 (0.007% w/v) (C3、Meridian Biodesign、カタログ番号C86613M) (被覆抗体として抗炭疽防御抗原抗体を用いて実施例2に記載するように調製した)、抗炭疽防御抗体で被覆した10 μ Lの磁気粒子 (0.05% w/v) (BAP-0105、Meridian Biodesign、カタログ番号C86501M) (下記の変更を加えて実施例4に記載するように調製した:被覆抗体として抗炭疽防御抗原)、および組み換え炭疽防御抗原 (List Laboratories、カタログ番号171A) を添加した10 μ Lのヒト血漿試料を含んだ。反応は10分間インキュベートした。個別の96ウェル黒色ウェル透明底部ポリスチレンプレートにおいて、90 μ Lの色素クッション試薬 (2mg/ml Chromotrope 2Rを含む15% Optiprep (登録商標)) は特定のウェルに添加した。インキュベーションの終了時に、40 μ Lの反応混合物アリコートは色素クッション層の最上部に積層され、プレートは組み立てられた棒磁石上に設置した。プレートは次いでハイスループット自動画像分析器に設置した。ウェルは0.1秒の露光時間を用いて上述の分析器で画像化した。個々の蛍光粒子は次いでソフトウェアを用いて計数した。

【0273】

結果。図20は標的の存在下および不在下における検定ウェルの非拡大画像の例を示す。図21は、自動化ソフトウェアを用いて画像を分析することにより作成される用量応答デー

10

20

30

40

50

タを示す。これらの2つの結果は、洗浄工程なしで非拡大画像化を用いた血漿などの複合体マトリクスからの炭疽防御抗原の特異的かつ高感度な検出を示す。

【0274】

結論。実施例11は、色素クッションおよび非拡大画像化の使用と組み合わせられた、シグナリング用の抗炭疽防御抗原コンジュゲート蛍光粒子および選択用の抗炭疽防御抗原コンジュゲート磁気粒子を用いる検定様式により、洗浄工程の必要性なしにヒト血漿などの複合体マトリクスにおいて炭疽防御抗原を検出できることを実証する。

【0275】

検定の特異性は色素-クッション試薬の包含により増強される。色素は標識として使用する蛍光部分の励起波長および/または放射波長で吸収する。この色素はシグナリング標的複合体を画像化する能力を検出帯に限定する。高密度クッションの追加により、選択不可能な複合体から選択可能な複合体を分離し、さらにバックグラウンドを減少できる。

【0276】

代替態様。他の態様は、異なるシグナリング部分、選択部分、ならびに色素およびクッション構成物質を利用し得る。

【0277】

他の態様は、細胞、ウイルス、細胞小器官、リボタンパク質、ならびにタンパク質、オリゴヌクレオチド、脂質、オリゴ糖、および有機および無機の小分子を含む分子を含む種々の異なる標的を検出するために同じ検定形式を用い得る。

【0278】

該方法は全血、血漿、糞便、廃水、乳などを含む複合体マトリクスを用いて試料に適用可能である。

【0279】

試料はまた選択前に処理され得る。例えば、全血は遠心分離して細胞成分を除去でき、細胞はメタノールで固定でき、DNAは抽出精製でき、通常血清因子と結合することが見出されるホルモン、タンパク質およびビタミンは遊離でき、ならびに他の処理による。

【0280】

この検定が抗標的蛍光粒子、抗標的磁気粒子、および試料由来の標的の同時接触を含む一方、本発明の検定は連続して実施できる。例えば、標的は抗標的磁気粒子の添加前に抗標的蛍光粒子で予め標識され得る。

【0281】

実施例12. ヒト尿における細菌炭疽菌ポリ-D- γ -グルタミン酸カプセルポリペプチド (PDGA) の検出

この実施例は、ヒト尿における細菌カプセルポリペプチドである炭疽菌のポリ-D- γ -グルタミン酸の検定を記載する。検定は、シグナリング部分および選択部分をヒト血漿試料に含まれるPDGAと結合させるためにマウスモノクローナル抗PDGAで被覆した蛍光粒子および磁気粒子を使用する。蛍光粒子-PDGA-磁気粒子複合体は色素クッションを通した磁気選択を用いて検出帯に沈着する。反応は反応ウェルで実行し、反応混合物は、磁気選択が適用される前に、画像ウェルの色素クッション上に積層される。

【0282】

方法。50 μ Lの反応混合物は、20 μ L PBS-TBP、抗炭疽 PDGA抗体で被覆した10 μ Lの蛍光粒子 (0.007% w/v) (被覆抗体として抗炭疽 PDGA抗体を用いて実施例2に記載するように調製した)、抗炭疽 PDGA抗体で被覆した10 μ Lの磁気粒子 (0.025% w/v) (下記の変更を加えて実施例4に記載するように調製した: 被覆抗体として抗炭疽 PDGA)、およびポリ-D- γ -グルタミン酸 (合成50量体、AnaSpec) を添加した10 μ Lのヒト尿試料から構成された。反応は5分間インキュベートした。個別の96ウェル黒色ウェル透明底部ポリスチレンプレートにおいて、色素クッション試薬 (2mg/ml Chromotrope 2Rを含む15% Optiprep (登録商標)) は特定のウェルに添加した。インキュベーションの終了時に、40 μ Lの反応混合物アリコートは色素クッション層の最上部に積層され、プレートはピン磁石アレイ上に7分間設置した。プレートは0.1秒の露光時間を用いてハイスループット自動画像分析

10

20

30

40

50

器で画像化した。個々の蛍光粒子は次いでソフトウェアを用いて計数した。

【0283】

結果。図22は標的の存在下および不在下における検定ウェルの非拡大画像の例を示す。図23は、自動化ソフトウェアを用いて画像を分析することにより作成される用量応答データを示す。これらの2つの結果は、ヒト尿中のPDGAの特異的かつ高感度な検出を示し、本発明の試料として用いられ得るマトリクスの多様性を実証する。

【0284】

結論。実施例12は、色素クッションおよび非拡大画像化の使用と組み合わせられた、シグナリング用の抗PDGAコンジュゲート蛍光粒子および選択用の抗PDGAコンジュゲート磁気粒子を用いる検定様式により、洗浄工程の必要性なしに尿中の炭疽防御抗原を検出できることを実証する。

10

【0285】

代替態様。PDGAは任意の単一モノクローナル抗体について多重結合部位をもつ反復ポリマーであるため、代替態様は蛍光粒子にも磁気粒子にもコンジュゲートする単一抗体を利用し得る。

【0286】

他の態様は、異なるシグナリング部分、選択部分、ならびに色素およびクッション構成物質を利用し得る。

【0287】

他の態様は、細胞、ウイルス、細胞小器官、リボタンパク質、ならびにタンパク質、オリゴヌクレオチド、脂質、オリゴ糖、および有機および無機の小分子を含む分子を含む種々の異なる標的を検出するために同じ検定形式を用い得る。

20

【0288】

該方法は全血、血漿、糞便、廃水、乳などを含む複合体マトリクスを用いて試料に適用可能である。

【0289】

試料はまた選択前に処理され得る。例えば、全血は遠心分離して細胞成分を除去でき、細胞はメタノールで固定でき、DNAは抽出精製でき、通常血清因子と結合することが見出されるホルモン、タンパク質およびビタミンは遊離でき、ならびに他の処理による。

【0290】

この検定が抗標的蛍光粒子、抗標的磁気粒子、および試料由来の標的の同時接触を含む一方、本発明の検定は連続して実施できる。例えば、標的は抗標的磁気粒子の添加前に抗標的蛍光粒子で予め標識され得る。

30

【0291】

実施例13. 自動分析によるヒト全血における炭疽致死因子の検出

この実施例は、ヒト全血における細菌毒素である炭疽菌の致死因子を検定するための完全自動化ハイスループットサージ試験機器の使用を記載する。検定は、シグナリング部分および選択部分をヒト血漿試料に含まれる致死因子分子と結合させるためにマウスモノクローナル抗炭疽致死因子で被覆した蛍光粒子および磁気粒子を使用する。蛍光粒子-致死因子-磁気粒子複合体は色素クッションを通した磁気選択を用いて検出帯に沈着する。異なる濃度の致死因子を添加した全血試料を含む試料担体は該機器に提示された。該機器は組み立てられ、反応ウェルで反応をインキュベートした後、画像ウェルの色素クッション上に各反応を重ね合わせ、ウェルを磁気選択ステーションに移送し、該ウェルを自動的に画像化した。

40

【0292】

方法。検定の組成物は実施例10に記載したものと同一であった。全ての試薬はハイスループットサージ試験機器の試薬カップに投入した。下記に記載される全てのピペット操作工程はコンピュータ制御下で完全に自動化されたロボットピペッターにより実行した。まず、400mM 1,3ジアミノプロパン (Sigma-Aldrich、カタログ番号D230807) を含むpH 7.8の10 μ L 200mM EPPS (Sigma-Aldrich、カタログ番号E9502) 緩衝液を反応カップに添加し

50

た後、1mg/mLアルギン酸（Sigma-Aldrich、カタログ番号A2158）、2.5% w/vポリビニルピロリドン（Sigma-Aldrich、カタログ番号PVP40）、0.5mg/mLウシガンマグロブリン（Lampire Laboratories、カタログ番号7400805）、および1mg/mLマウスガンマグロブリン（Jackson ImmunoResearch、カタログ番号015-000-002）を含む10 μ LのPBS試薬をピペット操作した。炭疽致死因子（List Laboratories、カタログ番号172b）を添加した10 μ Lのヒト全血を添加した。その後、10 μ Lの0.007% w/v抗炭疽致死因子蛍光粒子希釈液（実施例10に記載するように調製した）および10 μ Lの0.05% w/v抗炭疽致死因子磁気粒子希釈液（実施例10に記載するように調製した）を添加し、搭載ミキサーにより混合し、6分間インキュベートした。インキュベーション中、90 μ Lの色素クッション試薬（10mg/ml Chromotrope 2Rを含む30% Optiprep（登録商標））は個別の画像化カップに自動的に添加された。インキュベーション後、40 μ Lの反応混合物は分析器の画像ウェルにおける色素-クッション層の最上部に積層された。画像化カップは次いで分析器内の磁石上に自動的に移動し、磁気分離は1分間実行した。検出帯への磁気粒子の沈着後、画像化カップは自動的に画像化工程に移行し、次いで0.1秒の露光時間を用いて分析器で画像化した。個々の蛍光粒子は次いで計数し、試料結果は分析器のソフトウェアを用いて自動化様式で分析した。

【0293】

結果。完全自動化サージ試験機器を用いて作成されたデータは、図24に提示される。グラフは、ソフトウェアを用いて得られた画像の自動分析により作成された用量応答曲線を示す。これらの結果は、洗浄工程なしで非拡大画像化を用いて、ヒト血液などの複合体マトリクスからの炭疽菌致死因子の完全自動で特異的かつ高感度な検出を実証する。

【0294】

結論。実施例13は、本発明の検定がハイスループット系において完全自動化され得ることを実証する。

【0295】

実施例14.炭疽カプセルペプチド-ポリ- γ -D-グルタミン酸（PDGA）の検定-競合形式

実施例15は、競合検定形式を用いて、洗浄工程を要しない拡大画像化を用いて、炭疽ポリ- γ -D-グルタミン酸（PDGA）の検定を記載する。小分子（ハプテン）は一般に単一の特異的結合部分によってのみ結合し得る。これにより、シグナリング部分および選択部分に結合するカテゴリー結合部分による同時結合はできない。このような標的は「競合」形式の利用を通して本発明の方法により更に分析され得る。多数の異なるバージョンの「競合」結合検定は当技術分野で周知である。

【0296】

この実施例で用いられる「競合」形式は、標的競合相手を形成するために選択部分とコンジュゲートさせた複数の標的を使用する。試料中に標的が不在である場合、標的に特異的なカテゴリー結合分子とコンジュゲートさせた蛍光粒子は標的競合相手と結合し、選択され、検定で検出される。標的が存在する場合、標的-競合相手と蛍光粒子への結合を競合することにより、検定で検出されるシグナル量を減少させる。この減少は存在する標的の量に比例する。

【0297】

方法。抗PDGA抗体で被覆した蛍光粒子の調製は実施例13に記載する。ストレプトアビジンで被覆した磁気粒子は下記の変更を加えて実施例4に記載するように製造した。ストレプトアビジン（Prozyme SA10）は抗体の代わりに磁気粒子とコンジュゲートさせた。ビオチン化合成PDGA9量体ペプチド（Anaspecにより製造）はストレプトアビジンで被覆した磁気粒子より過剰に添加し、1時間インキュベートした。PDGA磁気粒子は次いでpH 7.4のPBS-TBPで広範に洗浄した。2 μ Lの抗PDGA抗体被覆蛍光粒子は、種々の濃度のPDGA₉-サイログロブリンコンジュゲートを含む25 μ Lの試料と、続いて2 μ LのPDGA磁気粒子と混合した。反応は振とうしながら5分間インキュベートした。反応物は希釈し非結合蛍光粒子から結合粒子を分離するために磁石上に設置した。上清は除去し、捕捉蛍光はVictor2蛍光光度計の読み込みにより検出された。多数の抗体被覆蛍光粒子は抗原被覆磁気粒子により捕捉された。シグナル阻害（競合）の程度は試料中の細菌カプセルペプチド量に相当した。

【0298】

結果。図25で見られる結果は、磁気捕捉を用いた競合免疫検定様式が標識（炭疽菌のPDGA）の有無を検出するために用いられ得ることを示唆する。データは「競合」形式を用いた結合検定に特徴的な阻害検定曲線を実証する。

【0299】

結論。実施例14は、代替検定形式（競合）が種々の試料から標的を検出するために本発明の幾つかの態様で利用され、本発明の検定に容易に組み込まれ得ることを示す。

【0300】

代替態様。抗PDGA蛍光粒子およびPDGA-競合相手と結合した磁気粒子は、様々な量のPDGA₉ペプチドを含む試料と上記のように混合する。接触工程後、反応混合物は色素クッション上に積層され、磁気選択にかけられ、ならびに0.1秒の露光時間を用いてハイスループット自動画像分析器で画像化される。試料中にPDGA₉が存在しない場合、多数の粒子が検出帯で捕捉される。試料中のPDGA量が増加するにつれ、捕捉粒子の数は減少する。

【0301】

本発明に適用できる当技術分野で周知の多数の「競合」結合検定形式が存在する。別の競合検定態様において、シグナリング部分も選択部分も標的競合相手と結合する。シグナリング部分および捕捉部分の架橋は、反応で供給される少なくとも2価のカテゴリート異分子（例えば抗体）により達成される。架橋反応は、2価カテゴリート異的な結合部分への添加標的の結合により阻害され、標的が反応物に存在する場合にシグナル量の減少をもたらす。第3の競合態様において、シグナリング部分および選択部分は、標的に結合し得るカテゴリート異的な結合部分とそれぞれ結合する。少なくとも2価の標的競合相手コンジュゲートの添加は、選択可能なシグナル-選択部分複合体の形成を誘導する。また、シグナリング部分および選択部分の架橋複合体の形成は標的の添加により減少する。

【0302】

他の態様は、これらの競合検定形式のいずれかにおいて、異なるシグナリング部分、選択部分、ならびに色素およびクッション構成物質を利用し得る。

【0303】

実施例15. 検定の精度を確保するための陽性および陰性の内部対照の利用

この実施例は、試験結果に及ぼすマトリクスの影響について試験するために、試験試料で行われる平行な陽性および陰性の内部対照の本発明のある態様への組み込みを記載する。試験マトリクスで行われる内部対照の組み込みは、試験結果の精度を確保し、偽結果および再試験の必要性を減らす。

