

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6408552号  
(P6408552)

(45) 発行日 平成30年10月17日(2018.10.17)

(24) 登録日 平成30年9月28日(2018.9.28)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/6804 (2018.01)  
 G O 1 N 33/543 (2006.01)  
 G O 1 N 33/532 (2006.01)  
 G O 1 N 33/536 (2006.01)  
 G O 1 N 37/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6804 Z N A Z  
 G O 1 N 33/543 5 O 1 D  
 G O 1 N 33/532 Z  
 G O 1 N 33/536 E  
 G O 1 N 37/00 1 O 2

請求項の数 25 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-501461 (P2016-501461)  
 (86) (22) 出願日 平成26年3月12日(2014.3.12)  
 (65) 公表番号 特表2016-512429 (P2016-512429A)  
 (43) 公表日 平成28年4月28日(2016.4.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/024279  
 (87) 国際公開番号 W02014/165061  
 (87) 国際公開日 平成26年10月9日(2014.10.9)  
 審査請求日 平成29年2月20日(2017.2.20)  
 (31) 優先権主張番号 61/779,050  
 (32) 優先日 平成25年3月13日(2013.3.13)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/919,887  
 (32) 優先日 平成25年12月23日(2013.12.23)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 505243216  
 メソ スケール テクノロジーズ エルエ  
 ルシー  
 アメリカ合衆国メリーランド州20850  
 , ロックヴィル, リサーチ・ブールバード  
 1601  
 (74) 代理人 100127926  
 弁理士 結田 純次  
 (74) 代理人 100140132  
 弁理士 竹林 則幸  
 (72) 発明者 アナヒット・アーグバニアン  
 アメリカ合衆国メリーランド州20878  
 , ゲイザースバーグ, ウェストボーンテラ  
 ス16900

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善されたアッセイ方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の目的の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、

a. (i) 分析物に関する捕捉試薬、および(ii) アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面；

b. 第1の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第1の検出試薬；ならびに

c. 第2の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第2の検出試薬を含む、前記キット。

【請求項2】

捕捉試薬、または第1の検出試薬、または第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含む、請求項1に記載のキット。

【請求項3】

試料中の目的の分析物を検出する方法であって、

a. 該分析物を、(i) 該分析物に関する捕捉試薬を含む表面上の該捕捉試薬；(ii) 第1の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第1の検出試薬；ならびに(iii) 第2の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第2の検出試薬に結合させ；それにより、該捕捉試薬、該分析物ならびに該第1および第2の検出試薬を含み、さらにアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む該表面上の複合体を形成させる

10

20

こと；

b．該第1および第2のプローブが近接されることを必要とする伸長プロセスを用いて、該第2のプローブを伸長して、該アンカー配列に対して相補的であるアンカー配列相補体を含む伸長配列を形成させること；

c．該アンカー配列を該アンカー配列相補体にハイブリダイズさせること；ならびに

d．該表面に結合した伸長配列の量を測定すること

を含み、

ここで前記方法は請求項1に記載のキットを用いて実施される、  
前記方法。

【請求項4】

10

捕捉試薬、または第1の検出試薬、または第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は分析物に対する抗体である、請求項3に記載の方法。

【請求項6】

アンカーオリゴヌクレオチド配列は1本鎖オリゴヌクレオチド配列、または2本鎖オリゴヌクレオチド配列を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項7】

20

伸長配列は1つまたはそれ以上の検出配列をさらに含み、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の検出配列に対して相補的な複数の標識プローブと接触させることをさらに含む、または、

伸長配列は1つまたはそれ以上の標識塩基をさらに含み、測定工程は1つまたはそれ以上の標識塩基の存在を検出することをさらに含む、  
請求項3に記載の方法。

【請求項8】

伸長配列は1つまたはそれ以上の修飾塩基をさらに含み、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の修飾塩基と結合することが可能な複数の検出可能な部分と接触させることをさらに含む、請求項3に記載の方法。

30

【請求項9】

1つまたはそれ以上の修飾塩基はアプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープを含み、複数の検出可能な部分は1つまたはそれ以上の修飾塩基および検出可能な標識の結合パートナーを各々含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

1つまたはそれ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む、または、

1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識を各々含む、または、

40

1つまたはそれ以上の修飾塩基はアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む、または、

1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識を各々含む、  
請求項9に記載の方法。

【請求項11】

工程(a)は分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含む、請求項3に記載の方法：

(i)表面上の捕捉試薬；および(ii)分析物に関する検出試薬、または、

(i)分析物に関する検出試薬；および(ii)表面上の捕捉試薬。

50

**【請求項 1 2】**

工程 ( a ) は分析物を以下の種に同時にまたは実質的に同時に結合させることを含む、請求項 3 に記載の方法：

( i ) 表面上の捕捉試薬；および ( i i ) 分析物に関する検出試薬。

**【請求項 1 3】**

伸長工程はプローブを鋳型核酸配列に結合させることおよびプローブをポリメラーゼ連鎖反応法によって伸長させることを含む、または、

伸長工程はプローブを鋳型核酸配列に結合させること、環状の核酸鋳型を形成させること、および環状の鋳型をローリングサークル増幅によって伸長させることを含む、請求項 3 に記載の方法。

10

**【請求項 1 4】**

伸長されるプローブはプローブ伸長後に表面上に局在化したままに残る、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 1 5】**

複合体は伸長工程後に表面に結合したままに残り、

必要に応じて、伸長されるプローブは表面上の複合体の位置の 1 0 ~ 1 0 0 nm 内のポジションでアンカー試薬に結合される、請求項 1 4 に記載の方法。

**【請求項 1 6】**

伸長工程は P C R ( ポリメラーゼ連鎖反応 )、L C R ( リガーゼ連鎖反応 )、S D A ( 鎖置換増幅 )、3 S R ( 自己持続合成反応 )、または等温性の増幅方法を含む、請求項 3 に記載の方法。

20

**【請求項 1 7】**

伸長工程は等温性の増幅方法を含み、

必要に応じて、等温性の増幅方法はヘリカーゼ依存的な増幅またはローリングサークル増幅 ( R C A ) である、請求項 1 6 に記載の方法。

**【請求項 1 8】**

伸長プロセスは、工程 ( a ) において形成される複合体を、( i ) 第 2 のプローブに対して相補的な内部配列および ( i i ) 第 1 のプローブの非オーバーラップ領域に対して相補的な 2 つの末端配列を含むコネクタ配列と接触させることを含み、

30

必要に応じて、コネクタオリゴヌクレオチドの 2 つの末端配列をライゲーションして、第 1 および第 2 のプローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させることをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 1 9】**

伸長プロセスは、工程 ( a ) において形成される複合体を、第 1 のプローブの第 1 の領域および第 2 のプローブにおける第 1 の領域に対して相補的な第 1 のコネクタプローブ配列を含む第 1 のコネクタオリゴヌクレオチド配列、および第 1 のプローブの第 2 の非オーバーラップ領域および第 2 のプローブの第 2 の非オーバーラップ領域に対して相補的な第 2 のプローブ配列を含む第 2 のコネクタオリゴヌクレオチドと接触させることを含み、

40

必要に応じて、第 1 および第 2 のコネクタオリゴヌクレオチドをライゲーションして、第 1 および第 2 のプローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させることをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 2 0】**

表面は電極を含み、測定工程は電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネセンスシグナルを生成することをさらに含み、

必要に応じて、粒子を電極上で採取することおよび電位波形を電極に適用して、エレクト

50

トロケミルミネッセンスシグナルを生成することをさらに含む、  
請求項 3 に記載の方法。

【請求項 2 1】

測定工程は伸長配列を検出可能な標識を有する検出プローブに結合させること、検出可能な標識を測定すること、および測定値を試料中の分析物の量と関連させることをさらに含む、検出プローブは伸長配列の領域に対して相補的である核酸配列を含む、

必要に応じて、検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはその組み合わせの測定によって測定される、または、検出可能な標識は E C L 標識であり、測定工程は E C L シグナルを測定することを含む、

10

請求項 3 に記載の方法。

【請求項 2 2】

表面は粒子を含む、または、

表面は複数の別個の結合ドメインを含み、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の 2 つの別個の結合ドメインに位置する、または、

表面は複数の別個の結合ドメインを含み、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する、

請求項 1 に記載のキット。

【請求項 2 3】

表面はマルチウェルプレートのウェルを含み、

20

必要に応じて、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内に 2 つの別個の結合ドメインに位置する、または、

ウェルは複数の別個の結合ドメインを含み、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内の同じ結合ドメインに位置する、

請求項 1 に記載のキット。

【請求項 2 4】

捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上で 10 ~ 100 nm 内にある、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 2 5】

表面は電極を含む、請求項 1 に記載のキット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

2013 年 3 月 13 日出願の米国仮出願第 61 / 779 , 050 号、および 2013 年 12 月 23 日出願の米国仮出願第 61 / 919 , 887 号に対する参照がなされ、それぞれ、各々の開示は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

本発明は、免疫アッセイを行うための改善された方法を対象とする。その方法を設計して、免疫アッセイにおいてシグナルが増幅されるおよびそこで用いられる免疫アッセイ複合体がアンカーされる。

40

【背景技術】

【0003】

文献のかなりの部分が、サンプル中の目的とする分析物の感度の良い測定のための、結合反応、例えば、抗原 - 抗体反応、核酸ハイブリダイゼーションおよび受容体 - リガンド反応を用いる技術について明らかとしている。多くの生化学的な結合システムにおける高度の特異性により、基礎研究、人間および獣医学領域の診断、環境モニタリングおよび産業的な試験を含め種々のマーケットにおいて、価値のある多くのアッセイ方法およびシステムが導かれてきた。目的の分析物の存在は、結合反応における分析物の関与を直接的に測定することによって測定され得る。いくつかのアプローチでは、この関与は、1 つまた

50

はそれ以上の結合物質に付着させた観察可能な標識の測定を通して示され得る。

【0004】

サンドイッチ免疫アッセイ形式は、優れた感度および特異性を多くの適用において提供するが、いくつかの分析物は従来の免疫アッセイ技術による検出に関しては低すぎる濃度で存在している。サンドイッチ免疫アッセイの性能は、検出抗体の非特異的な結合ならびに高いオフ率 (off-rate) の抗体を含むサンドイッチ複合体の不安定性によっても制限される可能性がある。しかしながら、従来の免疫アッセイ技術を改変して感度および特異性を改善する取組みは、アッセイの感度および特異性に影響力をおよぼしうる、各工程での非効率性によって妨げられうる、より複雑で人手を要するプロトコルをしばしば生み出す。たとえば、複数の結合事象および/または反応を必要とする複合的なアッセイにおいて、1つの事象または反応が至適未満である場合には、総合的にアッセイの感度および特異性が影響を受けうる。感度を改善し、非特異的な結合を低減させ、サンドイッチ複合体の安定性を改善することによってサンドイッチ免疫アッセイ性能を改善するための新規な技術についての必要性が存在する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、以下の特定の実施形態を企図している。当業者によって、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な改変、付加および修正を、本明細書に記載した実施形態に対してなし得る。このような改変、付加および修正は、特許請求の範囲の範囲内に収まることが意図される。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

実施形態(1): 試料中の目的の分析物を検出する方法であって、該分析物を、(i) 該分析物に関する捕捉試薬を含む表面上の該捕捉試薬、およびアンカー試薬; ならびに(ii) 核酸プローブに連結された、該分析物に関する検出試薬に結合させ; それにより、該捕捉試薬、該分析物および該検出試薬を含む該表面上に複合体を形成させること; 該プローブを伸長させて、該アンカー試薬に結合するアンカー領域を含む伸長配列を形成させること; 該伸長配列を該アンカー試薬に結合させること; ならびに該表面に結合した伸長配列の量を測定することを含む方法。

30

【0007】

実施形態(1)では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ(mimotope)、またはアプタマーであってもよい。特定の実施形態では、捕捉試薬は、抗体である。検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよく、特定の実施形態では、検出試薬は、抗体である。実施形態(1)の1つの特定の例では、捕捉および検出試薬は、分析物に対する抗体である。アンカー試薬は、オリゴヌクレオチド配列、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープを含むことができる; 場合により、アンカー領域は、アプタマーを含むことができ、アンカー試薬は、アプタマーリガンドを含むことができる。アンカー領域は核酸配列を含むことができ、アンカー試薬はDNA結合タンパク質を含むことができる。アンカー試薬はオリゴヌクレオチド配列を含むことができ、アンカー試薬は相補的なオリゴヌクレオチド配列を含むことができる。アンカー領域は、1本鎖オリゴヌクレオチド配列または2本鎖オリゴヌクレオチド配列を含むことができる。

40

【0008】

実施形態(1)の結合工程は、アンカー領域とアンカー試薬との間に三重らせんを形成させることをさらに含むことができる。方法は、結合工程の前に、アンカー領域を変性させて、1本鎖配列を曝露させること; 結合工程の前にアンカー領域をヘリカーゼ活性に曝露すること; および/または結合工程の前に、アンカー領域をヌクレアーゼ処理に曝露す

50

ることをさらに含むことができる。この実施形態では、アンカー領域は1つまたはそれ以上のハプテン-修飾塩基を含むことができ、アンカー試薬は1つまたはそれ以上のハプテンに特異的な抗体を含むことができる；および/またはアンカー領域は1つまたはそれ以上のリガンド-修飾塩基を含むことができ、アンカー試薬はリガンドに特異的な1つまたはそれ以上の受容体を含むことができる。伸長配列は1つまたはそれ以上の検出配列をさらに含むことができ、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の検出配列に対して相補的な複数の標識プローブと接触させることを含むことができる；伸長配列は1つまたはそれ以上の修飾塩基を含むことができ、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の修飾塩基と結合することが可能な複数の検出可能な部分と接触させることを含むことができる；および/または伸長配列は1つまたはそれ以上の標識塩基を含むことができ、測定工程は1つまたはそれ以上の標識塩基の存在を検出することをさらに含むことができる。この実施形態では、1つまたはそれ以上の修飾塩基はアプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープを含み、複数の検出可能な部分は1つまたはそれ以上の修飾塩基および検出可能な標識の結合パートナーを各々含む。1つまたはそれ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含むことができ、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；および/または1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含むことができ、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識を各々含む；および/または1つまたはそれ以上の修飾塩基はアビジンを含むことができ、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；および/または1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含むことができ、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識を各々含む。

10

20

**【0009】**

実施形態(1)の第1の工程は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：(i)表面上の捕捉試薬；および(ii)分析物に関する検出試薬；または実施形態(1)の第1の工程は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：(i)分析物に関する検出試薬；および(ii)表面上の捕捉試薬；および/または第1の工程は、分析物を以下の種を同時にまたは実質的に同時に結合させることを含むことができる：(i)表面上の捕捉試薬；および(ii)分析物に関する検出試薬。

**【0010】**

実施形態(1)の伸長工程は、プローブを鋳型核酸配列に結合させることおよびプローブをポリメラーゼ連鎖反応法によって伸長させること；および/またはプローブを鋳型核酸配列に結合させること、環状の核酸鋳型を形成させること；および環状の鋳型をローリングサークル増幅によって伸長させることを含むことができる。この実施形態では、伸長されるプローブは、プローブ伸長後に表面上に局在化したまま残ることができる。したがって、複合体は伸長工程後に表面に結合したまま残ることができる、例えば、伸長されるプローブは、表面上の複合体の位置の10~1000μm内のポジションで、アンカー試薬に結合される。

30

**【0011】**

実施形態(1)の伸長工程は、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)、LCR(リガーゼ連鎖反応)、SDA(鎖置換増幅)、3SR(自己持続合成反応)、または等温性の増幅方法を含むことができる。一実施形態では、伸長工程は、等温性の増幅方法、例えば、ヘリカーゼ依存的な増幅またはローリングサークル増幅(RCA)を含むことができる。

40

**【0012】**

実施形態(1)において参照される表面は、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する；および/または表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面

50

上の同じ結合ドメインに位置する。一実施形態では、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm内にあってもよい。表面は電極を含むことができ、測定工程は電位波形(voltage waveform)を適用して、エレクトロケミルミネッセンス(electrochemiluminescence)シグナルを生成することをさらに含むことができ、場合により、方法は、粒子を電極上で採取することおよび電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンスシグナルを生成することを含む。

#### 【0013】

実施形態(1)の測定工程は、伸長配列を検出可能な標識を有する検出プローブに結合させること、検出可能な標識を測定すること、および測定値を試料中の分析物の量と相関させることをさらに含むことができ、ここで、検出プローブは、伸長配列の領域に対して相補的である核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。実施形態(1)の特定の例では、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程はECLシグナルを測定することを含むことができる。

#### 【0014】

実施形態(2)：試料中の目的の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、(a)(i)該分析物に関する捕捉試薬、および(ii)アンカー試薬を含む表面；ならびに(b)核酸プローブに連結された、該分析物に関する検出試薬を含むキット。

#### 【0015】

実施形態(2)のアンカー試薬は、オリゴヌクレオチド配列、アプタマー、アプタマールリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミミトープを含むことができ、捕捉試薬は抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができる。特定の実施形態では、捕捉試薬は抗体を含むことができ、および/または検出試薬は抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、もしくはアプタマーを含むことができる。キットの特定の実施形態では、検出試薬は、抗体である。

#### 【0016】

実施形態(2)のキットの表面は、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。キットの表面がプレートのウェルである場合、表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する；および/または表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する。キットの特定の例では、表面はウェルであり、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm内にあってもよい。さらには、キットの表面は、電極を含むことができる。

#### 【0017】

実施形態(3)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)該分析物を、(i)該分析物に関する捕捉試薬を含む表面上の該捕捉試薬、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬；ならびに(ii)核酸プローブに連結された、分析物に関する検出試薬に結合させ；それにより、該捕捉試薬、該分析物および該検出試薬を含む該表面上に複合体を形成させること；(b)該プローブを伸長して、該アンカー配列に対して相補的であるアンカー配列相補体を含む伸長配列を形成させること；(c)該アンカー配列を該アンカー配列相補体にハイブリダイズさせること；ならびに(d)該表面に結合した伸長配列の量を測定することを含む方法。

## 【0018】

実施形態(3)では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよく、特定の例では、捕捉試薬は、抗体である。同様に、検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであり、実施形態(3)の特定の例では、検出試薬は、抗体である。実施形態(3)の1つの例では、捕捉および検出試薬は、分析物に対する抗体である。アンカーオリゴヌクレオチド配列は、1本鎖オリゴヌクレオチド配列または2本鎖オリゴヌクレオチド配列を含むことができる。伸長配列は1つまたはそれ以上の検出配列をさらに含んでもよく、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の検出配列に対して相補的な複数の標識プローブと接触させることをさらに含むことができる；あるいはまたはさらには、伸長配列は1つまたはそれ以上の修飾塩基をさらに含むことができ、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の修飾塩基と結合することが可能な複数の検出可能な部分と接触させることをさらに含むことができる。特定の例では、伸長配列は1つまたはそれ以上の標識塩基をさらに含むことができ、測定工程は1つまたはそれ以上の標識塩基の存在を検出することをさらに含むことができる。1つまたはそれ以上の修飾塩基はアプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープを含み、複数の検出可能な部分は1つまたはそれ以上の修飾塩基および検出可能な標識の結合パートナーを各々含む。1つまたはそれ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含むことができ、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識を各々含む；1つまたはそれ以上の修飾塩基はアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；および/または1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識を各々含む。

10

20

## 【0019】

実施形態(3)の工程(a)は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：(i)表面上の捕捉試薬；および(ii)分析物に関する検出試薬。あるいは、工程(a)は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：(i)分析物に関する検出試薬；および(ii)表面上の捕捉試薬。さらなる別の例では、工程(a)は、分析物を以下の種に同時にまたは実質的に同時に結合させることを含むことができる：(i)表面上の捕捉試薬；および(ii)分析物に関する検出試薬。

30

## 【0020】

実施形態(3)の伸長工程は、プローブを鋳型核酸配列に結合させることおよびプローブをポリメラーゼ連鎖反応法によって伸長させることを含むことができる。あるいは、伸長工程は、プローブを鋳型核酸配列に結合させること、環状の核酸鋳型を形成させること、および環状の鋳型をローリングサークル増幅によって伸長させることを含むことができる。伸長されるプローブは、プローブ伸長後に表面上に局在化したまま残ることができる。例えば、複合体は伸長工程後に表面に結合したまま残る。一例では、伸長されるプローブは、表面上の複合体の位置の10~100um内のポジションで、アンカー試薬に結合される。この特定の実施形態では、伸長工程は、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)、LCR(リガーゼ連鎖反応)、SDA(鎖置換増幅)、3SR(自己持続合成反応)、または等温性の増幅方法を含むことができる。たとえば、伸長工程は、等温性の増幅方法、例えば、ヘリカーゼ依存的な増幅またはローリングサークル増幅(RCA)を含むことができる。

40

## 【0021】

実施形態(3)の表面は、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。表面がプレートのウェルである

50



場合、それは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する；表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する。表面がウェルである場合、それは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する；捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm内にあってもよい。特定の例では、表面は電極を含むことができ、測定工程は電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンス(electrochemiluminescence)シグナルを生成することをさらに含むことができる。方法は、粒子を電極上で採取することおよび電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンスシグナルを生成することをさらに含むことができる。測定工程は、伸長配列を検出可能な標識を有する検出プローブに結合させること、検出可能な標識を測定すること、および測定値を試料中の分析物の量と関連させることをさらに含むことができ、ここで、検出プローブは、伸長配列の領域に対して相補的である核酸配列を含む。この実施形態では、検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス(electrochemiluminescence)、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される。たとえば、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程はECLシグナルを測定することを含むことができる。

10

#### 【0022】

実施形態(4)：試料中の目的の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、(a)(i)該分析物に関する捕捉試薬、および(ii)アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面；ならびに(b)核酸プローブに連結された、該分析物に関する検出試薬を含むキット。

20

#### 【0023】

実施形態(4)のキットは、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含む捕捉試薬を含む。特定の例では、捕捉試薬は、抗体を含むことができる。同様に、検出試薬は抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、特に、検出試薬は抗体を含むことができる。

30

#### 【0024】

実施形態(4)のキットは、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる表面を含む。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置し、例えば、表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。たとえば、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm内にある。実施形態(4)の表面は、電極を含むことができる。

40

#### 【0025】

実施形態(5)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)該分析物を、(i)該分析物に関する捕捉試薬を含む表面上の該捕捉試薬、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬；(ii)第1の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第1の検出試薬；ならびに(iii)第2の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第2の検出試薬に結合させること；それにより、結合試薬、該分析物ならびに該第1および第2の検出試薬を含む該表面上に複合体を形成させること；(b)該第1および第2のプローブが近接されることを必要とする伸長プロセスを用いて、該第2のプローブを伸長して、該アンカー配列に対して相補的であるアンカー配列相補体を含む伸長配

50

列を形成させること；（c）該アンカー配列を該アンカー配列相補体にハイブリダイズさせること；ならびに（d）該表面に結合した伸長配列の量を測定することを含む方法。

【0026】

実施形態（5）の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよい。特定の例では、捕捉試薬は、抗体である。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであり、特定の例では、第1の検出試薬は、抗体である。第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよく、特定の例では、第2の検出試薬は、抗体である。より詳細には、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

10

【0027】

実施形態（5）では、アンカーオリゴヌクレオチド配列は、1本鎖オリゴヌクレオチド配列または2本鎖オリゴヌクレオチド配列を含むことができる。この実施形態では、伸長配列は1つまたはそれ以上の検出配列をさらに含むことができ、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の検出配列に対して相補的な複数の標識プローブと接触させることをさらに含むことができる。伸長配列は1つまたはそれ以上の修飾塩基も含むことができ、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の修飾塩基と結合することが可能な複数の検出可能な部分と接触させることをさらに含むことができる。伸長配列は1つまたはそれ以上の標識塩基をさらに含むことができ、測定工程は1つまたはそれ以上の標識塩基の存在を検出することをさらに含むことができる。1つまたはそれ以上の修飾塩基はアプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミミトープを含むことができ、複数の検出可能な部分は1つまたはそれ以上の修飾塩基および検出可能な標識の結合パートナーを各々含む。たとえば、1つまたはそれ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識を各々含む；1つまたはそれ以上の修飾塩基はアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；および/または1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識を各々含む。

20

30

【0028】

実施形態（5）の工程（a）は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：（i）表面上の捕捉試薬；および（ii）分析物に関する検出試薬。あるいは、工程（a）は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：（i）分析物に関する検出試薬；および（ii）表面上の捕捉試薬；または工程（a）は、分析物を以下の種を同時にもしくは実質的に同時に結合させることを含むことができる：（i）表面上の捕捉試薬；および（ii）分析物に関する検出試薬。

【0029】

実施形態（5）の伸長工程は、プローブを鋳型核酸配列に結合させることおよびプローブをポリメラーゼ連鎖反応法によって伸長させることを含むことができる。伸長工程は、プローブを鋳型核酸配列に結合させること、環状の核酸鋳型を形成させること、および環状の鋳型をローリングサークル増幅によって伸長させることをさらに含むことができる。伸長されるプローブは、プローブ伸長後に表面上に局在化したまま残ることができ、例えば、複合体は伸長工程後に表面に結合したまま残る。伸長されるプローブは、表面上の複合体の位置の10～100μm内のポジションで、アンカー試薬に結合されてもよい。伸長工程は、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、LCR（リガーゼ連鎖反応）、SDA（鎖置換増幅）、3SR（自己持続合成反応）、または等温性の増幅方法を含むことができる。特定の例では、伸長工程は、等温性の増幅方法を含むことができ、例えば、ヘリカーゼ依存的な増幅またはローリングサークル増幅（RCA）である。

40

【0030】

50

実施形態(5)の伸長プロセスは、工程(a)において形成される複合体を、(i)第2のプローブに対して相補的な内部配列および(ii)第1のプローブの非オーバーラップ領域に対して相補的な2つの末端配列を含むコネクタ配列と接触させることを含むことができる。方法は、コネクタオリゴヌクレオチドの2つの末端配列をライゲーションして、第1および第2のプローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させることをさらに含むことができる。あるいは、伸長プロセスは、実施形態(5)の工程(a)において形成される複合体を、第1のプローブの第1の領域および第2のプローブにおける第1の領域に対して相補的な第1のコネクタプローブ配列を含む第1のコネクタオリゴヌクレオチド配列、ならびに第1のプローブの第2の非オーバーラップ領域および第2のプローブの第2の非オーバーラップ領域に対して相補的な第2のプローブ配列を含む第2のコネクタオリゴヌクレオチドと接触させること；ならびに、場合により、第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドをライゲーションして、第1および第2のプローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させることを含むことができる。

10

#### 【0031】

実施形態(5)の表面は、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する。表面は複数の別個の結合ドメインも含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10~100nm内にあってもよい。特定の例では、表面は電極を含むことができ、測定工程は電位波形を適用して、エレクトロケミルミネセンス(electrochemiluminescence)シグナルを生成することをさらに含むことができ、場合により、実施形態(5)の方法は、粒子を電極上で採取することおよび電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネセンスシグナルを生成することをさらに含む。

20

#### 【0032】

実施形態(5)の測定工程は、伸長配列を検出可能な標識を有する検出プローブに結合させること、検出可能な標識を測定すること、および測定値を試料中の分析物の量と相関させることをさらに含むことができ、ここで、検出プローブは、伸長配列の領域に対して相補的である核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネセンス、バイオルミネセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。特定の例では、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程はECLシグナルを測定することを含むことができる。

30

#### 【0033】

実施形態(6)：試料中の目的の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、(a)(i)該分析物に関する捕捉試薬、および(ii)アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面；(b)第1の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第1の検出試薬；ならびに(c)第2の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第2の検出試薬を含むキット。

40

#### 【0034】

実施形態(6)の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、特定の例では、捕捉試薬は、抗体を含むことができる。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタ

50

マーを含むことができ、特定の例では、第1の検出試薬は、抗体を含むことができる。類似して、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、特定の例では、第2の検出試薬は、抗体を含むことができる。

#### 【0035】

実施形態(6)の表面は、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する；および/または、表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10~100nm内にあってもよい。特定の例では、表面は、電極を含むことができる。

#### 【0036】

実施形態(7)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)該分析物を、(i)捕捉試薬を含む表面上の該分析物に関する該捕捉試薬、およびアンカー試薬；(ii)第1の近接プローブを含む、該分析物に関する第1の検出試薬、および(iii)第2の近接プローブを含む、該分析物に関する第2の検出試薬に結合させ；それにより、該捕捉試薬、該分析物ならびに該第1および第2の検出試薬を含む該表面上に検出複合体を形成させること；(b)(c)において形成される該検出複合体を、(i)該第2の近接プローブに対して相補的な内部配列および(ii)該第1の近接プローブの非オーバーラップ領域に対して相補的な2つの末端配列を含むコネクタ配列と接触させること；(c)該コネクタ配列を該第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせること；(d)コネクタオリゴヌクレオチドの2つの末端配列をライゲーションして、該第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させること；(e)該第2の近接プローブを該標的配列のローリングサークル増幅によって伸長させて、該アンカー試薬に結合する結合ドメインを含むアンプリコンを生成すること；(f)該アンプリコンを該アンカー試薬に結合させること；ならびに(g)該表面上のアンプリコンの量を測定することを含む方法。

#### 【0037】

実施形態(8)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)該分析物を：(i)捕捉試薬を含む表面上の該分析物に関する該捕捉試薬、およびアンカー試薬；(ii)第1の近接プローブを含む、該分析物に関する第1の検出試薬、および(iii)第2の近接プローブを含む、該分析物に関する第2の検出試薬に結合させ；それにより、該捕捉試薬、該分析物ならびに該第1および第2の検出試薬を含む該表面上に検出複合体を形成させること；(b)(c)において形成される検出複合体を、第1のコネクタオリゴヌクレオチドおよび第2のコネクタオリゴヌクレオチドと接触させること、ここで、(i)該第1のコネクタの第1の末端および該第2のコネクタの第1の末端は、該第1の近接プローブの2つの非オーバーラップ領域に対して相補的であるならびに(ii)該第1のコネクタの第2の末端および該第2のコネクタの第2の末端は、該第1の近接プローブの2つの非オーバーラップ領域に対して相補的である；(c)該第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドを該第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせること；(d)該第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドをライゲーションして、該第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させること；(e)該第2の近接プローブを該標的配列のローリングサークル増幅によって伸長させて、該アンカー試薬に結合する結合ドメインを含むアンプリコンを生成すること；(f)該アンプリコンを該アンカー試薬に結合させること；ならびに(g)該表面上のアンプリコンの量を測定することを含む方法。

## 【 0 0 3 8 】

実施形態（ 7 ）および（ 8 ）の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよい、特定の例では、捕捉試薬は、抗体である。類似して、第 1 の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよく、例えば、第 1 の検出試薬は、抗体である。さらに、第 2 の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、第 2 の検出試薬は、抗体である。実施形態（ 7 ）および（ 8 ）の特定の例では、捕捉試薬ならびに第 1 および第 2 の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

10

## 【 0 0 3 9 】

実施形態（ 7 ）および（ 8 ）のアンカー試薬は、オリゴヌクレオチド配列、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープを含むことができる。一例では、結合ドメインはアプタマーを含むことができ、アンカー試薬はアプタマーリガンドを含むことができる。結合ドメインは核酸配列を含むことができ、アンカー試薬は DNA 結合タンパク質を含むことができる；および / またはアンカー試薬はオリゴヌクレオチド配列を含むことができ、アンブリコンは相補的なオリゴヌクレオチド配列を含むことができる。

## 【 0 0 4 0 】

実施形態（ 7 ）および（ 8 ）のアンブリコンは 1 つまたはそれ以上の検出配列をさらに含むことができ、測定工程は伸長配列を 1 つまたはそれ以上の検出配列に対して相補的な複数の標識プローブと接触させることをさらに含むことができる。さらには、アンブリコンは 1 つまたはそれ以上の修飾塩基をさらに含んでもよく、測定工程は伸長配列を 1 つまたはそれ以上の修飾塩基と結合することが可能な複数の検出可能な部分と接触させることをさらに含むことができる。さらにまた、アンブリコンは 1 つまたはそれ以上の標識塩基をさらに含んでもよく、測定工程は 1 つまたはそれ以上の標識塩基の存在を検出することをさらに含むことができる。1 つまたはそれ以上の修飾塩基はアプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープを含むことができ、複数の検出可能な部分は 1 つまたはそれ以上の修飾塩基および検出可能な標識の結合パートナーを各々含む。1 つまたはそれ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含むことができ、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；1 つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含むことができ、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識を各々含む；1 つまたはそれ以上の修飾塩基はアビジンを含むことができ、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；および / または 1 つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含むことができ、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識を各々含む。

20

30

## 【 0 0 4 1 】

実施形態（ 7 ）および（ 8 ）の工程（ a ）は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：（ i ）表面上の捕捉試薬；ならびに（ i i ）分析物に関する第 1 および第 2 の検出試薬。あるいは、工程（ a ）は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：（ i ）分析物に関する第 1 および第 2 の検出試薬；および（ i i ）表面上の捕捉試薬。さらにまた、工程（ a ）は、分析物を以下の種に同時にまたは実質的に同時に結合させることを含むことができる：（ i ）表面上の捕捉試薬；ならびに（ i i ）分析物に関する第 1 および第 2 の検出試薬。

