

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-534945

(P2005-534945A)

(43) 公表日 平成17年11月17日(2005.11.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64	GO 1 N 21/64	B 2GO43
C 1 2 M 1/00	GO 1 N 21/64	F 2GO54
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/00	A 4BO24
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 M 1/34	A 4BO29
C 1 2 Q 1/04	C 1 2 M 1/34	Z 4BO63
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-506103 (P2005-506103)	(71) 出願人	504178096
(86) (22) 出願日	平成15年8月1日(2003.8.1)		センサー テクノロジーズ リミティド
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月23日(2005.3.23)		ライアビリティー カンパニー
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/024780		アメリカ合衆国, マサチューセッツ O 1
(87) 国際公開番号	W02004/013610		545, シュリューズベリー, ボストン
(87) 国際公開日	平成16年2月12日(2004.2.12)		ターンパイク 910, パーク ナイン
(31) 優先権主張番号	60/400, 503		ウエスト
(32) 優先日	平成14年8月1日(2002.8.1)	(74) 代理人	100099759
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	60/430, 273	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成14年12月2日(2002.12.2)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	60/461, 394		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成15年4月8日(2003.4.8)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 古賀 哲次
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子間相互作用の計測方法

(57) 【要約】

本発明は、プローブと未知標的との相互作用をアッセイする方法を特徴とし、該方法は、
 a) サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは、少なくとも1の未知標的、少なくとも1のプローブ、及び少なくとも1の蛍光タグを含む、
 b) サンプルのサブボリュームからの蛍光を計測し、及び
 c) 蛍光のゆらぎを分析することを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プローブと未知標的との平衡相互作用をアッセイする方法であって、該方法が以下のステップ：

サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは以下の：

ライブラリーの構成要素の少なくとも一部、

少なくとも 1 のプローブ、及び

少なくとも 1 の蛍光タグ、

を含み；

上記サンプルのサブボリュームから蛍光を計測し；そして

該蛍光のゆらぎを分析する

を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

前記方法がさらに以下のステップ：

前記ライブラリーの追加部分を選択し；

該ライブラリーの追加部分を照射で連続的に励起し；

追加部分のサブボリュームの蛍光を計測し；そして

該蛍光のゆらぎを分析する；

を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記サンプルが、複数の蛍光タグを含み、ここで該蛍光タグが前記構成要素に結合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記方法が、前記ライブラリーの前記一部の少なくとも 1 の構成要素を、前記ライブラリーの前記一部の少なくとも 1 の別の構成要素から分離し、そして上記少なくとも 1 の分離された構成要素について請求項 1 の方法を繰り返すことさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記構成要素が、前記蛍光タグを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記蛍光タグが、前記プローブに結合される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

ライブラリーを作成することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

蛍光構成要素を含むライブラリーを作成することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法

【請求項 9】

前記作成が、in vitro 翻訳を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ライブラリーの前記構成要素を、フルオロフォアで標識することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記標識が、蛍光アミノ酸アナログを使用する in vitro 翻訳標識、蛍光タンパク質の配列を cDNA に挿入することによる標識、又は翻訳後標識を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ライブラリーの前記構成要素が、蛍光タンパク質を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ライブラリーの前記構成要素が、蛍光標識されたアミノ酸を含む、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 14】

前記ライブラリーの前記構成要素が、蛍光標識されたペプチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記サンプルが、複数の固有のプロープを含み、ここで各固有のプロープが固有の蛍光タグを含み、各固有のプロープが固有の結合部位を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

プロープと構成要素との結合が存在するとき、前記方法がさらに、プロープが結合を形成する構成要素を同定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記サンプルが蛍光標識された第二プロープをさらに含み、ここで蛍光標識された第一プロープと蛍光標識された第二プロープが、二つの異なる固有の結合部位へと結合することができる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記サンプルが標的上の固有の部位に結合できる第二プロープをさらに含み、ここで該固有部位が、前記第一プロープが標的に結合するときに作成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記少なくとも 1 の蛍光タグが、第二プロープに結合され、ここで該第二プロープは、前記第一プロープが標的に結合するとき該標的と該第一プロープのうちの少なくとも 1 上の固有部位に結合することができ、ここで該固有部位は、上記第一プロープが上記標的に結合するときに作成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記固有部位が、前記標的と前記第一プロープのうちの少なくとも 1 の一次、二次、及び三次構造の少なくとも 1 における変化からもたらされる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記固有部位が、成分を前記標的に加えることにより作成される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記固有部位が、リン酸化、グリコシル化、アルキル化、アシル化、アセチル化、及びユビキチン化の少なくとも 1 により作成される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

前記固有部位が、タンパク質分解により作成される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

前記固有部位が、リン酸化チロシン、リン酸化セリン、又はそれらの組み合わせからなる群から選ばれる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 25】

前記構成要素が、リン酸化、グリコシル化、タンパク質分解、及びユビキチン化の少なくとも 1 により作成される結合部位を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記プロープと前記構成要素のうちの少なくとも 1 が、ビーズに結合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

前記プロープが前記ビーズに結合され、そして前記蛍光タグが前記構成要素に結合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記構成要素が前記ビーズに結合され、そして前記蛍光タグが前記プロープに結合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記分析が、蛍光強度のゆらぎの大きさ及び蛍光ゆらぎの相関期間のうちの少なくとも

10

20

30

40

50

1 を測定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記分析が、前記サンプルの相互相関関数と前記サンプルの自己相関関数のうちの少なくとも 1 を含む相関関数を測定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記分析が、前記相関関数の減衰時間を測定することをさらに含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記分析が、相関関数の時間 0 値を測定することをさらに含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記分析が、モーメント解析、フーリエ変換解析、及びパワー・スペクトル解析の内の少なくとも 1 を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

結合が存在するとき、前記方法が、プローブ-構成要素複合体の拡散係数、サンプル中のプローブ-構成要素複合体の数、及びプローブ-構成要素複合体の化学量論のうちの少なくとも 1 を決定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記サンプルが複数の固有プローブをさらに含み、ここで各固有のプローブが、固有のフルオロフォアを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記サンプルが、複数の異なる大きさのビーズ、複数のプローブ、及び前記ライブラリーの複数の構成要素をさらに含み、上記プローブと上記構成要素のうちの少なくとも 1 が、上記ビーズに結合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記構成要素が前記ビーズに結合され、そして前記プローブが蛍光タグを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記プローブが前記ビーズに結合され、そして前記構成要素が蛍光タグを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記サンプルが、前記第一蛍光タグとは異なる第二蛍光タグをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記第一蛍光タグが前記プローブに結合され、そして前記第二蛍光タグが前記構成要素に結合される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記第一蛍光タグが前記第一プローブに結合され、そして前記第二蛍光タグが第二プローブとビーズのうちの少なくとも 1 に結合される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記第一蛍光タグが前記構成要素に結合され、そして前記第二蛍光タグが前記プローブとビーズのうちの少なくとも 1 に結合される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記サンプルが、異なるサイズの複数のビーズをさらに含み、そして前記プローブと前記構成要素のうちの少なくとも 1 が該ビーズに結合される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記サンプルが、複数の固有プローブをさらに含み、ここで各固有プローブが異なるサイズのビーズに結合される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記第一蛍光タグが前記プローブに結合され、そして前記第二蛍光タグが前記未知標的

10

20

30

40

50

に結合される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記第一蛍光タグが前記第一プローブに結合され、そして前記第二蛍光タグが第二プローブと前記ビーズのうちの少なくとも 1 に結合される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記サンプルが、架橋剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記プローブ、前記構成要素、及び前記蛍光タグのうちの少なくとも 1 が、架橋剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記方法が、前記サンプルの真の自己相関関数と真の相互相関関数のうちの少なくとも 1 を測定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記サンプルを、サンプル・チャンパーを通して流すことをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記方法が自動化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 2】

プローブと未知標的の平衡相互作用をアッセイする方法であって、該方法が以下のステップ：

サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは以下の：

- 少なくとも 1 の未知標的、
- 少なくとも 1 のプローブ、及び
- 少なくとも 1 の蛍光タグ、

を含み；

上記サンプルのサブボリュームから蛍光を計測し；そして
前記蛍光のゆらぎを分析する

を含む、前記方法。

【請求項 5 3】

前記プローブと前記未知標的のうちの少なくとも 1 が、前記蛍光タグを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記蛍光タグが、前記プローブに結合される、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記蛍光タグが、前記未知標的に結合される、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 6】

結合が存在するとき、前記プローブが結合を形成した未知標的を同定することをさらに含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記未知標的が、病原体感染からもたらされる生成物を含む、請求項 5 2 に記載の方法

【請求項 5 8】

前記未知標的が、毒素を含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 9】

サンプル中の病原体をアッセイする方法であって、該方法が以下のステップ：

サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは以下の：

- 少なくとも 1 の病原体、
- 少なくとも 1 のプローブ、及び
- 少なくとも 1 の蛍光タグ

を含み；

10

20

30

40

50

上記サンプルのサブボリュームから蛍光を計測し；そして
 該蛍光のゆらぎを分析する
 を含む、前記方法。

【請求項 6 0】

サンプル中の病原体成分の存在をアッセイする方法であって、該方法が以下のステップ

：
 サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルが以下の：
 既定の病原体成分と結合できる少なくとも 1 のプローブ、及び
 少なくとも 1 の蛍光タグ、

を含む；

上記サンプルのサブボリュームから蛍光を計測し；

該蛍光のゆらぎを分析し；そして

上記病原体成分の有無を測定する；

を含む、前記方法。

10

【請求項 6 1】

前記方法が、前記病原体を同定することをさらに含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記サンプルが、複数の固有蛍光標識プローブを含み、ここで各固有プローブが固有のフルオロフォアを含み、各固有のプローブが固有の病原体成分に結合できる、請求項 6 0 に記載の方法。

20

【請求項 6 3】

前記サンプルが、前記第一蛍光タグのフルオロフォアとは異なるフルオロフォアを含む第二蛍光タグをさらに含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記分析が、前記サンプルの相互相関関数の測定と前記サンプルの自己相関関数の測定の少なくとも 1 を含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記病原体成分が、細菌を含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記病原体成分が、ウイルスを含む、請求項 6 0 に記載の方法。

30

【請求項 6 7】

前記病原体成分が、病原体、病原体断片、病原体核酸、病原体タンパク質、病原体炭水化物、及びそれらの組み合わせからなる群から選ばれる、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記病原体成分が、病原体孢子、病原体毒素、病原体の代謝生成物、及びそれらの組み合わせからなる群から選ばれる、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記病原体成分が病原体であり、そして前記プローブが病原体に結合できる、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 7 0】

40

サンプル中の毒素の存在をアッセイする方法であって、該方法が以下のステップ：

サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは以下の：

既定の毒素と結合できる少なくとも 1 のプローブ、及び

少なくとも 1 の蛍光タグ、

を含む；

上記サンプルのサブボリュームから蛍光を計測し；

該蛍光のゆらぎを分析し；そして

上記毒素の有無を測定する；

を含む、前記方法。

【請求項 7 1】

50

前記毒素がリシンである、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

前記プローブと前記蛍光タグが、蛍光標識されたヒト血清アルブミン・ガラクトースを含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 73】

前記プローブと前記蛍光タグが、蛍光標識されたヒト血清アルブミン・ガラクトースを含む、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

既知の病原体に結合できるプローブを同定する方法であって、該方法が以下のステップ

- 10
- a. サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは、少なくとも 1 の既知の病原体、少なくとも 1 のプローブ、及び少なくとも 1 の蛍光タグを含み；
 - c. 該サンプルにより放出される蛍光を計測し；そして
 - d. 該蛍光のゆらぎを分析する；
- を含む、前記方法。

【請求項 75】

リシンと該リシンに結合される蛍光タグを含む第一プローブ、及び該第一プローブに結合する第二プローブ、を含み、ここで該第二プローブは、リシンに結合するキット。

【請求項 76】

前記第二プローブが、ヒト血清アルブミン・ガラクトースを含む、請求項 75 に記載のキット。

【請求項 77】

前記キットが、第二蛍光タグをさらに含む、請求項 75 に記載のキット。

【請求項 78】

前記第二蛍光タグが、前記第二プローブに結合される、請求項 75 に記載のキット。

【請求項 79】

プローブと標的との分子間相互作用の存在をアッセイする方法であって、該方法が以下のステップ：

- 30
- a. サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは以下の：
 - i. 複数の固有の質量増大成分、ここで各固有の質量増大成分は固有の質量を有する；
 - i i. 複数の標的；
 - i i i. 複数の蛍光タグ；及び
 - i v. 複数のプローブ；
 を含み、
 - b. 該サンプルにより放出される蛍光を計測し；そして
 - c. 該蛍光のゆらぎを分析する；
- を含む、前記方法。

【請求項 80】

前記蛍光タグが、前記質量増大成分に結合される、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 81】

前記蛍光タグが、前記プローブに結合される、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 82】

前記蛍光タグが、前記標的に結合される、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 83】

前記プローブが、前記質量増大成分に結合される、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 84】

前記蛍光タグが前記プローブに結合され、そして該プローブが前記質量増大成分に結合される、請求項 79 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 85】
前記蛍光タグが前記質量増大成分に結合され、そして前記プローブが該質量増大成分に結合される、請求項 79 に記載の方法。
- 【請求項 86】
前記複数の蛍光タグが、複数の固有蛍光タグを含む、請求項 79 に記載の方法。
- 【請求項 87】
以下の：
複数の固有ビーズ、ここで各固有ビーズは異なるサイズを有する；
固有標的に結合するようになっている複数のプローブ、ここで該プローブは上記ビーズに結合される；並びに
複数の蛍光タグ；
を含むキット。 10
- 【請求項 88】
前記蛍光タグが、固有のフルオロフォアを含む、請求項 87 に記載のキット。
- 【請求項 89】
前記キットが、第二プローブをさらに含む、請求項 87 に記載のキット。
- 【請求項 90】
前記蛍光タグが、前記第二プローブに結合される、請求項 87 に記載のキット。
- 【請求項 91】
前記蛍光タグが、前記ビーズと前記プローブのうちの少なくとも 1 に結合される、請求項 87 に記載のキット。 20
- 【請求項 92】
サンプルの真の相関関数を測定する方法であって、該方法が、蛍光相関分光装置からサンプルの計測された相関関数を求め、そして計測された相関関数に補正アルゴリズムを適用することを含む、前記方法。
- 【請求項 93】
前記分光装置が、励起源、第一検出器、及び第二検出器を含む、請求項 92 に記載の方法。
- 【請求項 94】
前記計測された相関関数が、自己相関関数である、請求項 92 に記載の方法。 30
- 【請求項 95】
前記計測された相関関数が、相互相関関数である、請求項 92 に記載の方法。
- 【請求項 96】
前記補正アルゴリズムが、ブリード・スルー係数に基いた計測された相関関数を調整する、請求項 92 に記載の方法。
- 【請求項 97】
前記補正アルゴリズムが、第一検出器で計測される蛍光強度の第一平均と第二検出器で計測される蛍光強度の第二平均にさらに基づく、請求項 96 に記載の方法。
- 【請求項 98】
前記サンプルが、ライブラリーの構成要素の少なくとも一部、病原体、毒素、又はそれらの組み合わせを含む、請求項 92 に記載の方法。 40
- 【請求項 99】
サンプルの真の自己相関関数を測定する方法であって、該方法が以下のステップ：
蛍光相関分光装置の第一検出器からサンプルの計測された第一自己相関関数を求め；
該装置の第二検出器からサンプルの計測された第二自己相関関数を求め；
該装置の該第一検出器と該第二検出器との間の計測された相互相関関数を求め；そして
該第一検出器で計測された蛍光の真の自己相関関数を測定する；
を含む、前記方法。
- 【請求項 100】 50

サンプルの真の相互相関関数を測定する方法であって、該方法が以下のステップ：
蛍光相関分光装置の第一検出器から、サンプルの計測された第一相関関数を求め；
該装置の第二検出器から、サンプルの計測された第二相関関数を求め；
該装置の該第一検出器と該第二検出器との間の計測された相互相関関数を求め；
真の相互相関関数を測定する；

を含む、前記方法。

【請求項 101】

サンプルの真の相関関数の測定用コンピューター・プログラムを記録するコンピューターが読み込み可能な媒体を含む製品であって、該コンピューター・プログラムが以下の：
該サンプルの計測された相関関数を求めるための第一コード・セグメント；及び
計測された相関関数に補正アルゴリズム適用するための第二コード・セグメント；
を含む、前記製品。