【0304】

陽性対照（例えば、所定量の標的を試験試料に添加する）は、該対照が試験試料に添加される場合、定義可能な増分シグナルを加えることが予期される。陽性対照が検出されない場合、試料は負の干渉を有すると考察され、適切に解釈され得る。同様に、試料中の標的によるシグナルの生成を阻害するよう設計される陰性対照（例えば、標識を標的に結合させるために用いられる大量のカテゴリート異的な結合部分の添加による）は、陽性試料により生成するシグナルの減少をもたらすべきである。陰性対照ウェルにおけるシグナルの減少を実証しない陽性試料は偽陽性であるか或いは極めて高い真陽性である。これらの選択肢は試料の希釈により識別され得る。

【0305】

方法。この実験は、実施例5、11および12に記載する様々な対応標的のhTSH、炭疽防御抗原（PA）、および炭疽カプセルポリ-D-γ-グルタミン酸（PDGA）を検出するために抗標的抗体で被覆された蛍光粒子および磁気粒子を利用した。標的（それぞれ100pg/mL）を含むおよび含まない試料の別個の反応混合物は3つのウェルのそれぞれに添加し、各検定の反応混合物は下記の変更を加えた：試料定量化に関してはpH 7.4のPBS-TBP、陽性内部対照に関してはPBS-TBP中100pg/mL標的、および陰性内部対照に関してはPBS-TBP（詳細については実施例5、11および12を参照）中大過剰（1μg/mL）の遊離標的に特異的な抗体（抗体被覆蛍光粒子上の同じ抗体）。試料は10分間インキュベートした。個別の96ウェル黒色ウ

エル透明底部ポリスチレンプレートにおいて、色素クッション試薬（90 μ L）は特定のウェルに添加した。インキュベーションの終了時に、40 μ Lの反応混合物アリコートは色素クッション層の最上部に積層され、プレートは選択工程を実施するために棒磁石アレイ上に設置した。プレートはハイスループット自動画像分析器に設置し、ウェルは0.1秒の露光時間を用いて画像化した。個々の蛍光粒子はソフトウェアを用いて計数した。

【0306】

結果。図26は、標的を含むおよび含まない試験試料で行われる実験、陽性、および陰性の内部対照に関する各検定（hTSH、炭疽PA、および炭疽PDGA）の画像を示す。この方法論により、偽陰性および偽陽性反応の検定結果の補正を可能にすることが図から理解され得る。

10

【0307】

結論。この実験は、対照、即ち本発明と連動する内部対照に関して本発明に提示される態様の一つを実証し、結果の精度を確保するために用いられ得る。結果は、標的を含むおよび含まないウェルにおける予想シグナルおよびシグナルなし（+および-）を示す。陽性の内部対照ウェルは予測通りに全てのウェルで陽性シグナルを示し、陰性の内部対照は予測通りにシグナルを示さない。

【0308】

代替態様。本発明の幾つかの態様において、陰性あるいは陽性の内部対照の利用は単独で利用され得る。代替の陰性対照は不適切なカテゴリー結合分子とコンジュゲートしたシグナリング部分の使用を含む。

20

【0309】

本発明の他の態様において、陰性および陽性の内部対照は、カートリッジ内のものまたはウェルで乾燥されたものを含む使用試薬の性能を検証するために用いられ得る。

【0310】

陽性および陰性の内部対照は、試料における薬物耐性細菌または癌細胞の検出などの特定の態様に用いられ得る。これらの態様において、対照は、増殖工程が適切に生じることを確認するために、ならびに薬物感受性細胞集団から薬物耐性を識別するために用いられ得る。

【0311】

実施例16. 非特異的SYBR（登録商標）Green I染色による、細胞表面抗原プロテインAに特異的に結合する磁気ナノ粒子を用いた黄色ブドウ球菌細胞の特異的検出

30

この実施例は、非特異的染色剤を用いた後に特異的標的を検出するために標的特異的磁気粒子を使用する黄色ブドウ球菌細胞の染色方法を記載する。非特異的染色剤と組み合わせた標的特異的磁気粒子の使用は、標的の染色および捕捉により、非拡大画像化を用いて容易に標的を計数できるため、本発明に照らして一般的用途を有する。

【0312】

この実施例は、黄色ブドウ球菌がSYBR（登録商標）Green 1色素で容易に標識され、標的に特異的な磁気粒子を用いて特異的に捕捉されることを非拡大画像化で実証する。

【0313】

該方法は、従って、臨床、産業、および環境試料において低濃度で個々の細胞標的および分子標的を検出し計数するために用いられ得る。

40

【0314】

方法。SYBR（登録商標）Green 1および抗プロテインA抗体で被覆した磁気粒子を用いる黄色ブドウ球菌検定の図式は図27に示される。黄色ブドウ球菌細胞は実施例4に記載の通り製造されたSYBR（登録商標）Green 1および抗プロテインA抗体で被覆した磁気粒子を用いて標識した。黄色ブドウ球菌（ATCC株29213）の培養物は対数増殖期（ $OD_{600}=0.3$ ）に到達するまで35℃で2時間増殖培地TSB（Tryptic Soy Broth、Acumedia、カタログ番号7164A）で増殖した。黄色ブドウ球菌細胞はZeiss顕微鏡のPetroff-Hausser血球計算盤を用いて計数し、細胞は未使用のTSBで 2×10^5 細胞/mLに希釈した。反応は96ウェルポリカーボネートPCRプレート（Fisher Scientific、カタログ番号14230237）で実行した。反応混合物

50

(50 μ L) は、25 μ L黄色ブドウ球菌細胞 (5,000細胞)、20 μ LのSYBR (登録商標) Green 1色素 (生理食塩水で1:2000×希釈) およびPBS-TBP溶液 (10mMリン酸塩、140mM NaCl、3mM KCl (Calbiochem、カタログ番号524650)、0.05% w/v Tween 20 (Acros、カタログ番号2333600010)、2mg/mL BSA (Sigma-Aldrich)、0.05% w/v Proclin 300 (Supelco)、pH 7.4に調整) に懸濁された5 μ Lの抗プロテインA被覆磁気粒子 (2×10^{10} 粒子/mL) を含んだ。検定反応はピペット操作によりよく混合し、大気温度で15分間暗闇でインキュベートした。インキュベーション後、40 μ Lの反応混合物は、96ウェル半面積直径透明底部黒色プレート (Grainer、カタログ番号675096) に予め等分した70 μ Lの色素クッション溶液 (5mg/mL Chromotrope 2R (Sigma-Aldrich、C3143) を含む15% OptiPrep (登録商標) (Sigma、カタログ番号D1556)) 上に積層した。ウェルの底部で細胞-粒子複合体を選択するために、プレートは次いで4分間磁石上に載せることにより磁気にさらされた。次にプレートは磁石から取り外しハイスループット自動画像分析器に設置された。ウェルは次いで上記の分析器で0.1秒の露光時間で画像化された。個々の蛍光細胞は次にソフトウェアを用いて計数した。

【0315】

結果。図28は、SYBR (登録商標) Green 1による黄色ブドウ球菌細胞の標識および抗体被覆磁気粒子を用いた特異的捕捉の検定結果の画像を示す。パネルAは黄色ブドウ球菌細胞が存在しない反応を含むウェルの画像を示す (陰性対照)。パネルBは5000の黄色ブドウ球菌細胞を含む反応のウェルの画像を示し、パネルCは50,000の表皮ブドウ球菌細胞 (S. epidermidis) を含む反応のウェルの画像を示す (特異性対照として)。反応混合物が黄色ブドウ球菌細胞を含む場合にのみ多数の蛍光物が観察されたことがデータから明白である (パネルB)。細胞対照を含まないウェルおよび表皮ブドウ球菌を含むウェルはバックグラウンドを上回るシグナルを生じなかった (パネルAおよびC)。図29は、本明細書に記載する方法が低濃度で個々の細胞標的を検出し計数できることを実証する。

【0316】

結論。本発明に照らして、このデータは、抗体被覆磁気粒子が標識細胞 (例えば、黄色ブドウ球菌細胞) を特異的に捕捉するために使用され得ることを実証する。さらに、非黄色ブドウ球菌細菌 (例えば、表皮ブドウ球菌) はバックグラウンドを上回るシグナルを生じないため、検定は高度に特異的であり、検定の特異性を示唆する。次の実施例で示されるように、本明細書で用いる捕捉方法および標識方法は、本発明に照らして、捕捉標的を遊離シグナリング部分および他の標識実体から識別する方法と組み合わせ得る。

【0317】

低濃度の標的細胞で、個々の蛍光細胞は+標的画像で識別されソフトウェアにより直接計数され得る。

【0318】

代替態様。他の核酸染色剤は、検出用に細胞を標識するために使用され得る。または他の種類の蛍光細胞染色が使用され得る。標的に特異的な標識は細胞検出を可能にするために使用され得る。例えば、抗プロテインA抗体と結合させた蛍光粒子またはAlexa (登録商標) 490で標識した抗プロテインA抗体は標識として使用され得る。さらに、高密度粒子を用いる選択を含む他の選択様式がこの検定で用いられ得る。

【0319】

実施例17. 細胞表面抗原プロテインAに特異的に結合し且つ抗体で被覆された蛍光粒子および磁気ナノ粒子を用いることによる黄色ブドウ球菌細胞の特異的検出

この実施例は、特異的標的を検出するために、抗プロテインA抗体で被覆した蛍光粒子を用いた黄色ブドウ球菌細胞の特異的標識方法 (実施例2) および磁気粒子を用いた特異的捕捉方法 (実施例4) を記載する。色素-クッションの使用と組み合わせた標的的特異的蛍光粒子および磁気粒子の使用は、標的の染色および捕捉により、洗浄工程なしで非拡大画像化を用いて容易に標的を計数できるため、本発明に照らして一般的用途を有する。

【0320】

方法は、従って、臨床、産業、および環境試料において低濃度で個々の細胞標的および

10

20

30

40

50

分子標的を検出し計数するために用いられ得る。

【0321】

方法。抗プロテインA抗体で被覆した蛍光粒子および抗プロテインA抗体で被覆した磁気粒子を用いる黄色ブドウ球菌検定の図式は図30に示される。黄色ブドウ球菌（ATCC株29213）の培養物は対数増殖期（ $OD_{600}=0.3$ ）に到達するまで35℃で2時間増殖培地TSB（Tryptic Soy Broth、Acumedia、カタログ番号7164A）で増殖した。黄色ブドウ球菌細胞はZeiss顕微鏡のPetroff-Hausser血球計算盤を用いて計数し、細胞は未使用のTSBで 1×10^6 細胞/mLに希釈した。反応は96ウェルポリカーボネートPCRプレート（Fisher Scientific、カタログ番号14230237）で実行した。反応混合物（50 μ L）は、20 μ LのPBS-TBP、10 μ Lの黄色ブドウ球菌細胞（10,000細胞）、10 μ Lの抗プロテインA抗体被覆蛍光粒子（ 1.25×10^{10} 粒子/mL）および10 μ Lの抗プロテインA抗体被覆磁気粒子（ 6.25×10^9 粒子/mL）を含んだ。検定反応はピペット操作によりよく混合し、大気温度で30分間暗闇でインキュベートした。インキュベーション後、20 μ Lの反応混合物は、96ウェル半面積直径透明底部黒色プレート（Grainer、カタログ番号675096）に予め等分した70 μ Lの色素クッション溶液（5mg/mL Chromotrope 2R（Sigma-Aldrich、C3143）を含む15% OptiPrep（登録商標）（Sigma、カタログ番号D1556））上に積層した。ウェルの底部で細胞-粒子複合体を選択するために、プレートは次いで磁石上に載せることにより磁気にさらされた。次にプレートは磁石から取り外しハイスループット自動画像分析器に設置された。ウェルは次いで上記の分析器で0.1秒の露光時間で画像化された。個々の蛍光細胞は次にソフトウェアを用いて計数した。特異性対照として、本発明者らは、表皮ブドウ球菌（ATCC株12228）を使用し、該菌は上記と同様な様式でも検定された。

【0322】

結果。図31は、それぞれシグナリング部分としての抗体被覆蛍光粒子および選択部分としての抗体被覆磁気粒子による黄色ブドウ球菌細胞の特異的標識および捕捉を用いる検定結果の非拡大画像である。パネルAは黄色ブドウ球菌細胞が存在しない反応物を含むウェルの画像を示す（陰性対照）。パネルBは4000の黄色ブドウ球菌細胞を含む反応物のウェルの画像を示し、パネルCは40,000の表皮ブドウ球菌細胞を含む反応物のウェルの画像を示す（特異性対照として）。反応混合物が黄色ブドウ球菌細胞を含む場合にのみ多数の個々の蛍光物が画像で観察されたことがデータから明白である（パネルB）。細胞を含まないウェルおよび表皮ブドウ球菌を含むウェルはバックグラウンドを上回るシグナルを生じなかった（パネルAおよびC）。図32は、本明細書に記載する方法が低濃度で個々の細胞標的を検出し計数できることを実証する。

【0323】

結論。本発明に照らして、このデータは、黄色ブドウ球菌細胞の特異的標識および選択ならびに低標的濃度での細胞の計数のための均質な検定（洗浄工程なし）におけるシグナリング部分（抗体被覆蛍光粒子）および選択部分（磁気粒子）の使用を実証する。さらに、非黄色ブドウ球菌細菌（例えば、表皮ブドウ球菌）はバックグラウンドを上回るシグナルを生じず、検定の特異性を示唆するため、検定は高度に特異的である。次の実施例で示されるように、本明細書で用いる捕捉方法および標識方法は、本発明に照らして、捕捉標的を遊離シグナリング部分および他の標識実体から識別する方法と組み合わせ得る。

【0324】

低濃度の標的細胞で、個々の蛍光細胞は+標的画像で識別されソフトウェアにより直接計数され得る。

【0325】

代替態様。他の態様において、核酸染色剤は、検出用に細胞を標識するために使用され得る。または他の種類の非特異的蛍光細胞染色が用いられ得る。標的に特異的な標識は細胞検出を可能にするために使用され得る。例えば、Alexa（登録商標）490で標識した抗プロテインA抗体は標識として使用され得る。さらに、高密度粒子を用いる選択を含む他の選択様式がこの検定で用いられ得る。

【0326】

10

20

30

40

50

実施例18.選択的増殖後に非特異的SYBR（登録商標）Green I染色による、細胞表面抗原プロテインAに特異的に結合する磁気ナノ粒子を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の特異的検出

この実施例において、本発明者らは、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌細胞（MRSA）の迅速な検出のため、増殖中に表現型選択に基づく薬物耐性細菌の検定を記載する。この実施例は、非特異的染色剤を用いた後に特異的標的を検出するために標的的特異的磁気粒子を使用する黄色ブドウ球菌細菌細胞の染色方法を記載する。選択的増殖、ならびにその後の標的的特異的磁気粒子および非特異的染色剤の使用の組み合わせは、差示的増殖後の標的の染色および捕捉により、非拡大画像化を用いて容易に標的を計数でき、細菌の異なる特徴（薬物耐性など）を検出し得るため、本発明に照らして一般的用途を有する。

10

【0327】

この実施例は、薬物耐性細菌がSYBR（登録商標）Green 1色素染色および標的に特異的な磁気粒子を使用する特異的捕捉を用いて容易に検出されることを差示的増殖および非拡大画像化を用いて実証する。