40

## 【 0 0 4 2 】

実施形態（ 7 ）および（ 8 ）のアンブリコンは、プローブ伸長後に表面上に局在化したまま残ることができる。複合体は、伸長工程後に表面に結合したまま残ることができる。たとえば、アンブリコンは、表面上の複合体の位置の 1 0 ~ 1 0 0 u m 内のポジションで、アンカー試薬に結合する。

## 【 0 0 4 3 】

50

実施形態(7)および(8)の表面は、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。特定の例では、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10~100nm内にある。

10

#### 【0044】

さらにまた、表面は電極を含むことができ、測定工程は電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンス(electrochemiluminescence)シグナルを生成することを含むことができる。これらの実施形態((7)および(8))では、方法は、粒子を電極上で採取することおよび電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンスシグナルを生成することをさらに含むことができる。測定工程は、アンプリコンを検出可能な標識を有する検出プローブに結合させること、検出可能な標識を測定すること、および測定値を試料中の分析物の量と関連させることを含むことができ、ここで、検出プローブは、アンプリコンの領域に対して相補的である核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、

20

#### 【0045】

実施形態(9)：試料中の目的の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、(a)(i)該分析物に関する捕捉試薬、および(ii)アンカー試薬を含む表面；(b)第1の近接プローブを含む該分析物に関する第1の検出試薬；(c)第2の近接プローブを含む該分析物に関する第2の検出試薬；ならびに(d)(i)該第2の近接プローブに対して相補的な内部配列および(ii)該第1の近接プローブの非オーバーラップ領域に対して相補的な2つの末端配列を含むコネクター配列を含むキット。

30

#### 【0046】

実施形態(10)：試料中の目的の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、(a)(i)該分析物に関する捕捉試薬、および(ii)アンカー試薬を含む表面；(b)第1の近接プローブを含む該分析物に関する第1の検出試薬；(c)第2の近接プローブを含む該分析物に関する第2の検出試薬；ならびに(d)(i)第1のコネクターオリゴヌクレオチドおよび(ii)第2のコネクターオリゴヌクレオチドを含み、ここで、(x)該第1のコネクターの第1の末端および該第2のコネクターの第1の末端は、該第1の近接プローブの2つの非オーバーラップ領域に対して相補的であるならびに；(y)該第1のコネクターの第2の末端および該第2のコネクターの第2の末端は、該第1の近接プローブの2つの非オーバーラップ領域に対して相補的である、キット。

40

#### 【0047】

実施形態(9)および(10)の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができる。特定の例では、捕捉試薬は、抗体を含むことができる。第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、特定の例では、第1の検出試薬は、抗体を含むことができる。第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、特定の例では、第2

50

の検出試薬は、抗体を含むことができる。

【0048】

実施形態(9)および(10)の表面は、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。特定の例では、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10~100nm内にある。

10

【0049】

実施形態(9)および(10)の表面は、電極を含むことができる。

【0050】

実施形態(11)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)該分析物を、(i)捕捉試薬を含む表面上の該分析物に関する該捕捉試薬、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬；(ii)第1の近接プローブを含む、該分析物に関する第1の検出試薬、および(iii)第2の近接プローブを含む、該分析物に関する第2の検出試薬に結合させ；それにより、該捕捉試薬、該分析物ならびに該第1および第2の検出試薬を含む該表面上に検出複合体を形成させること；(b)(c)において形成される該検出複合体を、(i)該第2の近接プローブに対して相補的な内部配列、(ii)該第1の近接プローブの非オーバーラップ領域に対して相補的な2つの末端配列および(iii)該アンカー配列とマッチングする配列を含むコネクター配列と接触させること；(c)該コネクター配列を該第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせること；(d)コネクターオリゴヌクレオチドの2つの末端配列をライゲーションして、該第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させること；(e)該第2の近接プローブを該標的配列のローリングサークル増幅によって伸長させて、該アンカー試薬に対して相補的である複数のアンカー配列相補体を含むアンプリコンを生成すること；(f)該アンカー配列を該アンカー配列相補体の1つにハイブリダイズさせること；および(g)該表面上のアンプリコンの量を測定することを含む方法。

20

30

【0051】

実施形態(12)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)該分析物を、(i)捕捉試薬を含む表面上の該分析物に関する該捕捉試薬、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬；(ii)第1の近接プローブを含む、該分析物に関する第1の検出試薬、および(iii)第2の近接プローブを含む、該分析物に関する第2の検出試薬に結合させ；それにより、該捕捉試薬、該分析物ならびに該第1および第2の検出試薬を含む該表面上に検出複合体を形成させること；(b)(a)において形成される検出複合体を、第1のコネクターオリゴヌクレオチドおよび第2のコネクターオリゴヌクレオチドと接触させること、ここで、(i)該第1のコネクターの第1の末端および該第2のコネクターの第1の末端は、該第1の近接プローブの2つの非オーバーラップ領域に対して相補的である、(ii)該第1のコネクターの第2の末端および該第2のコネクターの第2の末端は、該第1の近接プローブの2つの非オーバーラップ領域に対して相補的である；ならびに(iii)該第1および/または第2のコネクターは、該アンカー配列とマッチングする配列も含む；(c)該第1および第2のコネクターオリゴヌクレオチドを該第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせること；(d)該第1および第2のコネクターオリゴヌクレオチドをライゲーションして、該第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させること；(e)該第2の近接プローブを該標的配列のローリングサークル増幅によって伸長させて、該アンカー試薬に対して相補的である複数のアンカー配列相補体を含むアンプリコンを生成すること；(f)該アンカー配列を該アンカー配列相補体の1つにハイブリダイズさせること；およ

40

50

び ( g ) 該表面上のアンプリコンの量を測定することを含む方法。

【 0 0 5 2 】

実施形態 ( 1 1 ) および ( 1 2 ) の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである。特定の例では、捕捉試薬は、抗体である。第 1 の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであり、特定の例では、第 1 の検出試薬は、抗体である。同様に、第 2 の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであり、特定の例では、第 2 の検出試薬は、抗体である。一例では、第 1 および第 2 の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

10

【 0 0 5 3 】

実施形態 ( 1 1 ) および ( 1 2 ) のアンプリコンは 1 つまたはそれ以上の検出配列をさらに含むことができ、測定工程は伸長配列を 1 つまたはそれ以上の検出配列に対して相補的な複数の標識プローブと接触させることを含むことができる。さらには、アンプリコンは 1 つまたはそれ以上の修飾塩基も含むことができ、測定工程は伸長配列を 1 つまたはそれ以上の修飾塩基と結合することが可能な複数の検出可能な部分と接触させることを含むことができる。アンプリコンは 1 つまたはそれ以上の標識塩基を追加的に含み、測定工程は 1 つまたはそれ以上の標識塩基の存在を検出することを含むことができる。1 つまたはそれ以上の修飾塩基はアプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープを含み、複数の検出可能な部分は 1 つまたはそれ以上の修飾塩基および検出可能な標識の結合パートナーを各々含む。1 つまたはそれ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含むことができ、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；1 つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含むことができ、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識を各々含む；1 つまたはそれ以上の修飾塩基はアビジンを含むことができ、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；および / または 1 つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含むことができ、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識を各々含む。

20

【 0 0 5 4 】

実施形態 ( 1 1 ) および ( 1 2 ) の工程 ( a ) は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる： ( i ) 表面上の捕捉試薬；ならびに ( i i ) 分析物に関する第 1 および第 2 の検出試薬。あるいは、工程 ( a ) は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる： ( i ) 分析物に関する第 1 および第 2 の検出試薬；および ( i i ) 表面上の捕捉試薬。さらにまた、工程 ( a ) は、分析物を以下の種に同時にまたは実質的に同時に結合させることを含むことができる： ( i ) 表面上の捕捉試薬；ならびに ( i i ) 分析物に関する第 1 および第 2 の検出試薬。

30

【 0 0 5 5 】

実施形態 ( 1 1 ) および ( 1 2 ) におけるアンプリコンは、プローブ伸長後に表面上に局在化したまま残ることができ、ならびに、場合により、複合体は伸長工程後に表面に結合したまま残る。たとえば、アンプリコンは、表面上の複合体の位置の 1 0 ~ 1 0 0 μ m 内のポジションで、アンカー試薬に結合する。

40

【 0 0 5 6 】

実施形態 ( 1 1 ) および ( 1 2 ) の表面は、粒子および / またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。場合により、表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の 2 つの別個の結合ドメインに位置する。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で 2 つの別個の結合ドメインに位置する。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。

50



捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm内にあってもよい。

【0057】

実施形態(11)および(12)の表面は電極を含むことができ、測定工程は電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンス(electrochemiluminescence)シグナルを生成することを含むことができる。場合により、実施形態(11)および(12)は、粒子を電極上で採取することおよび電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンスシグナルを生成することをさらに含む。測定工程は、アンブリコンを検出可能な標識を有する検出プローブに結合させること、検出可能な標識を測定すること、および測定値を試料中の分析物の量と関連させることを含むことができ、ここで、検出プローブは、アンブリコンの領域に対して相補的である核酸配列も含む。検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。一例では、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程はECLシグナルを測定することを含むことができる。

10

【0058】

実施形態(11)および(12)の試料は1つまたはそれ以上の分析物分子を含むことができ、表面は表面上に位置する複数の解像可能な結合領域にわたって分布する1つまたはそれ以上の分析物分子に関する複数の捕捉試薬を含むことができ、方法は、(x)1つまたはそれ以上の分析物分子を、表面上の1つまたはそれ以上の捕捉試薬に結合させること；(y)各結合領域における分析物分子の存在または非存在を決定すること；ならびに(z)分析物分子を含有する結合領域の数および/または分析物分子を含有しない分析物ドメインの数を同定することを含むことができる。測定工程は、表面からの光学的なシグナルをイメージングして、複数のピクセルを含むイメージを生成することを含むことができ、各解像可能な結合領域は、イメージにおいて1つまたはそれ以上のピクセルへとマップされる。解像可能な結合領域はアレイの要素であってもよいおよび/または解像可能な結合領域は個々の粒子に単離されるように構成される。各解像可能な結合領域は、<100nLの体積を有する個々のナノ・ウェルであってもよい、例えば、ここで、少なくとも99%の結合領域はゼロまたは1つの分析物分子を含有する、少なくとも約95%の結合領域はゼロまたは1つの分析物分子を含有する、少なくとも約80%の結合領域はゼロまたは1つの分析物分子を含有する、および/または少なくとも約50%の結合領域はゼロまたは1つの分析物分子を含有する。実施形態(11)および(12)において試料中の分析物分子の濃度は、少なくとも1つまたは1つの分析物分子を含有する、結合領域の数のキャリブレーション曲線、ポアソン分布分析および/またはガウス分布分析を用いて少なくとも部分的に決定されてもよい。

20

30

【0059】

実施形態(11)および(12)では、試料は1つまたはそれ以上の分析物分子を含むことができ、表面は分析物分子に関する複数の結合試薬を各々含む複数の粒子を含むことができ、ここで、複数の粒子は複数の解像可能な結合領域にわたって分布し、方法は、(i)1つまたはそれ以上の分析物分子を、表面上の1つまたはそれ以上の結合試薬に結合させること；ならびに(ii)複数の粒子を解像可能な結合領域のアレイにわたって分布させること；ならびに(iii)分析物分子を含有する結合領域の数および/または分析物分子を含有しない結合領域の数を同定するために、各解像可能な結合領域における分析物分子の存在または非存在を決定することを含むことができる。

40

【0060】

実施形態(13)：試料中の目的の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、(a)(i)該分析物に関する捕捉試薬、および(ii)アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面；(b)第1の近接プローブを含む該分析物に関する第1の検出試薬；(c)第2の近接プローブを含む該分析物に関する第2の検出試薬；ならびに(d)(i)該第2の近接プローブに対して相補的な内部配列および(ii)該第1の近接プローブの非オー

50

オーバーラップ領域に対して相補的な２つの末端配列を含むコネクタ配列を含むキット。

【００６１】

実施形態（１４）：試料中の目的の分析物の検出のためのキットであって、１つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、（a）（i）該分析物に関する捕捉試薬、および（ii）アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面；（b）第１の近接プローブを含む該分析物に関する第１の検出試薬；（c）第２の近接プローブを含む該分析物に関する第２の検出試薬；ならびに（d）（i）第１のコネクタオリゴヌクレオチドおよび（ii）第２のコネクタオリゴヌクレオチドを含み；ここで、（x）該第１のコネクタの第１の末端および該第２のコネクタの第１の末端は、該第１の近接プローブの２つの非オーバーラップ領域に対して相補的であるならびに；（y）該第１のコネクタの第２の末端および該第２のコネクタの第２の末端は、該第１の近接プローブの２つの非オーバーラップ領域に対して相補的である、キット。

10

【００６２】

実施形態（１３）および（１４）の捕捉試薬は抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、例えば、捕捉試薬は抗体を含むことができる。同様に、第１の検出試薬は抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、例えば、第１の検出試薬は抗体を含むことができる。同様に、第２の検出試薬は抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、例えば、第２の検出試薬は抗体を含むことができる。

20

【００６３】

実施形態（１３）および（１４）の表面は、粒子および／またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。前記は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の２つの別個の結合ドメインに位置する。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で２つの別個の結合ドメインに位置する。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上で１０～１００nm内にあってもよい、ならびに場合により、表面は電極を含むことができる。

30

【００６４】

実施形態（１５）：試料中の分析物を検出する方法であって、（a）該分析物を第１および第２の検出試薬に結合させて、各検出複合体が分析物、第１の検出試薬および第２の検出試薬を含む検出複合体を形成させること、ここで、該第１の検出試薬は第１の検出可能な標識を有し、該第２の検出試薬は第２の検出可能な標識を有する、（b）大多数の反応容器が１つまたはそれ以下の分析物を含有するように、該分析物を複数の反応容器にわたって分配すること；ならびに（c）分析物分子の数を、該第１および第２の検出可能な標識を含有する反応容器の数の計数によって検出することを含むことができる方法。実施形態（１５）では、第１の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよく、例えば、第１の検出試薬は、抗体である。同様に、第２の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよく、例えば、第２の検出試薬は、抗体である。特定の例では、第１および第２の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

40

【００６５】

実施形態（１５）の工程（a）は前記分析物および前記検出試薬を含む溶液を形成させることをさらに含むことができ、工程（b）は同じ容器中の未結合の第１の検出試薬および未結合の第２の検出試薬が見出される可能性が１０のうち１未満であるように、該溶液

50

を複数の反応容器にわたって分配することを含むことができる。あるいは、実施形態(15)の工程(a)は前記分析物および前記検出試薬を含む溶液を形成させることをさらに含むことができ、工程(b)は同じ容器中の未結合の第1の検出試薬および未結合の第2の検出試薬が見出される可能性が100のうち1未満であるように、該溶液を複数の反応容器にわたって分配することを含むことができる。さらにまた、実施形態(15)の工程(a)は前記分析物および前記検出試薬を含む溶液を形成させることをさらに含むことができ、工程(b)は同じ容器中の未結合の第1の検出試薬および未結合の第2の検出試薬が見出される可能性が1000のうち1未満であるように、該溶液を複数の反応容器にわたって分配することを含むことができる。さらには、実施形態(15)の工程(a)は前記分析物および前記検出試薬を含む溶液を形成させることをさらに含むことができ、工程(b)は同じ容器中の未結合の第1の検出試薬および未結合の第2の検出試薬が見出される可能性が10000のうち1未満であるように、該溶液を複数の反応容器にわたって分配することを含むことができる。

10

#### 【0066】

実施形態(16)：試料中の分析物を検出する方法であって、(a)該分析物を捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬に結合させて、各検出複合体が捕捉試薬、分析物、第1の検出試薬および第2の検出試薬を含む検出複合体を形成させること、ここで、(i)該第1の検出試薬は第1の検出可能な標識を有し、該第2の検出試薬は第2の検出可能な標識を有する、(ii)該捕捉試薬は表面上にある；(b)大多数の反応容器が1つまたはそれ以下の分析物を含有するように、該分析物を複数の反応容器にわたって分配すること；ならびに(c)分析物分子の数を、該第1および第2の検出可能な標識を含有する反応容器の数の計数によって検出することを含む方法。この実施形態では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよく、例えば、捕捉試薬は、抗体である。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよく、例えば、第1の検出試薬は、抗体である。さらには、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよく、例えば、第2の検出試薬は、抗体である。たとえば、捕捉試薬、第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

20

30

#### 【0067】

実施形態(16)の工程(b)は、同じ容器中の未結合の第1の検出試薬および未結合の第2の検出試薬が見出される可能性が10のうち1未満であるように、該溶液を複数の反応容器にわたって分配することをさらに含むことができる。さらには、実施形態(16)の工程(b)は、同じ容器中の未結合の第1の検出試薬および未結合の第2の検出試薬が見出される可能性が1000のうち1未満であるように、該溶液を複数の反応容器にわたって分配することをさらに含むことができる。さらには、実施形態(16)の工程(b)は、同じ容器中の未結合の第1の検出試薬および未結合の第2の検出試薬が見出される可能性が10000のうち1未満であるように、該溶液を複数の反応容器にわたって分配することをさらに含むことができる。

40

#### 【0068】

実施形態(16)の検出複合体中の捕捉試薬は、捕捉試薬を分析物に結合させる前に表面上にあってもよい；または検出複合体中の捕捉試薬は、捕捉試薬を表面上に固定化する前に分析物に結合する。一例では、捕捉試薬はターゲティング部分を含むことができ、表面はターゲティング部分相補体を含むことができる。ターゲティング部分およびターゲティング因子結合パートナー(targeting agent binding partner)は以下の結合対から選択される：アビジン - ビオチン、ストレプトアビジン -

50

ビオチン、受容体 - リガンド、抗体 - 抗原、核酸 - 核酸相補体。

【 0 0 6 9 】

実施形態 ( 1 6 ) の表面は粒子である、ならびに、場合により、捕捉試薬は複数の粒子において固定化される、および分析物の分配は分析物を捕捉試薬に結合させることおよび粒子を複数の反応容器に分配することによって達成される。捕捉試薬は複数の粒子において固定化されうる、ならびに分析物の分配は粒子を複数の反応容器に分配することおよび次いで分析物を捕捉試薬に結合させることによって達成される。

【 0 0 7 0 】

実施形態 ( 1 6 ) は、複数の粒子を複数の反応容器に分配することをさらに含むことができる、ここで、複数の粒子はターゲティング部分を含み、捕捉試薬はターゲティング部分相補体を含み、分析物の分配はターゲティング部分相補体をターゲティング部分に結合させることによって達成される。実施形態 ( 1 6 ) は、分配工程前および / または分配工程後に、粒子を洗浄することも含むことができる。

10

【 0 0 7 1 】

実施形態 ( 1 6 ) の表面は、反応容器の 1 つ内の位置にあってもよい。この実施形態では、捕捉試薬は複数の反応容器の表面に固定化されうる、および分析物の分配は分析物を捕捉試薬に結合させることによって達成される。場合により、反応容器は、それに固定化されたターゲティング部分を有する表面を有する、捕捉試薬はターゲティング部分相補体を含み、分析物の分配は、ターゲティング部分相補体をターゲティング部分に結合させることによって達成される。この特定の例では、方法は、検出工程の前に、反応容器を洗浄

20

【 0 0 7 2 】

実施形態 ( 1 6 ) の複数の反応容器は、ナノウェルのアレイを含むことができる。複数の反応容器は、少なくとも 1 0 , 0 0 0 の反応容器を含むことができる。一実施形態では、反応容器は、1 0 0 n L 未満の容量を有する。場合により、5 0 % 未満の反応容器が検出時に分析物を含有する、1 0 % 未満の反応容器が検出時に分析物を含有する、1 % 未満の反応容器が検出時に分析物を含有する、および / または 0 . 1 % 未満の反応容器が検出時に分析物を含有する。

【 0 0 7 3 】

実施形態 ( 1 6 ) の一態様では、第 1 の検出可能な標識は、一組の酵素反応系の第 1 の酵素である、および第 2 の検出可能な標識は、共役酵素反応系の第 2 の酵素である、ならびに工程 ( d ) は、1 つまたはそれ以上の反応系の基質を添加すること、酵素反応系の産物を産生すること、および産物を含有する反応容器を計数することを含むことができる。この実施形態では、第 1 および第 2 の酵素が互いに 2 0 0 n M 内にある、または第 1 および第 2 の酵素が互いに 5 0 n M 内にあるなど、第 1 の酵素および第 2 の酵素が近くで近接する場合のみ、産物は産生され得る。たとえば、第 1 の酵素は酸化酵素であり、第 2 の酵素はペルオキシダーゼであり、基質は酸化酵素基質および標識 A m p l e x R e d またはルミノール誘導体を含む。この実施形態では、酸化酵素はグルコース酸化酵素であってもよい、および酸化酵素基質はグルコースである。一実施形態では、検出複合体中の第 1 および第 2 の酵素によって触媒される反応により、表面上に標識 A m p l e x R e d またはルミノールの固定化がもたらされる、ならびに、場合により、方法は、表面上で標識 A m p l e x R e d またはルミノールを測定することを含むことができる。標識 A m p l e x R e d またはルミノールは、場合により、ビオチン - A m p l e x R e d またはルミノールである、ならびに、方法は、標識ストレプトアビジンを添加することおよびストレプトアビジンにおける標識を測定することを含むことができる。

30

40

【 0 0 7 4 】

実施形態 ( 1 6 ) の工程 ( d ) は、第 1 および第 2 の検出可能な標識が同じ分析物分子に結合する場合に生成される近接依存性シグナルを測定すること、ならびに、近接依存性シグナルを産生する反応容器の数を計数することを含んでいてもよく、例えば、近接依存性シグナルは P L A - R C A によって生成される。たとえば、第 1 の検出可能な標識は F

50

R E Tドナーであってもよい、ならびに検出可能な標識はF R E Tアクセプターである、ならびに近接依存性シグナルはF R E Tドナーを励起することおよびF R E Tアクセプターからの放射を測定することによって測定される。一例では、第1および第2の検出可能な標識は、独立に測定されうる。場合により、第1および第2の検出可能な標識は、スペクトル特性に関して互いに異なる発光性標識である。一例では、第1の検出可能な標識は、第1の基質と反応して第1のシグナルを産生する第1の酵素である、ならびに、第2の検出可能な標識は、第2の基質と反応して異なる第2のシグナルを産生する第2の酵素である、ならびに、実施形態(16)の工程(d)は、第1の酵素基質および第2の酵素基質を添加することならびに第1および第2のシグナルが生成される反応容器の数を計数することを含むことができる。第1および第2のシグナルは、異なるスペクトル特性を有する光学的な吸光度における変化であってもよい。場合により、第1および第2のシグナルは、異なるスペクトル特性を有する発光シグナルである。第1および第2の酵素は、例えば、ホスファターゼ、スルファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、またはそれらの組み合わせから選択される加水分解酵素であってもよい、ならびに第1および第2の基質は、リン酸塩、硫酸塩、ガラクトシドおよびグルクロニド修飾され、安定化されているジオキセタン、4-メチルウンベリフェリル、フルオレセイン、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の例では、第1および第2の酵素は、西洋わさびペルオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、およびアルカリホスファターゼから選択される。実施形態(16)の検出工程は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、ルミネッセンス、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせを介する検出を含むことができる。

#### 【0075】

実施形態(17)：試料中の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、(a)第1の検出可能な標識を含む第1の検出試薬；(b)第2の検出可能な標識を含む第2の検出試薬；(c)1つまたはそれ以下の分析物分子を含有するように構成される複数の反応容器を含むキット。

#### 【0076】

実施形態(18)：試料中の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、(a)第1の検出可能な標識を含む第1の検出試薬；(b)第2の検出可能な標識を含む第2の検出試薬；(c)捕捉試薬を含む表面；および(d)1つまたはそれ以下の分析物分子を含有するように構成される複数の反応容器を含むキット。

#### 【0077】

実施形態(17)および(18)の第1および第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、アプタマー、またはそれらの組み合わせを含むことができる。一例では、第1および第2の検出試薬は、抗体を含む。捕捉抗体は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、例えば、捕捉抗体は抗体を含むことができる。一例では、捕捉試薬はターゲティング部分を含むことができ、表面はターゲティング部分相補体、例えば、ターゲティング部分を含むことができ、ターゲティング因子結合パートナーは以下の結合対から選択される：アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、受容体-リガンド、抗体-抗原、核酸-核酸相補体。

#### 【0078】

実施形態(17)および(18)の表面は粒子であってもよい、および、たとえば、捕捉試薬は複数の粒子に固定化される。あるいは、表面は反応容器の1つ内の位置である、および、例えば、捕捉試薬は複数の反応容器の表面に固定化される。場合により、反応容器はそれに固定化されたターゲティング部分を有する表面を有する、および捕捉試薬はターゲティング部分相補体を含む。複数の反応容器は、ナノウェルのアレイまたは油中水型エマルジョン中に分散される水滴を含むことができる。複数の反応容器は少なくとも10,000の反応容器を含むことができ、場合により、複数性の一反応容器は100nL未

10

20

30

40

50

満の容量を有する。

【0079】

実施形態(17)および(18)のキットでは、第1の検出可能な標識は、一組の酵素反応系の第1の酵素であってもよい、ならびに第2の検出可能な標識は、共役酵素反応系の第2の酵素である、ならびにキットは、1つまたはそれ以上の付加的なバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、反応系の1つまたはそれ以上の基質を含むことができる。たとえば、第1の酵素は酸化酵素であり、第2の酵素はペルオキシダーゼであり、基質は酸化酵素基質および標識Amplex Redまたはルミノール誘導体を含む。特定の実施形態では、酸化酵素はグルコース酸化酵素である、および酸化酵素基質はグルコースである。第1および第2の検出可能な標識は近接依存性システムの構成要素であってもよい、例えば、第1の検出可能な標識はFRETドナーである、および検出可能な標識はFRETアクセプターである。第1および第2の検出可能な標識は、独立に測定される。場合により、第1および第2の検出可能な標識は、スペクトル特性に関して互いに異なる発光性標識である。

10

【0080】

実施形態(17)および(18)のキットでは、第1の検出可能な標識は、第1の基質と反応して第1のシグナルを産生する第1の酵素である、ならびに第2の検出可能な標識は、第2の基質と反応して異なる第2のシグナルを産生する第2の酵素である、ならびにキットは、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、第1の酵素基質および第2の酵素基質を含むことができる。場合により、第1および第2のシグナルは、異なるスペクトル特性を有する光学的な吸光度における変化である。一例では、第1および第2のシグナルは、異なるスペクトル特性を有する発光シグナルである。第1および第2の酵素は、加水分解酵素であってもよい。一例では、第1および第2の酵素は、ホスファターゼ、スルファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、またはそれらの組み合わせから選択される。第1および第2の基質は、リン酸塩、硫酸塩、ガラクトシドおよびグルクロニド修飾され、安定化されているジオキセタン、4-メチルウンベリフェリル、フルオレセイン、またはそれらの組み合わせから選択することができる。場合により、第1および第2の酵素は、西洋わさびペルオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、およびアルカリホスファターゼから選択される。

20

【0081】

実施形態(19)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)該分析物を捕捉試薬、第1の検出可能な標識を有する第1の検出試薬および第2の検出可能な標識を有する第2の検出試薬に結合させ、複合体を形成させること、ここで、該複合体中の該捕捉試薬は表面上に固定化される；(b)該第1および第2の検出試薬を架橋して、架橋した産物を形成すること；(c)該架橋した産物を該表面から溶出剤に放出すること；(d)該第1および第2の検出可能な標識の両方を含み、該溶出剤中の個々の架橋した産物を計数することを含む方法。この例(19)では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、特定の例では、捕捉試薬は、抗体である。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよい、特定の例では、第1の検出試薬は、抗体である。さらには、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、詳細には、第2の検出試薬は、抗体であってもよい。1つの特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

30

40

【0082】

実施形態(19)は、架橋剤を添加して、第1および第2の検出試薬を架橋することをさらに含むことができ、例えば、第1および第2の検出試薬は、反応部分を含み、架橋剤は、反応部分に連結する多機能性架橋剤である。たとえば、反応部分は、アミン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド、クリック化

50

学試薬、およびそれらの組み合わせを含む。架橋剤は、アミン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド、クリック化学試薬、およびそれらの組み合わせを含むことができる。第1および第2の検出試薬は結合部分を含むことができ、架橋剤は結合部分の多価結合パートナーである。一例では、第1および第2の検出試薬は動物種の抗体である、ならびに架橋剤は動物種の多価抗種抗体ターゲティング抗体 (multivalent anti-species antibody targeting antibodies) である。第1および第2の検出試薬はビオチンを含むことができ、架橋剤はストレプトアビジンである；第1および第2の検出試薬はストレプトアビジンを含み、架橋剤はビオチンである；第1および第2の検出試薬はストレプトアビジンに連結され、架橋剤は複数のビオチン分子を含むポリマーである；および/または第1および第2の検出試薬はそれぞれ第1および第2の核酸プローブを含み、架橋剤は、第1の核酸プローブに対して相補的な配列および第2の核酸プローブに対して相補的な別個の配列を含むことができるオリゴヌクレオチドである。

#### 【0083】

実施形態(19)の表面は粒子、反応容器、例えば、チューブもしくはアンプルを含むことができ、および/または表面はマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。実施形態(19)の方法は、粒子を採取することおよび粒子を洗浄して不純物を除去することをさらに含むことができ、場合により、第1および第2の検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される。特定の例では、第1および第2の検出可能な標識はECL標識を含み、計数工程はECLシグナルを測定することを含むことができる。

#### 【0084】

実施形態(20)：試料中の目的の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、(a)固定化された捕捉試薬を含む表面；(b)第1の検出可能な標識を有する第1の検出試薬；(c)第2の検出可能な標識を有する第2の検出試薬；ならびに(d)該第1および第2の検出試薬と反応性の架橋剤を含むキット。

#### 【0085】

実施形態(20)の第1および第2の検出試薬は反応部分を含むことができ、架橋剤は反応部分に連結する多機能性架橋剤である。反応部分は、アミン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド、クリック化学試薬、およびそれらの組み合わせを含むことができる；ならびに架橋剤はアミン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド、クリック化学試薬、およびそれらの組み合わせを含むことができる。実施形態(20)の第1および第2の検出試薬は結合部分を含むことができ、架橋剤は結合部分の多価結合パートナーである、例えば、第1および第2の検出試薬は動物種の抗体である、ならびに架橋剤は動物種の多価抗種抗体ターゲティング抗体である；第1および第2の検出試薬はビオチンを含み、架橋剤はストレプトアビジンである；第1および第2の検出試薬はストレプトアビジンを含み、架橋剤はビオチンである；第1および第2の検出試薬はストレプトアビジンに連結され、架橋剤は複数のビオチン分子を含むポリマーである；および/または第1および第2の検出試薬はそれぞれ第1および第2の核酸プローブを含み、架橋剤は、第1の核酸プローブに対して相補的な配列および第2の核酸プローブに対して相補的な別個の配列を含むことができるオリゴヌクレオチドである。

#### 【0086】

実施形態(20)の表面は、粒子、マルチウェルプレートのウェル、または反応容器、例えば、チューブまたはアンプルを含むことができる。さらに、表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬は、表面上の別個の結合ドメインに位置する。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬はウェル内で別個の結合ドメインに位置する。表面は、電極も含むことができる。

## 【 0 0 8 7 】

実施形態(21)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)該分析物を捕捉試薬、第1の検出試薬および第2の検出試薬に結合させて、複合体を形成させること、ここで、該第1の検出試薬は第1の検出可能な標識および第1の核酸プローブを含むことができ、該第2の検出試薬は第2の検出可能な標識および第2の核酸プローブを含むことができ、該複合体中の該捕捉試薬は表面上に固定化される；(b)該第1および第2の検出試薬を、(i)該第1のプローブを該第2のプローブにハイブリダイズさせること、(ii)該第1および第2のプローブを該第1および第2のプローブに対して相補的な領域を有する第3の核酸にハイブリダイズさせること、または(iii)該第1および第2のプローブをライゲーションすることによって架橋すること；(c)該架橋した産物を該表面から溶出剤に放出すること；(d)該第1および第2の検出可能な標識の両方を含む、該溶出剤中の個々の架橋した産物を計数することを含む方法。

10

## 【 0 0 8 8 】

実施形態(21)の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよい、例えば、捕捉試薬は、抗体である。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、第1の検出試薬は、抗体である；第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよい、例えば、第2の検出試薬は、抗体である。特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

20

## 【 0 0 8 9 】

実施形態(21)の表面は、粒子、反応容器、例えば、チューブもしくはアンブル、またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。実施形態(21)の方法は、粒子を採取することおよび粒子を洗浄して不純物を除去することをさらに含むことができる。第1および第2の検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。特定の例では、第1および第2の検出可能な標識はECL標識を含み、計数工程はECLシグナルを測定することを含むことができる。