10

【請求項 102】

前記計測された相関関数が、自己相関関数である、請求項 101 に記載の製品。

【請求項 103】

前記計測された相関関数が、相互相関関数である、請求項 101 に記載の製品。

【請求項 104】

前記補正アルゴリズムが、計測された相関関数を、第一検出器と第二検出器との間のクロストーク・パラメーターに基いて調整する、請求項 101 に記載の製品。

【請求項 105】

前記補正アルゴリズムが、第一検出器で計測される蛍光強度の第一平均と、第二検出器で計測される蛍光強度の第二平均にさらに基く、請求項 104 に記載の製品。

20

【請求項 106】

サンプルの真の相関関数の測定用コンピューター・プログラムをその中に記録する、コンピューター読み取り可能媒体を含む製品であって、該コンピューター・プログラムが以下の：

蛍光相関分光装置の第一検出器から該サンプルの計測された第一自己相関関数、該装置の第二検出器から該サンプルの計測された第二自己相関関数、及び該装置の該第一検出器と該第二検出器との間における計測された相互相関関数を求めるための第一コード・セグメント；

30

該第一検出器で計測された蛍光の真の自己相関関数を測定するための第二コード・セグメント

を含む、前記製品。

【請求項 107】

サンプルの真の相関関数の測定用システムであって、該システムが、サンプルに関する情報を記憶するメモリー装置、並びに蛍光相関装置からのサンプルの計測された相関関数を求め、そして計測された相関関数に補正アルゴリズムを適用する指令でプログラムされるプロセッサを含む。

【請求項 108】

サンプルの真の相関関数の測定用蛍光相関分光装置であって、該装置が、以下の：
励起源；

該サンプルの蛍光を計測する第一検出器と第二検出器；

該サンプルに関する情報を記憶するメモリー装置；及び

蛍光相関分光装置からサンプルの計測された相関関数を求め、そして計測された相関関数に補正アルゴリズムを適用する指令でプログラムされるプロセッサ；

を含む、前記装置。

【請求項 109】

サンプルの真の蛍光強度を測定する方法であって、該方法が以下のステップ：

蛍光相関分光装置の第一検出器から該サンプルの計測された蛍光強度を求め；そして

該計測された蛍光強度に補正アルゴリズムを適用する；

50

を含む前記方法。

【請求項 1 1 0】

前記補正アルゴリズムが、計測された蛍光強度を、蛍光相関分光装置の第一検出器と第二検出器との間のブリード・スルー係数に基いて調整する、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

前記補正アルゴリズムが、該第二検出器からのサンプルの計測された第二蛍光強度にさらに基く、請求項 1 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

サンプルの真の蛍光強度を測定する方法であって、該方法が以下のステップ：

蛍光相関分光装置の第一検出器で該サンプルの第一蛍光強度、並びに蛍光相関分光装置の第二検出器で該サンプルの第二蛍光強度を計測し；そして

該第一検出器で計測される蛍光の真の蛍光強度と、該第二検出器で計測される蛍光の真の蛍光強度のうちの少なくとも 1 を測定する；

を含む、前記方法。

【請求項 1 1 3】

前記真の第一蛍光強度に基いて真の自己相関曲線を作成することをさらに含む、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

前記真の第一蛍光強度と前記真の第二蛍光強度に基いて、真の相互相関曲線を作成することをさらに含む、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

蛍光相関分光装置により計測されるサンプルの真の蛍光強度を測定するコンピューター・プログラムをその中に記録するコンピューターが読み取り可能な媒体を含む製品。

【請求項 1 1 6】

サンプルの真の蛍光強度を測定するための蛍光相関分光装置であって、該装置は以下の：

励起源；

該サンプルの計測された第一蛍光と計測された第二蛍光を検出するための第一検出器と第二検出器；

コンピューター・コードを記憶するメモリー装置；及び

計測された第一蛍光と計測された第二蛍光に基いて上記真の蛍光強度を求めるためのコンピューター・コードを実行するプロセッサ；

を含む、前記装置。

【請求項 1 1 7】

前記メモリー装置が E P R O M である、請求項 1 1 6 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、蛍光相関分光法を使用して、標的とプローブとの相互作用を調べる事に関する。

【0 0 0 2】

関連出願へのクロスリファレンス

本出願は、2003年4月8日に提出された米国仮出願第60/461,394号、2002年12月2日に提出された米国仮出願第60/430,273号、及び2002年8月1日に提出された米国仮出願第60/400,503号の優先権を主張する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

生物学に関する様々な科学研究領域は、分子の存在を検出し、分子間相互作用を理解し、そして分子の性質及び機能を決定しようとしている。ヒトゲノム・プロジェクトは、

10

20

30

40

50

人体内で発現する全てのタンパク質のライブラリーを提供した。これらの発現されたタンパク質の分子間相互作用を理解し、そして発現されたタンパク質の機能を評価することは、新しい薬剤及び薬剤治療の開発を導く可能性を有する。同様に、生物兵器の形態として病原体をヒトの集団に対して使用する可能性が引き起こす脅威により、病原体を検出する必要性が注目されてきた。

【0004】

多くのアッセイ技術は、分子間相互作用の研究を手助けするために開発されており、例えば、酵素結合免疫吸着検定法(E L I S A)、ラジオ-イムノアッセイ(R I A)、蛍光アッセイ、動的散乱、質量分析法、酵母2ハイブリッド、ファージディスプレイ、及び熱量測定法などを含む。多くのこれらのアッセイ技術は、試験されるサンプルの特殊化された調製、精製、分離、及び増幅を必要とする。これらのアッセイ技術の幾つかはまた、比較的少量のサンプルを必要とし、そして実行するために多くの時間を要する。従って、分子間相互作用を計測する方法であって、使用するのに比較的単純でありかつ比較的少量のサンプルで行うことができる計測方法の開発への必要性が存在する。

10

【0005】

蛍光相関分光法(F C S)は、小さい(例えば、フェムトリットルの)共焦点体積の蛍光強度のゆらぎを計測する単一分子の検出方法である。F C Sは、密に集束されたレーザービームを使用して、共焦点体積を規定する。照射された体積内への及び該体積外への蛍光標識された粒子の分散は、蛍光強度のゆらぎパターンを決定する。このデータから、研究される分子に関する定性情報と定量情報の両方を抽出することができる。そうした定性情報は、例えば、分子間相互作用の有無を含み、そうした定量的情報は、拡散時間、相互作用の化学量論、相互作用する粒子の濃度、及び相互作用の動態を含む。

20

【0006】

F C Sは、単一分子の様々な性質、例えば、翻訳拡散及び輸送、化学反応速度、分子凝集、リガンドの結合、酵素活性、及び核酸相互作用を研究するために使用されてきている。

【発明の開示】

【0007】

要約

第一の態様では、本発明は、プローブと未知標的との平衡相互作用をアッセイする方法を特徴とし、該方法は、照射でサンプルを励起し、ここで、該サンプルは、ライブラリーの構成要素の少なくとも一部、少なくとも1のプローブ、及び少なくとも1の蛍光タグを含んでおり、サンプルのサブボリュームからの蛍光を計測し、そして蛍光のゆらぎを分析することを含む。一の態様では、該方法は、ライブラリーの追加部分を選択し、照射でライブラリーの追加部分を連続的に励起し、追加部分のサブボリュームの蛍光を計測し、そして蛍光のゆらぎを分析することを含む。いくつかの態様では、サンプルは、複数の蛍光タグを含み、蛍光タグは構成要素に結合されている。

30

【0008】

一の態様では、該方法はさらに、ライブラリーの一部の構成要素のうちの少なくとも1を、ライブラリーの一部の少なくとも1の別の構成要素から分離し、そしてこの少なくとも1の分離された構成要素に関して該方法を繰り返すことを含む。

40

【0009】

幾つかの態様では、構成要素は、蛍光タグを含む。別の態様では蛍光タグは、プローブに結合されている。

【0010】

別の態様では、該方法は、ライブラリーの作成をさらに含む。一の態様では、該方法は、蛍光構成要素を含むライブラリーの作成を含む。幾つかの態様では、このライブラリーの作成は、in vitro翻訳を含む。別の態様では該方法は、フルオロフォアでライブラリーの構成要素を標識することをさらに含む。幾つかの態様では、標識は、蛍光アミノ酸アナログを使用するin vitro翻訳標識、蛍光タンパク質の配列をc D N Aに挿入すること

50

による標識、又は翻訳後標識を含む。

【0011】

幾つかの態様では、ライブラリーの構成要素は、蛍光タンパク質を含む。別の態様では、ライブラリーの構成要素は、蛍光標識されたアミノ酸を含む。別の態様では、ライブラリーの構成要素は、蛍光標識されたペプチドを含む。

【0012】

別の態様では、サンプルは複数の固有のプロープを含み、ここで各固有プロープは、固有の蛍光タグを含み、各固有プロープは、固有の結合部位を有する。

【0013】

別の態様では、プロープと構成要素の結合が存在するとき、該方法はさらに、プロープが結合を形成する構成要素を同定することをさらに含む。該サンプルは、蛍光標識された第二プロープをさらに含み、蛍光標識された第一プロープ及び蛍光標識された第二プロープは、二つの異なる固有な結合部位へと結合することができる。

【0014】

一の態様では、サンプルは、標的の固有部位に対して結合できる第二プロープをさらに含み、ここで該固有部位は、第一プロープが標的に結合したときに作られる。

【0015】

別の態様では、少なくとも1の蛍光タグは、第二プロープに結合される。ここで、第一プロープが標的に結合するとき、第二プロープは、標的と第一プロープのうちの少なくとも1上の固有部位へと結合することができ、該固有部位は、第一プロープが標的に結合したときに作られる。幾つかの態様では、該固有部位は、標的と第一プロープのうちの少なくとも1の一次、二次、及び三次構造のうちの少なくとも1の変化からもたらされる。別の態様では、該固有部位は、ある成分を標的へ加えることにより作成される。別の態様では、該固有部位は、リン酸化、グリコシル化、アルキル化、アシル化、アセチル化、及びユビキチン化のうちの少なくとも1によって作成される。該固有部位は、タンパク質分解によって作成される。別の態様では、該固有部位は、リン酸化チロシン、リン酸化セリン、又はそれらの組み合わせからなる群から選ばれる。

【0016】

一の態様では、構成要素は、リン酸化、グリコシル化、タンパク質分解、及びユビキチン化のうちの少なくとも1により作成された固有部位を含む。

【0017】

幾つかの態様では、プロープと構成要素のうちの少なくとも1が、ビーズに結合される。別の態様では、プロープは、ビーズに結合され、そして蛍光タグは、構成要素に結合される。別の態様では、構成要素は、ビーズに結合され、そして蛍光タグは、プロープに結合される。

【0018】

一の態様では、分析は、蛍光強度のゆらぎの大きさと蛍光ゆらぎの相関期間のうちの少なくとも1を測定することを含む。別の態様では、分析は、サンプルの相互相関関数とサンプルの自己相関関数のうちの少なくとも1を含む相関関数を測定することを含む。別の態様では、相関関数の減衰時間を測定することをさらに含む。ある態様では、分析は、相関関数の時間が0のときの値(時間0値(time 0 value))を測定することをさらに含む。別の態様では、分析は、モーメント解析、フーリエ変換解析、及びパワー・スペクトル解析のうちの少なくとも1を含む。

【0019】

別の態様では、結合が存在するとき、該方法はさらに、プロープ-構成要素複合体の拡散係数、サンプル中のプロープ-構成要素複合体の数、及びプロープ-構成要素複合体の化学量論のうちの少なくとも1を測定することをさらに含む。

【0020】

幾つかの態様では、サンプルはさらに、複数の固有プロープを含み、ここで各固有プロープは、固有フルオロフォアを含む。別の態様では、サンプルはさらに異なるサイズの複

10

20

30

40

50

数のビーズ、複数のプローブ、及びライブラリーの複数の構成要素を含み、ここで該プローブと該ビーズのうちの少なくとも1は、ビーズに結合される。一の態様では、構成要素は、ビーズに結合され、そして構成要素は蛍光タグを含む。別の態様では、プローブはビーズに結合され、そして構成要素は蛍光タグを含む。

【0021】

別の態様では、サンプルはさらに、第一蛍光タグとは異なる第二蛍光タグをさらに含む。別の態様では、第一蛍光タグは、プローブに結合され、そして第二蛍光タグは、構成要素に結合される。幾つかの態様では、第一蛍光タグは、第一プローブに結合され、そして第二蛍光タグは、第二プローブとビーズの少なくとも1に結合される。別の態様では、第一蛍光タグは、構成要素に結合され、そして第二蛍光タグは、プローブとビーズのうちの少なくとも1に結合される。

10

【0022】

一の態様では、サンプルはさらに、複数の異なる大きさのビーズを含み、そしてプローブと構成要素のうちの少なくとも1は、ビーズに結合する。別の態様では、サンプルはさらに、複数の固有プローブを含み、ここで各固有プローブは、異なるサイズのビーズに結合する。幾つかの態様では、第一蛍光タグは、プローブに結合され、そして第二蛍光タグは、未知標的に結合されている。別の態様では、第一蛍光タグは、第一プローブに結合され、そして第二蛍光タグは、第二プローブとビーズのうちの少なくとも1に結合される。

【0023】

別の態様では、サンプルは、架橋剤を含む。幾つかの態様では、プローブ、構成要素、及び蛍光タグの少なくとも1は、架橋剤を含む。

20

【0024】

別の態様では、方法は、サンプルの真の自己相関関数と真の相互相関関数のうちの少なくとも1を求めることを含む。

【0025】

幾つかの態様では、サンプル・チャンバーを通してサンプルを流すことを含む。別の態様では、該方法は自動化される。

【0026】

幾つかの態様では、該方法は、以下の方程式：

【数1】

$$G_{1T} = \frac{-2\rho \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R + \rho^2 \langle I_2 \rangle^2 G_2 + \langle I_1 \rangle^2 G_1}{-2\rho \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle + \rho^2 \langle I_2 \rangle^2 + \langle I_1 \rangle^2}$$

30

[式中、

G_{1T} は、第一検出器で計測された蛍光の真の自己相関関数であり、

40

は、第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数であり、

$\langle I_1 \rangle$ は、第一検出器における時間平均強度であり、

$\langle I_2 \rangle$ は、第二検出器における時間平均強度であり、

R は、第一検出器と第二検出器との間の計測された相互相関関数であり、

G_1 及び G_2 は、第一検出器と第二検出器それぞれの計測された自己相関関数である。]

又はその同等物を使用して、サンプルの蛍光であって、第一検出器、第二検出器、及び励起源を有する蛍光相関分光装置の第一検出器で計測された蛍光の真の自己相関関数 (G_{1T}) を測定することをさらに含む。

【0027】

別の態様では、該方法は、以下の方程式：

50

【数 2】

$$G_{2T} = \frac{-2r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R + \langle I_2 \rangle^2 G_2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2 G_1}{-2r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle + \langle I_2 \rangle^2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2}$$

[式中、

G_{2T} は、第二検出器で計測された蛍光の真の自己相関関数であり、

r は、第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数であり、そして
 $\langle I_1 \rangle$ 、 $\langle I_2 \rangle$ 、 R 、 G_1 、及び G_2 は、上で記載されたとおりである。]

又はその同等物を使用して、サンプルの蛍光であって、第一検出器、第二検出器、及び励起源を有する蛍光相関分光装置の第二検出器で計測された蛍光の真の自己相関関数 (G_{2T}) を測定することをさらに含む。

【0028】

別の態様では、該方法は、以下の方程式：

【数 3】

$$R_T = \frac{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R(1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 G_2 - r \langle I_1 \rangle^2 G_1}{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle (1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 - r \langle I_1 \rangle^2}$$

[式中、

R_T は、第一及び第二検出器で計測された蛍光の真の相互相関関数であり、

$\langle I_1 \rangle$ 、 $\langle I_2 \rangle$ 、 R 、 G_1 、及び G_2 は、上で記載されたとおりである。]

又はその同等物を使用して、サンプルの蛍光であって、第一検出器、第二検出器、及び励起源を有する蛍光相関分光装置の第一検出器で計測された蛍光の真の相互相関関数 (R_T) を測定することをさらに含む。

【0029】

別の態様では、本発明は、プローブと未知標的との平衡相互作用をアッセイする方法を特徴とし、該方法は、サンプルを照射で励起し、ここで、該サンプルは、少なくとも1の未知標的、少なくとも1のプローブ、及び少なくとも1の蛍光タグを含んでおり、サンプルのサブボリュームから蛍光を計測すること、そして蛍光ゆらぎを分析することを含む。幾つかの態様では、蛍光タグは、未知標的へと結合される。別の態様では、結合が存在するとき、該方法は、プローブが結合を形成する未知標的を同定することをさらに含む。

