

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6475718号  
(P6475718)

(45) 発行日 平成31年2月27日 (2019.2.27)

(24) 登録日 平成31年2月8日 (2019.2.8)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00 Z N A

C 1 2 Q 1/6816 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6816

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/00 Z

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53 D

請求項の数 13 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-531874 (P2016-531874)  
 (86) (22) 出願日 平成26年7月30日 (2014.7.30)  
 (65) 公表番号 特表2016-532689 (P2016-532689A)  
 (43) 公表日 平成28年10月20日 (2016.10.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/048977  
 (87) 国際公開番号 W02015/017586  
 (87) 国際公開日 平成27年2月5日 (2015.2.5)  
 審査請求日 平成28年12月12日 (2016.12.12)  
 (31) 優先権主張番号 61/934,759  
 (32) 優先日 平成26年2月1日 (2014.2.1)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/859,891  
 (32) 優先日 平成25年7月30日 (2013.7.30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507044516  
 プレジデント アンド フェローズ オブ  
 ハーバード カレッジ  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02  
 138, ケンブリッジ, クインシー  
 ストリート 17  
 (74) 代理人 100079108  
 弁理士 稲葉 良幸  
 (74) 代理人 100109346  
 弁理士 大貫 敏史  
 (74) 代理人 100117189  
 弁理士 江口 昭彦  
 (74) 代理人 100134120  
 弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 定量的なDNAベースのイメージング及び超解像イメージング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バーコード化されたナノ構造ではなく、かつ (a) 約 0.1 ~ 約 5 秒間、相補的な蛍光標識イメージャー鎖に一時的に結合するか、そして / あるいは (b) 相補的な蛍光標識イメージャー鎖に一時的に結合し、かつ約 4 ~ 約 10 ヌクレオチドの長さを有する、ドッキング鎖に直接的に連結されたタンパク質を含むタンパク質 - 核酸コンジュゲート。

【請求項 2】

前記タンパク質が、抗体である、請求項 1 に記載のタンパク質 - 核酸コンジュゲート。

【請求項 3】

前記相補的な蛍光標識イメージャー鎖が、少なくとも 1 つのフルオロフォアを含む、請求項 1 に記載のタンパク質 - 核酸コンジュゲート。

【請求項 4】

前記相補的な標識イメージャー鎖が、約 8 ~ 約 10 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質 - 核酸コンジュゲート。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の少なくとも 1 つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートに結合された標的。

【請求項 6】

前記標的がタンパク質である、請求項 5 に記載の標的。

【請求項 7】

複数の、請求項 1 に記載のタンパク質 - 核酸コンジュゲート。

【請求項 8】

前記複数の前記タンパク質 - 核酸コンジュゲートの少なくとも 2 つのサブセットを含み、及び各サブセットの前記タンパク質 - 核酸コンジュゲートが異なる標的に結合する、請求項 7 に記載の複数のタンパク質 - 核酸コンジュゲート。

【請求項 9】

少なくとも 1 つの前記タンパク質 - 核酸コンジュゲートが、少なくとも 1 つの標的に結合する、請求項 7 に記載の複数のタンパク質 - 核酸コンジュゲートを含む組成物。

【請求項 10】

組成物であって：

バーコード化されたナノ構造ではないドッキング鎖に直接的に連結されたタンパク質を含む少なくとも 1 つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートであって、標的に結合する少なくとも 1 つのタンパク質 - 核酸コンジュゲート；及び

( a ) 約 0 . 1 ~ 約 5 秒間、前記ドッキング鎖に一時的に結合するか、そして / あるいは ( b ) ドッキング鎖に一時的に結合し、かつ約 4 ~ 約 10 ヌクレオチドの長さを有する、少なくとも 1 つの相補的な蛍光標識イメージャー鎖を含む、組成物。

【請求項 11】

サンプル中の標的を検出する方法であって：

サンプルを ( a ) バーコード化されたナノ構造ではないドッキング鎖に直接的に連結されたタンパク質を含む少なくとも 1 つのタンパク質 - 核酸コンジュゲート及び ( b ) 前記少なくとも 1 つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートの前記ドッキング鎖に相補的であり、かつ ( i ) 約 0 . 1 ~ 約 5 秒間、前記ドッキング鎖に一時的に結合するか、そして / あるいは ( i i ) 前記ドッキング鎖に一時的に結合し、かつ約 4 ~ 約 10 ヌクレオチドの長さを有する、少なくとも 1 つの蛍光標識イメージャー鎖に接触させるステップ；及び

前記少なくとも 1 つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートが、前記サンプル中の前記標的に結合するか否かを決定するステップを含む、方法。

【請求項 12】

サンプルを ( a ) タンパク質 - 核酸コンジュゲートのうちの少なくとも 2 つに接触させるステップ；及び

前記タンパク質 - 核酸コンジュゲートのうちの少なくとも 2 つが、前記サンプル中の少なくとも 1 つの標的に結合するか否かを決定するステップを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

サンプルが連続して ( b ) の少なくとも 2 つの標識イメージャー鎖と接触される、請求項 11 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許法第 119 条 ( e ) の下、それぞれ参照により全開示内容が本明細書に組み入れられる、2014 年 2 月 1 日出願の米国仮特許出願第 61 / 934, 759 号、2013 年 9 月 29 日出願の米国仮特許出願第 61 / 884, 126 号、及び 2013 年 7 月 30 日出願の米国仮特許出願第 61 / 859, 891 号の優先権を主張するものとする。

【0002】

発明の分野

本開示は、概して、標的の検出及び定量の分野に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 3 】

## 発明の背景

遠視野蛍光顕微鏡法は、従来の回折限界を回避する方法、例えば、超解像顕微鏡法（参照文献 1、2）の出現により、大きく進展した。殆どの実装は、蛍光 ON 状態と蛍光 OFF 状態との間で分子をスイッチングして個々の分子の連続的な局在化を可能にする。スイッチングは、従来、2つの方法の一方で行われる：「標的」スイッチングは、光の回折よりも小さい領域に蛍光励起を能動的に閉じ込める一方（例えば、誘導放出抑制顕微鏡法又は S T E D（参照文献 3））、「確率的」スイッチングは、光でスイッチング可能なタンパク質（光活性化局在性顕微鏡法、又は P A L M（参照文献 4））又は光でスイッチング可能な有機色素（確率的光学再構成顕微鏡又は S T O R M（参照文献 1））。これらの方法は、改善された空間解像度を提供するが、高価な機器又は非常に専門的な実験条件を必要とし、従って、依然として一般的な生物学実験技術に至っていない。

10

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 0 4 】

本開示は、特に、例えば、細胞環境における目的の標的（例えば、生体分子）を高又は低空間解像度で画像化するための方法、組成物（例えば、コンジュゲート）、及びキットを提供する。本開示の方法、組成物、及びキットは、短い標識（例えば、蛍光標識）オリゴヌクレオチド（例えば、DNA オリゴヌクレオチド）又は「イメージャー」鎖の相補的な「ドッキング」鎖への反復性の一時的な結合を利用し、この相補的な「ドッキング」鎖は、一部の実施形態では、介在分子、例えば、抗体、例えば、一次又は二次抗体によって目的の標的に取り付けられて、蛍光 ON 状態と蛍光 OFF 状態との間で確率的スイッチを形成する（図 1 A 及び図 1 B）。非結合状態では、部分的に消光された（参考文献 8）イメージャー鎖（imager strand）からのバックグラウンド蛍光のみが観察される（図 1 A の非結合イメージャー鎖の暗い蛍光によって示される）。これは、「OFF」状態と見なされる。イメージャー鎖の結合及び固定時に、蛍光発光が、例えば、全内部反射（T I R）又は薄層斜光照明法（H I L O）（参考文献 9）を用いて検出される。これは、「ON」状態と見なされる。一般に、本明細書に記載される方法、組成物、及びキットは、イメージングの解像度、従って、検出の感度を高める。一部の態様では、本明細書に記載される方法、組成物、及びキットはまた、限定されるものではないが、例えば、天然生体分子を含む目的の標的を検出するための特異性、及びこの検出に使用できる利用可能なフルオロフォアの数も増大させる。

20

30

## 【 0 0 0 5 】

短いドッキング鎖を結合パートナー（例えば、一次でも二次でも良い、タンパク質 - 結合部分又は核酸 - 結合部分）、例えば、一次抗体及び二次抗体を含む抗体に連結することにより、異なる種の標的（例えば、任意選択で細胞環境にある、生体分子）を標識して、ドッキング鎖に相補的であって一時的なワトソン - クリック相互作用によってこのドッキング鎖に結合する蛍光標識イメージャー鎖を導入することにより後に検出することができる。既存の検出方法とは異なり、本開示の方法は、異なる標的（例えば、生体分子）の検出に利用可能なスペクトルが異なるフルオロフォアの数によって制限されない。むしろ、本明細書では、核酸（例えば、DNA 及び / 又は RNA）分子がプログラム可能であること及び連続的なタイムラプスイメージングを使用して、一部の実施形態では、単一の最適化フルオロフォアのみを用いて、最大数百もの異なる種の標的の画像を提供する。さらに、これらの異なる種の標的（例えば、生体分子）は、単一蛍光標識イメージャー鎖のそれらの相補的な標的ドッキング鎖への結合の予測可能なキネティクスを用いて定量することができる。

40

## 【 0 0 0 6 】

場合によっては、この方法を使用して、超解像顕微鏡を全く必要とすることなく、超解像度画像を形成することができる。本明細書に記載される方法、組成物、及びキットは、超解像イメージングでの使用について説明することができるが、これらは、一部の実施形

50

態では、超解像を必要としないイメージングにも使用することができることを理解されたい。従って、一部の実施形態では、本開示の方法、組成物、及びキットは、一般に、イメージングに使用することができる。

【0007】

一部の態様では、相補的な標識イメージャー鎖に一時的に結合することができるドッキング鎖に連結されたタンパク質を含むタンパク質 - 核酸コンジュゲートが本明細書に記載される。一部の態様では、相補的な標識イメージャー鎖に一時的に結合するドッキング鎖に連結されたタンパク質を含むタンパク質 - 核酸コンジュゲートが本明細書に記載される。イメージャー鎖は、一部の実施形態では、検出可能な標識で標識される。検出可能な標識は、例えば、蛍光標識又は他の検出可能な標識、例えば、金ナノ粒子であり得る。本明細書の様々な態様及び実施形態は、蛍光標識イメージャー鎖について言及するが、このような蛍光標識は、多くの場合、他の検出可能な標識で置き換えることができることを理解されたい。従って、一部の実施形態では、蛍光標識イメージャー鎖（例えば、蛍光顕微鏡法で検出することができる）は、例えば、金ナノ粒子（例えば、暗視野顕微鏡法で検出することができる）で標識されたイメージャー鎖で置き換えることができる。また、ドッキング鎖は、複数の相補的な標識鎖に一時的に結合することができる（例えば、ドッキング鎖は、相補的な標識鎖のための複数の結合部位を備えることができる）ことを理解されたい。

10

【0008】

一部の実施形態では、複数のドッキング鎖とイメージャー鎖の対を用いる方法を行うことができる。このような方法は、複数の標的を検出するために使用することができる（例えば、ドッキング鎖 - イメージャー鎖の各対が1つの標的に対応する）。複数のドッキング鎖 - イメージャー鎖の対は、単一の環境又は条件（例えば、温度、塩濃度、鎖の濃度などによって定義される）下でハイブリダイズするほぼ等しい確率を共有しなければならないため、イメージャー鎖の集団の結合レベル（従って、検出）間に差異が観察されると、最終使用者は、このような差異が、ドッキング鎖の量、従って、最終的には標的の量の関数であると結論付けることができる。一部の実施形態では、ドッキング鎖及びイメージャー鎖は、典型的には、それらの結合状態が、約  $+/-0.5 \text{ kcal/mol}$  の範囲の熱安定性を有するように選択される。この範囲の熱安定性では、これらの多重化方法に使用される少なくとも200の直交（例えば、異なる）配列を選択することが可能である。

20

30

【0009】

一部の実施形態では、タンパク質は、抗体、例えば、一次抗体若しくは二次抗体、抗原結合抗体断片、又はペプチドアプタマーである。

【0010】

一部の実施形態では、タンパク質は、介在リンカーによってドッキング鎖に連結される。一部の実施形態では、介在リンカーは、ビオチン及びストレプトアビジンを含む。

【0011】

一部の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0012】

一部の実施形態では、相補的な蛍光標識イメージャー鎖は、少なくとも1つのフルオロフォアを含む。

40

【0013】

一部の実施形態では、任意選択で蛍光標識される、相補的な標識イメージャー鎖は、約4～約30ヌクレオチド又は約8～約10ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、相補的な標識イメージャー鎖は、30を超えるヌクレオチドの長さである。

【0014】

本明細書に記載されるこの態様及び他の態様並びに実施形態では、ドッキング鎖は、複数のドメインを含み、各ドメインは、標識イメージャー鎖に相補的である。ドメインは、配列が同一であっても良く（従って、同一のイメージャー鎖に結合する）、又は異なる配列であっても良い（従って、同一に標識されていないイメージャー鎖に結合することがで

50



きる)。このようなドメインは、本明細書では、イメージャー鎖の結合部位とも呼ばれることもある。

【0015】

一部の実施形態では、ドッキング鎖は、少なくとも2つ又は少なくとも3つのドメインを含み、各ドメインはそれぞれ、標識イメージャー鎖に相補的である。

【0016】

一部の態様では、少なくとも1つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートに結合する標的が本明細書に記載される。

【0017】

一部の実施形態では、標的はタンパク質である。一部の実施形態では、標的は核酸（例えば、DNA又はRNA）である。

10

【0018】

一部の態様では、複数のタンパク質 - 核酸コンジュゲートが本明細書に記載される。一部の実施形態では、その複数は、タンパク質 - 核酸コンジュゲートの少なくとも2つのサブセットを含み、各サブセットのタンパク質 - 核酸コンジュゲートは、異なる標的に結合する。

【0019】

一部の態様では、複数のタンパク質 - 核酸コンジュゲートを含む組成物又はキットが本明細書に記載され、任意選択で、タンパク質 - 核酸コンジュゲートの少なくとも1つが、少なくとも1つの標的に結合する。

20

【0020】

一部の態様では、ドッキング鎖に連結されたタンパク質を含む少なくとも1つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートを含む組成物又はキットが本明細書に記載され、任意選択で、この少なくとも1つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートは、標的、及び任意選択で蛍光標識される、少なくとも1つの相補的な標識イメージャー鎖に結合し、この相補的な標識イメージャー鎖は、少なくとも1つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートに一時的に結合する（又は一時的に結合することができる）。

【0021】

一部の実施形態では、組成物又はキットは、任意選択で蛍光標識される、少なくとも2つの相補的な標識イメージャー鎖を含み、この少なくとも2つの相補的な標識イメージャー鎖は同一である。一部の実施形態では、組成物又はキットは、少なくとも2つの相補的な標識イメージャー鎖を含み、この少なくとも2つの相補的な標識イメージャー鎖は異なる。

30

【0022】

一部の実施形態では、任意選択で蛍光標識される、相補的な標識イメージャー鎖の数は、タンパク質 - 核酸コンジュゲートの数よりも少ないか、多いか、又は等しい。

【0023】

一部の実施形態では、組成物又はキットは、任意選択で蛍光標識される、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、9つ、又は10の異なる相補的な標識イメージャー鎖を含む。一部の実施形態では、組成物又はキットは、少なくとも50又は少なくとも100の異なる相補的な蛍光標識イメージャー鎖を含む。

40

【0024】

一部の態様では、（例えば、1つ以上の）ドッキング鎖及び（例えば、1つ以上の）イメージャー鎖を含む組成物又はキットが本明細書に記載される。ドッキング鎖は、親和性標識を含むように改変することができ、これにより、後のこのドッキング鎖の1つ以上の結合パートナー、例えば、抗体への付着が容易になる。例えば、ドッキング鎖は、ビオチン化しても良く、又はアビジン若しくはストレプトアビジンに取り付けても良い。代わりに他の親和性標識も使用することができる。イメージャー鎖は、標識、例えば、蛍光標識することができる。イメージャー鎖は、（例えば、配列及び標識について）複数の同一のイメージャー鎖であっても良く、又は（例えば、配列及び標識について）複数の異なるイ

50

イメージャー鎖であっても良い。この組成物又はキットは、標的特異的結合パートナー、例えば、抗体をさらに含み得る。構成要素は、互いに結合しても良く、又はこのような組成物及びキット内で互いに物理的に分離されることを含め、結合しなくても良いことを理解されたい。これら及び他の組成物及びキットは、脱酸素剤を含む1つ以上の緩衝剤をさらに含み得る。

【0025】

一部の態様では、抗体-核酸コンジュゲートを含む組成物又はキットが本明細書に記載され、この抗体は、抗体に対する特性、典型的には、特定の種に由来する抗体の特定のアイソタイプ又はFcドメインに対する特異性を有する「二次抗体」である（例えば、ヒトIgG1抗体に特異的なマウス抗体）。コンジュゲート中の核酸は、本明細書に記載されるようにドッキング鎖である。この組成物又はキットは、本明細書に記載されるように、1つ以上のイメージャー鎖（又はイメージャー鎖の1つ以上のサブセット若しくは集団）をさらに含み得る。これら及び他の組成物及びキットは、脱酸素剤を含む1つ以上の緩衝剤をさらに含み得る。

10

【0026】

一部の態様では、本開示は、任意選択で蛍光標識される、相補的な標識イメージャー鎖に結合されるドッキング鎖に連結されたモノクローナル抗体を含む抗体-DNAコンジュゲートを提供し、この抗体及びドッキング鎖はそれぞれ、ビオチン化され、アビジン若しくはストレプトアビジンリンカー又はビオチン-ストレプトアビジンリンカーによって互いに連結される。

20

【0027】

一部の態様では、任意選択で蛍光標識される、相補的な標識イメージャー鎖に一時的に結合されるドッキング鎖に連結された核酸アプタマーを含むアプタマー-核酸コンジュゲートが本明細書に記載される。

【0028】

一部の態様では、サンプル中の標的を検出する方法が本明細書に記載され、この方法は、サンプルを（a）ドッキング鎖に連結されたタンパク質を含む少なくとも1つのタンパク質-核酸コンジュゲート及び（b）この少なくとも1つのタンパク質-核酸コンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する少なくとも1つの蛍光標識イメージャー鎖に接触させるステップ、及びこの少なくとも1つのタンパク質-核酸コンジュゲートが、このサンプル中の標的に結合するか否かを決定するステップを含む。一部の実施形態では、この決定するステップは、少なくとも1つの蛍光標識イメージャー鎖の、少なくとも1つのタンパク質-核酸コンジュゲートのドッキング鎖への一時的な結合を画像化するステップを含む。

30

【0029】

一部の態様では、サンプル中の標的を検出する方法が本明細書に記載され、この方法は、サンプルを（a）ドッキング鎖に連結されたタンパク質を含む少なくとも1つのタンパク質-核酸コンジュゲート及び（b）この少なくとも1つのタンパク質-核酸コンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する少なくとも1つの蛍光標識イメージャー鎖に接触させるステップ、及びこの少なくとも1つの蛍光標識イメージャー鎖の、少なくとも1つのタンパク質-核酸コンジュゲートのドッキング鎖への一時的な結合を、任意選択でタイムラプスイメージングを用いて画像化するステップを含む。

40

【0030】

一部の実施形態では、タンパク質-核酸コンジュゲートのタンパク質は、抗体、抗原結合抗体断片、又はペプチドアプタマーである。一部の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

【0031】

一部の実施形態では、タンパク質-核酸コンジュゲートのタンパク質は、介在リンカーを介してドッキング鎖に連結される。一部の実施形態では、介在リンカーは、ビオチン及

50

びノ又はストレプトアビジンを含む。

【0032】

一部の実施形態では、相補的な蛍光標識イメージャー鎖は、少なくとも1つのフルオロフォアを含む。

【0033】

一部の実施形態では、任意選択で蛍光標識される、相補的な標識イメージャー鎖は、約4～約10ヌクレオチド又は約8～約10ヌクレオチドの長さである。

【0034】

一部の実施形態では、サンプルは、細胞又は細胞溶解物である。

【0035】

一部の実施形態では、標的はタンパク質である。一部の実施形態では、標的は核酸（例えば、DNA又はRNA）である。

【0036】

一部の実施形態では、標的は、細胞又は細胞溶解物から得られる。

【0037】

一部の態様では、サンプル中の少なくとも1つ又は少なくとも2つの標的を検出する方法が本明細書に記載され、この方法は、サンプルを（a）ドッキング鎖に連結されたタンパク質をそれぞれ含む少なくとも2つのタンパク質 - 核酸コンジュゲート及び（b）この少なくとも1つ又は少なくとも2つの異なるタンパク質 - 核酸コンジュゲートのそれぞれのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する少なくとも2つの標識された（任意選択で、スペクトルが異なるか、又は蛍光標識されるか、又はスペクトルが異なって蛍光標識される）イメージャー鎖に接触させるステップ、及び少なくとも2つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートが、サンプル中の少なくとも2つの標的に結合するか否かを決定するステップを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、次の順序で、少なくとも2つの標識イメージャー鎖の1つの、少なくとも2つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートのドッキング鎖への一時的な結合を画像化して、（例えば、蛍光信号の）第1の画像を形成するステップ、及び少なくとも2つの標識イメージャー鎖のもう1つの、少なくとも2つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートのもう1つのドッキング鎖への一時的な結合を画像化して、少なくとも1つの（例えば、蛍光信号の）別の画像を形成するステップを含む。一部の実施形態では、この方法は、第1の画像と少なくとも1つの他の画像とを組み合わせることで信号（例えば、蛍光信号）の合成画像を形成するステップをさらに含み、この合成画像の信号は、少なくとも2つの標的を表す。

【0038】

一部の実施形態では、タンパク質 - 核酸コンジュゲートのタンパク質は、抗体、抗原結合抗体断片、又はペプチドアプタマーである。一部の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

【0039】

一部の実施形態では、タンパク質 - 核酸コンジュゲートのタンパク質は、介在リンカーを介してドッキング鎖に連結される。一部の実施形態では、介在リンカーは、ビオチン及びストレプトアビジンを含む。

【0040】

一部の実施形態では、少なくとも2つのスペクトルの異なる蛍光標識イメージャー鎖のそれぞれは、少なくとも1つのフルオロフォアを含む。

【0041】

一部の実施形態では、任意選択でスペクトルが異なり蛍光標識される、少なくとも2つの標識イメージャー鎖のそれぞれは、約4～約10ヌクレオチド又は約8～約10ヌクレオチドの長さである。

【0042】

一部の実施形態では、サンプルは、細胞又は細胞溶解物である。

【0043】

一部の実施形態では、少なくとも2つの標的はタンパク質である。一部の実施形態では、少なくとも2つの標的は核酸（例えば、DNA又はRNA）である。

【0044】

一部の実施形態では、少なくとも2つの標的は、細胞又は細胞溶解物から得られる。

【0045】

一部の態様では、サンプル中の少なくとも1つ又は少なくとも2つのタンパク質標的を検出する方法が本明細書に記載され、この方法は、(a) サンプルを、ドッキング鎖に連結されたタンパク質をそれぞれ含む少なくとも2つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートに接触させるステップ及び(b) 連続してこのサンプルを、この少なくとも2つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートのそれぞれのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する少なくとも2つの標識された（例えば、任意選択で、スペクトルが異なるか、又は蛍光標識されるか、又はスペクトルが異なり蛍光標識される）イメージャー鎖に接触させるステップ、並びに少なくとも1つ又は少なくとも2つのタンパク質 - 核酸コンジュゲートが、サンプル中の少なくとも2つの標的に結合するか否かを決定するステップを含む。一部の実施形態では、この方法は、次の順序で、サンプルを、第1のタンパク質 - 核酸コンジュゲート及び少なくとも1つの他のタンパク質 - 核酸コンジュゲートに接触させるステップ、このサンプルを、第1のタンパク質 - 核酸コンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する、任意選択で蛍光標識される、第1の標識イメージャー鎖に接触させるステップ、任意選択でタイムラプスイメージングを用いて、このサンプルを画像化して第1の画像を得るステップ、第1の標識イメージャー鎖を除去するステップ、このサンプルを、少なくとも1つの他のタンパク質 - 核酸コンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する少なくとも1つの他の標識イメージャー鎖に接触させるステップ、及び任意選択でタイムラプスイメージングを用いて、このサンプルを画像化して少なくとも1つの他の画像を得るステップを含む。

【0046】

一部の実施形態では、方法は、次の順序で、サンプルを、第1のタンパク質 - 核酸コンジュゲートに接触させるステップ、このサンプルを、第1のタンパク質 - 核酸コンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する、任意選択で蛍光標識される、第1の標識イメージャー鎖に接触させるステップ、任意選択でタイムラプスイメージングを用いて、このサンプルを画像化して第1の画像を得るステップ、第1の標識イメージャー鎖を除去するステップ、このサンプルを、少なくとも1つの他のタンパク質 - 核酸コンジュゲートに接触させるステップ、このサンプルを、少なくとも1つの他のタンパク質 - 核酸コンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する、任意選択で蛍光標識される、少なくとも1つの他の標識イメージャー鎖に接触させるステップ、及び任意選択でタイムラプスイメージングを用いて、このサンプルを画像化して少なくとも1つの他の画像を得るステップを含む。

【0047】

一部の実施形態では、方法は、第1のタンパク質 - DNAコンジュゲートが第1の標的に結合するか否か、及び/又は少なくとも1つの他のタンパク質 - DNAコンジュゲートが少なくとも1つの他の標的に結合するか否かを決定するステップをさらに含む。

【0048】

一部の実施形態では、方法は、第1の画像の信号（例えば、蛍光信号）に疑似カラーを割り当てるステップ、及び少なくとも1つの他の画像の蛍光信号に少なくとも1つの他の疑似カラーを割り当てるステップをさらに含む。

【0049】

一部の実施形態では、方法は、第1の画像と少なくとも1つの他の画像とを組み合わせる疑似カラー信号の合成画像を形成するステップをさらに含み、この合成画像の疑似カラー信号は、少なくとも2つの標的を表す。

【0050】

一部の実施形態では、タンパク質 - 核酸コンジュゲートのタンパク質は、抗体、抗原結合抗体断片、又はペプチドアプタマーである。一部の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態では、タンパク質 - 核酸コンジュゲートのタンパク質は、介在リンカーを介してドッキング鎖に連結される。一部の実施形態では、介在リンカーは、ビオチン及び/又はストレプトアビジンを含む。

【 0 0 5 2 】

一部の実施形態では、蛍光標識イメージャー鎖のそれぞれは、少なくとも1つのフルオロフォアを含む。

10

【 0 0 5 3 】

一部の実施形態では、蛍光標識イメージャー鎖のそれぞれは、約4～約30ヌクレオチド又は約8～約10ヌクレオチドの長さである。

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態では、サンプルは細胞又は細胞溶解物である。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態では、標的はタンパク質である。一部の実施形態では、標的は核酸（例えば、DNA又はRNA）である。

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態では、標的は、細胞又は細胞溶解物から得られる。

20

【 0 0 5 7 】

一部の態様では、任意選択で天然生体分子である標的を検出する方法が本明細書に記載され、この方法は、任意選択で天然生体分子である少なくとも1つの標的を含むサンプルを（a）任意選択でそれぞれ、ドッキング鎖に連結されたタンパク質又は核酸を含む、少なくとも1つのBP - NAコンジュゲート及び（b）この少なくとも1つのBP - NAコンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する、任意選択で蛍光標識される、少なくとも1つの標識イメージャー鎖に接触させるステップ、及びこの少なくとも1つのBP - NAコンジュゲートが、サンプル中の、任意選択で天然生体分子である少なくとも1つの標的に結合するか否かを決定するステップを含む。本明細書に記載されるこの及び他の態様又は実施形態では、この方法は、少なくとも1つの標的を含む疑いのあるサンプルを用いて、又はサンプルが標的を含む可能性についての事前知識の一切ない、最終使用者が少なくとも1つの標的の存在についての分析を望むサンプルを用いて行うことができることを理解されたい。

30

【 0 0 5 8 】

一部の実施形態では、決定するステップは、任意選択で蛍光標識される、少なくとも1つの標識イメージャー鎖の、少なくとも1つのBP - NAコンジュゲートのドッキング鎖への一時的な結合を画像化するステップを含む。

【 0 0 5 9 】

一部の実施形態では、サンプルは細胞又は細胞溶解物である。

【 0 0 6 0 】

一部の実施形態では、任意選択で天然生体分子である少なくとも1つの標的は、細胞又は細胞溶解物から得られる。

40

【 0 0 6 1 】

一部の実施形態では、タンパク質は、抗体、抗原結合抗体断片、又はペプチドアプタマーである。一部の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

【 0 0 6 2 】

一部の実施形態では、タンパク質は、介在リンカーを介してドッキング鎖に連結される。一部の実施形態では、介在リンカーは、ビオチン及び/又はストレプトアビジンを含む。

【 0 0 6 3 】

50

一部の実施形態では、核酸は核酸アプタマーである。

【0064】

一部の実施形態では、蛍光標識イメージャー鎖は、少なくとも1つのフルオロフォアを含む。

【0065】

一部の実施形態では、任意選択で蛍光標識されるイメージャー鎖は、約4～約30ヌクレオチド又は約8～約10ヌクレオチドの長さである。

【0066】

一部の態様では、任意選択で天然生体分子である標的を検出する方法が本明細書に記載され、この方法は、任意選択で天然生体分子である少なくとも2つの標的を含むサンプルを(a)任意選択でそれぞれ、DNAドッキング鎖に連結されたタンパク質又は核酸を含む、少なくとも2つの異なるBP-NAコンジュゲート及び(b)この少なくとも2つのBP-NAコンジュゲートのそれぞれのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する、少なくとも2つの標識(任意選択で、スペクトルが異ならないか、又は蛍光標識されるか、又はスペクトルが異なって蛍光標識される)イメージャー鎖に接触させるステップ、及びこの少なくとも2つのBP-NAコンジュゲートが、サンプル中の少なくとも1つ又は少なくとも2つの天然生体分子に結合するか否かを決定するステップを含む。

【0067】

一部の実施形態では、方法は、次の順序で、サンプルを、第1のBP-NAコンジュゲート及び少なくとも1つの他のBP-NAコンジュゲートに接触させるステップ、このサンプルを、第1のBP-NAコンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する、任意選択で蛍光標識される、第1の標識イメージャー鎖に接触させるステップ、任意選択でタイムラプスイメージングを用いて、このサンプルを画像化して第1の画像を得るステップ、第1の標識イメージャー鎖を除去するステップ、このサンプルを、少なくとも1つの他のBP-NAコンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する、任意選択で蛍光標識される、少なくとも1つの他の標識イメージャー鎖に接触させるステップ、及び任意選択でタイムラプスイメージングを用いて、このサンプルを画像化して少なくとも1つの他の画像を得るステップを含む。

【0068】

一部の実施形態では、方法は、次の順序で、サンプルを、第1のBP-NAコンジュゲートに接触させるステップ、このサンプルを、第1のBP-NAコンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する、任意選択で蛍光標識される、第1の標識イメージャー鎖に接触させるステップ、任意選択でタイムラプスイメージングを用いて、このサンプルを画像化して第1の画像を得るステップ、第1の標識イメージャー鎖を除去するステップ、このサンプルを、少なくとも1つの他のBP-NAコンジュゲートに接触させるステップ、このサンプルを、少なくとも1つの他のBP-NAコンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する、任意選択で蛍光標識される、少なくとも1つの他の標識イメージャー鎖に接触させるステップ、及び任意選択でタイムラプスイメージングを用いて、このサンプルを画像化して少なくとも1つの他の画像を得るステップを含む。

【0069】

一部の実施形態では、方法は、第1のタンパク質DNAコンジュゲートが、任意選択で天然性多分子である第1の標的に結合するか否か、及び/又は少なくとも1つの他のタンパク質-DNAコンジュゲートが、任意選択で天然生体分子である少なくとも1つの他の標的に結合するか否かを決定するステップをさらに含む。

【0070】

一部の実施形態では、方法は、第1の画像の信号(例えば、蛍光信号)に疑似カラーを割り当てるステップ、及び少なくとも1つの他の画像の信号(例えば、蛍光信号)に少な

10

20

30

40

50

くとも1つの他の疑似カラーを割り当てるステップをさらに含む。

【0071】

一部の実施形態では、方法は、第1の画像と少なくとも1つの他の画像とを組み合わせ、疑似カラー信号の合成画像を形成するステップをさらに含み、この合成画像の疑似カラー信号が、少なくとも1つ又は少なくとも2つの標的（例えば天然生体分子）を表す。

【0072】

一部の態様では、試験サンプル中の標的の数を決定する方法が本明細書に記載され、この方法は、任意選択で蛍光標識される、標識イメージャー鎖に直接又は間接的に一時的に結合する標的を含むサンプルを得るステップ、このサンプルの、任意選択でタイムラプス回折限界蛍光画像であるタイムラプス画像を得るステップ、回折限界画像に対してスポット検出（例えば、蛍光スポット検出）及び局在化（例えば、ガウスフィッティングの使用による）を行ってサンプルの高解像度画像を得るステップ、任意選択で既知の数の標的を含む対照サンプルを用いて、 $k_{on} \cdot c_{imager}$ を較正するステップであって、 $k_{on}$ が二次会合定数であり、かつ $c_{imager}$ が試験サンプル中の標識（例えば、蛍光標識）イメージャー鎖の濃度である、ステップ、任意選択で蛍光OFF時間分布を累積分布関数にフィッティングすることによって、変数 $\tau_d$ を決定するステップ、及び式、試験標的の数 =  $(k_{on} \cdot c_{imager} \cdot \tau_d)^{-1}$ に基づいて、サンプル中の試験標的の数を決定するステップを含む。

10

【0073】

一部の態様では、試験サンプル中の標的の相対量を決定する方法が本明細書に記載され、この方法は、標識イメージャー鎖に直接又は間接的に一時的に結合する標的を含むサンプルを得るステップ、このサンプルのタイムラプス画像を得るステップ、画像に対してスポット検出及び局在化を行ってこのサンプルの高解像度画像を得るステップ、変数 $\tau_d$ を決定するステップ、及び $\tau_d$ に基づいて、サンプル中の2つ以上の試験標的の相対量を決定するステップを含む。

20

【0074】

一部の実施形態では、試験標的はタンパク質標的である。

【0075】

一部の実施形態では、タンパク質標的は、ドッキング鎖に連結されたタンパク質を含むタンパク質 - 核酸コンジュゲートに結合し、及び標識（例えば、蛍光標識）イメージャー鎖は、このタンパク質 - 核酸コンジュゲートのそれぞれのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する。

30

【0076】

一部の実施形態では、タンパク質 - 核酸コンジュゲートのタンパク質は、抗体、抗原結合抗体断片、又はペプチドアプタマーである。

【0077】

一部の実施形態では、試験標的は一本鎖核酸である。

【0078】

一部の実施形態では、一本鎖核酸は、DNA又はRNAである。

【0079】

一部の実施形態では、蛍光標識イメージャー鎖のそれぞれは、少なくとも1つのフルオロフォアを含む。

40

【0080】

一部の実施形態では、任意選択で蛍光標識される、標識イメージャー鎖のそれぞれは、約4～約30ヌクレオチド又は約8～約10ヌクレオチドの長さである。

【0081】

一部の実施形態では、タイムラプス蛍光画像は、約25分の期間に亘って得られる。

【0082】

一部の実施形態では、試験標的の数は、90%を超える精度で決定される。

【0083】

50

一部の態様では、一本鎖DNAプローブが本明細書に記載され、この一本鎖DNAプローブは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は少なくとも3つのサブドメインのドッキングドメインに、任意選択でその3'末端に連結される約20ヌクレオチドの長さの標的結合ドメインを含み、この少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は少なくとも3つのサブドメインがそれぞれ、約4～約30又は約8～10ヌクレオチドの長さの少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は少なくとも3つの、任意選択で蛍光標識される、標識イメージャー鎖に相補的であり、この標的結合ドメインは、一本鎖mRNA標的鎖の相補的なドメインに結合する。