【0328】

該方法は、従って、臨床、産業、および環境試料において低濃度で個々の細胞標的および分子標的を検出し計数するために用いられ得る。

【0329】

この実施例は、黄色ブドウ球菌がSYBR（登録商標）Green 1色素で容易に標識され標的的特異的磁気粒子を用いて特異的に捕捉されることを非拡大画像化を用いて実証する。

20

【0330】

方法。選択的増殖後に非拡大画像化を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の迅速な検出の図式は図33に示される。MRSAは、3つの異なる増殖条件（無増殖、抗生物質なしでの増殖、および抗生物質の存在下での増殖）下で試料アリコートにインキュベートすることに起因する細胞の数を計数することにより検出され得る。非黄色ブドウ球菌、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）、およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の3つの可能な種類の細胞が存在し得る。所与の試料における細胞は上記3つの培地に植菌され、信頼性のあるMRSA細胞の検出のため、幾つかの倍增時間でインキュベートした後、黄色ブドウ球菌の特異的検出を行った。

【0331】

30

選択的増殖。この実験で、本発明者らは、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA:ATCC株29213）、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA:ATCC株43300）、および表皮ブドウ球菌（表皮ブドウ球菌ATCC株12228）を使用した。これらの細胞は、対数増殖期（ $OD_{600}=0.3$ ）に到達するまで任意の抗生物質を含まない増殖培地TSB（Tryptic Soy Broth、Acumedia、カタログ番号7164A）中35℃で2～3時間増殖した。黄色ブドウ球菌/表皮ブドウ球菌細胞はZeiss顕微鏡のPetroff-Hausser血球計算盤を用いて計数し、細胞は未使用のTSBで 1×10^4 細胞/mLに希釈した。それぞれの細胞（100 μ L）は、0.1% w/v ProClin 300（Supelco）を含む100 μ Lの未使用TSB、TSB単独、および6 μ g/mLセフォキシチン（Sigma、カタログ番号C4786）を含むTSBにそれぞれ植菌した。増殖は35℃で4時間24ウェルマイクロタイタープレート（Corning、カタログ番号25820）で実行した。増殖後、これらの試料は下記の通りに検定された。

40

【0332】

検定。検定反応は96ウェルポリカーボネートPCRプレート（Fisher Scientific、カタログ番号14230237）で実行した。反応混合物（50 μ L）は、それぞれの培養試料からの25 μ L培養培地、20 μ LのSYBR（登録商標）Green 1色素（0.9%塩化ナトリウム溶液で1:2000×希釈）およびpH 7.4のPBS-TBPに懸濁された5 μ Lの抗プロテインA被覆磁気粒子（ 2×10^{10} 粒子/mL）を含んだ。検定反応はピペット操作によりよく混合し、大気温度で15分間暗闇でインキュベートした。インキュベーション後、40 μ Lの反応混合物は、96ウェル半面積直径透明底部黒色プレート（Grainer、カタログ番号675096）に予め等分した70 μ Lの色素クッション溶液（5mg/mL Chromotrope 2R（Sigma-Aldrich、C3143）を含む15% OptiPrep

50

(登録商標) (Sigma、カタログ番号D1556)) 上に積層した。ウェルの底部で細胞-粒子複合体を選択するために、プレートは次いで4分間磁石上に載せることにより磁気さらされた。次にプレートは磁石から取り外し、ハイスループット自動画像分析器に設置された。ウェルは次いで上記の分析器で0.1秒の露光時間で画像化された。個々の蛍光細胞は次にソフトウェアを用いて計数した。

【0333】

結果。図34は、SYBR (登録商標) Green 1、および抗体被覆磁気粒子を使用する特異的捕捉を用いたMRSA検定の検定結果を示す。上部のパネル (MSSA) はメチシリン感受性黄色ブドウ球菌細胞 (MSSA) を含むウェルの画像を示し、中間のパネル (MSSA) はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を含むウェルの画像を示し、下部のパネルは表皮ブドウ球菌を含むウェルの画像を示す (陰性対照)。MSSAが唯一のウェル (抗生物質なしの増殖) でしか増殖を示さない一方、MRSAは抗生物質 (6 μ g/mLセフォキシチン) の不在下および存在下での増殖を示すことはデータから明白である。これに反して、表皮ブドウ球菌が使用された場合に細菌は検出されず、MSRA検定の特異性を示唆する。

10

【0334】

結論。このデータは、標識および抗体被覆磁気粒子を用いる細菌細胞の特異的捕捉と組み合わせられた選択的増殖が抗生物質耐性細胞から抗生物質感受性細胞を識別するために使用され得ることを実証する。前実施例で示されたように、本明細書で用いる捕捉方法および標識方法は、本発明に照らして、遊離のシグナリング部分および他の標識実体から捕捉標的を識別する方法と組み合わせられ得る。

20

【0335】

低濃度の標的細胞で、個々の蛍光細胞は+標的画像で識別されソフトウェアにより直接計数され得る。

【0336】

実施例19. 甲状腺刺激ホルモン (hTSH) 試薬の凍結乾燥による個々の試薬の安定化

この実施例は、ヒト甲状腺刺激ホルモン (hTSH) の検出のための凍結乾燥による個々の試薬の安定化を記載する。この実施例で記載する方法は一般的に本発明の他の態様で使用される試薬に適用可能である。

【0337】

検定試薬の安定化は、本発明に記載する検定試薬の保存可能期間および性能を引き延ばす。

30

【0338】

乾燥試薬の長期保管は、試薬のユーザにとって経済的価値があり、試薬が定期的に必要とされないが、バイオテロリスト事件または流行性疾患の発生など、急な必要性が生じる状況に適用される場合に特に重要である。

【0339】

凍結乾燥試薬は、使い捨てカートリッジなどの統合試薬の製造においても使用される。

【0340】

記載の方法は、臨床、産業、および環境試料において低濃度で個々の細胞標的および分子標的を検出し計数するために製造された試薬とともに用いられ得る。

40

【0341】

方法。一つの実験において、hTSH検定成分 (蛍光/磁気粒子および色素-クッション) の個別凍結乾燥は下記の通り実行した。Dura-Stop凍結乾燥機は-45℃まで予め冷却した。色素-クッション試薬10 μ L (下記の変更を加えて実施例7に記載の通り作製:5% w/vトレハロース (Sigma-Aldrich、カタログ番号T9449) が該試薬に含まれた) は、黒色壁384ウェルマイクロタイタープレート (Costar、カタログ番号3544) の特定ウェルの底部で凍結乾燥した。添加後、プレートは大気圧力で-45℃で1時間Dura-Stop凍結乾燥機で凍結し、真空が適用された。プレートは16時間凍結乾燥し、凍結乾燥機は-5℃で4時間、次いで25℃で1時間にした。圧力を放出し、プレートは取り外し、PCRプレートフィルムで密閉し、更なる使用までデシケーターで室温保存した。hTSH粒子試薬の凍結乾燥は下記の通り実行し

50

た。320mM 1,3ジアミノプロパン (Sigma-Aldrich、カタログ番号D230807) を含むpH 7.6 の160mM EPPS (Sigma-Aldrich、カタログ番号E9502) 緩衝液、5% w/v トレハロース (Sigma-Aldrich、カタログ番号T9449) 、0.003% w/v 抗hTSH抗体被覆蛍光粒子の希釈液、および0.08% w/v 抗hTSH抗体被覆磁気粒子の希釈液 (粒子試薬は実施例6に記載の通り調製した) の5 μ L混合物の凍結乾燥球は、液体窒素を含む絶縁ビーカーに5 μ Lの混合滴を正確に送り込むことにより製造した。凍結球は次いで-45℃まで予冷したDura-Stop凍結乾燥機に直ちに置いた。真空が直ちに適用され、球は16時間凍結乾燥し、凍結乾燥機は-5℃で4時間、次いで25℃で1時間にし、更なる使用までデシケーターで室温保存した。

【0342】

凍結乾燥試薬の性能は、未使用の液体試薬および凍結乾燥試薬を用いて実施されるhTSH 10
検定を比較することにより、決定した。2つの異なる標的 (hTSH) 溶液 (62.5pg/mLおよび250pg/mL) は組み換えhTSH (Cell Science、カタログ番号CRT505B) をPBS-TBPに添加することにより作製した。蛍光および磁気抗hTSH抗体被覆粒子 (上記で製造した通り) の凍結乾燥球は、凍結乾燥した色素-クッション試薬 (図35は検定図式を示す) を含む特定のウェルの最上部に設置した。個別の384ウェル黒色壁透明底部マイクロタイタープレート (C 20
ostar) において、10 μ Lの色素クッション試薬 (下記の変更を加えて実施例7に記載の通り:5% w/vトレハロース (Sigma-Aldrich、カタログ番号T9449) が含まれた) は特定のウェルにピペット操作した。インキュベーション後、250pg/mL TSH溶液の5 μ Lアリコートは、320mM 1,3ジアミノプロパン (Sigma-Aldrich、カタログ番号D230807) を含む160mM EPPS (Sigma-Aldrich、カタログ番号E9502) 緩衝液、5% w/v トレハロース (Sigma-Aldrich、 20
カタログ番号T9449) 、0.003% w/v 抗hTSH蛍光粒子の希釈液、および0.08% w/v 抗hTSH磁気粒子の希釈液の5 μ L混合物に添加し、96ウェルポリカーボネートPCRプレート (Fisher Scientific、カタログ番号14230237) の特定ウェルで10分間インキュベートした。インキュベーション後、7.5 μ Lのこの混合物は液体色素-クッションウェルの上に積層した。液体試薬のインキュベーション中、20 μ Lの62.5pg/mL hTSH溶液は、凍結乾燥試薬の特定ウェルの最上部に慎重にピペット操作した。プレートは次いでプレートを棒磁石上に5分間設置することにより磁気に曝した。プレートは次にハイスループット分析自動分析器に設置した。ウェルは次いで0.1秒の露光時間で分析器で画像化した。

【0343】

結果。図36 (最上部) は、液体試薬ウェル (液体試薬は100%回収として割り当てられた) と比較した凍結乾燥試薬ウェルにおけるhTSHの回収率を示唆する棒グラフを示す。図 30
36 (底部) は、検定が液体試薬および凍結乾燥試薬を用いて実施された場合の代表ウェルの非拡大画像を示す。凍結乾燥試薬を用いたhTSHの回収は検定の実験誤差を含んで液体試薬と同様であり、類似の性能を示唆する。

【0344】

結論:データは、凍結乾燥試薬がhTSHの検定で使用でき液体試薬と同様に機能することを実証する。本発明は、本発明の有用性を広げる凍結乾燥試薬を用いて実践され得る。

【0345】

実施例20. 個々の試薬の安定化-層状に付着した黄色ブドウ球菌の検出用試薬の凍結乾燥

この実施例は、凍結乾燥による層状に付着した黄色ブドウ球菌の検出用試薬の安定化を 40
記載する。この実施例で記載する方法は一般的に本発明の他の態様で使用される試薬に適用可能である。

【0346】

検定試薬の安定化は、本発明に記載する検定試薬の保存可能期間および性能を引き延ばす。

【0347】

乾燥試薬の長期保管は、試薬のユーザにとって経済的価値があり、試薬が定期的に必要ではないが、バイオテロリスト事件または流行性疾患の発生など、急な必要性が生じる状況に適用される場合に特に重要である。

【0348】

凍結乾燥試薬は、使い捨てカートリッジなどの統合試薬の製造においても使用される。

【0349】

記載の方法は、臨床、産業、および環境試料において低濃度で個々の細胞標的および分子標的を検出し計数するために製造された試薬とともに用いられ得る。

【0350】

方法。この実施例はともに層状の試薬を凍結乾燥することにより試薬を安定化する別の方法を示す(図37)。この実験において、黄色ブドウ球菌細菌細胞の検出用試薬は層状に凍結乾燥する。Dura-Stop凍結乾燥機は-45℃まで予冷した。色素-クッション試薬(2mg/mL Chromotrope R2 (Sigma-Aldrich、カタログ番号C3143)および5% w/vトレハロース (Sigma-Aldrich、カタログ番号T9449)を含む10% v/v Optiprep (登録商標) (Sigma-Aldrich、D1556))のアリコート(65 μL)は、検定ウェルにピペット操作した。プレートは凍結乾燥機に設置し、試薬層は1時間凍結させた。検定ウェルは次いで凍結乾燥機から取り外し、25 μLの完全試薬混合物(0.9%塩化ナトリウムで1対2000に希釈したSYBR (登録商標) Green 1 (Invitrogen、カタログ番号S-7563)、0.005% w/vニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA磁気粒子(実施例4に記載の通り製造)を含むpH 7.4のTBS-TBP)は凍結させた色素クッション層の最上部に慎重に積層した。検定ウェルは次いで直ちに凍結乾燥機に戻し1時間凍結させた。真空が適用され、ウェルは-45℃で16時間凍結乾燥した。次に、温度は-5℃で6時間、続いて25℃で2時間設定した。終了時に、凍結乾燥機は停止し、真空解除した。ウェルは取り外し、PCRフィルムで覆い、更なる使用までデシケーターで保存した。

【0351】

凍結乾燥試薬の性能は、未使用の液体試薬および凍結乾燥試薬を用いて実施される黄色ブドウ球菌検定を比較することにより決定した。黄色ブドウ球菌(ATCC株29213)の培養物は対数増殖期($OD_{600}=0.3$)に到達するまで35℃で2時間増殖培地TSB(Tryptic Soy Broth, Acumediaカタログ番号7164A)で増殖させた。黄色ブドウ球菌細胞はZeiss顕微鏡のPetroff-Hausser血球計算盤で計数し、細胞は未使用のTSBで 2×10^5 細胞/mLに希釈した。反応は96ウェルポリカーボネートPCRプレート(Fisher Scientific、カタログ番号14230237)で実行した。反応混合物(50 μL)は、25 μLの黄色ブドウ球菌細胞(5,000細胞)PBS-TBP(または陰性対照として無細胞)、20 μLのSYBR (登録商標) Green 1色素(0.9%塩化ナトリウムで1:2000×希釈)およびpH 7.4のPBS-TBPに懸濁した5 μLのニワトリ抗プロテインA抗体被覆磁気粒子(2×10^{10} 粒子/mL)を含んだ。検定反応はピペット操作によりよく混合し、大気温度で15分間暗闇でインキュベートした。インキュベーション後、40 μLの反応混合物は、96ウェル半面積直径透明底部黒色プレート(Grainer、カタログ番号675096)に予め等分した70 μLのクッション溶液(5mg/mL Chromotrope 2R (Sigma-Aldrich、C3143)を含む15% OptiPrep (登録商標) (Sigma、カタログ番号D1556)からなる)上に積層した。乾燥試薬検定のため、120 μLの黄色ブドウ球菌細胞(5,000細胞)PBS-TBP(または陰性対照として無細胞)は凍結乾燥試薬とともに特定ウェルの最上部に添加し、ウェルは大気温度で15分間暗闇でインキュベートした。ウェルの底部で細胞-粒子複合体を選択するために、プレートは次いで磁石上に4分間設置することにより磁気に曝した。プレートは次いで磁石から取り外し、ハイスループット自動画像分析器に設置された。ウェルは次いで上記の分析器で0.1秒の露光時間で画像化された。個々の蛍光細胞は次にソフトウェアを用いて計数した。