【0030】

幾つかの態様では、未知標的は、病原体感染からもたらされる生成物を含む。別の態様では、未知標的は、毒素を含む。

【0031】

別の態様では、本発明は、サンプル中の病原体をアッセイする方法を特徴とし、該方法は、サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは病原体、少なくとも1のプローブ、及び少なくとも1の蛍光タグを含む、サンプルのサブボリュームから蛍光を計測し、そして蛍光のゆらぎを分析することを含む。

【0032】

第二の態様では、本発明は、サンプル中の病原体成分の存在をアッセイする方法を特徴

10

20

30

40

50

とし、ここで該方法は、サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは、規定の病原体成分と結合できる少なくとも1のプロープ、及び少なくとも1の蛍光タグを含み、サンプルのサブボリュームから蛍光を計測し、蛍光のゆらぎを分析し、そして病原体成分の有無を測定することを含む。幾つかの態様では、該方法は、病原体を同定することをさらに含む。

【0033】

一の態様では、病原体成分は、細菌を含む。別の態様では病原体成分は、ウイルスを含む。別の態様では、病原体成分は、病原体、病原体断片、病原体核酸、病原体タンパク質、病原体炭水化物、及びそれらの組み合わせからなる群から選ばれる。幾つかの態様では、病原体成分は、病原体孢子、病原体毒素、病原体の代謝生成物、及びそれらの組み合わせからなる群から選ばれる。別の態様では、病原体成分は、病原体でありそしてプロープは、病原体に結合することができる。

10

【0034】

幾つかの態様では、サンプルは、複数の固有蛍光標識プロープを含み、ここで各固有プロープは、固有のフルオロフォアを含み、各固有プロープは、固有の病原体成分に結合できる。

【0035】

別の態様では、分析は、サンプルの少なくとも1の相互相関関数を測定し、そしてサンプルの自己相関関数を測定することを含む。

【0036】

第三の態様では、本発明は、サンプル中の毒素の存在をアッセイする方法を特徴とし、該方法は、サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは、既定の毒素に結合することができる少なくとも1のプロープ、及び少なくとも1の蛍光タグを含んでおり、サンプルのサブボリュームから蛍光を計測し、蛍光のゆらぎを分析し、そして毒素の有無を測定することを含む。ある態様では、毒素はリシンである。ある態様では、該プロープ及び該蛍光タグは、蛍光標識されたヒト血清アルブミン・ガラクトースを含む。

20

【0037】

第四の態様では、本発明は、既知の病原体に結合できるプロープを同定する方法を特徴とする。該方法は、サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは、少なくとも1の既知の病原体、少なくとも1のプロープ、及び少なくとも1の蛍光タグを含む、サンプルにより放出される蛍光を計測すること、そして蛍光のゆらぎを分析することを含む。

30

【0038】

第五の態様では、本発明は、リシンなどの第一プロープ、ここで蛍光タグがリシンに結合されており、及び第一プロープに結合する第二プロープ、ここで該第二プロープは、リシンと結合するために用いられる、を含むキットを特徴とする。幾つかの態様では、第二プロープは、ヒト血清アルブミン・ガラクトースを含む。別の態様では、このキットは、第二蛍光タグをさらに含む。一の態様では、この第二蛍光タグは、第二プロープに結合される。

【0039】

第六の態様では、本発明はプロープと標的との分子間相互作用の存在をアッセイする方法を特徴とし、該方法は、サンプルを照射で励起し、ここで該サンプルは、質量を増大する複数の固有成分を含み、各固有の質量増大成分は、固有の質量、複数の標的、複数の蛍光タグ、及び複数のプロープを有しており、そしてサンプルにより放出される蛍光を計測し、そして蛍光のゆらぎを分析することを含む。幾つかの態様では、蛍光タグは、質量増大成分に結合される。別の態様では、蛍光タグは、プロープに結合される。幾つかの態様では、蛍光タグは、標的に結合される。別の態様では、プロープは、質量増大成分に結合される。一の態様では、蛍光タグはプロープに結合され、そして該プロープは、質量増大成分に結合される。別の態様では蛍光タグは、質量増大成分に結合され、そしてプロープは、質量増大成分に結合される。幾つかの態様では、複数の蛍光タグは、複数の固有蛍光タグを含む。

40

50

【0040】

一の態様では、キットは、複数の固有ビーズ、ここで各固有ビーズは、異なるサイズを有し、固有標的に結合するように適用される複数のプローブ、ここで該プローブはビーズに結合される、並びに複数の蛍光タグを含む。一の態様では、該蛍光タグは、固有のフルオロフォアを含む。別の態様では、キットはさらに、第二プローブを含む。幾つかの態様では、蛍光タグは、ビーズとプローブのうちの少なくとも1に結合される。

【0041】

第七の態様では、本発明は、サンプルの真の相関関数を測定する方法を特徴とし、ここで該方法は、蛍光相関分光装置からサンプルの計測された相関関数を求め、そして補正アルゴリズムを、計測された相関関数に適用することを含む。一の態様では、該分光装置は、励起源、第一検出器、及び第二検出器を含む。幾つかの態様では、計測された相関関数は、自己相関関数である。別の態様では、計測された相関関数は、相互相関関数である。別の態様では、補正アルゴリズムは、ブリード・スルー係数に基いた計測された相関関数を調整する。

10

【0042】

別の態様では、補正アルゴリズムはさらに、第一検出器で計測された蛍光強度の第一平均、並びに第二検出器で計測される蛍光強度の第二平均に基く。

【0043】

一の態様では、本発明は、サンプルの真の自己相関関数を測定する方法を特徴とし、ここで該方法は、蛍光相関分光装置の第一検出器から、サンプルの計測された自己相関関数 (G_1) を求め、該装置の第二検出器から、サンプルの計測された自己相関関数を求め、該装置の第一検出器と第二検出器との間における計測された相関関数 (R) を求め、第一検出器で蛍光の第一時間平均強度 (I_1) を計算し、第二検出器で蛍光の第二時間平均強度 (I_2) を計算し、以下の方程式：

20

【数4】

$$G_{1T} = \frac{-2\rho \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R + \rho^2 \langle I_2 \rangle^2 G_2 + \langle I_1 \rangle^2 G_1}{-2\rho \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle + \rho^2 \langle I_2 \rangle^2 + \langle I_1 \rangle^2}$$

30

[式中、 ρ は、第二検出器に対する第一検出器のブリード・スルー係数である]

又はその同等物を使用して第一検出器で計測された蛍光の真の自己相関関数 (G_{1T}) を測定することを含む。

【0044】

別の態様では、サンプルの真の自己相関関数を測定する方法は、蛍光相関分光装置の第一検出器から、サンプルの計測された第一自己相関関数 (G_1) を求め、該装置の第二検出器から、サンプルの計測された第二自己相関関数 (G_2) を求め、該装置の第一検出器と第二検出器との間における計測された相互相関関数 (R) を求め、第一検出器での蛍光の第一時間平均強度 (I_1) を計算し、第二検出器で蛍光の第二時間平均強度 (I_2) を計算し、以下の方程式：

40

【数 5】

$${}_t G_{2T} = \frac{-2r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R + \langle I_2 \rangle^2 G_2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2 G_1}{-2r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle + \langle I_2 \rangle^2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2}$$

[式中、 r は第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数である]

10

又はその同等物を使用する第二検出器で計測される蛍光の真の自己相関関数 (G_{2T}) を測定することを含む。

【0045】

別の態様では、サンプルの真の相互相関関数を検出する方法は、蛍光相関分光装置の第一検出器から、サンプルの計測された第一相関関数 (G_1) を求め、該装置の第二検出器から、サンプルの計測された第二相関関数 (G_2) を求め、該装置の第一検出器と第二検出器との間の計測された相互相関関数 (R) を求め、第一検出器での蛍光の第一時間平均強度 (I_1) を計算し、第二検出器での蛍光の第二時間平均強度 (I_2) を計算し、以下の方程式：

【数 6】

20

$$R_T = \frac{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R (1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 G_2 - r \langle I_1 \rangle^2 G_1}{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle (1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 - r \langle I_1 \rangle^2}$$

[式中、 ρ は、第二検出器に対する第一検出器のブリード・スルー係数であり、かつ r は、第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数である。]

又はその同等物を使用して真の相互相関関数 (R_T) を測定することを含む。

30

【0046】

第八態様では、本発明は、サンプルの真の相関関数の測定用コンピューター・プログラムをその中に記録するコンピューターが読み取り可能な媒体を含む製品を特徴とし、ここで該コンピューター・プログラムは、サンプルの計測された相関関数を求めるための第一コード・セグメント、並びに計測された相関関数に補正アルゴリズムを適用するための第二コード・セグメントを含む。一の態様では、計測された相関関数は、自己相関関数である。別の態様では、計測された相関関数は、相互相関関数である。幾つかの態様では、補正アルゴリズムは、第一検出器と第二検出器との間のクロストークパラメーターに基いて、計測された相関関数を調整する。別の態様では、補正アルゴリズムは、第一検出器で計測された蛍光強度の第一平均、並びに第二検出器で計測される蛍光強度の第二平均にさら

40

【0047】

第九態様では、本発明は、サンプルの真の相関関数を測定するコンピューター・プログラムをその中に記録するコンピューターが読み込み可能な媒体を含む製品を特徴とし、該コンピューター・プログラムは、蛍光相関分光装置の第一検出器から、サンプルの計測された第一自己相関関数 (G_1)、該装置の第二検出器から、サンプルの計測された第二自己相関関数 (G_2)、及び該装置の第一検出器と第二検出器の間の計測された相互相関関数 (R) を求めるための第一コード・セグメント、第一検出器での蛍光の第一時間平均強度 (I_1)、並びに第二検出器での蛍光の第二時間平均強度 (I_2) を計算するための第二コード・セグメント、以下の方程式：

50

【数 7】

$$G_{1T} = \frac{-2\rho \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R + \rho^2 \langle I_2 \rangle^2 G_2 + \langle I_1 \rangle^2 G_1}{-2\rho \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle + \rho^2 \langle I_2 \rangle^2 + \langle I_1 \rangle^2}$$

[式中、 ρ は第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数である]

又はその同等物を使用して、第一検出器で計測された蛍光の真の自己相関関数 (G_{1T}) を測定する第三コード・セグメントを含む。一の態様では、該商品は、以下の方程式：

【数 8】

$$G_{2T} = \frac{-2r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R + \langle I_2 \rangle^2 G_2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2 G_1}{-2r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle + \langle I_2 \rangle^2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2}$$

20

[式中、 r は、第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数である]

又はその同等物を使用して、第二検出器で計測された蛍光の第二の真の自己相関関数 (G_{2T}) 測定するための第四コード・セグメントをさらに含む。幾つかの態様では、製品は、以下の方程式：

【数 9】

$$R_T = \frac{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R(1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 G_2 - r \langle I_1 \rangle^2 G_1}{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle (1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 - r \langle I_1 \rangle^2}$$

30

又はその同等物を使用して真の相互相関関数 (R_T) を測定するための第五コード・セグメントをさらに含む。

【0048】

一の態様では、製品は、サンプルの真の相関関数の測定用コンピューター・プログラムをその中に記録したコンピューターが読み込み可能である媒体を含む。ここで該コンピューター・プログラムは、蛍光相関分光装置の第一検出器から、サンプルの計測された第一相関関数 (G_1)、該装置の第二検出器から、サンプルの計測された第二相関関数 (G_2)、並びに該装置の第一検出器と第二検出器との間における計測された相互相関関数 (R) を求めるための第一コード・セグメント、第一検出器での蛍光の第一時間平均強度 (I_1) と第二検出器での蛍光の第二時間平均強度 (I_2) を計算するための第二コード・セグメント、以下の方程式：

40

【数 1 0】

$$G_{2T} = \frac{-2r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R + \langle I_2 \rangle^2 G_2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2 G_1}{-2r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle + \langle I_2 \rangle^2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2}$$

[式中、 r は、第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数である]又はその同等物を使用して、第二検出器で計測される蛍光の真の自己相関関数 (G_{2T}) を測定するための第三コード・セグメントを含む。 10

【0049】

別の態様では、製品は、サンプルの真の相関関数の測定用コンピューター・プログラムをその中に記録したコンピューターが読み取り可能な媒体を含む。ここで該コンピューター・プログラムは、蛍光相関分光装置の第一検出器から、サンプルの計測された第一相関関数 (G_1)、該装置の第二検出器から、サンプルの計測された第二相関関数 (G_2)、並びに該装置の第一検出器と第二検出器との間における計測された相互相関関数 (R) を求めるための第一コード・セグメント、第一検出器での蛍光の第一時間平均強度 (I_1) と第二検出器での蛍光の第二時間平均強度 (I_2) を計算するための第二コード・セグメント、以下の方程式： 20

【数 1 1】

$$R_T = \frac{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R(1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 G_2 - r \langle I_1 \rangle^2 G_1}{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle (1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 - r \langle I_1 \rangle^2}$$

[式中、 ρ は、第二検出器に対する第一検出器のブリード・スルー係数であり、 r は、第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数である]又はその同等物を使用して、真の相互相関関数 (R_T) を測定するための第三コード・セグメントを含む。 30

【0050】

第十態様では、本発明は、サンプルの真の相関関数を測定するためのシステムを特徴とする。ここで該システムは、サンプルに関する情報を記憶するメモリー装置、並びに蛍光相関分光装置からのサンプルの計測された相関関数を求め、そして計測された相関関数に補正アルゴリズムを適用するための指令をプログラムされたプロセッサを含む。

【0051】

別の態様では、本発明は、サンプルの真の相関関数を測定するための蛍光相関分光装置を特徴とする。ここで該装置は、励起源、サンプルの蛍光を計測するための第一検出器、及び第二検出器、サンプルに関する情報を記憶するためのメモリー装置、並びに蛍光相関装置からサンプルの計測された相関関数を求め、そして計測された相関関数に補正アルゴリズムを適用するための指令をプログラムされたプロセッサを含む。 40

【0052】

別の態様では、サンプルの真の蛍光強度を測定する方法は、蛍光相関分光装置の第一検出器からサンプルの計測された蛍光強度を求め、そして計測された蛍光強度に補正アルゴリズムを適用することを含む。一の態様では、補正アルゴリズムは、蛍光相関分光装置の第一検出器と第二検出器との間におけるブリード・スルー係数に基いて計測された蛍光強度を調整する。別の態様では、補正アルゴリズムは、第二検出器からのサンプルの計測さ 50

れた第二蛍光強度にさらに基く。

【0053】

一の態様では、サンプルの真の蛍光強度を測定するための方法は、蛍光相関分光装置の第一検出器でサンプルの第一蛍光強度(I_1)、並びに蛍光相関分光装置の第二検出器でサンプル第二蛍光強度(I_2)を計測し、以下の方程式：

【数12】

$$X = \frac{I_1 - \rho I_2}{1 - \rho r}$$

10

[式中、 ρ は、第二検出器に対する第一検出器の第一ブリード・スルー係数であり、かつ
 r は、第一検出器に対する第二検出器の第二ブリード・スルー係数である]
を使用して、第一検出器で計測された蛍光の第一真の蛍光強度(X)測定することを含む。

【0054】

別の態様では、サンプルの真の蛍光強度を測定する方法、第一検出器と第二検出器のそれぞれからサンプルの計測された第一蛍光強度(I_1)と計測された第二蛍光強度(I_2)を計測し、以下の方程式：

20

【数13】

$$Y = \frac{I_2 - r I_1}{1 - \rho r}$$

30

[式中、 r は第一検出器に対する第二検出器の第一ブリード・スルー係数であり、かつ
 ρ は、第二検出器に対する第一検出器の第二ブリード・スルー係数である。]
を使用して第二検出器で計測された蛍光の真の蛍光強度(Y)を測定することを含む。

【0055】

一の態様では、該方法は、真の第一蛍光強度に基いて、真の自己相関曲線を作成することをさらに含む。

【0056】

別の態様では、該方法は、真の第一及び第二蛍光強度に基いて、真の相互相関曲線を作成することをさらに含む。

40

【0057】

一の態様では、製品は、サンプルの真の蛍光強度の測定用コンピューター・プログラムをその中に記録したコンピューターが読み込み可能な媒体を含む。ここで該コンピューター・プログラムは、第二蛍光分光検出器に対する第一蛍光分光検出器の第一ブリード・スルー係数()、及び第一検出器に対する第二検出器の第二ブリード・スルー係数()を求める第一コード・セグメント、第一検出器と第二検出器それぞれからサンプルの計測された第一蛍光強度(I_1)と計測された第二蛍光強度(I_2)を計測するための第二コード・セグメント、以下の方程式：