【0084】

一部の実施形態では、少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は少なくとも3つのサブドメインの少なくとも1つが、少なくとも1つの、任意選択で蛍光標識される、標識イメージャー鎖に一時的に結合する。

【0085】

一部の態様では、複数の画像のドリフト補正を行う方法が本明細書に記載され、複数の画像のそれぞれが、時系列の画像のフレームを含み、この時系列の画像が、複数の一時的な事象を捉え、この方法は、複数の画像で特定された複数のドリフトマーカのそれぞれの時間トレースを決定するステップであって、各ドリフトマーカの時間トレースが、時系列の画像に対する画像における物体の動きに一致する、ステップ、少なくとも1つのコンピュータプロセッサを用いて、複数のドリフトマーカの時間トレースに少なくとも部分的に基づいて、複数のドリフトマーカの少なくとも1つの第1のドリフト補正を決定するステップ、複数の画像から特定された複数のドリフト型の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカ部位のそれぞれの時間トレースを決定するステップであって、複数のドリフト型における各ドリフト型が、ドリフト型における一時的な事象の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカ部位間の幾何学的な関係を示す、ステップ、複数のドリフト型の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカ部位の時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第2のドリフト補正を決定するステップ、第1のドリフト補正及び第2のドリフト補正に少なくとも部分的に基づいて複数の画像を補正するステップ、及び補正された複数の画像に基づいて最終画像を出力するステップを含む。

【0086】

一部の実施形態では、方法は、複数の画像のそれぞれにおける複数の局在化を特定するステップ、この複数の局在化の2次元ヒストグラムを作成するステップ、及びこの2次元ヒストグラムに少なくとも部分的に基づいて複数のドリフトマーカの位置を特定するステップをさらに含み、複数のドリフトマーカのそれぞれの時間トレースを決定するステップが、複数のドリフトマーカの位置に少なくとも部分的に基づいて時間トレースを決定するステップを含む。

【0087】

一部の実施形態では、複数の局在化を特定するステップは、複数の画像のそれぞれに対して複数のスポットを特定するステップ、及び局所ガウスフィッティングアルゴリズムを用いて、複数のスポットのそれぞれの近似中心位置(fitted center position)を決定するステップを含み、複数の局在化のそれぞれが、画像で特定されたスポット及びその関連する近似中心位置を含む。

【0088】

一部の実施形態では、複数の局在化のそれぞれが、局在化に一致する検出された光子カウントをさらに含む。

【0089】

一部の実施形態では、複数の局在化の2次元ヒストグラムを作成するステップが、全ての局在化を2次元格子にビンニングするステップ、及び各ピンにおける局在化の総数をヒストグラムカウントとして使用するステップを含む。

【0090】

一部の実施形態では、複数の局在化の2次元ヒストグラムを作成するステップが、全て

10

20

30

40

50



の局在化を2次元格子にビンニングするステップ、及び各ピンにおける複数の局在化の光子カウントの総数をヒストグラムカウントとして使用するステップを含む。

【0091】

一部の実施形態では、2次元ヒストグラムに少なくとも部分的に基づいて複数のドリフトマーカの位置を特定するステップは：1つ以上の選択基準を用いて2次元ヒストグラムを2値化するステップであって、1つ以上の選択基準が、ヒストグラム値の下限閾値又はヒストグラム値の上限閾値を含む、ステップ；2値化画像を区分に分割し、かつこの区分を1つ以上の選択基準に基づいてフィルタリングするステップであって、1つ以上の選択基準が、区画領域のうちの領域の下限閾値、この領域の上限閾値、最も長い区画の最も長い又は最も短い線寸法の下限又は上限、及び区画の偏心の下限又は上限の1つ以上を含む、ステップ；及び1つ以上の2値画像操作を用いて2値化画像を膨張及び収縮させるステップであって、1つ以上の2値画像操作が、膨張、退縮、ブリッジ(bridge)、接続(close)、切断(open)、塗りつぶし(fill)、除去(clean)、トップハット(top-hat)、ボトムハット(bottom-hat)、太線化(thicken)、及び細線化(thin)などの1つ以上を含む、ステップの少なくとも1つを含む。

10

【0092】

一部の実施形態では、複数のドリフトマーカの時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第1のドリフト補正を決定するステップは：複数のドリフトマーカのそれぞれの相対時間トレースを決定するステップであって、この相対時間トレースが、ドリフトマーカの時間トレースと同じトレースの平均位置とを比較することによって決定される、ステップ；及び複数のドリフトマーカのそれぞれの相対時間トレースに基づいて組み合わせ時間トレースを決定するステップを含み、複数のドリフトマーカの時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第1のドリフト補正を決定するステップは、複数のドリフトマーカのそれぞれの相対時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第1のドリフト補正を決定するステップを含む。

20

【0093】

一部の実施形態では、複数のドリフトマーカのそれぞれの相対時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第1のドリフト補正を決定するステップは、複数のドリフトマーカのそれぞれの相対時間トレースの重み付き平均を行うステップを含む。

【0094】

一部の実施形態では、重み付き平均を行うステップは：相対時間トレースのそれぞれの品質スコアを決定するステップであって、この品質スコアが、時間トレースに関連した時間による変動の指標及び/又は時間トレース内の個々の局在化の局在化不確実性の指標に少なくとも部分的に基づいて決定される、ステップを含む。

30

【0095】

一部の実施形態では、時間による変動の指標は、時間による時間トレースの標準偏差を含む。

【0096】

一部の実施形態では、個々の局在化の局在化不確実性の指標は、ガウスフィッティングによる不確実性の推定値又は他の同時局在化との比較を少なくとも部分的に含み、他の同時局在化は、同じ画像内から、及び複数のドリフトマーカからの他の時間トレースからであり、この比較は、全ての同時局在化の平均及び標準偏差を含む。

40

【0097】

一部の実施形態では、この方法は、複数のドリフトマーカの第1のドリフトマーカが、時系列の画像の少なくとも1つのフレームに存在しないことを決定するステップ、及び少なくとも1つのフレームの第1のドリフトマーカの時間トレースを線形内挿して、第1のドリフトマーカの平滑化時間トレースを作成するステップをさらに含む。

【0098】

一部の実施形態では、複数の画像から特定された複数のドリフト鋳型の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカ部位のそれぞれの時間トレースを決定するステップは：複数の

50

画像のそれぞれにおける複数の局在化を特定するステップ；複数の局在化の２次元ヒストグラムを作成するステップ；及び２次元ヒストグラムに少なくとも部分的に基づいて複数のドリフト鋳型を特定するステップを含み、複数のドリフト鋳型を特定するステップは、ヒストグラムカウントの下限閾値及び／又は上限閾値を用いて２次元ヒストグラムを評価するステップを含む。

【００９９】

一部の実施形態では、複数の画像から特定された複数のドリフト鋳型の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカー部位のそれぞれの時間トレースを決定するステップは、複数のドリフト鋳型のそれぞれの中の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカー部位のそれぞれの時間トレースを決定するステップを含み、第２のドリフト補正を決定するステップは、  
10 複数のドリフト鋳型のそれぞれの中の複数のマーカー部位のそれぞれの時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第２のドリフト補正を決定するステップを含む。

【０１００】

一部の実施形態では、複数のドリフト鋳型のそれぞれの複数の幾何学的にアドレス可能なマーカー部位のそれぞれの時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第２のドリフト補正を決定するステップは：複数のドリフト鋳型のそれぞれの中の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカー部位を特定するステップ；及び複数のドリフト鋳型のそれぞれの複数の幾何学的にアドレス可能なドリフトマーカーのそれぞれの相対時間トレースを決定するステップを含み；複数のドリフト鋳型の時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第２のドリフト補正を決定するステップは、複数のドリフト鋳型のそれぞれの中の複数のドリフトマーカーのそれぞれの相対時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第２のドリフト補正を決定するステップを含む。  
20

【０１０１】

一部の実施形態では、複数のドリフト鋳型のそれぞれの複数の幾何学的にアドレス可能なマーカー部位を特定するステップは、対応するドリフト鋳型における複数の局在化の２次元ヒストグラム及び／又は１つ以上の選択基準に少なくとも部分的に基づいて複数のマーカー部位を決定するステップを含み、１つ以上の選択基準は、局在化の総数、局在化の表面密度、及び局在化の標準偏差の１つ以上を含む。

【０１０２】

一部の実施形態では、複数のドリフト鋳型のそれぞれの中の複数のドリフトマーカーのそれぞれの相対時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第２のドリフト補正を決定するステップは、ドリフト鋳型のそれぞれの中の複数のドリフトマーカーのそれぞれの相対時間トレースの重み付き平均を行うステップを含む。  
30

【０１０３】

一部の実施形態では、重み付き平均を行うステップは：相対時間トレースのそれぞれの品質スコアを決定するステップであって、この品質スコアは、時間トレースに関連した時間による変数の指標及び／又は時間トレース内の局在化不確実性の指標に少なくとも部分的に基づいて決定される、ステップを含む。

【０１０４】

一部の実施形態では、時間による変動の指標は、時間による時間トレースの標準偏差を含む。  
40

【０１０５】

一部の実施形態では、個々の局在化の局在化不確実性の指標は、ガウスフィッティングによる不確実性の推定値又は他の同時局在化との比較を含み、他の同時局在化は、同じ画像内から、及び複数のドリフト鋳型の複数のマーカー部位の他の時間トレースからであり、この比較は、全ての同時局在化の平均及び標準偏差を含む。

【０１０６】

一部の実施形態では、第１のドリフト補正及び第２のドリフト補正に少なくとも部分的に基づいて複数の画像を補正するステップは、第１のドリフト補正を用いて複数の画像を補正して、第１の補正された複数の画像を得るステップを含み、複数の画像から特定され  
50

た複数のドリフト鋳型のそれぞれの時間トレースを決定するステップは、第1の補正された複数の画像から特定された複数のドリフト鋳型のそれぞれの時間トレースを決定するステップを含む。

【0107】

一部の実施形態では、方法は、第1のドリフト補正を用いて、複数の画像を補正するステップの前に第1のドリフト補正を平滑化するステップをさらに含む。

【0108】

一部の実施形態では、第1のドリフト補正を平滑化するステップは、第1のドリフト補正の特徴的なドリフト時間スケールによって決定されるウィンドウを用いる局所回帰法を使用して、第1のドリフト補正を処理するステップを含む。

10

【0109】

一部の実施形態では、方法は、第2のドリフト補正を用いて、複数の画像を補正するステップの前に第2のドリフト補正を平滑化するステップをさらに含む。

【0110】

一部の実施形態では、第2のドリフト補正を平滑化するステップは、第2のドリフト補正の特徴的なドリフト時間スケールによって決定されるウィンドウを用いる局所回帰法を使用して、第2のドリフト補正を処理するステップを含む。

【0111】

一部の実施形態では、方法は、複数のドリフトマーカの単一ドリフトマーカを選択するステップ；及び選択された単一ドリフトマーカに少なくとも部分的に基づいて第3のドリフト補正を決定するステップをさらに含み、複数の画像を補正するステップは、第3のドリフト補正に少なくとも部分的に基づいて複数の画像を補正するステップを含む。

20

【0112】

一部の実施形態では、第3のドリフト補正に少なくとも部分的に基づいて複数の画像を補正するステップは、第1のドリフト補正及び第2のドリフト補正に少なくとも部分的に基づいて複数の画像を補正するステップの前に行われる。

【0113】

一部の実施形態では、方法は、複数のフレームの第1の画像における第1の複数の点の位置を特定するステップ；複数の画像の第2の画像における第2の複数の点の位置を特定するステップであって、第2の画像が、時系列の画像における第1の画像の隣接フレームに一致する、ステップ；及び第1の複数の点の位置と第2の複数の点の位置との間の差異に少なくとも部分的に基づいて第4のドリフト補正を決定するステップをさらに含み；複数の画像を補正するステップは、第4のドリフト補正に少なくとも部分的に基づいて複数の画像を補正するステップを含む。

30

【0114】

一部の実施形態では、第2の画像が、時系列の画像における第1の画像に一致するフレームの直後のフレームに一致する。

【0115】

一部の実施形態では、第1の複数の点の位置と第2の複数の点の位置との間の差異に少なくとも部分的に基づいて第4のドリフト補正を決定するステップは：第1の複数の点の位置と第2の複数の点の位置との間の距離のヒストグラムを作成するステップ；ヒストグラムに少なくとも部分的に基づいて、同じ一時的な事象に一致する第1の画像と第2の画像との間の点の対を決定するステップ；及び決定された点の対のそれぞれの間の位置のオフセットを決定するステップを含み、第4のドリフト補正を決定するステップは、決定された点の対のそれぞれの位置のオフセットのベクトル平均に基づいている。

40

【0116】

一部の実施形態では、複数の画像は、DNAベースの画像に一致し、複数の一時的な事象は、イメージング鎖とDNAドッキング鎖との間の結合事象である。

【0117】

一部の実施形態では、イメージング鎖は、DNAドッキング鎖に会合すると蛍光を発す

50

るように構成された蛍光イメージングプローブである。

【0118】

一部の実施形態では、ドリフトマーカの少なくとも1つは、DNAベースのナノ構造である。

【0119】

一部の実施形態では、DNAベースのナノ構造は、ドッキング鎖を備えるDNA折り紙ナノ構造である。

【0120】

一部の実施形態では、ドリフト鋳型の少なくとも1つは、DNAベースのナノ構造である。

10

【0121】

一部の実施形態では、DNAベースのナノ構造は、ドッキング鎖を備えるDNA折り紙ナノ構造である。

【0122】

一部の実施形態では、ドリフト鋳型の少なくとも1つは、3次元ドリフト鋳型である。

【0123】

一部の実施形態では、3次元ドリフト鋳型は4面体である。

【0124】

一部の実施形態では、ドリフト鋳型の少なくとも1つは、異なるタイプの一時的な事象に一致する複数の色を含む。

20

【0125】

一部の実施形態では、異なるタイプの一時的な事象は、第1のイメージング鎖の第1のタイプのDNAドッキング鎖への第1の結合事象、及び第2のイメージング鎖の第2のタイプのDNAドッキング鎖への第2の結合事象を含む。

【0126】

一部の実施形態では、最終画像を出力するステップは、最終画像をディスプレイに表示するステップを含む。

【0127】

一部の実施形態では、最終画像を出力するステップは、最終画像を少なくとも1つのネットワークを介してコンピュータに送信するステップを含む。

30

【0128】

一部の実施形態では、最終画像を出力するステップは、最終画像を少なくとも1つの記憶装置に保存するステップを含む。

【0129】

一部の態様では、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実行されると、複数の画像のドリフト補正を行う方法を実施する、複数の命令で符号化された非一時的なコンピュータ可読媒体が本明細書に記載され、複数の画像のそれぞれは、時系列の画像のフレームを含み、この時系列の画像は、複数の一時的な事象を捉え、この方法は：複数の画像で特定された複数のドリフトマーカのそれぞれの時間トレースを決定するステップであって、各ドリフトマーカの時間トレースが、時系列の画像に対する画像における物体の動きに一致する、ステップ；複数のドリフトマーカの時間トレースに少なくとも部分的に基づいて複数のドリフトマーカの少なくとも1つの第1のドリフト補正を決定するステップ；複数の画像から特定された複数のドリフト鋳型の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカ部位のそれぞれの時間トレースを決定するステップであって、複数のドリフト鋳型における各ドリフト鋳型が、ドリフト鋳型における一時的な事象の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカ部位間の幾何学的関係を示す、ステップ；複数のドリフト鋳型の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカ部位の時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第2のドリフト補正を決定するステップ；第1のドリフト補正及び第2のドリフト補正に少なくとも部分的に基づいて複数の画像を補正するステップ；及び補正された複数の画像に基づいて最終画像を出力するステップを含む。

40

50

## 【 0 1 3 0 】

一部の態様では、コンピュータが本明細書に記載され、このコンピュータは：複数の画像を受け取るように構成された入力インターフェイスであって、複数の画像のそれぞれが、時系列の画像のフレームを含み、この時系列の画像が、複数の一時的な事象を捉える、入力インターフェイス；少なくとも1つのプロセッサであって：複数の画像で特定された複数のドリフトマーカのそれぞれの時間トレースを決定するステップであって、各ドリフトマーカの時間トレースが、時系列の画像に対する画像における物体の動きに一致する、ステップ；複数のドリフトマーカの時間トレースに少なくとも部分的に基づいて複数のドリフトマーカの少なくとも1つの第1のドリフト補正を決定するステップ；複数の画像から特定された複数のドリフト鋳型の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカ部位のそれぞれの時間トレースを決定するステップであって、複数のドリフト鋳型における各ドリフト鋳型が、ドリフト鋳型における一時的な事象の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカ部位間の幾何学的関係を示す、ステップ；複数のドリフト鋳型の複数の幾何学的にアドレス可能なマーカ部位の時間トレースに少なくとも部分的に基づいて第2のドリフト補正を決定するステップ；第1のドリフト補正及び第2のドリフト補正に少なくとも部分的に基づいて複数の画像を補正するステップ；及び補正された複数の画像に基づいて最終画像を決定するステップを行うようにプログラムされている、少なくとも1つのプロセッサ；並びに最終画像を出力するように構成された出力インターフェイスを含む。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 1 3 1 】

【図1A】図1Aは、約16ナノメートル（nm）離隔した（濃い灰色で示されている）一対の相反する面にある、一本鎖DNAドッキング鎖で「標識された」微小管様DNA折り紙ポリマーを示している。相補的な蛍光標識イメージャー鎖が、溶液からドッキング鎖に一時的に結合する。（底部の2つの中心にある螺旋に存在する）ピオチン化DNA鎖を使用して、蛍光イメージングのために微小管様DNA構造をガラス表面に結合させる。

【図1B】図1Bは、蛍光標識イメージャー鎖のドッキング鎖への一時的な結合が蛍光「明滅」（蛍光強度対時間トレース）を生じさせることを実証するグラフを示している。この明滅を使用して、連続的に点を回折限界よりも低く局在化させる。

【図1C】図1Cは、 $16 \pm 1$  nm（平均±標準偏差）[スケールバー：40 nm]の測定幅を有するDNA折り紙ポリマーの透過型電子顕微鏡（TEM）画像を示している。

【図1D】図1Dは、Cy3b標識イメージャー鎖を用いて得られた超解像蛍光画像（15,000フレーム、5 Hzのフレームレート）を示している。2つの異なる線が見える[スケールバー：40 nm]。図1Eは、図1Dの強調された領域< i > 及び< i i > の断面ヒストグラム（矢印はヒストグラムの方向を示す）を示し、このヒストグラムは、約16 nmの設計距離は、明確に解像されている（各分布の半値全幅（FWHM）は、約9 nmであると観察される）。

【図2】図2は、タンパク質（例えば、タンパク質標的）が本開示の抗体-DNAコンジュゲートで標識され、相補的な蛍光標識イメージャー鎖である、本開示の生体分子標識スキームの一例を示している。抗体は、ピオチン及びストレプトアビジンを含むリンカー（例えば、ピオチン-ストレプトアビジン ピオチンリンカー）によってドッキング鎖に連結される。

【図3A】図3Aは、抗体-DNAコンジュゲート及びAtto655標識イメージャー鎖を用いた固定HeLa細胞内の微小管網の超解像度画像（10,000フレーム、10 Hzのフレームレート）[スケールバー：5  $\mu$ m]を示している。

【図3B】図3Bは、図3Aの強調された領域の高倍率画像を示している[スケールバー：1  $\mu$ m]。

【図3C】図3Cは、図3Bの同じ領域の回折限界表現を示している。矢印は、画像の解像度の増加がはっきりと見える位置を強調している。図3Bにおける位置< i > での約46 nmの見かけ上の幅を有する隣接する微小管が、約79 nm分離されている[スケールバー：1  $\mu$ m]。

【図 3 D】図 3 D は、抗体 - DNA コンジュゲート、微小管（線状構造）用の Cy 3 b 標識イメージャー鎖、及びミトコンドリア（パッチ状構造）用の Atto 655 標識イメージャー鎖を用いて得られた固定 HeLa 細胞内の微小管及びミトコンドリアの二色超解像度画像（15, 000 フレーム、10 Hz のフレームレート）を示している [スケールバー：5  $\mu\text{m}$ ]。

【図 3 E】図 3 E は、図 3 D の強調された領域の高倍率画像を示している [スケールバー：1  $\mu\text{m}$ ]。

【図 3 F】図 3 F は、図 3 E に示されている同じ領域の回折限界画像を示している [スケールバー：1  $\mu\text{m}$ ]。

【図 4 A】図 4 A は、（例えば、それぞれ同じ色のフルオロフォアで標識された）スペクトルが異なるイメージャー鎖を用いて本開示の一実施形態を示している。ステップ [1] で、3 つの異なる種のドッキング鎖（a、b、c）を表面に標識化する。このような標識化は、ドッキング鎖のみ、若しくはタンパク質 - 結合（例えば、抗体）に連結されたドッキング鎖、又は目的の表面 / 生体分子に結合する核酸 - 結合分子を用いて行うことができる。ステップ [2] で、イメージャー鎖  $a^*$  の複数のコピーを導入し（ $a^*$  は a に相補的な配列を有する）、ドッキング鎖 a で標識された点が画像化される。ステップ [3] で、イメージャー鎖  $a^*$  のコピーが洗い流され、イメージャー鎖  $b^*$  が導入されて b 標識された点が画像化される。画像が得られ、イメージャー鎖  $b^*$  が洗い流される。ステップ [4] で、c 標識された点が、同じ要領で画像化される。ステップ [5] で、[2 ~ 4] からの画像に、疑似カラーが割り当てられ、組み合わせられて最終画像が形成される。画像の最終レンダリングに疑似カラーを使用することができるが、全てのイメージャー鎖は、実際は同じ色の色素（例えば、フルオロフォア）で標識される。

【図 4 B 1】図 4 B (1) ~ 図 4 B (3) は、画像の密度を低下させると同時に、達成可能な解像度を最大

【数 1】

$$2\sqrt{2}\ln 2 \approx 2.35$$

増加させることを示している。ここで、再構築された局在化の FWHM として既に定義された解像度は、スパース点を用いる局在顕微鏡法と同様に局在化の標準偏差として理解することができる。図 4 B (1) は、10 nm の間隔の線形ジオメトリにある 7 つの点を示している（上部）。約 14 nm の解像度の超解像度データをシミュレーションした（中心）。これらの点は、解像することができない。断面ヒストグラムデータは、幅広いピークを示している（底部）。

【図 4 B 2】図 4 B (2) 及び図 4 B (3) は、1 つおきの画像化が個々のスポットの局在化を可能にすることを示している。次いで、これらの局在化を組み合わせ、全パターンの最終画像を形成することができる。

【図 4 B 3】図 4 B (2) 及び図 4 B (3) は、1 つおきの画像化が個々のスポットの局在化を可能にすることを示している。次いで、これらの局在化を組み合わせ、全パターンの最終画像を形成することができる。

【図 4 C】図 4 C は、10 nm の間隔でドッキング鎖を表示する DNA 折り紙構造の画像を示している。

【図 5 A】図 5 A は、数字の 0 ~ 3（0、1、2、及び 3）に類似した異なる種類のドッキング鎖を指定位置に備えた DNA 折り紙構造を用いた本開示の一実施形態を示している。各回で、それぞれのイメージャー鎖配列が、イメージングチャンバに加えられ、画像の取得が行われ、イメージャー鎖が洗い流される。各イメージングの回では、設計の数字が画像化され、異なる回の間にクロストークのない非常に配列特異的な相互作用を示している [スケールバー：50 nm]。全てのイメージャー鎖が、同じ色の色素で標識されるが、各構造（例えば、0 ~ 3（0、1、2、及び 3））は、異なる色（例えば、紫色、黄色、青色、又は赤色；カラーレンダリングは不図示）でレンダリングされることに留意され

たい。

【図5B1】図5B(i)～図5B(v)は、数字の0～9(0、1、2、3、4、5、6、7、8、及び9)に類似した異なる種のドッキング鎖を指定位置に備えたDNA折り紙構造を用いた本開示の別の実施形態を示している。図5B(i)は、同じフルオロフォアで標識されたイメージャー鎖を用いた複数の標的の連続的なイメージングを示すexchange-PAINTの概略図を示している。図5B(ii)は、数字の4に類似したドッキング鎖を表示するDNA折り紙(70 100 nm)の概略図を示している。

【図5B2】図5B(iii)は、10回の全てのExchange-PAINTサイクルが組み合わせられた全体の画像を示し、イメージングサイクル間にクロストークが存在しないそれぞれの標的との特異的な相互作用を実証している。スケールバー：250 nm。図5B(iv)は、同じDNA折り紙上に全て存在する数字の0～3の4「色」画像を示している(それぞれ10,000フレーム、5 Hzのフレームレート；底部の概略図)。スケールバー：25 nm。図5B(v)は、10の異なる折り紙構造の疑似カラー画像を示し、それぞれに異なる色(例えば、橙色、緑色、青色、紫色、ピンクなど；カラーレンダリングは不図示)がレンダリングされ、高解像度(棒状の特徴のFWHM<10 nm)及び特異性を用いて1つのサンプルで数字の0～9が示されている。10回のイメージング-洗浄サイクルによって唯1つのフルオロフォア(Cy3b)を用いて得られた画像(イメージング：7,500フレーム/サイクル、5 Hzのフレームレート；洗浄：1～2分/サイクル)。スケールバー：25 nm。

【図6A】図6Aは、固定HeLa細胞を用いた本開示の一実施形態の実験の概略図を示し、1回で、ドッキング鎖が標的に結合され、次いで標識イメージャー鎖が添加され、画像が得られ、イメージャー鎖が洗い流される。各回が、異なる標識イメージャー鎖と共に異なる標的に特異的なドッキング鎖を用いて繰り返される。ドッキング鎖は、単独で、又はタンパク質-結合(例えば、抗体)又は目的の標的に結合する核酸-結合分子に連結されて使用することができる。

【図6B】図6Bは、固定HeLa細胞内のCy3b標識イメージャー鎖を用いた本開示の方法の2回を示している。ここで、微小管(緑の疑似カラー；カラーレンダリングは不図示)をドッキング配列aで標識し、ミトコンドリア(赤紫の疑似カラー；カラーレンダリングは不図示)を直交ドッキング配列bで標識した。

【図6C】図6Cは、図6Bと同様に固定HeLa細胞で行われたATTO655標識イメージャー鎖を用いた本開示の方法の2回を示している。[スケールバー：5 μm]。全てのイメージャー鎖が同じ色の色素で標識されることに留意されたい。

【図7A】図7Aは、溶液から、目的の構造又は分子上の相補的なドッキング鎖に一時的に結合する蛍光標識イメージャー鎖を示している。一時的な結合により、特徴的な蛍光ON時間及びOFF時間(それぞれ $\tau_b$ 及び $\tau_d$ )を用いて結合対時間トレースで示されている見かけ上の明滅が生じる。溶液からのイメージャー鎖の検出された結合頻度は、所与の画像領域における利用可能なドッキング鎖の数に線形従属する(即ち、ドッキング鎖が多ければ多いほど、結合頻度が高くなる)。結合事象間の時間、即ち、蛍光OFF時間( $\tau_d$ )は、ドッキング鎖の数に逆比例する。

【図7B】図7Bは、平均蛍光OFF時間( $\tau_d$ )を、OFF時間分布の累積分布関数(CDF)を計算することによって決定できることを示している。既知の会合定数 $k_{on}$ 及びイメージャー鎖濃度 $c$ と仮定すると、結合部位の数は、結合部位の数 = ( $\tau_d \cdot c \cdot k_{on}$ )<sup>-1</sup>によって計算することができる。

【図7C】図7Cは、概念実証のプラットフォームとして13の結合部位を表すように設計されたDNA折り紙構造の超解像度画像を示している。ドッキング部位の取り込み効率は、100%ではなく、実際に取り込まれた部位の分布となる(図7D(1))。表示されるドッキング部位の数を、スポットの数をカウントして(直接カウント)、この数を、推奨される結合キネティック分析(binding kinetic analysis)を用いて計算された部位の対応する数と比較することによって視覚的に決定することができるため、この構造は理想的な試験系システムとして役立つ。

10

20

30

40

50

【図 7 D 1】図 7 D ( 1 ) は、直接の目視カウントによって得られた 3 7 7 の折り紙構造の結合部位の分布を示している。

【図 7 D 2】図 7 D ( 2 ) は、本開示の結合キネティック分析 ( キネティクス ) によって得られた同じ構造の結合部位の分布を示している。

【図 7 D 3】図 7 D ( 3 ) は、直接カウントとキネティックカウントとの間の「オフセット」を示し：本開示の方法のカウント「エラー」又は不確実性は、7 % 未満であった ( ガウス分布の変動係数によって決定 ) 。

【図 8 A】図 8 A は、F I S H 様ハイブリダイゼーションスキームにおいてドッキング鎖を用いてタグが付けられた固定大腸菌細胞内の目的の m R N A 分子を示している。

【図 8 B】図 8 B は、各イメージングカラーの結合頻度を決定するために使用される読み出しスキームを示している。各単一 m R N A の位置の強度対時間プロファイルにより、1 色につき特有の一時的な結合パターン ( 明滅 ) が得られる。結合事象の頻度は、結合部位の数によって決まり、結合頻度を使用して、結合部位の異なる整数を区別することが可能となる。

【図 8 C 1】図 8 C は、赤色、緑色、及び青色のイメージャー鎖 ( カラーレンダリングは不図示 ) のそれぞれに対してそれぞれ 3、9、2 2、及び 4 4 の結合部位を表示する、D N A 折り紙構造に対する in vitro 原理証明実験を示している。異なる結合レベルが、各色で明確に区別可能であり、1 色につき 4 つの可能な「頻度レベル」を示唆し、バーコーディング、例えば、細胞内の m R N A 分子の 1 2 4 の異なる可能な組み合わせが得られる。バーコーディング空間は、蛍光 O N 時間及び追加の符号化実体 ( coding entity ) を用い

ることによって増大させることができる。

【図 8 C 2】図 8 C は、赤色、緑色、及び青色のイメージャー鎖 ( カラーレンダリングは不図示 ) のそれぞれに対してそれぞれ 3、9、2 2、及び 4 4 の結合部位を表示する、D N A 折り紙構造に対する in vitro 原理証明実験を示している。異なる結合レベルが、各色で明確に区別可能であり、1 色につき 4 つの可能な「頻度レベル」を示唆し、バーコーディング、例えば、細胞内の m R N A 分子の 1 2 4 の異なる可能な組み合わせが得られる。バーコーディング空間は、蛍光 O N 時間及び追加の符号化実体 ( coding entity ) を用い

ることによって増大させることができる。

【図 9】図 9 は、蛍光 O N 時間 ( 解離速度  $k_{off}$  に関連 ) は、蛍光 O F F 時間 ( 会合速度  $k_{on}$  に関連 ) とは独立に調整することができることを実証するグラフである。単一 C G 塩基対の追加による 9 ~ 1 0 ヌクレオチド ( n t ) のイメージング / ドッキング二重鎖の伸長により、キネティック O F F 速度は、桁 ( 8 ) がほぼ 1 桁減少する。

【図 1 0 A】図 1 0 A は、約 5 0 ヌクレオチド ( n t ) の長さのバーコードプローブを示し、2 1 n t の標的検出ドメイン  $t^*$  及びこれに続く赤色、緑色、又は青色イメージャー鎖の 8、9、又は 1 0 n t の長さの結合ドメインの組み合わせを備えた約 3 0 n t の長さの「バーコード」領域を用いて生体分子にタグを付けることができる。ここで、8、9、又は 1 0 n t の長さのドッキング鎖はそれぞれ、 $k_{off}$  が 1 秒当たり 1 0、1、及び 0 . 1 の 3 色で表示される ( カラーレンダリングは不図示 ) 。

【図 1 0 B】図 1 0 B は、9 n t の相互作用ドメインでは、8 n t の相互作用ドメインと比較して、蛍光 O N 時間  $t_b$  が増加した特徴的な強度対時間トレースを示している。

【図 1 0 C】図 1 0 C は、1 秒当たり 1 0、1、及び 0 . 1 の  $k_{off}$  値を区別できることを実証する確率的シミュレーションを示している。

【図 1 1 A】図 1 1 A は、単一フルオロフォアがイメージング表面に安定に取り付けられ ( 図 1 1 B ( 1 ) を参照 )、1 つの「スイッチング」事象当たり限られた数の光子が放出される従来の検出方法において、「補充可能な」イメージャー鎖からの全ての光子の抽出 ( 図 1 1 B ( 2 ) を参照 ) により、1 つのスイッチング事象当たりの局在化精度が高くなること ( 中央のパネル )、及び D N A メタフルオロフォア ( 図 1 1 B ( 3 ) 及び図 1 1 B ( 4 ) を参照 ) が、図 1 1 B ( 2 ) の単一フルオロフォアよりも 1 つのスイッチング事象当たりの光子の数が非常に多いこと ( 底部 ) を示している。

【図 1 1 B 1】図 1 1 B ( 1 ) ~ 図 1 1 B ( 3 ) は、現行のイメージング法及び本開示の



方法の概略図を示している。図 1 1 B ( 1 ) は、イメージング表面に安定に取り付けられたフルオロフォアを使用する従来の検出方法（例えば、S T O R M で使用される）を示している。

【図 1 1 B 2】図 1 1 B ( 2 ) は、イメージング表面に一時的に結合するフルオロフォアを用いる、本開示の検出方法の一実施形態を示している。

【図 1 1 B 3】図 1 1 B ( 3 ) は、コンパクトな DNA ナノ構造内の 8 つのフルオロフォアを含む明るいメタフルオロフォアを示している。

【図 1 1 B 4】図 1 1 B ( 4 ) は、表面に一時的に結合したときにのみ蛍光を発するフルオロフォア（星）及びクエンチャー（暗いドット）の両方で飾られた条件付きメタフルオロフォアを示している。

【図 1 1 C】図 1 1 C は、ドッキング部位が 2 0 n m の間隔で 4 × 3 の格子に配置された DNA 折り紙構造を示している。単一部位が、現在最も高い実証された解像度である約 3 n m の精度で光学的に局在化している [スケールバー：5 0 n m]。

【図 1 1 D】図 1 1 D は、超解像イメージングの試験プラットフォームとして使用される 7 又は 5 n m の間隔の 2 0 0 0 の一本鎖ドッキング鎖（ドット）を表示する 2 8 0 n m × 2 4 0 n m の DNA ナノ長方形（一本鎖タイル構造（1 5 ）、折り紙よりも 1 0 倍大きい領域）を示している [スケールバー：1 0 0 n m]。

【図 1 2 A】図 1 2 A ( i ) は、ドリフト補正の各段階の原理を示す概略図を例示している。各画像では、黒色マーカー及び線はソースデータを示し、濃淡値及び曲線は、計算上のドリフト補正を示している。図 1 2 A ( i i ) は、各段階で使用される主なタイプのドリフトマーカー（例えば、DNA ドリフトマーカー）の概略図を示している。

【図 1 2 B】図 1 2 B ( i ) は、各段階又は補正後のイメージングの品質を示す構造の一例を示し、図 1 2 B ( i i ) は、各段階での図 1 2 B ( i ) の対応する緑色長方形のズーム画像を示している。図 1 2 B ( i ) 及び図 1 2 B ( i i ) に示されているスケールバーは 5 0 n m に相当する。