【0352】

結果。図38(最上部)は、液体試薬ウェルと比較した凍結乾燥試薬ウェルにおける黄色ブドウ球菌の総数を示唆する棒グラフを示す。図38(底部)は、検定が凍結乾燥試薬を用いて実施された場合の代表ウェル(黄色ブドウ球菌細胞の有無)の非拡大画像を示す。凍結乾燥試薬を用いた黄色ブドウ球菌細胞の総数は検定の実験誤差を含んで液体試薬と同様であり、類似の性能を示唆する。

【0353】

結論。結果は、ともに層状に凍結乾燥した試薬が液体試薬と同様に機能し得ることを実

10

20

30

40

50

証する。本発明は、本発明の有用性を広げる凍結乾燥試薬を用いて実践され得る。

【0354】

代替態様。温度および時間などの凍結乾燥条件は調整でき、上記に列挙されるものに加えて種々の試薬が同様の処理を受け得る。あるいは試薬は、蒸発により（実施例19および20）または蒸着により乾燥され得る。例えば、上記の通り混合した試薬は、高温のオープンに、または水蒸気は相対湿度の差異により蒸気形態で漏出し得る室温以下で設置され得る。あるいは、試薬は試薬から水分を除去するために乾燥チャンバーに設置し得る。液体および固体の組み合わせが用いられ得る。

【0355】

実施例21. 選択される標的シグナリング部分複合体の画像化および動きの組み合わせによるビオチンの特異的検出

10

上記の実施例8~17は、遊離シグナリング複合体および非標的と結合した非選択シグナリング複合体から「バックグラウンド」シグナルを減らすために、シグナリング部分、選択部分、および色素-クッション試薬の使用を通して、特異的に標的を、および低濃度または小数の標的を画像化および検定する方法を記載する。

【0356】

これらの方法は洗浄工程なしで一容器において実施され得る。この実施例は、選択工程後のバックグラウンドを更に減らす方法を記載する。この実施例において、磁気選択部分は画像表面の方向に平行な方向に動き、順次画像化される。真のシグナリング部分-標的-選択部分複合体のみが動き、選択力の位置が変化する。より長い露光で撮られた画像の使用を通して、または一連の画像を通して、真のシグナリング部分-標的-選択部分複合体の動きは筋即ち「彗星」として見られ得る。画像領域に存在する遊離シグナリング部分および選択されない非標的シグナリング部分標的複合体は、無秩序に動くまたは全く動かない。該動きへの正確な応答を示す物体だけが画像分析ソフトウェアにより真のシグナル物体として計数される。

20

【0357】

記載の方法は、臨床、産業、および環境試料において低濃度で個々の細胞標的および分子標的を検出し計数するために製造された試薬とともに用いられ得る。

【0358】

方法。ストレプトアビジン磁気粒子は下記の変更を加えて実施例4に記載する方法を用いて製造した。ストレプトアビジン（Thermo Pierce、カタログ番号21122）が抗体の代わりにコンジュゲートし、カルボキシル化400nm磁気粒子を使用した（Merck EMD、カタログ番号M1030/40/7283）。蛍光ビオチン被覆（1 μ M）粒子はpH 7.4のPBS-TBP溶液にストレプトアビジン磁気粒子に対して数倍の割合で混合し、15分間インキュベートした。複合体はPBS-TBPで洗浄し、1mL当たり400,000のFluor複合体の最終濃度まで希釈した。この溶液は次いで40mg/mL Chromotrope 2R（Sigma-Aldrich、カタログ番号C3143）溶液と混合し、Kovaプラスティックスライドに搭載した。スライドは緑色蛍光フィルターを備えたZeiss倒立顕微鏡で画像化された。ネオジム磁石はスライド下で移動し画像は長露光で記録した。

30

【0359】

結果。選択複合体の動き（即ち、「彗星」）の画像は図39に示す。選択されないバックグラウンド蛍光の無運動に対する選択されたシグナリング-標的-選択部分複合体の動きを実証する。

40

【0360】

結論。画像は、検出の特異性を増加する非選択バックグラウンド蛍光物体から選択されたシグナリング-標的-選択部分複合体を識別する記載方法の能力を実証する。本発明のこの態様は洗浄せずに非拡大画像化で計数標的の特異性を向上し得る。

【0361】

代替態様。選択力の動きが、画像表面に平行した2次元平面で複数方向であり得る他の態様。

【0362】

50

他の態様において、例えば、蛍光、化学発光、光吸収、光散乱、リン光、酵素反応およびラマン散乱など、異なるシグナル特徴が用いられ得る。

【0363】

他の態様は、例えばフルオレセイン二酢酸（フルオレセインエステラーゼ基質）、SYBR（登録商標）Green（蛍光DNA染色剤）、スーダンブラック（脂質染色）、不溶性産物を得る酵素基質、ポリスチレン粒子、蛍光色素を含むポリスチレン粒子、コロイド金など、異なるシグナリング部分も用い得る（異なるシグナリング特徴をもつ）。

【0364】

これらの他の態様において、他の色素は異なるシグナリング特徴と使用する部分とを合致するために使用できる。

【0365】

使用され得る異なるカテゴリー標識部分は、抗体（様々な免疫グロブリン型を含む）および他のタンパク質（例えば、レクチン、ホルモン受容体など）、オリゴヌクレオチドおよびこれらの合成類似体（例えばペプチド核酸、アプタマーなど）、オリゴ糖（例えば、ヘパリンなど）、有機ポリマー（例えば、硫酸デキストランなど）ならびに小分子（例えば薬、非ペプチドホルモン、ビオチン、色素など）を含むがこれらに限定されない。

【0366】

選択はカテゴリー内の特異的標的の選択を通して特異的であり得る（例えば、鼻試料の血液または黄色ブドウ球菌細胞から得られるhTSHの選択）。検定は標的の標識カテゴリーの選択を通して特異的であり得る（例えば、ヒト血漿から得られるリポタンパク質の選択）。

【0367】

記載される方法は、細胞、ウイルス、細胞小器官、リポタンパク質、ならびにタンパク質、オリゴヌクレオチド、脂質、オリゴ糖、および有機および無機の小分子を含む分子を含み得るがこれらに限定されない標的の検出で用いられ得る。

【0368】

該方法は、全血、血漿、糞便、廃水、乳、などを含む複合体マトリクスを用いて試料に適用可能である。

【0369】

試料はまた選択前に処理され得る。例えば、細胞はメタノールで固定され得る。DNAは抽出精製され得る。通常血清因子と結合することが見出されるホルモン、タンパク質およびビタミンは遊離でき、ならびに他の処理による。試料は、標識後にも選択され得る。例えば、標的は選択前にシグナリング部分複合体で予め標識され得る。

【0370】

実施例22. 黄色ブドウ球菌細菌細胞の特異的検出のためのSYBR（登録商標）Green標識およびニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインAを用いた光退色の利用

低濃度または小数の標的の検出は、シグナリング部分-標的-選択部分複合体の特異的検出を必要とする。この実施例は、黄色ブドウ球菌細胞の特異的検出を増強するために、SYBR（登録商標）Greenの光退色およびニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインAで標識された黄色ブドウ球菌細菌細胞の使用方法を記載する。

【0371】

該方法は、光退色に対して蛍光DNA染色に対する蛍光粒子からの蛍光シグナルの相対的安定性を利用する。

【0372】

方法の概要は図40の図に示す。標的は2つの異なるシグナリング部分（これらは光退色に対する感受性において相違する）および磁気選択部分で標識される。複合体は磁気選択され画像化される。試料は、シグナリング部分の一つが光退色する十分な時間感光させる。第2の画像を撮る。機器ソフトウェアは次いで画像分析を実行し、シグナルが光退色される画素に近接する画素にあるシグナリング部分のみがシグナリング事象として計数される。

10

20

30

40

50

【0373】

記載の方法は、臨床、産業、および環境試料における低濃度の個々の細胞標的および分子標的を検出および計数するために、上記実施例に記載する発明の他の態様とともに用いられ得る。

【0374】

方法。黄色ブドウ球菌（ATCC株29213）の培養物は対数増殖期（ $OD_{600}=0.3$ ）に到達するまで35℃で2時間TSB増殖培地（Tryptic Soy Broth、Acumedia、カタログ番号7164A）で増殖させる。反応は96ウェルポリカーボネートPCRプレート（Fisher Scientific、カタログ番号14230237）で実行する。反応混合物（50 μ L）は、25 μ Lの黄色ブドウ球菌細胞（5,000細胞）を含むPBS-TBPまたはPBS-TBP単独（細胞なし）、0.005% w/vニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA蛍光粒子（実施例3に記載）と混合した20 μ LのSYBR（登録商標）Green 1色素（生理食塩水で1:2000×希釈）、およびPBS-TBP溶液に懸濁した5 μ Lの0.005% w/vニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA磁気粒子（実施例4に記載の通りに製造）を含有する。検定反応はピペット操作によりよく混合し、大気温度で15分間暗闇でインキュベートする。インキュベーション後、40 μ Lの反応混合物は、96ウェル半面積直径透明底部黒色プレート（Grainer、カタログ番号675096）に予め等分した70 μ Lの色素クッション溶液（15% OptiPrep（登録商標）（Sigma、カタログ番号D1556からなる）および5mg/mL Chromotrope 2R（Sigma-Aldrich、C3143）に積層する。ウェルの底部で細胞-粒子複合体を選択するために、プレートは4分間磁石上に載せることにより磁気にさらされる。プレートは磁石から取り外しハイスループット自動画像分析器に設置される。ウェルは画像化され、光退色し、分析器で再度画像化される。第1の画像は0.1秒の露光時間で撮られ；プレートはSYBR（登録商標）Greenを光退色させるためにそれぞれ1秒間2回照射され；次いで0.1秒の露光時間で再度画像化される。画像分析ソフトウェアは、光退色したシグナル部分に近接するシグナル部分を計数する。この実施例において、これはSYBR（登録商標）Greenで標識された黄色ブドウ球菌細胞に近接するニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA蛍光粒子のみを含むであろう。

【0375】

結論。この実施例は、光退色と画像分析との組み合わせによる検定の特異的シグナルの検出を実証する。洗浄せずに標的の非拡大画像化を用いた本発明の光退色の利用は、検定において干渉物質からの干渉を減じ、特異的な結果を生じる。

【0376】

代替態様。この実施例の方法は、光退色に対する感受性において相違する任意の蛍光標識対に適用され得る。特異的な標識は、シグナリング部分の対において光退色に耐性あるいは感受性のある部分を表し得る。

【0377】

異なるカテゴリー標識部分は、抗体（様々な免疫グロブリン型を含む）および他のタンパク質（例えば、レクチン、ホルモン受容体など）、オリゴヌクレオチドおよびこれらの合成類似体（例えばペプチド核酸、アプタマーなど）、オリゴ糖（例えば、ヘパリンなど）、有機ポリマー（例えば、硫酸デキストランなど）ならびに小分子（例えば薬、非ペプチドホルモン、ビオチン、色素など）を含むがこれらに限定されない。

【0378】

実施例23.黄色ブドウ球菌細菌細胞の特異的検出のためのSYBR（登録商標）Green標識を用いた光退色の利用

低濃度または小数の標的の検出は、シグナリング部分-標的-選択部分複合体の特異的検出を必要とする。この実施例は、非特異的バックグラウンドに対して真のシグナリング部分-標的-選択部分複合体の特異的検出を増強するために、SYBR（登録商標）Greenで標識された黄色ブドウ球菌細菌細胞の光退色の利用方法を記載する。

【0379】

該方法は、光退色に対する幾つかの標識方法の感受性を利用した。非拡大画像化を用いて画像化された蛍光シグナリング部分を計数することによる蛍光検出は蛍光デブリによる

バックグラウンドを有し得る。この方法により、特異的シグナルの光退色を利用することにより蛍光デブリを検出でき、非特異的蛍光シグナルを同定する。

【0380】

方法の概要は図41の図に示す。標的はシグナリング部分および磁気選択部分で標識された。複合体は磁気選択され画像化された。次いで試料は、シグナリング部分が光退色するのに十分な時間感光させた。第2の画像を撮った。機器ソフトウェアは次いで第2画像が第1画像から差分される画像分析を実行する。残存するシグナリング部分（光退色された）は次いで特異的シグナルとして計数される。

【0381】

記載の方法は、臨床、産業、および環境試料における低濃度の個々の細胞標的および分子標的を検出および計数するために、上記実施例に記載する発明の他の態様とともに用いられ得る。

【0382】

方法。黄色ブドウ球菌（ATCC株29213）の培養物は対数増殖期（ $OD_{600}=0.3$ ）に到達するまで32.5℃で2時間TSB増殖培地（Tryptic Soy Broth、Acumedia、カタログ番号7164A）で増殖させた。反応は96ウェルポリカーボネートPCRプレート（Fisher Scientific、カタログ番号14230237）で実行した。25 μ Lの黄色ブドウ球菌細胞（5,000細胞）を含むPBS-TBPまたはPBS-TBP単独（細胞なし）、20 μ LのSYBR（登録商標）Green 1色素（生理食塩水で1:2000×希釈）を含む反応混合物（50 μ L）は混合し、5 μ Lの0.005% w/vニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA磁気粒子（実施例4に記載の通りに製造）はPBS-TBP溶液に懸濁した。検定反応はピペット操作によりよく混合し、大気温度で15分間暗闇でインキュベートした。インキュベーション後、40 μ Lの反応混合物は、96ウェル半面積直径透明底部黒色プレート（Grainer、カタログ番号675096）に予め等分した70 μ Lのクッション溶液（15% OptiPrep（登録商標）Sigma、カタログ番号D1556からなる）および5mg/mL Chromotrope 2R（Sigma-Aldrich、C3143）に積層した。ウェルの底部で細胞-粒子複合体を選択するために、プレートは磁石上に載せることにより磁気選択にかけた。プレートは磁石から取り外し、非拡大画像化を用いるハイスループット自動画像分析器に設置した。ウェルは次いで0.1秒の露光で画像化され、プレートを1秒間に2回照射した後0.1秒分析器で再び画像化することにより光退色させた。画像分析ソフトウェアは次いで第1画像から第2画像を差分した。残存するシグナル部分は黄色ブドウ球菌細菌細胞として計数した。

【0383】

結果。図41の画像は該方法を実証する。第1画像は初期画像であり、第2画像は光退色後の画像であり、最後の画像は画像1から差分された画像2のソフトウェア作成画像であり、光退色し特異的に標識されたSYBR（登録商標）Green標識黄色ブドウ球菌を示す。画像は大きな蛍光デブリがデータから差分されたことを示す。

【0384】

結論。この実施例は、光退色と画像分析との組み合わせによる検定の非特異的シグナルの除去を実証する。洗浄せずに標的の非拡大画像化を用いた本発明の光退色の利用は、検定において干渉物質からの干渉を減じ、特異的な結果を生じる。

【0385】

代替態様。この実施例の他の態様は異なる順序の事象を含む。試薬を含んだ検定ウェルは選択工程前にまず光退色、続いて選択および非拡大画像化を行う。この態様は、干渉物質が光退色し得る場合に用いられ得る。

【0386】

実施例24. 標的を検出するための自動画像化分析器

概観。この実施例は自動分析器における本発明の自動性能を実証する（図43、44）。分析器は画像ウェルを含むカートリッジに対応し（図42）、磁気選択を用いて、標識標的選択部分の複合体を画像ウェルの検出表面上に沈着させる。分析器は、個々の標識標的複合体を画像化するためのCMOSカメラを内蔵し、試料容器運搬、インキュベーション、焦点合わせ、画像分析、および結果報告のためのソフトウェアおよびハードウェアを有する。分