30

## 【 0 0 9 0 】

実施形態(22)：試料中の目的の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、(a)固定化された捕捉試薬を含む表面；(b)第1の検出可能な標識を有する第1の検出試薬および第1の核酸プローブ；(c)第2の検出可能な標識を有する第2の検出試薬および第2の核酸プローブ；ならびに(d)第1および第2の核酸プローブに対して相補的な領域を有する第3の核酸を含むキット。

## 【 0 0 9 1 】

実施形態(22)の表面は、粒子、マルチウェルプレートのウェル、または反応容器、例えば、チューブまたはアンブルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬は表面上の別個の結合ドメインに位置する、ならびに表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬はウェル内で別個の結合ドメインに位置する。表面は、場合により、電極を含むことができる。

40

## 【 0 0 9 2 】

実施形態(23)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)該分析物を捕捉試薬、第1の検出試薬および第2の検出試薬に結合させて、複合体を形成させること、ここで、該第1の検出試薬は第1の核酸プローブを含むことができ、該第2の検出試薬は第2の核酸プローブを含むことができ、該複合体中の該捕捉試薬は表面上に固定化される；(b)該第2の核酸プローブを伸長して、検出可能な標識を含む伸長配列を形成させ

50



ること（該伸長は、複合体中の該第1および第2の核酸プローブの共局在に依存的である）；（c）該伸長配列を該表面から溶出剤に放出すること；ならびに（d）該溶出剤中の個々の伸長配列を計数することを含む方法。この実施形態では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである。特定の例では、捕捉試薬は、抗体である。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであり、特定の例では、第1の検出試薬は、抗体である。第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、詳細には、第2の検出試薬は、抗体である。特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

10

#### 【0093】

実施形態（23）の表面は、粒子、反応容器、例えば、チューブもしくはアンプル；またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。実施形態（23）の方法は、粒子を採取することおよび粒子を洗浄して不純物を除去することをさらに含むことができる。

#### 【0094】

実施形態（23）の標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。特定の例では、標識はECL標識を含むことができ、計数工程はECLシグナルを測定することを含むことができる。

20

#### 【0095】

実施形態（23）の伸長工程は、プローブを鋳型核酸配列に結合させることおよびプローブをポリメラーゼ連鎖反応法によって伸長させることを含むことができる。伸長工程は、第1のプローブを鋳型核酸配列に結合させること、環状の核酸鋳型を形成させること、および環状の鋳型をローリングサークル増幅によって伸長させることも含むことができる。伸長工程は、第1のプローブを鋳型核酸配列に結合させること、第2のプローブを鋳型配列に結合させること、ならびに第1および第2のプローブをライゲーションすることを含んでいてもよい。場合により、標識は蛍光標識である、および個々の伸長配列の計数は一分子蛍光検出を含むことができ、例えば、蛍光相関分光法（fluorescence correlation spectroscopy）および/または蛍光相互相関分光法（fluorescence cross-correlation spectroscopy）を含むことができる。一分子蛍光検出は、溶出剤をキャピラリーを通して流すこと、光源をキャピラリー内のある体積に焦点を当ててインタロゲーションゾーン（interrogation zone）を作ることおよびインタロゲーションゾーンを光検出器で観察して、インタロゲーションゾーンを通した蛍光分子の通過を検出することを含むことができる。一分子蛍光検出は、溶出剤をキャピラリーを通して流すこと、光源をキャピラリー内のある体積に焦点を当ててインタロゲーションゾーンを作ることおよびインタロゲーションゾーンを光検出器で観察して、インタロゲーションゾーンを通した蛍光分子の通過を検出することも含むことができる。

30

40

#### 【0096】

実施形態（24）：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、（a）該分析物を捕捉試薬、第1の検出可能な標識を有する第1の検出試薬および第2の検出可能な標識を有する第2の検出試薬に結合させ、複合体を形成させること、ここで、該複合体中の該捕捉試薬は表面上に固定化される；（b）形成される複合体を該表面から、固定化された捕捉試薬を表面から溶出剤に解離することによって放出させること；ならびに（c）該第1および第2の検出可能な標識の両方を含む、該溶出剤中の個々の産物を計数することを含む方法。この実施形態では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、捕捉試薬は、抗体である；第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオ

50

チド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、第1の検出試薬は、抗体である；第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、第2の検出試薬は、抗体である；ならびに、特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

【0097】

実施形態(24)の表面は、粒子、反応容器、例えば、チューブおよび/もしくはアンブル、またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。実施形態(24)の方法は、粒子を採取することおよび粒子を洗浄して不純物を除去することを含むことができる。第1および第2の検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定されうる、ならびに特定の実施形態では、第1および第2の検出可能な標識はECL標識を含み、計数工程はECLシグナルを測定することを含むことができる。

10

【0098】

実施形態(25)：試料中の目的の分析物を検出する方法であって、(a)該分析物を、(i)該分析物に関する捕捉試薬を含む表面上の該捕捉試薬；(ii)第1の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第1の検出試薬、および(iii)第2の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第2の検出試薬に結合させ；それにより、結合試薬、該分析物ならびに該第1および第2の検出試薬を含む該表面上に複合体を形成させること；(b)該第1および第2のプローブが近接されることを必要とする伸長プロセスを用いて、該第2のプローブを伸長して、伸長配列を形成させること；ならびに(c)該表面に結合した伸長配列の量を測定することを含む方法。この実施形態では、捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、捕捉試薬は、抗体である；第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、第1の検出試薬は、抗体である；第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである；例えば、第2の検出試薬は、抗体である；ならびに、特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

20

30

【0099】

実施形態(25)の伸長配列は1つまたはそれ以上の検出配列を含むことができ、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の検出配列に対して相補的な複数の標識プローブと接触させることを含むことができる；伸長配列は1つまたはそれ以上の修飾塩基を含むことができ、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の修飾塩基と結合することが可能な複数の検出可能な部分と接触させることを含むことができる；および/または伸長配列は1つまたはそれ以上の標識塩基を含むことができ、測定工程は1つまたはそれ以上の標識塩基の存在を検出することを含むことができる。1つまたはそれ以上の修飾塩基はアプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープを含み、複数の検出可能な部分は1つまたはそれ以上の修飾塩基および検出可能な標識の結合パートナーを各々含む。1つまたはそれ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含むことができ、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識を各々含む；1つまたはそれ以上の修飾塩基はアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；および/または1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識を各々含む。

40

【0100】

実施形態(25)の工程(a)は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：(i)表面上の捕捉試薬；および(ii)分析物に関する検出試薬；

50

分析物を以下の種に以下の順序で結合させること：( i ) 分析物に関する検出試薬；および( i i ) 表面上の捕捉試薬；または分析物を以下の種を同時にもしくは実質的に同時に結合させること：( i ) 表面上の捕捉試薬；および( i i ) 分析物に関する検出試薬。伸長工程は、プローブを鋳型核酸配列に結合させることおよびプローブをポリメラーゼ連鎖反応法によって伸長させることを含むことができる；またはプローブを鋳型核酸配列に結合させること、環状の核酸鋳型を形成させること、および環状の鋳型をローリングサークル増幅によって伸長させること。この実施形態では、伸長されるプローブは、プローブ伸長後に表面上に局在化したまま残ることができ、例えば、複合体は伸長工程後に表面に結合したまま残る。伸長工程は、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、LCR（リガーゼ連鎖反応）、SDA（鎖置換増幅）、3SR（自己持続合成反応）、または等温性の増幅方法を含むことができる。特定の例では、伸長工程は、等温性の増幅方法、例えば、ヘリカーゼ依存的な増幅またはローリングサークル増幅（RCA）を含むことができる。

10

#### 【0101】

実施形態（25）の伸長プロセスは、工程（a）において形成される複合体を、( i ) 第2のプローブに対して相補的な内部配列および( i i ) 第1のプローブの非オーバーラップ領域に対して相補的な2つの末端配列を含むコネクタ配列と接触させることを含むことができる。プロセスは、コネクタオリゴヌクレオチドの2つの末端配列をライゲーションして、第1および第2のプローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させることをさらに含むことができる。実施形態（25）の伸長プロセスは、工程（a）において形成される複合体を、第1のプローブの第1の領域および第2のプローブにおける第1の領域に対して相補的な第1のコネクタプローブ配列を含む第1のコネクタオリゴヌクレオチド配列、ならびに第1のプローブの第2の非オーバーラップ領域および第2のプローブの第2の非オーバーラップ領域に対して相補的な第2のプローブ配列を含む第2のコネクタオリゴヌクレオチドと接触させることも含むことができる。プロセスは、第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドをライゲーションして、第1および第2のプローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させることも含むことができる。

20

#### 【0102】

実施形態（25）の表面は、粒子またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する、表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。表面は電極を含むことができ、測定工程は電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンス（electrochemiluminescence）シグナルを生成することを含むことができる。方法は、場合により、粒子を電極上で採取することおよび電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンスシグナルを生成することを含む。測定工程は、伸長配列を検出可能な標識を有する検出プローブに結合させること、検出可能な標識を測定すること、および測定値を試料中の分析物の量と相関させることをさらに含んでもよく、ここで、検出プローブは、伸長配列の領域に対して相補的である核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。特定の例では、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程はECLシグナルを測定することを含むことができる。

30

40

#### 【0103】

実施形態（26）：試料中の目的の分析物の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、( a ) 該分析物に関する捕捉試薬を含む表面；( b ) 第1の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第1の

50

検出試薬；ならびに（c）第2の核酸プローブに連結された、該分析物に関する第2の検出試薬を含むキット。

【0104】

実施形態（26）の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、例えば、捕捉試薬は、抗体を含むことができる；第1の検出試薬は抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、例えば、第1の検出試薬は抗体を含むことができる；第2の検出試薬は抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、例えば、第2の検出試薬は抗体を含むことができる；ならびに表面は、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する；ならびに表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する。場合により、表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する、表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。表面は、電極を含むことができる。

10

【0105】

実施形態1～26の表面は、アッセイ容器、例えば、試験管、キュベット、フローセル、FACSセルソーター、カートリッジ、またはマルチウェルプレートのウェルの内部表面を含むことができる。表面は、スライド、アッセイチップ、またはアッセイアレイ；ピン、プローブ、ビーズ、または濾過培地；ラテラルフローメディア（lateral flow media）、例えば、濾過膜も含むことができる。

20

【0106】

実施形態（27）：1つまたはそれ以上の分析物分子を含む試料中の目的の分析物を検出する方法であって、（a）該試料を、表面上に位置する複数の解像可能な結合領域を含む該表面と接触させること（各解像可能な結合領域は該試料中の1つまたはそれ以上の分析物分子に関する複数の捕捉試薬を含む）；（b）1つまたはそれ以上の分析物分子を、（i）該表面上の1つまたはそれ以上の捕捉試薬に結合させること；（ii）第1の検出可能な標識を含む該分析物に関する第1の検出試薬、および（iii）第2の検出可能な標識を含む該分析物に関する第2の検出試薬；それにより、該捕捉試薬、該分析物ならびに該第1および第2の検出試薬を含む該表面上の解像可能な結合ドメインにおいて検出複合体を形成させること、ここで、該第1および第2の検出可能な標識は異なる標識化合物である；（c）各結合領域における該分析物分子の存在または非存在を決定すること；ならびに（d）該分析物分子を含有する結合領域の数および/または該分析物分子を含有しない結合領域の数を同定することを含む方法。同定工程は、表面からの光学的なシグナルをイメージングして、複数のピクセルを含むイメージを生成することを含むことができ、各解像可能な結合領域は、イメージにおいて1つまたはそれ以上のピクセルへとマップされる。解像可能な結合領域は、アレイの要素であってもよいおよび/または個々の粒子に単離されるように構成されてもよい。各解像可能な結合領域は<100 nLの体積を有する個々のナノ・ウェルであってもよいおよび/または少なくとも99%の結合領域はゼロまたは1つの分析物分子を含有する；少なくとも約95%の結合領域は、ゼロまたは1つの分析物分子を含有する；少なくとも約80%の結合領域は、ゼロまたは1つの分析物分子を含有する；あるいは、少なくとも約50%の結合領域は、ゼロまたは1つの分析物分子を含有する。試料中の分析物分子の濃度は、少なくとも1つまたは1つの分析物分子を含有する、結合領域の数のキャリブレーション曲線、ポアソン分布分析および/またはガウス分布分析を用いて少なくとも部分的に決定されてもよい。

30

40

【0107】

実施形態（27）の表面は分析物分子に関する複数の結合試薬を各々含む複数の粒子を

50

含むことができ、ここで、複数の粒子は複数の解像可能な結合領域にわたって分布する、方法は、( i ) 1 つまたはそれ以上の分析物分子を、表面上の 1 つまたはそれ以上の捕捉試薬、ならびに 1 つまたはそれ以上の分析物分子の各々に関する第 1 および第 2 の検出試薬に結合させること、ここで、第 1 および第 2 の検出試薬はそれぞれ第 1 および第 2 の検出可能な標識を含む；( i i ) 複数の粒子を解像可能な結合領域のアレイにわたって分布させること；ならびに( i i i ) 分析物分子を含有する結合領域の数および / または分析物分子を含有しない結合領域の数を同定するために、各解像可能な結合領域における分析物分子の存在または非存在を決定することを含むことができ、ここで、場合により、各解像可能な結合領域は  $< 100 \text{ nL}$  の体積を有する個々のナノ - ウェルであるおよび / または少なくとも 99 % の結合領域はゼロまたは 1 つの分析物分子を含有する；少なくとも約 95 % の結合領域は、ゼロまたは 1 つの分析物分子を含有する；少なくとも約 80 % の結合領域は、ゼロまたは 1 つの分析物分子を含有する；および / または少なくとも約 50 % の結合領域は、ゼロまたは 1 つの分析物分子を含有する。

10

**【 0 1 0 8 】**

実施形態 ( 2 7 ) における捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、捕捉試薬は、抗体である。第 1 の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、第 1 の検出試薬は、抗体である；第 2 の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、第 2 の検出試薬は、抗体である。特定の例では、捕捉試薬ならびに第 1 および第 2 の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

20

**【 0 1 0 9 】**

実施形態 ( 2 7 ) の工程 ( a ) は、分析物を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：( i ) 表面上の捕捉試薬；および ( i i ) 分析物に関する第 1 および第 2 の検出試薬；分析物を以下の種に以下の順序で結合させること：( i ) 分析物に関する第 1 および第 2 の検出試薬；および ( i i ) 表面上の捕捉試薬；または分析物を以下の種を同時にもしくは実質的に同時に結合させること：( i ) 表面上の捕捉試薬；および ( i i ) 分析物に関する第 1 および第 2 の検出試薬。

**【 0 1 1 0 】**

30

実施形態 ( 2 7 ) の表面は、粒子またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。特定の例では、表面は電極を含むことができ、同定工程は電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンス ( e l e c t r o c h e m i l u m i n e s c e ) シグナルを生成することを含むことができる。実施形態 ( 2 7 ) の方法は、粒子を電極上で採取することおよび電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンスシグナルを生成することをさらに含むことができる。第 1 の検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される；および / または第 2 の検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される。第 1 および第 2 の検出可能な標識は独立に測定することができる、一例では、第 1 および第 2 の検出可能な標識はスペクトル特性に関して互いに異なる発光性標識である。

40

**【 0 1 1 1 】**

実施形態 ( 2 7 ) の表面は、アッセイ容器、例えば、試験管、キュベット、フローセル、FACSセルソーター、カートリッジ、またはマルチウェルプレートのウェルの内部表面を含むことができる。表面は、スライド、アッセイチップ、またはアッセイアレイ；ピン、プローブ、ビーズ、または濾過培地；ラテラルフローメディア、例えば、濾過膜も含むことができる。

**【 0 1 1 2 】**

50

実施形態(28): 1つまたはそれ以上の分析物分子を含む試料中の目的の分析物を検出するためのキットであって、(a)表面上に位置する複数の解像可能な結合領域を含む表面(各解像可能な結合領域は該試料中の1つまたはそれ以上の分析物分子に関する複数の捕捉試薬を含む);(b)第1の検出可能な標識を含む該分析物に関する第1の検出試薬;ならびに(c)第2の検出可能な標識を含む該分析物に関する第2の検出試薬を含み;ここで、該第1および第2の検出可能な標識は、異なる標識化合物である、キット。

#### 【0113】

実施形態(28)の解像可能な結合領域は、アレイの要素であってもよいおよび/または個々の粒子に単離されるように構成されてもよい。各解像可能な結合領域は、場合により、 $<100\text{ nL}$ の体積を有する個々のナノ・ウェルである。表面は分析物分子に関する複数の結合試薬を各々含む複数の粒子を含むことができ、ここで、複数の粒子は複数の解像可能な結合領域にわたって分布する、キットは、1つまたはそれ以上の分析物分子の各々に関する第1および第2の検出試薬を含むことができ、ここで、第1および第2の検出試薬はそれぞれ第1および第2の検出可能な標識を含む。

#### 【0114】

実施形態(28)における捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、捕捉試薬は、抗体である。第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、第1の検出試薬は、抗体である;第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、第2の検出試薬は、抗体である。特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、分析物に対する抗体である。

#### 【0115】

実施形態(28)の表面は、粒子またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。特定の例では、表面は電極を含むことができ、同定工程は電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンス(electrochemiluminescence)シグナルを生成することを含むことができる。第1の検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される;および/または第2の検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される。第1および第2の検出可能な標識は独立に測定することができる、一例では、第1および第2の検出可能な標識はスペクトル特性に関して互いに異なる発光性標識である。

#### 【0116】

実施形態(28)の表面は、アッセイ容器、例えば、試験管、キュベット、フローセル、FACSセルソーター、カートリッジ、またはマルチウェルプレートのウェルの内部表面を含むことができる。表面は、スライド、アッセイチップ、またはアッセイアレイ;ピン、プローブ、ビーズ、または濾過培地;ラテラルフローメディア、例えば、濾過膜も含むことができる。

#### 【0117】

実施形態(29): 試料中のHIV p24を検出する方法であって、(a)HIV p24を、(i)HIV p24に関する捕捉試薬を含む表面上の該捕捉試薬、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬;(ii)第1の核酸プローブに連結された、HIV p24に関する第1の検出試薬;ならびに(iii)第2の核酸プローブに連結された、HIV p24に関する第2の検出試薬に結合させ;それにより、結合試薬、HIV p24ならびに該第1および第2の検出試薬を含む該表面上に複合体を形成させること;(b)該第1および第2のプローブが近接されることを必要とする伸長プロセスを用いて、該第2のプローブを伸長して、該アンカー配列に対して相補的であるア

ンカー配列相補体を含む伸長配列を形成させること；（c）該アンカー配列を該アンカー配列相補体にハイブリダイズさせること；ならびに（d）該表面に結合した伸長配列の量を測定することを含む方法。

【0118】

実施形態（29）の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよい。特定の例では、捕捉試薬は、抗体である。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであり、特定の例では、第1の検出試薬は、抗体である。第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーであってもよく、特定の例では、第2の検出試薬は、抗体である。より詳細には、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、HIV p24に対する抗体である。

10

【0119】

実施形態（29）では、アンカーオリゴヌクレオチド配列は、1本鎖オリゴヌクレオチド配列または2本鎖オリゴヌクレオチド配列を含むことができる。この実施形態では、伸長配列は1つまたはそれ以上の検出配列を含むことができ、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の検出配列に対して相補的な複数の標識プローブと接触させることを含むことができる。伸長配列は1つまたはそれ以上の修飾塩基も含むことができ、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の修飾塩基と結合することが可能な複数の検出可能な部分と接触させることを含むことができる。伸長配列は1つまたはそれ以上の標識塩基をさらに含むことができ、測定工程は1つまたはそれ以上の標識塩基の存在を検出することを含むことができる。1つまたはそれ以上の修飾塩基はアプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープを含むことができ、複数の検出可能な部分は1つまたはそれ以上の修飾塩基および検出可能な標識の結合パートナーを各々含む。たとえば、1つまたはそれ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識を各々含む；1つまたはそれ以上の修飾塩基はアビジンを含み、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；および/または1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含み、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識を各々含む。

20

30

【0120】

実施形態（29）の工程（a）は、HIV p24を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：（i）表面上の捕捉試薬；および（ii）HIV p24に関する検出試薬。あるいは、工程（a）は、HIV p24を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：（i）HIV p24に関する検出試薬；および（ii）表面上の捕捉試薬；または工程（a）は、HIV p24を以下の種を同時にもしくは実質的に同時に結合させることを含むことができる：（i）表面上の捕捉試薬；および（ii）HIV p24に関する検出試薬。

【0121】

40

実施形態（29）の伸長工程は、プローブを鋳型核酸配列に結合させることおよびプローブをポリメラーゼ連鎖反応法によって伸長させることを含むことができる。伸長工程は、プローブを鋳型核酸配列に結合させること、環状の核酸鋳型を形成させること、および環状の鋳型をローリングサークル増幅によって伸長させることをさらに含むことができる。伸長されるプローブは、プローブ伸長後に表面上に局在化したまま残ることができ、例えば、複合体は伸長工程後に表面に結合したまま残る。伸長されるプローブは、表面上の複合体の位置の10～100 μm内のポジションで、アンカー試薬に結合されてもよい。伸長工程は、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、LCR（リガーゼ連鎖反応）、SDA（鎖置換増幅）、3SR（自己持続合成反応）、または等温性の増幅方法を含むことができる。特定の例では、伸長工程は、等温性の増幅方法を含むことができ、例えば、ヘリ

50

カーゼ依存的な増幅またはローリングサークル増幅（RCA）である。

【0122】

実施形態（29）の伸長プロセスは、工程（a）において形成される複合体を、（i）第2のプローブに対して相補的な内部配列および（ii）第1のプローブの非オーバーラップ領域に対して相補的な2つの末端配列を含むコネクタ配列と接触させることを含むことができる。方法は、コネクタオリゴヌクレオチドの2つの末端配列をライゲーションして、第1および第2のプローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させることをさらに含むことができる。あるいは、伸長プロセスは、実施形態（29）の工程（a）において形成される複合体を、第1のプローブの第1の領域および第2のプローブにおける第1の領域に対して相補的な第1のコネクタプローブ配列を含む第1のコネクタオリゴヌクレオチド配列、ならびに第1のプローブの第2の非オーバーラップ領域および第2のプローブの第2の非オーバーラップ領域に対して相補的な第2のプローブ配列を含む第2のコネクタオリゴヌクレオチドと接触させること；ならびに、場合により、第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチドをライゲーションして、第1および第2のプローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させることを含むことができる。

10

【0123】

実施形態（29）の表面は、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する。表面は複数の別個の結合ドメインも含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10～100nm内にあってもよい。特定の例では、表面は電極を含むことができ、測定工程は電位波形を適用して、エレクトロケミルミネッセンス（electrochemiluminescence）シグナルを生成することを含むことができ、場合により、実施形態（29）の方法は、粒子を電極上で採取することおよび電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンスシグナルを生成することをさらに含む。

20

30

【0124】

実施形態（29）の測定工程は、伸長配列を検出可能な標識を有する検出プローブに結合させること、検出可能な標識を測定すること、および測定値を試料中のp24の量と関連させることを含むことができ、ここで、検出プローブは、伸長配列の領域に対して相補的である核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定することができる。特定の例では、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程はECLシグナルを測定することを含むことができる。

【0125】

40

実施形態（30）：試料中のHIV p24の検出のためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、（a）（i）HIV p24に関する捕捉試薬、および（ii）アンカーオリゴヌクレオチド配列を含むアンカー試薬を含む表面；（b）第1の核酸プローブに連結された、HIV p24に関する第1の検出試薬；ならびに（c）第2の核酸プローブに連結された、HIV p24に関する第2の検出試薬を含むキット。

【0126】

実施形態（30）の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、特定の例では、捕捉試薬は、抗体を含むことができる。同様に、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リ

50



ガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、特定の例では、第1の検出試薬は、抗体を含むことができる。類似して、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーを含むことができ、特定の例では、第2の検出試薬は、抗体を含むことができる。

【0127】

実施形態(30)の表面は、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する；および/または、表面がウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10~100nm内にあってもよい。特定の例では、表面は、電極を含むことができる。

【0128】

実施形態(31)：試料中のHIV p24を検出する方法であって、(a) HIV p24を、(i) 捕捉試薬を含む表面上のHIV p24に関する該捕捉試薬、およびアンカー試薬；(ii) 第1の近接プローブを含む、HIV p24に関する第1の検出試薬、および(iii) 第2の近接プローブを含む、HIV p24に関する第2の検出試薬に結合させ；それにより、該捕捉試薬、HIV p24ならびに該第1および第2の検出試薬を含む該表面上に検出複合体を形成させること；(b)(c)において形成される該検出複合体を、(i) 該第2の近接プローブに対して相補的な内部配列および(ii) 該第1の近接プローブの非オーバーラップ領域に対して相補的な2つの末端配列を含むコネクター配列と接触させること；(c) 該コネクター配列を該第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせること；(d) コネクターオリゴヌクレオチドの2つの末端配列をライゲーションして、該第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させること；(e) 該第2の近接プローブを該標的配列のローリングサークル増幅によって伸長させて、該アンカー試薬に結合する結合ドメインを含むアンプリコンを生成すること；(f) 該アンプリコンを該アンカー試薬に結合させること；ならびに(g) 該表面上のアンプリコンの量を測定することを含む方法。

【0129】

実施形態(32)：試料中のHIV p24を検出する方法であって、(a) HIV p24を：(i) 捕捉試薬を含む表面上のHIV p24に関する該捕捉試薬、およびアンカー試薬；(ii) 第1の近接プローブを含む、HIV p24に関する第1の検出試薬、および(iii) 第2の近接プローブを含む、HIV p24に関する第2の検出試薬に結合させ；それにより、該捕捉試薬、HIV p24ならびに該第1および第2の検出試薬を含む該表面上に検出複合体を形成させること；(b)(c)において形成される検出複合体を、第1のコネクターオリゴヌクレオチドおよび第2のコネクターオリゴヌクレオチドと接触させること、ここで、(i) 該第1のコネクターの第1の末端および該第2のコネクターの第1の末端は、該第1の近接プローブの2つの非オーバーラップ領域に対して相補的であるならびに(ii) 該第1のコネクターの第2の末端および該第2のコネクターの第2の末端は、該第1の近接プローブの2つの非オーバーラップ領域に対して相補的である；(c) 該第1および第2のコネクターオリゴヌクレオチドを該第1および第2の近接プローブにハイブリダイズさせること；(d) 該第1および第2のコネクターオリゴヌクレオチドをライゲーションして、該第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状の標的配列を形成させること；(e) 該第2の近接プローブを該標的配列のローリングサークル増幅によって伸長させて、該アンカー試薬に結合する結合ドメインを含むアンプリコンを生成すること；(f) 該アンプリコンを該アンカー試薬に結

合させること；ならびに（g）該表面上のアンプリコンの量を測定することを含む方法。

#### 【0130】

実施形態（31）および（32）の捕捉試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、特定の例では、捕捉試薬は、抗体である。類似して、第1の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、第1の検出試薬は、抗体である。さらに、第2の検出試薬は、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミミトープ、またはアプタマーである、例えば、第2の検出試薬は、抗体である。実施形態（31）および（32）の特定の例では、捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬は、HIV p24に対する抗体である。

10

#### 【0131】

実施形態（31）および（32）のアンカー試薬は、オリゴヌクレオチド配列、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープを含むことができる。一例では、結合ドメインはアプタマーを含むことができ、アンカー試薬はアプタマーリガンドを含むことができる。結合ドメインは核酸配列を含むことができ、アンカー試薬はDNA結合タンパク質を含むことができる；および/またはアンカー試薬はオリゴヌクレオチド配列を含むことができ、アンプリコンは相補的なオリゴヌクレオチド配列を含むことができる。

20

#### 【0132】

実施形態（31）および（32）のアンプリコンは1つまたはそれ以上の検出配列を含むことができ、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の検出配列に対して相補的な複数の標識プローブと接触させることを含むことができる。さらには、アンプリコンは1つまたはそれ以上の修飾塩基をさらに含んでもよく、測定工程は伸長配列を1つまたはそれ以上の修飾塩基と結合することが可能な複数の検出可能な部分と接触させることを含むことができる。さらにまた、アンプリコンは1つまたはそれ以上の標識塩基をさらに含んでもよく、測定工程は1つまたはそれ以上の標識塩基の存在を検出することを含むことができる。1つまたはそれ以上の修飾塩基はアプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープを含むことができ、複数の検出可能な部分は1つまたはそれ以上の修飾塩基および検出可能な標識の結合パートナーを各々含む。1つまたはそれ以上の修飾塩基はストレプトアビジンを含むことができ、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含むことができ、複数の検出可能な部分はストレプトアビジンおよび検出可能な標識を各々含む；1つまたはそれ以上の修飾塩基はアビジンを含むことができ、複数の検出可能な部分はビオチンおよび検出可能な標識を各々含む；および/または1つまたはそれ以上の修飾塩基はビオチンを含むことができ、複数の検出可能な部分はアビジンおよび検出可能な標識を各々含む。

30

#### 【0133】

実施形態（31）および（32）の工程（a）は、HIV p24を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：（i）表面上の捕捉試薬；および（ii）HIV p24に関する第1および第2の検出試薬。あるいは、工程（a）は、HIV p24を以下の種に以下の順序で結合させることを含むことができる：（i）HIV p24に関する第1および第2の検出試薬；および（ii）表面上の捕捉試薬。さらにまた、工程（a）は、HIV p24を以下の種を同時にもしくは実質的に同時に結合させることを含むことができる：（i）表面上の捕捉試薬；および（ii）HIV p24に関する第1および第2の検出試薬。

40

#### 【0134】

実施形態（31）および（32）のアンプリコンは、プローブ伸長後に表面上に局在化したまま残る。複合体は、伸長工程後に表面に結合したまま残ることができる。たとえば、アンプリコンは、表面上の複合体の位置の10～100μm内のポジションで、ア

50

ンカー試薬に結合する。

【0135】

実施形態(31)および(32)の表面は、粒子および/またはマルチウェルプレートのウェルを含むことができる。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で2つの別個の結合ドメインに位置する。表面は複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する。表面がプレートのウェルである場合、ウェルは複数の別個の結合ドメインを含むことができ、捕捉試薬およびアンカー試薬はウェル内で同じ結合ドメインに位置する。特定の例では、捕捉試薬およびアンカー試薬は、表面上で10~100nm内にある。

10

【0136】

さらにまた、表面は電極を含むことができ、測定工程は電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンス(electrochemiluminescence)シグナルを生成することを含むことができる。これらの実施形態((31)および(32))では、方法は、粒子を電極上で採取することおよび電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンスシグナルを生成することをさらに含むことができる。測定工程は、アンブリコンを検出可能な標識を有する検出プローブに結合させること、検出可能な標識を測定すること、および測定値を試料中の分析物の量と関連させることを含むことができ、ここで、検出プローブは、アンブリコンの領域に対して相補的である核酸配列を含む。検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせの測定によって測定される。たとえば、検出可能な標識はECL標識であり、測定工程はECLシグナルを測定することを含むことができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0137】

【図1a】免疫アッセイにおける固定試薬の使用を説明する図である。図1(a)は、捕捉試薬、目的的分析物、および核酸プローブを含む検出試薬を含む検出複合体に結合し安定化させるための固定試薬の使用を示す。核酸プローブは伸長して固定試薬に結合される。

30

【図1b】免疫アッセイにおける固定試薬の使用を説明する図である。図1(b)では、固定試薬は、検出試薬上に形成される伸長された配列の一部分に相補的な領域を含むオリゴヌクレオチド配列を含んでいる。

【図1c】免疫アッセイにおける固定試薬の使用を説明する図である。図1(c)は、それぞれに核酸プローブを含む2つの検出試薬を使用して分析物に結合する、特定の実施形態を示す図である。検出試薬上のプローブには増幅プロセスが適用され、伸長したプローブの1つがアンカーオリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能となる。

【図2a】図2(a)は、固定試薬を有する表面上で形成された免疫複合体にPLA-RCAプロセスを適用し、免疫複合体に結合した伸長配列内に複数の検出可能な種を組み入れる、特定の実施形態を示す図である。

40

【図2b】図2(b)は連結オリゴヌクレオチドの2つの代替構成の図である。

【図2c】図2(c)は連結オリゴヌクレオチドの2つの代替構成の図である。

【図3】タンパク質にオリゴヌクレオチドを取り付ける一方法を示す図である。

【図4a】図4(a)は、表面の境界複合体が、捕捉試薬、分析物、および2つの検出試薬の間で形成されており、検出試薬各々には、第1および第2近接プローブにそれぞれ結合しており、これら近接プローブはコネクタプローブにライゲートして、ローリングサークル増幅により増幅される環状DNA鋳型を形成する、本発明の好ましい実施形態を示す図である。Circ-1(配列番号4);Circ-2(配列番号5);PP1(配列番号1(ポリA末端切断));PP2(配列番号2)。図4(a)は、さらにアッセイが