【図 1 2 C】図 1 2 C ( i ) は、各段階の補正後のドリフトトレースの一例を示し、図 1 2 C ( i i ) は、各段階での図 1 2 C ( i ) の対応する長方形のズーム画像を示している。図 1 2 C ( i ) のスケールバーは、x : 5 0 0 n m、t : 5 0 0 秒に相当し、図 1 2 C ( i i ) のスケールバーは、x : 1 0 n m、t : 1 0 秒に相当する。

【図 1 3】図 1 3 は、一部の実施形態によるドリフト補正を行うためのプロセスを例示している。

【図 1 4】図 1 4 は、図 1 3 の段階 2 3 0 に対応するドリフト補正を行うためのプロセスを例示している。

【図 1 5】図 1 5 は、図 1 3 の段階 2 4 0 に対応するドリフト補正を行うためのプロセスを例示している。

【図 1 6】図 1 6 は、3 D ドリフト補正用の鋳型として使用される 3 D 4 面体を例示している。4 つの角は、ドッキング部位で標識されている。図 1 6 A は、4 つの角が明確に解像されていることを示している。図 1 6 B は、高さが約 8 5 n m の構造の X - Z 投影を例示している。

【図 1 7】図 1 7 は、本明細書に記載の本開示のいずれかの実施形態に関連して使用することができるコンピュータシステム 6 0 0 の例示的な一実施を示している。

【図 1 8 A】図 1 8 A ~ 図 1 8 C は、本開示の一部の実施形態によるドリフト補正のプロセスにおける段階の代替の表現を例示している。単一分子 DNA 折り紙ナノ構造上の 1 0 n m の間隔の規則的な格子の超解像度画像が示されている。DNA 折り紙構造は、垂直及び水平の両方向に 1 0 n m の間隔の 5 × 8 の正方形の格子となるように設計されていた。図 1 8 A は、十字形で表されている、収集されてフィルタリングされた局在化の散布図を示している。

【図 1 8 B】図 1 8 B は、上の構造のビンニングされた 2 D ヒストグラム図である。

【図 1 8 C】図 1 8 C は、図 1 8 A 及び図 1 8 B の長方形の全ての局在化の x 軸への投影による 1 D ヒストグラム、及び 8 つのガウス成分を用いた最小二乗フィッティングを示し

10

20

30

40

50

ている。フィッティングされたガウスピークは全て、 $1.5 \sim 2.4$  nmの範囲の標準偏差を有し、原理上は $3.5 \sim 5.6$  nmの解像度を可能にし；隣接するピーク間の間隔は $9.8 \sim 11.0$  nmの範囲であり、DNA折り紙設計に一致している。集合反応でのステープルの不完全な取り込みのために、少数（この場合は5）のスポットが、構造内で欠落しているが、超解像イメージング中には欠落していない。

【図19A】図19A及び図19Bは、RNAアプタマーがGFP様フルオロフォアの蛍光を調節することを示している。図19Aは、GFPに関連したHBI（緑色）及びDMHBIの構造を示している。

【図19B】図19Bは、13-2 RNAアプタマーが、蛍光発光に好ましい特定の分子配置を安定させることによるDMHBIの蛍光を促進することを示している。DMHBI、13-2 RNA、13-2 RNAを含むDMHBI、又は全HeLa細胞RNAを含むDMHBIを含む溶液を、 $365$  nmの光の照明下で撮影した。画像は、同一の画像取得条件下で得られたモンタージュである。（Paigeらによる画像、参考文献19）。

【図20A】図20A及び図20Bは、DFHBI結合キネティクスの単一分子蛍光の特徴付けを示している。図20Aは、ビオチン化DNA補足配列（赤色色素、例えば、Alexa647で標識された：カラーレンダリングは不図示）を用いてBSA/ビオチン被覆ガラス基板に固定された5'延長Spinach（緑色）を示している。

【図20B】図20Bは、アプタマーの追加の前（底部の線）及び後（上部の線）のSpinach-DFHBIのバルク蛍光測定を示し、DFHBI結合活性が、図20Aのガラス表面に固定するために必要なSpinachの延長部の追加の後にも十分に維持されることを示している。

【図21A】図21A及び図21Bは、ベンチマークのSpinach-PAINTの性能を示している。図21Aは、2つのSpinach分子を指定された位置に配置するために使用される6重螺旋DNA折り紙構造を示している。

【図21B】図21Bは、DNA構造（P）を局在化させるDNA-PAINT及びSpinach分子を3つの異なる距離に局在化させるSpinach-PAINTを用いた超解像再構成のシミュレーション表現を示している。

【図22】図22は、Spinachベースのセンサを示している。Spinachベースのセンサのアロステリック変異体（左）は、Spinachドメイン（黒色）、トランスデューサモジュール（灰色）、及び認識モジュール（明るい灰色）を含む。標的分子の非存在下では、トランスデューサモジュールが、主に構造化されていない状態であり、これにより、DFHBIの活性化に必要なSpinach構造の安定化が妨げられる。標的分子が結合すると、トランスデューサモジュールが二重鎖を形成し、Spinachモジュールの構造的な硬直化及びDFHBI蛍光の活性化がもたらされる（参考文献24）。

【図23A】図23Aは、in vitro及びin situ Exchange-PAINTチャンバの例を示している。

【図23B】図23Bは、in vitro及びin situ Exchange-PAINTチャンバの例を示している。

【発明を実施するための形態】

【0132】

発明の説明

本開示は、特に、核酸を使用するイメージングプローブ（例えば、DNAを使用するイメージングプローブ）を用いた、例えば、細胞環境での多重イメージングのための方法、組成物、及びキットを提供する。多重蛍光イメージングのための方法、組成物、及びキットは、得られる解像度の程度によって限定されるものではない。従って、本明細書に記載される方法、組成物、及びキットは、一般にイメージングに使用することができる。

【0133】

一部の態様では、本開示は、特に、核酸ベースのイメージングプローブ（例えば、DNAベースのイメージングプローブ）を使用する、例えば、細胞環境での多重超解像蛍光イメージングのための方法、組成物、及びキットをさらに提供する。本明細書で使用される

10

20

30

40

50

「超解像」イメージングとは、同じ領域の一連の低解像度画像を組み合わせにより高い解像度の単一画像を得るプロセスのことである。本開示の多くの態様を使用して、目的の標的（例えば、生体分子）を蛍光 ON 状態と蛍光 OFF 状態との間でスイッチングして、連続的な、又は場合によっては同時の、個々の標的の局在化を可能にすることができる。蛍光「ON」状態は、蛍光が発光されている状態である。蛍光「OFF」状態は、蛍光が発光されていない状態である。2つの状態間のスイッチングは、一部の実施形態では、検出可能な標識（例えば、蛍光分子）が標識された核酸分子で達成され、この核酸分子は、この検出可能な標識（例えば、蛍光分子）を含み、標的に結合する中間部分を用いて標的に一時的に相互作用する。本開示の方法、組成物、及びキットは、一部の態様では、目的の標的標的の検出、識別、及び定量に有用である。

10

#### 【0134】

本開示の結合パートナー - 核酸コンジュゲート（「BP - NAコンジュゲート」）は、相補的な、任意選択で蛍光標識される、標識イメージャー鎖と一時的に結合する。本明細書で使用される「結合パートナー - 核酸コンジュゲート」又は「BP - NAコンジュゲート」とは、一本鎖核酸（例えば、DNA）ドッキング鎖に（例えば、N - ヒドロキシスクシンイミド（NHS）リンカーを介して）連結された分子のことである。このコンジュゲートの結合パートナーは、目的の標的、例えば、生体分子（例えば、タンパク質又は核酸）に対して（例えば、結合する）親和性を有するあらゆる部分（例えば、抗体又はアプタマー）であり得る。一部の実施形態では、結合パートナーはタンパク質である。ドッキング鎖に連結されたタンパク質（又はペプチド）を含む BP - NA - コンジュゲートは、本明細書では、「タンパク質 - 核酸コンジュゲート」又は「タンパク質 - NAコンジュゲート」と呼ぶこともある。本開示のコンジュゲートに使用されるタンパク質の例として、限定されるものではないが、抗体（例えば、モノクローナルモノボディー）、抗原 - 結合抗体断片（例えば、Fab断片）、受容体、ペプチド、及びペプチドアプタマーが挙げられる。他の結合パートナーは、本開示に従って使用することができる。本明細書では、例えば、静電（例えば、静電粒子）相互作用、疎水性相互作用、又は磁気（例えば、磁気粒子）相互作用によって標的に結合する結合パートナーが考えられる。

20

#### 【0135】

本明細書で使用される「抗体」には、完全長抗体、及びその任意の抗原結合断片（例えば、「抗原 - 結合部分」）又は一本鎖が含まれる。「抗体」という語には、限定されるものではないが、ジスルフィド結合によって相互に連結された少なくとも2つの重（H）鎖及び2つの軽（L）鎖又はその抗原結合部分を含む糖タンパク質が含まれる。抗体は、ポリクローナル若しくはモノクローナル；異種、同種、若しくは同系；又はその修飾形態（例えば、ヒト化キメラ）であり得る。

30

#### 【0136】

本明細書で使用される抗体の「抗原 - 結合部分」とは、抗原に特異的に結合する能力を保持した抗体の1つ以上の断片のことである。抗体の抗原 - 結合機能は、完全長抗体の断片によって果たされ得る。抗体の「抗原 - 結合部分」という語の範囲に含まれる結合断片の例として、(i) Fab断片、即ちV<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、C<sub>L</sub>、及びC<sub>H1</sub>ドメインからなる一価断片；(ii) F(ab')<sub>2</sub>断片、即ちヒンジ領域のジスルフィドブリッジによって結合された2つのFab断片を含む二価断片；(iii) V<sub>H</sub>及びC<sub>H1</sub>ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の1つの腕のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインからなるFv断片、(v) V<sub>H</sub>ドメインからなるdAb断片（Ward et al., Nature 341:544-546, 1989）；及び(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）又は(vii) 任意選択で同系リンカーによって接続され得る、2つ以上の単離されたCDRの組み合わせが挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>は、別の遺伝子によってコードされるが、これらは、V<sub>H</sub>領域とV<sub>L</sub>領域とが対合して一価分子を形成する1本のタンパク質鎖（一本鎖Fv（scFv））として知られる；例えば、Bird et al. Science 242:423-426, 1988；及びHuston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988を参照されたい）としてこれらを形成することを可能にする同系リンカーによって、組換え法を用いて結合す

40

50

ることができる。このような一本鎖抗体もまた、抗体の「抗原 - 結合部分」という語の範囲に含まれる。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術によって得られ、このような断片は、無傷の抗体と同じ方式で有用性についてスクリーニングされる。

【 0 1 3 7 】

本明細書で使用される「受容体」とは、リガンド、例えば、ペプチド又は小分子（例えば、低分子量（＜ 9 0 0 ダルトン）の有機又は無機化合物）などに結合する細胞由来分子（例えば、タンパク質）のことである。

【 0 1 3 8 】

本明細書で使用される「ペプチドアプタマー」とは、定常足場タンパク質に挿入された可変ペプチド配列を有する分子のことである（例えば、Baines IC, et al. Drug Discov. Today 11:334-341, 2006を参照されたい）。

10

【 0 1 3 9 】

一部の実施形態では、B P - N A コンジュゲートの分子は、核酸、例えば、核酸アプタマーなどである。本明細書で使用される「核酸アプタマー」とは、タンパク質又は他の細胞標的を特異的に結合することができる二次構造及び三次構造を形成することができる小さいR N A 分子又はD N A 分子のことである（例えば、Ni X, et al. Curr Med Chem. 18 (27): 4206-4214, 2011を参照されたい）。従って、一部の実施形態では、B P - N A コンジュゲートは、アプタマー - 核酸コンジュゲートであり得る。

【 0 1 4 0 】

本明細書で使用される「ドッキング鎖」とは、約 5 ヌクレオチド ~ 約 5 0 ヌクレオチドの長さである（又は 5 ヌクレオチド ~ 5 0 ヌクレオチドの長さである）一本鎖核酸（例えば、D N A ）のことである。一部の実施形態では、ドッキング鎖は、約 4 ~ 約 6 0、約 6 ヌクレオチド ~ 約 4 0 ヌクレオチド、約 7 ヌクレオチド ~ 約 3 0 ヌクレオチド、約 8 ~ 約 2 0 ヌクレオチド、又は約 9 ヌクレオチド ~ 約 1 5 ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、ドッキング鎖は、（又は約）4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、又はそれを超えるヌクレオチドの長さである。

20

30

【 0 1 4 1 】

ドッキング鎖は、1つのドメイン又は2つ以上のドメイン（即ち、複数のドメイン）を有することができる、各ドメインは、それぞれのイメージャー鎖に相補的である。本明細書で使用される「ドッキング鎖ドメイン」とは、イメージャー鎖のヌクレオチド配列に相補的であるドッキング鎖のヌクレオチド配列のことである。ドッキング鎖は、例えば、1つ、2つ、3つ、又はそれを超えるドメインを含むことができ、各ドメインは、イメージャー鎖に相補的である。それぞれの相補的なイメージャー鎖は、異なる標識（例えば、赤色蛍光、青色蛍光、又は緑色蛍光）を含んでも良く、又は全ての相補的なイメージャー鎖が、同じ標識（例えば、赤色蛍光）を含んでも良い。例えば、3ドメインドッキング鎖では、このドッキング鎖は、赤色蛍光で標識されたイメージャー鎖に相補的な第1のドメイン、青色蛍光で標識されたイメージャー鎖に相補的な第2のドメイン、及び緑色蛍光で標識されたイメージャー鎖に相補的な第3のドメインを含み得る。あるいは、3つのドッキングドメインのそれぞれは、赤色蛍光で標識されたイメージャー鎖に相補的であっても良い。一部の実施形態では、ドッキング鎖は、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又はそれを超えるドメインを有し、それぞれは、イメージャー鎖にそれぞれ相補的である。一部の実施形態では、ドッキング鎖は、1 ~ 5、1 ~ 10、1 ~ 15、1 ~ 20、1 ~ 25、1 ~ 50、又は1 ~ 100のドメインを有し、それぞれは、イメージャー鎖にそれぞれ相補的である。

40

【 0 1 4 2 】

本明細書で使用される「イメージャー鎖」とは、約 4 ~ 約 3 0 ヌクレオチド、約 5 ~ 約

50

18ヌクレオチド、約6～約15ヌクレオチド、約7～約12ヌクレオチド、又は約8～10ヌクレオチドの長さであり、かつ蛍光標識されている一本鎖核酸（例えば、DNA）のことである。一部の実施形態では、イメージャー鎖は、（又は約）4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、若しくは30のヌクレオチドの長さであり得る。本開示のイメージャー鎖は、ドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する。2つの核酸又は核酸ドメインは、互いに塩基対を形成する、又は互いに結合してワトソン-クリック相互作用によって二本鎖核酸分子を形成する場合は、互いに「相補的」である。本明細書で使用される「結合」とは、例えば、生理学的条件下で静電相互作用、疎水性相互作用、イオン相互作用、及び／又は水素結合相互作用による少なくとも2つの分子間の会合のことである。イメージャー鎖は、例えば、室温で、ドッキング鎖の相補的な領域に結合して短時間のうちにこのドッキング鎖から解離する場合、ドッキング鎖に一時的に結合すると見なされる。一部の実施形態では、イメージャー鎖は、約0.1～約10又は約0.1～約5秒間、ドッキング鎖との結合を維持する。例えば、イメージャー鎖は、約0.1、約1、約5、又は約10秒間、ドッキング鎖との結合を維持し得る。

10

#### 【0143】

本開示のイメージャー鎖は、検出可能な標識で標識することができる（例えば、蛍光標識、従って「蛍光標識された」と見なされる）。例えば、一部の実施形態では、イメージャー鎖は、少なくとも1つ（即ち、1つ以上）のフルオロフォアを含み得る。本開示に従って使用されるフルオロフォアの例として、限定されるものではないが、キサンテン誘導体（例えば、フルオレセイン、ローダミン、オレゴングリーン、エオシン、及びテキサスレッド）、シアニン誘導体（例えば、シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニン、及びメロシアニン）、ナフタレン誘導体（例えば、ダンシル及びプロダン誘導体）、クマリン誘導体、オキサジアゾール誘導体（例えば、ピリジルオキサゾール、ニトロベンズオキサジアゾール、及びベンゾオキサジアゾール）、ピレン誘導体（例えば、カスケードブルー）、オキサジン誘導体（例えば、ナイルレッド、ナイルブルー、クレシルバイオレット、及びオキサジン170）、アクリジン誘導体（例えば、プロフラビン、アクリジンオレンジ、及びアクリジンイエロー）、アリアルメチン誘導体（arylmethine derivative）（例えば、オーラミン、クリスタルバイオレット、及びマラカイトグリーン）、及びテトラピロール誘導体（例えば、ポルフィン、フタロシアニン、及びビリルピン）が挙げられる。他の検出可能な標識、例えば、金ナノ粒子又は他の検出可能な粒子若しくは部分などを、本開示に従って使用することができる。

20

30

#### 【0144】

本明細書に使用される「スペクトルの異なる」分子（例えば、コンジュゲート及び／又はイメージャー鎖）とは、異なるスペクトル信号又は波長の標識（例えば、フルオロフォア）を有する分子のことである。例えば、Cy2フルオロフォアで標識されたイメージャー鎖は、約510nmの光の波長で信号を放射するが、Cy5フルオロフォアで標識されたイメージャー鎖は、約670nmの光の波長で信号を放射する。従って、Cy2標識されたイメージャー鎖は、本明細書では、Cy5標識イメージャー鎖とはスペクトルが異なると見なされる。逆に、本明細書の本開示の「スペクトルが異なる」分子とは、同じスペクトル信号又は波長を有する標識を含む分子のことである。即ち、標識の放射波長は、（例えば、波長が互いに同じか又は近いため）2つのスペクトルが異なる蛍光標識分子を区別することができない。

40

#### 【0145】

本開示のBP-NAコンジュゲート（例えば、タンパク質-核酸コンジュゲート）は、一部の実施形態では、（例えば、共有結合又は非共有結合で）分子をドッキング鎖に連結する介在リンカーを含み得る。介在リンカーは、ビオチン及び／又はストレプトアビジンを含み得る。例えば、一部の実施形態では、抗体及びドッキング鎖はそれぞれ、図2に示されているように、ビオチン化され（即ち、少なくとも1つのビオチン分子に結合され）

50

、介在ストレプトアビジン分子へのビオチンの結合によって互いに連結され得る。他の介在リンカーも、本開示に従って使用することができる。一部の実施形態では、例えば、分子が核酸である場合は、介在リンカーが必要ないであろう。例えば、BP-NAコンジュゲートのドッキング鎖は、核酸分子、例えば、核酸アプタマーなどの延長部（例えば、5'又は3'延長部）であり得る。

#### 【0146】

複数のBP-NAコンジュゲート（例えば、後タンパク質-核酸コンジュゲート）及びイメージャー鎖が本明細書に記載される。複数とは、同じ種又は異なる種の集団であり得る。同じ種の複数のBP-NAコンジュゲートは、全て同じ標的（例えば、生体分子）（例えば、同じエピトープ又は領域/ドメイン）に結合するコンジュゲートを含み得る。逆に、異なる種の複数のBP-NAコンジュゲートは、コンジュゲート又はコンジュゲートのサブセットを含み得、コンジュゲート又はコンジュゲートのサブセットはそれぞれ、同じ標的又は異なる標的の異なるエピトープに結合する。同じ種の複数のイメージャー鎖は、同じヌクレオチド配列及び同じ蛍光標識（例えば、Cy2、Cy3、又はCy4）を有するイメージャー鎖を含み得る。逆に、異なる種の複数のイメージャー鎖は、異なるヌクレオチド配列（例えば、DNA配列）及び異なる蛍光標識（例えば、Cy2、Cy3、又はCy4）又は異なるヌクレオチド配列及び同じ蛍光（例えば、全てCy2）を有するイメージャー鎖を含み得る。所与の複数のBP-NAコンジュゲートの異なる種の数、結合パートナー（例えば、抗体）の数及び異なるヌクレオチド配列のドッキング鎖（従って、相補的なイメージャー鎖）の数によって限定される。一部の実施形態では複数のBP-NAコンジュゲート（例えば、タンパク質-核酸コンジュゲート）は、少なくとも10、50、100、500、1000、2000、3000、4000、5000、 $10^4$ 、50000、 $10^5$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ のBP-NAコンジュゲートを含む。同様に、一部の実施形態では、複数の蛍光標識イメージャー鎖は、少なくとも10、50、100、500、1000、2000、3000、4000、5000、 $10^4$ 、50000、 $10^5$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ の蛍光標識イメージャー鎖を含む。一部の実施形態では複数

は、1～約200又はそれを超える異なる種のBP-NAコンジュゲート及び/又はイメージャー鎖を含み得る。例えば、複数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200又はそれを超える異なる種を含み得る。一部の実施形態では複数は、約5未満～約200未満の異なる種のBP-NAコンジュゲート及び/又はイメージャー鎖を含み得る。例えば、複数は、5未満、6未満、7未満、8未満、9未満、10未満、15未満、20未満、25未満、30未満、35未満、40未満、45未満、50未満、55未満、60未満、65未満、70未満、75未満、80未満、85未満、90未満、95未満、100未満、125未満、150未満、175未満、又は200未満の異なる種を含み得る。

#### 【0147】

本開示は、標的に直接結合することができるドッキング鎖も企図し得る。例えば、図8Aに示されているように、ドッキング鎖は、イメージャー-結合ドメイン（例えば、同じ又は異なるフルオロフォアを有する1つ、2つ、3つ、又はそれを超える）に加えて、標的、例えば、mRNA若しくは他の核酸に相補的であり、これに結合する標的ドメインを含み得る。

#### 【0148】

##### 方法

本明細書に記載される方法は、核酸ドッキング鎖及びイメージャー鎖がプログラム可能であることに部分的に基づいている。即ち、例えば、ドッキング鎖及びイメージャー鎖は、特定の条件下で特定の時間互いに結合するように設計することができる。このプログラム可能であることは、本明細書に記載されるように、イメージャー鎖のドッキング鎖への一時的な結合を可能にする。一般に、本明細書に記載される方法は、特定のサンプル（例

えば、生体サンプル)中で1つ以上の標的(例えば、タンパク質又は核酸のような生体分子)を特定することに関する。場合によっては、1つ以上の標的がサンプル中に存在するか否かは未知である。従って、本開示の方法は、標的を含む疑いのあるサンプル中の1つ以上の標的の存在又は非存在を決定するために使用することができる。本明細書に記載される態様及び実施形態のいずれか1つでは、サンプルは、1つ以上の標的を含み得るか、又は含む疑いがあり得る。

#### 【0149】

本明細書に記載される方法はまた、1つの標的(例えば、特定のタンパク質など)の絶対量、又は1つの標的の1つ以上の他の標的に対する量を特定するために使用することもできる。

#### 【0150】

さらに、本明細書に記載される方法は、標的のサンプル内での位置、又はサンプル内での他の標的に対する標的の位置を特定するために使用することができる。

#### 【0151】

本明細書に記載される方法は、一部の実施形態では、サンプルを(a)ドッキング鎖に連結された結合パートナーを含む少なくとも1つのBP-NAコンジュゲート(例えば、タンパク質-核酸コンジュゲート)及び(b)この少なくとも1つのBP-NAコンジュゲートのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する少なくとも1つの、任意選択で蛍光標識される、標識イメージャー鎖に接触させるステップ、及び続いて、この少なくとも1つのBP-NAコンジュゲートがサンプル中の少なくとも1つの標的(例えば、生体分子標的)に結合するか否かを決定するステップを含み得る。一部の実施形態では、この決定するステップは、少なくとも1つの標識された(任意選択で蛍光標識される)イメージャー鎖の少なくとも1つのBP-NAコンジュゲートのドッキング鎖への一時的な結合を(例えば、タイムラプス蛍光顕微鏡技術を用いて)画像化するステップを含む。

#### 【0152】

本明細書に記載される他の方法は、一部の実施形態では、サンプルを(a)それぞれドッキング鎖に連結された結合パートナーを含む少なくとも2つのBP-NAコンジュゲート及び(b)この少なくとも2つの異なるBP-NAコンジュゲートのそれぞれのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する、任意選択でスペクトルが異なり蛍光標識される、少なくとも2つの標識イメージャー鎖に接触させるステップ、及び続いて、この少なくとも2つのBP-NAコンジュゲートがサンプル中の少なくとも1つ、又は少なくとも2つの標的(例えば、生体分子標的)に結合するか否かを決定するステップを含み得る。BP-NAコンジュゲートのそれぞれの標的への結合は、任意選択でスペクトルが異なり蛍光標識される、少なくとも2つの標識イメージャー鎖のうちの1つの、少なくとも2つのBP-NAコンジュゲートのうちの1つのドッキング鎖への一時的な結合をイメージングして第1の画像を形成するステップ、及び続いて、任意選択でスペクトルが異なり蛍光標識される、少なくとも2つの標識イメージャー鎖のうちの別の、少なくとも2つのBP-NAコンジュゲートのうちの別のドッキング鎖への一時的な結合をイメージングして第2の画像を形成するステップによって決定することができる。一部の実施形態では、この方法は、第1の画像と第2の画像を組み合わせる信号(例えば、蛍光信号)の合成画像を形成するステップをさらに含み、複合画像の信号(例えば、蛍光信号)が、少なくとも2つの標的を表している。本明細書で使用する「合成画像」とは、同じ(又は実質的に同様の)領域の複数の画像を組み合わせる(例えば、オーバーレイする)ことによって形成される1つの画像のことである。合成画像はまた、本明細書の他の部分に記載されているように、超解像度画像とも呼ばれることもある。

#### 【0153】

図3は、固定HeLa細胞サンプル中の生体分子を標識するために2つの異なる種のBP-NAコンジュゲート(例えば、抗体-核酸コンジュゲート)が使用される本開示の実施形態を示している。1つの種の抗体-核酸コンジュゲートは、ミトコンドリアのエピ

10

20

30

40

50

トープを認識してこれに結合する抗体を含む。ミトコンドリア特異的抗体は、C y 3 b 標識イメージャー鎖に相補的な配列を有するドッキング鎖に連結される。他の種の抗体 - 核酸コンジュゲートは、微小管のエピトープを認識してこれに結合する抗体を含む。微小管特異的抗体は、A T T O 6 5 5 標識イメージャー鎖に相補的な配列を有するドッキング鎖に連結される。次いで、2つのスペクトルの異なる種のイメージャー鎖が同時に導入される：一方の種は、C y 3 b で標識され、かつミトコンドリア特異的抗体に連結されたドッキング鎖に相補的であり、他方の種は、A T T O 6 5 5 で標識されかつ微小管特異的抗体に連結されたドッキング鎖に相補的である。C y 3 b 標識イメージャー鎖とA T T O 6 5 5 標識イメージャー鎖との両方が、サンプルを含む溶液中に同時に存在する間に、イメージングが、C y 3 b チャネル及びA T T O 6 5 5 チャネルで連続的に行われる。

10

#### 【 0 1 5 4 】

本明細書に提供されるなお他の方法は、一部の実施形態では、サンプルを ( a ) それぞれドッキング鎖に連結されたタンパク質を含む少なくとも2つのB P - N A コンジュゲート及び ( b ) この少なくとも2つのB P - N A コンジュゲートのそれぞれのドッキング鎖に相補的であり、かつこのドッキング鎖に一時的に結合する少なくとも2つのスペクトルの異なる (例えば、同じフルオロフォアで標識された) 蛍光標識されたイメージャー鎖に接触させるステップ、及び続いて、この少なくとも2つのB P - N A コンジュゲートがサンプル中の少なくとも2つの標的 (例えば、生体分子標的) に結合するか否かを決定するステップを含み得る。一部の実施形態では、この方法は、次の順序で、サンプルを第1のB P - N A コンジュゲート及び少なくとも1つの他のB P - N A コンジュゲートに接触させるステップ、サンプルを、第1のB P - N A コンジュゲートのドッキング鎖に相補的で、このドッキング鎖に一時的に結合する第1の蛍光標識イメージャー鎖に接触させるステップ、第1のB P - N A コンジュゲートが第1の標的に結合するか否かを決定するステップ、第1の蛍光標識イメージャー鎖を除去するステップ、サンプルを、少なくとも1つの他のB P - N A コンジュゲートのドッキング鎖に相補的で、このドッキング鎖に一時的に結合する少なくとも1つの他の蛍光標識イメージャー鎖に接触させるステップ、及び少なくとも1つの他のB P - N A コンジュゲートが少なくとも1つの他の標的に結合するか否かを決定するステップを含む。

20

#### 【 0 1 5 5 】

あるいは、他の実施形態では、方法は、次の順序で、サンプルを第1のB P - N A コンジュゲートに接触させるステップ、サンプルを、第1のB P - N A コンジュゲートのドッキング鎖に相補的で、このドッキング鎖に一時的に結合する第1の蛍光標識イメージャー鎖に接触させるステップ、第1のB P - N A コンジュゲートが第1の標的 (例えば、生体分子) に結合するか否かを決定するステップ、第1の蛍光標識イメージャー鎖を除去するステップ、サンプルを、少なくとも1つの他のB P - N A コンジュゲートに接触させるステップ、サンプルを、少なくとも1つの他のB P - N A コンジュゲートのドッキング鎖に相補的で、このドッキング鎖に一時的に結合する少なくとも1つの他の蛍光標識イメージャー鎖に接触させるステップ、及び少なくとも1つの他のB P - N A コンジュゲートが少なくとも1つの他の標的に結合するか否かを決定するステップを含む。

30

#### 【 0 1 5 6 】

一部の実施形態では、第1の決定するステップは、第1の蛍光標識イメージャー鎖の、第1のB P - N A コンジュゲートのドッキング鎖への一時的な結合をイメージングして第1の画像を形成するステップを含み、第2の決定するステップは、少なくとも1つの他の蛍光標識イメージャー鎖の、少なくとも1つの他のB P - N A コンジュゲートのドッキング鎖への一時的な結合をイメージングして第2の画像を形成するステップを含む。一部の実施形態では、この方法は、第1の画像の蛍光信号に疑似カラーを割り当てるステップ、及び第2の画像の蛍光信号に少なくとも1つの他の疑似カラーを割り当てるステップをさらに含む。なおさらに、一部の実施形態では、この方法は、第1の画像と第2の画像とを組み合わせると疑似カラー信号の合成画像を形成するステップを含み、この合成画像の疑似カラー信号が、少なくとも2つの標的 (例えば、生体分子標的) を表している。図4 Aに

40

50



例示されているように、ステップ[ 1 ]で、3つの異なる種のドッキング鎖( a、b、c )が、( 例示目的のために選択された )格子の表面を標識する。ステップ[ 2 ]で、イメージャー鎖 a \* の複数のコピーが導入され、ドッキング鎖 a で標識された点が画像化される。ステップ[ 3 ]で、イメージャー鎖 a \* のコピーが洗い流され、イメージャー鎖 b \* が導入されて b 標識された点が画像化される。ステップ[ 4 ]で、c 標識された点が、同じ要領で画像化される。ステップ[ 5 ]で、ステップ[ 2 ~ 4 ]の画像に、( 例えば、ソフトウェアプログラムを用いて )人工の疑似カラーが割り当てられ、組み合わせられて最終的な合成画像が形成される。全てのイメージャー鎖を同じフルオロフォアで標識することができる - 即ち、イメージャー鎖はスペクトルが異なっていない。一部の実施形態では、ドッキング鎖は、結合パートナー( 例えば、タンパク質、例えば、抗体、又は核酸、例えば、DNA 若しくは核酸アプタマー )に連結される。

10

#### 【 0 1 5 7 】

本開示の方法の利点は、区分け及び連続的なイメージングを用いて、唯一つの最適化蛍光色素で最大数百もの異なる種の多数超解像度画像を得ることができることである。これらの方法を用いると、異なるヌクレオチド配列( 例えば、DNA 配列 )の数が、スペクトルの異なる色素の数とは異なり、多重能力を制限する。本開示の一部の方法、例えば、9ヌクレオチドの長さのイメージャー鎖を使用する方法では、単一のサンプルに使用することができる数百の種が、結合キネティクスのためにタイトな境界内に存在し、直接的な「従来の」イメージング方式と比較して、多重化の大幅な増加を表している。

#### 【 0 1 5 8 】

20

図 5 A は、スペクトルの異なるイメージャー鎖を用いる本明細書に開示の別の実施形態を例示している。1つのDNA ナノ構造が、それぞれ数字の 0 ~ 3 に類似するように設計された( 任意選択で、タンパク質結合パートナー又は核酸結合パートナーに連結される )4つの異なる種のドッキング鎖を表示している。イメージングは、単純な流動チャンバの構成を用いて連続的に行われ、数字の 0 のドッキング鎖に相補的な蛍光標識イメージャー鎖で最初のフラッシュが行われ、次いで、蛍光標識イメージャー鎖の溶液を、数字の 1 のドッキング鎖に相補的な配列の溶液と交換し、他の数字でもこのステップを続ける。得られた画像に、それぞれのイメージングサイクルを表すように疑似カラーを付ける。本明細書で使用される「イメージングサイクル」又は「イメージングラウンド」とは、ドッキング鎖に相補的な蛍光標識イメージャー鎖を、たとえ一時的であったとしてもこのイメージャー鎖のドッキング鎖への結合を可能にする条件下で導入し、画像を得る( 又は領域をイメージングする )プロセスのことである。

30

#### 【 0 1 5 9 】

本開示の態様は、上記のように、複数のドメインのドッキング鎖( 例えば、2つ以上のドメインを含むドッキング鎖 )を用いる多重検出も企図する。例示目的として、以下の実施形態は、例えば、介在結合パートナーなしで標的に結合するドッキング鎖について説明される。しかしながら、複数のドメインのドッキング鎖は、本明細書に記載されるように、( 例えば、BP - NA コンジュゲートの )結合パートナーに連結され得ることを理解されたい。

#### 【 0 1 6 0 】

40

一部の実施形態では、方法は、1つ以上の標的を、それぞれ2つ以上の結合ドメインを含む1つ以上のドッキング鎖に接触させるステップを含む。他の実施形態では、方法は、1つ以上の標的を、それぞれ1つの結合ドメインを含む2つ以上のドッキング鎖に接触させるステップを含む。ドッキング鎖のドメインは、直交配列を有し得る。以下の実施例では、3つ全ての標的( タンパク質 # 1 ~ # 3 )がサンプル中に存在する。

#### 【 0 1 6 1 】

スペクトル解像に基づいた検出。例示的な多重標的検出法は次の通りである。サンプルは、3つの標的種 - タンパク質 # 1、タンパク質 # 2、及びタンパク質 # 3 を含むか、又は含む疑いがある。3つのドッキング鎖は：第1のドッキング鎖が、イメージャー結合ドメイン A を含み、タンパク質 # 1 に結合し；第2のドッキング鎖が、イメージャー結

50

合ドメイン B を含み、タンパク質 # 2 に結合し；第 3 のドッキング鎖が、イメージャー結合ドメイン A 及び B を含み、タンパク質 # 3 に結合する、ように設計されている。相補的なイメージャー鎖 A' は、ドッキング鎖のイメージャー結合ドメイン A に結合し、かつ青色フルオロフォアで標識され、イメージャー鎖 B' は、ドッキング鎖のイメージャー結合ドメイン B に結合し、かつ赤色フルオロフォアで標識される。サンプルは、まずドッキング鎖に接触され、続いて、イメージャー鎖 A' 及び B' に接触される。次いで、サンプルは画像化される。ドッキング鎖及びイメージャー鎖を含むサンプルは、青色フルオロフォアを検出する条件下で最初に画像化される。青色フルオロフォアの画像化により、それぞれ青色フルオロフォアで標識されたイメージャー鎖によって結合されたタンパク質 # 1 及びタンパク質 # 3 を検出する。赤色フルオロフォアの画像化により、それぞれ赤色フルオロフォアで標識されたイメージャー鎖によって結合されたタンパク質 # 2 及びタンパク質 # 3 を検出する。赤色フルオロフォアの画像と青色フルオロフォアの画像との重ね合わせにより、赤色フルオロフォアで標識されたイメージャー鎖及び青色フルオロフォアで標識されたイメージャー鎖によって結合されたタンパク質 # 3 のみを検出する。従って、タンパク質 # 1 ~ # 3 の識別及び位置が、それぞれ赤色フルオロフォア及び青色フルオロフォアを検出する画像のオーバーレイによって特定される。