【数 1 4】

$$X = \frac{I_1 - \rho I_2}{1 - \rho r}$$

を使用して第一検出器で計測される蛍光の真の第一蛍光強度 (X) を測定するための第三コード・セグメントを含む。 10

【0058】

別の態様では、製品は、サンプルの真の蛍光強度の測定用コンピューター・プログラムをその中に記録したコンピューターが読み取り可能な媒体を含む。ここで該コンピューター・プログラムは、第二蛍光分光検出器に対する第一蛍光分光検出器の第一ブリード・スルー係数 () 及び第一検出器に対する第二検出器の第二ブリード・スルー係数 () を求めるための第一コード・セグメント、並びに第一検出器と第二検出器それぞれから、サンプルの計測された第一蛍光強度 (I₁) と計測された第二蛍光強度 (I₂) を計測するための第二コード・セグメント、並びに以下の方程式：

【数 1 5】

20

$$Y = \frac{I_2 - r I_1}{1 - \rho r}$$

を使用して、第二検出器で計測される蛍光の真の蛍光強度 (Y) を測定するための第三コード・セグメントを含む。 30

【0059】

別の態様では、サンプルの真の蛍光強度の測定用蛍光相関分光装置は、励起源、サンプルの計測された第一蛍光 (I₁) 及び計測された第二蛍光 (I₂) を検出するための第一検出器と第二検出器、コンピューター・コードを記憶するためのメモリー装置、並びに計測された第一及び第二蛍光に基いて、真の蛍光強度を求めるコンピューター・コードを実行するためのプロセッサを含む。

【0060】

一の態様では、コンピューター・コードは、以下の方程式：

【数 1 6】

40

$$X = \frac{I_1 - \rho I_2}{1 - \rho r}$$

[式中、 ρ は、第二検出器に対する第一検出器のブリード・スルー係数であり、かつ r は、第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数である]

を使用して第一検出器で計測される蛍光の真の蛍光強度 (X) を測定するための装置を含 50

む。

【0061】

幾つかの態様では、コンピューター・コードは、以下の方程式：

【数17】

$$Y = \frac{I_2 - rI_1}{1 - pr}$$

[式中、 r は、第二検出器に対する第一検出器のブリード・スルー係数であり、 p は、第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数である]を使用して第二検出器で計測される蛍光の真の蛍光強度(Y)を測定するための装置を含む。

【0062】

一の態様では、メモリー装置は、EPROMである。

【0063】

本発明は、蛍光相関分光法を使用して、高分子間相互作用、例えばタンパク質-タンパク質、タンパク質-DNA、タンパク質-RNA、DNA-DNA、RNA-DNA、及びRNA-RNA相互作用を研究するための方法を特徴とする。該方法は、分子の化学量論の性質(例えば、分子上の結合部位の数)、分子の分子量、サンプル中の蛍光粒子数、及びそれらの組み合わせを測定するために使用されうる。該方法は、ライブラリーのどの構成要素が、既定のプロープに結合するか、並びにどのプロープが既定の標的に結合するかを同定するために使用されうる。

【0064】

本発明はまた、特定の標的、例えばタンパク質に対する新規の結合パートナーを同定する能力、並びに未知標的を含むサンプル中に標的を検出及び/又は同定する能力を特徴とする。

【0065】

本発明はまた、真の自己相関関数及び真の相互相関関数を測定する方法を特徴とする。

【0066】

本発明はまた、既知及び未知標的をアッセイする試薬を含むキットを特徴とする。

【0067】

別の特徴及び利点は、好ましい態様の以下の記載から、並びに特許請求の範囲から明らかであるだろう。

【0068】

用語解説

本発明において、これら用語は、以下で定められた意味を有する。

「プロープ」という用語は、結合部位を有するいずれかの周知の成分を意味する。

「蛍光タグ」又は「蛍光標識された」という用語は、フルオロフォアの存在を意味しており、フルオロフォア、別の成分に結合できるフルオロフォアを含む成分、及びそれらの組み合わせを含む。

「アッセイ」という用語は、標的の有無、標的の量、又はその両方を測定することを意味する。

「ライブラリー」という用語は、幾つかの化学構造の点で互いに異なる多数の関連構成要素を意味する。

「標的」という用語は、プロープの結合部位が結合する成分のことを意味する。

「未知標的」という用語は、プロープが結合するかどうか知られていない成分を意味する。

10

20

30

40

50

「粒子」という用語は、蛍光タグを意味する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0069】

本発明は、蛍光相関分光法を使用してライブラリーの構成要素(例えば、cDNAライブラリーから作られたたんぱく質)をスクリーニングする方法を提供する。該方法は、プローブが平衡条件下でライブラリーの構成要素に結合するかどうかを測定するために、ライブラリーのサブボリューム、少なくとも1のプローブ、及び少なくとも1の蛍光タグを含むサンプルをスクリーニングすることを含む。スクリーニングの結果に基いて、該方法は、プローブと結合する構成要素の同定が達成されるまで、ライブラリーのサブボリューム又はライブラリーの追加のサブボリュームに関して分離及びスクリーニング過程を行うことを場合により含む。ライブラリーを分離しそしてスクリーニングする適切な方法であって、ライブラリーの個々の構成要素を同定するための方法はいずれも使用されうる。

【0070】

該方法は、サンプルのサブボリュームから放出される蛍光のゆらぎを分析することにより、ライブラリーの構成要素(又は複数の構成要素)とプローブ(又は複数のプローブ)との間の結合の有無を測定する。計測されたゆらぎを分析することにより、サンプルの様々な性質についての情報が提供される。例えば、プローブと構成要素との間の結合の有無、構成要素上の有効な結合部位の数、拡散係数、拡散時間、サンプルのサブボリューム中に存在する蛍光標識された複合体の数、サンプル中でプローブが結合する構成要素の数、カウント毎分、平均強度、凝集状態、化学的濃度、化学反応動態、化学量論、及びそれらの組み合わせである。これらの性質は、溶液中並びに生細胞の形質膜内の構成要素について決定されうる。

【0071】

該方法はまた、少なくとも1のプローブ、少なくとも1の未知標的、及び少なくとも1の蛍光タグを含むサンプルにおいて、未知標的とプローブとの間の分子間相互作用をアッセイするため、そしてサンプルのサブボリュームから放出される蛍光のゆらぎを分析することによりプローブと未知標的との間の結合の有無を測定するため使用されうる。

【0072】

該方法はまた、例えば、病原体又は毒素を含むと考えられるサンプルを分析し、滅菌されたサンプルが感染しているか検診し、潜在的な標的についてサンプル流を連続的にモニタリングすることを含む様々な適用に適している。

【0073】

サンプルの計測されたゆらぎを分析することにより、ライブラリーの構成要素に関して上で記載されたように、未知標的、病原体、又は毒素を含むシステムについても同じ情報が提供される。

【0074】

I. 蛍光相関分光法(FCS)

サンプルの蛍光は、FCS装置を使用して計測されうる。該装置は、一般的に、少なくとも1の光源、光源により放出された光をサンプルに焦点を合わせる光焦点化装置、光を検出することができる少なくとも1の検出器、及び該検出器に結合される相関器、ここで該相関器は、上記検出器で受け取ったデータを加工し、そして自己相関データ、相互相関データ、又はそれらの組み合わせを含むデータを提供することができる。相互相関の場合では、識別される二つの最大波長について計測するように構成された少なくとも2個の検出器が必要とされる。適切なFCS装置は、例えば「Fluorescence Correlation Spectroscopy Instrument and Method of Using the Same」という題名の米国特許出願番号第60/461,394号において記載される。該文献は本明細書中に援用される。別の適切なFCS装置は、例えば"Fluorescence Correlation Spectroscopy." Bulsecu, D. A.とWolf, D. E.著(2003)、"Video Microscopy, Second Edition." Sluder, G.とWolf, D. Eds著 Academic Press, New York.、"Fluorescence Correlation Spectroscopy.II" Magde, D., E.L. Elson, 及び W.W. Webb,著、"An experimental realization." Biopolymers, 19

74.13(1) : p.29-61.; Rigler, R., "Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology." J Biotechnol, 1995.41 (2-3): p.177-86において記載され、そして本明細書中に援用される。

【 0 0 7 5 】

該システムにより計測される蛍光は、例えば自己相関モードにおける蛍光相関分光法、相互相関モードにおける蛍光相関分光法、モーメント解析、パワー・スペクトル分析と増幅分析を含むフーリエ変換解析、並びにそれらの組み合わせを含む様々な技術を使用して分析されうる。

【 0 0 7 6 】

蛍光相関分光法(FCS)は、FCS装置の焦点体積を通し拡散するか又は焦点体積を通り抜ける蛍光タグのゆらぎの強度から、関係する情報を抽出するために使用される。FCSは、焦点体積における蛍光強度の一時的な相関の減少を計測する。FCSは、自己相関モード、相互相関モード、又は両方のモードで、連続して又は同時に実行されうる。

【 0 0 7 7 】

相関技術は、少なくとも2のパラメーターにより、事象の特徴を記述する。本明細書中でときに「粒子」と呼ばれる蛍光タグの場合、相関データは、サンプル中に存在する独立した粒子の数を提供する。そして拡散の場合、相関データは、粒子の特徴、又は粒子、プローブ、標的、及びそれらの組み合わせにより形成される複合体の特徴である拡散係数(つまり拡散時間)を粒子が示すかどうかを提供する。相関の緩和時間は、拡散、又は焦点体積を通過する標的の割合などのランダム化の確率過程に関する。一方、これらのゆらぎの大きさは、確率過程に含まれる粒子数に関する。FCSが相互相関モードで行われるとき、二つの蛍光標識されたプローブが同じ標的上に結合することにより、相関の振幅(R)の増大をもたらされる。

【 0 0 7 8 】

自己相関は、焦点体積内の単一蛍光粒子の存在を計測する。より明確にすると、自己相関は、時間 = 0での蛍光強度と、それに続く時間の全てにおける蛍光強度とのあいだの相関を計測する。標的への単一プローブの結合は、標的とプローブとの複合体の拡散時間(τ_0)の変化をもたらす。これらの変化は、自己相関モードで機能する蛍光相関分光装置を使用して検出されうる。自己相関関数はまた、蛍光強度のゆらぎを分析するために使用されて、サンプル中の粒子と標的の別の性質、例えば凝集状態、化学的濃度、化学反応動態、化学量論、及びそれらの組み合わせを含む性質に関する情報を与える。該情報は、溶液中、並びに生細胞の原形質膜内の標的に関して獲得されうる。

【 0 0 7 9 】

自己相関は、強度 $I(t)$ 、平均強度、及び強度変化 $I(t + \tau)$ 、の時間までのサンプルの強度の平均を計測する。蛍光強度のゆらぎの統計分析は、自己相関曲線をもたらす。該曲線は時間に対する蛍光強度の一時的な相関の減衰を示す。該自己相関関数 $G(\tau)$ は、以下：

【 数 1 8 】

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I(t) * \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2}, \quad (1)$$

[式中、 $\langle I \rangle$ は、平均についての強度の偏差を示し、 t は真の時間であり、 τ は追加の時間であり、 δI はゆらぎの強度であり、そして $\langle \rangle$ は、全時間 t における平均を示す。]により与えられる。

【 0 0 8 0 】

時間 = 0での自己相関関数の値は、サンプル中の平均粒子数の逆数であり、そして粒

10

20

30

40

50

子の複合体化又は凝集の尺度として使用されうる。

【0081】

相互相関は、異なる励起及び照射性質を有する二つの異なる(つまり、固有な)フルオロフォアの強度のゆらぎを一時的に相関させる。同じ巨大分子上のこれらのフルオロフォアの同時発光は、短い時間()で、相互相関関数の振幅Rの変化として検出され、該振幅Rは二重に標識された蛍光粒子の濃度に直接比例する。該相互相関関数は以下：

【数19】

$$r(\tau) = \frac{\langle \delta I_i(t) * \delta I_j(t+\tau) \rangle}{SD_i * SD_j} \quad (2)$$

10

により与えられる。

【0082】

方程式2の相関関数は、統計学において通常に使用される形態である。相関関数は、完全な相互相関では1になり、そして全く相互相関しないときは0になる。機器により、自己相関関数R()について、方程式1に類似の方法で相互相関関数を定義することは単純

20

【数20】

$$R(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I_i(t) * \delta I_j(t+\tau) \rangle}{\langle I_i \rangle * \langle I_j \rangle} \quad (3)$$

30

[式中、 I_i は第一チャンネルにおける強度を表し、そして I_j は、第二チャンネルにおける強度を表す。他の表記の態様は、方程式1に使用されるものと同じである。]

この形は、進行中のデータの流れからリアルタイムで計算するために単純化されており、 $I_i = I_j$ 、そして $R() = G()$ であるとき、さらなる優位性を有する。

【0083】

方程式1~3は、ゆらぎの統計的な分析を表す。これらの方程式からの特定の分子性質を決定するには、ゆらぎの物理的原因の知識を必要とする。相関関数が分子の性質に依存することが物理的にモデル化されるなら、データをこのモデル適合するために非線形解析が使用されうる。例えば、蛍光分子の一重項状態と三重項状態との間の項間交差を伴う、複数の成分の三次元(3D)溶液拡散の場合では、自己相関関数は方程式4により与えら

40

【数 2 1】

$$G(\tau) = 1 + \left(\frac{1}{N} \right) \left(1 - T + T \exp\left(-\tau/\tau_T\right) \right) \left(\sum_i \frac{F_i}{\left(1 + \tau/\tau_{D_i}\right) \left(1 + \tau/K^2\tau_{D_i}\right)^{1/2}} \right) \quad (4)$$

10

【式中、Nは粒子の数であり、Tは三重項状態の割合であり、 τ_T は三重項状態の相関時間であり、 F_i は、粒子の割合であり、 τ_{D_i} は、粒子種iを拡散する拡散時間である。構造パラメータ K^2 は、分離して測定され、そして各適合について一定保たれた。ここで $K = r_z / r_x$ (r_z 及び r_x は、zとx方向それぞれに対する $\exp(-r^2)$ 光線半径である)。

【0084】

II. 相関

標的-プローブ-蛍光タグシステムの様々な置換は、蛍光相関分光法を使用して標的の結合性質を研究するために使用されうる。議論を簡単にするために、システムと該システムを使用する方法の様々な態様の以下の例は、未知標的に関して記載される。しかしながら、この記載がライブラリーの構成要素、既知の標的、病原体、毒素、及びそれらの組み合わせに適用できることは理解されるべきである。

20

【0085】

A. 自己相関

標的-プローブ-蛍光タグシステムの様々な置換は、蛍光相関分光法を自己相関モードで使用して標的の結合性質を研究するために使用されうる。該システムは、少なくとも1の未知標的、少なくとも1のプローブ、及び少なくとも1の蛍光タグを含む。未知標的、プローブ、又は未知標的がプローブに結合したときに形成される複合体(つまり、プローブ-標的複合体)のうちの少なくとも1は、蛍光タグを含む。プローブ-標的結合などの分子間相互作用が生じたとき(該相互作用は、相関関数の減衰時間の増加により表される)、蛍光標識された成分の拡散係数が変化し、粒子数(N)が架橋のために変化し、又はその組み合わせが生じるように、システムの要素が選ばれる。様々なシステムの形態が適している。

30

【0086】

一の態様では、システムの未知標的は、蛍光タグを含む。プローブは、システムに加えられ、そしてプローブと蛍光標識された標識との間の結合が生じるなら、蛍光標識された未知の標識の拡散係数が変化する。未知標的が結合できる複数の結合部位をプローブが有するなら、粒子数は、変化するだろう。

【0087】

別の態様では、システムのプローブは、蛍光タグを含み、そして該蛍光標識されたプローブが未知標的を含むサンプルに加えられるとき、プローブと未知標的との結合が生じるなら、蛍光標識されたプローブの拡散係数は変化する。未知標的が、プローブが結合できる複数の結合部位を有するなら、粒子数もまた、変化するだろう。

40

【0088】

別の態様では、第一プローブは、第一プローブの未知標的に対する結合が、蛍光を含む第二プローブが結合できる部位を作るように選ばれる。第一プローブが、未知標的を含むサンプルへと加えられるとき、そして第一プローブと未知標的との間の結合が生じるなら、蛍光標識された第二プローブは、新しく作られた結合部位へ結合し、そして蛍光標識された第二プローブの拡散係数が変化するだろう。もし未知標的が、第二プローブが結合できる複数の結合部位を有するなら、粒子数はまた、変化するだろう。第一プローブが、未知標的に結合しないなら、第二プローブは、未知標的に結合することができず、そして第