50

進行するにつれ生じるアンプリコンの配列に相補的な固定オリゴヌクレオチド配列を有する増幅試薬を含んでいる。

【図4b】図4(b)は環状DNA鋳型Circ-1の例示的な配列(配列番号4)を示す。この配列は検出オリゴヌクレオチド配列、アンプリコンの不活性領域および、および第2近接プローブにハイブリダイズするPP2部分を有する。

【図4c】図4(c)は、Circ-1(配列番号4)およびCirc-2(配列番号5)が、P1b+P1a(配列番号1)およびP2a+P2b(配列番号2)にハイブリダイズする実施形態を示す図である。

【図5】ローリングサークル増幅により増幅できるアンプリコンを生成する代替方法を説明する図である。

10

【図6a】ローリングサークル増幅により増幅できるアンプリコンを生成する代替方法を説明する図である。

【図6b】ローリングサークル増幅により増幅できるアンプリコンを生成する代替方法を説明する図である。

【図7】サンドイッチ複合体において、近接プローブの各々の一部分が、各セグメントにハイブリダイズさせたRNAの短鎖により一時的に保護される、別の実施形態を説明する図である。これら鎖は、近接プローブが互いにハイブリダイズできるよう、また鎖が伸長できるよう酵素で除去される。

【図8】捕捉試薬および検出試薬に近接プローブが結合され、図7で記述したように各近接プローブの一部分が、そこへハイブリダイズしたRNAの短鎖により一時的に保護される、さらなる実施形態を示す図である。

20

【図9】実施例1に記述した方法を使用して導出したIL-10アッセイの検量線を示す図である。

【図10】(a)~(b)は、固定試薬を使用した場合(a)と使用しない場合(b)の蛍光顕微鏡画像を示す写真である。

【図11a】図11(a)は、ライゲーション部位1または2を含む単一の線状コネクタ-オリゴヌクレオチド配列の構成と、アッセイにおけるこれらコネクタ-の使用を示す図である。Circ-1(配列番号4);Circ-2(配列番号5);近接プローブ1(配列番号1);近接プローブ2(配列番号2)。

【図11b】図11(b)は、Circ-1およびCirc-2の組み合わせを使用したアッセイと、ライゲーション部位1を有する単一の線状コネクタ-オリゴヌクレオチド配列、またはライゲーション部位2を有する単一の線状コネクタ-オリゴヌクレオチド配列のいずれかを使用したアッセイの比較である。

30

【図12】実施例1および6に記述した方法を使用して導出したHIV p24アッセイの検量線である。

【図13】実施例1および6に記述した方法を使用した、セロコンバージョンパネルの分析の結果を示すである。

【発明を実施するための形態】

【0138】

本明細書において他に定義しない限り、本発明に関連する科学的および技術的な用語は、当業者により広く理解される意味を有するものとする。さらに、文脈によって他に必要とされない限り、単数形は複数形を含み、複数形は単数形を含むものとする。本明細書において使用される冠詞の「a」および「an」はその冠詞の文法上の目的格の1つまたは複数(つまり少なくとも1つ)について言及する。例として、「要素(an element)」は、1つの要素または複数の要素を意味する。

40

【0139】

本発明は(i)アッセイにおいて使用される標的分析物および1つまたはそれ以上の分析物結合試薬間で形成される検出複合体をアンカーすること;および/または(ii)標識した検出複合体からのシグナルを増幅することを含む、改良された免疫アッセイを含む。アンカーは、低結合親和性の相互作用および/または高分子量標識もしくはは標識部位を

50

含む複合体を安定させるために使用してもよい。シグナルの増幅は、伸長プローブを複数の標識または検出標識部位を含む結合複合体に付着させることによって実現でき、そのことによって個々の検出複合体の各々についての検出可能なシグナルを増幅する。好ましい実施形態において、複数の標識または検出標識部位を含む伸長プローブを検出複合体に付着させること、および複合体が表面に確実に保持されるように、複合体を表面にアンカーすることが方法に含まれる。この改変アッセイは、非常に低い数の結合事象を検出するために使用することができ、個々の分析物結合試薬複合体であってもそれが可能である。基本的なアプローチは免疫アッセイに限られることはなく、結合試薬の他のクラスを用いた結合アッセイを行うことにも使用することができる。

#### 【0140】

結合アッセイを改善するために使用できる1つの方法は、表面に結合させたアンカー試薬を使用して目的の分析物を含む検出複合体を表面に接着させることおよび検出複合体を安定化させることである。このアプローチは検出複合体を形成する試薬間の低結合親和性を克服するためおよび/または複合体がその後のプロセスの前に表面から解離することを防ぐために使用してもよい。結合アッセイにおけるアンカー試薬の使用について、図1(a)に図示した。表面(101)には、分析物Aに結合する捕捉試薬(102)、およびアンカー試薬(103)が含まれる。1つまたはそれ以上の工程において、分析物は捕捉試薬およびさらに分析物に結合する検出試薬(104)に結合する。ここで、検出試薬は核酸プローブ(105)に連結している。分析物は捕捉試薬および検出試薬に同時にまたは実質的に同時に結合することができるか、あるいは分析物は捕捉試薬および検出試薬に(いずれかの順序において)順次に結合することができる。したがって、複合体(106)は、捕捉試薬、分析物、および検出試薬を含む表面上に形成される。プローブは伸長され、アンカー試薬に結合するアンカー領域を含む伸長配列(107)を形成する。伸長配列はアンカー試薬に結合し、表面に結合した伸長配列の量が測定される。

#### 【0141】

結合アッセイの分野の当業者は、本方法において使用してもよい捕捉試薬および対応する結合パートナーの範囲を容易に理解する。そのような対の非限定的なリストとして、(いずれかの順序において)受容体/リガンドの対、抗体/抗原、天然または合成受容体/リガンドの対、ハプテン/抗体の対、抗原/抗体の対、エピトープ/抗体の対、ミミトープ(mimotope)/抗体の対、アプタマー/標的分子の対、ハイブリダイゼーションパートナーおよびインターカレーター/標的分子の対が挙げられる。1つの実施形態において、結合アッセイは、抗体または他の受容体タンパク質を目的の分析物の捕捉試薬および/または検出試薬として使用する。用語「抗体」は、インタクトな抗体分子(インビトロで抗体サブユニットの再会合によって構築されたハイブリッド抗体を含む)、抗体断片および抗体の抗原結合ドメインを含む組み換えタンパク質コンストラクト(例えばPorter, R. R. およびWeir, R. C. J. Cell Physiol., 67(補足); 51~64頁(1966)ならびにHochman, I. Inbar, D. およびGivol, D. Biochemistry 12: 1130頁(1973)に記載のような)、ならびに、例えば検出可能な標識の導入による、化学的に修飾した抗体コンストラクトを含む。

#### 【0142】

同様に、アンカー試薬および対応するアンカーメンバーまたは領域には、任意の適切な結合の対、例えば、受容体/リガンドの対、抗体/抗原、天然または合成受容体/リガンドの対、ハプテン/抗体の対、抗原/抗体の対、エピトープ/抗体の対、ミミトープ/抗体の対、アプタマー/標的分子の対、ハイブリダイゼーションパートナーおよびインターカレーター/標的分子の対、ならびに静電気帯電により結合した表面およびアンカー試薬の使用が含まれてもよい。例えば、アンカー試薬は、オリゴヌクレオチド配列、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミメトープ(mimotope)であってよく、および対応するアンカー領域にはそれぞれ、相補オリゴヌクレオチド配列、アプタマーリガンド、アプタマー、抗原、抗体、受

10

20

30

40

50

容体、リガンド、または抗体を含む。1つの特定の実施形態として、アンカー領域はオリゴヌクレオチド配列であって、アンカー試薬はDNA結合タンパク質を含む。代替的には、アンカー領域が二重鎖オリゴヌクレオチド配列であるならば、アンカー試薬はインターカレーターを含んでもよい。さらなる実施形態として、アンカー領域は1つまたはそれ以上の修飾オリゴヌクレオチド塩基を含み、対応するアンカー試薬はアンカー領域上の修飾塩基に結合する1つまたはそれ以上の部分を含む。例えば、修飾塩基にはハプテンまたはリガンドを含んでもよく、対応するアンカー試薬にはそれぞれ、ハプテンまたはリガンドに特異的な1つまたはそれ以上の抗体またはリガンドを含んでもよい。さらに、アンカー領域は、検出複合体を検出するために使用することができる多数の標識ヌクレオチド塩基を含んでもよい。

10

#### 【0143】

図1(b)において示した特定の実施形態において、表面に結合したアンカー試薬には、検出複合体を表面にアンカーするために使用されるオリゴヌクレオチドを含んでもよい。アンカーオリゴヌクレオチド配列は、検出複合体に付着した相補的なオリゴヌクレオチド配列に結合する。この実施形態において、表面(108)は、分析物、Aに結合する捕捉試薬(109)、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列(111)を含むアンカー試薬(110)を含む。1つまたはそれ以上の工程において、分析物は捕捉試薬およびさらに分析物に結合する検出試薬(112)に結合する。ここで、検出試薬は核酸プローブ(113)に連結している。図1(a)において前に記載したように、分析物は捕捉試薬および検出試薬に同時にもしくは実質的に同時に結合することができるか、または分析物は各々の捕捉試薬および検出試薬に(いずれかの順序において)順次に結合することができる。したがって、複合体(114)は、結合試薬、分析物、および検出試薬を含む表面上において形成される。プローブは伸長され、アンカー配列に相補的であるアンカー配列相補体を含む伸長配列(115)を形成する。アンカー配列はアンカー配列相補体にハイブリダイズし、表面に結合した伸長配列の量が測定される。

20

#### 【0144】

検出複合体は1つまたはそれ以上の検出試薬を、例えば分析物に対するアッセイの特異性を増強させるために含ませることができる。例えば、各々の検出試薬が分析物に接近している場合に検出可能なシグナルを発信するようにアッセイが設計されているか、または分析物に結合した単体の検出試薬からのシグナルが、分析物に結合した複数の検出試薬から発信したシグナルと区別できるのであれば、複数の検出試薬を使用することにより、アッセイの特異性を増強させることができる。そのようなアッセイの1つの実施形態を図1(c)に示す。表面(116)は、分析物Aに結合する捕捉試薬(117)、およびアンカーオリゴヌクレオチド配列(119)を含むアンカー試薬(118)を含む。1つまたはそれ以上の工程において、分析物は捕捉試薬および分析物に結合する2つの(またはそれ以上の)検出試薬(それぞれ、120および121)の各々に結合し、各々の第1および第2の検出試薬は核酸プローブ(122および123、それぞれ第1および第2の核酸プローブ)に連結される。分析物は捕捉試薬および検出試薬に同時にもしくは実質的に同時に、または順次的に、段階的に結合することができる。したがって、複合体(124)は捕捉試薬、分析物、ならびに第1および第2の検出試薬を含む表面上に形成される。第1および第2のプローブが互いに近接していることを必要とする伸長プロセスを用いて、第1のプローブは、アンカー配列に相補的なアンカー配列相補体を含む伸長配列(125)を形成するように伸長される。最後から二番目の工程において、アンカー配列はアンカー配列相補体にハイブリダイズされ、表面上に結合した伸長配列の量が測定される。

30

40

#### 【0145】

図1(c)に示した方法の特定の実施形態を図2(a)に示すが、ここで、アンカー試薬は検出複合体を表面に接着させるために使用し、検出複合体に付着したプローブはアンカー試薬に結合する伸長領域を生成するように伸長される。この実施形態において、複合体は近接プローブに結合する2つの検出試薬を使用して検出される。本方法は検出試薬をコネクター配列に接合させることを含み、その後、コネクター配列はライゲーションさせ

50

ることにより環状標的配列を形成し、ローリングサークル増幅法によりアンカー試薬に結合したアンプリコンを生成させる。表面(201)は、捕捉試薬(202)およびアンカー試薬(203)を含む。1つまたはそれ以上の工程において、分析物は捕捉試薬、第1の近接プローブ(205)を含む第1の検出試薬(204)、第2の近接プローブ(207)を含む第2の検出試薬(206)に結合し、それにより、表面上に検出複合体(208)を形成する。検出複合体を、各々が第1の近接プローブの非重複領域と相補的な末端配列および第2の近接プローブの非重複領域と相補的な末端配列を含む2つのコネクタ配列(209aおよび209b)と接触させる。コネクタ配列は第1および第2の近接プローブとハイブリダイズさせ、コネクタオリゴヌクレオチドの末端配列はライゲーションさせることにより、第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズさせた環状標的配列(210)を形成する。第2の近接プローブはローリングサークルハイブリダイゼーションにより伸長され、アンカー試薬に結合する結合試薬を含むアンプリコンを生成し、表面に結合したアンプリコンの量が測定される。第1の近接プローブは、第1のプローブの伸長を防ぐためにキャップされ、またはさもなければ修飾されてもよい。(代替的な実施形態においては、第1の近接プローブは伸長され、第2の近接プローブは伸長を防ぐためにキャップされ、またはさもなければ修飾されてもよい。)図2(a)に示した実施形態において、アンプリコンは、アンプリコンにハイブリダイズさせ、表面に結合したアンプリコンの量を測定するために使用する標識した検出プローブに相補的な2つまたはそれ以上の検出配列もまた含む。(図2(a)に示されていない)代替的な実施形態において、伸長プロセスは、アンプリコンに相補的な1つまたはそれ以上の標識プローブを添加することなく表面上で直接アンプリコンを検出するために使用する標識されたヌクレオチド塩基をアンプリコンに取り込む。図2(b)は、第1および第2のコネクタオリゴヌクレオチド(それぞれ209aおよび209b)を示すコネクタ配列の構成要素の模式的な説明図である。ここで、第1のコネクタの第1の末端( $C_1(E_1)$ )および第2のコネクタの第1の末端( $C_2(E_1)$ )は第1の近接プローブの2つの非重複領域と相補的であり、第1のコネクタの第2の末端( $C_1(E_2)$ )および第2のコネクタの第2の末端( $C_2(E_2)$ )は第2の近接プローブの2つの非重複領域と相補的である。第1および第2のコネクタは第1および第2の近接プローブとハイブリダイズし、第1および第2のコネクタがライゲーションされることにより第1および第2の近接プローブの両方にハイブリダイズする環状標的配列を形成する。

#### 【0146】

図2(c)はコネクタの代替的な実施形態を示す。コネクタ配列211は、第2の近接プローブと相補的な内部配列( $C_{IS}$ )および第1の近接プローブの非重複領域に相補的な2つの末端配列(それぞれ $C_{E1}$ および $C_{E2}$ )を含む。この実施形態において、ローリングサークル増幅法のための環状標的配列を形成するために1つのライゲーション事象だけが必要である(すなわち、第1の近接プローブにハイブリダイズした末端 $C_{E1}$ および $C_{E2}$ のライゲーション)が、プライミング/伸長が第2の近接プローブからのものであるため、2つの近接プローブの近接の必要性が保たれる。好ましくは、第1の近接プローブは、第1のプローブの伸長を防ぐためにキャップされ、またはさもなければ修飾される。

#### 【0147】

その後、第2の近接プローブが環状標的配列のローリングサークル増幅法により伸長され、アンカー試薬に結合する結合領域を含むアンプリコンを生成し、表面に結合したアンプリコンの量が測定される。

#### 【0148】

第1および第2の近接プローブの配列は当業者に知られている方法により設計することができる。例えば、各々のプローブは長さ約20~50塩基、好ましくは長さ25~40塩基の間、最も好ましくは長さ約30~35塩基の間である。第1および第2の近接プローブはまた、本明細書に記載のプロセスにおいて使用される1つまたはそれ以上のコネクタ配列またはその部分に相補的な配列を含む。1つの実施形態において、検出複合体は

、各々が第1の近接プローブの非重複領域に相補的な末端配列および第2の近接プローブの非重複領域に相補的な末端配列を含む2つのコネクタ配列(209aおよび209b)に接触する。したがって、この実施形態において、第1および第2の近接プローブは、各々がコネクタの末端配列に相補的な非重複領域を含む。代替的には、1つだけのコネクタを使用してよく、コネクタ配列(211)は、第2の近接プローブと相補的な内部配列( $C_{IS}$ )および第1の近接プローブの非重複領域に相補的な2つの末端配列(それぞれ $C_{E1}$ および $C_{E2}$ )を含む。したがって、この実施形態において、第1の近接プローブは、それぞれコネクタ、 $C_{E1}$ および $C_{E2}$ の2つの末端配列に相補的な非重複領域を含み、第2の近接プローブは、コネクタの内部配列( $C_{IS}$ )に相補的な配列を含む。第1の近接プローブは、第1のプローブの伸長を防ぐためにキャップされ、またはさもなければ修飾されてもよい。(代替的な実施形態においては、第1の近接プローブは伸長され、第2の近接プローブは、伸長を防ぐためにキャップされ、またはさもなければ修飾されてもよい。)

#### 【0149】

したがって、図1~2に図示した実施形態は、アンカー試薬を取り込むように結合アッセイを改変できること、および/または検出複合体からのシグナルが増幅できることを示している。好ましい実施形態において、アンカー試薬およびシグナル増幅法を結合アッセイにおいて使用する。代替的には、増強した結合アッセイを達成するため、1つまたは他の方法のみを使用してもよい。したがって、本発明は、アンカー試薬を省略した、図1~2に記載したようなシグナル増幅法を有するアッセイを含む。

#### 【0150】

アンカー試薬が直接または間接的に表面に(例えば、結合反応により)結合したアンカー配列を含むこれらの実施形態において、アンカー試薬を生成するために、当該技術分野において確立した、共有結合によるおよび非共有結合による付着方法を含むオリゴヌクレオチドを固定するための方法を使用することができる。1つの実施形態において、アンカー試薬はアンカー配列に連結またはさもなければ結合したタンパク質を含む。この実施形態において、(共有結合によりまたは非共有結合により)表面に固定することができる。アンカーオリゴヌクレオチドにより修飾できる、任意のタンパク質を使用することができる。非限定的な例として、ストレプトアビジン、アビジン、またはウシ血清アルブミン(BSA)が挙げられる。好ましい実施形態として、アンカー試薬はBSAを含む。タンパク質は、既知の方法を用いて、例えば、図3に図示したように、よく確立されたヘテロ二官能性架橋剤である、スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボン酸(Sulfo-SMCC)を用いて、アンカーオリゴヌクレオチドで修飾し、表面に付着させることができる。SMCCのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)基とウシ血清アルブミン(BSA)が反応することにより、チオール反応性マレイミド基を有するBSAが標識される。変わって、マレイミド基は、チオール修飾オリゴヌクレオチドと反応して、安定なチオエーテル結合を介して連結したBSA-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを形成する。1つの特定の例として、一連のBSA-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを黒鉛炭素表面、好ましくはスクリーン印刷カーボンインク電極にプリントして、アレイを形成する。代替的には、タンパク質がアビジンまたはストレプトアビジンであるならば、アンカー配列はビオチンに連結することができ、ビオチン-アビジンまたはビオチン-ストレプトアビジン相互作用により固定化したアビジンまたはストレプトアビジンに結合させることができる。

#### 【0151】

アンカー試薬に付着したアンカーオリゴヌクレオチドは、伸長プロセスの間に展開する伸長配列(またはアンプリコン)にハイブリダイズする任意の配列であってよい。アンカーオリゴヌクレオチドはまた、相補性領域を表面から離れて伸長させるために、表面と相補的(ハイブリダイズしている)領域と間のリンカー配列として使用される非相補的な領域(例えばポリ(A)配列)を含んでいてもよい。1つの実施形態として、ハイブリダイゼーション配列は、近接または検出プローブへの結合とは関連しないアンプリコンの領域



(「内部」領域)として選択される。より特定の実施形態として、ハイブリダイゼーション配列は、アンプリコンの内部領域全長と相補的であり、(好ましくは長さ約25ヌクレオチド)、単独としてまたは、例えば長さ30ヌクレオチドまでのポリ(A)アーム(poly(A) arm)との組み合わせとして含まれる。好ましくは、アンカーオリゴヌクレオチドは:(i)(アンプリコンの内部領域についての全長相補体、長さ25ヌクレオチド)-(20ヌクレオチドのポリ(A)アーム);または(ii)(アンプリコンの内部領域の一部についての相補体、長さ15ヌクレオチド)-(30ヌクレオチドのポリ(A)アーム)から選択される。

#### 【0152】

1つの実施形態において、第2の近接プローブを伸長させるために、近接ライゲーション増幅(PLA)が行われる。図2(a)~(c)を参照して上述したように、2つの近接プローブを含む複合体は1つまたはそれ以上のコネクターオリゴヌクレオチド(209a~209bまたは211)と接触させ、ハイブリダイズしたコネクター配列のライゲーションにより環状オリゴヌクレオチドが形成され、それはその後、環のローリングサークル増幅法(RCA)により第2の近接プローブを伸長するために使用される。近接ライゲーション増幅のための適切なプローブ設計および増幅条件は、当該技術分野においてよく確立されている。本発明の独特な態様は、アンカー試薬において使用されるものと同じ配列のコネクターの1つに包含されるものである。第2の近接プローブの伸長の間、伸長した領域はそれによりアンカー試薬にハイブリダイズするアンカー配列の相補体を含み、それによりサンドイッチ複合体を安定化させ、第2の近接プローブの解離を防ぐ。伸長した第2の近接プローブは、(例えば、RCA伸長反応の間の標識ヌクレオチドの包含により)表面上の分析物の量を決定するために測定できる検出可能な標識を含んでいてもよい。代替的には、多数の検出可能な標識を含む標識プローブが加えられ、伸長した第2の近接プローブにハイブリダイズされ、表面に結合した分析物の量が測定される。

#### 【0153】

任意の適切な増幅技術を伸長配列(またはアンプリコン)の生成のために使用することができ、それには、PCR(Polymerase Chain Reaction;ポリメラーゼ連鎖反応法)、LCR(Ligase Chain Reaction;リガーゼ連鎖反応法)、SDA(Strand Displacement Amplification;鎖置換増幅法)、3SR(Self-Sustained Synthetic Reaction;自家持続配列複製法)および等温核酸増幅法(isothermal amplification)、例えば、ヘリカーゼ依存増幅法(helicase-dependent amplification)およびローリングサークル増幅法(rolling circle amplification;RCA)を含むがそれらに限定されない。好ましい実施形態として、感度、多重化、ダイナミックレンジおよび拡張性の点で顕著な利点を有するため、RCAが使用される。RCAについての技術は当該技術分野において知られている(例えば、Bannerら、Nucleic Acids Research、26:5073~5078頁、1998;Lizardiら、Nature Genetics 19:226頁、1998;Schweitzerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10113~10119頁、2000;Faruqiら、BMC Genomics 2:4頁、2000;Nallurら、Nucl. Acids Res. 29:e118頁、2001;Deanら、Genome Res. 11:1095~1099頁、2001;Schweitzerら、Nature Biotech. 20:359~365頁、2002;米国特許第6,054,274号、6,291,187号、6,323,009号、6,344,329号および6,368,801号を参照のこと)。RCAのいくつかの異なる変形が知られており、線形RCA(LRCA)および指数関数的RCA(exponential RCA;ERCA)が含まれる。RCAはオリジナル標的DNAに付着したコピーの鎖とともに何千もの環状テンプレートのコピーを生成し、標的の空間的分解能およびシグナルの迅速的増幅をもたらす。RCAは(i)単一標的分子の検出;(ii)DNAおよび

R N Aと同様にタンパク質からのシグナルの増幅；( i i i ) 固体表面上において増幅した分子の位置の同定；( i v ) 多くの異なる標的の同時測定；ならびに( v ) 溶液中または固相における1つまたはそれ以上の標的の解析を容易にする。検出複合体を有するR C A生産物の空間位置局在性は、アレイまたは粒子に基づくフォーマットにおける多重結合アッセイの遂行の際に、特に有利となる。

#### 【 0 1 5 4 】

アンカー試薬およびシグナル増幅プロセスの両方を使用した本発明の特定の実施形態を図4 ( a ) に示した。図4 ( a ) は、捕捉試薬 ( 4 0 2 ) 、分析物 ( 4 0 3 ) ならびに、各々がそれぞれ第1の近接プローブ ( 4 0 6 ) ( P P 1、配列番号1 ) および第2の近接プローブ ( 4 0 7 ) ( P P 2、配列番号2 ) を含む2つの検出試薬 ( 3 0 4 および3 0 5 ) の間において、表面上 ( 4 0 1 ) に形成された複合体を示す。第1および第2のコネクターオリゴヌクレオチドC i r c - 1 ( 4 0 8 ) ( 配列番号4 ) およびC i r c - 2 ( 4 0 9 ) ( 配列番号5 ) が加えられ、両者の近接プローブが複合体に存在すると、各々がC i r c - 1 およびC i r c - 2 にハイブリダイズし、2つの近接プローブの間に架橋を作製する。結合したコネクタープローブはそれぞれライゲーション部位1および2 ( 4 1 0 および4 1 1 ) でライゲーションされ、環状D N Aテンプレート ( 4 1 2 ) を形成する。環状D N Aテンプレートはローリングサークル増幅法により増幅され、第2の近接プローブを伸長し、それにより、1つまたはそれ以上の検出配列 ( 4 1 3 ) および ( 部分的なアンカー配列相補体 ( 4 1 5 ) を含む ) アンカーオリゴヌクレオチド配列相補体 ( 4 1 4 ) を含むアンプリコンを生成する。 ( 捕捉部分 ( 4 1 7 ) に付着した ) アンカーオリゴヌクレオチド配列 ( 4 1 6 ) およびその相補体はハイブリダイズし、多数の検出プローブは多数の検出プローブ配列にハイブリダイズし、表面に結合した分析物の量が測定される ( 示されていないが図1 ( a ) に図示してある ) 。図4 ( b ) は、第1の近接プローブ ( P P 1 ) にハイブリダイズするように設計された一部分、検出オリゴヌクレオチド配列、 ( アンカーオリゴヌクレオチド配列に結合するように全体または部分的に使用することができる ) アンプリコンの内部領域、および ( 第2の近接プローブにハイブリダイズするように設計された ) P P 2 の一部分を有する、第1の環状D N AテンプレートC i r c - 1 ( 4 0 8 ) ( 配列番号4 ) の例示的な配列を示している。 ( 配列番号4 および配列番号5 の配列を含む ) 環状D N Aテンプレートがローリングサークル増幅法により増幅され、多数の検出配列 ( それぞれ4 1 8 および4 1 9 ) を含むアンプリコンを生成することを示す、さらなる実施形態を図4 ( c ) に示した。本明細書に記載の配列を変えることを意図しなくとも、図4 ( c ) のような図に開示されたような近接プローブP P 1 およびP P 2 のポリ-Aテイルは、開示したP P 1 および / またはP P 2 配列と比較して、図に具体的に示されたアラニン反復の数がばらついていてもよいことは、理解されるべきである。

#### 【 0 1 5 5 】

図4 ( a ) に示された本発明のさらなる実施形態において、捕捉部分4 1 7 に付着したアンカーオリゴヌクレオチド配列 ( 4 1 6 ) は、3 ' の自由末端を有し、プライマーとして作用することができる。この実施形態において、第2の近接プローブは検出配列 ( 4 1 3 ) と相補的な配列を含む。

#### 【 0 1 5 6 】

R C Aまたは任意の適切な増幅方法により増幅される標的配列を生成する別のアプローチを図5 に図示した。この実施形態において、各々の近接プローブはループしたヘアピン構造に折りたたまれ得る。これらのヘアピン構造の形成により、単鎖ループおよび組み換えシグナルを含む二重鎖部分が生成される。リコンビナーゼを加えて、2つのヘアピン構造の組み換えを推進し、環状D N Aテンプレートを形成する。その後、上述のようなR C Aに供する。アンプリコンは標識され、場合によってアンカー試薬にアンカーされ、分析物が検出される。この実施形態の重要な要素は、リコンビナーゼが配列特異的組み換え部位を含むD N Aの部位特異的組み換えを触媒することができる能力である。例えば、バクテリオファージP 1 からのC r e リコンビナーゼは、l o x P 部位を含む部位において組み換えを触媒し、他の非限定的な例としてF l i p p a s e ( f l p、酵母由来 )、H i

n (サルモネラ菌)、およびCreの遺伝子操作(進化)バージョンであるTreが含まれるが、それらに限定されない。この代替的なアプローチはオリゴヌクレオチドテンプレート、ATPおよびdNTPのような付加的な構成要素の添加が必要ではない。この実施形態において、loxP(組み換え)部位が、非対称的であるように修飾されることが好ましく、通常の平衡が望ましい組み換え生産物の形成の方向にシフトするように得られる。これは、組み換え部位の明暗の濃淡により、図5に図示される。

#### 【0157】

さらに、RCAまたは任意の適切な増幅方法により増幅された標的配列を生成するための、なお別の方法を図6(a)に図示する。検出試薬に付着した各々の近接プローブは、Creリコンビナーゼによる2つのオリゴヌクレオチド間の部位特異的組み換えが可能なloxP部位を含み、loxP部位に隣接する、1つの近接プローブの5'部分および他の近接プローブの3'部分が含まれる新しいオリゴヌクレオチド配列の形成をもたらす。新しく作製された標的配列は、その後、上述のように、任意の適切な方法により増幅させ、標識させ、場合によってアンカーさせ、検出させることができる。T7 RNAポリメラーゼプロモーターを増幅のための操作可能な要素として使用する、この実施形態を図6(a)に図示する。近接プローブの3または5'部分のいずれかに連結したT3およびSP6のような他のRNAポリメラーゼ部位が本方法における使用に同じく適切であることもまた理解される。この実施形態において、loxP(組み換え)部位が、非対称的であるように修飾されることが好ましく、通常の平衡が望ましい組み換え生産物の形成の方向にシフトするように得られる。図6(b)に示すように、この方法はRCAにおいて使用することができる環状DNAテンプレートを生成するために使用することもできる。

#### 【0158】

本発明は、分析物を表面上の捕捉試薬および2つの検出試薬に結合させ、検出複合体を形成することを含む分析物の検出方法を含む。本方法は、2つの検出試薬の1つのみを含む複合体と比較して、両方の検出試薬を含む複合体を優先的に測定する、検出複合体の測定を含む。1つの実施形態として、本方法は複合体を形成すること、その後、検出試薬を架橋すること、および架橋した試薬を検出することを含む。検出複合体の構成要素を連結するために、任意の適切な架橋化学が使用できる。例えば、第1および第2の検出試薬は、反応性部分とリンクする多機能性架橋剤の添加により反応し、連結する反応性部分を含むことができる。この実施形態において、反応性部分および架橋剤はアミン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド、クリックケミストリー試薬、およびそれらの組み合わせを含むことができる。別の実施形態において、第1および第2の検出試薬は結合部分を含んでもよく、架橋剤は結合部分の多価の結合パートナーである。この実施形態のいくつかの非限定的な例として：(a)第1および第2の検出試薬は動物種の抗体であって、架橋剤は動物種の抗体をターゲティングする多価の抗-種抗体である；(b)第1および第2の検出試薬はビオチンを含み、架橋剤はストレプトアビジンである(もしくは逆もまた同じ)；(c)第1および第2の検出試薬はストレプトアビジンに連結しており、架橋剤は多数のビオチン分子を含むポリマーである(もしくは逆もまた同じ)；または(d)第1および第2の検出試薬はそれぞれ第1および第2の核酸プローブを含み、架橋剤は、第1の核酸プローブに相補的な配列と第2の核酸プローブに相補的な別途の配列を含むオリゴヌクレオチドである。

#### 【0159】

特定の実施形態において、サンプル中の目的の分析物は、固定化した捕捉試薬、第1の検出試薬および第2の検出試薬に分析物を結合させ、複合体を形成することにより検出することができる。ここで、第1の検出試薬は第1の検出可能な標識および第1の核酸プローブを含み、ならびに第2の検出試薬は第2の検出可能な標識および第2の核酸プローブを含む。この実施形態において、第1および第2の検出試薬は(i)第1のプローブを第2のプローブにハイブリダイズさせる、(ii)第1および第2のプローブを第1および第2のプローブに相補的な領域を有する第3の核酸にハイブリダイズさせる、または(iii)第1および第2のプローブをライゲーションすることにより、架橋される。

## 【0160】

架橋された生産物は表面に結合されることにより検出することができるか、または場合によって、架橋された生産物は表面から溶出剤の中へ放出され、検出されることができる。この点において、第1および第2の検出可能な標識の両方を含む、溶出剤中のこれらの個々の架橋された生産物のみがカウントされる。溶出剤中の標識の存在を検出するために、任意の適切な検出方法が使用される。好ましい実施形態において、標識は蛍光分子であって、溶出剤中に存在する標識された架橋された生産物は、1分子蛍光検出、例えば、蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy)、および/または蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross-correlation spectroscopy) によってカウントされる。この実施形態において、1分子蛍光検出は、キャピラリーを通じて溶出剤を流すこと、光源をキャピラリーの中の容積に焦点をあわせ、照合ゾーン (interrogation zone) を作製することおよび照合ゾーンを通る蛍光分子の通過を検出するために照合ゾーンを光検出器で観測することを含む。検出方法は第1の標識に関連する第1の蛍光シグナルおよび第2の標識に関連する第2の蛍光シグナルを検出すること、および両方のシグナルが照合ゾーンから検出される検出事象をカウントすることをさらに含んでもよい。代替的には、1つの標識は、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) ドナーであり、他のラベルはFRETアクセプターであり、検出方法は照合ゾーンのFRETドナーを励起すること、FRETアクセプターからの蛍光シグナルを検出することをさらに含んでもよい。