#### 【 0 1 6 2 】

イメージャー鎖の交換に基づいた検出。別の例示的な多重標的検出法は次の通りである：サンプルは、3 つの標的種 - タンパク質 # 1、タンパク質 # 2、及びタンパク質 # 3 を含むか、又は含む疑いがある。3 つのドッキング鎖は：第 1 のドッキング鎖が、イメージャー結合ドメイン A を含み、タンパク質 # 1 に結合し；第 2 のドッキング鎖が、イメージャー結合ドメイン B を含み、タンパク質 # 2 に結合し；第 3 のドッキング鎖が、イメージャー結合ドメイン A 及び B を含み、タンパク質 # 3 に結合する、ように設計されている。相補的なイメージャー鎖 A' は、ドッキング鎖のイメージャー結合ドメイン A に結合し、青色フルオロフォアで標識され、イメージャー鎖 B' は、ドッキング鎖のイメージャー結合ドメイン B に結合し、同様に青色フルオロフォアで標識される。サンプルは、まずドッキング鎖に接触され、続いて、イメージャー鎖 A' に接触される。次いで、サンプルは、青色フルオロフォアを検出する条件下で画像化される。青色フルオロフォアの画像化により、青色フルオロフォアで標識されたイメージャー鎖 A' によってそれぞれ結合されたタンパク質 # 1 及びタンパク質 # 3 を検出する。次いで、サンプルは、イメージャー鎖 A' を除去するために洗浄される。次に、サンプルは、イメージャー鎖 B' に接触される。次いで、サンプルは、青色フルオロフォアを検出する条件下で再び画像化される。ここで、青色フルオロフォアの画像化により、青色フルオロフォアで標識されたイメージャー鎖 B' によってそれぞれ結合されたタンパク質 # 2 及びタンパク質 # 3 を検出する。（例えば、重ね合わせられていないフルオロフォアと比較して強い信号になる）青色フルオロフォアの画像の重ね合わせにより、青色フルオロフォアで標識された 2 つのイメージャー鎖によって結合されたタンパク質 # 3 のみを検出する。従って、タンパク質 # 1 ~ # 3 の識別及び位置が、青色フルオロフォアを検出する画像のオーバーレイによって特定され、信号強度に基づいている。

#### 【 0 1 6 3 】

スペクトル検出と交換検出の組み合わせに基づいた検出。なお別の例示的な多重標的検出法は次の通りである：サンプルは、15 の標的種を含む、又は含む疑いがある。ドッキング鎖は、各標的種がドッキング鎖に結合するように設計され、各ドッキング鎖は、ドメイン A ~ D の単一の異なるドメイン又は異なる組み合わせ（例えば、A、又は A 及び B（即ち、A / B）、又は A / C、又は A / D、又は A / B / C、又は A / B / D、又は A / C / D、又は A / B / C / D、又は B、又は B / C、又は B / D、又は B / C / D、又は C、又は C / D、又は D）を含む。イメージャー鎖は、2 つのセットに分割され：第 1 のセット（セット # 1）は、赤色フルオロフォアによって標識されたイメージャー鎖 A' 及び青色フルオロフォアで標識されたイメージャー鎖 B' を含み；第 2 のセットは、赤色フルオロフォアで標識されたイメージャー鎖 C' 及び青色フルオロフォアで標識されたイメ

ージャー鎖D'を含む。サンプルは、最初にドッキング鎖に接触され、続いて、イメージャー鎖セット#1に接触される。次いで、サンプルは、青色フルオロフォア及び赤色フルオロフォアを検出する条件下で画像化される。イメージャー鎖A'によって結合された標的は赤色で検出され、イメージャー鎖B'によって結合された標的は青色で検出される。従って、ドッキングドメインA及びBを含む全ての標的種は、最初の画像又は最初の画像のセットで検出される。次いで、サンプルが洗浄されて、イメージャー鎖セット#1が除去される。次に、サンプルは、イメージャー鎖セット#2に接触される。次いで、サンプルは、青色フルオロフォア及び赤色フルオロフォアを検出する条件下で再び画像化される。イメージャー鎖C'によって結合された標的は、赤色で検出され、イメージャー鎖D'によって結合された標的は、青色で検出される。従って、ドッキングドメインC及びDを含む全ての標的種は、第2の画像又は第2の画像のセットで検出される。収集された全ての画像を組み合わせることにより、15の標的種のそれぞれを、僅か4つのイメージャー鎖及び2つのフルオロフォアを用いて特定することができる。例えば、標的の数によっては、5つ以上のイメージャー鎖及び3つ以上のフルオロフォアを使用できることを理解されたい。

10

#### 【0164】

一時的な結合の期間に基づいた検出。一部の実施形態では、本開示は、標的種を、異なるドッキング鎖のドメイン配列及び異なる長さのそれらの配列に接触させることも企図する。ドッキング鎖のイメージャー結合ドメインの長さは、イメージャー鎖への一時的な結合の時間に影響を及ぼす。長い結合ドメインを有するドッキング鎖はそれぞれ、短い結合ドメインと比較してより長い時間、相補的なイメージャー鎖に結合する。以下の例示的な実施形態では、サンプルは、4つの標的種を含むか、又は含む疑いがある。4つのドッキング鎖は：第1のドッキング鎖が、10ヌクレオチドの長さの結合ドメインA(A10)を含み、タンパク質#1に結合し；第2のドッキング鎖が、イメージャー結合ドメインA10及び8ヌクレオチドの長さのイメージャー結合ドメインB(B8)を含み、タンパク質#2に結合し；第3のドッキング鎖が、8ヌクレオチドの長さのイメージャー結合ドメインA(A8)及び10ヌクレオチドの長さのイメージャー結合ドメインB(B10)を含み、タンパク質#3に結合し；第4のドッキング鎖が、イメージャー鎖結合ドメインB10を含む、ように設計されている。イメージャー鎖A'は、10ヌクレオチドの長さであり、A8及びA10の両方に結合し、かつ青色フルオロフォアで標識される。イメージャー鎖B'は、10ヌクレオチドの長さであり、B8及びB10の両方に結合し、かつ赤色フルオロフォアで標識される。サンプルは、まずドッキング鎖に接触され、続いて、イメージャー鎖A'及びB'に接触される。次いで、サンプルは、青色フルオロフォアを検出する条件下で画像化される。青色フルオロフォアの画像化により、結合時間(即ち、イメージャー鎖とドッキング鎖との間の結合時間)の長いタンパク質#3及びタンパク質#4、並びに結合時間の短いタンパク質#2を検出する。赤色フルオロフォアの画像化により、結合時間の長いタンパク質#1及びタンパク質#2、並びに結合時間の短いタンパク質#3を検出する。青色フルオロフォアの画像と赤色フルオロフォアの画像との重ね合わせにより、4つのタンパク質標的のそれぞれを検出する。

20

30

#### 【0165】

本開示はまた、スペクトル解像及び期間に基づいた多重検出、交換及び期間に基づいた多重検出、並びにスペクトル解像、交換、及び期間に基づいた多重検出を組み合わせることも企図する。

40

#### 【0166】

「サンプル」は、複数の細胞(若しくは1つの細胞)、組織、又は体液、例えば、血液(血清及び/又は血漿)、尿、精液、リンパ液、脳脊髄液、又は羊水を含み得る。サンプルは、限定されるものではないが、ヒト、動物、細菌、ウイルス、微生物、及び植物を含むあらゆる供給源から得られ(又は由来し)得る。一部の実施形態では、サンプルは、細胞溶解物又は組織溶解物である。サンプルは、1つの供給源又は異なる供給源からの材料の混合物も含み得る。サンプルは、空間的領域又は体積(例えば、アレイの格子、又はプ

50

レート若しくは皿のウェル)であり得る。サンプルは、一実施形態では、標的、B P - N Aコンジュゲート、及びイメージャー鎖を含む。

【0167】

「標的」は、観察又は定量が求められ、かつ結合パートナーが存在する任意の部分である。標的は、一実施形態では、天然でなくても良い。標的は、一実施形態では、生体分子でも良い。本明細書で使用される「生体分子」は、大きい巨大分子、例えば、タンパク質、多糖、脂質、及び核酸(例えば、DNA及びRNA、例えば、mRNA)、並びに小さい分子、例えば、一次代謝産物、二次代謝産物、及び天然産物を含む、生物によって産生される任意の分子である。生体分子の例としては、限定されるものではないが、DNA、RNA、cDNA、又はRNAの逆転写によるDNA産物、A23187(カルシマイシン、カルシウムイオノフォア)、アバメクチン、アビエチン酸、酢酸、アセチルコリン、アクチン、アクチノマイシンD、アデノシン、アデノシンニリン酸(ADP)、アデノシンーリン酸(AMP)、アデノシン三リン酸(ATP)、アデニル酸シクラーゼ、アドニトール、アドレナリン、エピネフリン、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、エクオリン、アフマトキシン、寒天、アラメチシン、アラニン、アルブミン、アルドステロン、アリューロン、-アマニチン、アラントイン、アレスリン、-アマナチン(-Amanatin)、アミノ酸、アミラーゼ、アナボリックステロイド、アネトール、アンジオテンシノーゲン、アニソマイシン、抗利尿ホルモン(ADH)、アラビノース、アルギニン、アスコマイシン、アスコルビン酸(ビタミンC)、アスパラギン、アスパラギン酸、非対称ジメチルアルギニン、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、オーキシン、アビジン、アザジラクチンA-C35H44O16、バクテリオシン、ボーベリシン、ピククリン、ピリルビン、バイオポリマー、ピオチン(ビタミンH)、ブレフェルジンA、ブラシノライド、ブルシン、カダベリン、カフェイン、カルシフェロール(ビタミンD)、カルシトニン、カルモジュリン、カルモジュリン、カルレチキユリン、カンフル-(C10H16O)、カンナビノール、カブサイシン、カルボヒドラーゼ、炭水化物、カルニチン、カラギーナン、カゼイン、カスパーゼ、セルラーゼ、セルロース-(C6H10O5)、セルレニン、セトリモニウムブロミド(セトリミド)-C19H42BrN、ケレリスリン、クロマイシンA3、シャパロニン(Chaparonin)、キチン、-クロラロース、クロロフィル、コレシストキニン(CCK)、コレステロール、コリン、コンドロイチン硫酸、桂皮アルデヒド、シトラール、クエン酸、シトリニン、シトロネラル、シトロネロール、シトルリン、コバラミン(ビタミンB12)、コエンザイム、コエンザイムQ、コルヒチン、コラーゲン、コニイン、コルチコステロイド、コルチコステロン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)、コルチゾール、クレアチン、クレアチンキナーゼ、クリスタリン、-シクロデキストリン、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、シクロバミン、シクロピアゾン酸、システイン、シスチン、シチジン、サイトカラシン、サイトカラシンE、チトクローム、シトクロムC、シトクロムcオキシダーゼ、シトクロムcペルオキシダーゼ、サイトカイン、シトシン-C4H5N3O、デオキシコール酸、DON(デオキシニバレノール)、デオキシリボフラノース、デオキシリボース、デオキシリボース核酸(DNA)、デキストラン、デキストリン、DNA、ドーパミン、酵素、エフェドリン、エピネフリン-C9H13NO3、エルカ酸-CH3(CH2)7CH=CH(CH2)11COOH、エリスリトール、エリスロポエチン(EPO)、エストラジオール、オイゲノール、脂肪酸、フィブリン、フィブロンекチン、葉酸(ビタミンM)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、ホルムアルデヒド、ギ酸、ホルミノシ(Formnoci)、フルクトース、フモニシンB1、グロブリン、ガラクトース、グロブリン、-アミノ酪酸、-ブチロラクトン、ヒドロキシ酪酸(ghb)、ガストリン、ゼラチン、ゲラニオール、グロブリン、グルカゴン、グルコサミン、グルコース-C6H12O6、グルコースオキシダーゼ、グルテン、グルタミン酸、グルタミン、グルタチオン、グルテン、グリセリン(グリセロール)、グリシン、グリコーゲン、グリコール酸、糖タンパク質、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)、グランザイム、緑色蛍光タンパク質、成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)、GTPアーゼ、グアニン、グアノシ

10

20

30

40

50

ン、グアノシン三リン酸 (+ G T P )、ハプトグロビン、ヘマトキシリン、ヘム、ヘムエ  
 リトリン、ヘモシアニン、ヘモグロビン、ヘムタンパク質、ヘパラン硫酸、高密度リボタ  
 ンパク質、H D L、ヒスタミン、ヒスチジン、ヒストン、ヒストンメチルトランスフェラ  
 ーゼ、H L A 抗原、ホモシステイン、ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン ( h C G )、  
 ヒト成長ホルモン、ヒアルロン酸、ヒアルロニダーゼ、過酸化水素、5 - ヒドロキシメチ  
 ルシトシン、ヒドロキシプロリン、5 - ヒドロキシトリプタミン、インディゴ染料、イン  
 ドール、イノシン、イノシトール、インスリン、インスリン様成長因子、内在性膜タンパ  
 ク質、インテグラーゼ、インテグリン、インティン、インターフェロン、イヌリン、イオ  
 ノマイシン、イオノン、イソロイシン、鉄 - 硫黄クラスター、K 2 5 2 a、K 2 5 2 b、  
 K T 5 7 2 0、K T 5 8 2 3、ケラチン、キナーゼ、ラクターゼ、乳酸、乳糖、ラノリン  
 、ラウリン酸、レプチン、レプトマイシン B、ロイシン、リグニン、リモネン、リナロー  
 ル、リノール酸、リノレン酸、リパーゼ、脂質、脂質アンカータンパク質、リポアミド、  
 リポタンパク質、低密度リポタンパク質、L D L、黄体形成ホルモン ( L H )、リコピン  
 、リジン、リゾチーム、リンゴ酸、マルトース、メラトニン、膜タンパク質、金属タンパ  
 ク質、メタロチオネイン、メチオニン、ミモシン、ミトラマイシン A、マイトマイシン C  
 、モノマー、ミコフェノール酸、ミオグロビン、ミオシン、天然フェノール、核酸、オク  
 ラトキシ A、エストロゲン、オリゴペプチド、オリゴマイシン、オルシン、オレキシ  
 ン、オルニチン、シュウ酸、オキシダーゼ、オキシトシン、p 5 3、P A B A、パクリタキ  
 セル、パルミチン酸、パントテン酸 ( ビタミン B 5 )、副甲状腺ホルモン ( P T H )、パ  
 ラプロテイン、パルダキシン、パルテノライド、パツリン、パキシリン ( Paxilline )、  
 ペニシリン酸、ペニシリン、ペニトレム A、ペプチダーゼ、ペプシン、ペプチド、ペリマ  
 イシン、末梢膜タンパク質、ペロサミン、フェネチルアミン、フェニルアラニン、ホスフ  
 ァゼン、ホスファターゼ、リン脂質、フェニルアラニン、フィチン酸、植物ホルモン、ポ  
 リペプチド、ポリフェノール、多糖、ポルフィリン、プリオン、プロゲステロン、プロラ  
 クチン ( P R L )、プロリン、プロピオン酸、プロタミン、プロテアーゼ、タンパク質、  
 プロテイノイド、プトレシン、ピレトリン、ピリドキシン又はピリドキサミン ( ビタミン  
 B 6 )、ピロリジン、ピルビン酸、キノン、ラディシコール、ラフィノース、レニン、レ  
 チネン、レチノール ( ビタミン A )、ロドプシン ( 視紅 )、リボフラビン ( ビタミン B 2 )  
 、リボフラノース、リボース、リボザイム、リシン、R N A - リボ核酸、R u B i s C  
 O、サフロール、サリチルアルデヒド、サリチル酸、サルビノリン A - C 2 3 H 2 8 O 8  
 、サポニン、セクレチン、セレノシステイン、セレノメチオニン、セレノプロテイン、セ  
 リン、セリンキナーゼ、セロトニン、スカトール、シグナル認識粒子、ソマトスタチン、  
 ソルビン酸、スクワラン、スタウロスポリン、ステアリン酸、ステリグマトシスチン、ス  
 テロール、ストリキニーネ、スクロース ( 糖 )、( 一般的な ) 糖、スーパーオキシド、T  
 2 毒素、タンニン酸、タンニン、酒石酸、タウリン、テトロドトキシン、ソーマチン、ト  
 ポイソメラーゼ、チロシンキナーゼ、タウリン、テストステロン、テトラヒドロカナビ  
 ノール ( T H C )、テトロドトキシン、タプシガルジン、ソーマチン、チアミン ( ビタミ  
 ン B 1 ) - C 1 2 H 1 7 C 1 N 4 O 5 · H C 1、トレオニン、トロンボポエチン、チミジ  
 ン、チミン、トリアクシン C、甲状腺刺激ホルモン ( T S H )、甲状腺刺激ホルモン放出  
 ホルモン ( T R H )、チロキシ ( T 4 )、トコフェロール ( ビタミン E )、トポイソメ  
 ラーゼ、トリヨードサイロニン ( T 3 )、膜貫通受容体、トリコスタチン A、栄養ホルモ  
 ン、トリプシン、トリプトファン、チューブリン、ツニカマイシン、チロシン、ユビキチ  
 ン、ウラシル、尿素、ウレアーゼ、尿酸 - C 5 H 4 N 4 O 3、ウリジン、バリン、バリノ  
 マイシン、バナビンス ( Vanabins )、バソプレシン、ベルルクロゲン ( Verruculogen )、  
 ( 一般的な ) ビタミン、ビタミン A ( レチノール )、ビタミン B、ビタミン B 1 ( チアミ  
 ン )、ビタミン B 2 ( リボフラビン )、ビタミン B 3 ( ナイアシン又はニコチン酸 )、ビ  
 タミン B 4 ( アデニン )、ビタミン B 5 ( パントテン酸 )、ビタミン B 6 ( ピリドキシン  
 又はピリドキサミン )、ビタミン B 1 2 ( コバラミン )、ビタミン C ( アスコルビン酸 )  
 、ビタミン D ( カルシフェロール )、ビタミン E ( トコフェロール )、ビタミン F、ビタ  
 ミン H ( ビオチン )、ビタミン K ( ナフトキノ )、ビタミン M ( 葉酸 )、ワートマニン

10

20

30

40

50

、及びキシロースが挙げられる。

#### 【0168】

一部の実施形態では、標的は、例えば、細胞環境のタンパク質（例えば、細胞内タンパク質又は膜タンパク質）などのタンパク質標的とすることができる。タンパク質の例としては、限定されるものではないが、線維性タンパク質、例えば、細胞骨格タンパク質（例えば、アクチン、 $\alpha$  r p 2 / 3、コロニン、ジストロフィン、F t s Z、ケラチン、ミオシン、ネブリン、スペクトリン、タウ、タイチン、トロポミオシン、チューブリン、及びコラーゲン）及び細胞外マトリックスタンパク質（例えば、コラーゲン、エラスチン、f - スポンジン、ピカチュリン、及びフィブロンネクチン）；球状タンパク質、例えば、血漿タンパク質（例えば、血清アミロイドP成分及び血清アルブミン）、血液凝固因子（例えば、補体タンパク質、C 1 - インヒビター及びC 3 - 転換酵素、第V I I I因子、第X I I I因子、フィブリン、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤、トロンピン、フォン・ヴィレブランド因子）、及び急性期タンパク質、例えば、C反応性タンパク質；ヘムタンパク質；細胞接着タンパク質（例えば、カドヘリン、エペンジミン（ependymin）、インテグリン、N c a m、及びセレクチン）；膜貫通輸送タンパク質（例えば、C F T R、グリコホリンD、及びスクランブラーゼ）、例えば、イオンチャネル（例えば、ニコチン性アセチルコリン受容体及びG A B A a受容体のようなりガンド依存性イオンチャネル、及び電位依存性イオンチャネル、例えば、カリウム、カルシウム、及びナトリウムチャネル）、シンポート（synport）/ アンチポートタンパク質（例えば、グルコーストランスポーター）；ホルモン及び成長因子（例えば、上皮成長因子（E G F）、線維芽細胞増殖因子（F G F）、血管内皮増殖因子（V E G F）、ペプチドホルモン、例えば、インスリン、インスリン様成長因子及びオキシトシン、及びステロイドホルモン、例えば、アンドロゲン、エストロゲン、及びプロゲステロン）；受容体、例えば、膜貫通受容体（例えば、Gタンパク質共役受容体、ロドプシン）及び細胞内受容体（例えば、エストロゲン受容体）；DNA結合タンパク質（例えば、ヒストン、プロタミン、C Iタンパク質）；転写調節因子（例えば、c - m y c、F O X P 2、F O X P 3、M y o D、及びP 5 3）；免疫系タンパク質（例えば、免疫グロブリン、主要組織適合性抗原、及びT細胞受容体）；栄養貯蔵/ 輸送タンパク質（例えば、フェリチン）；シャペロンタンパク質；及び酵素が挙げられる。

#### 【0169】

一部の実施形態では、標的は、細胞環境の核酸標的、例えば、核酸などであり得る。「核酸」とは、標的、ドッキング鎖、及びイメージャー鎖に関して本明細書で使用される場合、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態、例えば、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又はそれらの類似体のことである。例えば、核酸は、DNA、RNA、又は逆転写を受けたRNAのDNA産物であり得る。核酸の非限定的な例の例として、遺伝子又は遺伝子断片、即ち、連鎖解析から定義される複数の遺伝子座（遺伝子座）のコーディング領域又は非コーディング領域、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換え核酸、分岐核酸、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、及びプライマーが挙げられる。核酸の他の例として、限定されるものではないが、cDNA、アプタマー、ペプチド核酸（「PNA」）、2' - 5' DNA（短縮された主鎖がDNAのAコンフォメーションに一致する塩基間隔を有する合成物質；2' - 5' DNAは、通常のB形のDNAとはハイブリダイズしないが、RNAとは容易にハイブリダイズする）、ロックド核酸（「LNA」）、及び主鎖が修飾された核酸（例えば、塩基修飾型又は糖修飾型の天然核酸）が挙げられる。核酸は、修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体（プリン及びピリミジンの「類似体」型は、当技術分野で公知である）を含み得る。存在する場合は、ヌクレオチド構造の修飾は、ポリマーの構築の前又は後で行うことができる。核酸は、一本鎖、二本鎖、部分的に一本鎖、又は部分的に二本鎖のDNA又はRNAであり得る。

#### 【0170】

一部の実施形態では、核酸（例えば、核酸標的）は天然である。本明細書で使用される「天然」とは、ヒトの介入なしで自然に存在する生物又はウイルス中に存在する核酸のことである。一部の実施形態では、核酸は、生物又はウイルスで自然に生じる。一部の実施形態では、核酸は、ゲノムDNA、メッセンジャーRNA、リボソームRNA、マイクロRNA、プレ-マイクロRNA、プロ-マイクロRNA、ウイルスDNA、ウイルスRNA、又はpiwi-RNAである。一部の実施形態では、核酸標的は、合成DNAナノ構造（例えば、Watson-クリック相互作用によって相互にハイブリダイズして2-D又は3-Dナノ構造を形成している2つ以上の核酸を含む2次元（2-D）又は3次元（3-D）DNAナノ構造）ではない。

【0171】

10

本明細書に記載の核酸ドッキング鎖及びイメージャー鎖は、上述のいずれか1つの核酸（例えば、DNA、RNA、修飾核酸、核酸類似体、天然核酸、合成核酸）とすることができる。

【0172】

定量的イメージング

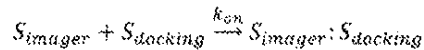
本開示はまた、先行技術のイメージング技術では空間的に解像することができない高密度クラスターにおける蛍光部分又は放射体を定量するための方法も提供する。本発明の前には、蛍光シグナルの光スイッチングのキネティクスを説明する系統的モデルが一切存在しなかった。

【0173】

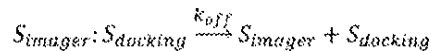
20

短いオリゴヌクレオチド（例えば、イメージャー鎖）のそれらの標的への一時的な結合を用いる確率的超解像イメージングは、回折限界領域における標識分子を整数で定量的にカウントする独自の可能性を提供する。本開示の方法における蛍光OFF状態から蛍光ON状態への分子の「スイッチング」は、単一分子核酸（例えば、DNA）のハイブリダイゼーション事象によって促進され、このようなハイブリダイゼーション事象は、二次会合速度 $k_{on}$ 及び一次解離速度 $k_{off}$ を有する高度に予測可能なキネティックモデルによって制御される。

【数2】



30



【0174】

キネティックパラメータ $k_{on}$ 及び $k_{off}$ は、ここでは、図7Aに示されている蛍光ON時間及び蛍光OFF時間（それぞれ、 $\tau_b$ 及び $\tau_d$ ）に直接関係している。蛍光ON時間 $\tau_b$ は、解離速度 $k_{off}$ ： $\tau_b = 1 / k_{off}$ によって決定され、蛍光OFF時間 $\tau_d$ は、会合速度 $k_{on}$ 、溶液中におけるイメージャー鎖の濃度 $c_{imager}$ 、及び観察された結合部位 $bs$ の数によって決定される。

【数3】

$$\tau_d = \frac{1}{k_{on} \cdot c_{imager} \cdot bs}$$

40

【0175】

（例えば、DNAナノ構造を用いて容易に行うことができる）既知の数の結合部位 $bs$ を有するサンプルを用いた較正 $k_{on} \cdot c_{imager}$ の後、未知の分子又は領域の結合部位の数を次の式によって得ることができる。

## 【数 4】

$$hs = \frac{1}{k_{on} \cdot c_{imager} \cdot \tau_d}$$

## 【0176】

従って、蛍光画像の定量化は、結合キネティクス解析ソフトウェアを用いて自動的に行うことができる。簡単に述べると、典型的な画像が、タイムラプス方式（例えば、10 Hzのフレームレートで15000フレーム）で記録される。蛍光スポットの検出及びフィッティング（例えば、ガウスフィッティング、セントロイドフィッティング（Centroid fitting）、又はベッセルフィッティング（Bessel fitting））が、回折限界画像に対して行われ、これにより超解像度画像が得られる。次のステップで、校正マーカーが選択される（例えば、図7Cのような指定数のスポットを有するDNA折り紙構造）。ソフトウェアが、OFF時間分布を累積分布関数にフィッティングすることによって蛍光の暗い時間 $\tau_d$ を自動的に計算する。上記の式を用いると、 $k_{on} \cdot c_{imager}$ の積を計算することができる。この積は、ドッキング部位、従って画像化領域の標的の数を計算するために使用される。

10

## 【0177】

一部の実施形態では、解像（例えば、超解像）画像における目的の領域の選択は、例えば、クラスター内の標的の数を計算する第2のスポット検出ステップを行うことによって自動的に行うことができる。

20

## 【0178】

従って、一部の実施形態では、本開示の方法は、蛍光標識されたイメージャー鎖に直接又は間接的に一時的に結合される標的を含むサンプルを提供するステップ、サンプルのタイムラプス回折限界蛍光画像を得るステップ、回折限界画像に対して蛍光スポット検出及びフィッティング（例えば、ガウスフィッティング、セントロイドフィッティング、又はベッセルフィッティング）を行ってサンプルの高解像度画像を得るステップ、既知の数の標的を有するサンプルを用いて校正 $k_{on} \cdot c_{imager}$ を行うステップであって、 $k_{on}$ が二次会合定数であり、 $c_{imager}$ がサンプル中の、結合していないイメージャー鎖を含む蛍光標識イメージャー鎖の濃度である、ステップ、蛍光OFF時間分布を累積分布関数にフィッティングすることによって変数 $\tau_d$ を決定するステップ、及び式、標的の数 =  $(k_{on} \cdot c_{imager} \cdot \tau_d)^{-1}$ に基づいてサンプル中の標的の数を決定するステップを含む。

30

## 【0179】

本開示の一部の態様は、フィッティング関数に関連する。本明細書で使用される「フィッティング関数」とは、分子の強度プロファイルをフィッティングするために使用される数学的関数のことである。本明細書に記載される使用のためのフィッティング関数の例として、限定されるものではないが、ガウスフィッティング、セントロイドフィッティング、及びベッセルフィッティングが挙げられる。本明開示の多くの態様及び実施形態は、ガウスフィッティングに言及しているが、他のフィッティング関数も、ガウスフィッティングの代わりに、又はガウスフィッティングに加えて使用することができることを理解されたい。

40

## 【0180】

## 組成物

本開示の少なくとも1つ又は少なくとも2つ（例えば、複数）のBP-NAコンジュゲート（例えば、タンパク質-核酸コンジュゲート）を含む組成物が本明細書に記載される。BP-NAコンジュゲートは、目的の標的（例えば、生体分子）に結合しても良く、かつ/又は相補的な蛍光標識イメージャー鎖に一時的に結合しても良い。組成物は、複数の同じ種又は異なる種のBP-NAコンジュゲートを含み得る。一部の実施形態では、組成物は、少なくとも10、50、100、500、1000、2000、3000、400

50



0、5000、 $10^4$ 、50000、 $10^5$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ のBP-NAコンジュゲートを含み得る。一部の実施形態では、組成物は、少なくとも10、50、100、500、1000、2000、3000、4000、5000、 $10^4$ 、50000、 $10^5$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ の相補的な蛍光標識イメージャー鎖を含み得る。一部の実施形態では、組成物は、1～約200以上の異なる種のBP-NAコンジュゲート及び/又はイメージャー鎖を含み得る。例えば、組成物は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、又はそれを超える異なる種を含み得る。一部の実施形態では、組成物は、約5～約200未満の異なる種のBP-NAコンジュゲート及び/又はイメージャー鎖を含み得る。例えば、組成物は、5未満、6未満、7未満、8未満、9未満、10未満、15未満、20未満、25未満、30未満、35未満、40未満、45未満、50未満、55未満、60未満、65未満、70未満、75未満、80未満、85未満、90未満、95未満、100未満、125未満、150未満、175未満、又は200未満の異なる種を含み得る。

10

#### 【0181】

組成物中の相補的な蛍光標識イメージャー鎖イメージャー鎖の数は、組成物中のBP-NAコンジュゲートの数よりも少なくても、同数であるか、又は多くても良いことを理解されたい。

#### 【0182】

20

#### キット

本開示は、本明細書に記載される1つ以上の組成物を含むキットをさらに提供する。このキットは、例えば、BP-NAコンジュゲート及び/又は蛍光標識イメージャー鎖を含み得る。キットはまた、BP-NAコンジュゲートを作製するため、又はイメージャー鎖を標識するための構成要素も含み得る。例えば、キットは、結合パートナー（例えば、抗体）、ドッキング鎖、及び介在リンカー、例えば、ビオチン及びストレプトアビジン分子など、及び/又はイメージャー鎖を含み得る。キットは、上記の目的を含め、当業者に明らかなあらゆる目的のために使用することができる。

#### 【0183】

キットは、他の試薬、例えば、ハイブリダイゼーション反応を行うための緩衝液も含み得る。キットはまた、キットの構成要素の使用のため、及び/又はBP-NAコンジュゲート及び/又は標識イメージャー鎖の作製及び/又は使用のための取扱説明書も含み得る。

30

#### 【0184】

一部の実施形態では、キットは、少なくとも1つのドッキング鎖、及びドッキング鎖に一時的に結合できる少なくとも1つの標識イメージャー鎖を含む。ドッキング鎖は、結合パートナーにコンジュゲートしても良く、又はしなくても良い。一部の実施形態では、ドッキング鎖は、「一般的な」非標的特異的親和性分子（例えば、ビオチン又はストレプトアビジン）にコンジュゲートされ、この非標的特異的親和性分子は、最終使用者によって選択される結合パートナーにドッキング鎖を結合するために使用することができる。一部の実施形態では、この親和性分子は二次抗体である。従って、一部の実施形態では、キットは、少なくとも1つのドッキング鎖、少なくとも1つの親和性分子、例えば、二次抗体、及び少なくとも1つのイメージャー鎖を含む。

40

#### 【0185】

一部の実施形態では、キットは、(a)結合パートナー、例えば、タンパク質（例えば、標的に結合するタンパク質）に連結された少なくとも1つのドッキング鎖及び(b)ドッキング鎖に一時的に結合することができる（例えば、一時的に結合する）少なくとも1つ（例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも10、少なくとも100）の標識イメージャー鎖を含む。ドッキング鎖は、例えば、少なくとも2つのドメイン又は少なくとも3つのドメインを含み得、各ドメインは、そ

50

れぞれに相補的な標識イメージャー鎖に結合する。標識イメージャー鎖の数は、例えば、ドッキング鎖の数よりも少なくても、多くても、又は同数でも良い。結合パートナーは、タンパク質、例えば、抗体（例えば、モノクローナル抗体）、抗原結合抗体断片、又はペプチドアプタマーなどであり得る。一部の実施形態では、キットは、少なくとも2つの異なる結合パートナー（例えば、タンパク質）を含み、それぞれが、異なる標的に特異的である。結合パートナー（例えば、タンパク質）は、一部の実施形態では、介在リンカー、例えば、ビオチン及びストレプトアビジンを含むリンカー（例えば、ビオチン - ストレプトアビジン - ビオチンリンカー）などによってドッキング鎖に連結されている。一部の実施形態では、ドッキング鎖は、ドッキング鎖を結合パートナーに連結するために使用することができる親和性分子を含むように変更されている。一部の実施形態では、親和性分子は二次抗体である。イメージャー鎖は、一部の実施形態では、少なくとも1つの蛍光標識（例えば、少なくとも1つのフルオロフォア）で標識される。一部の実施形態では、イメージャー鎖の長さは、4 ~ 30ヌクレオチド又はそれを超える。例えば、イメージャー鎖の長さは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、イメージャー鎖の長さは、8 ~ 10ヌクレオチドである。一部の実施形態では、キットは、少なくとも2つのイメージャー鎖を含み、それぞれのイメージャー鎖は互いに異なっている。一部の実施形態では、相補的な標識イメージャー鎖に一時的に結合したドッキング鎖の熱安定性は、他のドッキング鎖であって、それらのそれぞれの標識イメージャー鎖に一時的に結合した他のドッキング鎖の0.5 kcal/molの熱安定性の範囲内である。

#### 【0186】

一部の実施形態では、キットは、(a)モノクローナル抗体又はその抗原結合断片（例えば、モノクローナル抗体又は標的に結合するその抗原結合断片）に連結された少なくとも1つのドッキング鎖及び(b)ドッキング鎖に一時的に結合することができる（例えば、一時的に結合する）少なくとも1つ（例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも10、少なくとも100）の標識イメージャー鎖を含む。ドッキング鎖は、例えば、少なくとも2つのドメインを含み得、各ドメインは、それぞれに相補的な標識イメージャー鎖に結合する。標識イメージャー鎖の数は、例えば、ドッキング鎖の数よりも少なくても、多くても、又は同数でも良い。一部の実施形態では、キットは、少なくとも2つの異なるモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を含み、それぞれが異なる標的に特異的である。モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、一部の実施形態では、ビオチン及びストレプトアビジンを含む介在リンカー（例えば、ビオチン - ストレプトアビジン - ビオチンリンカー）によってドッキング鎖に連結されている。イメージャー鎖は、一部の実施形態では、少なくとも1つの蛍光標識（例えば、少なくとも1つのフルオロフォア）で標識される。一部の実施形態では、イメージャー鎖の長さは、4 ~ 30ヌクレオチド又はそれを超える。例えば、イメージャー鎖の長さは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、イメージャー鎖の長さは、8 ~ 10ヌクレオチドである。一部の実施形態では、キットは、少なくとも2つのイメージャー鎖を含み、それぞれのイメージャー鎖は互いに異なっている。一部の実施形態では、相補的な標識イメージャー鎖に一時的に結合したドッキング鎖の熱安定性は、他のドッキング鎖であって、それらのそれぞれの標識イメージャー鎖に一時的に結合した他のドッキング鎖の0.5 kcal/molの熱安定性の範囲内である。