50

ニプローブの拡散係数は変化しないだろう。

【0089】

新しく作り出される部位は、未知標的の一次、二次、及び三次構造の内の少なくとも1の変化由来でありうる。新しい部位は、例えば、リン酸化、グリコシル化、アルキル化、アシル化、アセチル化、及びユビキチン化などの標的に対する成分の付加、及びタンパク質分解などの成分の分解を含む様々なメカニズムにより作り出されうる。例えば、蛍光標識されたプローブは、酵素反応が起こったときに作られる標的上の特定部位を認識するために選ばれうる。酵素反応により、特定のプローブが結合できる新規の結合部位を作りだす特異的な現象が生じる。酵素反応は、(例えば、細胞内で)自然に誘導されうるか又は(例えばアッセイシステムにおいて)誘導剤の添加の後に誘導されうる。プローブ結合の結果として作られうる適切な部位の例は、ホスホチロシン、ホスホセリン、及びそれらの組合せを含み、並びに、上記される様に、特定糖脂質又は糖タンパク質部位に対して加えられた成分の全てを含む。

10

【0090】

プローブ、蛍光タグ、又は未知標的が、ビーズなどの質量増大成分に結合され、そして結合現象がシステムの蛍光タグがビーズに付随することに相当するようにシステムの成分が選ばれるなら、ビーズにより与えられた複合体の質量増加は、ビーズがない状態での拡散係数の変化より強調される拡散係数の変化をもたらす。もし、結合現象により、複数の蛍光タグが、単一の成分、例えば未知標的、ビーズ、又はプローブに結合するなら、粒子数は変化するだろう。議論を簡潔にするため、質量増大成分は、本明細書中で、ビーズのことを指す。しかしながら、システムの成分の望ましい分子間相互作用を邪魔しないいづれの質量増大成分が使用されうるということが理解されるべきである。別の適切な質量増大成分は、例えば、架橋剤、ピオチン/アビジン複合体、ピオチン/ストレプトアビジン複合体、抗体分子の全体、抗体分子全体の複合体、ポリマー性アミノ酸、核酸、炭水化物、質量増大成分から構成される特定のレジン、及びそれらの組み合わせを含む。

20

【0091】

有用なビーズ成分の例は、量子ドット、不活性化細菌、ポリマー(例えばポリスチレン)の微粒子、アルギン酸塩、アクリルアミド、アガロース、及びセファロースを含む。適切なビーズは、Molecular Probes (Eugene, OR)、Quantum Dot (Hayward, California)、及びBangs Laboratories (Fishers, Indiana)から市販される。特に有用なビーズは、利用できる。例えば、Bangs Laboratories社のPROACTIVE(商標)及びQUANTUM-PLEX(商標)(例えば、ストレプトアビジン、タンパク質A、又は抗体で被膜される)タンパク質被膜微粒子及び、QDOTストレプトアビジン及びQDOT665タンパク質A抱合体である。これら全てはQuantum Dot社から市販されている。

30

【0092】

一の態様では、該システムは、ビーズ、共通のエピトープを含む多数の未知標的、及び蛍光タグに結合されるプローブを含む。この蛍光タグは、共通のエピトープに結合することができる。もしプローブが、未知標的に結合するなら、エピトープに結合する蛍光タグの拡散係数は、変化することになる。該プローブが、未知標的が結合できる複数の結合部位を有するなら、粒子数は変化するだろう。ビーズが、ビーズに結合される未知標的を結合することができる複数のプローブを有するなら、粒子数は変化することになる。未知標的をプローブに結合する前に又は結合した後に、蛍光タグが加えられうる。

40

【0093】

別の態様では、該方法は、サンプルが二つのプローブを含む競合的アッセイを含む。ここで片方のプローブは、蛍光標識され、そしてもう一方は、蛍光標識されていない。二つのプローブは、互いに結合する。サンプル中の未知標的は、蛍光標識されない。未知標的の有無は、非標識プローブ上の結合部位について、未知標的と蛍光標識されたプローブとの間の競合を検出することにより測定される。蛍光標識されるプローブは、蛍光標識された標的又は蛍光標識されたプローブであって、標的と同じ結合部位に競合的に結合することが知られるプローブが使用されうる。或いは、未知標的の有無は、蛍光標識されたプロ

50

ープ上の結合部位について、未知標的と非標識プローブとのあいだの競合を検出することにより測定される。

【0094】

B. 相互相関

様々なシステムの形態は、蛍光相関分光法を相互相関モードで使用して、未知標的の結合性質を研究するために使用されうる。該システムは、FCSを使用して、同じ複合体上の異なる二つの波長の最大値で発光する二つのフルオロフォアの同時発光を研究することを可能にするように選ばれる。該システムの二つのフルオロフォアは、システムの様々な成分上、例えば、未知標的、1以上のプローブ、ビーズ、及びそれらの組合せの上に配置されうる。

10

【0095】

一の態様では、サンプルは、各々が第一蛍光タグを含む多数の未知標的、並びに第二蛍光タグを含む少なくとも1のプローブを含む。プローブが未知標的に結合するならば、二つの蛍光タグは、同じ複合体上に存在し、このことは、二つの異なる検出器で検出されるゆらぎを相関させる。

【0096】

別の態様では、二つの固有部位と結合できる二つの蛍光標識されたプローブは、未知標的を含むサンプルへと加えられる。各プローブは、異なる蛍光タグを含み、そして未知標的上の両方の蛍光タグの一致は、二つの異なる検出器で検出されるゆらぎを相関させた。

【0097】

別の態様では、サンプルは、多数の未知標的を含み、該標的の各々は、共通のエピトープと固有結合部位を含む。エピトープに結合できる第一蛍光タグは、共通のエピトープを有する未知標的の全てが、第一蛍光タグで標識されるようにサンプルに加えられる。蛍光標識された第二プローブを加えること、及び、第二プローブを未知標的上の固有の結合部位に結合することは、同じ複合体上における二つの蛍光タグの同時発光をもたらし、このことは異なる二つの検出器で検出されたゆらぎを相関させる。

20

【0098】

別の態様では、未知標的又は第一プローブは、第一蛍光タグを含み、未知標的に対する第一プローブの結合は、第二プローブが結合することができる新しい結合部位を作り出す。蛍光標識された第二プローブの形態における第二蛍光タグを加えること、第二プローブを新しく作り出された結合部位に結合することは、同じ複合体上における二つの蛍光タグの同時発光をもたらし、このことは二つの異なる検出器で検出されるゆらぎを相関させる。結合部位が作られる有用な方法の例は、上で記述される。

30

【0099】

別の態様では、プローブ、未知標的、蛍光タグ、又はその組み合わせは、ビーズに結合される。別の態様では、プローブは、ビーズに結合され、そしてプローブ及びビーズのうち少なくとも1は、第一蛍光タグを含む。プローブ-ビーズ複合体は、サンプルへ加えられ、そして蛍光標識された未知標的は、プローブに結合するとき、同じ複合体上の二つの蛍光タグの同時発光が起こり、それは二つの異なる検出器で検出されるゆらぎを相関させる。

40

【0100】

別の態様では、未知標的は、ビーズに結合され、そして未知標的とビーズのうちの少なくとも1は、蛍光タグを含む。蛍光標識されたプローブはサンプルに加えられ、そして、プローブと未知標的との間に結合が起こるならば、同じ複合体上の二つの蛍光タグの同時発光が起こり、それは二つの異なる検出器で検出されるゆらぎを相関させる。

【0101】

別の態様では、プローブは、ビーズに結合され、そしてプローブとビーズのうちの少なくとも1は、第一蛍光タグを含む。未知標的がプローブに結合するとき、該結合は第二プローブが結合する部位を作り出す。蛍光標識された第二プローブを加え、そして未知標的上に新たに作られた部位に対して第二プローブを結合することは、同じ複合体上の二つの

50

蛍光タグの同時発光を引き起こし、これは二つの検出器で検出されるゆらぎを相関させる。

【0102】

別の態様では、未知標的は、ビーズに結合され、そして未知標的とビーズの内の少なくとも1は、第一蛍光タグを含む。プローブが未知標的に結合するとき、この結合は、第二プローブが結合する部位を作る。蛍光標識された第二プローブを加え、そして第二プローブを未知標的上の新たに作り出された部位に結合させることは、同じ複合体上で二つの蛍光タグの同時発光を引き起こし、このことは、二つの異なる検出器で検出されるゆらぎを相関させる。

【0103】

自己相関について上で記載された成分を付け加え又は取り除く酵素反応は、特定のプローブにより認識される結合部位を作るための、相互相関モードで使用されうる。

【0104】

C. 多重化

システムの複雑化及びシステムから得られる情報の詳細は、複数のビーズサイズ、複数の固有蛍光プローブ、複数の固有プローブ、及びそれらの組み合わせにより増加されうる。複数のビーズサイズ、複数の固有フルオロフォア、複数の固有プローブ、及びそれらの組み合わせを含むシステムは、自己相関、相互相関、及びそれらの組み合わせにより分析されうる。自己相関及び相互相関に関して上で記載される態様は、複数のビーズサイズ、複数の固有フルオロフォア、複数の固有プローブ、及びそれらの組み合わせを含むように 20
20

【0105】

ある態様では、複数の固有のプローブが未知標的のサンプルに加えられて、未知標的に対する1以上のプローブの結合の有無を同時に測定する。各々の固有のプローブは、固有のフルオロフォアを含む。拡散係数の変化又は1以上の蛍光標識されたプローブの粒子数は、サンプル中の未知標的の性質についての情報を提供する。固有のプローブの幾つかについての変化が起こらないなら、例えば、未知標的が、固有のプローブと結合する結合部位を含まないということが決定されうる。同様に、プローブ-未知標的の結合が起こるなら、複合体に結合する固有の蛍光の拡散係数は変化し、このことは未知標的に結合したプローブの同一性を提供し、次に未知標的の性質についての情報を提供する。この情報は、 30
30
拡散定数の変化を示す固有の蛍光標識されたプローブ各々から得られうる。この態様では、蛍光を計測するために使用されるFCS装置は、各固有のフルオロフォアから放出される固有放出波長を検出するために十分な数の検出器を含む。別の態様では、多数の固有蛍光タグを含むシステムは、相互相関分析用に構成されうる。そうしたシステム構成は、例えば同じ蛍光タグを有する未知標的及び同じ蛍光タグを有するビーズをさらに含む。

【0106】

未知標的がビーズに結合されるなら、未知標的に結合する蛍光標識されたプローブの拡散係数の変化は、より強調されうる。

【0107】

別の態様では、異なる結合性質を有する複数の固有プローブは、ビーズに結合される。 40
40
多数の未知標的であって、その各々が固有の蛍光タグを含む標的を含むサンプルに、ビーズ-プローブ複合体が加えられるとき、プローブと未知標的との間の結合は、蛍光標識された標的についての拡散係数の変化により証拠付けられるだろうし、そして標的のフルオロフォアの放出波長に関する検出器で検出されうる。別の態様では、該システムは、プローブ上又はシステムのビーズ上に同じ蛍光タグを含むことにより、相互相関分析用に構成される。

【0108】

別の態様では、サンプルは、固有の蛍光タグを含む多数の固有のプローブを含み、そして標的に結合するとき、新たな固有結合部位を作ることができる。新たに作り出された部位に結合することができる第二プローブの導入は、固有蛍光プローブの拡散係数の変化を 50
50

引き起こすだろう。システムは、場合により、少なくとも1の第二プローブと未知標的上の同じ蛍光タグを含むことにより、相互相関分析用に構成されうる。

【0109】

別の態様では、多数の異なるサイズのビーズは、該システムに加えられる。各サイズのビーズは、周知の特徴的な拡散係数を有する。固有の結合特性を有する固有プローブが、各サイズのビーズに結合され、その結果各ビーズのサイズは、サイズに結び付けられた固有の結合特性を有する。ビーズが、蛍光標識された未知標的のサンプルに加えられるとき、結合の現象が、自己相関モードにおいて、蛍光標識された未知標的の拡散係数の変化として検出される。蛍光標識された未知標的の新たな拡散係数は、個々のビーズサイズの拡散係数に一致し、このことは続いてビーズに結合される未知標的の結合性質を決定することを許容する。該態様では、蛍光タグのフルオロフォアは、同じでありうる。別の態様では、ビーズ又は固有のプローブの少なくとも1は、固有の蛍光タグを含む。1以上の固有蛍光タグが、サンプル中に存在するとき、分光装置は、自己相関モードにおける固有の蛍光タグを検出するために十分な数の検出器(つまり検出チャンネル)を含む。

10

【0110】

別の態様では、システムは、異なる大きさのビーズを含み、該ビーズは、ビーズの大きさに対応する固有の蛍光タグを含み、そしてビーズに結合される固有のプローブを含む。該システムは、場合により、未知標的が同じ蛍光タグを含む場合、場合により相互相関分析用に構成されうる。1以上の固有蛍光タグがサンプル中に存在するとき、分光装置は、自己相関及び相互相関モードにおいて固有の蛍光タグを検出するために十分な数の検出器を含む。

20

【0111】

III. プローブ

プローブは少なくとも1の結合部位を含む。複数の結合部位がプローブ上に存在する場合、複数の結合部位は、例えば関心の部位と同じ部位に対する複数の結合部位、関心の固有部位に結合できる複数の固有結合部位、及びそれらの組み合わせを含みうる。プローブの結合部位とプローブの性質は、プローブの特異性及び結合現象がプローブに起こったときに得られる情報の性質を決定しうる。

【0112】

有用なプローブは、例えば、結合が所望されるプローブ、関心の部位へ結合することができるプローブ、及びそれらの組み合わせを含む。

30

【0113】

いずれの適切なプローブが使用されうる。適切なプローブは、例えば、高分子(例えば、タンパク質、ペプチド、ポリ核酸、及び多糖)、分子(例えば、アミノ酸、核酸、及び糖類)、及びそれらの組み合わせを含む。有用な高分子は、例えば抗体、受容体タンパク質、レクチン、ホルモン、タンパク質A、タンパク質G、アビジン、酵素、及びそれらの組み合わせを含む。

【0114】

適切なプローブは、例えば、Sigma Biochemicals (St. Louis, Missouri)、Molecular Probes (Eugene, Oregon)、及びVector Laboratories (Burlingame, California)などの様々な供給元から市販される。

40

【0115】

プローブは、場合により蛍光タグを含みうる。有用な蛍光タグ及びその製造方法は、以下に記載され、本明細書中に援用される。

【0116】

プローブは、場合により、ビーズ又はプローブの質量を増大する他の成分を含みうる。該プローブの有用な製造方法は、以下に記載され、本明細書中に援用される。高分子及び分子の結合に適したビーズは、Sigma Biochemicals (St. Louis, Missouri)、Molecular Probes (Eugene, Oregon)、及びBangs Laboratories (Fishers, Indiana)から市販される。有用な質量増大成分の例は、上で記載されており、そして本明細書中に援用される。

50

【0117】

プローブの特異性を測定する有用な方法、及びプローブが、関心の結合部位に適切な特異性を示すかどうかは、例えば自己相関及び相互相関を含む FCS を使用することを含む。調製されたプローブは、関心の標的、つまり周知の結合部位を含む標的を含むサンプルに加えらる。該サンプルはまた、蛍光タグを含み、そしてシステムの成分は、プローブと標的との間の結合が、蛍光タグの拡散係数における検出可能な変化、粒子数の変化、又はそれらの組み合わせに一致するように選ばれる。周知のプローブ及びその周知の標的の行動を計測しそして分析することは、プローブの特異性及び選択性、つまりプローブが標的に結合するかどうかを検証することができる。

【0118】

A. 病原体検出用プローブ

様々なプローブは、病原体を検出する際に使用されうる。病原体の抗原は、例えば、特定の抗体プローブを使用して検出されることがあり、そして病原体の核酸配列は、特定のオリゴヌクレオチド・プローブを使用して検出されうる。プローブは、好ましくは糖タンパク質、タンパク質、核酸、又はそれらの組み合わせを標的するように選ばれ、これらは、病原体の特定部分、病原体の孢子、トキシン、病原体の代謝生成物、病原体により誘導される生物学応答産物を含みうる。特異的なプローブ・セットは、ゲノム・データー、発現されたプロテオームの特徴化、並びに感染結果の臨床データーに基いて調製されうる。