析器は1時間当たり40試料までの処理能力を有し、大量の臨床検査の適用に有用である。食品加工および獣医検査の適用にも用いられ得る。

【0387】

記載。分析器は多量の試料容器に対応するために2つのキューを有する（図43、44）。キューは1ないし8の試料容器のスタックに対応するように設計される。スタックがいずれかの入力キュー開口部に設置される場合、光電子センサー（Omron、光電子逆反射センサーE3T-SR21）は始動し、ステッパーモーター（Arcus、DMAX-KDRV-23）を駆動させるため制御ソフトウェアに信号を送り、スタックを処理用分析器に移す。

【0388】

スタックがいずれかのキューで処理される状態にある場合、分析器はまずスタックの最上部の試料容器を処理する。スタックの最上部はガントリーロボット（図44）に搭載された光電子センサー（Omron、光電子逆反射センサーE3T-SR21）で見つけられる。ロボットはそれぞれのキューを走査し、最大スタック高でセンサー開始し、試料容器がセンサーを始動させるまで下方移動する。一度見つけると、ガントリーロボットは最上部の試料容器を取り外す。

【0389】

該システムにおける試料容器の移動は3つのモーターシステムにより達成される（図43、44）。これらのシステムは、入力システム、主要ガントリーシステム、および撮像装置ガントリーシステムと呼ばれる。各システムは以下に詳細に記載する。該システムは独立操作でき、時折、特定の操作に同期化を要する。

【0390】

入力システムは、上記のステッパーモーター（Arcus、DMAX-KDRV-23）を原動力とする単一のコンベヤーベルトからなる（図43、44）。ベルトは初期エントリーポイントからガントリーロボットのピックアップ用に指定された空間まで試料容器を移動させる。前の試料容器が既にピックアップ位置にある場合、新しい試料容器はその前方の使用容器と接触するまでベルトと移動する。その地点で、ベルトは、ピックアップ位置に待ち行列に入れられた試料容器下で滑走した。

【0391】

3つのステッパーモーター（Arcus、DMAX-KDRV-17）はガントリーシステムに存在した（図44）。各モータは異なる長さのリニアステージ（Automation Solutions、DL20DW-XZ）と接続される。最長ステージはガントリーY（左右）の方向を制御した。このステージは基板に固定される。ガントリーX（前後）の方向を制御する最短ステージはYステージプラットフォームに固定される。ガントリーZ（上下）の方向を制御するために用いるステージはXステージプラットフォームに固定される。一対のフォークがZステージに固定される。フォークは、試料容器で成型される特徴をもつアラインメントを可能にする特徴を有する（図42）。また、Zステージプラットフォームに固定されるのは光電子センサー（Omron、光電子逆反射センサーE3T-SR21）である。センサーは、上記の通り、スタックの高さを測定するために用いられる。

【0392】

ガントリーは、XおよびZステージを調整することによりフォークを用いて試料容器を受け取る。一度試料容器がフォークに支持されると、Xステージは後方に移動しYステージに認可を与える。この位置で、Yステージは、分析器内で構造物と衝突することなく、試料容器を任意の処理用ステーションに移動させ得る。

【0393】

撮像装置ガントリーシステムは2つのリニアステージ（Automation Solutions、DL20DW-XZ）に付着した2つのステッパーモーター（Arcus、DMAX-KDRV-17）からなる。長い方のステージは撮像装置Xステージと呼ばれる。このステージは撮像装置ガントリーの前後の動きを制御した。撮像装置Xステージに付着するのは撮像装置Zステージであり、これは撮像装置ガントリーの垂直の動きを制御した。Zステージに付着するのは、試料容器の類似アラインメント特性と一致するアラインメント特性をその表面上に有するプラットフォーム

である（図43、44）。

【0394】

撮像装置Zは、ファインピッチのねじ機構を有することにより他のステージと異なった。これは分析器の他のステージの50ミクロン解像度と対照的に、5ミクロンの解像度を有する。この差異により、高精度焦点の調整および反応検定を開始する高さの微調整を可能にする。これらの特性は以下に詳細に記載する。

【0395】

試料容器が主要ガントリーロボットにより入力位置から受け取られた後、バーコードリーダー（Microscan、MS1）に搬送される。試料容器の1Dバーコードは、ロット番号、試験型、および試験パラメータを含む情報をコードした。読み取り時に、制御プログラムは、試料容器を追跡し分析結果を保留するためのデータ構造に情報を保存した。

10

【0396】

2種類のインキュベーションがこの分析器で行われる。試料増殖用の固定温度インキュベーションおよび検定反応用の大気温度インキュベーションである。試料容器のバーコードが走査された後に、試料の増殖ウェルへの開始が起きる。主要ガントリーロボットは試料容器を撮像装置ガントリープラットフォームに移動させる（図44）。ガントリーが試料容器をプラットフォーム上に設置した後、撮像装置ガントリーは、試料容器上のプランジャーキャップ（図42）が撮像装置Zステージの最上部の機能により押圧されるまで、画像プラットフォームを上げる。プランジャーを押し下げることにより、液体試料が試料投入容器から増殖チャンバーへ動員され、増殖試薬は凍結乾燥された。次に、試料容器は主要ガントリーロボットにより搭載固定温度インキュベーターに設置される（図43、44）。試料容器は35℃で4時間インキュベートし細菌細胞を増殖し得る。

20

【0397】

インキュベーターは機械加工品から構成される棚からなる（最上部、底部、左、右、後側、および前側）。棚の底部は試料容器の底部の特性と一体化される特性を含む（図43、44）。インキュベーター壁は、インキュベーターを4つのチャンバーに分割した絶縁性発泡体を用いて構築される。インキュベーターの背面壁は4つのチャンバーの前に4つの機械加工ドアを固定する形状である。ドアは作動装置（Firgelli、L12-50-100-12-1）により開閉する。インキュベーターの加熱はインキュベーターの外側上下部にわたって加熱ストリップ（OMEGA、SRFG-310/10-P）を用いた。加熱ストリップ、および任意の露出外表面は、ドアを除いて、絶縁発泡体で被覆した。

30

【0398】

増殖インキュベーションが完了した後に検定が開始する。主要ガントリーロボットは増殖インキュベーターから試料容器を取り外し、撮像装置ガントリープラットフォームに移動させる（図44）。ガントリーは試料容器をプラットフォーム上に設置した後、撮像装置ガントリーは、試料容器のプランジャーキャップ（図42、44）が撮像装置Zステージの最上部の特性により完全に押圧されるまでプラットフォームを上げることにより検定を開始する。プランジャーに2回押圧することにより、液体試料は増殖チャンバーから検定試薬が凍結乾燥された画像化チャンバー内への移動を強いられる。液体が画像化チャンバーに入り次第、試薬は再水和し、検定反応が始まる。撮像装置ガントリーはピックアップ位置に戻り、主要ガントリーロボットは試料容器を反応インキュベーションステーションに移動させる。このインキュベーションは15分間持続し室温で生じる。

40

【0399】

反応インキュベーターは15棚のシステムからなる。個々の棚は位置決めアラインメント用の試料容器の底部の特性と一体化する特性を有する。

【0400】

反応が終了した後、標的の選択は磁気選択により生じる。主要ガントリーロボットは試料容器を棚から磁石ステーションに移動させる（図43、44、46）。磁気選択は主要ガントリーが試料容器を画像化プラットフォームに移動させる前に5分間実施される。図44に示されるように、磁気捕捉ステーションは2つの同一な磁石組立品からなる。組立品は、図4

50

6に示されるように、希土類元素の固体型磁石（ネオジム-鉄-ホウ素N48 NdFeB、22×22×100mmバー）を含有した。これにより、重複期間中に2つの試料について磁気選択ができる。

【0401】

磁気選択後、画像化が実施される。画像化サブシステム（図45）は蛍光シグナリング部分と連動するよう設計される。シグナリング部分は約475ナノメートル波長に集中する通過帯域フィルターを通してフィルターにかけられる青色光で励起される。放射光は、波長約535ナノメートルに集中する通過帯域フィルターを通して光をフィルターにかけた後、収集される。放射構成要素、検出光学、およびカメラは全て画像組立品の試料容器に配置される（図44）。

10

【0402】

磁気捕捉が終了した後、主要ガントリーロボットは試料容器を磁石ステーションから撮像装置ガントリーロボットに移動させる（図44）。撮像装置ガントリーロボットは距離センサー（Keyence、LK-G37）を介して試料容器を移動させた。それぞれの画像壁への距離が測定され、焦点距離は計算される。撮像装置ガントリーロボットは、各ウェルの8ビットグレースケールを取得するCMOSカメラ（Mightex、BCN-B013）の上に配置される。それぞれのウェルは10回画像化され合計され、より高いビットのグレースケール分析用画像をもたらす。

【0403】

画像分析は搭載ソフトウェアを用いて行う。一度分析が終了すると、撮像装置ガントリーロボットが試料容器を排出システムに移動させる。試料容器は次いでプラットフォームからバイオハザード廃棄物容器へと押し出される（図43）。一度データが分析されると、結果は、カートリッジ情報に沿って、コンピュータに保存され、プリントされ（Seiko、DPU-30）、LCDタッチスクリーンモニター（AEI、ALCDP7WVGATS）に表示される（図43）。

20

【0404】

システムはUbuntu Linux 2.6を作動するシングルスモールボードコンピュータ（Ampro、RB800R）により制御されるよう設計される。全ての構成要素は、直接または制御ボードを介してコンピュータに接続されている。コンピュータに直接接続される構成要素は、モータ制御器（Gralil、DMC-2183-DC24-DIN）、LCDモニター（AEI、ALCDP7WVGATS）、CMOSカメラ（Mightex、BCN-B013）、距離センサー（Keyence、LK-G37）、およびプリンター（Seiko、DPU-30）を含む。モータ制御器を介して接続される構成要素は、光電子センサー（Omron、E3T-SL22）、主要ガントリーおよび撮像装置ガントリー用のステッパーモーター（Arcus、DMAX-KDRV-17）、入力室コンベヤー用のステッパーモーター（Arcus、DMAX-KDRV-23）、ならびにLED（Lumileds、LXHL-PB09）を含む。

30

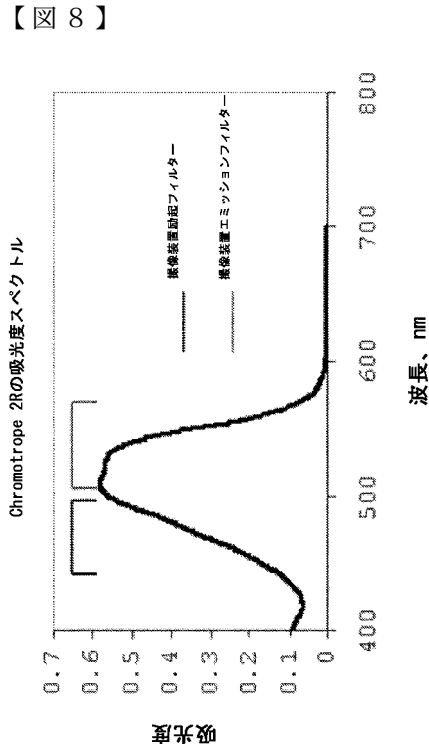
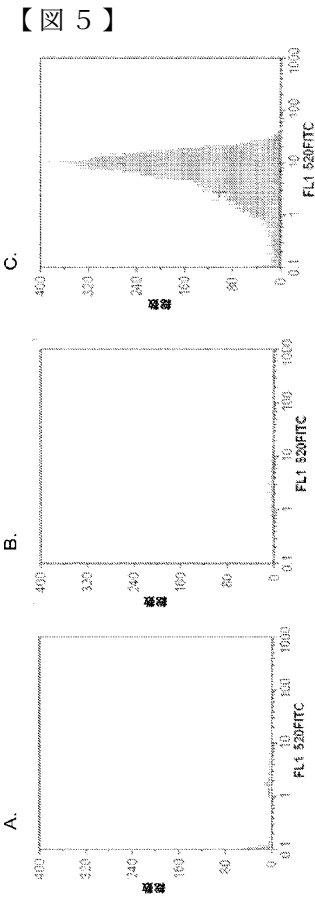
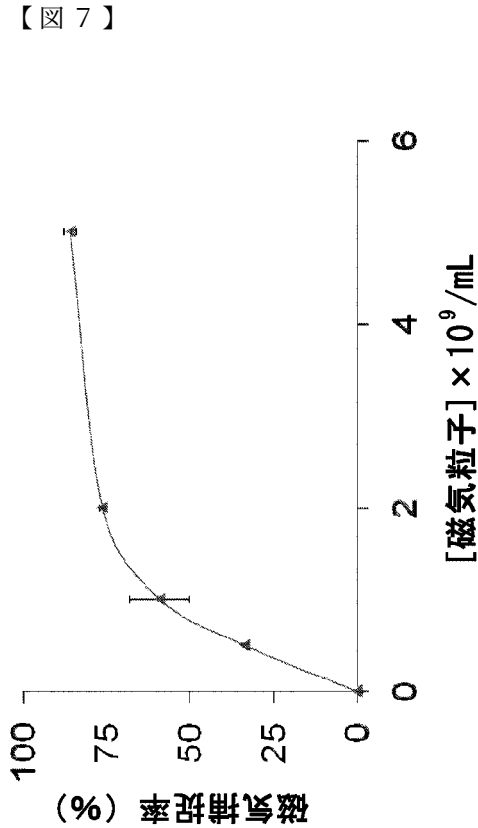
【0405】

結果。図47は実施例16の方法およびこの実施例の自動画像分析器（図43、44）を用いて図42に示されるカートリッジにおける個々の標識黄色ブドウ球菌細胞の検出を示す。

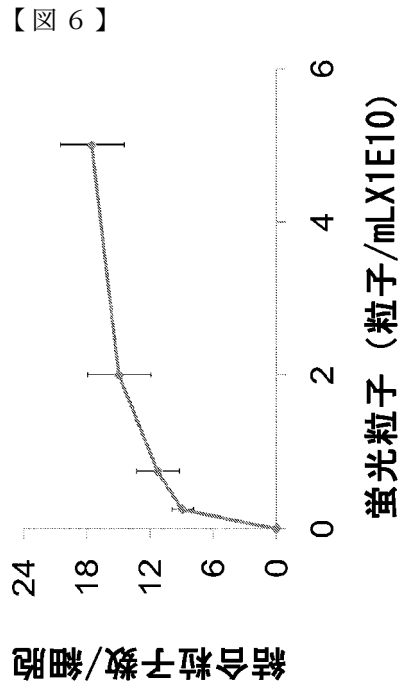
【0406】

結論。この分析器はユーザの最小相互作用で自動的に試料容器を処理し得る。試料容器は、オンデマンドの処理、試料増殖、非拡大画像化および統合廃棄物処理を支持する分析器と相互作用する。分析器により、拡大化せずにCMOSカメラを用いてシグナリング部分および選択部分に結合した個々の標的を検出できる。