#### 【0187】

##### 用途

本開示のBP - NAコンジュゲート（例えば、タンパク質 - 核酸コンジュゲート又は抗体 - 核酸コンジュゲート）は、特に、既存の標的検出技術が使用される任意のアッセイで 사용할ことができる。

## 【0188】

典型的には、アッセイとして、診断アッセイ、予後アッセイ、患者監視アッセイ、スクリーニングアッセイ、生物戦アッセイ (biowarfare assay)、法医学的分析アッセイ、及び出生前ゲノム診断アッセイなどを含む検出アッセイが挙げられる。アッセイは、*in vitro*アッセイ又は*in vivo*アッセイであり得る。本開示は、たとえこのような標的が従来技術のイメージング法で空間的に解像可能でなくても（従って、空間的に異なっていないくても）、多数の異なる標的を、本開示の方法を用いて単一サンプルから一度に分析できるという利点を提供する。これにより、例えば、1つのサンプルに対して行われるいくつかの診断検査が可能となる。

## 【0189】

B P - N A コンジュゲートはまた、部位又は領域を単純に観察するために使用することもできる。

## 【0190】

本開示の方法は、病変細胞型がサンプル中に存在するか否かを決定し、かつ／又は疾患の病期を分類するために、患者から得られたサンプル又は患者由来のサンプルの分析に適用することができる。例えば、血液サンプルは、サンプル中の癌細胞型の存在及び／又は癌細胞型のマーカーの量を決定し、これにより癌を診断又は病期を分類するために、本明細書に記載される任意の方法に従ってアッセイすることができる。

## 【0191】

あるいは、本明細書に記載の方法は、病原体感染、例えば、細胞内細菌及びウイルスによる感染を、サンプル中の細菌又はウイルスのそれぞれの存在及び／又はマーカーの量を決定することによって診断するために使用することができる。従って、本開示の方法、組成物、及びキットを用いて検出された標的は、患者のマーカー（例えば、腫瘍マーカー）又は外来病原体での感染のマーカー、例えば、細菌マーカー若しくはウイルスマーカーであり得る。

## 【0192】

本開示の定量的イメージング法は、例えば、その存在量が生物学的状態又は病状（例えば、病態の結果として上方制御又は下方制御される血液マーカー）を示す標的（例えば、標的生体分子）を定量するために使用することができる。

## 【0193】

さらに、本開示の方法、組成物、及びキットは、患者の治療過程の決定に役立つ診断情報を提供するために使用することができる。例えば、腫瘍の特定のマーカーの量は、たとえ患者の少量のサンプルからでも正確に定量することができる。乳癌のような特定の疾患では、特定のタンパク質、例えば、H e r 2 - n e u の過剰発現は、より積極的な治療過程が必要となることを示す。

## 【0194】

本開示の方法はまた、化合物、突然変異、温度変化、成長ホルモン、成長因子、疾患、又は培養条件の変化を含む摂動の様々な標的に対する影響を決定し、これにより、その存在、非存在、又はレベルが特定の生物学的状態を示す標的を特定するために使用することができる。一部の実施形態では、本開示は、病態の成因及び経路を解明及び発見するために使用される。例えば、疾患組織に存在する標的の量と「正常」組織に存在する標的の量の比較により、疾患に関与する重要な標的の解明が可能となり、これにより、疾患の治療に使用することができる新たな薬剤候補の発見／スクリーニングのための標的を特定することができる。

## 【0195】

分析されるサンプルは、生物学的サンプル、例えば、血液、痰、リンパ液、粘液、便、及び尿などであり得る。サンプルは、環境サンプル、例えば、水サンプル、空気サンプル、及び食品サンプルなどであり得る。アッセイは、固定化された結合反応の1つ以上の成分を用いて行うことができる。従って、標的又はB P - N A コンジュゲートを固定化することができる。アッセイは、固定化されていない結合反応の1つ以上の成分を用いて行う

10

20

30

40

50

ことができる。アッセイは、本開示のB P - N A コンジュゲート及び蛍光標識イメージャー鎖によって提供される多重化の可能性を考慮して、実質的に同時にサンプル中の標的の数の検出を含み得る。一例として、アッセイは、（例えば、特異的な細胞表面受容体に基づいた）特定の細胞型、及びこの特定の細胞型における特定の遺伝子突然変異を検出するために使用することができる。このようにして、最終使用者は、一例として、特定の型の細胞のどの程度が目的の突然変異を有するかを決定することもできる。

【 0 1 9 6 】

#### 装置

図 2 3 A 及び図 2 3 B に示されているように、液体の処理のための流体チャンバ装置も本明細書に記載される。一部の実施形態では、この装置は、それぞれ一端がサンプルチャンバに接続された第 1 の通路及び第 2 の通路を備えるポリマー系（例えば、ポリジメチルシロキサン（P D M S））装置である。この構成により、1 つ以上の流体が制御された速度でサンプルに連続的に投与される。例えば、シリンジを使用して、第 1 の流体を装置の第 1 の通路を介してサンプルに投与することができる。次いで、シリンジを使用して、装置の第 1 の通路を通してサンプルチャンバに流れる第 2 の流体を投与し、これにより、第 1 の流体をサンプルチャンバから押し出して、第 2 の通路から、例えば、この第 2 の通路に接続されたタンクに入れることができる（図 2 3 A）。一部の実施形態では、装置は、この装置の下に配置された顕微鏡対物レンズから見るようにスライドガラスに配置される。

【 0 1 9 7 】

#### 超解像イメージング

空間解像度が増大したスーパー解像イメージング（本明細書では「超解像」イメージングと呼ばれる）は、一実施形態では、図 1 1 A に示されている、2 つの戦略の一方を用いて 1 つの局在化事象当たりの光子の数を増加させることによって達成することができる。第 1 の戦略では、1 つ 1 つの補充可能なフルオロフォアからの光子の最大数が推論される。フルオロフォア安定化緩衝液（1 6、1 7）と共に高いレーザー励起出力を使用して、ドッキング部位（又はドッキング鎖の部位）で一時的に結合したフルオロフォアを「消光」させ、これにより 1 つの結合事象及び色素当たりの光子の最大数を推論することができる（図 1 1 A）。イメージャー鎖の反復的な結合により、いずれの結合鎖の「消光」も可能となり、従って、放射された光子を最大限利用することができ、従来のイメージング技術に対して局在化の精度が大幅に向上することになる。第 2 の戦略では、明るいメタフルオロフォア（metafluorophore）が使用される。蛍光 D N A ナノ構造、又は「メタフルオロフォア」を、コンパクト D N A ナノ構造に多数のフルオロフォアを付加することによって形成することができる（図 1 1 B 3）。メタフルオロフォアからの個々の色素発光の全てが、同じ点源を起源とすると解釈され、従って、標準的なフルオロフォア（例えば、C y 3）の代わりにメタフルオロフォアを用いることにより、局在化の精度がさらに向上する。能動的にバックグラウンドが抑制されたメタフルオロフォアにより進展した形態が図 1 1 B 4 に示されている。ここで、貝殻様構造が、ドッキング鎖に結合したときにのみ蛍光を発する条件付きフルオロフォアとして機能する。

【 0 1 9 8 】

本開示は、上記のように、スポット検出、フィッティング、及びドリフト補正に使用されるアルゴリズムも提供する。

【 0 1 9 9 】

#### ドリフト補正用のソフトウェアアルゴリズム

一部の実施形態は、時系列に記録された画像におけるドリフトを補正するための方法及び装置に関する。以下にさらに詳細に説明される、ドリフト補正を行うための技術の非限定の適用例では、ドッキング鎖とイメージング鎖との間の一時的な結合に関与する、本明細書に記載の分子レベルの D N A ベースのイメージングにおけるドリフトを補正する。しかしながら、本明細書に記載の技術は、別法として、1 つ以上の一時的なイメージング事象が時系列の画像の際に記録される他のイメージングの適用例においてドリフトを補正す

るために使用することができ、かつドリフト補正に関連した実施形態は、分子レベルのDNAベースのイメージングに限定されるものではないことを理解されたい。

#### 【0200】

一部の実施形態では、DNAナノ構造は、ドリフトマーカーとして使用することができる。任意の適切なDNAナノ構造（例えば、（Rothemundによる米国特許出願公開第2007/0117109 A1号）、single-stranded tiles（Yin et al., “Programming DNA Tube Circumferences,” Science (2008): 321: 824-826）、DNAヘアピン（Yinらによる米国特許出願公開第2009/0011956 A1号；Yin et al., “Programming biomolecular self-assembly pathways,” Nature (2008) 451:318-323）を使用することができ、このようなナノ構造は、例えば、DNA折り紙技術を用いて形成することができる。10  
先進的分析及び後処理技術と組み合わせられた、DNAナノ構造ベースのドリフトマーカーを使用するドリフト補正は、高精度の補正、長時間のイメージングとの適合性、及び実施の容易さの利点を有する。蛍光ビーズに基づいたドリフトマーカーを含む従来の核酸ベースのイメージング技術は、ビーズが消光されるまでのイメージング時間の長さが限定されているという問題があり；明視野イメージングは、専用の機器、例えば、二重視野カメラビュー（dual-field camera view）を必要とする。

#### 【0201】

本明細書に記載の一部の実施形態によるドリフト補正技術は、複数の段階を含み得、各段階は、異なる技術を使用してドリフト補正を行う。一部の実施形態では、ある段階の出力は、追加のドリフト補正処理のための次の段階への入力として供給される。第1の段階では、粗ドリフト補正が、隣接フレームの局在化の比較によって行われる。第2の段階では、単一ドリフトマーカーが選択され、その時間トレースが、異なる粗補正として使用される。第3の段階では、ドリフトマーカーの群が、自動的又は使用者の入力で選択され、次いで、その時間トレースが、より正確なドリフト補正を計算するために組み合わせられる。第4の段階では、局在化が、画定されて空間的に解像可能なジオメトリ（例えば、4×3の格子点）にスポットを表示する鋳型ベースのドリフトマーカーからプールされる。第5の段階では、ノイズをさらに低減して、最終画像の解像度を可能にして分子レベルの解像度に到達するように、ドリフト補正の平滑化が行われる。20

#### 【0202】

これらの5つの段階の任意の数及び/又は組み合わせを、本明細書に記載の技術に従って行うことができる。例えば、一部の実施形態では、時系列の画像におけるドリフトの量は、品質測定を用いて特徴付けることができ、この品質測定に少なくとも部分的に基づいて、1つ以上の段階を排除することができる。他の実施形態では、実施形態がこれに関して限定されるものではないため、5つの段階全てを行うことができる。なお他の実施形態では、本明細書に記載の少なくとも1つの段階と組み合わせられて使用される追加のドリフト補正段階も使用することができる。30

#### 【0203】

ドリフト補正を行うための技術の以下の説明では、FWHM（半値全幅）という語は、「解像度」の数学的代用として使用される。ガウス分布ではFWHM<sup>\*</sup>2.35という近似も使用され、<sup>\*</sup>は標準偏差である。ドリフト補正を行うための本明細書に記載の技術は、時系列の画像の処理に関する。記録された画像スタックは、本明細書では「ムービー」と呼ばれ、個々の画像はそれぞれ、「フレーム」と呼ばれる。ムービーの各フレームは、スポット発見アルゴリズムで動作され、次いで、局所ガウスフィッティングアルゴリズムを、それぞれの識別されたスポットに使用することができ；このスポットとそのフィッティングされた中心位置の特定は、本明細書では互換的に「局在化」と呼ばれる。ムービーのフレームは、一部のフレームには存在するが他のフレームには存在しない1つ以上の一時的現象を捕捉する。ムービーのフレームが、上記の核酸ベースのイメージングに関連している技術の例示的な適用例では、解離までのイメージャー鎖のドッキング鎖へのハイブリダイゼーションは、本明細書では結合「現象」と呼ばれ；従って、現象は、一連の隣接フレームにおけるいくつかの局在化を有し得、典型的にはこれらの局在化からなる。40  
50

結合事象は、ドリフト補正を行うための本明細書に記載の技術を用いて分析することができる1つの例示的な一時的な事象として以下にさらに詳細に説明されるが、時系列に画像化される他のタイプの一時的な事象を別法として使用できることを理解されたい。視野の特定の領域内で、全ムービーに亘る全ての局在化の集合体が、まとめて「時間トレース」と呼ばれ、この時間トレースは、観察する構造の動きを反映し、以下により詳細に説明されるように、いくつかの異なる方法でドリフト補正に使用される。

#### 【0204】

##### ドリフト補正技術の概要

図12は、本明細書に記載の技術に従って行うことができるドリフト補正手順の5つの段階の模式的な概略図を例示している。これらの段階は、未処理画像から、5つの段階のそれぞれ技術を用いて処理された最終画像へと順に連続的に行われるとして例示されている。これらの段階はそれぞれ、以下により詳細に説明される。簡単に述べると、図12A(i)は、ドリフト補正の各段階の原理を示す模式図を示している。各画像では、黒いマーカー及び線はソースデータを示し、赤い値及び曲線は、計算上のドリフト補正を例示している。図12A(ii)は、各段階で使用される主要なタイプのドリフトマーカー（例えば、DNAドリフトマーカー）の模式図を示している。図12B(i)は、各段階又は補正後のイメージングの質を示す構造の一例を例示し、図12B(ii)は、各段階での図12B(i)の対応する緑色の長方形のズーム画像を示している。図12B(i)及び図12B(ii)に示されているスケールバーは50nmに相当する。図12C(i)は、補正の各段階の後のドリフトトレースの一例を例示し、図12C(ii)は、各段階での図12C(i)の対応する緑色の長方形のズーム画像を示している。図12C(i)のスケールバーは、x:500nm、t:500秒に相当し、図12C(ii)のスケールバーは、x:10nm、t:10秒に相当する。図18は、一部の実施形態に従ったドリフト補正のプロセスにおける段階の代替の表現を例示している。

#### 【0205】

一部の実施形態では、第1の段階からの画像解像出力は、約1 $\mu$ mであり得る。

#### 【0206】

一部の実施形態では、第2の段階からの画像解像出力は、約200nmであり得る。

#### 【0207】

一部の実施形態では、第3の段階からの画像解像出力は、約20nmであり得る。

#### 【0208】

一部の実施形態では、第4の段階からの画像解像出力は、約5nmであり得る。

#### 【0209】

一部の実施形態では、第4の段階からの画像解像出力は、約5nm未満であり得る。

#### 【0210】

##### イメージングの質及び達成可能な解像の限界

ドリフト補正画像の可能な最高の質は、個々の局在化の質によって制限され、この質は、イメージングセッション中に使用される様々な条件（例えば、顕微鏡イメージングセッション）によって決まる。異なるイメージング条件の質を定量的に評価し、これらの質同士を効果的に比較するために、隣接フレーム局在化間の距離(DNFL)と呼ばれる量が、連続的な画像フレームから検出された局在化間の平均離隔距離として定義され、この平均離隔距離は、同じ一時的な事象（例えば、結合事象）から生じる。

#### 【0211】

画像のDNFLを計算するための手順は、次のように概要が説明される。NFの各対（隣接するフレーム、例えば、フレーム#1及び#2）では、両方のフレームからの全ての局在化がプールされ、フレーム間にドリフトが存在しないと仮定して、異なるフレームからの局在化の各対（例えば、フレーム#1からの1つの局在化と別のフレーム#2からの局在化）間の距離が計算される。全てのNF対から得られる距離が、二峰性分布を得るためにプールされる。二峰性分布の第1のモードは、幅が広く、振幅が高く、かつ視野の幅に亘っている。二峰性分布の第2のモードは、急であり、振幅が低く、0に近く、かつ同

じ結合事象からの局在化に一致する。第2のモードの最大値を決定することができ、局所ガウスフィッティングアルゴリズムを、ほぼ最大値で行ってピークの中心を決定することができる。この値は、特定の画像のD N F Lと見なすことができる。連続したフレームからの局在化を組み合わせなくても、D N F L値が、特定の画像から達成することができる可能な最高の解像度の限界を設定し、最良の達成可能な解像度とD N F Lとの間の数学的関係は、最良の達成可能な解像度 = D N F L / ルート  $2 \times 2 . 3 5$  である。

#### 【0212】

ドリフト補正の品質及び対応可能な解像度

最終ドリフト補正画像の質は、1つの結合部位の点広がり関数(P S F)を特徴付けることによって評価することができる。数千を超える単一ドッキング部位の画像の統計オーバーレイを、P S F分布の基準として作成することができる。2-Dガウスフィッティングを統計オーバーレイに対して行って、P S Fの標準偏差( )を決定し、これにより、上記と同様の式：画像の対応可能な解像度 =  $\times 2 . 3 5$  によって得られる、形成された画像の最良の対応可能な解像度が決まる。補助DNAナノ構造を利用して単一の分離されたドッキング部位の分離及びオーバーレイを行うことができる。この構造は、十分に分離されたドッキング部位の既知のパターン(例えば、格子パターン)を有し、以下により詳細に説明される、鋳型ベースのドリフト補正段階に使用される構造と同じ構造とすることができる。レーザー強度のばらつき、光学面の蒸着のむら、及び他の系統的因子、並びにイメージングプロセスの起こり得る確率的性質により、上で決定された全画像の画質は、イメージング視野における各単一サンプル物体の実際のイメージングの質を反映することができない。典型的には、イメージング視野の中心に近く、かつ光学面に良好に固定された構造は、良好に照明され、周辺にある十分には固定されていない構造よりも優れた解像度を示す。単一分子の画質及び解像度は、上記の手順と同様の手順で決定することができる。補助DNAナノ構造(上記と同じ)の単一分子の投影は、ドッキング部位を最良に分離する方向に沿って(格子構造の場合は、これは任意の格子方向に沿って)行うことができ、多重ガウスフィットを、投影された1-D分布に対して行うことができる。次いで、フィッティングされたガウスピークの標準偏差を決定し、これを同様に使用して単一分子画像の解像度を推論することができる。

#### 【0213】

ドリフトの評価及びドリフト補正段階の選択

一部の実施形態では、以下にさらに詳細に説明される、ドリフト補正を行うための技術を含む5つの段階を順次行って、未処理画像のドリフトを減少させ、それぞれの連続した段階がドリフトをさらに減少させ、次の段階の動作の成功に十分なほど低くなる。捕捉した画像におけるドリフトの程度によっては、5つの段階の全てを使用しなくても良い。例えば、元の画像のドリフトが低いと決定された場合は、各フレームにおける局在化が分離可能であり得、処理を、第1の段階による処理を必要とすることなく、第2の段階から開始することができる。元の画像のドリフトがさらに低いと決定された場合は、処理を、最終画像の質を著しく低下させることなく、第3の段階から開始することができる。とりわけ、熱変動及び熱膨張、電気モーターの作動による顕微鏡ステージの動き、建物からの振動、及び光学台の複雑さを含み得るドリフトの複雑な起源により、元の画像におけるドリフトの制御は、困難な傾向にあり、最初の2つの段階を含むことは、しばしば、所望の解像度の最終画像を形成するのに有用である。例えば、本明細書に記載の5つ全ての段階を含むことは、専用のハードウェア又は建物の要件を必要とすることなく、殆どの生物研究所で撮影される画像に適用可能であるドリフト補正の強力な戦略となる。

#### 【0214】

一部の実施形態では、元の未処理画像のドリフトの程度及び画像全体の質を任意の適切な技術を用いて決定することができ、決定された画質を使用して、ドリフト補正の実施に使用するためにドリフト補正の段階を選択することができる。例えば、画質を決定するための技術は、同じ画像の異なる時間セグメントを比較することができる。この例示的な技術では、元の画像を、ムービーの第1の半分から局在化と第2の半分からの局在化とを別

10

20

30

40

50

々にプールすることによって2等分することができる。2つの画像間の相互関連を計算して、最良のオフセットを推定して、全体のドリフトの兆候を提供することができる。全体のドリフトの兆候を1つ以上の閾値と比較して、1つ以上のドリフト補正段階を、本明細書に記載の技術に従ってドリフト補正を行う際に省略することができるか否かを決定することができる。

#### 【0215】

図13は、一部の実施形態に従ってドリフト補正を行うためのプロセスを例示している。動作210で、ドリフト補正が、ムービーの隣接するフレームに亘る局在化の差異を考慮することによって行われる。次いで、プロセスは動作220に進み、単ドリフトマーカーが選択され、ムービー中の時間に対するドリフトマーカーの動きを表現する時間トレースが決定され、かつこの単ドリフトマーカーの時間トレースが使用されて、画像のドリフト補正が行われる。次いで、プロセスは動作230に進み、画像で識別された複数のドリフトマーカーのそれぞれに対して時間トレースが決定される。以下により詳細に説明されるように、時間トレース間の差異を使用して、最終画像のさらなるドリフト補正を行うことができる。次いで、プロセスは動作240に進み、幾何学的に拘束された鋳型を用いたドリフト補正が行われる。次いで、プロセスは動作250に進み、以下により詳細に説明されるように、適切な平滑化技術を用いてドリフトトレースを平滑化することによって画像がさらにドリフト補正される。本明細書に記載の技術に従ってドリフト補正を行うための5つの段階のそれぞれが、以下にさらに詳細に説明される。前述の説明から分かるように、全ての実施形態が、ドリフト補正処理に5つ全ての段階の使用を必要とするものではない。例えば、一部の実施形態では、動作230及び240のみを行うことができる。他の実施形態では、動作230、240、及び250を行うことができる。なお他の実施形態では、動作210を含まずに、動作220、230、240、及び250を行うことができる。

#### 【0216】

##### ドリフト補正の第1の段階

ドリフト補正の第1の段階（例えば、図13の動作210）は、ムービーにおける隣接するフレームからの局在化を比較することによって行われる。上記のDNFLの計算と同様の手順（又はその他の適切な技術）を使用して、同じ一時的な事象（例えば、1つの結合事象）から生じる局在化の対を識別することができる。同じ一時的な事象から生じる全ての局在化の対をプールして二峰性分布を作成することができる。隣接する画像からの局在化の二峰性分布の作成後に、カットオフ値を自動的に決定して、同じ事象からの局在化の対（近い局在化）を異なる局在化から分離することができる。次に、同じ隣接するフレーム（NF）対の全ての近い局在化の対がプールされ、各対間のオフセット値が計算される。全てのオフセットのベクトル平均が、ドリフト補正として出力される。適切な近い局在化が存在しないNF対が特定された場合、0ドリフトを出力することができる。ドリフト補正の第1の段階は、典型的には、高振幅（オフセットが1 $\mu$ mよりも離れている）を有する全体的なドリフトを補正し、これにより、異なるドリフトマーカー間の干渉が効果的に取り除かれ、次の段階を含めることが可能となる。上記のように、異なるドリフトマーカーが既に互いに分離可能であり得る一部の実施形態では、処理の第1の段階を省略することができる。処理の第1の段階を省略できるか否かの決定は、上記のように画質因子分析を用いて、又はその他の適切な技術（例えば、手動検査）で行うことができる。

#### 【0217】

##### ドリフト補正の第2の段階

ドリフト補正の第2の段階（例えば、図13の動作220）は、単ドリフトマーカー又はサンプル物体で行われる。この段階のドリフト補正処理に使用される単ドリフトマーカーは、任意の適切な方法で選択することができる。例えば、一部の実施形態では、単ドリフトマーカーは、特定された全てのドリフトマーカーのセットからランダムに選択することができる。他の実施形態では、望ましい質（例えば、全ムービーに対するドリフトの平均量）に関連した特定のドリフトマーカーを、この段階で使用される単ドリフト



マーカーとして選択することができる。単ードリフトマーカーの選択後に、その時間トレースが自動的に決定され、平滑化され、ドリフト補正として出力される。あるいは、ドリフトトレースは、ドリフトマーカー間の分離を自動的に識別するのが困難な場合は、手動で引くことができる。

#### 【0218】

ドリフト補正の第2の段階は、ムービーの全体的なドリフトをさらに減少させ（典型的には、 $< 200\text{ nm}$ ）、以降の段階におけるドリフトマーカーの自動的なバッチ識別が可能となる。

#### 【0219】

ドリフト補正の第3の段階

10

ドリフト補正の第3の段階（例えば、図2の段階230）は、複数のドリフトマーカーの時間トレースを組み合わせ、ドリフト補正の第2の段階よりも細かい解像度でドリフト補正を計算する。各ドリフトマーカーは、高い一時的な適用範囲を可能にするために多数のドッキング部位を有し；多数のこれらのドリフトマーカーが、サンプルと共にイメージング表面に配置される。この段階の実施におけるドリフト補正の改善が、画像における各ドリフトマーカーの広がり及び1フレーム当たりのドリフトマーカーの有効数によって主に決まるため、各ドリフトマーカーの結合部位の数及び表面におけるドリフトマーカーの濃度を適切に選択して、高品質のドリフト補正を保障することができる。

#### 【0220】

図14は、図2の段階230に一致するドリフト補正を行うためのプロセスを例示している。動作310では、複数のドリフトマーカーの位置が特定される。複数のドリフトマーカーの位置の特定は、2次元（2D）ヒストグラムを計算するためにムービーの全てのフレームからの局在化をプールすることを含み得る。次いで、ドリフトマーカーの位置を、ヒストグラムのビンサイズの適切な調整及び他の選択基準の組み合わせによって特定することができる。例えば、ヒストグラムのビンサイズは、ドリフトマーカーのフィーチャーサイズ、例えば、第4又は第3のそれらの全サイズを反映するように調整することができる。選択基準の範囲は、限定されるものではないが、ヒストグラム値の下限閾値及び幾何学的特性（例えば、領域、寸法）に基づいたフィルタリングを含む。近接ドリフトマーカー間の十分な分離は、例えば、二重結合事象の疑似局在化から生じる偽局在化を排除するためにしばしば必要である。（例えば、数千の）ドリフトマーカーのプールの特定の後、プロセスは動作320に進み、そこで、各ドリフトマーカーの時間トレースが決定され、組み合わせトレースの中心からの各時間トレースのオフセットとして決定される相対時間トレースが計算される。画像が、一時的な事象（例えば、核酸 - 結合事象）を捉えるため、ドリフトマーカーの全ての時間トレースが、ムービーの全ての時点をカバーできるものではない。このような場合、時間トレースは、より細かくて平滑な結果を得るために「欠落点」で線形内挿することができる。

20

30

#### 【0221】

複数のドリフトマーカーのそれぞれの時間トレースの決定後に、プロセスは動作330に進み、そこで、画像のドリフト補正が、各ドリフトマーカーに対して決定された時間トレースに基づいて決定される。時間トレースの任意の適切な組み合わせを用いてドリフト補正を決定することができ、実施形態は、これに関して限定されるものではない。一部の実施形態では、この段階からのドリフト補正出力を決定するために、時間トレースの重み付き平均が使用される。例えば、相対時間トレースのプールの重み付き平均は、ドリフト補正の結果として計算することができ、この補正は、ドリフトマーカートレースの質によって重み付けされる。ドリフトマーカートレースの質は、限定されるものではないが、ドリフトマーカーの質又は個々の局在化の質を評価することによって質を決定することを含め、任意の適切な方法で決定することができる。一部の実施形態では、各ドリフトマーカートレースの質は、時系列のトレースの標準偏差（ $\sigma$ ）をとることによって計算される。各トレースのこの値の逆数（例えば、 $1/\sigma$ ）を重み因子として使用することができる。あるいは、時間トレース内の個々の局在化の質は、Thomson, 2002の式によって与えられ

40

50

る局在化不確実性として計算することができる。この計算の標準偏差の逆数を、各時間トレースの重み因子として使用することができる。ドリフト補正の決定後に、プロセスは動作 3 4 0 に進み、そこで、この決定されたドリフト補正を用いて画像が補正される。

#### 【0222】

ドリフト補正のこの段階は、任意の回数行うことができる。一部の実施形態では、このドリフト補正の段階は、各反復に使用される異なるパラメータで繰り返し行われる。ドリフト補正が進むにつれて、残りのドリフト振幅が次第に減少し、ドリフトマーカの空間的な広がりが次第に小さくなり、ドリフトマーカの選択をより厳密に行うことができる。この結果、最初の反復では、閾値ヒストグラムカウントをより低い値に設定することができ、この値を、後の反復中により高い値に調整することができる。加えて、一部の実施形態では、ドリフトマーカの有効面積及び寸法は、最初の反復でより大きい値に設定することができ、次の反復中により小さい値に調整される。なおさらに、一部の実施形態では、ドリフトマーカ間の分離は、次の反復で大きい値から小さい値に変更され得る。一部の実施形態では、(手動又は自動的に行われる)対話型の質のチェックを、さらなる作業の決定を容易にするために反復間で決定することができる。

10

#### 【0223】

イメージングの質によっては、このドリフト補正の段階は、典型的には、得られる画像の解像度を、最良の許容解像度の 2 倍以内に作る(即ち、個々の局在化の精度が、約 5 nm の解像度を可能にし、これにより、この段階で、通常は約 10 nm の解像度が得られる)。典型的には、良好なイメージングの条件では、この段階での処理の後に、解像度 < 10 nm を得ることができる。

20

#### 【0224】

ドリフト補正の第 4 の段階

ドリフト補正の第 4 の段階(例えば、図 13 の動作 2 4 0)は、ドリフトマーカ「鋳型」を使用し、従って、この段階は「鋳型ドリフト補正」と呼ばれる。1 つ以上のドリフトマーカ鋳型(例えば、ドッキング部位が既知の十分に分離された幾何学的配置にある DNA ナノ構造)が、段階 3 に関連して上記説明されたように、「通常の」ドリフトマーカと共にイメージング表面に配置される。これらのドッキング部位間の分離は、好ましくは、異なるドッキング部位からの局在化間の容易な分離が可能となるように、前の段階(例えば、段階 3)から得られる解像度の 2 倍よりも小さくならないように選択される。これらの鋳型におけるドッキング部位の数、及び表面におけるドッキング部位の濃度は、好ましくは、第 3 の段階で説明された補正と同様に、有効な鋳型補正が達成されるように選択される。

30

#### 【0225】

図 15 は、図 2 の段階 2 4 0 に対応するドリフト補正を行うためのプロセスを例示している。動作 4 1 0 では、複数のドリフト補正鋳型が、ムービーの全てのフレームに亘ってプールされた局在化の 2-D ヒストグラムから特定される。ドリフト鋳型を第 3 の段階で使用されるドリフトマーカと区別するために、上記の選択基準の範囲に加えて、ヒストグラムカウントの別の上限閾値を含めることができる。ドリフト鋳型が特定されたら、プロセスは動作 4 2 0 に進み、そこで、各ドリフト鋳型の時間トレースが決定される。ドッキング部位は、鋳型で十分に分離されるように設計されているため、個々のドッキング部位からのいくつかの非重複時間トレースを、全ドリフト鋳型の各時間トレースから分離することができる。この特定及び分離ステップは、画像全体からのドリフトマーカの特定と同様の方式で行うことができる。例えば、各ドリフト鋳型の個々の時間トレースの標準偏差に対する局所ヒストグラム閾値化とフィルタリングの組み合わせを使用することができる。

40

#### 【0226】

各ドリフト鋳型の時間トレースが決定された後に、プロセスは動作 4 3 0 に進み、そこで、時間トレースの組み合わせが、このドリフト補正の段階を決定するために使用される。一部の実施形態では、これは、各時間トレースの相対時間トレースを計算することによ

50

って達成され、この相対時間トレースが、ドリフト補正を決定するために少なくとも部分的に使用される。相対時間トレースは、ドリフト補正を決定するために任意の適切な方法で使うことができる。例えば、一部の実施形態では、個々のドッキング部位の全ての時間トレースの重み付き平均を平均して最終ドリフト補正を得ることができる。重み因子は、任意の適切な方法で決定することができる。例えば、重み因子は、個々の部位の質、又は時間トレースにおける個々の局在化の質に基づき得る。ドリフト補正の決定の後に、プロセスは動作 440 に進み、そこで、決定されたドリフト補正を用いて画像が補正される。

#### 【0227】

イメージングの質によっては、このドリフト補正の段階により、最終画像の解像度が、可能な最高の解像度に近づき得る。即ち、個々の局在化の精度が、約 5 nm の解像度を可能にする場合は、本明細書に記載の技術に従った鋳型ドリフト補正の実施により、約 6 nm に近い解像度を達成することができる。一部の実施形態では、第 3 の段階の後に < 10 nm の解像度が達成される場合、格子面間隔が 20 nm の 4 × 3 の格子に配置された 12 のドッキング部位を有する DNA ナノ構造をドリフト補正鋳型として使うことができる。このセクションに記載された技術を用いる鋳型ベースのドリフト補正は、この段階の後に 6 ~ 7 nm の解像度を達成することができる。

#### 【0228】

ドリフト補正の第 5 の段階

ドリフト補正の第 5 の段階（例えば、図 13 の動作 250）は、ドリフト補正トレースの平滑化を行い、平滑化されたドリフト補正トレースを、ドリフト補正を行うために使うことができる。例えば、上記の第 2、第 3、及び第 4 の段階の 1 つ以上のドリフト補正を決定した後に、得られたドリフト補正を任意の適切な技術を用いて平滑化して、最終のドリフト補正の結果を得ることができる。平滑化は、隣接するフレームの局在化を考慮することによって、各フレームにおけるドリフトマーカー又はドリフト鋳型の数を効果的に増加させることができる。平滑化は、任意の適切なウィンドウ期間を用いて任意の適切な方式で行うことができる。例えば、一部の実施形態では、平滑化は、特徴的なドリフト時間スケールによって決定されるウィンドウ期間に対して行われるロバストな局所回帰法で行われる。平滑化ウィンドウ期間の非限定の例は、10 ~ 30 秒であり得る。

#### 【0229】

3D イメージングへの拡張

上記の全ての段階は、3D 画像（例えば、超解像度画像）を補正するためにも直接適用することができる。3D 超解像イメージングでは、例えば、非点収差レンズをイメージングの経路に導入することができ、得られるガウス放射プロファイルの楕円率を使用して、分子の z 位置を決定することができる。上記の折り紙ドリフトマーカー構造（例えば、幾何学的に拘束された鋳型）を、ドリフト補正の段階を行うために 1 対 1 方式で使うことができる。鋳型ベースのドリフト補正段階の場合、画定された 3D 形状（例えば、四面体）を有する DNA 折り紙構造を使うことができる。

#### 【0230】

図 16 は、3D ドリフト補正の鋳型として使用される 3D 四面体を例示している。4 つの角が、ドッキング部位で標識されている。図 16 A は、4 つの角が明確に解像されていることを示している。図 16 B は、高さが約 85 nm の構造の X - Z 投影を例示している。

#### 【0231】

多色イメージングへの拡張

複数の時系列画像におけるドリフトの補正のための上記の技術は、画像における単色を用いて特定される一時的な事象のイメージングに関連して説明されている。しかしながら、これらの技術は、異なる一時的な事象（例えば、異なる核酸ドリフトマーカーのドッキング部位との結合）が、同じ画像で識別することができる異なる色で標識される多色イメージングに拡張することができることを理解されたい。多色イメージングが使用される場

10

20

30

40

50

合、鋳型ベースのドリフト補正のための上記の幾何学的鋳型は、異なる色に一致する異なる一時的な事象についての特定の既知のジオメトリを説明する情報を含み得る。例えば、 $3 \times 4$ の格子における単一ドッキング部位で生じる単一結合事象だけではなく、同じ幾何学的鋳型の異なる色を用いて色分けされた複数の結合事象を表現することができ、複数の結合事象からの情報を用いてドリフト補正を行うことができる。本明細書に記載の技術を多色イメージングに拡張するための他のプロセスも考えられ、実施形態は、これに関連して限定されるものではない。