10

20

## 【0161】

特定の実施形態において、サンプル中の分析物は、分析物を固定化した捕捉試薬、第1の核酸プローブを含む第1の検出試薬および第2の核酸プローブを含む第2の検出試薬に結合させ、複合体を形成させること；検出可能な標識を含む伸長配列を形成するために、第2の核酸プローブを伸長させることであって、伸長は複合体中の第1および第2の核酸プローブの共局在に依存していること；伸長配列を表面から溶出剤中へ放出すること；ならびに溶出剤中の個々の伸長配列をカウントすることにより検出することができる。伸長工程は、プローブをテンプレート核酸配列に結合させることおよびプローブをポリメラーゼ連鎖反応法により伸長させることを含んでもよい。代替的には、伸長工程は、第1のプローブをテンプレート核酸配列に結合させること、環状核酸テンプレートを形成させること、および環状テンプレートをローリングサークル増幅法により伸長させることを含む。伸長工程は、第1のプローブをテンプレート核酸配列に結合させること、第2のプローブをテンプレート配列に結合させること、ならびに第1および第2のプローブをライゲーションさせることを含んでもよい。

30

## 【0162】

捕捉試薬を使用する本発明の方法において、捕捉試薬は直接的に固相に固定化することができ、または例えば下に述べるターゲッティング試薬のような、第2の結合試薬によって間接的に固定化することができる。例えば、捕捉試薬は固相上に固定化したターゲッティング試薬相補体に結合するターゲッティング試薬に連結してもよいし、含んでもよい。ターゲッティング試薬のその相補体への結合は直接的であってもよいし（例えば、ターゲッティング試薬はストレプトアビジンであって相補体はビオチンであってもよい）、または架橋剤を介して間接的であってもよい（例えば、ターゲッティング試薬および相補体はビオチンであって、架橋剤はストレプトアビジンのような多価のビオチン結合受容体であってもよい）。1つの実施形態において、ターゲッティング剤およびその相補体は第1のオリゴヌクレオチドおよび相補性オリゴヌクレオチド、受容体 - リガンドの対、抗原 - 抗体の対、ハプテン - 抗体の対、エピトープ - 抗体の対、ミメトープ - 抗体の対、アプタマー - 標的分子の対、ハイブリダイゼーションパートナーまたはインターカレーター標的分子の対を含む。アッセイにおいて使用されるターゲッティング剤および相補体は、アッセイによって測定される分析物についての捕捉試薬または検出試薬と関連するターゲッティング剤および相補体がアッセイによって測定される他の分析物についての捕捉試薬または

40

50

検出試薬に関連するターゲッティング剤および相補体について実質的に非交差反応性であるように選択される。例えば、結合試薬のその関連結合ドメインへの（その関連ターゲッティング剤およびターゲッティング剤相補体による）結合は、実質的に他の分析物（および存在する異なるターゲッティング剤相補体）に関連する結合ドメインへのその結合よりも実質的に強力であるべきである。好ましくは、分析物についての捕捉試薬または検出試薬の他の分析物に関連する結合ドメインへの結合の正しい結合ドメインへの結合に対する交差反応性は、 $< 1\%$ 、より好ましくは $< 0.1\%$ およびより好ましくは $< 0.01\%$ である。好ましい実施形態において、ターゲッティング剤/ターゲッティング剤相補体は相補性配列を含むオリゴヌクレオチドの対を含み、ターゲッティング剤およびその相補体はターゲッティング剤がその相補体にハイブリダイズするために十分な条件下で接触される。

10

#### 【0163】

ターゲッティング剤が使用される際は、アッセイ法に使用される捕捉試薬がいつ固相上に固定化されるかについて、ある程度柔軟性がある。1つの実施形態において、捕捉試薬は、ターゲッティング剤 - ターゲッティング剤相補体相互作用により固相上に事前に固定化して、ユーザーに提供される。別の実施形態において、ターゲッティング剤および固定化したターゲッティング剤相補体を支持する固相に連結した捕捉試薬は、別々の構成要素として提供される。アッセイ方法は、したがって、ターゲッティング剤をその相補体に（直接または架橋剤の使用により）結合することにより捕捉試薬を固相上に固定化する工程をさらに含む。この工程は、検出複合体の形成に関連する工程の前、同時に、または後に行われてもよい。

20

#### 【0164】

本発明の方法においては、結合アッセイの技術分野からの従来の表面を含む広く多様な表面が使用に適切である。表面はポリマー（例えば、ポリスチレンおよびポリプロピレン）、セラミックス、ガラス、複合材料（例えば、カーボンベースのインクのようなカーボン - ポリマー複合体）を含む様々な異なる材料から作られてもよい。適切な表面としては、アッセイ容器の内部表面（例えば、試験管、キュベット、フローセル、FACSセルソーター、カートリッジ、マルチウェルプレートのウェルなど）、スライド、（遺伝子またはタンパク質チップ測定において使用されるような）アッセイチップ、ピンまたはプローブ、ビーズ、ろ過メディア、側方流動メディア（例えば、側方流動試験紙において使用されるろ過膜）などのような巨視的な物体の表面が挙げられる。

30

#### 【0165】

適切な表面としてはまた、他のタイプの粒子ベースのアッセイにおいて通常使用される粒子（コロイドまたはビーズが含まれるがそれらに限定されない）、例えば、マグネティック、ポリプロピレン、およびラテックス粒子、固相合成において典型的に使用される材料、例えば、ポリスチレンおよびポリアクリルアミド粒子、ならびにクロマトグラフィーの応用において典型的に使用される材料、例えば、シリカ、アルミナ、ポリアクリルアミド、ポリスチレンが、挙げられる。材料はまたカーボン小繊維のような繊維であってもよい。微小粒子は無生物であってもよいし、または代替的には、細胞、ウイルス、バクテリアなどの生命の生物学的実態を含んでいてもよい。本方法において使用される粒子には、1つまたはそれ以上の捕捉試薬または検出試薬に付着させるために適切な任意の材料が含まれてもよく、それは例えば、遠心分離、重力、ろ過、またはマグネティック収集を介して収集してもよい。捕捉試薬または検出試薬に付着させてもよい広く多様な異なるタイプの粒子が結合アッセイにおける使用のために市販されている。これらには、粒子を磁場によって収集できるように磁化可能な材料を含む粒子とともに非マグネティック粒子が含まれる。1つの実施形態において、粒子は、コロイド状金粒子のような伝導性および/または半導体材料を含む。微小粒子は広く多様なサイズおよび形状を有していてもよい。限定されない例としては、微小粒子は5ナノメートルから100マイクロメートルの間であってよい。好ましくは、微小粒子は20nmから10マイクロメートルの間のサイズを有する。粒子は球状、長方形、ロッド状などであってよいが、または形状として不規則であっ

40

50

てもよい。

【0166】

本方法において使用される粒子は、粒子の混合物の中から特定の粒子または粒子の亜集団を同定するようにコードされてもよい。そのようにコードされた粒子の使用は、結合アッセイについて固相支持体として粒子を利用するアッセイの多重化を可能にするように使用されてきた。1つのアプローチとして、粒子は1つまたはそれ以上の蛍光色素を含むように製造され、1つまたはそれ以上の波長における蛍光発光の強度および/または相対的強度に基づいて粒子の特定の集団が同定される。このアプローチはルミネックスxMAPシステムズ(Luminex xMAP systems)(例えば、米国特許第6,939,720号を参照のこと)およびベクトンディッキンソン サイトメトリックビーズアレイシステムズ(Becton Dickinson Cytometric Bead Array systems)において使用されてきた。代替的には、粒子はサイズ、形状、包埋した光学的パターンなどのような他の物性の差異によりコードされてもよい。混合物中または粒子のセット中に提供された1つまたはそれ以上の粒子は、粒子の光学的特性、サイズ、形状、包埋した光学的パターンなどに基づいて、混合物中の他の粒子と区別されるようにコードされてもよい。

10

【0167】

特定の実施形態において、本発明の方法は多数の異なる分析物をこれらの分析物についての多数の捕捉試薬に結合させることにより、多重化されたフォーマットにおいて使用することができる。捕捉分析物は、コードすることにより特定のビーズについての捕捉試薬(および分析物標的)が同定されるように、コードされたビーズに固定化される。本方法は、(本明細書に記載した検出アプローチを使用して)結合した分析物を有するビーズの数をカウントすることをさらに含んでもよい。

20

【0168】

代替的にはまたは付加的には、検出複合体および/または捕捉試薬は、例えば、結合ドメインが個々のアレイ要素である結合アレイにおいて、または結合ドメインが個々のビーズであるビーズのセットにおいて、別々のアッセイシグナルが各々の結合ドメイン上に生成され、測定されるようにして、直接的または間接的に1つまたはそれ以上の固相上の異なる別々の結合ドメインに結合することができる。もし異なる分析物についての捕捉試薬が異なる結合ドメインに固定化された場合には、それらのドメインに結合した異なる分析物は独立に測定することができる。そのような実施形態の1つの例としては、結合ドメインは1つまたはそれ以上の表面上に、目的の分析物を結合する捕捉試薬の別々のドメインを固定化させるように調製される。場合によって、表面は、部分的に、サンプルを保持するかまたはサンプルが通過する(例えば、フローセル、ウェル、キュベットなどの)容器の1つまたはそれ以上の境界を定義してもよい。好ましい実施形態については、個々の結合ドメインは電気化学または電気化学発光アッセイにおいて使用される電極上に形成される。電気化学発光を用いた多数の結合ドメインを含む表面上の分析物の多重化測定は、メソスケールダイアグノスティックス、LLC(Meso Scale Diagnostics, LLC)、MULTI-ARRAY(登録商標)およびSECTOR(登録商標)イメージャー(Imager)製品系統において使用されてきた(例えば、米国特許第7,842,246号および6,977,722号、その記載は参照によって本明細書にその全体を組み入れる)。

30

40

【0169】

なおさらに、検出複合体および/または捕捉試薬は、上述したように場合によって異なる別々の結合ドメインを含む電極表面に、直接的または間接的に結合することができる。電極表面はマルチウェルプレートおよび/またはフローセルの構成要素であってよい。電極は、伝導性物質、例えば、金、銀、プラチナ、ニッケル、スチール、イリジウム、銅、アルミニウム、伝導性アロー(ac conductive allow)などのような金属を含むことができる。それらにはまた、例えば、酸化アルミニウム被覆アルミニウムのような酸化物被覆金属を含んでいてもよい。電極は、例えば、金属対電極およびカーボン

50

作用電極のような、同じまたは異なる材料から作られ得る作用および対電極を含むことができる。1つの特定の実施形態において、電極には、カーボン、カーボンブラック、黒鉛カーボン、カーボンナノチューブ、カーボン小繊維、黒鉛、グラフェン、カーボンファイバーおよびそれらの混合物のようなカーボンベースの材料が含まれる。1つの実施形態において、電極には、例えば、黒鉛、カーボンブラック、カーボンナノチューブなどのような、元素状炭素が含まれる。それらは、伝導性カーボンポリマー複合材料、マトリックス中に分散された伝導性粒子（例えば、カーボンインク、カーボンペースト、金属インク、グラフェンインク）、および/または伝導性ポリマーが含まれ得ることが有利である。本発明の1つの特定の実施形態は、カーボン、例えばカーボン層、および/またはカーボンインクのスクリーン印刷層を含む電極（例えば、作用および/または対電極）を有するアクセシモジュール、好ましくはマルチ-ウェルプレートである。

10

#### 【0170】

本発明は、個々の検出複合体の検出およびカウントについての方法を含む。特定の実施形態において、表面は、サンプル中に存在する1つまたはそれ以上の分析物分子について多数の捕捉試薬を含み、多数の捕捉試薬は表面に位置する多数の分離できる結合領域にわたって分散される。測定を実施し、解析するために使用される条件下において、「分離できる結合領域」とは、分離可能で、さらなる個々の結合事象が起きているもう1つのエリアと区別できる個々の結合事象に関連する最小の表面エリアである。したがって、本方法は1つまたはそれ以上の分析物分子を1つまたはそれ以上の捕捉試薬に表面上で結合させること、表面上の多数の分離できる結合領域における分析物分子の存在または不在を決定すること、ならびに、分析物分子を含む分離できる結合領域の数および/または分析物分子を含まない分析物ドメインの数を同定することを含む。

20

#### 【0171】

分離できる結合領域は、全体的にまたは部分的に、光学的に照合することができる。すなわち、各々の個々の分離できる結合領域は個々に光学的に照合され、および/または、多数の分離できる結合領域を含む表面全体は画像化されることができ、その画像の1つまたはそれ以上のピクセルまたはピクセルのグループ分けは個々の分離できる結合領域にマップされることができる。分離できる結合領域は多数の微小粒子中の微小粒子であってもよい。光学サインについての変化を示す分離できる結合領域は、従来の光学的検出システムにより同定されることができる。検出した種（例えば、蛍光実態のタイプなど）および操作的な波長に依存して、特定の波長について設計した光学フィルターは、分離できる結合領域の光学照合について使用することができる。光学照合が使用される場合の実施形態において、システムは、光源の波長および/または強度を調整するために複数の光源および/または多数のフィルターを含むことができる。いくつかの実施形態において、多数の分離できる結合領域からの光学シグナルはCCDカメラを用いて捕捉される。画像を捕捉するために使用することができるカメラ画像化システムの他の非限定的な例としては、当業者には知られている、電荷注入装置（charge injection devices (CIDs)）、相補型金属酸化物半導体（complementary metal oxide semiconductors (CMOSs)）装置、科学的CMOS (sCMOS) 装置、および時間遅延積分（time delay integration (TDI)）装置が挙げられる。いくつかの実施形態においては、光ダイオードまたは光電子増倍管（PMT）を連結したスキャニングミラーシステムが画像化に使用されてもよい。

30

40

#### 【0172】

本方法の測定工程には、多数のピクセルからなる画像を生成するために表面（またはその一部）からの光学シグナルを画像化することを含むことができる。ここで、各々の分離できる結合領域は画像中の1つまたはそれ以上のピクセルまたはピクセルの群にマップする。結合事象（検出複合体）を示すシグナルを有するピクセルまたはピクセルのセットを同定するための画像解析は、例えば、蛍光顕微鏡像における標識された生物学的構造を同定およびカウントするために利用できる豊富な画像解析アルゴリズムおよびソフトウェア

50

のような、技術分野に認識された方法を用いて達成することができる。1つの実施形態において、大規模のシグナル勾配を除去するため画像をフィルタリングした後に、画像は区分けしきい値を用いてバイナリ画像に変換される。分離できる結合領域は上述のしきい値強度の隣接領域を同定することにより、見つけられる。結合ドメインは、サイズおよび強度の要求を満たせば、結合事象として分類される。

#### 【0173】

1つの実施形態において、分離できる結合領域はアレイの要素である。好ましい実施形態において、アレイは、マイクロ・ウェルまたはナノウェル、例えば単位基板の個々のくぼみまたはウェルのアレイである。好ましくは、ウェルの容量は100 nL未満、好ましくは50 nL未満である。1つの実施形態において、ウェルの容量は約10 aL ~ 100 pLの範囲である。場合において、ウェルは微小粒子を保持するように形状が決められていてもよい。

10

#### 【0174】

1つの実施形態において、基板に位置し、アッセイの間に対象となる分離できる結合領域の少なくとも50%は、ゼロまたは1つの分析物分子を含んでいる。好ましくは、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも95%、および最も好ましくは少なくとも99%の分離できる結合領域は、ゼロまたは1つ以上の分析物分子を含んでいる。サンプル中の分析物分子の濃度は少なくとも部分的に、少なくとも1つまたは1つの分析物分子を含む結合領域の数の較正曲線、ポアソン分布解析および/またはガウシアン分布解析を用いて決定される。特定の実施形態において、表面は、各々が分析物分子についての多数の捕捉試薬を含む多数の粒子を含み、多数の粒子は多数の分離できる結合領域（例えば、マイクロ・またはナノ・ウェルのアレイ）にわたって分布される。したがって、本方法は：(i) 1つまたはそれ以上の分析物分子を表面上の1つまたはそれ以上の捕捉試薬に結合させること、(ii) 分離できる結合領域のアレイにわたって多数の粒子を分布させること、ならびに(iii) 分析物分子を含む結合ドメインの数および/または分析物分子を含まない結合ドメインの数を同定するために、各々の分離できる結合領域において分析物分子が存在するか不在であることを決定することを含む。

20

#### 【0175】

本発明の1つまたはそれ以上の方法を用いて閉じ込められた容量の分析物を検出することもまた有利である。これらの実施形態において、サンプル中の分析物分子は、各々が区別できる標識を有する検出試薬の対に結合しており、分析物は、基板、例えばプレート、ディッシュ、チップ、光学ファイバーなど、の上で、多数の場所、例えばウェルまたは反応容器（本明細書においては「反応容器」と呼ぶ）、にわたって、反応容器の大部分が1つまたはより少ない分析物を含むように区分化されている。この方法によりユーザーは、分析物に付着した各々の区別できる標識を含む反応容器の数をカウントすることにより分析物分子を検出することができる。いくつかの場合において、課題対象となる多数の反応容器は、少なくとも1つの分析物分子を含む可能性がある全量の反応容器の一部または本質的に全てである（例えば、少なくとも1つの分析物分子に関連しているかまたはいずれの分析物分子にも関連していない）。以下の出版された米国特許出願を引用する：米国特許出願第20070259448号；米国特許出願第20070259385号；米国特許出願第20070259381号；および国際特許出願第PCT/US07/019184号。これらの出版物の各々の開示は、参照によって本明細書に組み入れる。反応容器の少なくとも一部を課題対象としてよく、少なくとも1つの分析物分子または粒子を含む反応容器の数/パーセンテージを示す測定がされてもよい。いくつかの場合において、数/パーセンテージに基づいて、流体サンプル中の分析物分子の濃度の測定が決定されてもよい。

30

40

#### 【0176】

閉じ込められた容量の中での分析物分子の検出を可能とする特定の実施形態において、サンプル中の分析物は、分析物を第1および第2の検出試薬に結合させ、検出複合体を形成することにより検出することができる。各々の検出複合体には、分析物、第1の検出試

50



薬、および第2の検出試薬が含まれ、ならびに第1の検出試薬および第2の検出試薬はそれぞれ第1および第2の検出可能な標識を有する。検出複合体は同時に、実質的に同時に、または順次的に形成されることができる。検出複合体は、反応容器の大部分が1つまたはより少ない検出複合体を含むように多数の反応容器にわたって区分化され、第1および第2の検出可能な標識の各々を含む反応容器の数をカウントすることにより、分析物分子の数が検出される。好ましくは、検出複合体は、結合していない第1の検出試薬および結合していない第2の検出試薬を同じ容器中に検出する可能性が約10に1つ未満、好ましくは約100に1つ未満、より好ましくは約1000に1つ未満、および最も好ましくは約10,000に1つ未満であるように、多数の反応容器にわたって区分化される。検出複合体は、例えば、多数の反応容器にわたって検出複合体の一部を手動で等分する、および/または検出複合体が支持体上の個々の反応容器の中へ分離するようにして、多数の反応容器にわたって検出複合体を含む溶液を流すことによって、多数の反応容器にわたって区分化、すなわち、部分または一部に分割または分離される。

10

#### 【0177】

さらなる実施形態において、サンプル中の分析物は、(a)分析物を表面に結合した捕捉試薬ならびに第1および第2の検出試薬に結合させ、検出複合体を形成させることによって検出することができる。ここで、(i)各々の検出複合体は捕捉試薬、分析物、第1の検出試薬および第2の検出試薬を含み、(ii)第1の検出試薬は第1の検出可能な標識を有し、および第2の検出試薬は第2の検出可能な標識を有する。任意の順序で構成要素を添加することにより、例えば、同時に、または実質的に同時に構成要素をまとめることによって、または順次に各々の構成要素を加えて、検出複合体を段階的に形成することによって、検出複合体を形成することができる。大部分の反応容器が1つまたはより少ない分析物を含むようにして、検出複合体は、多数の反応容器にわたって区分化され、第1および第2の検出可能な標識を含む反応容器の数をカウントすることによって、分析物分子の数が検出される。本方法は、各々の工程の後、および検出工程の前に洗浄してまたは洗浄せずに実行され得る。

20

#### 【0178】

表面は粒子であることができ、場合によって、多数の捕捉試薬が粒子または多数の粒子の上に固定化される。この実施形態において、区分化工程は多くの方法により実行することができる：(i)捕捉試薬は多数の粒子の上に固定化され、分析物の区分化は分析物を捕捉試薬に結合させることおよび粒子を多数の反応容器中に区分化することによって達成される；(ii)捕捉試薬は多数の粒子上に固定化され、分析物の区分化は粒子を多数の反応容器中に区分化し、その後分析物を捕捉試薬に結合させることによって達成される。

30

#### 【0179】

多数の反応容器には、油中水滴型エマルジョン中に分散させた水ドロップレットも含む。エマルジョンは100  $\mu\text{m}$ までの直径およびほぼ1 nLの容量のドロップレットとして作ることができる。高容量、すなわち、エマルジョン1 mL中に $10^{10}$ ドロップレットを超える量、エマルジョン調製の容易さ、および広い範囲の条件にわたるそれらの高い安定性により、区画化生化学的アッセイの理想的手段が提供される。各々の水ドロップレットは、独立した反応容器として機能し、検出複合体は、場合によって粒子に付着して、多数の水ドロップレットにわたって区分化されることができる。

40

#### 【0180】

代替的には、表面は、反応容器の1つの中の場所である。例えば、反応容器がプレートのウェルであるならば、表面はそのプレートのウェルの中のドメインまたは領域であることができる。この実施形態において、捕捉試薬は多数の反応容器のドメインまたは領域に固定化されることができ、区分化工程は分析物分子を捕捉試薬に結合させることによって達成される。別の実施形態において、多数の反応容器は、そこに固定化したターゲッティング部分を持つ領域を含み、捕捉試薬はターゲッティング部分相補体を含み、区分化工程はターゲッティング部分相補体を多数の反応容器に位置するターゲット部分に結合させることによって達成される。さらなる実施形態において、本明細書に記載の結合アッセイは

50

、例えば、サンプル中の分析物の濃度を上昇させることおよび／またはアッセイ性能を妨げるかもしれないサンプル中に存在し得る異物の濃度を減少させることによって、アッセイ性能を改善させるための前濃縮工程も含むことができる。これは（a）目的の分析物を含むサンプルを分析物に結合する第1の結合試薬に連結した粒子に接触させ、それにより前記第1の結合試薬に結合した分析物を含む複合体を形成すること；（b）複合体を収集すること；（c）複合体からサンプルの結合していない構成要素を分離すること；（d）および複合体を放出することによって行うことができる。この前濃縮方法は、アッセイ性能を妨げるかもしれない不純物を取り除くために本明細書に記載の結合アッセイが行われる前に行うことができる。この点において、米国特許出願公開第US 2010/0261292号が引用され、その記載は参照によって本明細書に組み入れる。

10

#### 【0181】

本発明の方法により解析されてもよいサンプルの例には、食料サンプル（食料抽出物、食料破砕物、飲料などを含む）、環境サンプル（例えば、土壌サンプル、環境スラッジ、収集した環境エアロゾル、環境ワイプ、ろ過水など）、工業サンプル（例えば、工業生産プロセスからの出発原料、生成物または中間体）、ヒトの医療サンプル、獣医学サンプルおよび他の生物学的起源のサンプルが含まれるが、それらに限定されない。解析されてもよい生物学的サンプルには、便、粘膜スワブ、生理学的試料、および／または細胞の懸濁液を含むサンプルが含まれるがそれらに限定されない。生物学的サンプルの具体例としては、血液、血清、血漿、便、粘膜スワブ、組織吸引物、組織破砕物、細胞培養物および細胞培養上清（真核生物および原核生物の細胞培養物を含む）、尿、唾液、たん、および脳脊髄サンプルが含まれる。

20

#### 【0182】

本発明の方法を使用して測定されてもよい分析物としては、タンパク質、毒素、核酸、微生物、ウイルス、細胞、菌類、孢子、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リボタンパク質、多糖類、薬、ホルモン、ステロイド、栄養素、代謝産物および上記の分子の任意の修飾された誘導体、または1つもしくはそれ以上の上記の分子を含む任意の複合体またはそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。サンプル中の目的の分析物のレベルは疾患または病状を示すものであってよく、またはそれは単に患者がその分析物に曝されているか否かについて示すものであってもよい。

#### 【0183】

30

本発明のアッセイはサンプル中の1つまたはそれ以上の、例えば2つまたはそれ以上の分析物の濃度を決定することに使用してもよい。したがって、2つまたはそれ以上の分析物は同じサンプル中で測定されてもよい。同じサンプル中で測定することができる分析物のパネルとしては、例えば、分析物についてのアッセイのパネルまたは病状または生理的条件に関連した活性が挙げられる。特定のこのようなパネルには、サイトカインおよび／またはそれらの受容体（例えば、1つまたはそれ以上のTNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IL1- $\alpha$ 、IL1- $\beta$ 、IL2、IL4、IL6、IL-10、IL-12、IFN- $\gamma$ 、など）、増殖因子および／またはそれらの受容体（例えば、1つまたはそれ以上のEGF、VGF、TGF、VEGF、など）、乱用薬物、治療薬、ビタミン、病原体特異的抗体、自己抗体（例えば、Sm、RNP、SS-A、SS-B、JO-1、およびScl-70抗原に対して向けられた1つまたはそれ以上の抗体）、アレルゲン特異的抗体、腫瘍マーカー（例えば、1つまたはそれ以上のCEA、PSA、CA-125、CA-15-3、CA-19-9、CA-72-4、CYFRA 21-1、NSE、AFP、など）、うっ血性心臓疾患および／または急性心筋梗塞を含む心疾患のマーカー（例えば、1つまたはそれ以上のトロポニンT、トロポニンI、トロポニンC、ミオグロビン、CKMB、ミエロペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ナトリウム利尿タンパク質（BNP）、 $\beta$ -ナトリウム利尿タンパク質（ANP）、エンドセリン、アルドステロン、C反応性タンパク質（CRP）、など）、止血に関連するマーカー（例えば、1つまたはそれ以上のフィブリンモノマー、D-ダイマー、トロンビン-アンチトロンビン複合体、プロトロンビン断片1&2、抗Xa因子など）、急性ウイルス性肝炎感染のマ-

40

50

カー（例えば、1つまたはそれ以上のA型肝炎ウイルスに対するIgM抗体、B型肝炎コア抗原に対するIgM抗体、B型肝炎表面抗原、C型肝炎ウイルスに対する抗体等）、アルツハイマー病のマーカー（アルファ・アミロイド、ベータアミロイド、A<sub>42</sub>、A<sub>40</sub>、A<sub>38</sub>、A<sub>39</sub>、A<sub>37</sub>、A<sub>34</sub>、タウタンパク質、など）骨粗鬆症のマーカー（例えば、1つまたはそれ以上の架橋したNorCテロペプチド、総デオキシピリジノリン、遊離のデオキシピリジノリン、オステオカルシン、アルカリホスファターゼ、I型コラーゲンのC末端プロペプチド、骨特異的アルカリホスファターゼなど）、妊娠能状態や妊娠能に関連する障害のマーカー（例えば、1つまたはそれ以上のエストラジオール、プロゲステロン、卵胞刺激ホルモン（FSH）、黄体形成ホルモン（LH）、プロラクチン、hCG、テストステロンなど）、甲状腺障害のマーカー（例えば、1つまたはそれ以上の甲状腺刺激ホルモン（TSH）、トータルT<sub>3</sub>、遊離T<sub>3</sub>、トータルT<sub>4</sub>、遊離T<sub>4</sub>、およびリバースT<sub>3</sub>）、および前立腺癌のマーカー（例えば、1つまたはそれ以上のトータルPSA、遊離PSA、複合体化PSA、前立腺酸性ホスファターゼ、クレアチンキナーゼなど）のパネルが含まれる。本発明のある実施形態には、例えば、特定の病状または生理的条件に関連した1つもしくはそれ以上の、2つもしくはそれ以上の、4つもしくはそれ以上の、または10もしくはそれ以上の分析物の測定が含まれる（例えば、パネルにおいて上述のようにリストに挙げたような、まとめてグループ化された分析物；例えば、甲状腺障害の診断に有用なパネルとして、例えば、1つまたはそれ以上の甲状腺刺激ホルモン（TSH）、トータルT<sub>3</sub>、遊離T<sub>3</sub>、トータルT<sub>4</sub>、遊離T<sub>4</sub>、およびリバースT<sub>3</sub>が含まれてもよい）。

10

20

#### 【0184】

好ましい実施形態において、パネルは、従来のサンプルマトリックス中に1つまたはそれ以上の低存在量の分析物、例えば、約100fg/mL未満、好ましくは約10fg/mL未満の濃度の分析物を含む。パネル中に含むことができる分析物の非限定的なリストには、例えば、IL-17、IL-21、IL-31、Ab-38、Ab-40、Ab-42、Ab-39、Ab-43、Ab-15、Ab-16、Ab-17、アミロイドオリゴマー、C-ペプチド、IL-13、IL-17A、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、INF-g、PSA、タウ、フォスフォ-タウ、TNF $\alpha$ 、トロポニンI、心筋トロポニンT、トロポニンC、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、EPO、LC3B、アルブミン、CHO-P、大腸菌HCP、IgA、IgE、IgG、IgG1、IgG4、IgM、NSO-P、Per-C6、残余プロテインA（residual protein A）、IgG2、IgG3、IgG4、AFP、CA125、カスパーゼ-3アクティブ（Caspase-3 active）、CXCL11/I-TAC、ErbB2/HER2、HGFR/o-MET、IFN- $\gamma$ 、MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、 $\alpha$ -NGF、TFF3、TIMP1、Kim-1、 $\alpha$ -2マクログロブリン、D-ダイマー、ICAM-1、ミエロペルオキシダーゼ、ミオグロビン、PAI-1、PCSK9、プラスミノゲン、レニン/プロレニン、tPA、CXCL1/GRO- $\alpha$ 、CCL2/MCP1、CCL3/MIP-1 $\alpha$ 、CCL4/MIP-1 $\alpha$ 、CCL5/Rantes、CRP、CXCL9/MIG、CXCL10/IL-10、G-CSF、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、IL1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL12（p70）、IL13、IL15、IL18、IL-22、IL-23、IL-33、c-MET、アディポネクチン、FGF21、GLP-1、成長ホルモン、IGF1、IGF2、インシュリン、レプチン、乳汁分泌ホルモン、HIV p24、HB-EGF、AKT、フォスフォ-AKTおよびそれらの組み合わせを含む。

30

40

#### 【0185】

特定の実施形態において、パネルは、従来のサンプルマトリックス中に1つまたはそれ以上の低存在量の分析物、例えば、約100fg/mL未満、好ましくは約10fg/mL未満の濃度の分析物を含む。好ましくはパネルには、1つまたはそれ以上の下記の分析物が含まれる：IL-17、IL-21、IL-31、IL-22、IL-23、IL-

50

33、心筋トロポニンT、およびそれらの組み合わせ。特定の実施形態において、サンプル中に検出される分析物の濃度は、0.01 fMから100 fM、0.03 fM～50 fM、または0.03 fM～10 fMの範囲内である。いくつかの実施形態において、実質的に正確に決定され得るサンプル中の分析物分子の濃度は、約100 fM未満、約10 fM未満、約3 fM未満、約1 fM未満、約0.3 fM未満、約0.1 fM未満、約0.03 fM未満、またはそれ未満である。サンプル中の分析物分子の濃度は、サンプル中の分析物分子の測定濃度が、サンプル中の分析物分子の実際の濃度の約20%以内であるならば、実質的に正確に決定されるとみなされてもよい。ある実施形態においては、サンプル中の分析物分子の測定濃度は、サンプル中の分析物分子の実際の濃度の約10%以内、約3%以内または約1%以内である。アッセイの検出限界は、バックグラウンドシグナルより少なくとも2.5の標準偏差であるシグナルを与える濃度であり、好ましくは、アッセイは、サンプル中の約10～10,000の分子、またはサンプル中の100～5,000分子またはサンプル中の100～1000の分子を検出することができる。