40

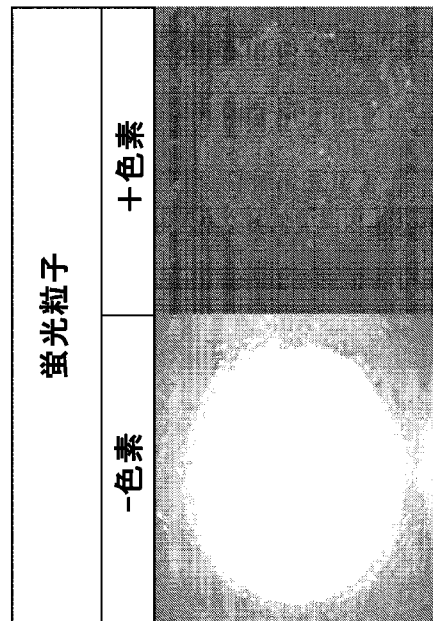


Chromotrope 2R色素は撮像装置で用いられる励起フィルター
およびエミッションフィルターの通過光に対応する波長の光を
吸収する。(実施例5)



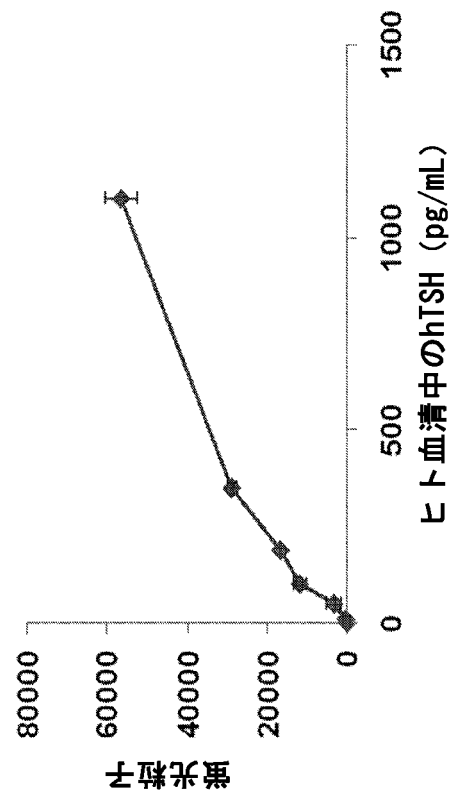
フローサイトメトリーによる黄色ブドウ球菌に特異的な
蛍光粒子の結合効率の測定 (実施例3)

【図 9】



色素は蛍光粒子からのシグナルを減衰させるために使用される。
(実施例5)

【図 10】



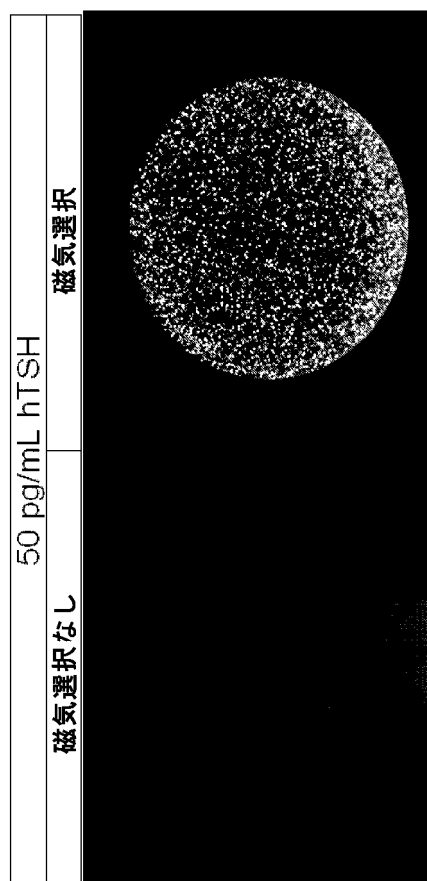
磁気捕捉および色素を用いたヒト血清におけるヒト甲状腺刺激ホルモン (hTSH) の検定 (実施例5)

【図 11】



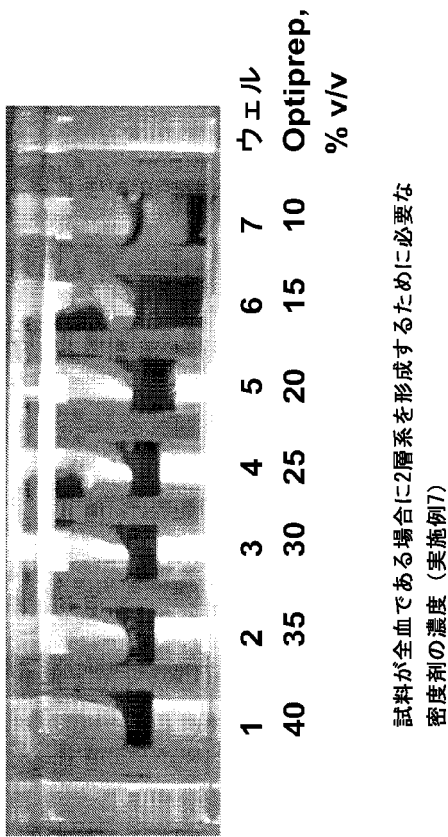
ヒト甲状腺刺激ホルモン検定試薬を用いた色素およびクッションの効果を証明する色素-クッション試薬の試験 (実施例6)

【図 12】

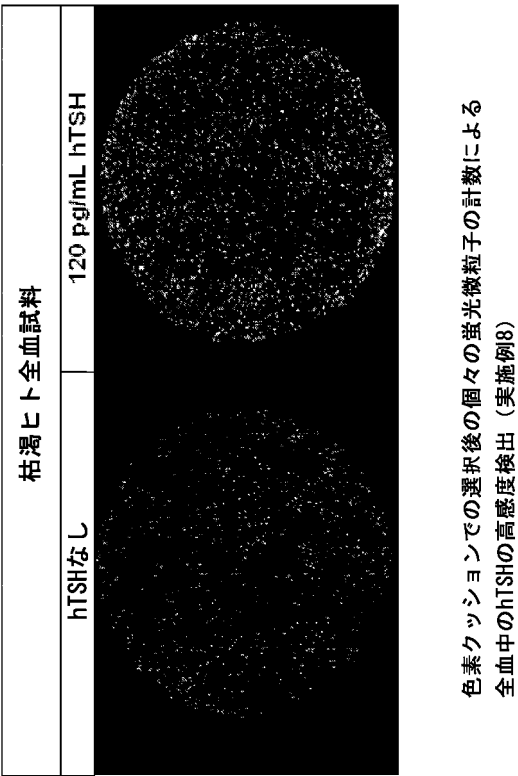


TSH検定試薬を用いた色素およびクッションの効果を証明する色素クッション試薬の試験。hTSHに関する磁気選択実験 (実施例6)

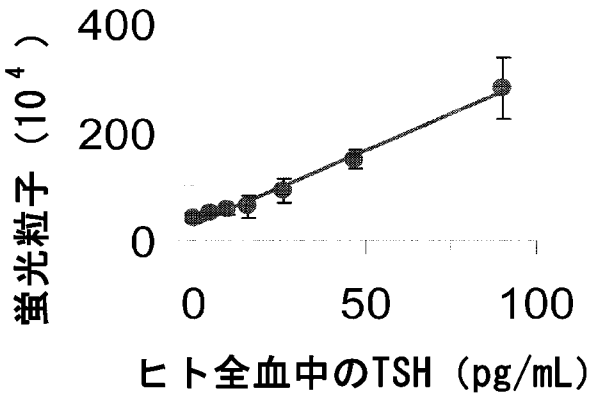
【図 1 3】



【図 1 4】

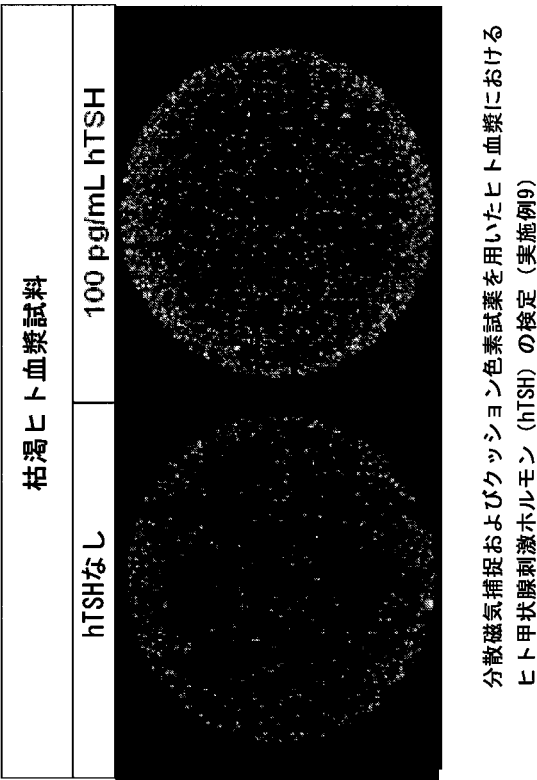


【図 1 5】

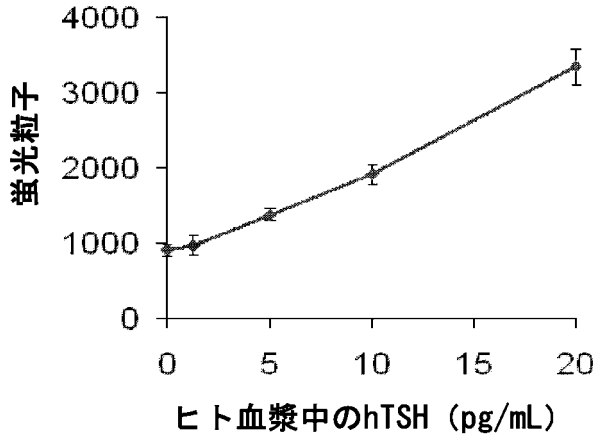


磁気捕捉、クッション色素試薬、磁性担体を用いた
ヒト全血におけるヒト甲状腺刺激ホルモン (hTSH) の検出
(実施例8)

【図 1 6】

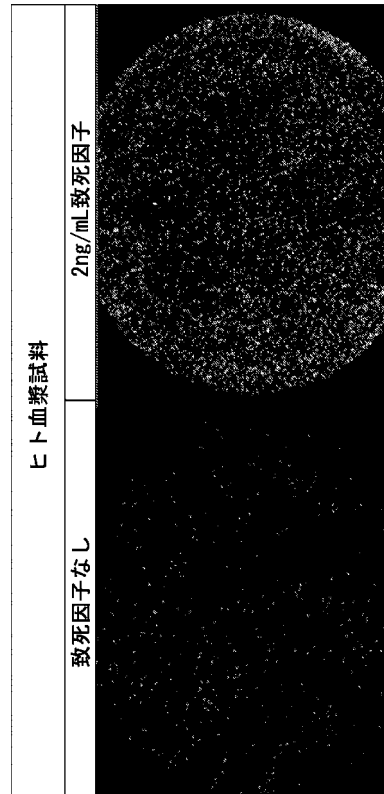


【図 17】



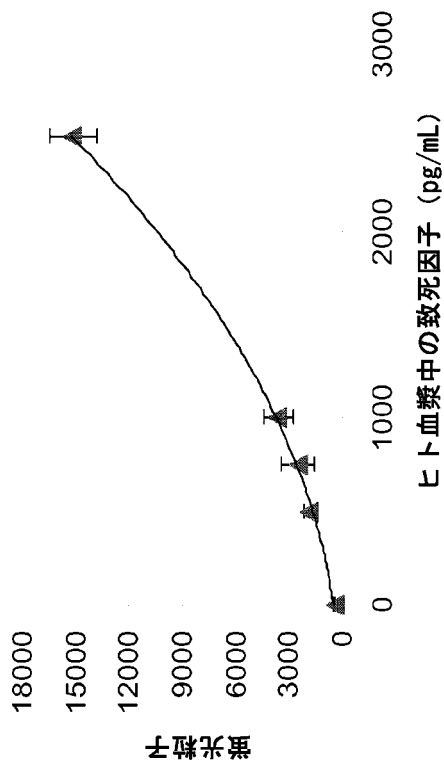
分散磁気捕捉およびクッション色素試薬を用いた
ヒト血漿におけるヒト甲状腺刺激ホルモン (hTSH) の検定
(実施例9)

【図 18】



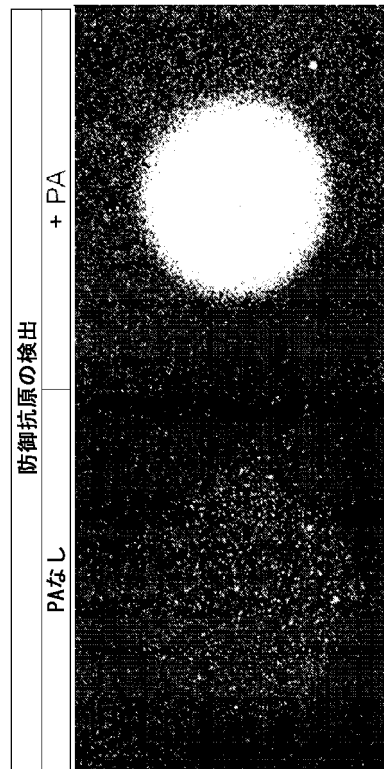
磁気捕捉およびクッション色素試薬を用いたヒト血漿中の炭疽菌
(Bacillus anthracis) 致死因子 (LF) の検出 (実施例10)

【図 19】



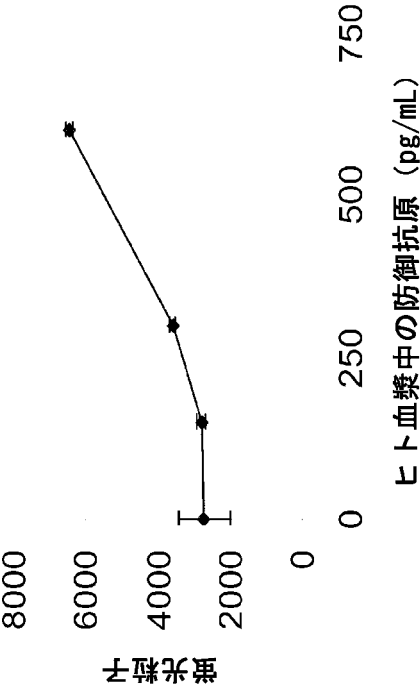
磁気捕捉およびクッション色素試薬を用いた
ヒト血漿中の炭疽菌致死因子 (LF) の検出 (実施例10)

【図 20】



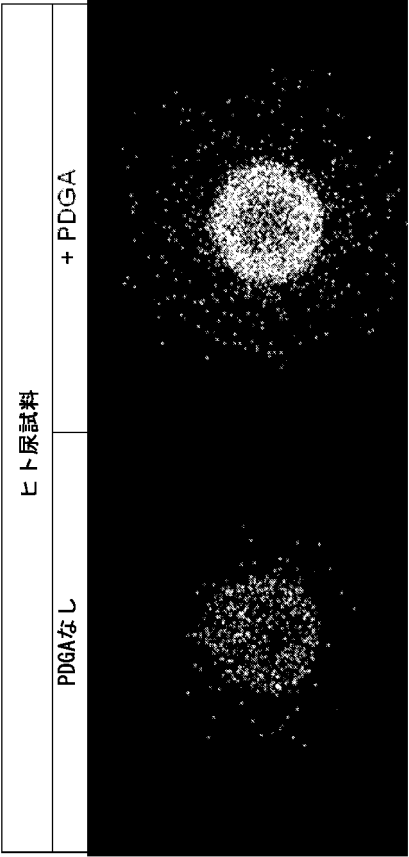
磁気捕捉およびクッション色素試薬を用いたヒト血漿中の
炭疽菌防御抗原 (PA) の検出 (実施例11)