#### 【0232】

例示的なコンピュータシステム

本明細書に記載の本開示の任意の実施形態に関連して使用することができるコンピュータシステム600の例示的な一実施が図17に示されている。コンピュータシステム600は、1つ以上のプロセッサ610及び1つ以上の非一時的なコンピュータ可読記憶媒体（例えば、メモリ620及び1つ以上の不揮発性記憶媒体630）を備えることができる。本明細書に記載の本開示の態様がこれに関連して限定されるものではないため、プロセッサ610は、メモリ620及び不揮発性記憶媒体630へのデータの書き込み及びこれらのメモリ620及び不揮発性記憶媒体630からのデータの読み取りを任意の適切な方式で制御することができる。本明細書に記載の任意の機能を果たすために、プロセッサ610は、1つ以上のコンピュータ可読記憶媒体（例えば、メモリ620）に保存された1つ以上の命令を実行することができ、この1つ以上のコンピュータ可読記憶媒体は、このプロセッサ610によって実行される命令を保存する非一時的なコンピュータ可読記憶媒体として機能し得る。

#### 【0233】

本開示の上記の実施形態は、様々な方法のいずれかで実施することができる。例えば、実施形態は、ハードウェア、ソフトウェア、又はこれらの組み合わせを用いて実施することができる。ソフトウェアで実施される場合、1つのコンピュータに提供されるか、又は複数のコンピュータ間に分配されるにかかわらず、ソフトウェアコードを、任意の適切なプロセッサ又は一群のプロセッサで実行することができる。上記の機能を果たす任意の構成要素又は一群の構成要素は、一般的に、上述の機能を制御する1つ以上の制御装置として見なすことができることを理解されたい。1つ以上の制御装置は、様々な方法、例えば、専用のハードウェアを用いて、又は上で言及された機能を果たすためにマイクロコード若しくはソフトウェアを用いてプログラムされた汎用ハードウェア（例えば、1つ以上のプロセッサ）を用いて実施することができる。

#### 【0234】

これに関連して、本開示の実施形態の一実施は、プロセッサで実行されると本開示の実施形態の上述の機能を果たす、コンピュータプログラム（即ち、複数の命令）で符号化された少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体（例えば、コンピュータメモリ、フロッピーディスク、コンパクトディスク、テープなど）を含むことを理解されたい。このコンピュータ可読記憶媒体は、この記憶媒体に保存されたプログラムを任意のコンピュータ資源にロードして、本明細書に記載の本開示の態様を実施することができるように転送可能であり得る。加えて、実行されると上述の機能を果たすコンピュータプログラムについての言及は、ホストコンピュータで動作するアプリケーションプログラムに限定されるものではないことを理解されたい。むしろ、コンピュータプログラムという語は、プロセッサをプログラムして本開示の上述の態様を実施するために利用することができる任意のタイプのコンピュータコード（例えば、ソフトウェア又はマイクロコード）を指すために本明細書で一般的に使用される。

#### 【0235】

均等物

いくつかの発明の実施形態は、本明細書に記載及び例示されるが、当業者であれば、機能を果たすため及び/又は本明細書に記載の1つ以上の利点及び/又は結果を得るために様々な他の手段及び/又は構造に容易に想到し、このような変形形態及び/又は変更形態

10

20

30

40

50

のそれぞれは、本明細書に記載の発明の実施形態の範囲内であると見なされる。より一般的には、当業者であれば、本明細書に記載の全てのパラメータ、寸法、材料、及び構成は、例示することが目的であり、かつ実際のパラメータ、寸法、材料、及び／又は構成は、発明の技術が使用される特定の１つ又は複数の用途によって決まることを容易に理解されよう。当業者であれば、本明細書に記載の特定の発明の実施形態の多数の均等物を、一般的な実験のみを用いて理解する、又は特定することができるであろう。従って、前述の実施形態が単なる例として表され、かつ添付の特許請求の範囲及びその均等物の範囲内で、発明の実施形態を、具体的に記載及び特許請求される以外の方法で実施できることを理解されたい。本開示の発明の実施形態は、本明細書に記載の個々の特徴、システム、製品、材料、キット、及び／又は方法に関する。加えて、このような特徴、システム、製品、材料、キット、及び／又は方法の２つ以上の任意の組合せは、このような特徴、システム、製品、材料、キット、及び／又は方法が相互に矛盾していない場合、本開示の発明の範囲内に含まれる。

10

#### 【０２３６】

本明細書で定義されて使用される全ての定義は、辞書による定義、参照により本明細書に組み入れられる文献中の定義、及び／又は定義済みの語の通常の意味に優先することを理解されたい。

#### 【０２３７】

本明細書に開示される全ての参考文献、特許、及び特許出願は、それぞれが言及される主題に関する参照により本明細書に組み入れられ、場合によっては文献全体を包含し得る。

20

#### 【０２３８】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される不定冠詞「１つの(a)」及び「１つの(an)」は、明確にこれに反する意味が記載されていないならば、「少なくとも１つ」を意味することを理解されたい。

#### 【０２３９】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される「及び／又は」という句は、等位接続された要素、即ち、ある場合には接続されて存在し、別の場合には離接されて存在する要素の「いずれか又は両方」を意味することを理解されたい。「及び／又は」を用いて列記される複数の要素は、同じ方式、即ち、「１つ以上の」結合された要素であると解釈されるべきである。具体的に特定された要素に関連する関連しないにかかわらず、「及び／又は」の節によって具体的に特定された他の要素が、任意選択で存在しても良い。従って、非限定の例として、「及び／又は」は、非限定の語、例えば、「含む(comprising)」に関連して使用される場合、一実施形態では、Aのみ(任意選択でB以外の要素を含む)；別の実施形態では、Bのみ(任意選択でA以外の要素を含む)；なお別の実施形態では、A及びBの両方(任意選択で他の要素を含む)などを意味し得る。

30

#### 【０２４０】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される「又は」は、上で定義された「及び／又は」と同じ意味を有することを理解されたい。例えば、項目が一覧の中で別々である場合、「又は」若しくは「及び／又は」は、包含的である、即ち、多数又は一覧の要素の少なくとも１つを含むが、２つ以上も含み、任意選択で一覧にない項目もさらに含むと解釈されるべきである。明確にこの逆を意味する「のみ」という語、例えば、「～の１つのみ」又は「～の正確に１つ」、又は請求項で使用される場合は「～からなる」は、多数又は一覧の要素の正確に１つの要素を含むことを指す。一般に、本明細書で使用される「又は」という語は、限定的な語、例えば、「いずれか」、「～の１つ」、「～の１つのみ」、又は「～の正確に１つ」が前にある場合は、限定的な代替(即ち、「一方又は他方であるが、両方ではない」)を意味するとのみ解釈されるものとする。「～から実質的になる」は、請求項で使用される場合、特許法の分野で使用される通常の意味を有するものとする。

40

#### 【０２４１】

50

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される、1つ以上の要素の一覧に関する「少なくとも1つの」という句は、この要素の一覧のいずれか1つ以上の要素から選択される少なくとも1つの要素を意味するが、この要素の一覧の中に具体的に列記された1つ1つの要素の少なくとも1つを必ずしも含む必要はなく、かつこの要素の一覧の要素の任意の組合せを排除するものではないことを理解されたい。この定義はまた、「少なくとも1つの」という句が言及する要素の一覧の中の具体的に特定された要素以外の要素が、この具体的に特定された要素に関連するかしないかにかかわらず、任意選択で存在し得ることを許容する。従って、非限定の例として、「A及びBの少なくとも1つ」（又は同様に「A又はBの少なくとも1つ」、又は同様に「A及び/又はBの少なくとも1つ」）は、一実施形態では、Bを含まずに、任意選択で2つ以上のAを含む、少なくとも1つのA（及び任意選択でB以外の要素を含む）；別の実施形態では、Aを含まずに、任意選択で2つ以上のBを含む、少なくとも1つのB（及び任意選択でA以外の要素を含む）；なお別の実施形態では、任意選択で2つ以上のAを含む、少なくとも1つのA、及び任意選択で2つ以上のBを含む、少なくとも1つのB（及び任意選択で他の要素を含む）などを意味し得る。

10

#### 【0242】

また、明確に反する記載がなければ、2つ以上のステップ又は動作を含む、本明細書で請求されるあらゆる方法では、方法のステップ又は動作の順序は、この方法のステップ又は動作が列挙される順序に必ずしも限定されるものではないことを理解されたい。

#### 【0243】

20

特許請求の範囲及び上記の説明では、全ての移行句、例えば、「含む（comprising）」、「含む（including）」、「有する（carrying）」、「有する（having）」、「含む（containing）」、「含む（involving）」、「保持する（holding）」、及び「～構成される（composed of）」などは非限定である、即ち、限定されないが含むことを意味すると理解されたい。米国特許商標庁特許審査手続マニュアル（United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures）のセクション2111.03に記載されるように、「～からなる（consisting of）」及び「～から実質的になる（consisting essentially of）」の移行句のみがそれぞれ、限定又は半限定の移行句であるものとする。

#### 【実施例】

#### 【0244】

30

#### 実施例

#### 実施例1：細胞イメージング

固定細胞における細胞内成分の多重化超解像イメージングを、ドッキング鎖の抗体への結合によって達成した（図2）。これらの抗体-DNAコンジュゲートを、まずビオチン化ドッキング鎖をストレプトアビジンと反応させ、次いで目的のタンパク質に対するビオチン化抗体をインキュベートすることによって形成した。次いで、固定HeLa細胞を、-チューブリンに対する予備構築抗体-DNAコンジュゲートを用いて免疫染色した。イメージングの前に、ATTO655標識イメージャー鎖を、ハイブリダイゼーション緩衝液（500mMのNaClが添加された1×PBS）中のサンプルに導入し、単一分子イメージングを、斜照明を用いて行った（9）。得られた超解像度画像は、回折限界表現とは対照的に空間解像度の明確な増加を示している（図3a～図3c）。図3Bの位置< i >で撮影された断面プロフィールは、微小管のそれぞれが約47及び約44nmの見かけ上の幅を有する2つの隣接する微小管間に約79nmの距離を示し、これは、免疫染色された微小管の以前の報告に一致している（13）。本開示の抗体-DNAコンジュゲーションのアプローチは、高い標識密度をもたらし、イメージャー鎖の非標識細胞成分への非特異的な結合が殆ど又は全く起こらない。

40

#### 【0245】

直交イメージャー鎖配列がスペクトルの異なる色素に結合する本開示の標識スキームの多色への拡張を実証するために、固定HeLa細胞における微小管網を、Cy3b-標識鎖のドッキング配列を有する予備構築抗体-DNAコンジュゲートで標識し、ミトコンド

50

リアを、A T T O 6 5 5 イメージャー配列の直交配列に連結された第2の抗体を用いて染色した。C y 3 b - 標識イメージャー鎖及びA T T O 6 5 5 標識イメージャー鎖の両方が溶液中に同時に存在し、イメージングを、C y 3 b チャンネル及びA T T O 6 5 5 チャンネルの両方で連続的にを行い、得られた超解像度画像は、回折限界表現と比較して空間解像度の明確な増加を示した(図3 d ~ 図3 f)。単色の場合と同様に、細胞環境でのイメージャー鎖の非標識成分への非特異的な結合は殆ど又は全く観察されなかった。加えて、in vitroの場合と同様に、2色間にクロストークが全く観察されず、イメージャー鎖の配列特異的相互作用を示唆した。

【0246】

実施例2：多重化

一定の局在化精度と仮定すると、イメージング解像度で直接2倍の増加を容易に達成することができる。これは、イメージングスポットを、実際の現在の解像度限界よりもさらに離れた同じドッキング鎖配列(例えば、図4のドッキング部位a)で間隔を空け、これにより、これらの部位を超解像度画像における単一スポットとして明確に特定することによって実現することができる。ここで、全ての得られた局在化を特定の部位に割り当てることができるため、得られるイメージング解像度は、再構築されたスポットの半値全幅(FWHM)ではなくなり、標準偏差(FWHMの約2.35分の1の大きさ)となる。これは、図4 B 1に示されており、10 nmの間隔の7つの点のセットが、約14 nmの解像度で画像化され、個々の点が解像不可能のまま残る。断面ヒストグラムデータは、幅広いピーク(底部)を示した。図4 B 2及び図4 B 3では、1つおきの部位ごとのイメージングにより、個々のスポットの局在化が可能となった。次いで、これらの局在化を組み合わせ、解像度が増加した最終複合画像を形成した。

【0247】

図5 Aは、それぞれ数字の0~3に類似するように設計された4つの異なるDNA配列のセットを表示する単一DNAナノ構造を示している。イメージングを、単純な流動チャンバの構成を用いて連続的にを行い、数字の0のドッキング鎖に相補的なイメージャー鎖で最初のフラッシュを行い、次いで、イメージャー鎖の溶液を、数字の1のドッキング鎖に相補的な配列の溶液と交換し、他の数字でもこのステップを続ける。得られた画像を、それぞれのイメージングの回を示すために疑似着色した。DNA折り紙構造を用いる実証は、高いイメージング効率、及び連続するイメージング動作間にクロストークがないことを示した。

【0248】

Exchange - PAINTを用いたDNA構造の10「色」超解像イメージングを実証するために、それぞれが数字の0~9に類似した直交ドッキング鎖の異なるパターンを表示する、10の独自の長方形DNA折り紙構造を設計した(パターン「4」については図5(i i)を参照)。10全ての構造の表面固定の後、連続的なイメージングを、液体の取り扱いを容易にする特注の流動チャンバ(図2 3 A)を用いて行った。全てC y 3 bで標識された10の直交イメージャー鎖(P 1 \* ~ P 1 0 \*)を使用してExchange - PAINTを行った。10回の全てのイメージングで得られた数字が図5 B(v)に示されている。各標的は、高い空間解像度で解像されている。数字のバーに沿った断面ヒストグラムは、10 nm以下のFWHMの分布を示している(データは不図示)。同じ最適化色素(C y 3 b)及びイメージング条件が各サイクルで使用されているため、高い解像度が全ての数字で維持されていることに留意されたい。

【0249】

図5 B(i i i)は、10回の全ての組み合わせ画像を示し、サイクル間に観察可能なクロストークが存在しないイメージャー鎖とそれぞれの標的との特異的な相互作用を実証している。数字の8及び9は、選択された領域に存在していない。2ではなく明らかな「緑色の」数字の5が観察された(図5 B(i i i)では< i >)。これは、クロストークから誤って画像化された数字の5ではなく、むしろ数字の2の「鏡像」であるようである。鏡像は、ドッキング鎖が下に捕捉され、それでもなおイメージャー鎖にアクセス可能で

10

20

30

40

50

ある、逆さに固定された折り紙から生じる可能性が高い。

#### 【0250】

流動構成は、流体タンク及びシリンジを可撓性チューブを介して実際の流動チャンバから「分離する」ことによってサンプルの動きを最小限するように設計されている。サンプルの歪みを回避するために、洗浄ステップ中に流体の流れが緩やかになるように特別な注意を払った。サンプルが、実際に殆ど動きを示さず、殆ど又は全く歪まないのを検証するために、Exchange - PAINT実験を10回行った。DNA折り紙を、1回目に数字の4で画像化し、10回の緩衝液の交換後に再び画像化した。サンプルの全体の動き（物体に対する流動チャンバの物理的な動き）は2  $\mu$ m未満であり、基準マーカで容易に補正することができる。選択された構造の正規化相互相関分析は、0.92の相関係数を示し、サンプルの歪みが殆どないことを実証している（細胞イメージングのセクションの記述も参照されたい）。

10

#### 【0251】

最後に、Exchange - PAINTを用いて、4つの異なる数字のパターンを、同じDNA折り紙構造上で画像化するのに成功した（図5B（iv））。従って、Exchange - PAINTは、空間的に分離された種に限定されるものではなく、観察可能なクロストーク又はサンプルの歪みなしで同じ構造における回折パターン以下を解像することができる。異なるExchange - PAINTの回からの画像の整合は、DNA折り紙ベースのドリフトマーカを用い、単純である。加えて、イメージングは、同じ色素を用いて行われるため、色収差をイメージングの回の間で補正する必要がない。

20

#### 【0252】

本開示の方法の細胞環境への適用性を、図3に類似しているが、単色フルオロフォアのみ又はスペクトルの異なるイメージャー鎖を用いて固定HeLa細胞の微小管及びミトコンドリアを標的にすることによって示した。イメージングは、同じ色素で標識されたイメージャー鎖を用いて連続的に行った（2回、図6）。

#### 【0253】

##### 実施例3：定量的イメージング

本開示の定量的方法の実行可能性を実証するために、格子状の配置で13の結合部位を備えたDNA折り紙ナノ構造を使用した（図7C）。ドッキング部位の取り込み効率は100%ではなく、実際に取り込んだ部位の分布となる（図7C及び図7D1）。それでもなお、スポットの数を（直接）カウントして、この数を、推奨される結合キネティック分析を用いて計算された部位の対応する数と比較することによって利用可能な部位の数（キネティクス）を視覚的に決定することができるため、この構造は理想的な試験システムであった。図7D1は、直接のカウントによって得られた377の折り紙構造の結合部位の分布を示している。結合キネティック分析によって得られた同じ構造の結合部位の分布は図7D2に示されている。最後に、ベンチマークとして、直接のカウントとキネティックカウントとの間の「オフセット」を各構造について計算した。この方法のカウント「エラー」又は不確実性は、約25分のイメージング時間では7%未満であった（ガウス分布の変動係数によって決定）。

30

#### 【0254】

##### 実施例4：キネティックバーコーディング

高多重化超解像バーコーディングを、幾何学的符号化又はスペクトル符号化ではなく、結合頻度分析によって得た。BP - NAコンジュゲート、又はドッキング鎖の目的の分子への結合頻度は、この分子の結合部位の数に線形従属する。蛍光標識イメージャー鎖の特定の濃度及び会合速度が与えられると、結合頻度は、結合部位の数と共に線形に変化し、従って、識別に使用することができる。例えば、124の異なる動的「明滅シグネチャ」を、3色と、1色当たり4つのレベルの結合頻度を用いて作成した（図8）。幾何学的符号化と比較すると、このアプローチは、遥かに小型の非構造プローブが特徴である。スペクトル符号化（14）と比較すると、本開示の方法は、よりコスト効率が良く、測定可能であり、かつ実施が容易である。この頻度符号化法には、3つの蛍光標識イメージャー鎖

40

50



のみが必要であり、高スループットスクリーニング実験にとって非常にコスト効率が良い。DNA折り紙試験構造におけるin vitro試験が図8Cに示されている。

#### 【0255】

利用可能な結合部位の数を決定して分子にバーコードを付けるために事象間期間 (inter-event lifetime)  $\tau_d$  又は結合頻度を使用することに加えて、蛍光ON時間又は  $\tau_b$ 、従って解離定数  $k_{off}$  を使用して情報を符号化することもできる。 $k_{off}$  は、ドッキング鎖及びイメージャー鎖の二本鎖の塩基成分及び/又は長さによって正確に調整することができる。このアプローチの実行可能性は、図9に例示されており： $1/\tau_d$  及び  $1/\tau_b$  が、ドッキング/イメージャー二本鎖の長さに対してプロットされている。 $1/\tau_d$ 、従って  $k_{on}$  は、二本鎖安定性に依存する。しかしながら、1つのCG塩基対の付加によるイメージャー/ドッキング二本鎖の9ntから10ntへの伸長により、キネティックOFF速度がほぼ1桁低下する。

#### 【0256】

最後に、イメージャー/ドッキング二本鎖の熱力学的安定性の差異を検出するために本発明者の能力を使用する「マイクロバーコード」、最小バーコードを、経済的な短い非構造プローブを用いて多数の分子を識別するために作製した。このバーコードは、約50ntの長さの1つのDNA分子のみを含み、このDNA分子は、赤色、緑色、又は青色のイメージャー鎖の8、9、又は10ntの長さの結合ドメインの組み合わせを含む約30ntの長さの「バーコード」領域が続く21ntの標的検出ドメイン $t^*$  (図10A)を用いて目的の分子を標識するために使用される。僅か30ntの長さにもかかわらず、このバーコード領域を用いて、3つのスペクトルの異なる色及び3つの熱力学的に異なる配列の長さのみで $3^3 = 27$ の異なるバーコードを表現することができる。図10は、 $k_{off}$  がそれぞれ1秒当たり10、1、及び0.1の3つの色の8、9、又は10ntの長さのドッキング鎖を例示している。図10Aは、赤色イメージャー鎖用の8ntの長さの結合ドメイン、緑色イメージャー鎖用及び青色イメージャー鎖用の2つの9ntの長さの結合ドメインからなるバーコードの一例を示している。これが、8ntの相互作用ドメインと比較して9ntの相互作用ドメインで蛍光ON時間 $\tau_b$ が増加した特徴的な時間トレースに対する強度をもたらしている (図10B)。確率的シミュレーションが、それぞれ1秒当たり10、1、及び0.1の $k_{off}$  値を区別することが明らかに可能であることを示している (図10C)。

#### 【0257】

実施例5：遺伝的に符号化された生細胞超解像イメージング

蛍光イメージングの重要な利点は、生細胞における生体分子のプロセスを可視化する潜在力にある。しかしながら、生細胞超解像イメージングの実証には課題が存在する (参考文献22~22)。このような1つの課題は、適切なイメージング条件を可能にすると共に生体適合性に十分な濃度の合成イメージングプローブの生細胞への送達にある。別の課題は、高分子の密集が固定細胞環境と比較してより重要な因子であり得る生細胞環境における非結合プローブのバックグラウンド蛍光の程度であり、「生」ヘリカーゼ (“live” helicase) が、結合キネティクスに影響を与える。

#### 【0258】

本開示は、生細胞中の標的分子に特異的に結合することができ、結合したときにのみ蛍光を開始して明滅し、特定の標的の超解像イメージングを可能にする遺伝的に符号化されたRNAプローブを利用することによってこれら及び他の課題に取り組んでいる。

#### 【0259】

この条件付き「明滅」プローブは、標的結合ドメイン (TBD) 及び条件付き明滅ドメイン (CBD) を有する小さい一本鎖RNA (<100nt) である。CBDは、TBDの機械制御下であり、TBDが標的Tに結合していないときは暗い。TBDの標的「T」への結合により、CBDが再構築され、Tの超解像イメージングに適した強度及び頻度でCBDを明滅させることができる。

#### 【0260】

明滅RNAプローブは、Spinachアプタマー系（参考文献19）、GFPの蛍光RNA模倣体に基づいている（図19）。Spinachは、当初は暗い小分子DFHBI（DMHB Iに類似）の蛍光を発光させることができ、この小分子DFHBIは、非毒性であり、かつ細胞透過性である。Spinachを標的RNAにタグ付けすることにより、細菌及び哺乳動物細胞中での標的RNAの発現を画像化することができる（参考文献19）。

#### 【0261】

小分子DFHBIは、Spinachに結合及び解離するため、蛍光ON状態と蛍光OFF状態を交互させる。得られる明滅挙動は、超解像蛍光顕微鏡法を行うために使用し、この蛍光顕微鏡法は、本明細書では「Spinach - PAINT」と呼ぶ（図20）。殆どの生細胞超解像イメージング技術とは異なり、Spinach - PAINTは、特殊なイメージング条件、例えば、特殊な緩衝系又は外部の光スイッチング若しくは活性化を必要としない。より重要なことに、DFHBIは、小さい細胞透過性分子であり、生細胞の非毒性イメージングを実現することを示している。超解像イメージングに必要な「明滅」挙動は、溶液中のDFHBI濃度を調整して、イメージング鎖のそのパートナーとのDNA - DNA結合相互作用を調整する概念と同じ概念でDFHBIのSpinachへの結合を促進/減弱させるためにSpinachを修飾/突然変異させて、蛍光ON時間と蛍光OFF時間とを交互させることによって得ることができる。単一分子測定に基づいたDFHBIの表面固定Spinachへの結合キネティクスを特徴付けて最適化することが可能である（図20）。結合キネティクスを、一時的な結合に基づいた超解像顕微鏡法で適合性についてチェックする。

#### 【0262】

超解像イメージング用の最適化明滅特性を有するspinach変異体を作製する：DNA - PAINTに基づいて、開始点で、約2Hzのレートで生じる、少なくとも50ミリ秒のON時間を示すSpinach変異体を得る。Spinachは、 $0.02 \text{ s}^{-1}$ の $k_{off}$ を示し、約50秒の滞留時間となることが分かった。これは、超解像イメージングに必要な時間よりも著しく長い。 $1 \sim 20 \text{ s}^{-1}$ の $k_{off}$ を有するSpinach変異体を見つけるために、各位置のSpinachで見られるdNTPと他の3つのdNTPを2:1:1:1の比率で含むdNTP混合物を用いてSpinach変異体の「ドーピング」ライブラリ（“doped” library）を調製する。このアプローチは、典型的には、アプタマー配列（SELEX）（参考文献23）を最適化するために使用される。次いで、Spinach変異体を、DFHBI滞留時間の短い変異体についてスクリーニングする。5～10回のSELEXの後、クローンをそれぞれ特徴付ける。第1のステップでは、全てのSpinach変異体が、DFHBIに結合時に相当な量子収率及び吸光係数のSpinach様蛍光をなお示すことを確認する。一般に、アプタマーと小分子との間の結合相互作用を弱めることは強めることよりも容易である。

#### 【0263】

第2のステップでは、単一分子イメージングによってこれらのSpinach変異体の結合及び解離速度定数を測定する。正確な超解像イメージングを得るために十分な光子カウントを提供する結合持続時間を示すSpinach変異体が選択される。

#### 【0264】

明滅頻度を最適化するために、本発明者らは、RNA - フルオロフォア複合体の形成のレートが $k_{on}$ 及びDFHBIの濃度の両方によって決まるため、DFHBIで滴定し、5～10Hzの明滅レートをもたらす濃度を特定する。最後に、本発明者らは、超解像イメージングに必要な最適化された明滅を示すSpinach変異体のセットを特定する。

#### 【0265】

試験プラットフォームとして、本発明者らは、DNAベースのナノ構造（例えば、DNA折り紙によって形成されたナノ構造）のin vitro「イメージング」によるSpinach - PAINTの超解像能力を最適化する。DNA折り紙基質は、定められた距離及び幾何学的配置に複数のSpinach分子を配置するためのプログラム可能な環境を提供する利点を有する。このナノスケールのルーラーシステム（ruler system）により、本発明者らが、この超解像イメージング技術の達成可能な解像度を正確に定量することが可能となる（図21）。

#### 【0266】

細胞骨格タンパク質の超解像イメージングのための、チューブリンに結合すると明滅を示すRNA：代謝産物（参考文献24）及びタンパク質（参考文献25）によって活性化されるSpinachベースのセンサを作製した。この開示のアプローチは、本明細書に記載のチューブリン結合アプタマー及び明滅Spinach変異体を用いた、チューブリンの結合によって活性化されるSpinachベースのセンサを作製するために使用する。

【0267】

Spinachのアロステリック型は、目的の標的に結合するアプタマーからなる「制御」又は「検出」モジュールに融合した修飾Spinachアプタマードメインから構成されている（参考文献24）。標的の結合により、修飾Spinachアプタマーの「活性」構造へのアロステリックな折り畳みが起こり、DFHBI結合及び蛍光発光が可能となる（図22）。いくつかのチューブリン結合DNAアプタマーが説明されている（参考文献26）。この開示は、既に確立されたプロトコルを用いてチューブリンを検出することができるSpinach用の制御モジュールの進展を実現する。簡単に述べると、候補アプタマーは、Spinachに融合してチューブリン依存性のSpinach蛍光を達成し、（*in vitro*でCy5標識され、重合される）チューブリンの存在下でのみSpinach活性化が検証される。

【0268】

*in vitro*イメージングについて試験された超解像条件に基づいた、上記のように作製された条件付きSpinachプローブを用いることにより、Spinach-PAINTを、例えば、哺乳動物生細胞の微小管の超解像イメージングに使用することができる。

【0269】

実施例6：流動チャンバ

図23Aは、本明細書に記載される、*in vitro* DNA折り紙実験に使用される実験構成の一例を示している。このサンプルは、PDMSチャネルのガラスカバースリップに固定されている。イメージング緩衝液及び洗浄緩衝液を容器に入れ、シリンジによってチャネルを介して引き込む。容器及びシリンジは、可撓性チューブを介してPDMSチャネルに接続され、従って、機械的に取り外される。図23Bは、*in situ*細胞イメージングに使用される実験構成を示している。細胞は、Lab-Tek IIチャンバで画像化される。一方のシリンジが、新しい緩衝液を供給し、第2のシリンジが、前の緩衝液を除去する。

【0270】

例えば、図23A及び図23Bに示されている流動チャンバを用いるExchange-PAINTイメージングの例示的なプロトコルは次の通りである：

PDMS流動チャンバの容量：40  $\mu$ l

- ・流動チャンバを100  $\mu$ lの1M KOHですすぐ
- ・流動チャンバを100  $\mu$ lの緩衝液Aで2回ですすぐ
- ・5分間インキュベートする
- ・流動チャンバを100  $\mu$ lの緩衝液Aですすぐ
- ・流動チャンバを、緩衝液A中、50  $\mu$ lの1mg/ml BSA-ビオチンですすぐ
- ・2分間インキュベートする
- ・流動チャンバを、緩衝液A中、50  $\mu$ lの1mg/ml BSA-ビオチンですすぐ
- ・2分間インキュベートする
- ・流動チャンバを100  $\mu$ lの緩衝液Aで2回ですすぐ
- ・流動チャンバを、緩衝液A中、50  $\mu$ lの0.5mg/ml ストレプトアビジンですすぐ
- ・2分間インキュベートする
- ・流動チャンバを、緩衝液A中、50  $\mu$ lの0.5mg/ml ストレプトアビジンですすぐ
- ・2分間インキュベートする
- ・流動チャンバを100  $\mu$ lの緩衝液Aで2回ですすぐ
- ・流動チャンバを100  $\mu$ lの緩衝液Bで2回ですすぐ
- ・30分間インキュベートする

- ・流動チャンバを100  $\mu$ lの緩衝液Bで2回すすぐ
- ・流動チャンバを、緩衝液B中、50  $\mu$ lの1 nM折り紙ですすぐ
- ・10分間インキュベートする
- ・流動チャンバを100  $\mu$ lの緩衝液Bで2回すすぐ
- ・チューブを取り付ける
- ・緩衝液Bで行う。

#### 【0271】

##### 追加の材料及び方法

材料。未修飾DNAオリゴヌクレオチドをIntegrated DNA Technologiesから購入した。蛍光修飾DNAオリゴヌクレオチドをBiosynthesisから購入した。 - チューブリンに対するビオチン化モノクローナル抗体(9F3; カタログ番号: 6181)及びCOX IVに対するビオチン化モノクローナル抗体(3E11; カタログ番号: 6014)をCell Signalingから購入した。抗PMP70(カタログ番号: ab28499)をAbcamから購入した。抗TGN46(カタログ番号: NBP1-49643B)をVWRから購入した。ストレプトアビジンをInvitrogenから購入した(カタログ番号: S-888)。ウシ血清アルブミン(BSA)及びBSA-ビオチンをSigma Aldrichから得た(カタログ番号: A8549)。スライドガラス及びカバースリップをVWRから購入した。Lab-Tek II チャンバ付きカバーガラスをThermo Fisher Scientificから購入した。M13mp18足場をNew England Biolabsから得た。微小管様DNA折り紙構造用のp8064足場を、19に記載されているように調製した。「Freeze N Squeeze」カラムをBio-Radに注文した。TetraSpeck BeadsをLife Technologiesから購入した。パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、及びTEM格子(FORMVAR 400 Mesh Copper Grids)をElectron Microscopy Sciencesから得た。3つの緩衝液をサンプルの調製及びイメージングに使用した: 緩衝液A(10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、0.05% Tween-20、pH 7.5)、緩衝液B(5 mM Tris-HCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA、0.05% Tween-20、pH 8)、及び緩衝液C(1x PBS、500 mM NaCl、pH 8)。

#### 【0272】

光学構成。蛍光イメージングを、油浸対物レンズ(CFI Apo TIRF 100x、NA 1.49、Oil)を備えるNikonのTIRF照明器を用いる対物型TIRF構成を利用して、Perfect Focus Systemを用いて倒立Nikon Eclipse Ti顕微鏡(Nikon Instruments)で行った。2Dイメージングの場合は、107 nmの画素サイズに一致する約150倍の最終倍率を得るために追加の1.5の倍率を使用した。励起のために3つのレーザーを使用した: 488 nm(200 mW公称、Coherent Sapphire)、561 nm(200 mW公称、Coherent Sapphire)、及び647 nm(300 mW公称、MBP Communications)。レーザービームを、浄化フィルタ(ZT488/10、ZET561/10、及びZET640/20、Chroma Technology)に通して、マルチバンドビームスプリッター(ZT488rdc/ZT561rdc/ZT640rdc、Chroma Technology)を用いて顕微鏡対物レンズに結合した。蛍光を、発光フィルタ(ET525/50m、ET600/50m、及びET700/75m、Chroma Technology)を用いてスペクトルフィルタリングし、EMCCDカメラ(iXon X3 DU-897、Andor Technologies)で撮影した。

#### 【0273】

DNA折り紙自己集合。微小管様DNA折り紙構造を、折り畳み緩衝液(20 mM MgCl<sub>2</sub>を含む1x TAE緩衝液)中、10 nM足場鎖(scaffold strand)(p8064)、500 nM折り畳みステーブル(folding staple)及びビオチンハンドル(biotin handle)、750 nMビオチン抗ハンドル(biotin anti-handle)、及び1.1  $\mu$ M DNA-PAINTドッキング鎖を含む40  $\mu$ lの総量でワンポット反応で形成した。この溶液を、15時間に亘る80 から14 に冷却するサーマルランプ13(thermal ramp 13)を用いてアニーリングした。自己集合後、モノマー構造を、1.5時間の4.5 V/cmでのアガロースゲル電気泳動法(1.5%アガロース、0.5x TBE、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1x Sybr Safe)によって精製した。ゲルバンドをカットし、粉碎し

10

20

30

40

50

、及び「Freeze 'N Squeeze」カラムに充填し、4 で5分間、1000×gで回転させた。重合を、折り畳み緩衝液中、5倍過剰の重合ステーブル (polymerization staple) で、30 で48時間行った。重合構造を、さらなる精製なしでイメージングに使用した。DNA折り紙ドリフトマーカーは、ワンポット反応 (総量40 µl、20 nM M13 mp18足場、100 nMビオチン化ステーブル (biotinylated staple)、DNA-PAINTドッキング部位を含む530 nMステーブル、12.5 mM MgCl<sub>2</sub>を含む1×TAE) で自己集合した。自己集合構造を前述のように精製した。4「色」in vitro Exchange-PAINT実証用のDNA折り紙構造が、ワンポット反応 (総量40 µl、30 nM M13 mp18足場、470 nMビオチン化ステーブル、数字イメージング用のドッキング部位を含む400 nMステーブル、370 nMコア構造ステーブル (core structure staple)、12.5 mM MgCl<sub>2</sub>を含む1×TAE) で自己集合した。自己集合構造を前述のように精製した。10「色」in vitro Exchange-PAINT実証用のDNA折り紙構造が、ワンポット反応 (総量40 µl、30 nM M13 mp18足場、36 nMビオチン化ステーブル、数字イメージング用のドッキング部位を含む750 nMステーブル、300 nMコア構造ステーブル、12.5 mM MgCl<sub>2</sub>を含む1×TAE) で自己集合した。この構造を精製しなかった。過剰なステーブルを、構造の表面への固定の後にサンプルから洗い落とした。微小管様DNA折り紙構造用のDNA鎖配列は、表1で確認することができる。DNA折り紙ドリフトマーカー用のDNA鎖配列は、表2で確認することができる。10「色」in vitro Exchange-PAINT実証用のDNA折り紙構造用のDNA鎖配列は、奇数の数字を表3で、偶数の数字を表4で確認することができる。in vitro Exchange-PAINT実証用のDNA折り紙構造のためのDNA鎖配列 (数字の0~3) は、表5で確認することができる。p8064及びM13 mp18用の足場配列はそれぞれ、配列番号: 882及び883に一致している。DNA-PAINTイメージャー及びドッキング配列並びにビオチンを介した表面付着用の配列は表6に列記されている。