【0119】

オリゴヌクレオチド・プローブは、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR)、並びに関連する病原体の種の DNA の可変及び保存領域のゲノム・データーの分析を使用して得られる情報に基いて設計されうる。抗体プローブは、ゲノム及びタンパク質データーベース分析により測定された特定病原体により発現される固有の抗原に対して設計されうる。病原体の病原性は、1 以上のタンパク質又は糖タンパク質の固有の発現が原因でありうる。1 以上のタンパク質又は糖タンパク質のそうした固有の発現は、特定のプローブ標的として役に立ちうる。

【0120】

ひとたび選択的プローブが同定され、そして結合条件が最適化されると、プローブの組み合わせは、推定のプローブ・セットを与えるために選択されうる。適切なプローブ・セットは、例えば 2 個の DNA 特異的プローブ、2 個の抗原特異的プローブ、及び 1 個の DNA 特異的プローブと 1 個の抗原特異的プローブを含む。

【0121】

病原体に適用する場合、プローブ・セットは、各病原体に対する少なくとも 2 のプローブを含むように作成されうる。プローブは、病原体、病原体により分泌される毒素、及びその組み合わせを検出するように設計されうる。例えば、バチルス・アンスラシス (*Bacillus anthracis*) では、例えば、適切なプローブは、炭疽菌防御抗体 (PA)、炭疽菌致死因子 (LF)、pXO1 プラスミド、pXO2 プラスミド、及びそれらの組み合わせに結合できるプローブを含む。PA 又は LF に対するプローブは、バチルス・アンスラシスの生成物を検出することができ、そして pXO1 及び pXO2 プローブは、サンプル中の生存細菌の存在を検出できる。市販されるプローブは、バチルス・アンスラシス、PA、及び LF に対する抗体を含むこれらのプローブ・セットの要素として使用されうる。

【0122】

大痘瘡ウイルス類似物、ワクシニアは、ウイルス性病原体の検出及び同定用プローブ・セットを同定しそして試験するために使用されうる。プローブは、標的 DNA 配列に特異的に結合し、そしてウイルス・コートタンパク質を標的するために設計されうる。ポリメラーゼ・チェーン・リアクションは、痘瘡ウイルスとワクシニアウイルスとの間を区別するために使用され、特異的オリゴヌクレオチド・プローブは、固有ウイルス DNA 標的に特異的に結合するために使用されうるということを指し示す。好ましいワクシニアプライマー、5' - A T G A C A C G A T T A C C A A T A - 3' は、FCS を使用してワクシニア・ウイルスが検出されうるかどうかを決定するためのプローブとして使用

10

20

30

40

50

されるだろう。ワクシニアDNA配列に結合する第二プライマー(5'-CTA GAC TTT GTT CTC TG-3')は、FCS相互相関分析用第二DNAプローブとして使用されるだろう。さらに、ゲノム分析は、別のDNA配列が、特定の標的として役に立ちうるかどうかを決定するために行われるだろう。市販の抗体は、ワクシニア・ウイルスに利用でき、そしてウイルス・コート・タンパク質に対するFCSプローブとしての適合性を試験されるだろう。

【0123】

IV. 標的

標的は、関心のある標的のいずれも含みうる。標的は、未知でありうるし又は既知でありうる。未知標的は、プローブが結合するかどうかを知られていない標的を含む。既知の標的は、関心のプローブの結合部位が結合する標的を含む。適切な標的の例は、高分子(例えば、タンパク質、ペプチド、ポリ核酸、及び多糖)、分子(例えば、アミノ酸、核酸、及び糖類)、並びにそれらの組み合わせを含む。有用な高分子は、例えば、抗体、受容体タンパク質、レクチン、ホルモン、タンパク質A、タンパク質G、アビジン、酵素、及びそれらの組み合わせを含む。

10

【0124】

標的は、ライブラリー、ライブラリーの一部、ライブラリーの構成要素、又はそれらの組み合わせでありうる。適切なライブラリーは、例えばアプタマー・ライブラリー、ファージ・ディスプレイ・ライブラリー、抗体ライブラリー、ペプチド・ライブラリー、及び翻訳されたcDNAライブラリーを含む。ライブラリーの構成要素の例は、タンパク質、ペプチド、ポリ核酸、有機ポリマー、多糖、アミノ酸、核酸、及び糖類を含む。

20

【0125】

標的は場合により蛍光タグを含みうる。有用な蛍光タグ、並びに標的などの要素に蛍光タグを結合する方法は、以下に記載され、そして本明細書中に援用される。発現されたcDNAライブラリーの構成要素は、翻訳の間又は翻訳後に蛍光タグで標識されうる。適切な翻訳後標識方法は、例えば、リジンのアミノ基又はシステインのチオール基を反応性蛍光成分で修飾することを含む。アミン反応性基の例は、例えば、イソチオシアネート、n-スクシジミジル(succidimidyl)・エステル、及びスルホニル・クロリドを含む。チオール反応性基の例は、アセトアミド及びマレアミドを含む。別の翻訳後標識方法は、例えば、G.T.Hermanson, Bioconjugate Techniques, 1996 (Academic Press, Inc., San Diego, California, pp.785)に記載されており、該文献は本明細書中に援用される。翻訳後標識は、タンパク質の内在性部位、或いは蛍光標識を特別に標識することを特に目的として付け加えられる外因性の部位を標的することができる。

30

【0126】

別の方法では、発現されたcDNAライブラリーの構成要素は、in vitro翻訳(IVT)方法の間に標識されうる。つまり、cDNAをタンパク質へと翻訳する間において、蛍光標識を取り込む。あるそうした方法では、蛍光アミノ酸(例えば、蛍光標識されたリジン)は、翻訳の間作られるタンパク質中へ取り込まれる。リジンを標識するためのフルオロフォアの有用な例は、ボディピーである。有用なボディピー標識リジンは、ProMega (Madison, Wisconsin)から市販される。

40

【0127】

別の方法では、発現されたcDNAライブラリーの例は、蛍光タンパク質のcDNA配列をDNAクローン中に取り込むことによって、in vitro翻訳ステップで標識されうる。蛍光cDNA配列が、この後で翻訳されるとき、発現された要素は、蛍光標識されるだろう。

【0128】

別の方法では、ライブラリーの構成要素が、共通のエピトープを含むように改変されうる。エピトープは、プローブがエピトープに結合できるように選択される。構成要素が共通のエピトープ・タグを含むようにライブラリーを改変する様々な方法は、周知である。

【0129】

50

別の適切な標的は、例えば病原体(例えば細菌、ウイルス、リケッチア)などの生物体、病原体成分、毒素、及び生物体に付随する高分子を含む。病原体成分の例は、病天体、病原体断片、病原体核酸、病原体タンパク質、病原体炭水化物、病原体孢子、病原体毒素、病原体の代謝生成物、及びそれらの組み合わせを含む。

【0130】

有用な標的生物は、例えばバチルス・セレウス(*Bacillus cereus*)、バチルス・サチリス(*Bacillus subtilis*)、様々な種の非病原性イー・コリ(*E. coli*)、及びワクシニア・ウイルスを含む。

【0131】

有用な標的病原体は、例えば、バチルス・アンスラシス、及びバリオーラ・メジャー(*Variolamajor*)を含む。 10

【0132】

有用な標的毒素は、植物、昆虫、動物、病原性及び非病原性起源由来の毒素を含む。植物毒素の例は、リシナス・コミュニス(*Ricinus communis*)由来のリシン毒素を含む。

【0133】

V. 蛍光タグ

蛍光タグは、フルオロフォアを含み、そしてフルオロフォア、別の成分に結合できるフルオロフォアを含む成分(例えば、蛍光標識されたプローブ、及び蛍光標識されたビーズ)、及びそれらの組み合わせでありうる。

【0134】

有用なフルオロフォアの例は、NBD(つまり、N-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾロ-4-イル))、ローダミン、フルオレセン、エオシン、エリスロシン、ダンシル、及びアクリジンオレンジを含む。適切な市販の反応性フルオロフォアは、フルオレseinイソチオシアネート、テトラメチルローダミン・イソチオシアネート、Molecular Probe(Eugene, Oregon)からの商標名のボディピー系、例えば、4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸のボディピーFLスクシンイミジル・エステル、ボディピー-R6G・4,4-ジフルオロ-5-フェニル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸、スクシンイミジル・エステル、ボディピー-TR-X、ボディピー-630/650-X、ボディピー-650/665-X、ボディピー-FL・Br2・SE、ボディピー-500/510、ボディピー-FLCs、ボディピー-FL・SE、ボディピー-FL・SSE、ボディピー-FL・AEBSF、ボディピー-FL-X、ボディピー-FL-X・SE、ボディピー-FL・CASE、ボディピー-TMR-X・SE、ボディピー-530/550、ボディピー-530/550SE、ボディピー-530/550EDA、ボディピー-R6G・SE、ボディピー-R6G-X・SE、ボディピー-581/591SE、ボディピー-576/589SE、ボディピー-650/665-X・SE、ボディピー-564/570、ボディピー-564/570SE、ボディピー-493/503SE、ボディピー-559/568SE、ボディピー-TR-X・SE、及びボディピー-630/650-X・SE; 商標名Cy系、例えばCy3.5単官能NHS-エステル、Cy5.5単官能性NHS-エステル、Cy3単官能性NHS-エステル、Cy5単官能性NHS-エステル、及びCy7単官能性NHS-エス 40
テルを含み、これら全ては、Amersham Bioscience(Buckinghamshire, England)から市販される; 並びに商標名アレクサ・フルオール系、例えばアレクサ・フルオール488カルボン酸・スクシンイミジル・エステル混合アイソマー、アレクサ・フルオール555カルボン酸・スクシンイミジル・エステル、アレクサ・フルオール647カルボン酸スクシンイミジル・エステル、アレクサ・フルオール350、405、430、500、514、532、546、555、568、594、610、633、647、660、680、700、及び750を含む。これら全てはMolecular Probes(Eugene, Oregon)から市販される。

【0135】

タンパク質及び別の生体分子をフルオロフォアで標識する有用なプロトコルは、例えば 50

R. Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Products(第9版、2002年)、及びG.T. Hermanson, Bioconjugate Techniques(1996)で記載され、そして本明細書中に援用される。

【0136】

V I . 架橋剤

システムは、場合により架橋剤を含みうる。該架橋剤は、少なくとも2の結合部位を含み、そして例えばプローブ、標的、及びその組み合わせを含む少なくとも2の成分を結合でき、そして架橋された構造を形成する。架橋剤が結合する成分は、場合により架橋剤が結合できる複数の結合部位を含む。架橋により、複合体の質量が増大され、粒子数が減少され、そしてそれらの組み合わせとしての徴候が現れうる。

10

【0137】

架橋剤は、少なくとも2の要素を凝集するように機能しうる。2の要素のうちの少なくとも1が蛍光標識を含む場合、蛍光標識された成分は質量の増加を示し、それにより蛍光標識された成分の拡散係数の変化が検出されうる。少なくとも2の蛍光標識された成分の凝集により、システムにおいて独立して動く蛍光標識された成分の数の減少が検出されうる。

【0138】

少なくとも1のシステムの成分(例えば、プローブ、標的、ビーズ、及びそれらの組み合わせ)は、架橋剤として機能しうる。或いは、架橋剤は、システムの更なる成分でありうる。適切な架橋剤は、例えばプローブ、標的、質量増大成分、システムの成分に対する

20

【0139】

V I I . 化学量論

標的の高分子化学量論、つまり、二つの高分子が相互作用する定量的比率は、自己相関データから測定されうる。方程式4から始めて、システム間横断及び粒子拡散が、ゆらぎの独立した源であることが仮定されるなら、高分子の化学量論が計算されうる。第一のゆらぎがマイクロ秒(μs)の時間範囲で起こり、そして一重項と三重項との間でフルオロフォアの項間交差からもたらされる。第二のゆらぎは、ミリ秒(ms)の時間範囲内で起こり、そして焦点体積の中への及び外への粒子の拡散からもたらされる。一重項と三重項状態との間のゆらぎは、それゆえ、焦点体積内のフルオロフォアの数によって支配されており、一方、拡散性のゆらぎは、粒子の数によって支配される。このことは方程式(4)の単純化された形態を導く。もしこの仮定がされるなら、方程式4は、再構成されて、方程式5になる。

30

【数22】

$$G(\tau) = 1 + \frac{T}{N_M} \exp(-\tau/\tau_T) + \frac{1-T}{N_P} \left(\sum_i \frac{F_i}{\left(1 + \tau/\tau_{D_i}\right) \left(1 + \tau/K^2\tau_{D_i}\right)^{1/2}} \right) \quad (5)$$

40

該方程式は、 $N_M = N'_M T$ 及び $N_P = N'_P (1 - T)$ と定義することにより、さらに方程式6へと単純化されうる。

【数 2 3】

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N'_M} \exp(-\tau/\tau_r) + \frac{1}{N'_p} \left(\sum_i \frac{F_i}{\left(1 + \tau/\tau_{D_i}\right) \left(1 + \tau/K^2\tau_{D_i}\right)^{1/2}} \right) \quad (6)$$

10

【0 1 4 0】

標的の分子の化学量論を測定する方法は、自己相関データと較正因子を使用する。該較正因子は、蛍光標識されたプローブあたりのフルオロフォアの数である。較正因子は、以下の方程式に従って計算される。

【数 2 4】

$$r = \frac{N'_M}{N'_p} \quad (7)$$

20

[式中、 N'_M は、フルオロフォア分子の数であり、かつ N'_p は拡散粒子の全数であり、そして自己相関データから得られる早い拡散粒子(F_1)、(つまり、複合体化されていない(つまり非結合性の)蛍光標識されたプローブ)とゆっくりと拡散する複合体(F_2)(つまり、プローブの標的に結合される蛍光標識されたプローブの複合体)を含む。化学量論(S)は、概念的に、以下：

【数 2 5】

30

$$S = \frac{\text{ゆっくりと拡散する複合体を形成するFabの数}}{\text{複合体の数}}$$

として定義され、ここで S は、以下の式：

40

【数 2 6】

$$S = \frac{\text{全Fab}-\text{早く拡散するFab}}{\text{複合体の数}}$$

により与えられ、その結果、化学量論についての一般的な関係は、以下の式：

50

【数 27】

$$S = \frac{N'_M / r - F_1 N'_P}{F_2 N'_P} \quad (8)$$

[式中、 $F_1 N'_P$ は、早く拡散する粒子の全数、つまり、複合体化していない蛍光標識されたプローブを定義し、そして $F_2 N'_P$ は、ゆっくり拡散する形成された複合体の全数を定義する。]

として表される。

この分析は、標識されたプローブで、一定濃度で行われ、そして標的濃度の範囲に晒される。Sは、方程式6に適合し、そして方程式7で決定される較正因子により、求められるパラメータ値を使用して、各標的濃度について方程式8を用いて求められる。

【0141】

V I I I . 独立して動く蛍光粒子の数

与えられた検出器は、既定の波長セットで蛍光を発するサンプル中の蛍光タグの種類を検出する。蛍光タグが分子間相互作用(例えばプローブ間、標的、架橋剤、及びそれらの組み合わせ)の結果として複合体を形成する場合、独立して動く蛍光タグの数は減少する。本明細書中で、粒子数(N_P)と呼ばれるそうした独立して動く蛍光タグのサンプル中の数は、自己相関データから作られる自己相関曲線から決定されうる。 $G(0)$ 、は時間=0での自己相関曲線の値 $G(t)$ であり、システムにおける粒子数(N_P)に反比例する。実験的に得られる実際の0時間点は、散発的ノイズによって左右されるので、 $G(0)$ 値は、通常は自己相関データに適合された曲線から計算される。自己相関関数の0時間点は、粒子数が減少するにつれて増加する。焦点体積における関心の粒子の数を測定するために、関心の粒子は、蛍光タグを含まなければならない。蛍光標識された粒子が凝集を形成するならば、遊離状態の蛍光標識された粒子の数は減少して、自己相関関数の0時間点での変動をもたらす、そしてシステムにおける粒子数の対応する減少をもたらす。

【0142】

I X . 相互相関補正アルゴリズム

検出器の間におけるブリード・スルー発光は、FCSシステムにおいて起こる。ブリード・スルー発光は、検出器の構成が、単一の検出器チャンネルにおいて両方のフルオロフォアの検出してしまい、そして2個のシグナルの人為的な相互相関を導くときに生じる。結果として、計測される自己相関及び相互相関関数は、真の自己相関関数及び相互相関関数(つまり、ブリード・スルーの存在しない場合において得られる相関関数)とは異なってしまう。高率なデータ取得のため、データ取得の間においてブリード・スルーを補正することは難しい。本発明の発明者は、3個の計測された補正関数(つまり、2個の自己相関関数及び1個の相互相関関数)が、3個の真の(つまりブリード・スルーを補正された)相関関数の線形的な組み合わせであるということを見出した。ブリード・スルーの補正は、これらの3個の連立線形方程式のセットを解く問題になる。