【図 2 1】



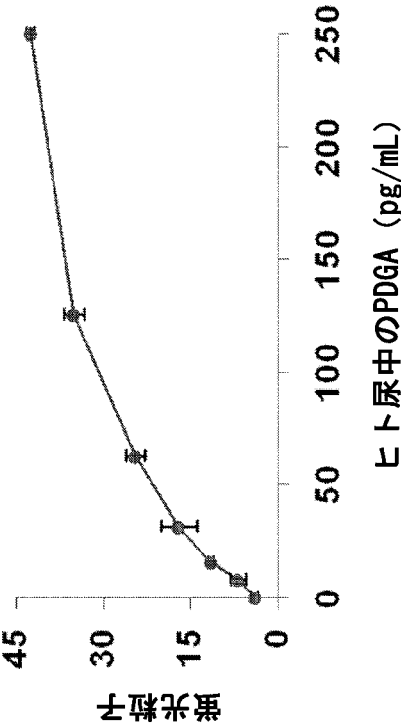
磁気捕捉およびクシヨン色素試薬を用いたヒト血漿中の炭疽菌防御抗原 (PA) の検出 (実施例11)

【図 2 2】



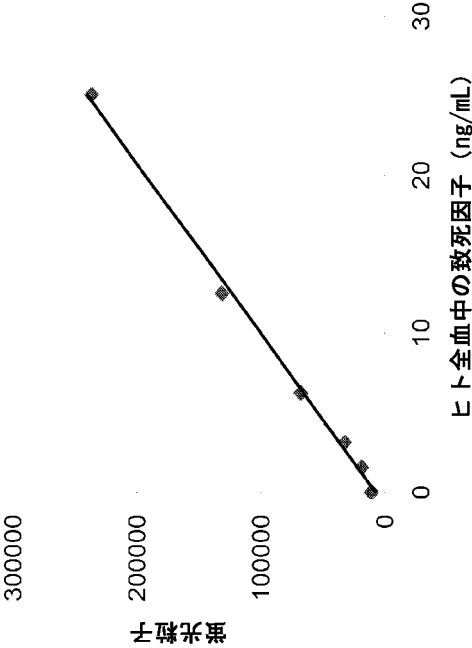
ヒト尿中の炭疽菌ポリ-D-γ-グルタミン酸 (PDGA) カプセル・ポリペプチドの検出 (実施例12)

【図 2 3】



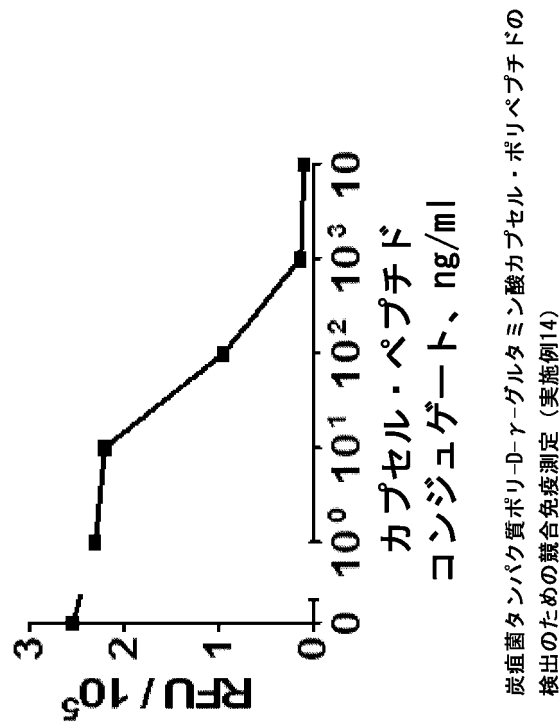
ヒト尿中の炭疽菌ポリ-D-γ-グルタミン酸 (PDGA) カプセル・ポリペプチドの検出 (実施例12)

【図 2 4】

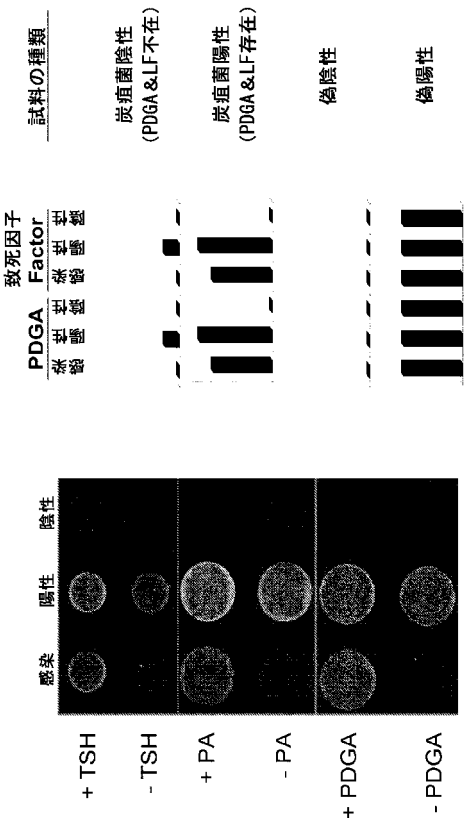


自動分析によるヒト全血中の炭疽菌致死因子の検出 (実施例13)

【図 2 5】

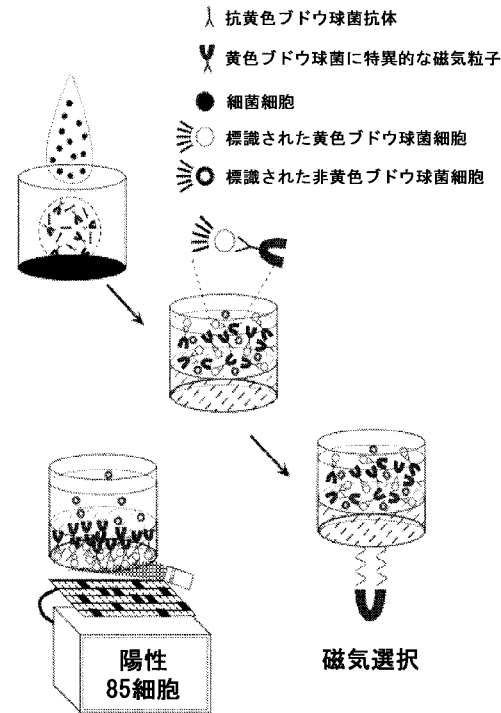


【図 2 6】



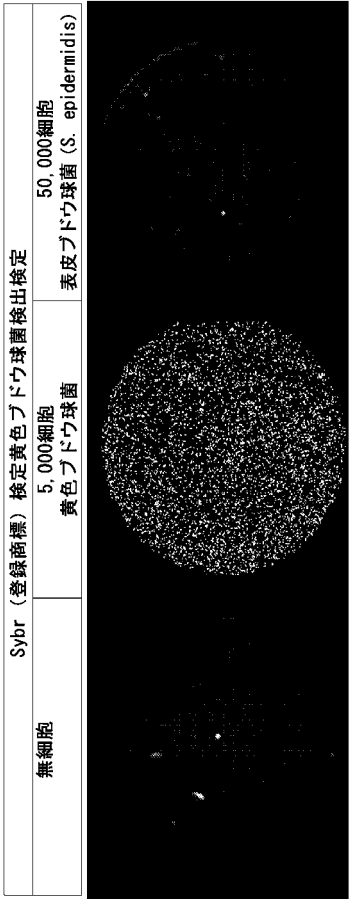
ヒトTSHおよび炭疽菌PAおよびPDGAに関する陽性および陰性の内部検定対照（実施例15）

【図 2 7】



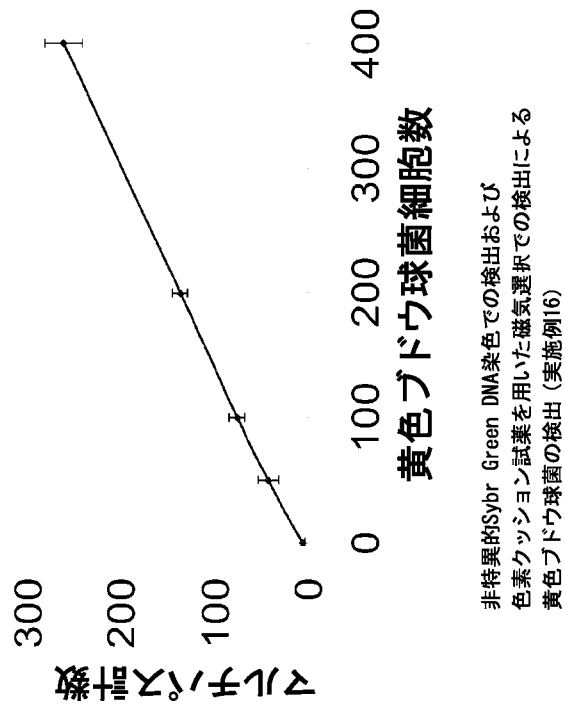
蛍光性DNA染色による黄色ブドウ球菌の標識。
マルチパス黄色ブドウ球菌検定により
非拡大デジタル画像を用いて個々の
標識黄色ブドウ球菌細胞を計数する。
細胞計数技術は差次的な増殖による
抗生物質感受性測定的基础である。（実施例16）

【図 2 8】

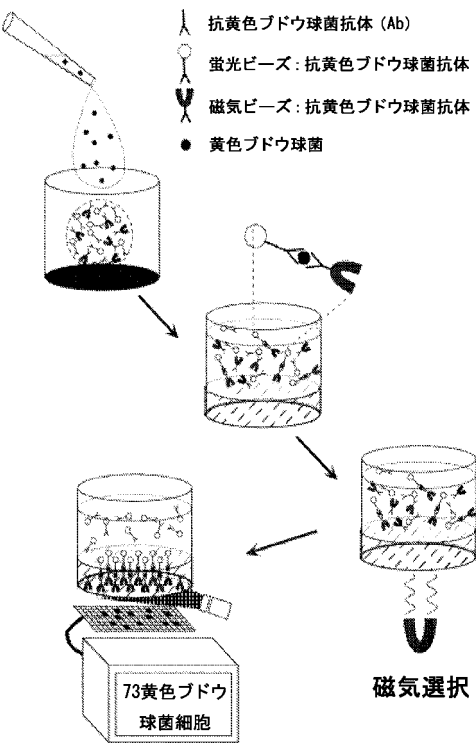


非特異的Sybr (登録商標) Green DNA染色での検出および
色素クッション試験を用いた磁気選択での検出による黄色ブドウ球菌の検出
(実施例16)

【図 2 9】

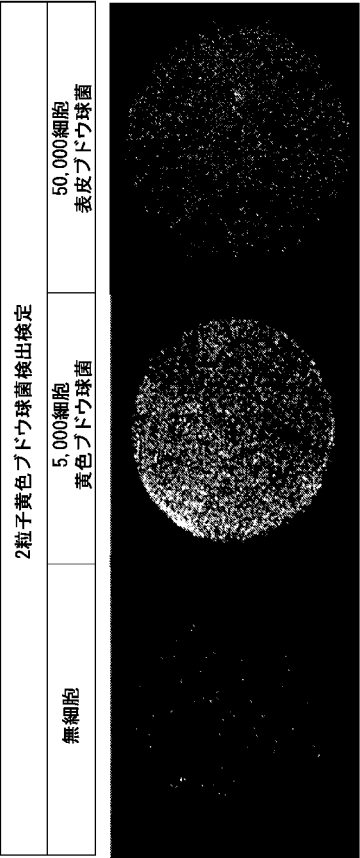


【図 3 0】



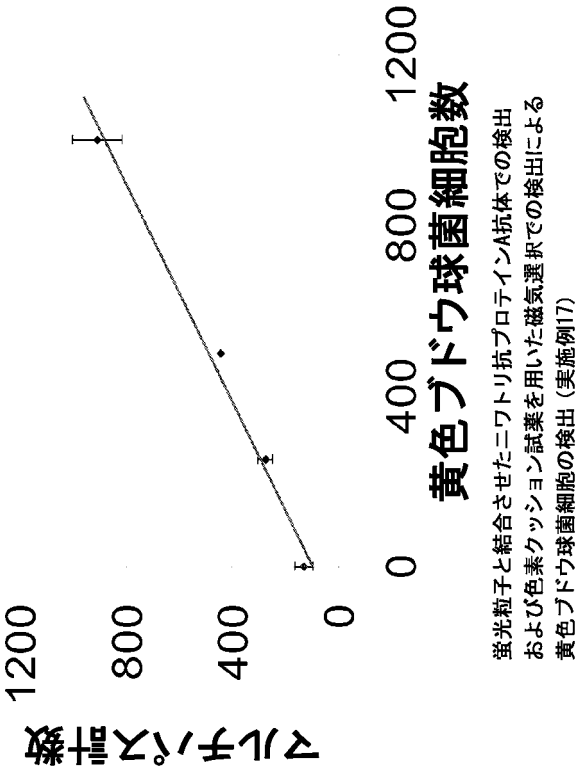
蛍光ナノ粒子と結合させた
ニワトリ抗プロテインA抗体を用いた
黄色ブドウ球菌細胞の標識 (実施例17)

【図 3 1】

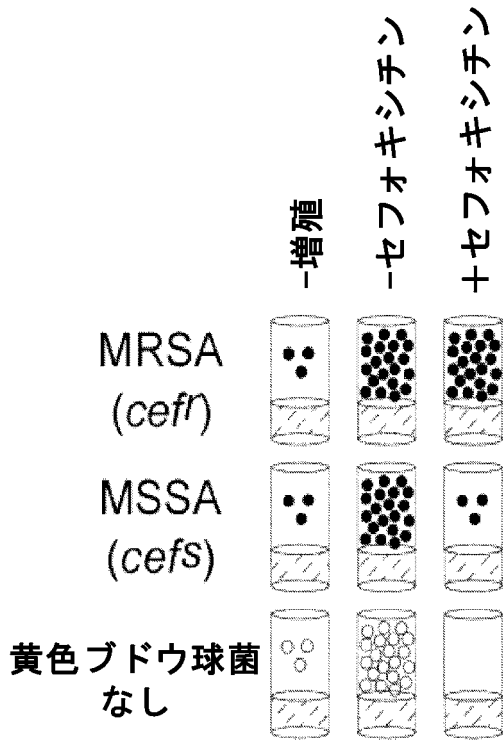


蛍光ナノ粒子と結合させたニワトリ抗プロテインA抗体を用いた
黄色ブドウ球菌細胞の標識 (実施例17)

【図 3 2】

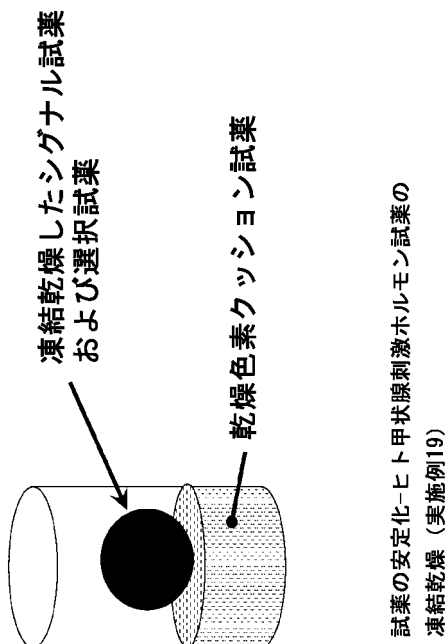


【図 3 3】



細胞の選択的増殖および免疫検出による
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の
検出プロトコル (実施例18)