#### 【0274】

抗体-DNAコンジュゲート。目的のタンパク質をDNA-PAINTドッキング部位で特異的に標識するために使用される抗体-DNAコンジュゲートを、2つのステップで予め形成した: まず、3.2 µlの1 mg/ml ストレプトアビジン (緩衝液Aに溶解) を、0.5 µlの100 µMビオチン化DNA-PAINTドッキング鎖及び追加の5.3 µlの緩衝液Aと、ゆっくりと振盪させながら30分間、室温 (RT) で反応させた。次いで、溶液を第2のステップで、目的のタンパク質に対する1 µlの1 mg/mlモノクローナルビオチン化抗体と共に30分間、室温でインキュベートした。フィルタカラム (Amicon 100 kDa、Millipore) を使用して、未反応ストレプトアビジン-オリゴコンジュゲートから予め形成されたコンジュゲートを精製した。

#### 【0275】

細胞免疫染色。HeLa及びDLD1細胞を、ペニシリン及びストレプトマイシンを含む10% FBSで強化されたイーグル最小必須培地で培養し、37 で、5% CO<sub>2</sub>を用いてインキュベートした。1ウェル当たり約30%コンフルエンスの細胞を、固定の24時間前にLab-Tek IIチャンバ付きカバーガラスに播種した。微小管、ミトコンドリア、ゴルジ複合体、及びペルオキシソームを、以下の手順で免疫染色した: PBSで洗浄する; PBS中、3%パラホルムアルデヒド及び0.1%グルタルアルデヒドの混合物で10分間固定する; PBSで3回洗浄する; 約1 mg/ml NABH<sub>4</sub>で7分間、還元する; PBSで3回洗浄する; PBS中、0.25% (v/v) Triton X-100で10分間、透過処理する; PBSで3回洗浄する; 3% (w/v) ウシ血清アルブミンで30分間ブロックし、-チューブリン、COX IV、PMP70、又はTGN46に対する予め形成された抗体-DNAコンジュゲートで一晩染色する (コンジュゲートは、5% BSA中、10 µg/mlに希釈した); PBSで3回洗浄する; PBS中、3%パラホルムアルデヒド及び0.1%グルタルアルデヒドの混合物で10分間、後固定する; そしてPBSで3回洗浄する。

#### 【0276】

微小管様DNA折り紙構造の超解像DNA-PAINTイメージング。サンプルの調製では、1枚のカバースリップ(No. 1.5、 $18 \times 18 \text{ mm}^2$ 、約 $0.17 \text{ mm}$ の厚さ)及びスライドガラス( $3 \times 1 \text{ インチ}^2$ 、 $1 \text{ mm}$ の厚さ)を、両面テープの2つのストリップによって互いに挟んで、約 $20 \mu\text{l}$ の容積の流動チャンバを形成した。まず、 $20 \mu\text{l}$ のビオチン標識ウシアルブミン( $1 \text{ mg/ml}$ 、緩衝液Aに溶解)を、チャンバに流し込んで2分間インキュベートした。次いで、チャンバを $40 \mu\text{l}$ の緩衝液Aで洗浄した。次いで、 $20 \mu\text{l}$ のストレプトアビジン( $0.5 \text{ mg/ml}$ 、緩衝液Aに溶解)をチャンバに流し込んで、2分間結合させた。 $40 \mu\text{l}$ の緩衝液Aでの洗浄、及びこれに続く $40 \mu\text{l}$ の緩衝液Bでの洗浄後、緩衝液B中、 $20 \mu\text{l}$ のビオチン標識微小管様DNA構造(約 $300 \text{ pM}$ モノマー濃度)及びDNA折り紙ドリフトマーカ(約 $100 \text{ pM}$ )を最終的にチャンバに流し込んで5分間インキュベートした。チャンバを、 $40 \mu\text{l}$ の緩衝液Bで洗浄した。最終イメージング緩衝液は、緩衝液B中、 $1.5 \text{ nM}$  Cy3b標識イメージャー鎖を含んでいた。次のイメージングの前に、チャンバをエポキシで密封した。CCD読み取り帯域幅を、16ビットで $1 \text{ MHz}$ 、及び5.1のプリアンプ利得に設定した。EM利得は使用しなかった。イメージングを、 $561 \text{ nm}$ で $294 \text{ W/cm}^2$ の励起強度のTIR照明を用いて行った。

#### 【0277】

DNAナノ構造の超解像Exchange-PAINTイメージング。流体交換のために、特注の流動チャンバを形成した。詳細な調製プロトコルは、実施例6で確認することができる。イメージングチャンネルをBSA-ビオチンで機能させる前に、洗浄のために $1 \text{ M}$  KOHですすいだ。折り紙構造の流動チャンバの表面への結合を前述のように行った。各画像取得ステップの後に、それぞれ $200 \mu\text{l}$ の緩衝液Bを用いた少なくとも3回の洗浄からなる短い約1~2分の洗浄ステップを行った。次いで、次のイメージャー鎖溶液を導入した。洗浄手順の間、イメージャー溶液の完全な交換が行われるように表面を監視した。10全ての標的が画像化されるまで、取得及び洗浄ステップを繰り返した。CCD読み取り帯域幅を、14ビットで $3 \text{ MHz}$ 、及び5.1のプリアンプ利得に設定した。EM利得は使用しなかった。イメージングを、 $561 \text{ nm}$ で $166 \text{ W/cm}^2$ (緩衝液B中、 $3 \text{ nM}$  Cy3b標識イメージャー鎖を用いた10「色」Exchange-PAINT、図5B(iii)及び図5B(v))及び $647 \text{ nm}$ で $600 \text{ W/cm}^2$ (緩衝液B中、 $3 \text{ nM}$  ATTO655標識イメージャー鎖を用いた4「色」Exchange-PAINT、図5B(iv))の励起強度のTIR照明を用いて行った。

#### 【0278】

細胞の超解像DNA-PAINTイメージング。全てのデータを、14ビットで $5 \text{ MHz}$ 、5.1のプリアンプ利得、及び255の電子増倍利得のEMCCD読み取り帯域幅で得た。イメージングは、HIL照明11を用いて行った。レーザー出力密度は、図3Aでは $647 \text{ nm}$ で $283 \text{ W/cm}^2$ 、図3Dでは $647 \text{ nm}$ で $142 \text{ W/cm}^2$ 、及び $561 \text{ nm}$ で $19 \text{ W/cm}^2$ であった。イメージング条件：図3A：緩衝液C中、 $700 \text{ pM}$  ATTO655標識イメージャー鎖。図3D：緩衝液C中、 $600 \text{ pM}$  Cy3b標識イメージャー鎖及び $1.5 \text{ nM}$  ATTO655標識イメージャー鎖。

#### 【0279】

細胞の超解像Exchange-PAINTイメージング。Lab-Tek IIチャンバを、流体交換のために適合した。2D画像(図6B及び図6C)を、14ビットで $5 \text{ MHz}$ 、5.1のプリアンプ利得、及び255のEM利得のEMCCD読み取り帯域幅で得た。3D画像(図6)を、154ビットで $3 \text{ MHz}$ 、5.1のプリアンプ利得、及びEM利得なしのCCD読み取り帯域幅で得た。いずれの場合も、イメージングはHIL照明を用いて行った。連続イメージングを、2D折り紙ナノ構造の記載のように行ったが、洗浄ステップは、緩衝液Cを用いて行った。

#### 【0280】

3D DNA-PAINTイメージング。3D画像を、検出回路の円柱レンズ(Nikon)で得た。NIS Elements(Nikon)のN-STORM分析パッケージをデータ処理に使用した。イメージ

10

20

30

40

50

ングは、検出経路に追加の倍率を用いずに行い、160 nmの画素サイズが得られた。3D較正を、製造者の取扱説明書に従って行った。

#### 【0281】

イメージャー鎖濃度の決定。最適なイメージャー鎖濃度を、標識密度に従って経験的に決定する。一般に、十分に高い蛍光OFF/ON比は、1回折限界領域当たりの単一イメージャー鎖のみの結合を保障するために正確にしなければならない。さらに、十分な結合事象、従って、画像取得中の各ドッキング鎖のロバストな検出を保障するために、十分なイメージャー鎖濃度（従って、十分に低い蛍光OFF時間）が必要である。

#### 【0282】

超解像データ処理。超解像DNA-PAINT画像を、LabVIEW10でプログラムされたスポット検出及び2D-ガウスフィッティングアルゴリズムを用いて再構築した。このソフトウェアの簡易型が、DNA-Paintウェブサイト(org suffix)でダウンロード可能である。

#### 【0283】

正規化相互相関分析。正規化相互相関係数を、それぞれの再構築されたグレースケール超解像度画像をまず正規化し、続いてMATLAB R2013b(MathWorks, Natick, MA, USA)で相互相関分析を行うことによって得た。

#### 【0284】

ドリフト補正及びチャンネルの整合。DNA折り紙構造を、in vitro DNA-PAINT及びExchange-PAINTイメージングの整合マーカーとしてドリフト補正に使用する。ドリフト補正は、各ムービーの間中、各折り紙ドリフトマーカーの位置を追跡することによって行われた。次いで、全ての検出されたドリフトマーカーの軌道を平均して、これを、最終超解像再構築のドリフトを全体的に補正するために使用した。Exchange-PAINTにおける異なるイメージングサイクル間のチャンネルの整合では、これらの構造を、各Exchange-PAINT画像のそれらの位置を一致させることによって整合点として使用する。細胞イメージングでは、100 nmの金ナノ構造(Sigma Aldrich; 緩衝液C中、10 nM、イメージングの前に添加される)を、ドリフトマーカー及び整合マーカーとして使用した。金ナノ粒子は、イメージングチャンバのガラス底部に非特異的に吸着される。ドリフト補正及びドリフト整合は、折り紙ドリフトマーカーの場合と同様の方式で行われる。同様に、視野における全ての金ナノ粒子の明らかな動きを、ムービーの間中、追跡する。次いで、得られた軌道を平均して、これを、最終超解像度画像の全体的なドリフト補正に使用する。図3D~図3Fにおけるミトコンドリア及び微小管の二色画像では、金粒子は、両方の色のチャンネルで見ることができる。同じ金ナノ粒子はまた、in situ Exchange-PAINT実験の異なるイメージングの回のドリフト補正及び再整合にも使用される(図6)。

#### 【0285】

透過電子顕微鏡イメージング。イメージングのために、3.5 µlの未希釈微小管様DNA構造を、グロー放電炭素被覆TEM格子に2分間吸着した。次いで、この格子を、超濾過(0.2 µmのフィルタ)された25 mM NaOHを含む2%ギ酸ウラニル水溶液を用いて10秒間染色した。イメージングを、80 kVで動作するJEOL JEM-1400を用いて行った。

#### 【0286】

原子間力顕微鏡イメージング。イメージングを、E-scanner(Bruker)を備えたMultimode VIII原子間力顕微鏡(AFM)でタッピングモードを用いて行った。イメージングは、狭い100 µmの7~9 kHzの共振周波数、0.38 N/mの力定数カンチレバー(force constant cantilever)を用いて、DNP-Sの酸化物の尖った窒化ケイ素カンチレバー(DNP-S oxide-sharpened silicon nitride cantilever)及びSNLの鋭い窒化レバー(SNL sharp nitride lever)(Bruker Probes)を含むTAE/Mg2+緩衝液で行った。折り紙構造の自己集合の後、約20 µlのTAE/Mg2+緩衝液を、金属バック(Ted Pella)に接着された新しく切断された雲母表面(Ted Pella)に堆積させた。30秒後、雲母表面を、N2の緩やかな流れで乾燥させ、5 µlの折り紙溶液を雲母表面に堆積さ

10

20

30

40

50

せた。この30秒後に、30  $\mu$ lの追加の緩衝液をサンプルに添加した。イメージングパラメータを最高の画質のために最適化したが、サンプルの損傷を最小限にするために可能な最も高い設定値を維持した。画像は、それぞれのスキャンラインから一次多項式を減じることによって後処理した。駆動振幅が約0.11Vであり、積分利得が約2であり、かつ比例利得が約4である。

【0287】

以下の表1～表5に、説明した構造における各オリゴヌクレオチドの位置が示されている。第1の列における各オリゴヌクレオチドの位置（例えば、n[n]n[n]）は、コンマで区切られ、それぞれ、同じ行にある第2の列の配列識別番号に一致する。各配列識別番号は、参照により本明細書に組み入れられる添付の配列表にある対応するオリゴヌクレオチド配列を示す。例えば、表1では、位置0[39]21[39]は、配列番号：1によって表されるオリゴヌクレオチドに一致し；位置0[79]1[79]は、配列番号：2によって表されるオリゴヌクレオチドに一致し；以下同様である。

【0288】



【表 1】

表1.微小管類似体DNA構造のステーブル配列

位置*	配列番号	説明
0[39]21[39], 0[79]1[79], 0[167]22[168], 0[199]2[200], 0[239]21[231], 1[24]18[24], 1[96]17[95], 1[120]1[151], 1[152]19[167], 2[39]23[55], 2[79]23[71], 2[103]3[119], 2[127]31[143], 2[199]23[207], 2[231]5[231], 3[16]31[31], 3[56]19[55], 3[80]2[80], 3[120]24[128], 3[168]5[175], 4[71]5[87], 4[135]22[120], 4[207]6[184], 5[16]22[16], 5[32]25[31], 5[52]3[55], 5[88]23[103], 5[152]4[136], 5[176]22[184], 6[95]4[72], 6[127]8[120], 6[151]22[144], 6[159]26[160], 6[183]2[184], 6[207]4[208], 6[231]24[208], 7[16]4[16], 7[48]5[51], 7[80]25[95], 7[112]6[96], 7[176]25[191], 8[39]11[31], 8[95]12[80], 8[159]10[160], 8[191]8[160], 9[48]25[63], 9[104]24[112], 9[120]10[136], 9[136]24[144], 9[176]11[191], 9[208]25[223], 10[31]27[23], 10[55]8[40], 10[95]27[95], 10[135]26[112], 10[159]27[159], 10[183]27[191], 10[215]10[184], 11[192]26[208], 12[31]29[23], 12[55]28[32], 12[79]11[63], 12[119]16[120], 12[183]29[191], 12[215]27[215], 13[40]27[55], 13[72]30[80], 13[104]9[103], 13[144]17[159], 13[168]25[183], 13[216]14[224], 14[55]16[40], 14[87]28[72], 14[119]15[135], 14[223]30[208], 15[32]29[55], 15[80]18[80], 15[96]28[104], 15[160]28[168], 16[119]31[111], 16[143]30[120], 16[191]14[160], 16[207]19[207], 16[239]29[231], 17[24]14[24], 17[40]18[56], 17[64]14[56], 17[160]31[175], 17[224]31[239], 18[55]2[40], 18[79]21[79], 18[111]0[96], 18[183]30[160], 18[239]2[232], 19[56]30[64], 19[96]30[96], 19[168]3[167], 19[192]30[184], 19[208]30[224], 20[159]21[135], 20[223]21[199], 21[16]1[23], 21[40]4[32], 21[80]22[96], 21[136]2[128], 21[200]1[215], 21[232]6[232], 22[95]3[79], 22[119]2[104], 22[143]21[159], 22[167]7[175], 22[183]18[184], 22[207]21[223], 23[56]1[55], 23[72]24[56], 23[104]5[103], 23[208]22[208], 24[79]7[79], 24[127]9[135], 24[143]5[151], 24[231]26[216], 25[64]24[80], 25[224]10[216], 26[159]12[144], 26[207]6[208], 26[239]7[247], 27[96]10[96], 27[112]14[120], 27[136]7[151], 28[191]15[183], 29[56]15[79], 29[136]27[135], 29[192]13[215], 29[232]28[216], 30[95]14[88], 30[119]29[135], 30[183]16[192], 30[207]11[223], 30[223]15[239], 31[112]1[119], 31[144]19[143], 1[56]0[40], 1[80]19[95], 1[216]0[200], 2[183]19[191], 5[104]6[128], 8[63]10[56], 9[80]8[64], 11[64]9[79], 11[216]9[239], 14[159]15[159], 14[159]15[159], 15[184]16[208], 17[96]15[95], 19[128]18[112], 19[144]19[127], 24[55]7[47], 24[111]7[111], 24[183]6[160], 24[207]8[192], 25[32]9[47], 25[96]8[96], 25[192]9[207], 27[32]10[32], 27[160]9[175], 30[63]17[63], 30[79]0[80], 30[159]16[144], 31[32]15[31], 31[176]0[168], 13[136]12[120], 15[136]13[135], 27[24]13[39], 27[56]12[56], 27[216]12[216], 28[71]13[71], 28[103]13[103], 28[167]13[167], 28[215]12[184]	配列番号: 1- 配列番号: 178	構造鎖
1[56]0[40], 1[80]19[95], 1[216]0[200], 2[183]19[191], 5[104]6[128], 8[63]10[56], 9[80]8[64], 11[64]9[79], 11[216]9[239], 14[159]15[159], 15[184]16[208], 17[96]15[95], 19[128]18[112], 19[144]19[127], 24[55]7[47], 24[111]7[111], 24[183]6[160], 24[207]8[192], 25[32]9[47], 25[96]8[96], 25[192]9[207], 27[32]10[32], 27[160]9[175], 30[63]17[63], 30[79]0[80], 30[159]16[144], 31[32]15[31], 31[176]0[168]	配列番号: 179- 配列番号: 206	DNA-PAINT、 ドッキング鎖
2[9]2[10], 4[15]6[248], 5[232]5[15], 6[247]3[15], 7[248]24[232], 9[240]11[7], 11[8]25[23], 13[8]26[240], 14[23]16[240], 15[240]28[8], 17[8]18[240], 19[3]0[248], 22[15]21[15], 24[23]7[15], 27[237]13[7], 28[7]27[236], 30[23]17[7], 31[16]31[15], 31[240]0[240]	配列番号: 207- 配列番号: 225	連結鎖
13[136]12[120], 15[136]13[135], 27[24]13[39], 27[56]12[56], 27[216]12[216], 28[71]13[71], 28[103]13[103], 28[167]13[167], 28[215]12[184]	配列番号: 226- 配列番号: 234	3-ピオチン、 ドッキング鎖

【表 2】

表2ドリフトマーカーのステーブル配列

位置*	配列番号	説明
0[111]1[95], 0[143]1[127], 0[175]0[144], 0[207]1[191], 0[239]1[223], 1[32]3[31], 1[96]3[95], 1[224]3[223], 2[79]0[80], 2[111]0[112], 2[143]1[159], 2[175]0[176], 2[207]0[208], 3[32]5[31], 3[96]5[95], 3[160]4[144], 3[224]5[223], 4[143]3[159], 5[32]7[31], 5[96]7[95], 5[224]7[223], 6[47]4[48], 6[79]4[80], 6[111]4[112], 6[143]5[159], 6[175]4[176], 6[207]4[208], 6[239]4[240], 6[271]4[272], 7[32]9[31], 7[96]9[95], 7[160]8[144], 7[224]9[223], 8[143]7[159], 9[32]11[31], 9[64]11[63], 9[96]11[95], 9[128]11[127], 9[192]11[191], 9[224]11[223], 9[256]11[255], 10[47]8[48], 10[79]8[80], 10[111]8[112], 10[143]9[159], 10[175]8[176], 10[207]8[208], 10[239]8[240], 10[271]8[272], 12[143]11[159], 13[32]15[31], 13[64]15[63], 13[96]15[95], 13[128]15[127], 13[192]15[191], 13[224]15[223], 13[256]15[255], 14[271]12[272], 15[32]17[31], 15[96]17[95], 15[160]16[144], 15[224]17[223], 16[143]15[159], 17[32]19[31], 17[96]19[95], 17[224]19[223], 18[47]16[48], 18[79]16[80], 18[111]16[112], 18[143]17[159], 18[175]16[176], 18[207]16[208], 18[239]16[240], 18[271]16[272], 19[32]21[31], 19[96]21[95], 19[160]20[144], 19[224]21[223], 20[143]19[159], 21[96]23[95], 21[160]22[144], 21[224]23[223], 22[47]20[48], 22[79]20[80], 22[111]20[112], 22[143]21[159], 22[175]20[176], 22[207]20[208], 22[239]20[240], 22[271]20[272], 23[64]22[80], 23[96]22[112], 23[128]23[159], 23[160]22[176], 23[192]22[208], 7[56]9[63], 7[120]9[127], 7[184]9[191], 7[248]9[255], 11[32]13[31], 11[64]13[63], 11[96]13[95], 11[128]13[127], 11[160]12[144], 11[192]13[191], 11[224]13[223], 11[256]13[255], 14[47]12[48], 14[79]12[80], 14[111]12[112], 14[143]13[159], 14[175]12[176], 14[207]12[208], 14[239]12[240], 21[120]23[127], 21[184]23[191], 1[160]2[144], 4[47]2[48], 4[79]2[80], 4[111]2[112], 4[175]2[176], 4[207]2[208], 4[239]2[240], 4[271]2[272], 5[160]6[144], 8[47]6[48], 8[79]6[80], 8[111]6[112], 8[175]6[176], 8[207]6[208], 8[239]6[240], 8[271]6[272], 9[160]10[144], 12[47]10[48], 12[79]10[80], 12[111]10[112], 12[175]10[176], 12[207]10[208], 12[239]10[240], 12[271]10[272], 13[160]14[144], 16[47]14[48], 16[79]14[80], 16[111]14[112], 16[175]14[176], 16[207]14[208], 16[239]14[240], 16[271]14[272], 17[160]18[144], 20[47]18[48], 20[79]18[80], 20[111]18[112], 20[175]18[176], 20[207]18[208], 20[239]18[240], 20[271]18[272], 0[47]1[31], 0[79]1[63], 0[271]1[255], 2[47]0[48], 2[239]0[240], 2[271]0[272], 21[32]23[31], 21[56]23[63], 21[248]23[255], 23[32]22[48], 23[224]22[240], 23[256]22[272]	配列番号: 235- 配列番号: 402	DNA-PAINT、 ドッキング鎖
4[63]6[56], 4[127]6[120], 4[191]6[184], 4[255]6[248], 18[63]20[56], 18[127]20[120], 18[191]20[184], 18[255]20[248]	配列番号: 403- 配列番号: 410	5-ピオチン、 修飾
1[64]4[64], 1[128]4[128], 1[192]4[192], 1[256]4[256], 15[64]18[64], 15[128]18[128], 15[192]18[192], 15[256]18[256]	配列番号: 411- 配列番号: 418	構造鎖

10

20

30

【 0 2 9 0 】

## 【表 3】

表3.10「色」jin vitro Exchange-PAINT実証のためのDNA折り紙構造のステーブル配列(奇数の数字)

位置*	配列番号	説明(数字)
0[111]1[95], 0[143]1[127], 0[175]0[144], 0[79]1[63], 1[160]2[144], 2[47]0[48], 3[160]4[144], 5[160]6[144], 7[160]8[144]	配列番号: 419- 配列番号: 427	5,9
10[271]8[272], 11[160]12[144], 12[271]10[272], 13[160]14[144], 14[271]12[272], 15[160]16[144], 16[271]14[272], 17[160]18[144], 18[271]16[272], 19[160]20[144], 2[271]0[272], 20[271]18[272], 21[160]22[144], 22[271]20[272], 4[271]2[272], 6[271]4[272], 8[271]6[272], 9[160]10[144]	配列番号: 428- 配列番号: 445	3,5,9
0[47]1[31], 1[32]3[31], 11[32]13[31], 13[32]15[31], 15[32]17[31], 17[32]19[31], 19[32]21[31], 3[32]5[31], 5[32]7[31], 7[32]9[31], 9[32]11[31]	配列番号: 446- 配列番号: 456	3,5,7,9
21[120]23[127], 21[56]23[63], 21[96]23[95], 23[32]22[48], 23[64]22[80], 23[96]22[112]	配列番号: 457- 配列番号: 462	1,3,7,9
21[184]23[191], 21[224]23[223], 21[248]23[255], 21[32]23[31], 23[128]23[159], 23[160]22[176], 23[192]22[208], 23[224]22[240], 23[256]22[272]	配列番号: 463- 配列番号: 471	1,3,5,7,9
2[111]0[112], 2[79]0[80]	配列番号: 472- 配列番号: 473	9
0[207]1[191], 0[239]1[223], 0[271]1[255], 1[128]4[128], 1[192]4[192], 1[224]3[223], 1[256]4[256], 1[64]4[64], 1[96]3[95], 10[111]8[112], 10[143]9[159], 10[175]8[176], 10[207]8[208], 10[239]8[240], 10[47]8[48], 10[79]8[80], 11[128]13[127], 11[192]13[191], 11[224]13[223], 11[256]13[255], 11[64]13[63], 11[96]13[95], 12[111]10[112], 12[143]11[159], 12[175]10[176], 12[207]10[208], 12[239]10[240], 12[47]10[48], 12[79]10[80], 13[128]15[127], 13[192]15[191], 13[224]15[223], 13[256]15[255], 13[64]15[63], 13[96]15[95], 14[111]12[112], 14[143]13[159], 14[175]12[176], 14[207]12[208], 14[239]12[240], 14[47]12[48], 14[79]12[80], 15[128]18[128], 15[192]18[192], 15[224]17[223], 15[256]18[256], 15[64]18[64], 15[96]17[95], 16[111]14[112], 16[143]15[159], 16[175]14[176], 16[207]14[208], 16[239]14[240], 16[47]14[48], 16[79]14[80], 17[224]19[223], 17[96]19[95], 18[111]16[112], 18[143]17[159], 18[175]16[176], 18[207]16[208], 18[239]16[240], 18[47]16[48], 18[79]16[80], 19[224]21[223], 19[96]21[95], 2[143]1[159], 2[175]0[176], 2[207]0[208], 2[239]0[240], 20[111]18[112], 20[143]19[159], 20[175]18[176], 20[207]18[208], 20[239]18[240], 20[47]18[48], 20[79]18[80], 22[111]20[112], 22[143]21[159], 22[175]20[176], 22[207]20[208], 22[239]20[240], 22[47]20[48], 22[79]20[80], 3[224]5[223], 3[96]5[95], 4[111]2[112], 4[143]3[159], 4[175]2[176], 4[207]2[208], 4[239]2[240], 4[47]2[48], 4[79]2[80], 5[224]7[223], 5[96]7[95], 6[111]4[112], 6[143]5[159], 6[175]4[176], 6[207]4[208], 6[239]4[240], 6[47]4[48], 6[79]4[80], 7[120]9[127], 7[184]9[191], 7[224]9[223], 7[248]9[255], 7[56]9[63], 7[96]9[95], 8[111]6[112], 8[143]7[159], 8[175]6[176], 8[207]6[208], 8[239]6[240], 8[47]6[48], 8[79]6[80], 9[128]11[127], 9[192]11[191], 9[224]11[223], 9[256]11[255], 9[64]11[63], 9[96]11[95]	配列番号: 474- 配列番号: 594	構造 ステーブル
4[63]6[56], 4[127]6[120], 4[191]6[184], 4[255]6[248], 18[63]20[56], 18[127]20[120], 18[191]20[184], 18[255]20[248]	配列番号: 595- 配列番号: 602	5-ピオテン

10

20

30

【 0 2 9 1 】

【表 4】

表4.10「色」*in vitro* Exchange-PAINT実証のためのDNA折り紙構造のステーブル配列(偶数の数字)

位置*	配列番号	説明 (数字)
1[160]2[144], 11[160]12[144], 13[160]14[144], 15[160]16[144], 17[160]18[144], 19[160]20[144], 21[160]22[144], 3[160]4[144], 5[160]6[144], 7[160]8[144], 9[160]10[144]	配列番号: 603- 配列番号: 613	2,4,6,8
21[224]23[223], 21[248]23[255]	配列番号: 614- 配列番号: 615	0,4,8
0[111]1[95], 0[143]1[127], 0[79]1[63], 2[111]0[112], 2[47]0[48], 2[79]0[80], 21[184]23[191], 23[160]22[176], 23[192]22[208], 23[224]22[240]	配列番号: 606- 配列番号: 625	0,4,6,8
1[32]3[31], 11[32]13[31], 13[32]15[31], 15[32]17[31], 17[32]19[31], 19[32]21[31], 3[32]5[31], 5[32]7[31], 7[32]9[31], 9[32]11[31]	配列番号: 626- 配列番号: 635	0,2,8
0[207]1[191], 0[239]1[223], 0[271]1[255], 10[271]8[272], 12[271]10[272], 14[271]12[272], 16[271]14[272], 18[271]16[272], 2[175]0[176], 2[207]0[208], 2[239]0[240], 2[271]0[272], 20[271]18[272], 22[271]20[272], 4[271]2[272], 6[271]4[272], 8[271]6[272]	配列番号: 636- 配列番号: 652	0,2,6,8
21[32]23[31], 2[56]23[63], 21[96]23[95], 23[32]22[48], 23[64]22[80], 23[96]22[112]	配列番号: 653- 配列番号: 658	0,2,4,8
0[175]0[144], 0[47]1[31], 23[128]23[159], 23[256]22[272]	配列番号: 659- 配列番号: 662	0,2,4,6,8
21[120]23[127]	配列番号: 663	0,2,4
1[128]4[128], 1[192]4[192], 1[224]3[223], 1[256]4[256], 1[64]4[64], 1[96]3[95], 10[111]8[112], 10[143]9[159], 10[175]8[176], 10[207]8[208], 10[239]8[240], 10[47]8[48], 10[79]8[80], 11[128]13[127], 11[192]13[191], 11[224]13[223], 11[256]13[255], 11[64]13[63], 11[96]13[95], 12[111]10[112], 12[143]11[159], 12[175]10[176], 12[207]10[208], 12[239]10[240], 12[47]10[48], 12[79]10[80], 13[128]15[127], 13[192]15[191], 13[224]15[223], 13[256]15[255], 13[64]15[63], 13[96]15[95], 14[111]12[112], 14[143]13[159], 14[175]12[176], 14[207]12[208], 14[239]12[240], 14[47]12[48], 14[79]12[80], 15[128]18[128], 15[192]18[192], 15[224]17[223], 15[256]18[256], 15[64]18[64], 15[96]17[95], 16[111]14[112], 16[143]15[159], 16[175]14[176], 16[207]14[208], 16[239]14[240], 16[47]14[48], 16[79]14[80], 17[224]19[223], 17[96]19[95], 18[111]16[112], 18[143]17[159], 18[175]16[176], 18[207]16[208], 18[239]16[240], 18[47]16[48], 18[79]16[80], 19[224]21[223], 19[96]21[95], 2[143]1[159], 20[111]18[112], 20[143]19[159], 20[175]18[176], 20[207]18[208], 20[239]18[240], 20[47]18[48], 20[79]18[80], 22[111]20[112], 22[143]21[159], 22[175]20[176], 22[207]20[208], 22[239]20[240], 22[47]20[48], 22[79]20[80], 3[224]5[223], 3[96]5[95], 4[111]2[112], 4[143]3[159], 4[175]2[176], 4[207]2[208], 4[239]2[240], 4[47]2[48], 4[79]2[80], 5[224]7[223], 5[96]7[95], 6[111]4[112], 6[143]5[159], 6[175]4[176], 6[207]4[208], 6[239]4[240], 6[47]4[48], 6[79]4[80], 7[120]9[127], 7[184]9[191], 7[224]9[223], 7[248]9[255], 7[56]9[63], 7[96]9[95], 8[111]6[112], 8[143]7[159], 8[175]6[176], 8[207]6[208], 8[239]6[240], 8[47]6[48], 8[79]6[80], 9[128]11[127], 9[192]11[191], 9[224]11[223], 9[256]11[255], 9[64]11[63], 9[96]11[95]	配列番号: 664- 配列番号: 778	構造 ステーブル
4[63]6[56], 4[255]6[248], 4[191]6[184], 4[127]6[120], 18[63]20[56], 18[255]20[248], 18[191]20[184], 18[127]20[120],	配列番号: 779- 配列番号: 786	5-ピオチン

10

20

30

【 0 2 9 2 】

## 【表 5】

表5:in vitro Exchange-PAINT実証のためのDNA折り紙構造のステーブル配列(数字の0~3)

位置*	配列番号	説明(数字)
2[47]0[48], 2[79]0[80], 2[111]0[112], 2[143]1[159], 2[175]0[176], 2[207]0[208], 2[239]0[240], 6[47]4[48], 6[239]4[240], 10[47]8[48], 10[239]8[240], 14[47]12[48], 14[239]12[240], 18[47]16[48], 18[239]16[240], 22[47]20[48], 22[79]20[80], 22[111]20[112], 22[143]21[159], 22[175]20[176], 22[207]20[208], 22[239]20[240]	配列番号: 787- 配列番号: 808	0
9[64]11[63], 9[96]11[95], 9[128]11[127], 9[192]11[191], 9[224]11[223], 9[256]11[255], 11[64]13[63], 11[96]13[95], 11[128]13[127], 11[160]12[144], 11[192]13[191], 11[224]13[223], 11[256]13[255], 12[47]10[48], 12[79]10[80], 12[111]10[112], 12[175]10[176], 12[207]10[208], 12[239]10[240], 13[160]14[144], 14[79]12[80], 14[111]12[112], 14[175]12[176], 14[207]12[208]	配列番号: 809- 配列番号: 832	1
0[175]0[144], 0[207]1[191], 0[239]1[223], 0[271]1[255], 1[32]3[31], 4[143]3[159], 4[271]2[272], 5[32]7[31], 8[143]7[159], 8[271]6[272], 9[32]11[31], 12[143]11[159], 12[271]10[272], 13[32]15[31], 16[143]15[159], 16[271]14[272], 17[32]19[31], 20[143]19[159], 20[271]18[272], 21[32]23[31], 21[56]23[63], 21[96]23[95], 21[120]23[127], 21[160]22[144], 23[256]22[272]	配列番号: 833- 配列番号: 857	2
0[47]1[31], 2[271]0[272], 3[32]5[31], 6[143]5[159], 6[271]4[272], 7[32]9[31], 10[143]9[159], 10[271]8[272], 11[32]13[31], 14[143]13[159], 14[271]12[272], 15[32]17[31], 18[143]17[159], 18[271]16[272], 19[32]21[31], 19[160]20[144], 22[271]20[272], 23[32]22[48], 23[64]22[80], 23[96]22[112], 23[128]23[159], 23[160]22[176], 23[192]22[208], 23[224]22[240]	配列番号: 858- 配列番号: 881	3

## 【 0 2 9 3 】

## 【表 6】

表6:DNA-PAINTドッキング及びイメージャー配列並びにビオチンドッキング配列

説明	配列番号	配列
イメージャー P1 *	884	5'-CTAGATGTAT-色素
イメージャー P2 *	885	5'-TATGTAGATC-色素
イメージャー P3 *	886	5'-GTAATGAAGA-色素
イメージャー P4 *	887	5'-GTAGATTCAT-色素
イメージャー P5 *	888	5'-CTTTACCTAA-色素
イメージャー P6 *	889	5'-GTAATCAATT-色素
イメージャー P7 *	890	5'-CATCCTAATT-色素
イメージャー P8 *	891	5'-GATCCATAT-色素
イメージャー P9 *	892	5'-CACCTTATTA-色素
イメージャー P10 *	893	5'-CCCTCTCTAT-色素
イメージャー P11 *	894	5'-GTATCATCAA-色素
イメージャー P12 *	895	5'-GAATCACTAT-色素
9nt P1 ドッキング部位	896	鎖-TTATACATCTA-3'
9nt P2 ドッキング部位	897	鎖-TTATCTACATA-3'
10nt P2 ドッキング部位	898	鎖-TTGATCTACATA-3'
9nt P3 ドッキング部位	899	鎖-TTCTTTCATTA-3'
9nt P4 ドッキング部位	900	鎖-TTATGAATCTA-3'
9nt P5 ドッキング部位	901	鎖-TTTTAGGTAAA-3'
9nt P6 ドッキング部位	902	鎖-TTAAATTGAGTA-3'
9nt P7 ドッキング部位	903	鎖-TTAAATTAGGAT-3'
9nt P8 ドッキング部位	904	鎖-TTATAATGGAT-3'
9nt P9 ドッキング部位	905	鎖-TTTAATAAGGT-3'
9nt P10 ドッキング部位	906	鎖-TTATAGAGAAG-3'
9nt P11 ドッキング部位	907	鎖-TTTTGATGATA-3'
9nt P12 ドッキング部位	908	鎖-TTATAGTGATT-3'
抗体結合のためのビオチン化P1ドッキング部位	909	ビオチン-TTATACATCTA-3'
抗体結合のためのビオチン化P2ドッキング部位	910	ビオチン-TTATCTACATA-3'
抗体結合のためのビオチン化P3ドッキング部位	911	ビオチン-TTCTTTCATTA-3'
抗体結合のためのビオチン化P4ドッキング部位	912	ビオチン-TTATGAATCTA-3'
微小管様構造のためのドッキング部位	913	ビオチン-GAATCGGTACAGTACAACCG-3'

## 【 0 2 9 4 】

1. Rust, M.J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 3, 793-5 (2006).
2. Hell, S.W. Microscopy and its focal switch. *Nature methods* 6, 24-32 (2009).
3. Hell, S.W. & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19, 780-2 (1994).
4. Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J. & Hess, H.F. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313, 1642-5 (2006).
5. Sharonov, A. & Hochstrasser, R.M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18911-18916 (2006).
6. Giannone, G., Hosy, E., Levet, F., Constals, A., Schulze, K., Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P., Gouaux, E., Tampe, R., Choquet, D. & Cognet, L. Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophys J* 99, 1303-10 (2010).
7. Lew, M.D., Lee, S.F., Ptacin, J.L., Lee, M.K., Twieg, R.J., Shapiro, L. & Moerner, W.E. Three-dimensional superresolution colocalization of intracellular protein superstructures and the cell surface in live *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E1102-10 (2011).
8. Jungmann, R., Steinhauer, C., Scheible, M., Kuzyk, A., Tinnefeld, P. & Simmel, F.C. Single-Molecule Kinetics and Super-Resolution Microscopy by Fluorescence Imaging of Transient Binding on DNA Origami. *Nano Letters* 10, 4756-4761 (2010).
9. Tokunaga, M., Imamoto, N. & Sakata-Sogawa, K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nature Methods* 5, 159-161 (2008).
10. Lin, C., Jungmann, R., Leifer, A.M., Li, C., Levner, D., Church, G.M., Shih, W.M. & Yin, P. Submicrometre geometrically encoded fluorescent barcodes self-assembled from DNA. *Nat Chem* 4, 832-9 (2012).
11. Derr, N.D., Goodman, B.S., Jungmann, R., Leschziner, A.E., Shih, W.M. & Reck-Peterson, S.L. Tug-of-war in motor protein ensembles revealed with a programmable DNA origami scaffold. *Science* 338, 662-5 (2012).
12. Johnson-Buck, A., Nangreave, J., Kim, D.N., Bathe, M., Yan, H. & Walter, N.G. Super-resolution fingerprinting detects chemical reactions and idiosyncrasies of single DNA pegboards. *Nano Lett* 13, 728-33 (2013).
13. Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H. & Ewers, H. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat Methods* 9, 582-4 (2012).
14. Lubeck, E. & Cai, L. Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling. *Nat Methods* 9, 743-8 (2012).
15. Wei, B., Dai, M. & Yin, P. Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles. *Nature* 485, 623-6 (2012).
16. Aitken, C.E., Marshall, R.A. & Puglisi, J.D. An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments. *Biophys J* 94, 1826-35 (2008).
17. Rasnik, I., McKinney, S.A. & Ha, T. Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat Methods* 3, 891-3 (2006).
18. Huang, B., Wang, W., Bates, M. & Zhuang, X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* 319, 810-3 (

10

20

30

40

50

2008).