【0143】

このブリード・スルーを補正するため、かつ真の自己相関関数及び相互相関関数を求めるために、サンプルについて得られた自己相関及び相互相関データは、好ましくはさらに、二つの検出器において検出されるクロスオーバー発光を補正するアルゴリズムを使用してさらに分析される。第一検出器の自己相関関数では、データは好ましくは以下のアルゴリズムに供される。

【数 2 8】

$$G_{1T} = \frac{-2\rho \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R + \rho^2 \langle I_2 \rangle^2 G_2 + \langle I_1 \rangle^2 G_1}{-2\rho \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle + \rho^2 \langle I_2 \rangle^2 + \langle I_1 \rangle^2} \quad (9)$$

【式中、 G_{1T} は、第一検出器で計測された蛍光の真の自己相関関数であり、 r は、第二検出器に対する第一検出器のブリード・スルー係数であり、 $\langle I_1 \rangle$ は、第一検出器における時間平均強度であり、 $\langle I_2 \rangle$ は、第二検出器における時間平均強度であり、 R は、第一検出器と第二検出器に対する計測された相互相関関数であり、そして G_1 及び G_2 は、第一検出器及び第二検出器それぞれの計測された自己相関関数である。

10

【0 1 4 4】

第二検出器の自己相関関数では、データは好ましくは、以下のアルゴリズムに供される。

【数 2 9】

$$G_{2T} = \frac{-2r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R + \langle I_2 \rangle^2 G_2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2 G_1}{-2r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle + \langle I_2 \rangle^2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2} \quad (10)$$

20

【式中、 G_{2T} は、第二検出器で計測される蛍光の真の自己相関関数であり、 r は第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数であり、そして R 、 $\langle I_1 \rangle$ 、 $\langle I_2 \rangle$ 、 G_1 、及び G_2 は、上で記載されるとおりである。】

【0 1 4 5】

相互相関関数の場合では、データは好ましくは、以下のアルゴリズムに供される。

30

【数 3 0】

$$R_T = \frac{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle R(1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 G_2 - r \langle I_1 \rangle^2 G_1}{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle (1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 - r \langle I_1 \rangle^2} \quad (11)$$

40

【式中、 R_T は、第一及び第二検出器で計測された蛍光の真の相互相関関数であり、 R は、第一検出器及び第二検出器の計測された相互相関関数であり、そして r 、 ρ 、 $\langle I_1 \rangle$ 、 $\langle I_2 \rangle$ 、 G_1 、及び G_2 は、上で記載されるとおりである。

【0 1 4 6】

ブリード・スルー係数、 r は、第一フルオロフォアを使用し、そして第二検出器においてその平均強度を計測し、第一検出器において測定されるその平均強度で割ることにより実験的に測定される。

【0 1 4 7】

第一検出器に対する第二検出器のブリード・スルー係数 r は、第二フルオロフォアを使用し、そして第一検出器におけるその平均強度を計測し、それを第二検出器において計測

50

される平均強度により割ることにより実験的に測定される。

【0148】

方程式(9)~(11)は、第一検出器チャンネルを第二検出器チャンネルに相関させること(R_{12})と、第二検出器チャンネルを第一検出器チャンネルと相関させること(R_{21})との間に違いがないということを仮定する。この仮定は、理論的にも実践的にも真実であるが、実際には、 R_{12} と R_{21} を分離して決定することもできる。この場合方程式(9)~(11)は、以下の対応する方程式(9a)、(10a)、(11a)、及び(11b)で置換されうる。

【数31】

$$G_{1T} = \frac{-\rho \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle (R_{12} + R_{21}) + \rho^2 \langle I_2 \rangle^2 G_2 + \langle I_1 \rangle^2 G_1}{-2\rho \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle + \rho^2 \langle I_2 \rangle^2 + \langle I_1 \rangle^2} \quad (9a)$$

$$G_{2T} = \frac{-r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle (R_{12} + R_{21}) + \langle I_2 \rangle^2 G_2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2 G_1}{-2r \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle + \langle I_2 \rangle^2 + r^2 \langle I_1 \rangle^2} \quad (10a)$$

$$R_{12T} = \frac{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle (R_{12} + \rho r R_{21}) - \rho \langle I_2 \rangle^2 G_2 - r \langle I_1 \rangle^2 G_1}{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle (1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 - r \langle I_1 \rangle^2} \quad (11a)$$

$$R_{21T} = \frac{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle (R_{21} + \rho r R_{12}) - \rho \langle I_2 \rangle^2 G_2 - r \langle I_1 \rangle^2 G_1}{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle (1 + \rho r) - \rho \langle I_2 \rangle^2 - r \langle I_1 \rangle^2} \quad (11b).$$

10

20

【0149】

別の態様では、ブリード・スルー発光は、複数の検出器チャンネル(つまり、第一検出器チャンネル及び第二検出器チャンネル)で計測されるシグナルに基いて、補正されうる。第一検出器チャンネル及び第二検出器チャンネルに対する真のシグナル X 及び Y は、それぞれ、第一検出器チャンネル及び第二検出器チャンネルでシグナル I_1 及び I_2 を計測し、ブリード・スルー係数、つまり、第二検出器チャンネルからのシグナルに起因する第一検出器チャンネルのシグナルの割合を測定し、ブリード・スルー係数、つまり、第一検出器チャンネルにおけるシグナルに起因する第二検出器チャンネルにおけるシグナルの割合を測定し、第一チャンネルにおけるシグナルを以下の方程式：

30

【数32】

$$X = \frac{I_1 - \rho I_2}{1 - \rho r}$$

40

を使用して補正し、そして場合により、さらに、又は代わりに、第二チャンネルのシグナルを、以下の方程式：

【数 3 3】

$$Y = \frac{I_2 - rI_1}{1 - \rho r}$$

を使用して補正することにより得られる。

10

【0 1 5 0】

X. システムの別の特徴

A. 流れ

サンプルは、例えばウェル、キュベット、フロー・チャンバー、及びキャピラリー・チューブなどを含む様々な形態で、FCS装置の焦点体積に提供されうる。フロー・チャンバーの場合、サンプルは、焦点体積を流れる。この流れは、例えば圧力(例えば、粒子速度が粒子サイズに無関係である静水圧)、及び電圧の適用(例えば、粒子速度が粒子サイズに依存する電気泳動による流れ)などの様々な力の結果でありうる。

【0 1 5 1】

B. ハイスループット及び自動化システム

20

別の態様では、ハイスループット・スクリーニングの方法論、例えば、サブボリュームの選択によるライブラリーのスクリーニングは、プローブ・構成要素結合ペア、つまり、プローブとライブラリーの構成要素とのあいだの結合現象を同定するために使用されうる。例えば、ライブラリー・構成要素のストックは、サブボリュームに分割され、その結果、各サブボリュームは、ライブラリーの構成要素の一部を含むことになる。各サブボリューム溶液は、次にアレイ(例えば、ライブラリーの構成要素(つまり、潜在的標的)を含む複数のサンプル・チャンバー)を使用して、スクリーニングされる。結合現象を検出する際に、サブボリュームは、再び細分化され、そしてプローブに結合する構成要素が同定されるまで繰り返してスクリーニングされることもある。

【0 1 5 2】

30

また、システムは自動化されうる。適切な自動化システムは、液相化学用に開発されたロボットシステムを含む。これらの自動化システムは、自動化ワークステーション、例えば、Takeda Chemical Industries, LTD(Osaka, Japan)製の自動化合成装置及びロボットアームを使用する多くのロボットシステム(Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.)を含む。適切な自動化装置は、例えば複数のサンプルをFCS装置のサンプル検出体積に(例えば連続的に又は同時に)提供することを含む。適切な自動化装置はまた、例えばプローブ、緩衝液、標的、蛍光タグ、及びそれらの組み合わせなどの自動化された液体操作を含む。

【0 1 5 3】

40

C. サンプル

サンプルは、例えば拭き取り検体(例えば頬拭き取り検体、鼻拭き取り検体、目拭き取り検体)、生物学的サンプル、例えば体液(例えば血液、尿、唾液、及び耳垢)、環境サンプル、(例えば水、空気、及び土壌)、並びにそれらの組み合わせを含む様々な源から得ることができる。

【0 1 5 4】

XI. キット

例えば少なくとも1のプローブ及び少なくとも1の蛍光タグを含むシステムの試薬は、未知又は既知の標的の存在をアッセイするためのキットに含まれる。プローブは、高分子上の既定の標的又は部位に結合可能でありうる。蛍光タグは、プローブに結合されうる。キットは、場合により単一のビーズ又は複数のビーズを含みうる。少なくとも1のプロー

50

ブは、ビーズに結合されうる。ビーズは、場合により蛍光タグを含みうる。該キットは、固有のフルオロフォアを有する複数の蛍光タグを含みうる。

【0155】

一つの有用なキットは、蛍光標識されたヒト血清アルブミン・ガラクトース・プローブを含む。別の有用なキットは、ヒト血清アルブミン・ガラクトース・プローブ及び蛍光標識されたリシン・プローブを含む。そうしたキットは、例えばリシンなどの毒素のアッセイに有用である。

【0156】

本発明は、以下の実施例によりさらに記載される。

【実施例】

【0157】

試験手順

実施例中に使用される試験手順は、以下を含む。

FCS装置

サンプルは、異なる波長で蛍光発光を識別するために構成された蛍光相関分光装置、並びに自己相関、相互相関、フーリエ変換、及びモーメント解析をできるデータ処理プログラムを使用して分析された。

【0158】

実施例 1

未知の株の細菌を親油性蛍光色素、DiIC16で非特異的に標識した。イー・コリ(E. coli) K-12株特異的抗体をアレクサ-546(ALEXA-546)で標識した。標識された抗体は、未知の株の細菌に対して特異的ではなく、それゆえこの細菌に結合しない。蛍光標識された細菌及び蛍光標識された抗イー・コリ抗体を、アレクサ-546及びDiIC16をそれぞれ検出する波長に調節された2個の固有の検出チャンネル(つまり第一チャンネル及び第二チャンネル)で計測した。第一検出チャンネル及び第二検出チャンネルにおいて同時発生するピークはなく、そして相互相関は起こらなかった。図1Aは、第一検出チャンネル及び第二検出チャンネルにおける同時発生ピークが存在しないことを示す。第二検出チャンネルのピークは、焦点検出体積を通過する2個の細菌を示す。第一検出チャンネルにおける同時発生ピークがないことは、イー・コリに対するアレクサ546標識抗体は、蛍光標識された細菌株には結合していないことを示す。図1Bは、検出チャンネル1及び2における同時発生ピークがないことのため、明確な相互相関曲線が存在しないことを示す。

【0159】

実施例 2

アレクサ-594で標識されたイー・コリK-12株(BIOPARTICLES、製品番号：D23370の商標名で市販される)を、Molecular Probes(Eugene, Oregon)から購入した。アレクサ-546に結合し、特異的にイー・コリK-12株上の結合部位を認識するイー・コリ特異的抗体を第二プローブとして使用した。抗体をイー・コリと5分間室温でインキュベーションし、平衡結合に達した。アレクサ-594及びアレクサ546を固有の第一検出チャンネル及び第二検出チャンネルで計測した。該チャンネルはそれぞれアレクサ594とアレクサ546を検出するように波長を調節し、そしてシグナル・ピークが両方の検出チャンネル間で同時発生するとき、相互相関曲線を得た。図2Aは、第一検出チャンネル及び第二検出チャンネルで一回の同時発生ピークが存在することを示し、このことは焦点検出体積を通過した一つの細菌の動きを示す。図2Bは、図2Aで示された同時発生ピークから得られた相互相関関数を示す。

【0160】

実施例 3

アレクサ594で標識されたイー・コリK-12株(商標名BIOPARTICLES、製品番号；D23370で市販される)をMolecular Probes(Eugene, Oregon)から購入した。アレクサ-546に結合し、そして特異的にイー・コリK-12株の結合部位を認識するイー・

10

20

30

40

50

コリ特異的抗体を第二プローブとして使用した。抗体をイー・コリと5分間室温でインキュベーションし、平衡結合に達させた。アレクサ594及びアレクサ546を、それぞれアレクサ594及びアレクサ546を検出する波長に調節された2つの固有検出チャンネル1及び2で計測した。シグナル・ピークは、両方の検出チャンネルの間で同時発生するとき、相互相関曲線が得られた。図3Aは、検出チャンネル1及び2での二つの同時発生ピークを示し、このことは、二つの細菌が焦点検出体積を通過したことを示す。図3Bは図3Aで示される同時発生ピークから得られる相互相関曲線を示す。

【0161】

実施例4

イー・コリに対する抗体をアレクサ-546で標識し、そしてイー・コリを含むサンプル・チャンパーへと加え、そして平衡に達するまでインキュベーションした。自己相関データをサンプルから収集した。図4Aは、2つのピークを示し、このことは個々の細菌が検出体積を通過することを示す。図4Bは、図4Aで収集されたデータの自己相関曲線を示す。

10

【0162】

実施例5

全ての抗体の抗原結合性フラグメント(Fab断片)をローダミンで標識した(Rh-Fab)。Rh-Fabは、特異的に抗体(IgG)に結合するが、特異的結合部位の数は知られていない。Rh-FabのIgG上の結合部位の数を測定するために、10nMのRh-Fabを増大した濃度のIgGで滴定し、そして平衡化させた。図5Aは、Rh-Fabのみの自己相関曲線(20)、及び4 μ MのIgGの存在下におけるRh-Fabの自己相関関数を示す。データを方程式6に適合し、そして最適回帰線及び残差(上パネル)を示した。図5Bは、各IgG濃度におけるゆっくりした拡散粒子(F_2N_p)の割合を測定するためにこの分析から得られたパラメーターの見積値の使用することを示した。ゆっくりと拡散する粒子数は、IgGが増大するにつれて増大し、そして全ての結合部位が占められるとき飽和される。図5Cは、Rh-FabをIgGへと結合する化学量論を測定するために、方程式7及び8における自己相関曲線(図5A)の分析からのパラメーターの見積値を使用することを示した。IgGに結合するRh-Fabの数は、方程式9を使用して測定され、そして試験されるIgG濃度についてプロットされた。該分析は、低いIgG濃度では各IgGに結合する約6のRh-Fab存在し、そして高いIgG濃度では、各IgGに結合する約2のRh-Fabが存在することを示した。

20

30

【0163】

実施例6

神経成長因子(NGF)に結合する低親和性神経成長因子受容体、gp75は、A875細胞中に内在的に発現する。A875細胞を細胞培養チャンパー中に一晚静置し、そしてチャンパーの表面に付着させた。細胞を未処理のままにするか、又は180nMのNGFに5分間晒して、結合平衡に達させた。図6Aは、未処理のA875細胞からの自己相関曲線(30)、及びNGF処理A875細胞からの自己相関曲線(34)を示した。データを方程式6に適合し、そして最適回帰線及び残差(上パネル)が示された。図6Bは、単量体36、二量体38、三量体40、及び四量体42の理論曲線を、部分占有率の関数として示した。該分析から得られるパラメーターの見積値を方程式8に使用し、未処理とNGF処理とに関する化学量論の計算の結果が異ならないということを決した。このことはgp75がA875細胞で単量体の受容体であるということを示す。

40

【0164】

実施例7

リシンは、アレクサ-546で蛍光標識されて、アッセイの開発を容易にする。図7は、アレクサ546結合リシンのみ(50)、抗リシン抗体の存在下におけるアレクサ546結合リシン(54)、及び非標識リシンと前もって室温で5分間インキュベーションして平衡に達させた抗-リシン抗体の存在下におけるアレクサ546結合リシン(58)を示す。アレクサ546結合リシンが、抗リシン抗体に結合するとき、遊離粒子数(N)の減少

50

をもたらす、そしてゆっくり拡散する(大きい)粒子の存在を示す拡散時間の右方シフトをもたらす。抗-リシン抗体が、非標識リシンで前もってインキュベーションされたとき、リシン結合部位は妨げられ、アレクサ-546結合リシンが、リシン抗体に結合することを妨げることになる。

【0165】

実施例 8

図 8 は、アレクサ-546 で標識されたリシン(A1546-リシン)であって、ヒト血清アルブミンに結合されたガラクトース(HSA-gal)と前もって、少なくとも室温で五分間結合されて平衡に達しているリシン(60)を示す。非標識リシンがこの平衡化されたリシンに加えられ、そして室温で15分間インキュベーションして、HSA-ガラクトースからA1546リシンを平衡置換し、自己相関曲線のシフト(64)をもたらした。

10

【0166】

実施例 9

図 9 は、アレクサ-594 及びアレクサ-546 の両方で標識された細菌粒子上で収集された相互相関データを示す。上パネル(図 9 A)は、クロス・トーク補正アルゴリズムを適用する前のデータとして相互相関データを示す。下パネル(図 9 B)は、補正アルゴリズム(方程式 11)を適用後の相互相関データを示す。細菌粒子拡散を表すゆっくりとした拡散時間は、両方のデータ・セットの6msに適合する。

【0167】

実施例 10

図 10 は、アレクサ-594 及びアレクサ-546 の両方で標識された細菌粒子上の補正アルゴリズムを使用して、自己相関データの補正することを示す。図 10 A は、クロス・トーク補正アルゴリズムを適用する前のデータとして自己相関データを示す。図 10 B は、補正アルゴリズム(第一検出器チャンネルについて方程式 9)を適用後の自己相関データを示す。同じ分析は、第二検出器チャンネルにおいて収集されたデータについて、方程式 10 を使用して適用されうる。

20

【0168】

実施例 11

図 11 は、単独のアレクサ-546 標識リシン或いはHSA-ガラクトースに結合されたアレクサ546 標識リシンの蛍光強度ゆらぎ(実施例 8 のデータ)のモーメント解析を示す。モーメント解析は、自己相関関数を計算することなく、粒子数(N_p)についての値を求めることを可能にする。収集されたデータは、以下の一般アルゴリズム:

30

【数 34】

$$\frac{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2}{\langle I \rangle^2} \quad (12)$$

40

[式中、 I は、分析される自己相関データの蛍光強度であり、 $\langle I \rangle$ は、時間平均強度(つまり第一モーメント)であり、そして $\langle I^2 \rangle$ は、時間平均強度の二乗(つまり、第二モーメント)である。]に供される。リシン単独のモーメント解析は、 $1/N_p = 0.00014$ の値をもたらす。HSA-ガラクトースに結合されるリシンのモーメント解析は、 $1/N_p = 0.007$ の値をもたらす。図 11 は、リシン単独の自己相関関数(B)とHSA-ガラクトース(A)に結合するリシンの自己相関関数(A)の分析を示す。矢印は、モーメント解析により計算される $1 + 1/N_p$ を指す。

【0169】

実施例 12

50

図 1 2 は、アレクサ - 5 4 6 標識リシン単独の蛍光強度のゆらぎ(実施例 8 のデータ)のフーリエ変換解析(6 0)、及び H S A - ガラクトースに結合されるアレクサ - 5 4 6 標識リシンの蛍光強度のゆらぎ(実施例 8 のデータ)のフーリエ変換解析(6 4)を示す。図 1 2 A は、フーリエ変換のパワー・スペクトル(F F T 関数、Origin 5 . 0 , OriginLab, Northampton, Massachusetts)を示す。収集されるデータは、以下の一般アルゴリズム：
【数 3 5】

$$\mathfrak{J}\left(\frac{I_i - \langle I \rangle}{\langle I \rangle}\right) \quad (13)$$

10

[式中、 I_i は、各時間点での強度の値であり、そして $\langle I \rangle$ は、時間平均強度である。] に供される。図 1 2 B は、フーリエ変換の振幅を示す。

【図面の簡単な説明】

【0 1 7 0】

【図 1】図 1 A は、実施例 1 の時間に対する蛍光強度ゆらぎを示す。図 1 B は、実施例 1 の相互相関関数曲線を示す。

20

【図 2】図 2 A は、実施例 2 の蛍光強度のゆらぎを示す。図 2 B は、図 2 A のデータに対応する相互相関曲線を示す。

【図 3】図 3 A は、実施例 3 の蛍光強度のゆらぎを示す。図 3 B は、図 3 A におけるデータから得られた相互相関曲線を示す。

【図 4】図 4 A は、実施例 4 の蛍光強度のゆらぎを示す。図 4 B は、図 4 A において収集されたデータについての自己相関関数曲線を示す。

【図 5】図 5 A は、実施例 5 の自己相関関数曲線を示す。図 5 B は、各 I g G 濃度におけるゆっくりした拡散粒子 ($F_2 N p$) の割合を測定するための回帰係数の使用を示す。図 5 C は、化学量論を測定するための、図 5 A の自己相関曲線の分析からの回帰係数の使用を示す。

30

【図 6】図 6 A は、実施例 6 の非処理(実線) A 8 7 5 細胞と、N G F 処理(点線) A 8 7 5 細胞から求めた自己相関関数曲線を示す。図 6 B は、単量体、二量体、三量体、および四量体に対する理論曲線を、部分占有率(fractional occupancy)の関数として示す。

【図 7】図 7 は、実施例 7 の自己相関曲線を示す。

【図 8】図 8 は、実施例 8 の自己相関曲線を示す。

【図 9】図 9 は、実施例 9 で収集された相互相関データを示す。図 9 A は、クロストーク補正アルゴリズム適用前における実施例 9 で収集された相互相関データを示す。図 9 B は、補正アルゴリズム適用後における実施例 9 で収集された相互相関データを示す。

【図 1 0】図 1 0 A は、クロストーク補正アルゴリズム適用前の、実施例 1 0 の自己相関データを示す。図 1 0 B は、クロストーク補正アルゴリズム適用後の実施例 1 0 の自己相関データを示す。

40

【図 1 0 A】図 1 0 A は、クロストーク補正アルゴリズム適用前の、実施例 1 0 の自己相関データを示す。図 1 0 B は、クロストーク補正アルゴリズム適用後の実施例 1 0 の自己相関データを示す。

【図 1 0 B】図 1 0 A は、クロストーク補正アルゴリズム適用前の、実施例 1 0 の自己相関データを示す。図 1 0 B は、クロストーク補正アルゴリズム適用後の実施例 1 0 の自己相関データを示す。

【図 1 1】図 1 1 は、実施例 1 1 の強度ゆらぎデータに関するモーメント解析を示す。

【図 1 2】図 1 2 A は、実施例 1 2 についての強度ゆらぎデータのフーリエ変換のパワー・スペクトルを示す。図 1 2 B は、実施例 1 2 についての強度ゆらぎデータのフーリ

50

工変換の振幅スペクトルを示す。

【 図 1 】

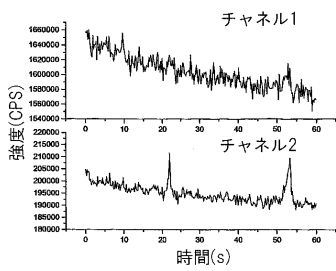


FIG. 1A

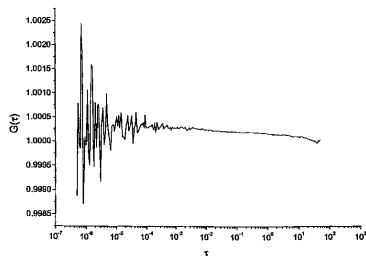


FIG. 1B

【 図 2 】

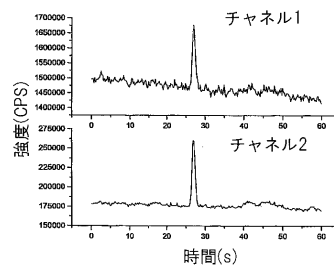


FIG. 2A

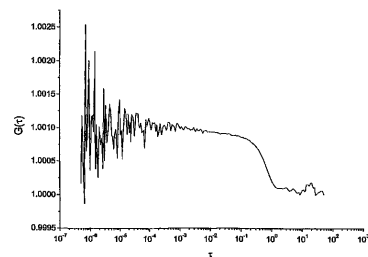


FIG. 2B

【 図 3 】

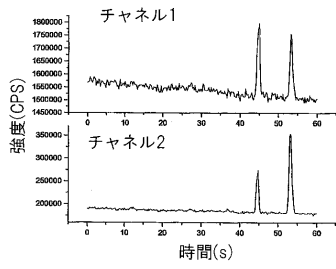


FIG. 3A

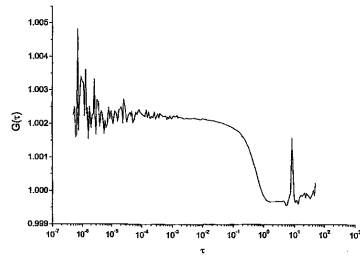


FIG. 3B

【 図 4 】

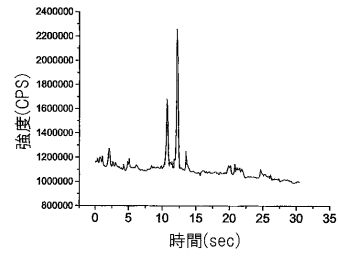


FIG. 4A

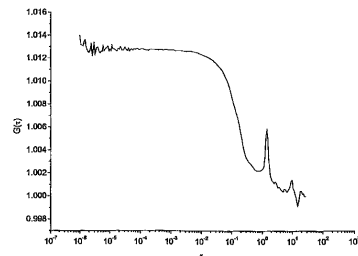


FIG. 4B

【 図 5 】

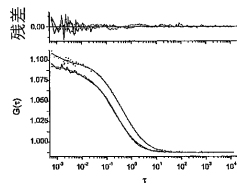


FIG. 5A

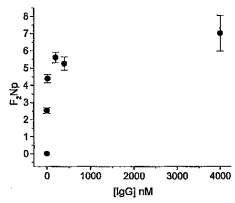


FIG. 5B

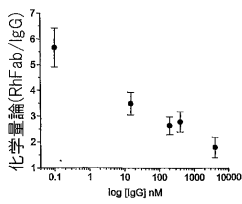


FIG. 5C

【 図 6 】

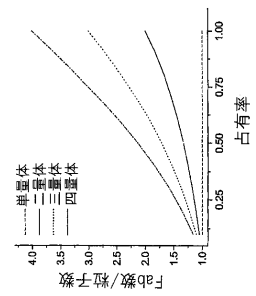


FIG. 6B

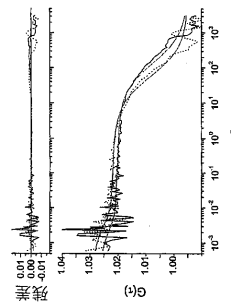
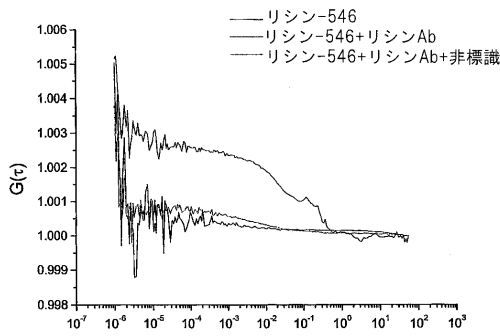


FIG. 6A

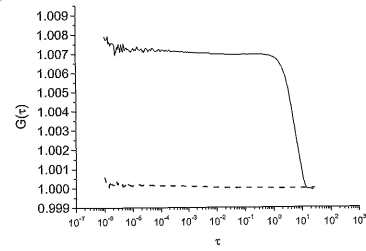
【 図 7 】

FIG. 7



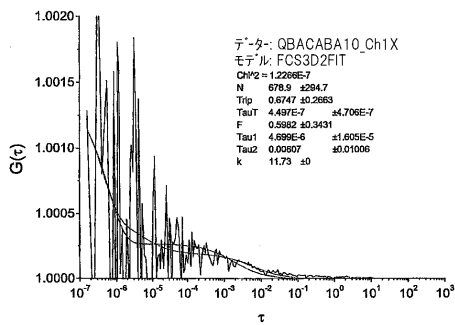
【 図 8 】

FIG. 8



【 図 9 】

FIG. 9A



【 図 10 】

FIG. 10

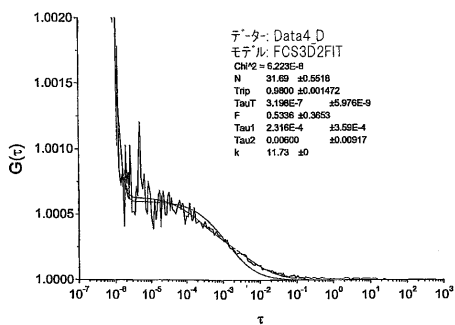
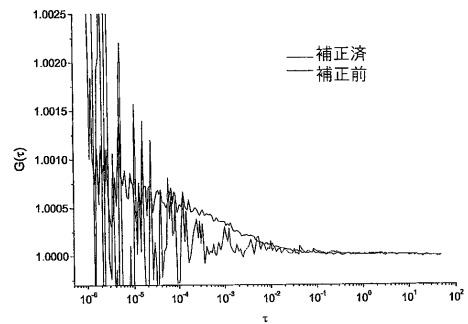


FIG. 9B

【 図 1 1 】

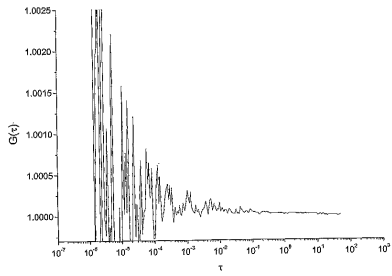


FIG. 10A

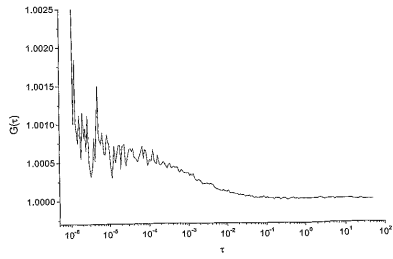


FIG. 10B

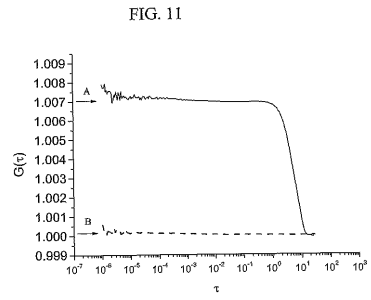


FIG. 11

【 図 1 2 】

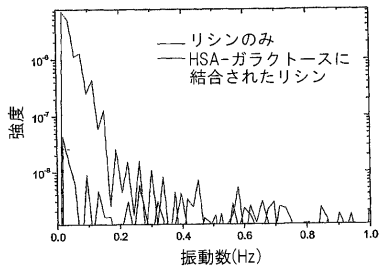


FIG. 12A

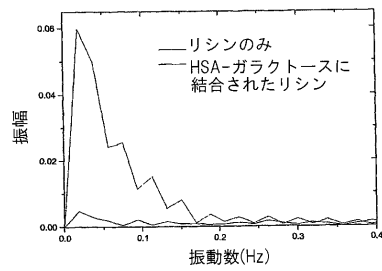


FIG. 12B

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/24780		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : G12Q 1/68; C12P 19/34; C12M 1/36; C07H 21/04 US CL : 435/7.1, 7.92; 436/172, 501, 544; 356/317				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/4, 6, 12, 7.1, 7.8, 7.92; 436/172, 501, 544; 356/317; 536/24.3, 23.1				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A,P	US 6,403,313 B1 (DAKSIS et al) 11 June 2002 (11.06.2002), see entire patent	1-117		
A	US 6,420,115 B1 (ERIKSON et al) 16.07.2002 (16.07.2002), see entire patent	1-117		
A	US 5,756,292 A (ROYER) 26 May 1998 (26.05.1998), see entire patent	1-117		
A	US 5,674,698 A (5,674,698) 7 October 1997 (07.10.1997), see entire patent	1-117		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 19 December 2003 (19.12.2003)		Date of mailing of the international search report 25 MAR 2004		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Layla G. Lauchman Telephone No. (703) 308-0956		

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/70	C 1 2 Q 1/04	
G 0 1 N 21/78	C 1 2 Q 1/68	A
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/70	
	G 0 1 N 21/78	C
	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ウルフ, デビッド イー .

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 1 7 7 6 , サドベリー, コンコード ロード 2 8 5

(72)発明者 プルスコ, ディラン エー .

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 1 5 4 1 , プリンストン, イースト プリンストン ロー
ド 2 2 0

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 EA01 FA03 GA25 GB28 LA01 NA01
NA06
2G054 CA20 CE02 EA03 GA04 GB02
4B024 AA11 AA19 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA11 HA08 HA09
HA12 HA14 HA19
4B029 AA07 AA21 AA23 BB01 BB02 BB11 BB13 BB15 BB17 BB20
CC03 FA02 FA03 FA11 FA12
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ05 QQ06 QQ08 QQ10 QQ42 QQ52 QR08
QR32 QR35 QR42 QR48 QR56 QR66 QR69 QR75 QR77 QR79
QR82 QS12 QS24 QS25 QS28 QS36 QS39 QX02