#### 【0186】

さらなる実施形態において、本明細書に記載される方法は、直近の暴露および/または感染に起因する低存在量の分析物を検出するために使用されることができる。様々な疾患または状態、例えば、癌、細菌感染、例えば、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*; 炭疽)、ウイルス感染症、例えば、HIV、肝炎、HPVなど、毒素曝露、例えば、リシン、ボツリヌス毒素A、B、またはEなどの早期診断が、ELISAのような利用可能な技術の検出限界 (LOD) は、疾患の発症を示す可能性がある低存在量タンパク質の循環濃度よりも高いという事実によって制限されている。パネルには、1つまたはそれ以上の従来サンプルマトリックス中の低存在量の分析物、例えば、約100 fg/mL未満、または約10 fg/mL未満の濃度の分析物を含むことができる。パネルに含むことができる分析物の非限定的なリストには、例えば、HIV gp41、HIV gp120、HIV gp160、HIV p24、HIV p66、HIV p51、HIV p17、HIV p31、Tat、Nef、Vif、A、B、C、D、またはE型肝炎抗原、HPVタイプ16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、および/または82、HPV-E6およびE7タンパク質、IL-17、IL-21、IL-31、IL-22、IL-23、IL-33、心筋トロポニンT、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。なおさらには、パネルには直近の疾患の発症、暴露および/または感染に起因して低存在量であり得る1つまたはそれ以上の下記の分析物を含むことができる: Ab-38、Ab-40、Ab-42、Ab-39、Ab-43、Ab-15、Ab-16、Ab-17、アミロイドオリゴマー、C-ペプチド、IL-13、IL-17A、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、INF-g、PSA、Tau、フォスフォ-Tau、TNF-a、トロポニンI、心筋トロポニンT、トロポニンC、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、EPO、LC3B、アルブミン、CHO-P、大腸菌HCP、IgA、IgE、IgG、IgG1、IgG4、IgM、NSO-P、Per-C6、残余プロテインA、IgG2、IgG3、IgG4、AFP、CA125、カスパーゼ-3アクティブ、CXCL11/I-TAC、ErbB2/HER2、HGFR/o-MET、IFN-、MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、-NGF、TFF3、TIMP1、Kim-1、-2マクログロブリン、D-ダイマー、ICAM-1、ミエロペルオキシダーゼ、ミオグロビン、PAI-1、PCSK9、プラスミノゲン、レニン/プロレニン、tPA、CXCL1/GRO-、CCL2/MCP1、CCL3/MIP-1、CCL4/MIP-1、CCL5/Rantes、CRP、CXCL9/MIG、CXCL10/IL-10、G-CSF、GM-CSF、IFN-、IFN-、IL1、IL-1、IL-3、IL-7、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-18、c-MET、アディポネクチン、FGF21、GLP-1、成長ホルモン、IGF1、IGF2、インシュリン、レプチン、乳汁分泌ホルモン、HB-EGF、AKT、フォスフォ-AKT、およびそれらの組み合わせ。

10

20

30

40

50

## 【0187】

本発明の方法は、上述したように、広い種類の生物学用および生化学用薬剤の検出を許容するように設計されている。1つの実施形態において、本方法は病原体および/または潜在的な病原体ウイルス、生物兵器剤(「BWA」)を含むバクテリアおよび毒素を、血液、たん、大便、フィルター、綿棒などを制限されることなく含む、さまざまな関連する臨床および環境マトリックスにおいて検出するように使用してもよい。本発明の方法を用いて、(単独で、または組み合わせて)分析することができる病原体および毒素の非限定的なリストは、炭疽菌(炭疽)、ペスト菌(*Yersinia pestis*; ペスト)、コレラ菌(*Vibrio cholerae*; コレラ)、野兔病菌(*Francisella tularensis*; 野兔病)、ブルセラ属菌(*Brucella* spp.; ブルセラ症)、Q熱リケッチア(*Coxiella burnetii*; Q熱)、リステリア菌(*Listeria*)、サルモネラ菌(*Salmonella*)、赤痢菌(*Shigella*)、コレラ菌(*V. cholera*)、クラミジアトラコマチス(*Chlamydia trachomatis*)、バークホルデリア痘菌(*Burkholderia pseudomallei*)、天然痘ウイルス(*variola virus*; 天然痘)を含むオルソポックスウイルス(*orthopox viruses*)、ウイルス性脳炎、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(*Venezuelan equine encephalitis virus*; VEE)、西部ウマ脳炎ウイルス(*western equine encephalitis virus*; WEE)、東部ウマ脳炎ウイルス(*eastern equine encephalitis virus*; EEE)、アルファウイルス、ウイルス性出血熱、アレナウイルス科、ブニヤウイルス科、フィロウイルス科、フラビウイルス科、エボラウイルス、ブドウ球菌エンテロトキシン、リシン、ボツリヌス毒素(A、B、E)、ボツリヌス菌、マイコトキシン、フザリウム、マイロテシウム(*Myrothecium*)、セファロスポリウム、トリコデルマ、ベルチシモノスポリウム(*Verticillium*)、スタキボトリス、鼻疽、小麦菌、パチルスグロビジイ(*Bacillus globigii*)、セラチアマルセセンス、黄色の雨(*yellow rain*)、トリコセセン系マイコトキシン、ネズミチフス菌、アフマトキシン、インドネズミノミ、ディアマヌスモンタヌス(*Diamanus montanus*)、痘瘡、サル痘ウイルス、アレナウイルス、ハンタウイルス、ラッサ熱、アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、リフトバレー熱ウイルス、クリミア-コンゴウイルス、ハンタウイルス、マールブルグ出血熱、黄熱病ウイルス、デング熱ウイルス、インフルエンザ(H5N1型鳥インフルエンザ、インフルエンザA、インフルエンザA、H1特異的、インフルエンザA、H3特異的、インフルエンザA、H5特異的、インフルエンザA、2009-H1N1特異的、インフルエンザBなどのヒトおよび動物の株を含む)、RSV、ヒト免疫不全ウイルスIおよびII(HIV IおよびII)、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎(非A、BまたはC)、エンテロウイルス、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、クラミジアトラコマチス、ナイセリアゴノレア、脛トリコモナス、ヒトパピローマウイルス、梅毒トレポネマ、肺炎連鎖球菌、ボレリア・ブルグドルフェリ(*Borrelia burgdorferi*)、ヘモフィルスインフルエンザエ、肺炎マイコプラズマ、クラミドフィラニューモニエ、レジオネラニューモフィラ、黄色ブドウ球菌、ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)、アブリン、志賀毒素1、志賀毒素2、モラクセラカタラーリス、化膿連鎖球菌、クロストリジウムディフィシル、髄膜炎菌、肺炎桿菌、結核菌、A群連鎖球菌、大腸菌O157、コロナウイルス、コクサッキーAウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、メタニューモウイルス、ワクシニア、ならびにアデノウイルスである。

## 【0188】

本明細書に記載の結合アッセイの改良法は、結合アッセイのダイナミックレンジ、すなわち、希釈することなくシステムもしくは方法によって定量化され得る流体サンプル中の分析物分子の濃度またはサンプルの濃度の範囲、を拡大するかまたは同様の結果を生ずる

10

20

30

40

50

アッセイ条件の変更（例えば、使用する試薬の濃度など）するために使用することができ、ここで、分析物分子の測定濃度は実質的に正確に決定され得る。流体サンプル中の分析物分子の濃度は、流体サンプル中の分析物分子の測定濃度が、流体サンプル中の分析物分子の実際の（例えば、真の）濃度の約10%以内であれば、実質的に正確に決定されたものとみなされてもよい。ある実施形態において、流体サンプル中の分析物分子の測定濃度は測定濃度が流体サンプル中の分析物分子の実際の濃度の約5%以内、約4%以内、約3%以内、約2%以内、約1%以内、約0.5%以内、約0.4%以内、約0.3%以内、約0.2%以内、約0.1%以内である実施形態において実質的に正確に決定される。いくつかの場合において、決定した濃度の測定値は、真の（例えば、実際の）濃度とは、約20%以下、約15%以下、約10%以下、約5%以下、約4%以下、約3%以下、約2%以下、約1%以下、約0.5%以下異なる。アッセイ方法の精度は、いくつかの実施形態において、選択したアッセイ方法を用い、測定濃度を実際の濃度と比較して、既知の濃度の流体サンプル中の分析物分子の濃度を決定することにより、決定されてもよい。

10

#### 【0189】

いくつかの実施形態において、システムまたは方法は、約1000(3 log)、約10,000(4 log)、約100,000(5 log)、約350,000(5.5 log)、1,000,000(6 log)、約3,500,000(6.5 log)、約10,000,000(7 log)、約35,000,000(7.5 log)、約100,000,000(8 log)以上のダイナミックレンジにわたって流体サンプル中の分析物分子の濃度を測定することができるものであってよい。

20

#### 【0190】

いくつかの実施形態において、実質的に正確に決定され得る流体サンプル中の分析物分子の濃度（例えば未知の濃度）は、約5000 fM（フェムトモル）未満、約3000 fM未満、約2000 fM未満、約1000 fM未満、約500 fM未満、約300 fM未満、約200 fM未満、約100 fM未満、約50 fM未満、約25 fM未満、約10 fM未満、約5 fM未満、約2 fM未満、約1 fM未満、約500 aM（アトモル）未満、約100 aM未満、約10 aM未満、約5 aM未満、約1 aM未満、約0.1 aM未満、約500 zM（zeptomol）未満、約100 zM未満、約10 zM未満、約5 zM未満、約1 zM未満、約0.1 zM未満、またはそれ以下である。いくつかの場合において、検出限界値（例えば、溶液中で決定され得る分析物分子の最も低い濃度）は約100 fM、約50 fM、約25 fM、約10 fM、約5 fM、約2 fM、約1 fM、約500 aM（アトモル）、約100 aM、約50 aM、約10 aM、約5 aM、約1 aM、約0.1 aM、約500 zM（zeptomol）、約100 zM、約50 zM、約10 zM、約5 zM、約1 zM、約0.1 zM以下である。いくつかの実施形態において、実質的に正確に決定され得る流体サンプル中の分析物分子または粒子の濃度は、約5000 fMと約0.1 fMの間、約3000 fMと約0.1 fMの間、約1000 fMと約0.1 fMの間、約1000 fMと約0.1 zMの間、約100 fMと約1 zMの間、約100 aMと約0.1 zMの間、またはそれ以下である。検出の上限（例えば、溶液中で決定され得る分析物分子の上限濃度）は少なくとも約100 fM、少なくとも約1000 fM、少なくとも約10 pM（ピコモル）、少なくとも約100 pM、少なくとも約100 pM、少なくとも約10 nM（ナノモル）、少なくとも約100 nM、少なくとも約1000 nM、少なくとも約10 uM、少なくとも約100 uM、少なくとも約1000 uM、少なくとも約10 mM、少なくとも約100 mM、少なくとも約1000 mM、またはそれ以上である。いくつかの実施形態において、決定される流体サンプル中の分析物分子または粒子の濃度は、約 $50 \times 10^{-15}$  M未満、または約 $40 \times 10^{-15}$  M未満、または約 $30 \times 10^{-15}$  M未満、または約 $20 \times 10^{-15}$  M未満、または約 $10 \times 10^{-15}$  M未満、または約 $1 \times 10^{-15}$  M未満である。

30

40

#### 【0191】

いくつかの実施形態において、実質的に正確に決定され得るサンプル中の分析物分子の濃度は、約100 fM未満、約10 fM未満、約3 fM未満、約1 fM未満、約0.3 f

50

M未満、約0.1 fM未満、約0.03 fM未満、またはそれ以下である。いくつかの実施形態において、実質的に正確に決定され得るサンプル中の分析物分子の濃度は、約5000 fMと約0.1 fMの間、約3000 fMと約0.1 fMの間、約1000 fMと約0.1 fMの間、約1000 fMと約1 fMの間、約100 fMと約1 fMの間、約100 fMと約0.1 fMの間である。サンプル中の分析物分子の濃度は、サンプル中の分析物分子の測定濃度が、サンプル中の分析物分子の実際の濃度の約20%以内であれば、実質的に正確に決定されたものとみなされてもよい。ある実施形態において、サンプル中の分析物分子の測定濃度は、サンプル中の分析物分子の実際の濃度の約10%以内、約3%以内、または約1%以内であってよい。アッセイ方法の精度は、いくつかの実施形態において、選択したアッセイ方法を用い、既知の濃度のサンプル中の分析物分子の濃度を決定することにより、決定されてもよい。好ましくは、アッセイは、サンプル中に約10~10,000分子、好ましくは、サンプル中に100~5,000分子、およびより好ましくは、サンプル中に100~1000分子を検出することができる。

10

#### 【0192】

例えば、同一の捕捉抗体、および2つの検出抗体のいずれか一方、ならびに同一標識および同一検出技術を使用して測定した従来のサンドイッチ免疫アッセイ技術と比較すると、本明細書に記述したアッセイフォーマットの使用は、検出信号およびアッセイ感度を10倍も、好ましくは50倍、100倍または1000倍も向上させ得る。本明細書に記述したアッセイフォーマットの使用が、標準的なサンドイッチ免疫アッセイと比較して、検出信号およびアッセイ感度を100倍向上させるのが好ましい。

20

#### 【0193】

本発明の方法の有利な態様の1つは、特に高感度の光検出技術と組み合わせた場合、信号増幅によって個々の結合イベントを光の輝点として検出できるようになることである。信号の定量化は、個々のイベントの計数により（バックグラウンドノイズから結合イベントを識別する能力の改善により、低濃度の分析物に対して感度を上昇できる）または、全結合イベントの信号を積分することにより（高濃度の分析物測定に対して、より良いダイナミックレンジを提供できる）、実行できる。

#### 【0194】

本発明の方法は様々なアッセイ装置および/またはフォーマットにおいて使用され得る。アッセイ装置には、例えばアッセイプレート、カートリッジ、マルチウェルアッセイプレート、反応容器、テストチューブ、キュベット、フローセル、アッセイチップ、ラテラルフロー装置等のアッセイモジュールを含み、これら装置はアッセイ試薬（標的化剤または他の結合試薬を含み得る）を有するが、アッセイ試薬はアッセイの進行とともに追加されるか、またはアッセイモジュールのウェル、チャンバまたはアッセイ領域にあらかじめロードされる。これらの装置では特異的結合アッセイ、例えば免疫アッセイ、免疫クロマトグラフィーアッセイに対して様々なアッセイフォーマットを用い得る。例示のアッセイ装置およびフォーマットを本明細書で後に記述する。ある種の実施形態において、本発明の方法は、乾燥状態で保存されたアッセイ試薬を用いてもよく、アッセイ装置/キットはさらに、アッセイ試薬を乾燥状態に維持するための乾燥剤を含んでもよく、また乾燥剤が供給されてもよい。アッセイ試薬をあらかじめロードしたアッセイ装置により、保存中の優れた安定性を維持しつつ、アッセイ測定の速度を大幅に向上させ、かつアッセイ測定を単純化できる。乾燥アッセイ試薬は、乾燥でき、後にアッセイでの使用に先立って再構成できる任意のアッセイ試薬であってよい。このような試薬には、目的の分析物を検出するために使用され得る結合アッセイに有益な結合試薬、酵素、酵素基質、指示染料および他の反応化合物が含まれるがこれらに限定するものではない。アッセイ試薬はさらに、検出のメカニズムに直接関与しないが、アッセイで補助的な役割を果たす物質を含んでもよく、例えば遮断剤、安定化剤、界面活性剤、塩、pH緩衝液、保存剤などを含むが、これらに限定するものではない。試薬は遊離状態で存在してもよく、またはアッセイモジュールにおけるコンパートメント（例えばチャンバ、チャンネル、フローセル、ウェル等）の表面、もしくはコロイド、ビーズまたは他の粒子の支持物の表面を含む固相上で支持さ

30

40

50

れていてもよい。

【0195】

本発明の方法は分析物の量を測定するための様々な方法と一緒に使用でき、特に、固相に結合した分析物の量を測定するための方法とともに使用できる。使用可能な技術には、細胞培養ベースアッセイ、結合アッセイ（凝集検査、免疫アッセイ、核酸ハイブリッド形成アッセイ等を含む）、酵素アッセイ、比色分析等、当業界で知られた技術があるがこれらに限定されない。他の適切な技術は当技術分野において平均的なスキルを有する当業者には容易に明らかとなる。なんらかの測定技術により、測定は目視検査可能なものとなり、測定を実施するための装置の使用が必要となる場合があるが、それが利点となる場合もある。

10

【0196】

分析物の量を測定する方法は非標識技術を含み、i) 表面に分析物が結合した後、表面での質量または屈折率の変化を測定する技術（例えば表面超音波技術、表面プラズモン共鳴センサー、偏光解析技術等）、ii) 質量分析技術（表面上の分析物を測定できるMALDI、SELDI等の技術を含む）、iii) クロマトグラフィー技術または電気泳動技術、iv) 蛍光技術（分析物固有の蛍光に基づく）等があるがこれらに限定されない。

【0197】

分析物の量を測定するための方法はさらに、分析物に直接または間接的に結合し得る標識の検出を通して（例えば標識された分析物の結合パートナーの使用を通じて）分析物を測定する技術を含む。適切な標識には、直接視覚化できる標識を含む（例えば、視覚的に確認できる粒子および測定可能な信号を生成する標識、例えば光散乱、光学的吸収、蛍光、化学発光、電気化学発光、放射線、磁場等）。使用し得る標識はまた、光散乱、吸収、蛍光等の測定可能な信号をもたらす化学的活性を有する酵素または他の化学反応種を含む。標識としての酵素の使用は、ELISA、酵素免疫アッセイ法またはEIAと呼ばれる酵素結合免疫吸着検査法において確立されている。ELISAフォーマットでは、未知の量の抗原を表面に固定し、次に特異抗体を表面に流して、特異抗体を抗原に結合させる。この抗体は酵素に結合し、最終工程で、ある物質が追加され、酵素は検出可能な信号に変化をもたらす産物に変わる。産物の形成は、例えば、吸収、蛍光、化学発光、光散乱等の測定可能な特徴における基質との差異によって検出可能である。本発明による固相結合法と一緒に使用し得るある測定方法は（すべてではないが）、非結合成分（例えば標識）を固相から除去する洗浄工程から利益を得る場合もあり、この工程が必要となる場合もある。したがって、本発明の方法はそのような洗浄工程を含み得る。

20

30

【0198】

一対の検出可能な標識を用いるこれら実施形態において、一対の標識が互いに近くにある、つまり、検出複合体内の目的の分析物にそれぞれに直接または間接的に結合する場合、これら標識物質はそれぞれ独立して検出できる能力、および/または検出可能な信号を生成するよう連携する能力に基づいて選択される。一実施形態において、第1の検出可能な標識は共役酵素反応系の第1の酵素であり、第2の検出可能な標識は共役酵素反応系の第2の酵素であり、本方法はさらに、反応系の1つまたはそれ以上の基質を追加して、それにより酵素反応系の検出可能な産物を生成する工程を含む。検出可能な産物を含む反応容器と含まない反応容器は識別可能である。好ましい実施形態では、第1の酵素と第2の酵素が近接している、例えば200nm未満、理想的には50nm未満の場合にのみ、検出可能な産物が生成される。一実施形態において、第1の酵素はオキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼであり、第2の酵素はペルオキシダーゼであり、基質はオキシダーゼ基質、例えばグルコース、と標識チラミド、Amplex Red（10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジン）、またはルミノール誘導体（本明細書ではまとめて、標識した反応性誘導体と呼び、好ましい実施形態では、標識した反応性誘導体はAmplex Redまたはルミノールを含む）を含む。この実施形態では、第1の酵素が基質と反応して第2の酵素と反応する産物を生成し、この産物は標識した反応性誘導体と反応する第2の産物を生成し、検出可能な種を生成する。好ましくは、この反応は検出複合

40

50



体の第1および第2の酵素により触媒され、表面上に標識した反応性誘導体を固定する。この誘導体は表面上に存在する分析物分子の数を決定するために測定され得る。一実施形態において、標識した反応性誘導体はビオチン-チラミドであり、本方法はさらに、標識ストレプトアビジンを追加し、ストレプトアビジン上の標識を測定することを含む。

【0199】

さらに本方法で利用できる別の近接依存性の標識化システムはFRETペアであり、例えば第1の検出可能な標識はFRETドナーであり、検出可能な標識はFRETアクセプターである。蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)は、2つの色素分子の電子的励起状態の間の距離に依存した相互作用であり、励起がドナー分子からアクセプター分子へ、発光せず転移する。FRETの効率は分子間の距離の6乗に反比例し、これは生体高分子の大きさに比肩する距離であるため、有用なシステムである。この標識化システムでは、近接依存性の信号は、FRETドナーを励起させてFRETアクセプターからの放出を測定することで測定される。ドナーおよびアクセプター分子は、例えば約10~100オングストローム等の近接距離にあるのが好ましく、アクセプターの吸収スペクトルはドナーの蛍光発光スペクトルと重なり合うことが好ましく、ドナーおよびアクセプターの転移双極子配向はほぼ並行でなくてはならない。FRETペアのリストを表1に示すがこれに限定しない。

【0200】

【表1】

表1.FRETペア例

ドナー	アクセプター
フルオレセイン	テトラメチルローダミン
IAEDANS	フルオレセイン
EDANS	ダブシル
フルオレセイン	フルオレセイン
BODIPY FL	BODIPY FL
フルオレセイン	QSY7およびQSY9色素

光顕微鏡法に対して様々なFRET検出法が存在し、例えばアクセプターの光退色、ドナーの光退色、比率イメージング、増感発光および蛍光寿命測定がある。

【0201】

実施形態において使用可能な、一対の検出標識を用いる別の適切な標識化システムは、第1および第2の検出可能な標識を独立して測定できるシステムである。例えば、第1および第2の検出可能な標識は、分光特性に対して互いに異なる発光標識であってもよい。あるいは、第1の検出可能な標識は、第1の基質と反応して第1の信号を生成する第1の酵素であり、第2の検出可能な標識は、第2の基質と反応して異なる第2の信号を生成する第2の酵素であり、本方法はさらに、第1の酵素基質および第2の酵素基質を追加し、第1および第2の信号が生成される反応容器の数を計数することを含む。第1および第2の信号は異なる分光特性により、光学的吸収および/または発光信号が異なる可能性がある。

【0202】

第1および第2の検出可能な標識が第1および第2の酵素を含む場合、これら酵素はそ

れぞれ加水分解酵素、例えばホスファターゼ、スルファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、またはそれらの組合せであってもよく、したがって、第1および第2の基質はリン酸塩、硫酸塩、ガラクトシドおよびグルクロニド修飾安定化ジオキセタン、4-メチルウンベリフェリル、フルオレセインまたはそれらの組合せから選択される。あるいは、第1および第2の酵素はホースラディッシュペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼから選択される。

#### 【0203】

あるいは、分析物分子を検出するために使用する標識は単一分子の蛍光検出、例えば蛍光相関分光法、および/または蛍光交差相関分光法において使用できる蛍光種であってもよい。単一分子蛍光検出は、キャピラリーに検出可能な種を含む溶出液を流し、キャピラリー内の内容物に光源を集中させて監視領域を設定し、光検知器で監視領域を観察し、監視領域を通過する蛍光分子を検出することを含む。

#### 【0204】

一実施形態では、試料内の目的の分析物は電気化学発光に基づいたアッセイフォーマット、例えば電気化学発光(ECL)に基づく免疫アッセイを使用して測定してもよい。ECLの感度の高さ、幅広いダイナミックレンジおよび選択性は医学的診断における重要な特質である。市販のECL器具は並はずれた性能を示し、感度、ダイナミックレンジ、精度に優れ、複雑なサンプル基材を許容することを含め、複数の理由から広く使用されてきた。ECLの放出を誘起できる種(ECL活性種)がECL標識として使用されてきており、例えば、i)金属が例えば第VIII族の貴金属からのものである有機金属化合物(Ru含有およびOs含有有機金属化合物、例えばトリス-ピピリジル-ルテニウム(RuBpy)部分を含む)ならびにii)ルミノールおよび関連化合物がある。ECLプロセスのECL標識関与する種を本明細書においてECL共反応物(coreactants)と呼ぶ。一般に使用される共反応物としては、RuBpy由来のECLに対する第三級アミン(例えば米国特許第5,846,485号を参照)、オキザレートおよびパーサルフェート、ならびにルミノール由来のECLに対する過酸化水素(例えば米国特許第5,240,863号を参照)などがある。ECL標識が発生する光を、レポーター信号として診断手続に使用できる(Bardら、米国特許第5,238,808号、参照によって本明細書に組み入れる)。例えば、ECL標識は、抗体、核酸プローブ、レセプターまたはリガンド等の結合剤に共有結合でき、結合相互作用での結合試薬の関与はECL標識から放出されたECLの測定によりモニターできる。あるいは、ECL活性化合物からのECL信号は化学的環境の指標になり得る(例えば、米国特許第5,641,623号を参照。これはECL共反応物の形成または分解をモニターするECLアッセイを記載している)。ECL、ECL標識、ECLアッセイおよびECLアッセイを実施するための器具についてのさらなる背景については、米国特許第5,093,268号、同第5,147,806号、同第5,324,457号、同第5,591,581号、同第5,597,910号、同第5,641,623号、同第5,643,713号、同第5,679,519号、同第5,705,402号、同第5,846,485号、同第5,866,434号、同第5,786,141号、同第5,731,147号、同第6,066,448号、同第6,136,268号、同第5,776,672号、同第5,308,754号、同第5,240,863号、同第6,207,369号、同第6,214,552号および同第5,589,136号、ならびに国際公開第99/63347号、WO00/03233、WO99/58962、WO99/32662、WO99/14599、WO98/12539、WO97/36931およびWO98/57154を参照されたい。これらはすべて参照によって本明細書に組み入れる。

#### 【0205】

複数のアッセイ測定を単一の試料上で実行する場合、本発明の方法はシングルプレックスまたはマルチプレックスのフォーマットに適用し得る。本発明で使用できるマルチプレックス測定は、これらに限定するものではないが、i)多数のセンサーの使用を含み；ii)ある表面(例えばアレイ)上の位置によって識別可能な、表面上の別個のアッセイ領

10

20

30

40

50

域を使用し；*i i i*）粒子性状、例えば、大きさ、形、色等により識別可能な粒子にコーティングした試薬の使用を含み；*i v*）光学的性質（例えば吸収度または発光スペクトル）に基づいて識別可能なアッセイ信号を生成する、または、*v*）アッセイ信号の時間的特性（例えば時間、信号の周波数または位相）に基づく、マルチプレックス測定を含む。

#### 【0206】

いくつかの実施形態では、試料内の分析物分子の濃度測定は、少なくとも一部分で、測定したパラメーターと検量基準との比較により決定してもよい。例えば、分析物分子を含む結合表面の分画を検量線と比較して、試料内の分析物分子の濃度測定を求めてもよい。検量線は、既知の濃度の複数の標準化試料のアッセイを、テスト試料の分析に使用する条件下で完了することで作成し得る。各標準化試料において分析物分子の検出／定量化に関係する信号を読むことで、分析物分子の既知濃度に分析物分子の検出を関連づける検量線を作成し得る。その後、アッセイを未知濃度の分析物分子を含む試料で完了させ、このアッセイでの分析物分子の検出を検量線上にプロットし、試料内の分析物分子の濃度測定を決定し得る。

#### 【0207】

光学信号（蛍光、化学発光または電気化学発光等）の測定に映像化技術を使用する特定のケースでは、結合イベントは光源の輝点として検出できる。点源の表面密度が低い場合（例えば、 $R \times R$ 領域に点源を見つける可能性、 $-R$ は検出システムにおける空間分解能である $-$ が10%未満である場合）、任意の観察された点源は単一の結合イベントによるものである可能性が高い。これらの条件下では、イベントの計数が最も高感度な測定となり得る。表面密度が増加するにつれ、個々の結合イベントを分解し計数することが徐々に困難となる。これらの条件下では、結合表面の光学信号の積分により正確な測定が可能となる。

#### 【0208】

本明細書に記述された方法が、当業者に既知の免疫アッセイの多くのプラットフォームに適用できることは、当業者には明らかであろう。免疫アッセイプラットフォームの様々な特徴は、特定のプラットフォームに適合するよう調整し得るが、この調整は通常のスキルを有する当業者に十分可能なものである。例えば、本明細書に記述された方法は、コード化粒子を使用するビーズベースのフォーマットに適用できる。このようなシステムでは、使用するビーズは磁性または非磁性であってよく、ビーズの表面は捕捉試薬の1つまたはそれ以上の複製を有するよう修飾される。本システムで用いる検出試薬は一对の検出試薬である。一実施形態では、2つの検出試薬は識別可能な蛍光標識を含む。あるいは、2つの検出試薬は、本明細書に記載したように核酸プローブで修飾され、この場合、免疫アッセイ法は伸長プロセス、例えば $RCAPLA$ を含み、検出可能な各検出試薬の存在を示す増幅産物を生成する。検出試薬が識別可能な蛍光標識を2つ含む場合、測定工程にはフローセルへのビーズの導入を含み、ビーズが磁性である場合、フローセルにおいてビーズを捕捉することを含む。検出試薬が核酸プローブで修飾される場合、測定工程にはビーズ上にサンドイッチ複合体を形成すること、 $RCAPLA$ を実行すること、および蛍光標識した検出プローブでアンプリコンを標識することを含む。その後、標識されたビーズをフローセルへ導入し、ビーズが磁性である場合は、ビーズをフローセル内で捕捉する。各実施形態では、アッセイは蛍光標識したコード化ビーズの同定をベースにしたスペクトルによって多重化できる。多色検出における励起光源および放出光検出器は、各実施形態の結合イベントの検出に使用でき、定量化は検出可能な両標識を有するビーズ、または検出できるよう標識された伸長産物を含むこれらビーズを計数することで実現でき、定量化はまた、積分強度、例えばすべての結合イベントの信号に対する積分による検出によって実現できる。したがって、あるキットが上述した方法で使用するために提供されるが、このキットは1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、下記の1つまたはそれ以上を含む：（a）捕捉試薬を有する磁性または非磁性ビーズ；（b）識別可能な蛍光標識を有する検出試薬2つ；および（c）アッセイプロトコル用の任意のバッファーおよび／または賦形剤。別のキットが上述した方法で利用できるが、このキ

ットは1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、下記の1つまたはそれ以上を含む：(a) 捕捉試薬を有する磁性または非磁性ビーズ；(b) 核酸プローブで修飾される検出試薬2つ（場合により、検出試薬は別々に提供され、近接プローブ（1および2）は、プローブによる検出試薬を修飾するための命令と一緒に提供される）；および(c) 蛍光標識プローブ；近接プローブによる検出試薬の修飾に必要な任意の試薬；アッセイ希釈剤、キャリアプレート、環状化オリゴヌクレオチド、ライゲーション混合物またはその成分、例えばライゲーションバッファー、ATP、BSA、Tween 20、T4 DNAリガーゼ；RCA混合物またはその成分、例えばBSA、バッファー、dNTP、Tween 20、Phi 29 DNAポリメラーゼ。

#### 【0209】

別の実施形態では、本明細書に記述した方法は、フローセル分析、ビーズベースのフォーマットに適用できる。そのようなシステムでは、使用するビーズは磁性であり得、ビーズの表面は捕捉試薬の1つまたはそれ以上の複製を含むよう修飾される。本システムで用いる検出試薬は、本明細書に記載したような核酸プローブで修飾される一対の検出試薬であり、この場合、免疫アッセイ法は伸長プロセス、例えばRCA-PLAを含み、検出可能な各検出試薬の存在を示す増幅産物を生成する。測定工程はビーズ上にサンドイッチ複合体を形成すること、RCA-PLAを実行すること、およびECL標識した検出プローブでアンプリコンを標識することを含む。その後、標識されたビーズをフローセルへ導入し、ビーズをフローセル内で捕捉する。特に、磁場を磁粉、例えばビーズを引きつけるために電極表面に印加するが、これは様々な金属、例えば白金を含み得る。電圧源は電極に電圧を印加するために使用され、放出光検出器は結合イベントを検出するために使用でき；定量化は検出できるよう標識された伸長産物を有するビーズを計数することで実現でき、定量化はまた、積分強度、例えばすべての結合イベントの信号に対する積分による検出によって実現できる。上述した方法で使用可能なキットは、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、下記の1つまたはそれ以上を含むことができる：(a) 捕捉試薬を有する磁性ビーズ；(b) 核酸プローブで修飾される検出試薬2つ（場合により、検出試薬は別々に提供され、近接プローブ（1および2）は、プローブによる検出試薬を修飾するための命令と一緒に提供される）；および(c) ECL標識プローブ；近接プローブによる検出試薬の修飾に必要な任意の試薬；アッセイ希釈剤、キャリアプレート、環状化オリゴヌクレオチド、ライゲーション混合物またはその成分、例えばライゲーションバッファー、ATP、BSA、Tween 20、T4 DNAリガーゼ；RCA混合物またはその成分、例えばBSA、バッファー、dNTP、Tween 20、Phi 29 DNAポリメラーゼ。

#### 【0210】

フローセル分析のビーズベースのフォーマットの特定の実施形態では、試料を、ピオチン化モノクローナル分析物特異的捕捉抗体、および各々、オリゴヌクレオチドをコンジュゲートさせたモノクローナル分析物特異抗体の混合物とインキュベートし、反応させてサンドイッチ複合体を形成する。ストレプトアビジンコート微粒子の追加後、この複合体は、ピオチンとストレプトアビジンとの間の相互作用によって固相に結合する。ライゲーション混合物をこの混合物に追加し、混合物とライゲーション混合物とと一緒にインキュベートし、洗浄して、過剰な環状化オリゴヌクレオチドを除去し、RCA混合物と一緒にインキュベートする。混合物を洗浄し、ピオチン標識検出プローブの混合物を追加する。適切な標識、例えば発光標識、化学発光標識、またはSULFO-TAG等の電気化学発光標識を組み込むため、検出プローブを、末端のピオチン標識と合成し、SULFO-TAG標識ストレプトアビジンにあらかじめ結合させる。反応混合物を測定セルへ吸引し、微粒子を、例えば、白金電極などの金属電極の電極の表面上に磁気的に捕捉する。その後、非結合物質を適切な洗浄バッファー、例えばProCell (TPA含有バッファー) で除去する。その後、電極に電圧を印加して化学発光の放出を誘発し、発光を光電子増倍管により測定する。電圧の印加と結果としての発光の測定は、例えばCobasおよび/またはElectrosys instrument (Hoffmann-La Roche L