19. Paige, J.S., Wu, K.Y. & Jaffrey, S.R. RNA mimics of green fluorescent protein. *Science* 333, 642-6 (2011).

20. Hein, B., Willig, K.I. & Hell, S.W. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14271-6 (2008).

21. Jones, S.A., Shim, S.H., He, J. & Zhuang, X. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nature methods* 8, 499-508 (2011).

22. Willig, K.I. et al. Nanoscale resolution in GFP-based microscopy. *Nat Methods* 3, 721-3 (2006).

23. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng* 24, 381-403 (2007).

24. Paige, J.S., Nguyen-Duc, T., Song, W. & Jaffrey, S.R. Fluorescence imaging of cellular metabolites with RNA. *Science* 335, 1194 (2012).

25. Jaffrey, S.R. Personal Communication. Personal Communication (2013).

26. Fukusaki, E. et al. SELEX for tubulin affords specific T-rich DNA aptamers. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Bioorg Med Chem Lett* 11, 2927-30 (2001).

10

【図 1 A】

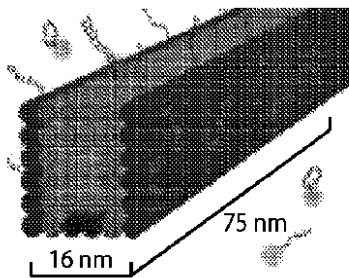


Fig. 1A

【図 1 C】

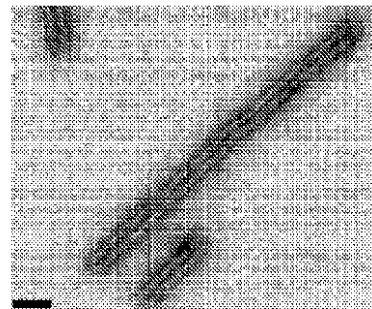
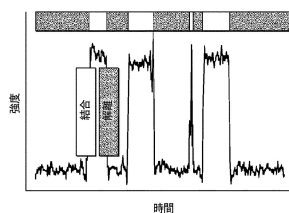


Fig. 1C

【図 1 B】



【図 1 D】

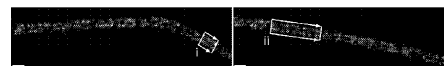
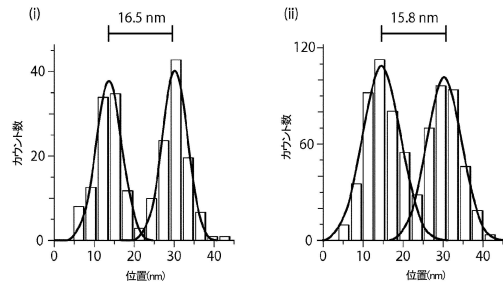
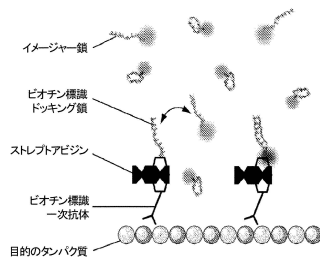


Fig. 1D

【図 1 E】



【図 2】



【図 3 A】

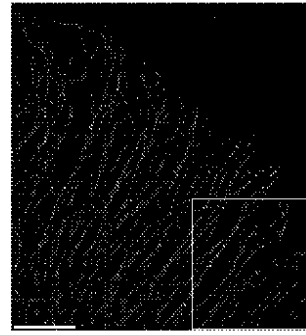


Fig. 3A

【図 3 B】

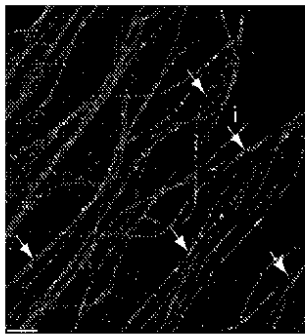


Fig. 3B

【図 3 C】

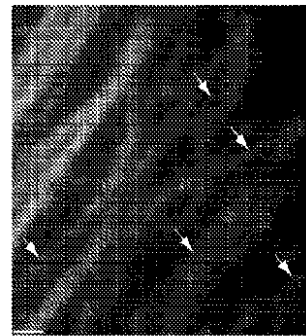


Fig. 3C



【図 3 D】

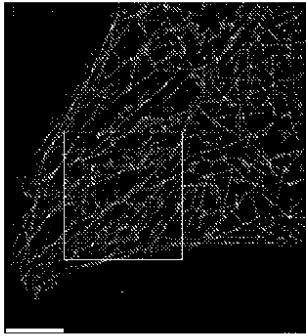


Fig. 3D

【図 3 E】

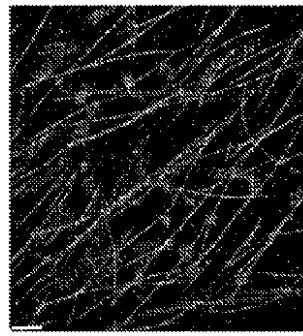


Fig. 3E

【図 3 F】

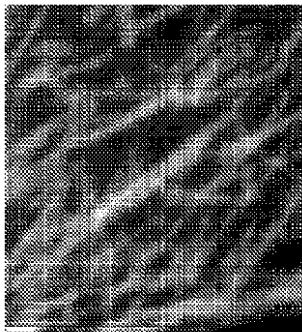
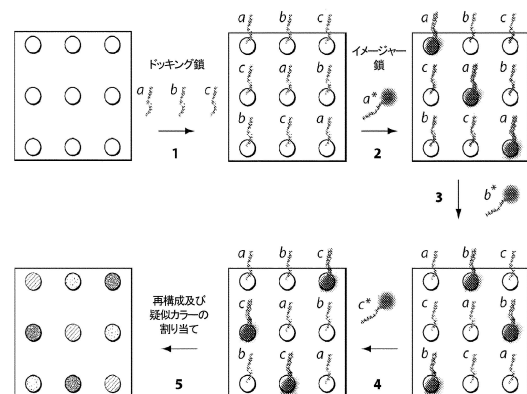
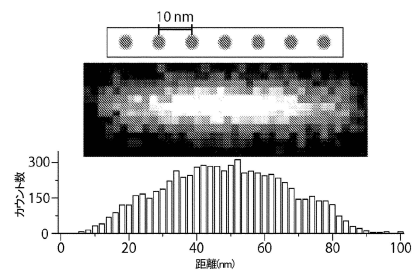


Fig. 3F

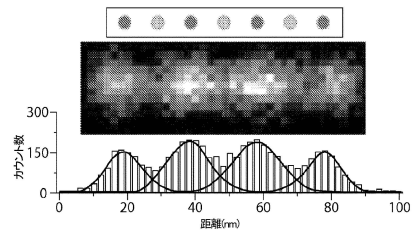
【図 4 A】



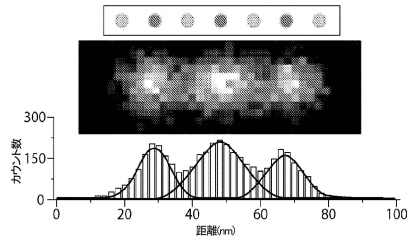
【図 4 B 1】



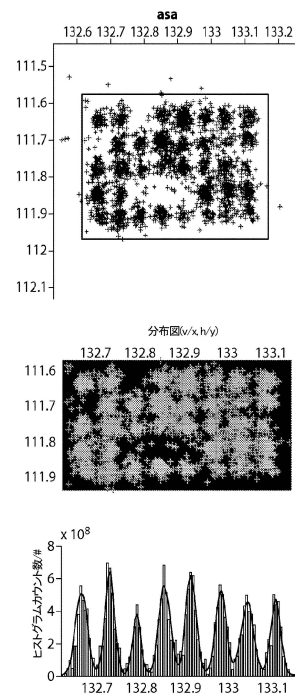
【 図 4 B 2 】



【 図 4 B 3 】



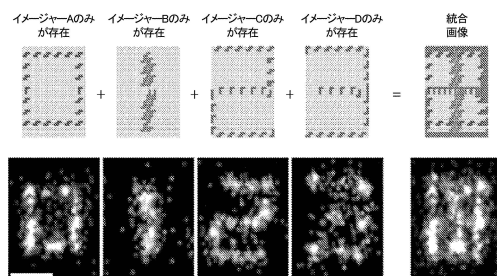
【 図 4 C 】



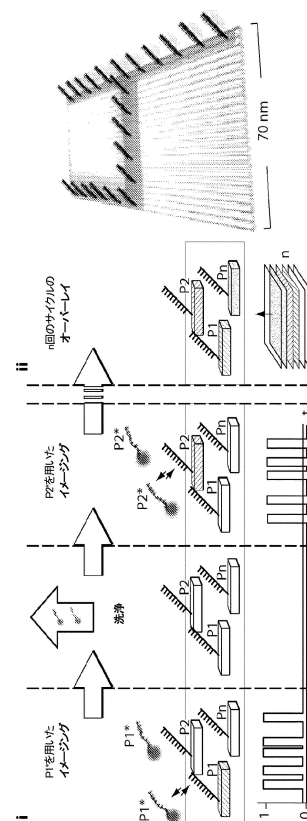
### フィッティングの結果:

間隔: 10.4661	9.94118	10.1858	9.83788	10.978	9.80175	10.4411 nm
標準偏差: 2.1757	1.7805	1.5213	2.163	1.9209	1.9914	2.3486 nm
正規化残差 = 3.3e+006, 修正カイニ乗 = 0.024						

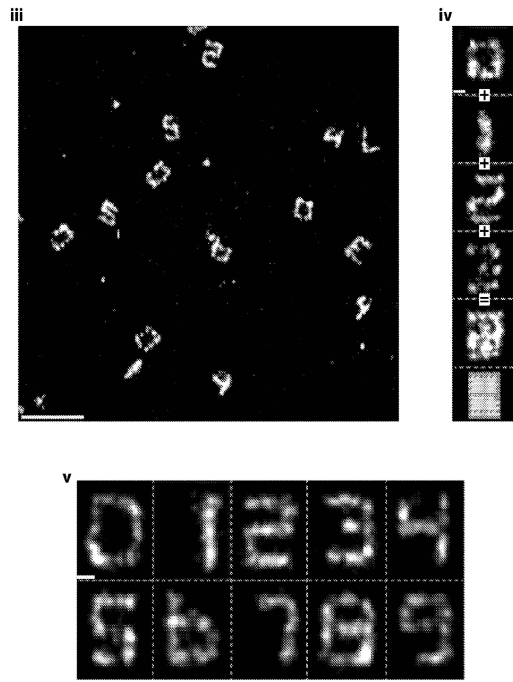
【 図 5 A 】



【 図 5 B 1 】

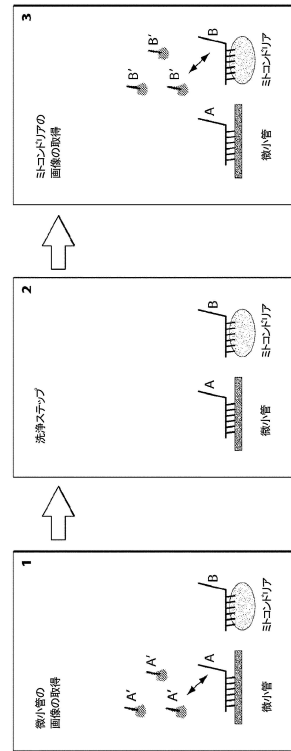


【図 5 B 2】



(続き)

【図 6 A】



【図 6 B】

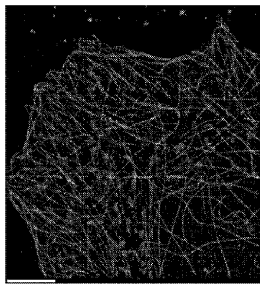


Fig. 6B

【図 6 C】

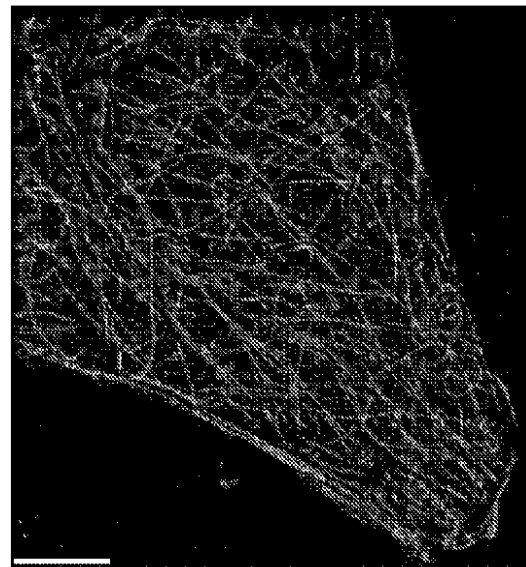
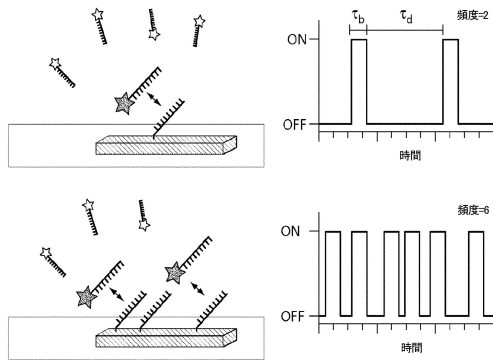
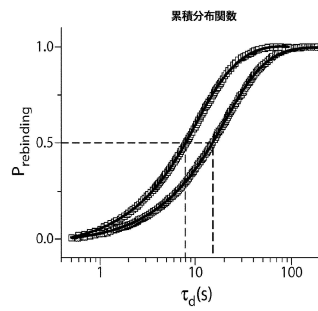


Fig. 6C

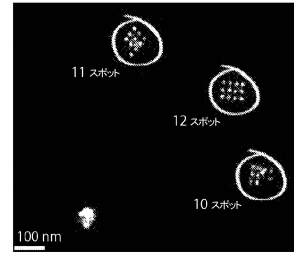
【図 7 A】



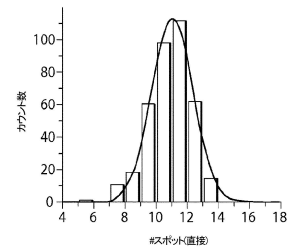
【図 7 B】



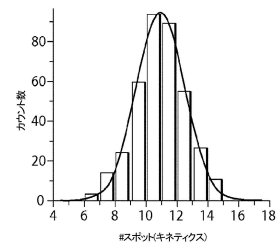
【図 7 C】



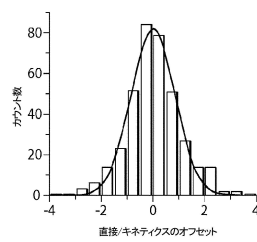
【図 7 D 1】



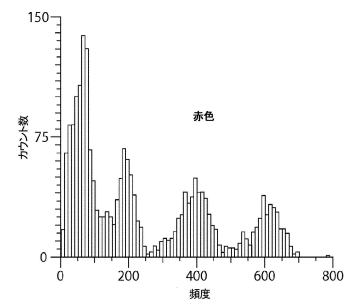
【図 7 D 2】



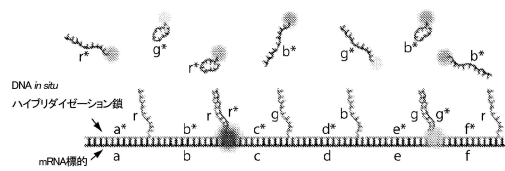
【図 7 D 3】



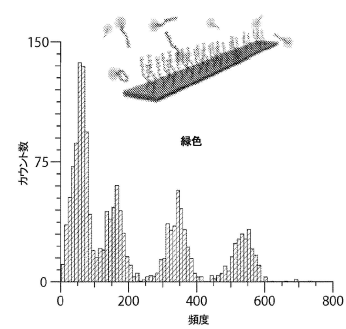
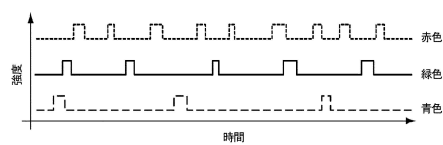
【図 8 C 1】



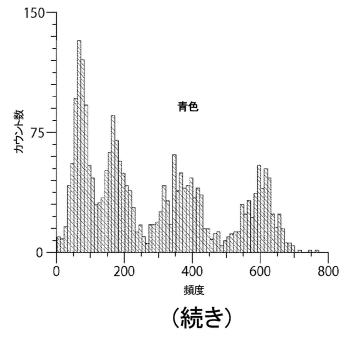
【図 8 A】



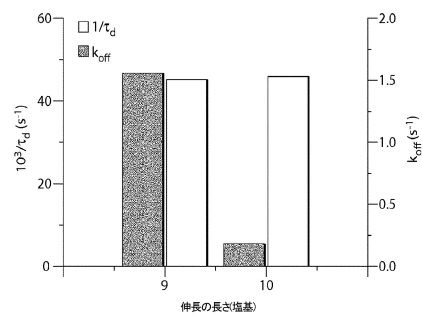
【図 8 B】



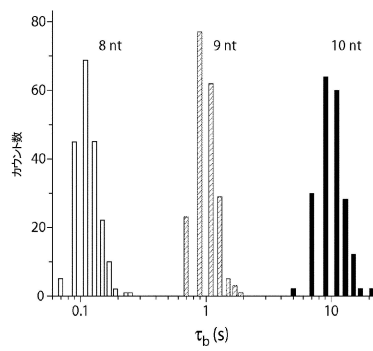
【図 8 C 2】



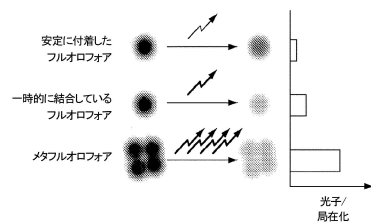
【図 9】



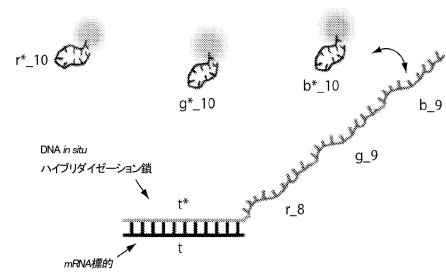
【図 10 C】



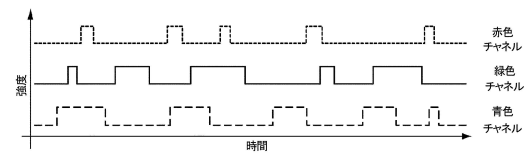
【図 11 A】



【図 10 A】



【図 10 B】



【図 11 B 1】



Fig. 11B1

【図 11 B 2】

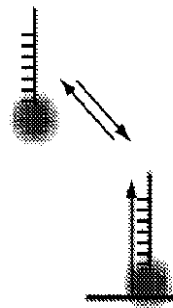


Fig. 11B2

【図 1 1 B 3】

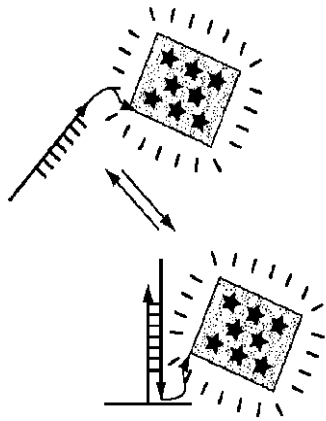


Fig. 11B3

【図 1 1 B 4】

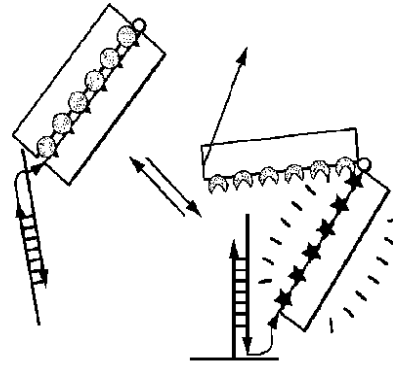


Fig. 11B4

【図 1 1 C】

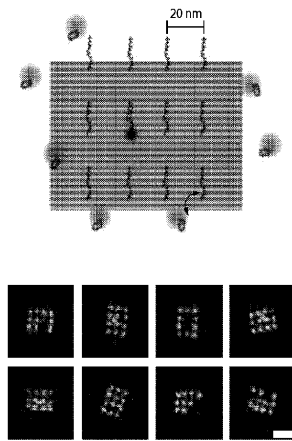
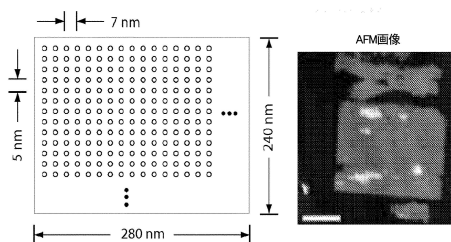
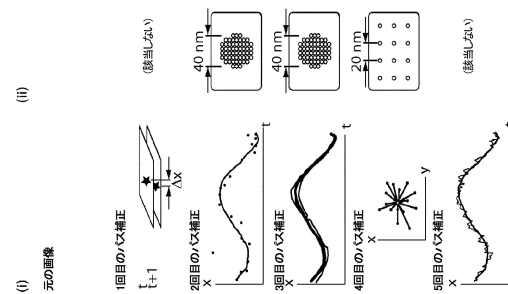


Fig. 11C

【図 1 1 D】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】

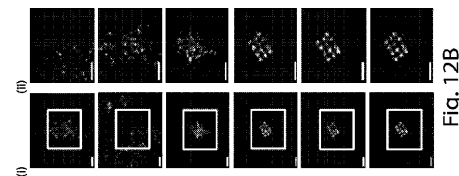
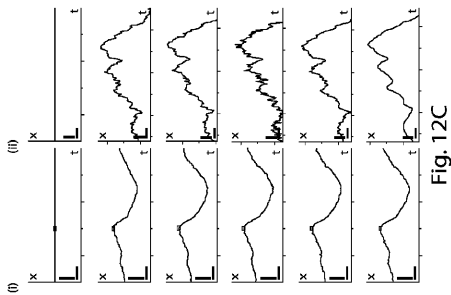
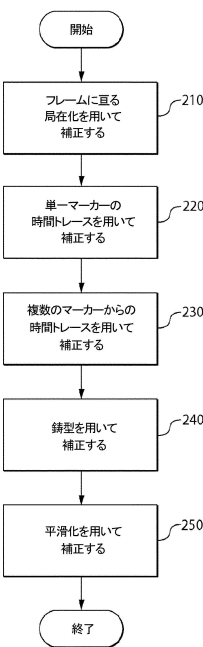


Fig. 12B

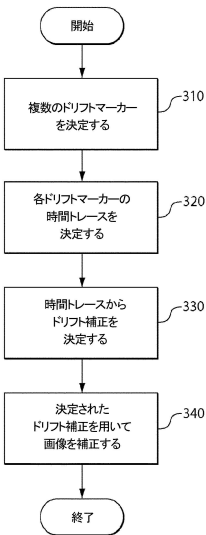
【図 12 C】



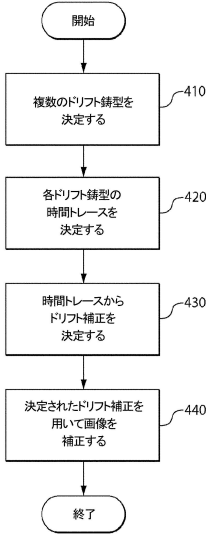
【図 13】



【図 14】



【図 15】



【図 16 A】

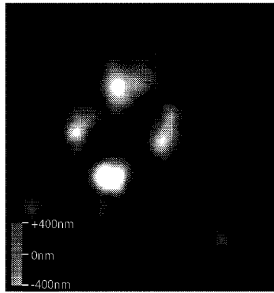
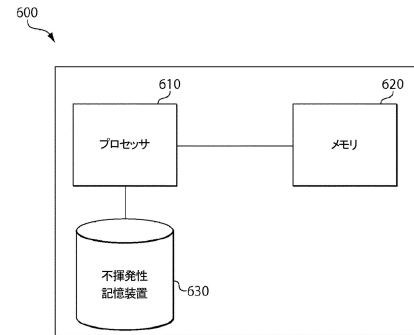


Fig. 16A

【図 17】



【図 16 B】

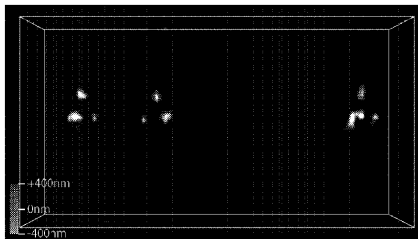
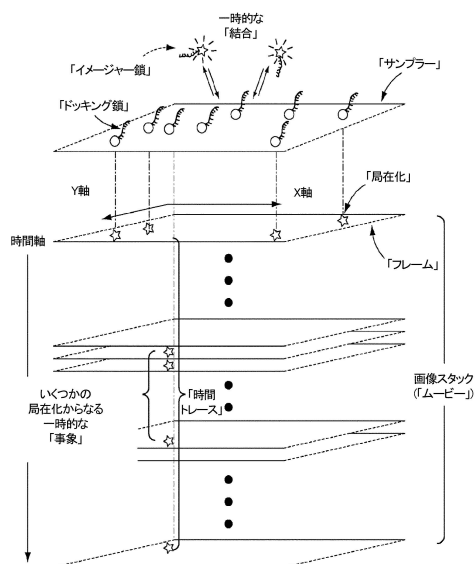


Fig. 16B

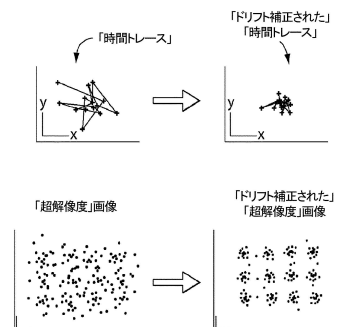
【図 18 A】

イメージングプロセス



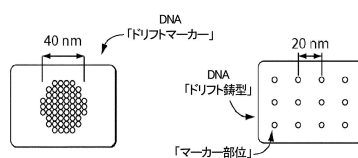
【図 18 C】

ドリフト補正の原理

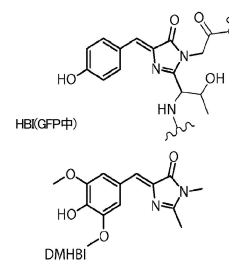


【図 18 B】

ドリフトマーカー

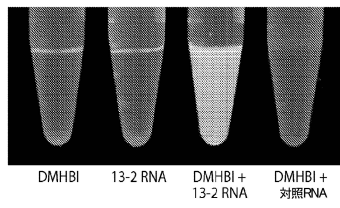


【図 19 A】

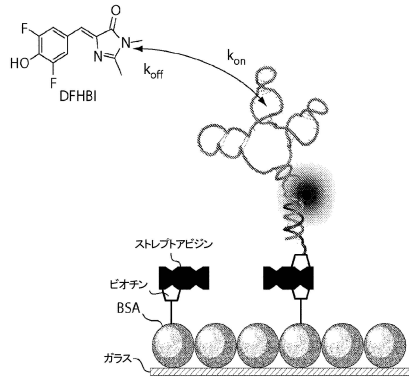




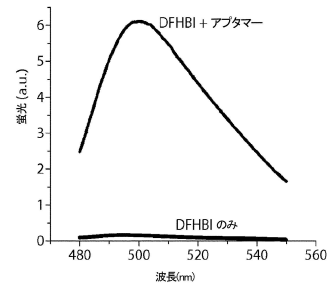
【図 19 B】



【図 20 A】



【図 20 B】



【図 21 A】

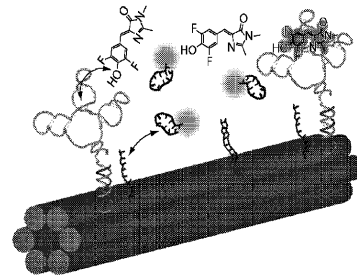


Fig. 21A

【図 21 B】

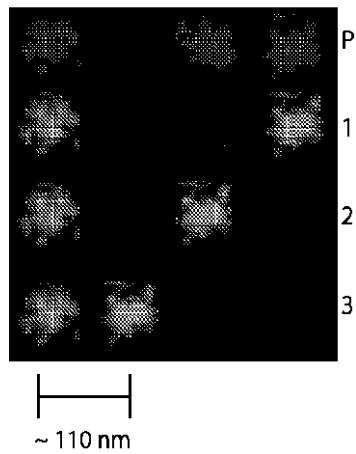


Fig. 21B

【図 22】

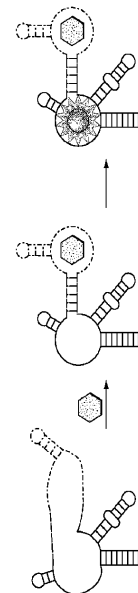
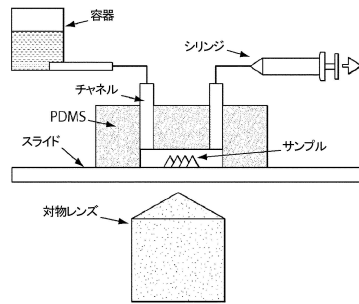
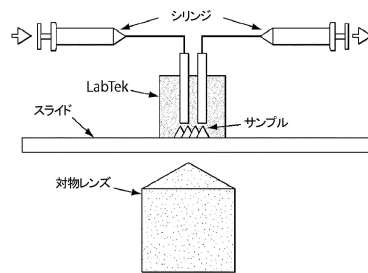


Fig. 22

【図 23 A】



【図 23 B】



【配列表】

0006475718000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
<b>G 0 1 N 33/542 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53		U
<b>G 0 1 N 21/64 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/542		A
<b>G 0 1 N 21/78 (2006.01)</b>		G 0 1 N 21/64		F
		G 0 1 N 21/78		C

(31)優先権主張番号 61/884,126

(32)優先日 平成25年9月29日(2013.9.29)

(33)優先権主張国 米国(US)

## 前置審査

(72)発明者 ユングマン,ラルフ  
アメリカ合衆国,マサチューセッツ州 0 2 1 3 8,ケンブリッジ,プレスコット ストリート  
8 5,アパートメント 1

(72)発明者 イン,ペン  
アメリカ合衆国,マサチューセッツ州 0 2 4 4 5,ブルックライン,ウィスロップ ロード 5  
1

(72)発明者 ダイ,ミンジエ  
アメリカ合衆国,マサチューセッツ州 0 2 2 1 5,ボストン,ブルックライン アベニュー 1  
7 0

(72)発明者 アヴェンダーノ,マイアー  
アメリカ合衆国,マサチューセッツ州 0 2 1 3 5,ブライトン,ユーリータ テラス 8,アパ  
ートメント 2

(72)発明者 ウェールシュタイン,ヨハネス,ピー.  
アメリカ合衆国,マサチューセッツ州 0 2 4 4 6,ブルックライン,ピーコン ストリート 1  
3 5 3

審査官 上條 肇

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 2 / 0 5 8 6 3 8 (WO, A 2 )  
国際公開第2 0 1 2 / 0 7 1 4 2 8 (WO, A 2 )

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 9 / 0 0  
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 7 0  
G 0 1 N 2 1 / 0 0 - 2 1 / 9 5 8  
G 0 1 N 3 3 / 5 3 - 3 3 / 5 4 2  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
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 / W P I D S ( S T N )