【図 3 5】

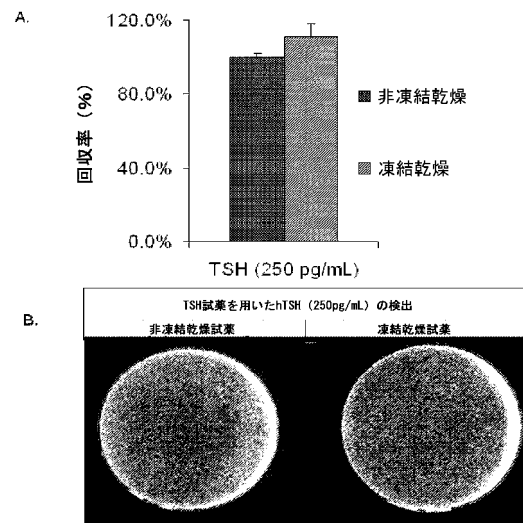


【図 3 4】

株	非増殖	CFXなしの増殖	CFX中の増殖
MSSA			
MRSA			
表皮 ブドウ球菌			

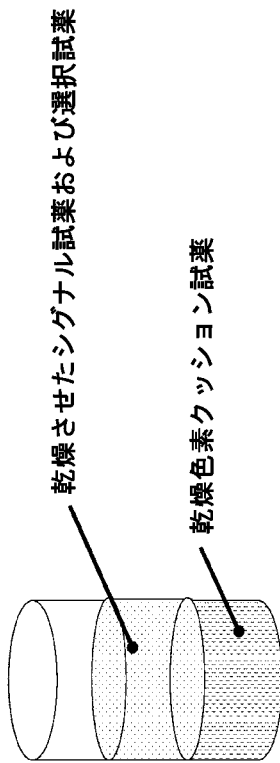
細胞の選択的増殖および免疫検出による
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の検出 (実施例18)

【図 3 6】

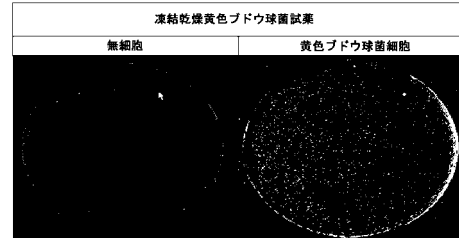
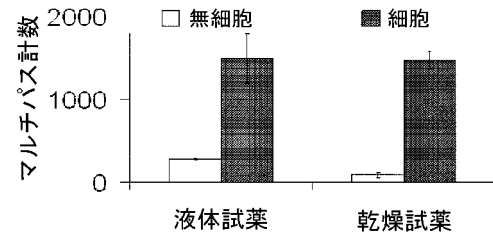


凍結乾燥試薬を利用したヒト甲状腺刺激ホルモンの検定
(実施例19)

【図 37】



【図 38】

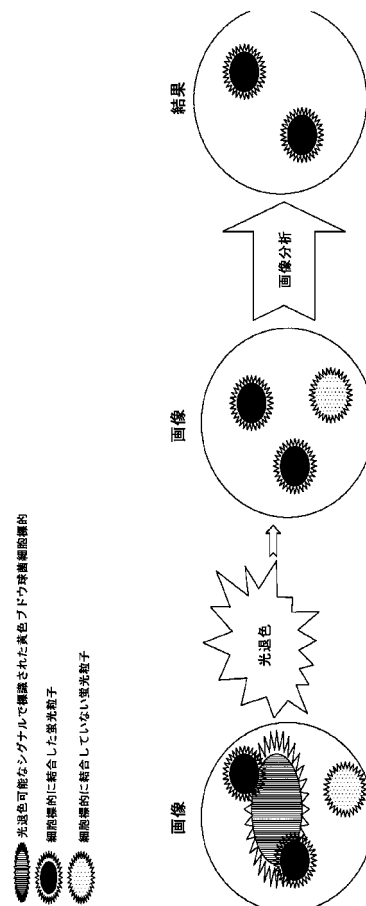
凍結乾燥試薬を利用した黄色ブドウ球菌の検定
(実施例20)

【図 39】

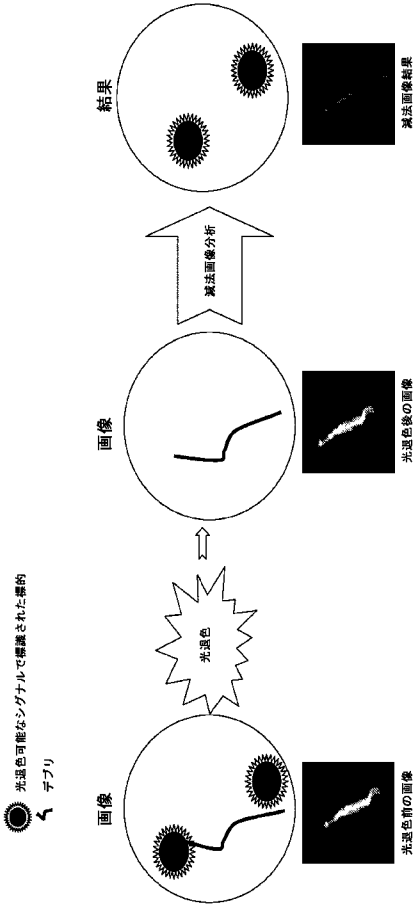


選択複合体の移動によるバイオチップの特異的検出 (実施例21)

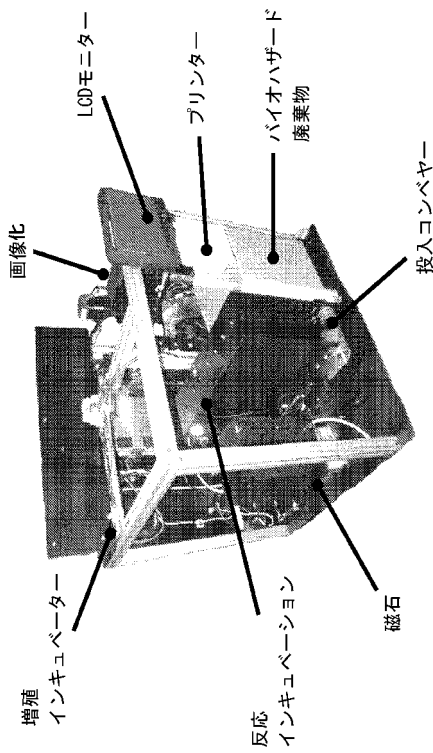
【図 40】

光退色を利用した検定における黄色ブドウ球菌の特異的検出
(実施例22)

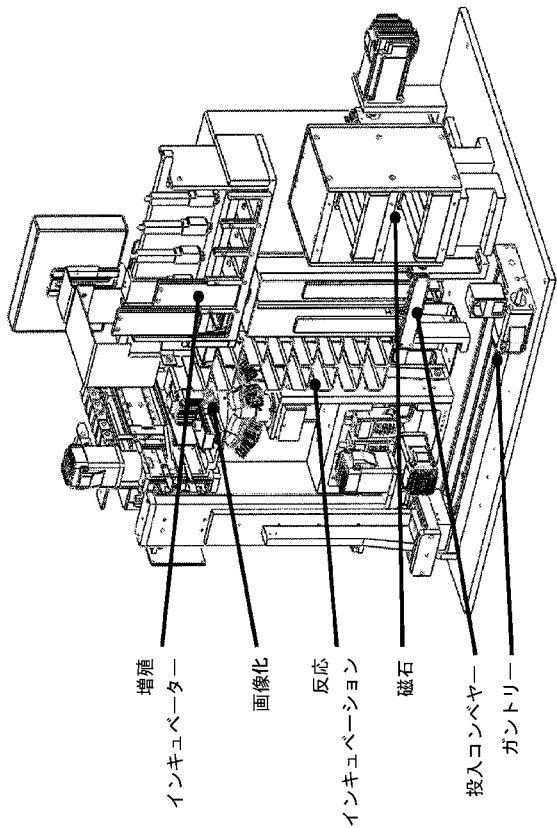
【図 4 1】



【図 4 3】

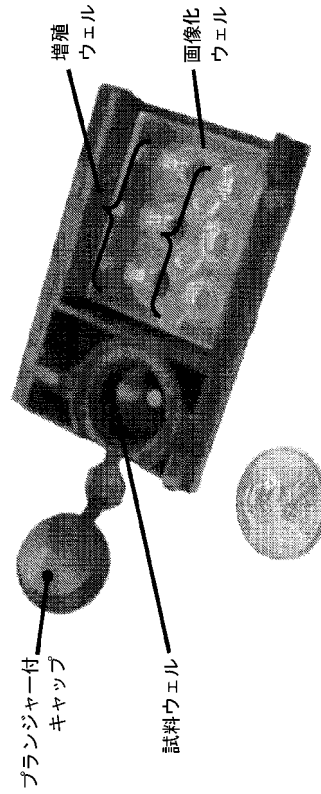


分析器の写真 (実施例14)



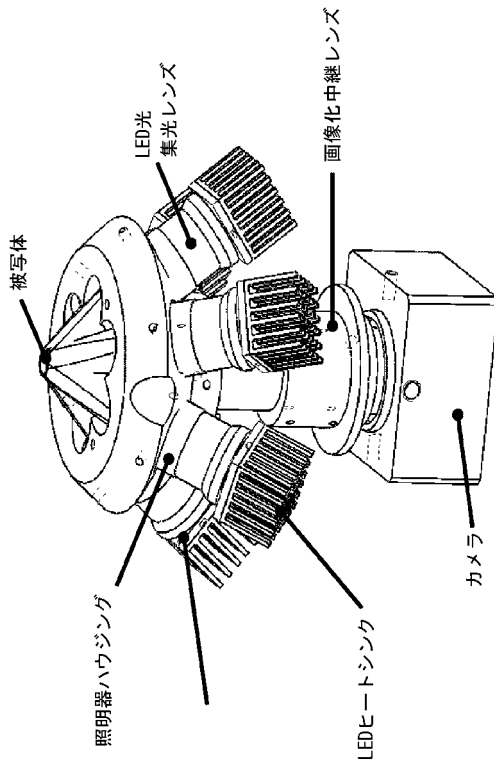
分析器CAD部分組立品 (実施例14)

【図 4 2】



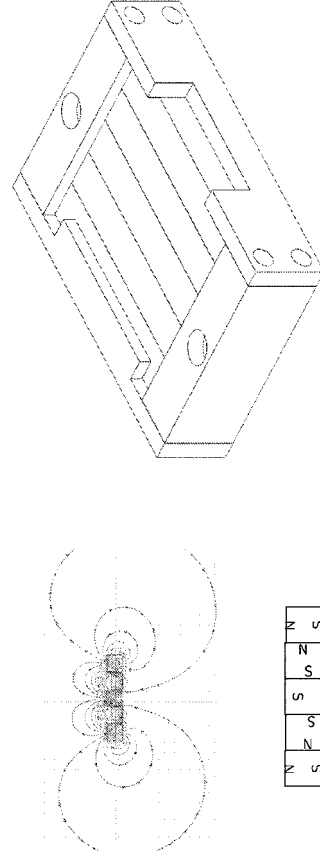
カートリッジの態様 (実施例9)

【図 4 5】



ロボット工学を用いた自動分析器の画像化光学系図
(実施例1および実施例9)

【図 4 6】

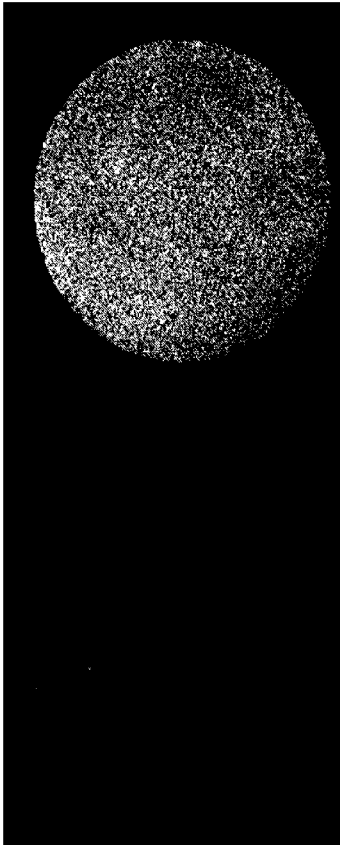


棒状磁石組立品 (実施例2)

【図 4 7】

黄色ブドウ球菌細胞

黄色ブドウ球菌細胞なし



自動分析器上の色素クッションを含むカートリッジにおける
磁気粒子と複合体形成した個々の標識黄色ブドウ球菌細胞の検出

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/58270

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12M 1/34, G01N 33/53 (2009.01)

USPC - 435/7.2, 435/7.32, 435/7.33, 435/287.1, 435/288.7

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)

IPC(8): C12M 1/34, G01N 33/53 (2009.01)

USPC: 435/7.2, 435/7.32, 435/7.33, 435/287.1, 435/288.7

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWest, PubMed, Google Scholar: detect\$4, vessel\$2, target\$2, bacteria\$2, sample\$2, surface, linear, mm, overlying, layer, underlying, signal\$4, moiety\$4, signaling moieties, selection moieties, select\$4, photonic signaling, selection force, cushion, contact, simultaneous, complex\$4, detection zone, detection area, hydrat\$4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/0170613 A1 (STRAUS) 11 September 2003 (11.09.2003) abstract; [0070], [0082], [0087], [0094], [0287], [0304], [0306], [0308], [0318], [0448]	33-40, 45-48, 51-53, 55-60, 62
Y		1-32, 41-44, 49-50, 54, 61
Y	US 2005/0191687 A1 (WANG et al.) 01 September 2005 (01.09.2005) para [0029]	10-13, 41-44
Y	US 2004/0048395 A1 (LEE et al.) 11 March 2004 (11.03.2004) para [0039]	18-21, 49-50
Y	US 2004/0171121 A1 (LEPPLA et al.) 02 September 2004 (02.09.2004) abstract, para [0011]	24, 54
Y	US 2008/ 0003571 A1 (MCKERNAN et al.) 03 January 2008 (03.01.2008) para [0211]	12, 43
Y	US 2006/0188967 A1 (NALIN et al.) 24 August 2006 (24.08.2006) para [0031]	1-31, 32
Y	US 5,552,272 A (BOGART) 03 September 1996 (03.09.1996) col 57, ln 5-28	31, 61

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"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

17 November 2009 (17.11.2009)

Date of mailing of the international search report

02 DEC 2009

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. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/48 (2006.01)		G 0 1 N 33/543	5 7 5	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/48		P
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/50		P
		G 0 1 N 33/53		E

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. L i n u x

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 アブラムス エズラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン コルバート ロード 4

(72)発明者 ガイト サダナンド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 アーリントン ランカスター ロード 60

(72)発明者 シネフェルド リサ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン ケンダール ロード 116

(72)発明者 ストラウス ドン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ バッキンガム ストリート 19

(72)発明者 シーク ゴードン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ソマービル ハイランド アベニュー 187

(72)発明者 ヤンツ グレグ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ソマービル ブロードウェイ 941

F ターム(参考) 2G045 AA28 BB20 BB50 BB51 CB21 DA13 DA56 DA60 FA11 FB03
FB07 FB12 GB04 GC15
4B063 QA01 QQ03 QQ06 QQ42 QR32 QR48 QR55 QR68 QR69 QR83
QS03 QS28 QS32 QS33 QS34 QS36 QS39 QX01 QX02