10

20

30

40

50

TD、から入手可能)など任意の適切なフローセルにおいて行うことができる。

#### 【0211】

また別の実施形態において、本明細書に記述した方法は、ビーズベースのフォーマットに適用でき、キャピラリーの流動によりデジタル的に個々の分子を計数できる。そのようなシステムでは、使用するビーズは磁性であり得、ビーズの表面は捕捉試薬の1つまたはそれ以上の複製を含むよう修飾される。本システムで用いる検出試薬は、識別可能な蛍光標識を含む一対の検出試薬である。この測定工程は、捕捉試薬、分析物および検出試薬を含むサンドイッチ複合体を形成すること、検出試薬を架橋すること、検出試薬を溶出すること、ならびにフローセルにビーズを導入することを含む。多色検出における励起光源および放出光検出器は、結合イベントの検出に使用でき、定量化はフローセル内の2つの蛍光体の検出を関連させることにより実現でき、定量化はまた、積分強度、例えばすべての結合イベントの信号に対する積分による検出によって実現できる。上述した方法で使用可能なキットは、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、下記の1つまたはそれ以上を含むことができる：(a) 捕捉試薬を有する磁性ビーズ；(b) 識別可能な蛍光標識を有する2つの架橋可能な検出試薬；および(c) アッセイプロトコル用の任意のバッファーおよび/または賦形剤。

10

#### 【0212】

さらに、本明細書に記述した方法はビーズベースのフォーマットに適用できるが、このフォーマットは個々のナノウェル中へビーズを分離させることを含む。そのようなシステムでは、使用するビーズは磁性であり得、ビーズの表面は捕捉試薬の1つまたはそれ以上の複製を含むよう修飾される。本システムで用いる検出試薬は、識別可能な酵素標識を含む一対の検出試薬である。測定工程は捕捉試薬、分析物および検出試薬を含むサンドイッチ複合体を形成すること、ならびに2つの酵素標識のための基質を追加することを含む。その後、ビーズは個々のナノウェル内で捕捉される。アッセイは、異なる分光特性を有する酵素産物の同定をベースにしたスペクトルによって多重化できる。多色検出における励起光源および放出光検出器は、結合イベントの検出に使用でき、定量化は両酵素産物を含むナノウェルを計数することで実現でき、定量化はまた、積分強度、例えば全ナノウェルの信号に対する積分による検出によって実現できる。上述した方法で使用できるあるキットは、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、下記の1つまたはそれ以上を含むことができる：(a) 捕捉試薬を有する磁性ビーズ；(b) 識別可能な酵素標識でそれぞれ修飾した2つの検出試薬、例えばビオチン化検出試薬およびハプテンコンジュゲート検出試薬；(c) ストレプトアビジン - ガラクトシダーゼ、抗ハプテンコンジュゲート酵素、レソルフィン d ガラクトピラノシド；(d) アレイ、例えばQuanterix DVDフォーマットアレイ；(e) フルオロカーボン油；ならびに(f) アッセイプロトコル用の任意のバッファーおよび/または賦形剤。この特定の実施形態では、検出可能な信号は、ナノウェル高感度システムの使用と近接性に基づいた検出システムとを組み合わせることにより増強される。特定の近接性に基づいた検出システムを使用してこの特定の実施形態を説明するが、本明細書に記述された他の近接性に基づいた検出システム、例えばFRETドナー/アクセプターシステム；分光特性が互いに異なる発光標識；または上述したような加水分解酵素である第1および第2の酵素および適切な付随する基質の使用、をアッセイでの検出可能な信号を増強するために使用できるという事実を当業者は理解するであろう。

20

30

40

#### 【0213】

さらに、本明細書に記述された方法は、ビーズアレイベースのプラットフォームに適用できる。そのようなシステムでは、使用するビーズは非磁性であってよく、ビーズの表面は捕捉試薬の1つまたはそれ以上の複製を含むよう修飾される。本システムで用いる検出試薬は、第1および第2核酸プローブを含む一対の検出試薬である。この測定工程は、捕捉試薬、分析物および検出試薬を含むサンドイッチ複合体を形成すること、プローブのうちの1つを伸長して、伸長配列を形成すること(ここで伸長は、サンドイッチ複合体における第1および第2プローブの共局在化に依存する)、蛍光プローブで伸長配列を標識す

50

ること、および表面から溶出液中へ伸長配列を放出することを含む。多色検出における励起光源および放光検出器は、結合イベントの検出に使用でき、定量化は検出できるよう標識された個々の伸長産物を計数することで実現でき、定量化はまた、積分強度、例えばすべての結合イベントの信号に対する積分による検出によって実現できる。上述した方法で使用可能なキットは、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、下記の1つまたはそれ以上を含むことができる：(a) 捕捉試薬を有する非磁性ビーズ；(b) 核酸プローブで修飾された検出試薬2つ（場合により、検出試薬は別々に提供され、近接プローブ（1および2）は、プローブによる検出試薬を修飾するための命令と一緒に提供される）；および(c) 蛍光標識したプローブ；近接プローブによる検出試薬の修飾に必要な任意の試薬；アッセイ希釈剤、キャリブレーター、環状化オリゴヌクレオチド、ライゲーション混合物またはその成分、例えばライゲーションバッファー、ATP、BSA、Tween 20、T4 DNAリガーゼ；RCA混合物またはその成分、例えばBSA、バッファー、dNTP、Tween 20、Phi 29 DNAポリメラーゼ。

10

#### 【0214】

本明細書に記述した、性能を改善した結合アッセイは、アッセイで用いる構成部分のセットを含む1つまたはそれ以上のキットを使用して実行できる。例えば、試料内の分析物の検出に使用されるキットは、1つまたはそれ以上のバイアル、容器またはコンパートメントにおいて、分析物用の捕捉試薬および固定試薬を含む表面；および核酸プローブに連結される、分析物用の検出試薬を含む。そのようなキットは、固定オリゴヌクレオチド配列を含む固定試薬を含んでいてもよい。

20

#### 【0215】

本明細書に記述した方法の実行に使用できる別のキットは、1つまたはそれ以上のバイアル、容器またはコンパートメントにおいて、分析物用の捕捉試薬および固定オリゴヌクレオチド配列を含む固定試薬を含む表面；第1の核酸プローブに結合する第1の検出試薬；ならびに、第2の核酸プローブに結合する第2の検出試薬を含む。

#### 【0216】

さらに、本明細書に記述した結合アッセイの実行に使用できる別のキットは、1つまたはそれ以上のバイアル、容器またはコンパートメントにおいて、分析物用の捕捉試薬および固定試薬を含む表面；第1の近接プローブを含む分析物用の第1の検出試薬；第2の近接プローブを含む分析物用の第2の検出試薬；ならびに、(i) 第2の近接プローブに相補的な内部配列および(ii) 第1の近接プローブの非オーバーラップ領域に相補的な2つの末端配列を含むコネクター配列を含む。あるいは、キットは上記に代えて、分析物用の捕捉試薬および固定試薬を含む表面；第1の近接プローブを含む分析物用の第1の検出試薬；第2の近接プローブを含む分析物用の第2の検出試薬ならびに(i) 第1コネクターオリゴヌクレオチド、および(ii) 第2コネクターオリゴヌクレオチド、を含んでもよく、(x) 第1コネクターの第1末端および第2コネクターの第1末端が、第1の近接プローブの2つの非オーバーラップ領域に相補的であり、(y) 第1コネクターの第2末端および第2コネクターの第2末端が、第1の近接プローブの2つの非オーバーラップ領域に相補的である。さらに、これらのいずれかの、または両キットにおける固定試薬には、固定オリゴヌクレオチド配列を含むことができる。

30

40

#### 【0217】

さらに、本明細書に記述された方法は、1つまたはそれ以上のバイアル、容器またはコンパートメントにおいて、第1の検出可能な標識を含む第1の検出試薬；第2の検出可能な標識を含む第2の検出試薬；分析物分子を1個含む、または含まないよう構成された複数の反応容器；および場合により捕捉試薬を含む表面を含むキットを使用して実施できる。

#### 【0218】

最後に、本明細書に記述した方法を使用する分析物検出のためのキットは、1つまたはそれ以上のバイアル、容器または区画において、固定化した捕捉試薬；第1の検出可能な標

50

識を有する第 1 の検出試薬；第 2 の検出可能な標識を有する第 2 の検出試薬；および第 1 および第 2 の検出試薬と反応する架橋剤を含む表面、を含む。架橋剤は、検出試薬に結合した反応部分を連結する多機能性架橋剤、または検出試薬に結合した結合部分の多価の結合パートナーを含めることができる。適切な多機能性架橋剤はアミン、チオール類、ヒドラジド、アルデヒド、エステル、ヨードアセトアミド、マレイミド類、クリックケミストリー試薬およびそれらの組合せ含むが、これらに限定するものではない。同様に、多価の結合パートナーの一例は、検出試薬を標的とする多価の抗種 ( a n t i - s p e c i e s ) 抗体であるが、これはその動物種の抗体である。架橋剤はまたストレプトアビジン、検出試薬に結合する結合パートナーの一方とペアになった場合の、アビジンまたはビオチンを含むことができる。架橋剤はまたキットの構成部分に直接的または間接的に結合された核酸プローブに相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドであってもよい。特定の実施形態において、本明細書に記述した方法で使用するキットは、1 つまたはそれ以上のバイアル、容器またはコンパートメントにおいて、固定化した捕捉試薬；第 1 の検出可能な標識および第 1 の核酸プローブを有する第 1 の検出試薬；第 2 の検出可能な標識および第 2 の核酸プローブを有する第 2 の検出試薬；ならびに第 1 および第 2 核酸プローブに相補的な領域を有する第 3 の核酸を含む表面、を含む。

10

#### 【 0 2 1 9 】

本明細書に記述したキットの表面は、1 つまたはそれ以上の分析物分子に対する複数の捕捉試薬を含むことができ、捕捉試薬は、例えばアレイ、マルチウェルプレート、またはマイクロもしくはナノウェルプレートにおいて、表面上に位置する複数の解像可能な結合領域または反応容器にわたって分布している。加えてこの表面には、分析物分子用の複数の捕捉試薬をそれぞれ含む複数の粒子をさらに含むことができる。

20

#### 【 0 2 2 0 】

上述のキットは、さらに下記の 1 つまたはそれ以上を含むことができる：1 つまたはそれ以上の追加試薬、バッファー、ポリメラーゼ、リガーゼ、および / または d N T P ( 標識、または非標識 ) 。さらに 1 つまたはそれ以上の検出試薬が検出可能な標識を含む場合、キットにはまた、キットで用いる検出可能な標識に対する共反応物を含むことができる。あるいは、1 つまたはそれ以上の検出試薬が共役酵素反応系の構成要素である場合、検出試薬の各々は第 1 および第 2 の酵素を含み、キットはさらに、1 つまたはそれ以上の容器、バイアルまたはコンパートメントにおいて、共役酵素反応系のための 1 つまたはそれ以上の基質、および、場合により共役酵素反応系の産物に結合するよう構成された標識成分を含む。例えば、第 1 の酵素はオキシダーゼであってもよく、第 2 の酵素はペルオキシダーゼであってもよく、キットはさらにオキシダーゼ基質および標識チラミド誘導体を含む。別の実施形態において、第 1 および第 2 の検出可能な試薬は、近接依存性検出システムの成分、例えば F R E T ドナー、F R E T アクセプター、またはそれらの分光特性に関して互いに異なる発光標識を含むことができる。

30

#### 【 0 2 2 1 】

付加的な代替的实施形態

さらなる実施形態を図 7 に図示する。パネル ( a ) のサンドイッチ免疫アッセイ複合体における各近接プローブの一部分が、各セグメントにハイブリダイズした R N A の短鎖により一時的に保護される。R N A 鎖は酵素で除去され、近接プローブの各々が互いにハイブリダイズし、鎖はビオチン化 d N T P を使用して、ポリメラーゼ伸長により伸長する ( パネル ( b ) ) 。鎖に組み込まれた各ビオチン化塩基はそれぞれ、検出可能な標識で標識したストレプトアビジンに結合する ( パネル ( c ) ) 。

40

#### 【 0 2 2 2 】

また別のアプローチを図 8 に図示する。近接プローブは、( パネル ( a ) で示すように ) 固定試薬および検出試薬に結合でき、または各近接プローブは上述のように 2 つの検出試薬に結合できる ( 図示せず ) 。図 7 で図示したのと類似した方法で、各々近接プローブの一部分が、各セグメントにハイブリダイズした R N A の短鎖により一時的に保護される。R N A 鎖は酵素で除去され、近接プローブの各々が互いにハイブリダイズし、鎖はビオ

50

チン化 d N T P を使用して、ポリメラーゼ伸長により伸長する（パネル（b））。鎖に組み込まれた各ビオチン化塩基はそれぞれ、検出可能な標識で標識したストレプトアビジンに結合する（パネル（c））。

#### 【実施例 1】

#### 【0223】

近接ライゲーションおよびローリングサークル増幅の一般的なプロトコル

標的分析物に対する一対の検出抗体を、近接プローブ 1 および 2 を追加して以下のように修飾した：100 uL バッファー中 200 u g の第 1 の検出抗体に、1.74 uL、23 mM の s u l f o - S M C C を追加し、150 mM リン酸緩衝液で希釈し、30 分間室温でインキュベートした。遊離した s u l f o S M C C はサイズ排除クロマトグラフィーにより除去した。検出抗体の最終濃度は 2 m g / m L またはこれよりわずかに低かった。300 u M のチオール修飾オリゴヌクレオチド（近接プローブ 1 および 2）95 uL を、100 mM リン酸緩衝液中 1 mM D T T の 5 uL、0.5 mM E D T A、p H 8.4 で室温で 1 時間還元した。近接プローブ 1 および 2 の配列は次の通りである：

#### 【0224】

チオール修飾近接プローブ 1：S H - A A A A A A A G A C G C T A A T A G T T A A G A C G C T T U U U（配列番号 1；3 つの U 残基は 2' O - メチル R N A である）。

#### 【0225】

チオール修飾近接プローブ 2：S H - A A A A A A A T A T G A C A G A A C T A G A C A C T C T T（配列番号 2）。

#### 【0226】

過剰な S u l f o - S M C C および D T T を例えば、スピンカラム分離器を 3 つ使用して除去し、抗体および D N A を共有結合によるコンジュゲーション用にブールした。この溶液を室温で 1 時間、混合しながらインキュベートした。抗体 - 近接プローブコンジュゲートを、例えばサイズ排除クロマトグラフィーにより精製し、コンジュゲートしなかった抗体およびオリゴヌクレオチドを除去した。

#### 【0227】

M S D M U L T I - S P O T（登録商標）プレート適切な M S D（登録商標）遮断溶液と一緒に 1 時間ブロッキングし洗浄した。プレート上の各結合領域はそれぞれ捕捉抗体および固定部分（B S A - オリゴヌクレオチド複合体として固定化され、オリゴヌクレオチドはローリングサークルのアンプリコンに特異的であるよう選択された）含む。この実施例において使用される固定オリゴヌクレオチドの配列は、5' - A A G A G A G T A G T A C A G C A G C C G T C A A A A A A A A A A A A - / 3 T h i o M C 3 - D / - 3'（配列番号 3）であった。アッセイ希釈剤およびキャリブレーター、または試料（適切に希釈した）各 25 u l（全容積 50 u l となる）を各ウェルに追加した。プレートを 1 ~ 3 時間、振とうさせながらインキュベートし、各ウェルを洗浄した。上述の通り調整した、近接プローブ 1 および 2 で標識した検出抗体の溶液を各ウェル（ウェル当たり 25 u L）に追加し、1 ~ 2 時間振とうさせながらインキュベートした（あるいは、それぞれ個々の検出抗体を連続して追加し、個々の抗体追加後は 1 時間インキュベーションした）。下記成分を含むライゲーション混合物を各ウェルに追加した：（i）環状化オリゴヌクレオチド 1（4 n M）、環状化オリゴヌクレオチド 2（4 n M）、ライゲーションバッファー、A T P（1 m M）、T 4 D N A リガーゼ（0.15 U / u L）。各々の環状化オリゴヌクレオチドは：

#### 【0228】

C i r c - 1：リン酸 - C T A T T A G C G T C C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T A A G A G A G T A G T A G A G C A G C C G T C A A G A G T G T C A A G A G T G T C T A（配列番号 4）。

#### 【0229】

C i r c - 2：リン酸 - G T T C T G T C A T A T T T A A G C G T C

10

20

30

40

50



T T A A (配列番号5)であった。

【0230】

このプレートを室温で30分間ライゲーション混合物と一緒にインキュベートし、洗浄して過剰な環状化オリゴヌクレオチドを除去し、37℃で1.5時間RCA混合物と一緒にインキュベートした。RCA混合物はRCAバッファー、dNTP(各250μM)、Phi29DNAポリメラーゼ(0.125U/ml)を包含していた。プレートを洗浄し、検出プローブの混合物を追加し、37℃で30分間インキュベートした。ここで検出プローブ混合物は次のものを含んでいた: 20mM Tris(1mM SDTA、250mM NaCl、0.01%トリトン、BSA(200μg/ml)、Tween20(0.05%)、検出プローブ(6.25nM)。検出プローブは、配列CAG TGA ATG CGA GTC CGT CT(配列番号6)であった。電気化学発光標識SULFO-TAG(Meso Scale Diagnostics)を組み込むために、検出プローブを、末端のビオチン標識と合成し、SULFO-TAG標識ストレプトアビジンにあらかじめ結合した。プレートを洗浄し、MSD読み取りバッファー150μlを添加し、MSD SECTOR(登録商標)6000リーダーで直ちに読んだ(プレートとリーダーはMeso Scale Discovery、Rockville、MDより提供)。

【0231】

一般的な手順を以下の分析物を検出するために使用した: トロポニンI、Akt(total)、phospho-Akt(473)、phospho-Akt(308)、インフルエンザA核タンパク質(NP)、IL-12p40、IL-12p70、Abeta1-42、TNFアルファモデル系を使用するbridging and isotyping Igアッセイ、B型肝炎表面抗原を使用するbridging and isotyping Igアッセイ、および、Lyme C6を使用するbridging and isotyping Igアッセイ。標準的なサンドイッチ免疫アッセイに対するECL信号およびアッセイ感度の増加は、アッセイ間で変動したが、100倍もの向上が観察された。テストしたあるアッセイ、例えばトロポニンI、Akt(total)、IL-12p40、IL-12p70、Abeta1-42では、固定部分があることで増幅工程中の検出複合体の分離を防止することにより、信号および/または希釈直線性が向上した。上述の手順によるIL-10アッセイの検量線を図9に示す。さらに表2(下)は、上述の手順により導出された、代表的なアッセイのあるセットのLODを示す(列2、「3-AB RCA/PLAアッセイ」)。Meso Scale Diagnosticsウェブサイト入手可能であるMeso Scale Diagnostics(MSD)、Rockville、MDの標準2抗体免疫アッセイプロトコルのLOD(列3「MSD V-Plex 2-AB免疫アッセイプロトコル」)と比較している。

【0232】

【表 2】

表2

分析物	3-AB RCA/PLA アッセイのLOD(fg/mL)	MSD V-Plex 2-AB免疫アッセイ プロトコル(fg/mL)
IL-1b	2-5	80
IL-2	4	180
IL-4	0.7	40
IL-6	0.6	120
IL-10	2	60

10

## 【実施例 2】

## 【0233】

固定試薬がある場合、および無い場合のアッセイプロトコル MSD 7-spot M  
ULTI-SPOTプレートを、実施例1で上述したようにトロポニンI捕捉抗体(22  
0ug/mL)で各々コートした。捕捉抗体を固定部分、つまりアンプリコンに特異的な  
オリゴヌクレオチドを共有結合したBSA(存在する場合は、固定部分5ug/mL)と  
一緒に、または固定部分なしでスポットした。アッセイ希釈剤、キャリブレーター、また  
は試料(適切に希釈した)各25μl(全部で50μl)を各ウェルに追加した。プレ  
ートを、2時間振とうさせながらインキュベートし各ウェルを洗浄した。上述の通り調整し  
た、近接プローブ1および2で標識した検出抗体の溶液を各ウェルに追加し(ウェル当  
たり25μL)、1時間振とうさせながらインキュベートした。実施例1で上述したように  
、ライゲーション混合物を各ウェルに追加した。実施例1で上述したように、このプレ  
ートを室温で30分間ライゲーション混合物と一緒にインキュベートし、洗浄して過剰な環  
状化オリゴヌクレオチドを除去し、RCA混合物と一緒に37℃で1.5時間インキュベ  
ートした。実施例1で記述したように、プレートを洗浄し、検出プローブの混合物を加え  
て37℃で30分間インキュベートした。プレートを洗浄し、MSD読み取りバッファ  
ー150μlを添加し、MSD SECTOR(登録商標)6000リーダーで直ちに読ん  
だ。蛍光イメージングのためMSD電極をプレートの上部から除去し、PBSおよびカバ  
ースリップで湿潤状態とした。表面を、顕微鏡でZylaカメラ、対物レンズ20x、2  
x2ピニング、カスタマーフィルタセットを用いて、2秒間暴露して観察した。

20

30

## 【0234】

表3(下)に示すように、ECL値は固定試薬が存在する状態で4~5倍高く、また、  
検出限界は3分の1低かった(より高感度である)。

## 【0235】

【表 3】

算出濃度 (pg/ml)	固定試薬	
	有り	無し
500	134,705	29,818
50	12,713	2,486
5	1,121	270
0.5	150	60
0.05	92	43
0.005	40	86
0.0005	56	30
0	71	37
検出限界	0.36	1.16

表 3

## 【 0 2 3 6 】

図 1 0 ( a ) および ( b ) は、固定試薬 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  有りのプレート表面 ( パネル ( a ) ) および固定試薬無しのプレート表面 ( パネル ( b ) ) の蛍光顕微鏡画像を示す。画像には、個々の結合イベントに関連した明るい蛍光スポットが示され、固定試薬が存在下での R C A 増幅は、観察可能な結合イベントの生成においてより効果的であったことが確認できる。

## 【実施例 3】

## 【 0 2 3 7 】

コネクターオリゴヌクレオチドが 1 つの場合と 2 つの場合との比較

実施例 2 に記述したアッセイを繰り返したが、ここでは環状テンプレートを形成するために 2 つの別個のライゲーション部位を有する 2 つのコネクターオリゴヌクレオチドを使用する代わりに、ライゲーション部位を 1 つ有する単一の線状コネクターオリゴヌクレオチドを使用した。図 1 1 ( a ) に示すように、ライゲーション部位 1 またはライゲーション部位 2 で開いた単一の線状コネクターオリゴヌクレオチドを準備した。単一の線状コネクターオリゴヌクレオチドを両方とも、実施例 1 と 2 で使用したオリゴヌクレオチド、C i r c - 1 と C i r c - 2 との組合せと並行してテストした。実施例 2 に記述したプロトコルを用いて、さらに、単一の線状コネクターオリゴヌクレオチドを 3 種類の濃度、1 2 5 n M、6 2 . 5 n M および 3 1 n M でテストし、一方、C i r c - 1 と C i r c - 2 のオリゴヌクレオチドの組合せを使用する標準アッセイを 1 2 5 n M でテストした。図 1 1 ( b ) に示すように、2 つの単一線状コネクターオリゴヌクレオチドは、2 種のコネクターオリゴヌクレオチド混合物 ( C i r c - 1 と C i r c - 2 ) とおよそ同一の効率で R C A 増幅産物に成功裡に組み込まれた。ライゲーション部位 1 で開いていた単一の線状コネクターオリゴヌクレオチドは、信号強度、非特異的バックグラウンドおよび総合的な感度に基づいて、2 種のコネクター混合物に匹敵する性能を有していた。予想した通り、ライゲーション部位 2 で開いていた単一の線状コネクターオリゴヌクレオチドは、非特異的なバックグラウンドがより高く、感度はより低かった。この後者のケースでは、ライゲーションとプライミングの両方が、近接プローブ # 1 の存在にのみ依存しており；したがって、近接増幅アプローチの特定の利点のうちのいくつかは損なわれた。

## 【実施例 4】

## 【 0 2 3 8 】

代替近接プローブ、固定オリゴヌクレオチドおよびコネクター配列を使用して実施した 3 つの抗体アッセイ

以下の試薬の代替セットを用いて、実施例 1 で概説したプロトコルを使用してアッセイ

10

20

30

40

50

を実施した：

【 0 2 3 9 】

【 表 4 】

表4

配列の内容	配列
代替セット(a)	
検出オリゴ	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3' (配列番号7)
近接オリゴ 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaCACTAAGCTGTTAGTCCATTACCGmUmUmU (配列番号8)
近接オリゴ 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaGCTGGAGGTTGAGACGATTTTGCG (配列番号9)
Circ-1a	/5Phos/AACAGCTTAGTGACATCGGTAGTTAACAGATTGATCTTGACACATCGGTAGTT CGCAAAATCGTC (配列番号 10)
Circ-2a	/5Phos/TGAACCTCCAGCTTTTCGGTAATGGACT (配列番号11)
固定オリゴ	5'ACAGATTGATCTTGAAAA AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/ (配列番号12)
代替セット(b)	
検出オリゴ	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3' (配列番号7)
近接オリゴ 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaAGAGTCCAGAGGCAAAGCGTGAATmUmUmU (配列番号13)
近接オリゴ 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaGATAAGGAAGGGCCTTAGCGACA (配列番号14)
Circ-1b	/5Phos/CCTCTGGACTCTACATCGGTAGTTTGGAAACATTTTATTCTAACATCGGTAG TTTGTGCTAAGGC (配列番号15)
Circ-2b	/5Phos/CCCTTCCTTATCTTTATTACGCTTTG (配列番号16)
固定オリゴ	5'GGAACATTTTATTCTAAA AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/ (配列番号17)
代替セット(c)	
検出オリゴ	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3' (配列番号7)
近接オリゴ 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaACAACCTCCGATTGCTTGCTTCTTmUmUmU (配列番号18)
近接オリゴ 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaTAGCCCTACGTGCCCTGCATAGAC (配列番号19)
Circ-1c	/5Phos/ATCGGAGTTGTTACATCGGTAGTTCGCGCAGGTCGGGAATT ACATCGGT AGTTGTCTATGCAGGG (配列番号20)
Circ-2c	/5Phos/CACGTAGGGCTATTTAAGAAGCAAGCA (配列番号21)
固定オリゴ	5'GCGCAGGTCGGGAATAAAA AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/ (配列番号22)

【 0 2 4 0 】

下記の表5の結果はトロポニンアッセイのものであり、トロポニンの濃度は500 pg / mLで、MULTI-SPOTプレートのウェルはそれぞれ、表4で挙げたセットの1つからの固定オリゴヌクレオチドを有する捕捉スポット1つを含んでいた。実施例1で記述したように、アッセイは近接プローブ(1)の1つおよび近接プローブ(2)の1つを

10

20

30

40

50

同濃度で使用した。セット (a) ~ (c) の非特異的結合がより多かったが、これは、実施例 1 での記述と比較して検出オリゴヌクレオチド - S A - S T A G の濃度が 9 倍高かったためである。検出オリゴヌクレオチド - S A - S T A G の濃度がより高くなったのは、実施例 1 のような S A - S T A G 単独の滴定でなく、あらかじめ結合した複合体を共に滴定したことによる。

【 0 2 4 1 】

【表 5】

表5.

PLA セット	(a)	(b)	(c)	実施例 1
トロポニン	178,560	138,540	189,166	273,261
トロポニン無し	412	314	545	88

10

【実施例 5】

【 0 2 4 2 】

付加的な免疫アッセイプラットフォームで実施した 3 つの抗体アッセイ

( a ) コード化粒子を使用する、ビーズベースの免疫アッセイフォーマット

20

アッセイ工程はすべて 96 ウェルフィルタプレートで実施した。真空マニホールドでプレートから液体を除去した ( H g 10 インチを超過せず ) 。プレートは反転させない。目詰まりが生じた場合、コニカルチューブ 15 m l の先端を使用して目詰まりしたウェルの下の区域をやさしく押し、次に、1 m l のパストツールピペットのゴム球を使用するか、目詰まりしたウェルを親指でやさしく押して、詰まりを取り除く。最終の吸引工程後、ペーパータオルを重ねた上でプレートの底を軽く叩き、次に、フィルタプレートの底面を K i m w i p e で拭いて残留液 / 液滴を除去した。

【 0 2 4 3 】

洗浄溶液の調整：脱イオン水 285 m l で 20 x 洗浄溶液ボトルの全容量を希釈して 1 x 洗浄溶液を調整した。

30

【 0 2 4 4 】

アッセイ標準の用意：凍結乾燥した標準試料を 100 % のアッセイ希釈剤 ( 血清および血漿試料 ) 、または 50 % アッセイ希釈剤 / 50 % 組織培養メディア ( 組織培養上清 ) で再構成した；再構成容積： ( i ) バイアル 1 個：1 m l ； ( i i ) バイアル 2 個：1 バイアル当たり 0.5 m l 。 8 ~ 10 分間室温で再水和した。バイアルを数回ゆっくり逆さにし、完全に水和させるためさらに 3 ~ 5 分静置した。標準試料を 2 つ以上使用する場合は、各標準試料を同容積合わせて、穏やかに混合する。再構成した標準試料の 3 倍の系列希釈を行い 7 ポイントの検量線を調製した。

【 0 2 4 5 】

分析物捕捉：

40

( 1 ) 10 x キャプチャービーズストックをボルテックス ( 30 秒 ) および超音波分解 ( 30 秒 ) する。ホイルにくるんだチューブで、10 x キャプチャービーズストック ( ウェル当たり 2.5  $\mu$  l ) を洗浄溶液に希釈する ( ウェル当たり 25  $\mu$  l 約 2,000 ~ 5,000 ビーズ / アッセイ ) 。より高度な多重化には、保持した 10 x キャプチャービーズストックの追加分の容積を調製できるよう洗浄溶液の容積を調整する。

【 0 2 4 6 】

( 2 ) 200  $\mu$  l 洗浄溶液で標準ウェルおよび試料ウェルをあらかじめ湿潤させる。

【 0 2 4 7 】

( 3 ) 希釈したキャプチャービーズ溶液をボルテックス ( 30 秒 ) および超音波分解 ( 30 秒 ) する。直ちに 25  $\mu$  l を各アッセイウェルに追加し、続いて 1 x 洗浄溶液を 20

50

0  $\mu$  L 追加する。吸引し洗浄溶液 200  $\mu$  L で洗浄を繰り返す。必要ならばフィルタプレートの底を軽く叩いて拭く。

【0248】

(4) インキュベーションバッファ 50  $\mu$  l を全アッセイウェルに追加した。

【0249】

(5) 指定のウェルへ標準試料を 100  $\mu$  l 追加した。試料として指定したウェルには、50  $\mu$  l アッセイ希釈剤、続いて 50  $\mu$  l 試料を追加した。振とう機上で (500 ~ 600 rpm)、室温で 2 時間プレートをカバーしインキュベートした。全インキュベーションにおいて、不透明な蓋でアッセイプレートを覆い遮光した。速度は振とう機の半径により調整される必要がある場合がある。

【0250】

分析物検出

(6) 蛍光標識した検出抗体の 1 x 混合物の調整：希釈剤 (ウェル当たり 100  $\mu$  l) で 10 x 検出抗体混合物 (ウェル当たり 10  $\mu$  l) を希釈した。混合物は目的の分析物に特異的な一対の検出抗体を含み、1 つは Alexa Fluor 350 (青色蛍光標識) で標識し、もう 1 つは Alexa Fluor 594 (赤色蛍光標識) で標識した (これらの各々の蛍光標識は Life Technologies, Grand Island, NY、www.lifetechnologies.com から入手可能)。より高度な多重化は、必要な 10 x 抗体混合物の追加の容積を調製できるよう希釈剤の容積を調整する。吸引し洗浄溶液 200  $\mu$  L で 2 回アッセイウェルを洗浄した。100  $\mu$  l の希釈検出抗体混合物を各アッセイウェルに追加した。プレートをカバーし、プレート振とう機で 1 時間インキュベートした (500 ~ 600 rpm)。

【0251】

アッセイの読み取り

(8) 吸引し洗浄溶液 200  $\mu$  L で 3 回アッセイウェルを洗浄した。清潔なペーパータオルでフィルタプレートの底を乾かし、完全に全残留液滴を除去した。100  $\mu$  l 洗浄溶液を各アッセイウェルに追加し、2 ~ 3 分間プレート振とう機 (500 ~ 600 rpm) 上にプレートを載せた。

【0252】

(9) 個々の蛍光標識に対するカラーチャンネルを含む多色蛍光パーティクルアナライザー (FACS システムまたは修正した xMAP 装置等) でビーズ懸濁を分析する。感度を最大にするために、任意の粒子は、ある 1 つの分析物に結合するか、または全く結合しない可能性があり、分析物の量は、(粒子のコード化に基づいて) 所与の分析物に特異的であり、両蛍光標識を含む粒子の数を計数することにより定量するという条件でアッセイを実行する。場合により、アッセイはコード化されたビーズを使用したマルチプレックスフォーマットで実行できるが、ここで、コードは、ビーズ上の捕捉抗体および各分析物に対する追加の検出抗体ペアが分析物に特異的であることを示す。xMAP 等でビーズに組み込む蛍光色の追加を使用してコード化を決定した場合、分析器は追加した色の測定およびビーズコードの識別に対応する追加の検出チャンネルを有さなくてはならない。

【0253】

(b) 固定部分を含むコード化粒子、核酸プローブで修飾した 2 つの検出試薬を使用したビーズベースの免疫アッセイフォーマット

実施例 5 (a) で概説したように、アッセイ工程はすべて 96 - ウェルフィルタプレートで実施した。実施例 5 (a) で記述したように、洗浄溶液およびアッセイの標準試料を調製し、実施例 1 で記述したように、標的分析物に対する一対の検出抗体を、近接プローブ 1 および 2 を追加して修飾した。分析物を実施例 5 (a) で記述したように捕捉ビーズ上で捕捉した。捕捉ビーズは固定部分を含むが、この固定部分は、BSA - オリゴヌクレオチド複合体としてビーズ表面に固定化され、オリゴヌクレオチドはローリングサークルのアンプリコンに特異的であるよう選択される。使用した固定オリゴヌクレオチドの配列は配列番号 3 である。

## 【0254】

アッセイ希釈剤 25  $\mu$ l、キャリブレーター、または試料（適切に希釈した）を捕捉ビーズの混合物と混合した。混合物を、1～3時間振とうさせながらインキュベートし、洗浄した。上述のように調製した、近接プローブ1および2で標識した検出抗体の溶液を混合物に追加し、1～2時間振とうさせながらインキュベートした（あるいは、それぞれ個々の検出抗体を連続して追加し、個々の追加後は1時間インキュベーションした）。実施例1で記述したライゲーション混合物を追加した。この混合物を37℃で30分間ライゲーション混合物と一緒にインキュベートし、洗浄して過剰な環状化オリゴヌクレオチドを除去し、37℃で1.5時間、実施例1に上述したRCA混合物と一緒にインキュベートした。混合物を洗浄し、上述のフルオレセイン標識検出プローブの混合物を加えて37℃で30分間インキュベートした。混合物を洗浄し、粒子をマルチチャンネル蛍光パーティクルアナライザーに吸引した。

10

## 【0255】

(c) ビーズベースのフォーマットおよび個々のナノウェルへの捕捉分析物分子の分離

試料を25%ウシ血清（2～4倍希釈）100  $\mu$ lで調製し、捕捉抗体でコートした500 Kビーズ（常磁性2.7  $\mu$ m、場合によって蛍光コード化）を、試料に追加した。試料を23℃で約2時間インキュベートした。試料をPBS（5X、0.1% Tween-20）で3回洗浄し、標識した検出抗体の混合物を追加した（第1ビオチン化検出抗体およびハプテンコンジュゲート抗体を含む混合物）。混合物を23℃で約1時間インキュベートした。混合物をPBS（5X、0.1% Tween 20）で3回洗浄し、酵素標識を20

20

## 【0256】

混合物をナノウェルのアレイ上に引き出し（DVDフォーマットでQuanterixから提供、環状オレフィンポリマーから作製、1ディスク当たり24試料）、約2分を静置した。アレイをバッファーと一緒に洗い流し、アレイをフルオロカーボン油と一緒に密閉し、23℃で2～5分間インキュベートし、結果をマルチカラーの蛍光イメージャー上で読んだ。画像分析を使用して両蛍光酵素産物を包むナノウェルの数を計数し、それにより試料中の分析物の濃度と関連する値を得た。

30

## 【0257】

(d) フローセル分析を用いたビーズベースの免疫アッセイフォーマット

第1のインキュベーション：試料10  $\mu$ l、ビオチン化モノクローナル分析物特異的捕捉抗体（希釈標準溶液2.6 mg/l）、およびそれぞれオリゴヌクレオチドにコンジュゲートさせたモノクローナル分析物特異抗体の混合物（0.3 mg/lの希釈標準溶液）を反応させてサンドイッチ複合体を形成した。モノクローナル分析物特異抗体の混合物は実施例1の記述通りに調製し、混合物には、実施例1で上述したように、近接プローブ1および2にコンジュゲートした一対の抗体が挙げられる。

40

## 【0258】

第2インキュベーション：ストレプトアビジンコート微粒子の追加後に（Dyna1 M280、2.8  $\mu$ m、0.72 mg/ml、ビオチン結合能470 ng/mg）、複合体をビオチンとストレプトアビジンとの間の相互作用により固相に結合させた。実施例1に記述したプロトコルによって調製したライゲーション混合物をこの混合物に追加した。混合物を37℃で30分間ライゲーション混合物と一緒にインキュベートし、洗浄して過剰な環状化オリゴヌクレオチドを除去し、実施例1で記述したRCA混合物と一緒にインキュベートした。混合物を洗浄し、ビオチン標識した検出プローブの混合物を追加し、37℃で30分間インキュベートした。検出プローブ混合物は実施例1で記述したように調製した。電気化学発光標識SULFO-TAG（Meso Scale Diagnos

50

t i c s ) を組み込むために、検出プローブを、末端のビオチン標識と合成し、S U L F O - T A G 標識ストレプトアビジンにあらかじめ結合した。

【 0 2 5 9 】

反応混合物を測定セルへ吸引し、測定セルで微粒子を電極の表面上へ磁気によって捕捉した。その後、未結合の物質を P r o C e l l 1 ( T P A を含むバッファー) で除去した。その後、電極に電圧をかけ、化学発光を誘発し、光電子増倍管により測定した。結果は検量線によって決定した。検量線は 2 ポイント校正および試薬バー・コードにより提供されたマスタ曲線により装置の固有差を考慮して生成した。

【 実施例 6 】

【 0 2 6 0 】

10

H I V - 1 P 2 4 の検出

材料、方法および結果：

実施例 1 に記述した手順を H I V - 1 p 2 4 を検出するために使用した。H I V - 1 mixed titer performance panel (Seracare Life Sciences、www.seracarecatalog.com から入手可能)、H I V - 1 セロコンバージョンパネル(これも Seracare Life Sciences から入手可能)、H I V 抗体陽性試料 ( P r o M e d D x 、 L L C 、 www.promeddx.com から入手可能) および正常な対応試料 ( B i o r e c l a m a t i o n 、 www.bioreclamation.com から入手可能) から入手した約 6 4 の血清または血漿試料を試験した。上述の手順に従って導出された H I V - 1 p 2 4 アッセイの検量線を図 1 2 に示す。アッセイの L O D は、1 . 3 f g / m L であることが見出され、L L O Q は 3 . 0 f g / m L 、U L O Q は 3 7 、5 0 0 f g / m L だった。2 5 u L 試料の検出限界 1 . 3 f g / m L は p 2 4 分子約 6 5 0 個に相当し、ウィルス粒子 ( 分子) はそれぞれ、p 2 4 タンパク質の複製を約 2 0 0 0 個生成する。

20

【 0 2 6 1 】

Mixed titer performance panel、P R A 2 0 4 ( B ) は、市販のアッセイ ( b i o M e r i e u x 、 P e r k i n E l m e r 、 a n d Z e p t o m e t r i x ) において H I V p 2 4 抗原に対する陽性反応が弱から強までの範囲の 1 0 の標本 1 セットから成る。陰性標本を 2 つパネルに含めた。アッセイの結果を下

30

の表 6 に示す：

【 0 2 6 2 】



【表 6】

表6.

パネル/ メンバー	bioMerieux HIV Ag VIDAS p24 (pg/mL)	Perkin Elmer HIV Ag p24 (s/co)	Zeptometrix HIV Ag p24 (s/co)	MSD 3AB フォーマット (pg/mL)	MSD 3AB フォーマット (ECL)
PRA204(B)-09	>400	>42	75	>38	1915873
PRA204(B)-10	<3	1	0	0.0	174
PRA204(B)-11	85	18	16	>38	1674519
PRA204(B)-12	60	11	14	>38	1601078
PRA204(B)-13	170	47	41	>38	1902237
PRA204(B)-15	192	45	36	>38	1884816
PRA204(B)-17	>400	42	61	>38	1897359
PRA204(B)-20	<3	1	0	0.0	150
PRA204(B)-21	68	14	18	>38	1422070
PRA204(B)-22	17	3	1	10	347517
PRA204(B)-23	14	2	2	7	237726
PRA204(B)-24	15	3	3	9	306728

## 【 0 2 6 3 】

H I V p 2 4 レベルは高く、ほとんどの試料の U L O Q を超えていた。10 個の陽性試料はすべて検出可能で、市販の p 2 4 キットに匹敵し、一方、陰性試料（それぞれ市販のアッセイ、P R A 2 0 4 ( B ) - 1 0 および - 2 0 基づく）は、それぞれ約 3 f g / m L および約 2 f g / m L であり、極めて低かった。

## 【 0 2 6 4 】

セロコンバージョンパネルの分析結果を図 1 3 に示す。3 抗体アッセイフォーマットは P C R と同程度に高感度であり、第 1 の陽性試料の検出にかかる推定遅延時間および P R B 9 4 8 ~ P R B 9 6 2 パネルの両試料における p 2 4 レベルは、P C R キットに匹敵し、他の市販の p 2 4 アッセイより優れていることが見出された。データを表 7 に示す。

## 【 0 2 6 5 】

10

20

30

【表 7】

表7.

パネル/ メンバー	初回採血 後経過 日数	Abbott BBI (s/co)	Coulter BBI (s/co)	DuPont BBI (s/co)	Inno. (s/co)	MSD 3AB (pg/ mL)	MSD 3AB (ECL)	Roche PCR (co/ mL)	
パネル I-I, PRB948-01	0	0.4	0	0.1	0.4	0.001	121	BLD	
パネル I-I, PRB948-01	18	0.4	0	0.1	0.4	0.001	100	BLD	
パネル I-I, PRB948-01	20	0.5	0.2	0.5	1	3	97688	$3 \times 10^4$	
パネル I-I, PRB948-01	23	5	23	15	31	>38	1736809	$6 \times 10^5$	
	初回採血 後経過 日数	Coulter (s/co)2	PE (s/co)2	Roche Elecsys (s/co)2	Zepto (s/co)2	MSD 3AB (pg/ mL)	MSD 3AB (ECL)	Roche Ultra (co/ mL)	Roche stnd
パネル I-II, PRB962-01	0	0.3	0.3	0.1	0.1	0.002	149	<50	NT
パネル I-II, PRB962-02	2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.001	120	<50	NT
パネル I-II, PRB962-03	7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.021	778	NT	$7.6 \times 10^2$
パネル I-II, PRB962-04	9	0.6	0.3	0.3	0.3	0.2	7603	NT	$7.7 \times 10^2$
パネル I-II, PRB962-05	14	>40	30	23	10	>38	1808344	NT	$7.0 \times 10^3$
パネル I-II, PRB962-06	17	>40	>49	155	24	>38	1863699	NT	$1.2 \times 10^7$

Abbott BBIはAbbott BBI HIV-1抗原テストを指す。

Coulter BBIはCoulter BBI HIV-1抗原テストを指す。

DuPont BBIはDuPont BBI HIV-1抗原テストを指す。

Inno.はInnogenetics R129 HIV-1抗原テストを指す。

Roche PCRはRoche PCR HIV RNA BBIテストを指す。

CoulterはCoulter ELISA HIV-1抗原テストを指す。

PEはPerkin Elmer ELISA HIV-1抗原テストを指す。

Zepto.はZeptomatrix ELISA HIV-1抗原テストを指す。

Roche UltraはRoche Ultrasensitive HIV-1 RNAテストを指す。

Roche standはRoche standard HIV-1 RNAテストを指す。

BLD=検出限界を下回るおよびNT=テストせず。

## 【 0 2 6 6 】

結論：

H I V に感染して間もない患者は、この疾病の伝播の一因となる傾向がある。ウィルス負荷は感染後最初の数週間高く、新たに感染した患者は、自らの感染とともに、他者へ感染を拡大し得ることを自覚していない可能性が高い。したがって、急性H I V 感染の早期発見は、公衆衛生上非常に重要である。P C R 法は確立された感受性を有し；血清または血漿m L 当たりわずか6 0 のH I V R N A 複製を検出できる（m L 当たりウィルス粒子

30個)。しかしながら、PCR法は複雑で費用が高く、したがって、すべての状況で適切とはならない。免疫アッセイはより単純でより安価であるが、現行の検出限界は、第四世代のp24免疫アッセイにおいてわずか約10pg/mL、または1mL当たり約2億5000万個のカプシドタンパク質となっている。ウイルス当たり約2,000個のp24カプシドタンパク質が存在するという事実にもかかわらず、これらの免疫アッセイは、ウイルスベースでPCR検査の数千倍分の一の感度である。

#### 【0267】

本明細書の記述にあるような、MSDのMULTI-ARRAY（登録商標）テクノロジーに基づいた次世代電気化学発光アッセイフォーマットが開発され、その性能には特色がある。この新規のp24免疫アッセイの検出限界は約1fg/mL（現在のp24免疫アッセイより10,000倍高感度）であった。1fg/mLの感度は、25uLの我々のサンプル容積において1未満のウイルス粒子に相当する。定量化の下限および上限はそれぞれ3fg/mLおよび38,000fg/mLであった。プレート内CVは7%、全CVは15%であった。添加回収率および希釈の直線性は80%~120%であった。p24は、明らかに健常なドナー32人の血清または血漿において検出できなかった。p24混合タイターパネルは、3-AB HIV p24アッセイと市販のp24免疫アッセイ間の優れた相関を示した。2つのセロコンバージョンパネルを検査した：SeraCare PRB948（0および18日目、PCR陰性；22および23日目、PCR陽性）およびPRB962（0および2日目、PCR陰性；7、9、14および17日目、PCR陽性）。両ケースで、3-AB HIV p24アッセイの結果は、すべてのPCR陰性試料で陰性であり、すべてのPCR陽性試料では陽性であり、感染は従来のp24免疫アッセイの前に良く検出された。

#### 【0268】

結論として、本明細書に記述された3-AB HIV p24免疫アッセイは、p24 ELISAの現行の範囲より10,000倍高感度であり、PCRアッセイにおける感度に匹敵する。本アッセイは専用の設備を必要とせず、MESO（商標）Quickplex SQ 120およびSECTOR（登録商標）イメージャー上で実行できる。

#### 【0269】

本発明は、本明細書に記載された特定の実施形態によって範囲を限定されない。実際、本明細書に開示したものに加えて、本方法の様々な改変は、これまでの記述と添付の図から当業者には明らかとなろう。このような改変は特許請求の範囲内にあることが意図される。様々な文献が本明細書に引用されているが、これらの開示全体を参照によって組み入れる。

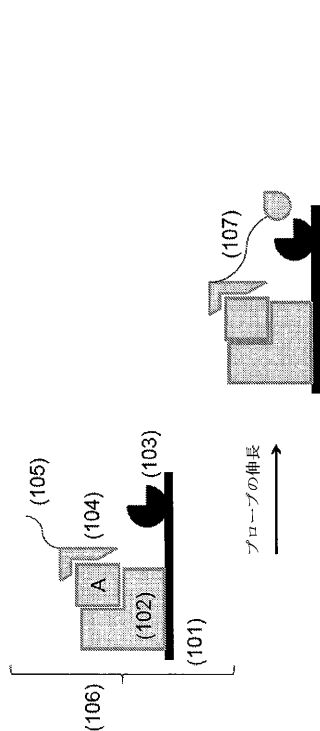
#### 【0270】

#### References

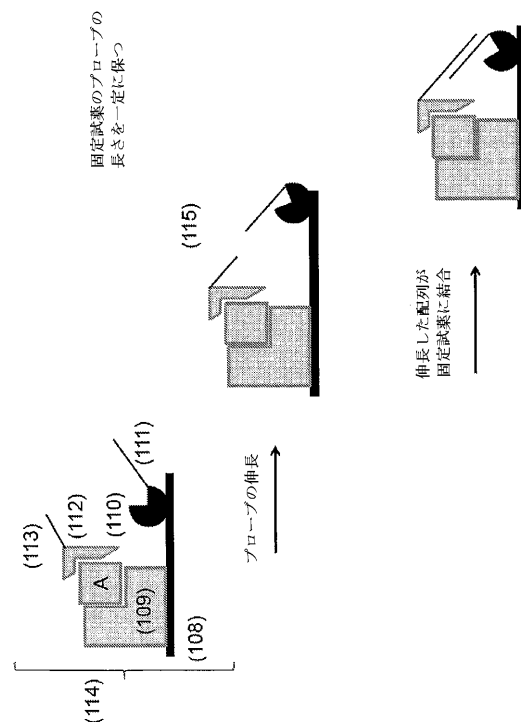
1. U.S. Patent No. 7,306,904
2. U.S. Patent No. 7,320,860
3. U.S. Patent No. 7,351,528
4. U.S. Patent No. 7,192,703
5. U.S. Patent No. 6,878,515
6. Zhou et al., Genome Biology (2004), 5: R28
7. Dean et al., Genome Research (2001), 11: 1095-1099
8. Soderberg et al., Methods (2008), 45: 227-232
9. Fredriksson et al., Nature Biotech (2002), 20: 473-477
10. Fredriksson et al., Nature Methods (2007), 4(4): 327-329
11. Vincent et al., EMBO Reports (2005), 5(8): 795-800
12. Gajadjar et al., Biotechniques (1010), 48(22): 145-152
13. Schallmeiner et al., Nature Methods (2007) 4(2): 135-137
14. Ericsson et al., Nucl. Acids Research (2008), 36(8): e45
15. Darmanis et al., Biotechniques (2007), 43: 443-450

16. Dahl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (2004), 101(13): 4548-4553
  17. Weibrecht et al., Expert Rev. Proteomics (2010), 7(3): 401-409
  18. Spits et al., Nature Protocols (2005), 1(4): 1965-1970
  19. Nordengrahn et al., Vet. Microbio (2008), 127: 227-236
  20. Vuoriluoto et al., Mol. Oncology (2011), 5: 105-111
  21. Zhang et al., Clinica Chimica Acta (2006), 363: 61-70
  22. Andras et al., Mol. Biotech. (2001), 19: 29-44
  23. Schweltzer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (2000), 97(18): 10113-10119
  24. Jeong, et al., Cell. Mol. Life Sci. (2009), 66: 3325-3336
  25. Gill et al., Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids (2008), 27: 224- 10
- 245
26. Gullberg, et al., Current Op. in Biotech. (2003), 14: 82-86
  27. Gustafsdottir, et al., Clinical Chemistry (2006), 52(6): 1152-1160
  28. U.S. Patent Publication No. 20100075862
  29. U.S. Patent No. 8,222,047
  30. U.S. Patent No. 8,236,574
  31. U.S. Patent No. 8,338,776
  32. U.S. Patent Publication No. 20110212537
  33. U.S. Patent Publication No. 20120196774
  34. U.S. Patent Publication No. 20120289428 20

【図 1 a】

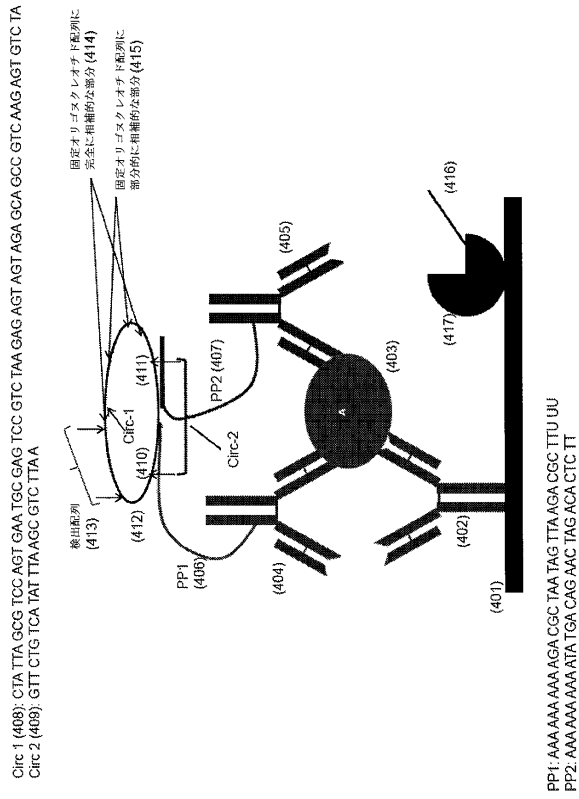


【図 1 b】

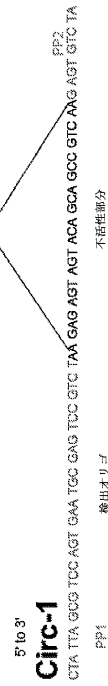




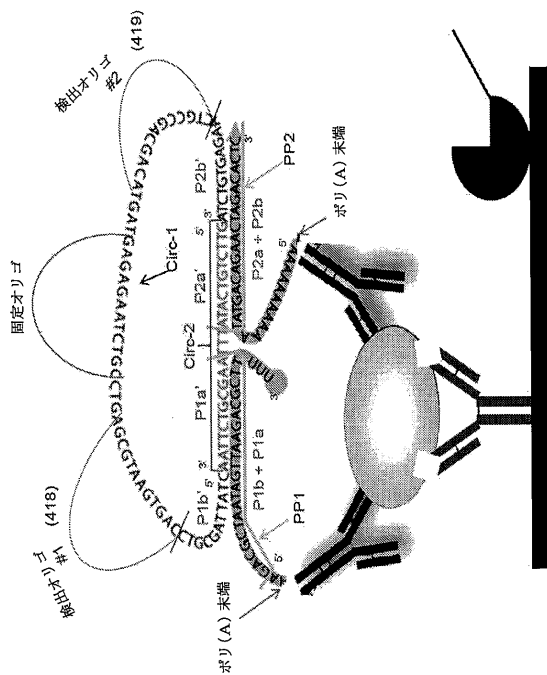
【 図 4 a 】



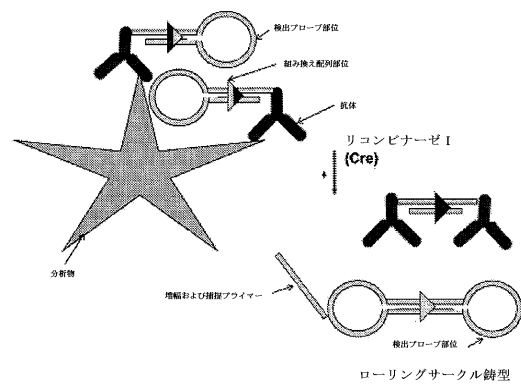
【 図 4 b 】



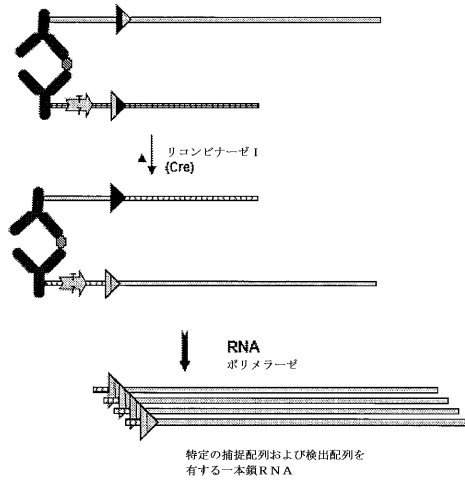
【 図 4 c 】



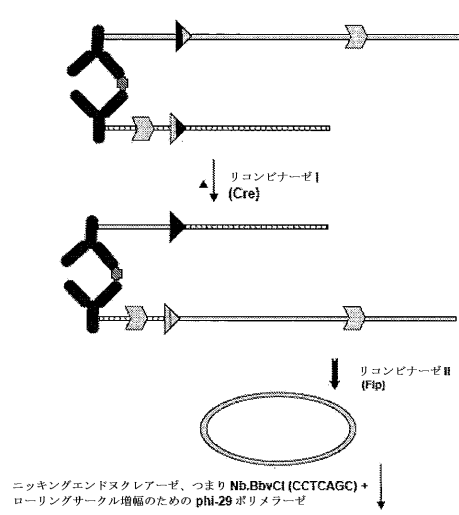
【 図 5 】



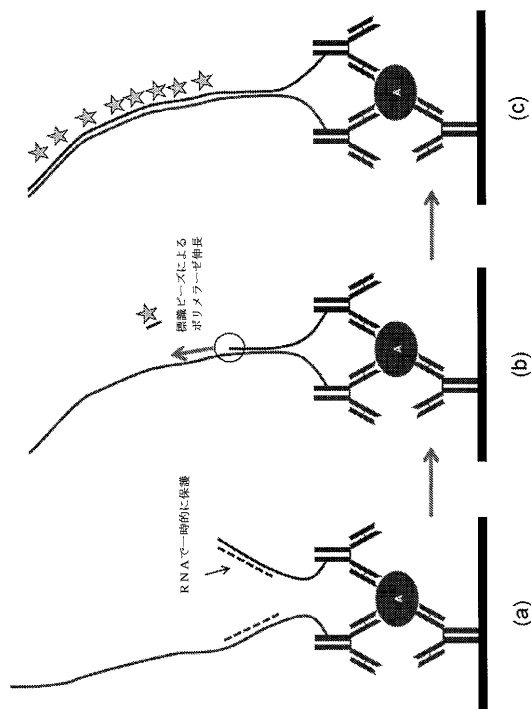
【図 6 a】



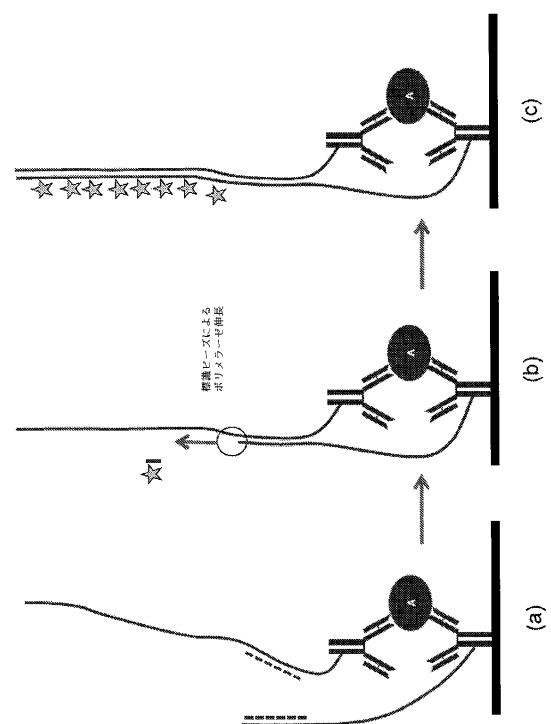
【図 6 b】



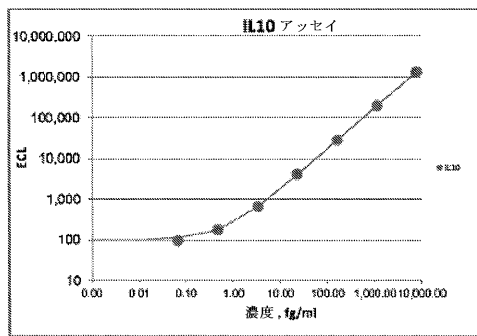
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【図 10】

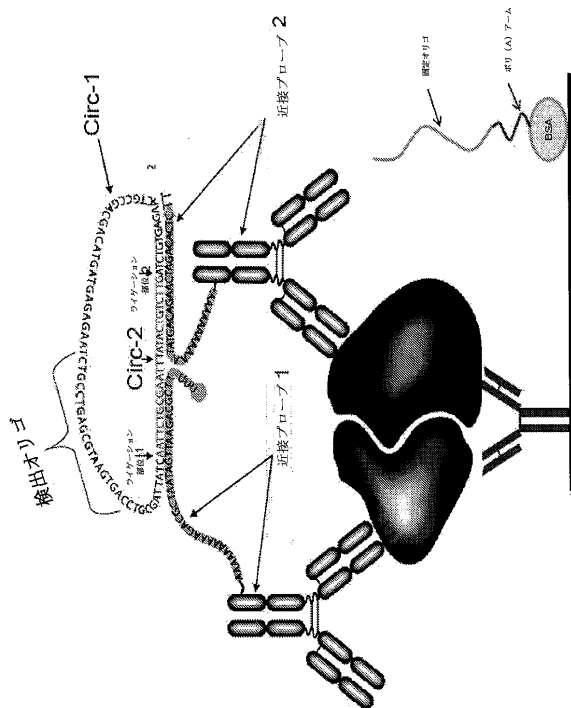


(b)

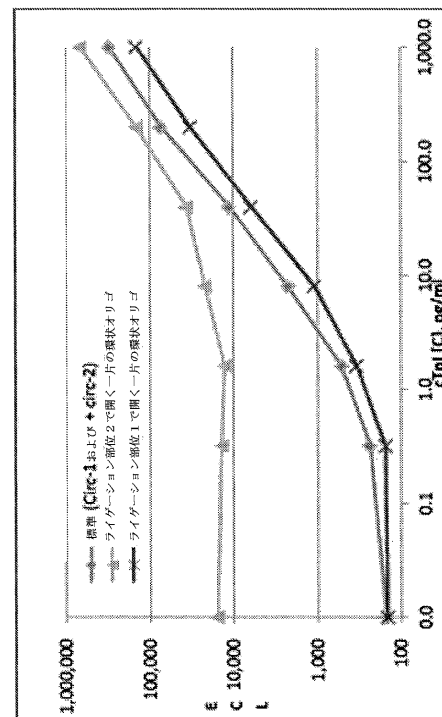


(a)

【図 11 a】

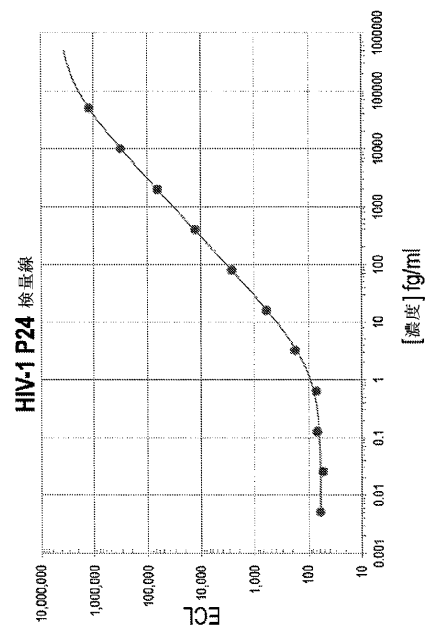


【図 11 b】

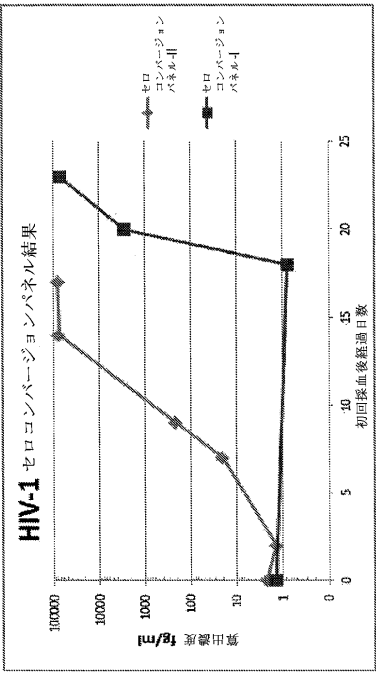




【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

0006408552000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 15/11 (2006.01) C 1 2 N 15/11 Z

- (72)発明者 イーライ・エヌ・グレザー  
アメリカ合衆国メリーランド州 9 2 0 1 4 . デルマー . ドゥランゴドライブ 1 3 7 4 6
- (72)発明者 ジョン・ケンテン  
アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 4 1 . ボイズ . シュガーリッジテラス 2 1 0 2 1
- (72)発明者 ジョージ・シーガル  
アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 5 3 . ロックビル . トレイルウェイドライブ 5 3 3 3
- (72)発明者 マーティン・ステンゲリン  
アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 7 8 . ゲイザースバーグ . スティルクリークレーン 6 0 6

審査官 西 賢二

- (56)参考文献 特表平 1 1 - 5 0 8 0 4 0 ( J P , A )  
国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 0 0 8 3 ( W O , A 1 )  
Leuchowius, K. J. et al. , "Parallel visualization of multiple protein complexes in individual cells in tumor tissue" , Mol. Cell. Proteomics. , 2 0 1 3 年 2 月 2 2 日 , Vol. 1 2 , pp. 1563-1571

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )