



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0002843
(43) 공개일자 2025년01월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) C12Q 1/6816 (2018.01)
G01N 33/532 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/54353 (2013.01)
C12Q 1/6816 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2024-7042210(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월11일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2022-7036862
원출원일자(국제) 2014년03월11일
심사청구일자 2022년11월21일
- (85) 번역문제출일자 2024년12월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/022948
- (87) 국제공개번호 WO 2014/164594
국제공개일자 2014년10월09일
- (30) 우선권주장
61/775,860 2013년03월11일 미국(US)
61/778,727 2013년03월13일 미국(US)

- (71) 출원인
메소 스케일 테크놀로지스, 엘엘시
미국 20850 메릴랜드주 록빌 리서치 불러바드 1601
- (72) 발명자
글레저 엘리 엔.
미국 92014 메릴랜드주 텔 마르 두란고 드라이브 13746
쿠마르 수딕
미국 20886 메릴랜드주 케이테르스부르크 아이비 브리지 코트 20427
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

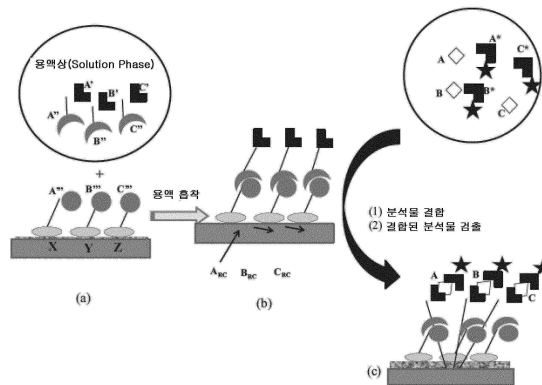
전체 청구항 수 : 총 78 항

(54) 발명의 명칭 다중화 어세이를 수행하기 위한 개선된 방법

(57) 요약

본 발명은 고체상 결합 어세이를 수행하는 방법에 관한 것이다. 일례는 분석물 특이성이 개선된 어세이 방법으로, 이 때 특이성은 비특이적 결합 상호작용의 존재에 의해 제한된다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 33/532 (2013.01)

G01N 33/54306 (2013.01)

G01N 2470/04 (2021.08)

(72) 발명자

오베로이 판카지

미국 20850 메릴랜드주 록빌 트리몬트 웨이 306

시갈 조지

미국 20853 메릴랜드주 록빌 트레일웨이 드라이브
5333

티시온스카이 마이클

미국 20855 메릴랜드주 더우드 레인즈 드라이브
19037

명세서

청구범위

청구항 1

복수의 관심 분석물에 대해 다중화 결합 어세이(multiplexed binding assay)를 수행하는 방법으로서,

(a) 1 이상의 단계로, 하기 성분들:

(i) 제1 관심 분석물 및 제2 관심 분석물을 포함하는 샘플,

(ii) 제1 결합 도메인 상에 고정화된 제1 표적화제,

(iii) 연결체에 연결된 제1 표적화제 상보체로서, 제1 표적화제 상보체는 제1 표적화제의 결합 파트너인 제1 표적화제 상보체,

(iv) 보조 연결체에 연결된 제1 결합 시약으로서, 제1 결합 시약은 제1 분석물의 결합 파트너인 제1 결합 시약,

(v) 제2 결합 도메인 상에 고정화된 제2 표적화제,

(vi) 연결체에 연결된 제2 표적화제 상보체로서, 제2 표적화제 상보체는 제2 표적화제의 결합 파트너인 제2 표적화제 상보체,

(vii) 보조 연결체에 연결된 제2 결합 시약으로서, 제2 결합 시약은 제2 분석물의 결합 파트너인 제2 결합 시약, 및

(viii) 경우에 따라, 가교제(bridging agent)의 2 이상의 복제물(copies)

을 배합하는 단계로서,

여기서 가교제가 생략되면, 각각의 연결체는 보조 연결체의 결합 파트너이거나, 또는 가교제가 포함되면, 가교제는 연결체 중 하나에 대한 제1 결합 부위 및 보조 연결체 중 하나에 대한 추가의 결합 부위를 갖는 것인 단계;

(b) (i) 제1 표적화제, 제1 표적화제 상보체, 제1 결합 시약 및 제1 분석물을 포함하는 제1 결합 도메인 상의 제1 결합 복합체, 및

(ii) 제2 표적화제, 제2 표적화제 상보체, 제2 결합 시약 및 제2 분석물을 포함하는 제2 결합 도메인 상의 제2 결합 복합체

를 형성하는 단계, 및

(c) 제1 및 제2 결합 도메인 각각 상의 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 샘플은 1 이상의 추가 관심 분석물을 함유하고, 각각의 추가 관심 분석물에 대해,

배합 단계 (a)는 1 이상의 단계로, (ix) 추가 결합 도메인 상에 고정화된 추가 표적화제, 연결체에 연결된 추가 표적화제 상보체, 및 보조 연결체에 연결된 추가 결합 시약, 및 (x) 추가 표적화제, 추가 표적화제 상보체, 추가 결합 시약 및 추가 분석물을 포함하는 추가 결합 도메인 상의 추가 결합 복합체를 배합하는 단계를 더 포함하고,

형성 단계 (b)는 (iii) 추가 표적화제, 추가 표적화제 상보체, 추가 결합 시약 및 추가 분석물을 포함하는 추가 결합 도메인 상의 추가 결합 복합체를 형성하는 단계를 더 포함하며,

단계 (c)의 측정은 추가 결합 도메인 상의 추가 분석물의 양을 측정하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

제1 표적화제 상보체 및 제1 결합 시약은 연결제와 보조 연결제 사이의 결합 상호작용을 통해 연결된 제1 표적화제 상보체 및 제1 결합 시약을 포함하는 사전 결합된(pre-bound) 제1 표적화 복합체로서 제공되고;

제2 표적화제 상보체 및 제2 결합 시약은 연결제와 보조 연결제 사이의 결합 상호작용을 통해 연결된 제2 표적화제 상보체 및 제2 결합 시약을 포함하는 사전 결합된 제2 표적화 복합체로서 제공되는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

제1 표적화 복합체는 제1 결합 도메인 상에 고정화된 제1 표적화제에 사전 결합되어 제공되고;

제2 표적화 복합체는 제2 결합 도메인 상에 고정화된 제2 표적화제에 사전 결합되어 제공되는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 단계 (a)는

액체의 제1 부피로, 상기 제1 표적화제 상보체, 상기 제1 결합 시약 및, 사용한다면, 상기 가교 시약을 배합하고, 상기 제1 표적화제 상보체 및 상기 제1 결합 시약을 그들의 부착된 연결제를 통해 연결시켜 제1 표적화 복합체를 형성하는 단계; 및

액체의 제2 부피로, 상기 제2 표적화제 상보체, 상기 제2 결합 시약 및, 사용한다면, 상기 가교 시약을 배합하고, 상기 제2 표적화제 복합체 상보체 및 상기 제2 결합 시약을 그들의 부착된 연결제를 통해 연결시켜 제2 표적화 복합체를 형성하는 단계

를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 단계 (a)는

상기 제1 및 제2 표적화 복합체를 배합하는 단계,

상기 제1 및 제2 표적화 복합체의 배합물을 상기 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키는 단계, 및

상기 제1 표적화 복합체를 상기 제1 결합 도메인 상의 상기 제1 표적화제에 결합시키고 상기 제2 표적화 복합체를 상기 제2 결합 도메인 상의 상기 제2 표적화제에 결합시키는 단계

를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제3항 또는 제5항에 있어서, 배합 단계 (a)는

제1 및 제2 표적화 복합체를 샘플과 배합하여 이의 혼합물을 형성하는 단계,

제1 분석물을 제1 표적화 복합체의 제1 결합 시약에 결합시키고 제2 분석물을 제2 표적화 복합체의 제2 결합 시약에 결합시키는 단계,

제1 및 제2 분석물 각각에 결합된 제1 및 제2 표적화 복합체의 혼합물을 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키는 단계; 및

제1 표적화 복합체를 제1 결합 도메인 상의 제1 표적화제에 결합시키고 제2 표적화 복합체를 제2 결합 도메인 상의 제2 표적화제에 결합시키는 단계

를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 제1 및 제2 표적화 복합체는 제1 및 제2 표적화 복합체를 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키기 전에 샘플과 배합되는 것인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 제1 및 제2 표적화 복합체는 제1 및 제2 표적화 복합체를 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시킨 후에 샘플과 배합되는 것인 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 제1 및 제2 표적화 복합체는 샘플과 배합되고 동시에 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉되는 것인 방법.

청구항 11

제4항에 있어서, 단계 (a)는

상기 제1 및 제2 결합 도메인 상의 상기 제1 및 제2 표적화 복합체를 상기 샘플과 접촉시키는 단계,

상기 제1 분석물을 상기 제1 표적화 복합체의 제1 결합 시약에 결합시키고 상기 제2 분석물을 상기 제2 표적화 복합체의 상기 제2 결합 시약에 결합시키는 단계

를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 가교제가 생략되며 연결체는 (a) 티올 기와 말레이미드 또는 요오도아세트아미드 기; (b) 알데히드와 히드라지드; 또는 (c) 알킨과 아지드 사이의 결합 상호작용을 통해 보조 연결체에 결합되는 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 가교제가 생략되며 (a) 연결체는 바이오틴이고 보조 연결체는 스트렙타비딘 또는 아비딘이거나; (b) 연결체는 스트렙타비딘 또는 아비딘이고 보조 연결체는 바이오틴이거나; (c) 연결체는 펩티드이고 보조 연결체는 항펩티드 항체이거나; 또는 (d) 연결체는 항펩티드 항체이고 보조 연결체는 펩티드인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 가교제가 포함되며, 가교제는 스트렙타비딘 또는 아비딘이고, 연결체 및 보조 연결체는 각각 바이오틴인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 제1 및 제2 결합 시약 각각은 상기 제1 및 제2 분석물 각각에 결합할 수 있는 수용체, 리간드, 항체, 합텐, 항원, 에피토프, 미미토프, 압타머, 또는 인터칼레이터를 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 제1 및 제2 결합 시약은 항원인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 제1 및 제2 결합 시약은 항체인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 샌드위치 결합 어세이를 수행하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 단계 (a)에서 배합되는 성분은 제1 분석물에 결합하는 제1 검출 시약 및 제2 분석물에 결합하는 제2 검출 시약을 더 포함하고, 단계 (b)에서 형성되는 제1 및 제2 복합체는 제1 및 제2 검출 시약 각각을 더 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 제1 및 제2 검출 시약 각각은 검출가능한 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 제1 및 제2 결합 시약, 및 제1 및 제2 검출 시약은 항체인 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 제1 및 제2 검출 시약은 제1 또는 제2 분석물에 결합할 수 있는 것인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 제1 및 제2 검출 시약 각각은 검출가능한 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 제1 및 제2 결합 시약은 항원이고, 분석물은 항원에 대한 항체이며, 검출 시약은 항면역글로불린 항체, 단백질 A, 단백질 G 또는 단백질 L을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 경쟁적 결합 어세이를 수행하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 26

제1항에 있어서, 단계 (a)에서 배합되는 성분은 (xvi) 제1 결합 시약과의 결합에 대해 제1 분석물과 경쟁하는 제1 검출 시약, 및 (xvii) 제2 결합 시약과의 결합에 대해 제2 분석물과 경쟁하는 제2 검출 시약을 더 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 제1 및 제2 검출 시약은 검출가능한 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제25항에 있어서, 제1 및 제2 결합 시약은 항체이고 제1 및 제2 검출 시약은 분석물의 구조 유사체인 방법.

청구항 29

제19항 또는 제25항에 있어서, 측정 단계 (c)는 광학 흡광도, 형광, 인광, 화학발광, 전기화학발광, 광산란, 또는 자성(magnetism)을 통해 제1 및 제2 검출가능한 표지의 존재를 측정하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제25항에 있어서, 제1 및 제2 검출가능한 표지는 전기화학발광성 표지이며, 측정 단계 (c)는 전기화학발광성 신호를 측정하고 신호를 샘플 내 제1 및 제2 분석물의 양과 관련시키는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 31

제23항에 있어서, 제1 및 제2 결합 도메인은 전극 상에 위치하고 측정 단계는 전극에 전압 파형을 인가하여 전기화학발광을 생성하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제1항에 있어서, 제1 및 제2 결합 도메인 각각은 결합 도메인의 어레이의 성분(element)인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 어레이는 다중웰 플레이트의 웰 내에 위치하는 것인 방법.

청구항 34

제1항에 있어서, 제1 및 제2 결합 도메인 각각은 1 이상의 미세입자의 표면 상에 각각 위치하는 것인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 입자는 특이적 입자의 식별, 및 제1 및 제2 결합 도메인 간 구별이 가능하도록 암호화되는 것인 방법.

청구항 36

제1항 또는 제2항에 있어서, (i) 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체, 및 (ii) 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체 각각은 상보성 올리고뉴클레오티드 쌍을 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 제1 및 제2 결합 시약은 각각 항체인 방법.

청구항 38

제36항에 있어서, 제1 및 제2 결합 도메인 각각 상에 위치한 상보성 올리고뉴클레오티드 쌍은 상이하고 하기에 선택되는 것인 방법:

항	서열	항	서열
1	acatcgtagtt (서열번호 1)	12	cgaatgtagat (서열번호 23)
	aactaccgatet (서열번호 2)		actctacattcg (서열번호 24)
3	agaagaagatcc (서열번호 5)	13	cggttagata (서열번호 25)
	ggatctttctt (서열번호 6)		tatctcaaacg (서열번호 26)
6	atcattaccacc (서열번호 11)	16	gacataaacga (서열번호 31)
	eetgataaat (서열번호 12)		tcgcttatatc (서열번호 32)
7	attaacaggagc (서열번호 13)	17	gccatagtctt (서열번호 33)
	gctccggtaat (서열번호 14)		agagactatagc (서열번호 34)
8	cagaegtcttaa (서열번호 15)	18	gctaattacca (서열번호 35)
	ttaagaccttg (서열번호 16)		tggtagattagc (서열번호 36)
9	casgtatcatt (서열번호 17)	20	gttgattctctc (서열번호 39)
	aatggacacctg (서열번호 18)		gacagaatcaac (서열번호 40)
11	octacagatatac (서열번호 21)	23	ttccacttaggg (서열번호 45)
	gtatatcgtagg (서열번호 22)		ccctaagtggaa (서열번호 46)
		25	tttccttctta (서열번호 49)
			tagcaaggaaa (서열번호 50)

청구항 39

제38항에 있어서, 7개 이상의 결합 도메인이 존재하는 것인 방법.

청구항 40

제38항에 있어서, 10개 이상의 결합 도메인이 존재하는 것인 방법.

청구항 41

제38항에 있어서, 16개 이상의 결합 도메인이 존재하는 것인 방법.

청구항 42

제38항에 있어서, 25개 이상의 결합 도메인이 존재하는 것인 방법.

청구항 43

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 및 제2 상보성 표적화제 각각은 각각 제1 및 제2 결합 도메인 중 하나에 선택적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상보성 표적화제의 다른 결합 도메인과의 결합에 대한 교차 반응성은 결합 도메인 중 하나와

의 결합의 5% 미만인 방법.

청구항 45

제43항에 있어서, 각각의 제1 및 제2 상보성 표적화제의 제3 결합 도메인과의 결합에 대한 교차 반응성은 결합 도메인 중 하나와의 결합의 1% 미만인 방법.

청구항 46

제43항에 있어서, 각각의 제1 및 제2 상보성 표적화제의 제3 결합 도메인과의 결합에 대한 교차 반응성은 결합 도메인 중 하나와의 결합의 0.5% 미만인 방법.

청구항 47

제43항에 있어서, 각각의 제1 및 제2 상보성 표적화제의 제3 결합 도메인과의 결합에 대한 교차 반응성은 결합 도메인 중 하나와의 결합의 0.1% 미만인 방법.

청구항 48

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 및 제2 결합 시약 각각은 상이한 관심 분석물에 결합하는 것인 방법.

청구항 49

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 및 제2 결합 시약은 각각 상이한 관심 분석물에 대해 우선적으로 선택적인 것인 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 결합 시약은 상이한 관심 분석물에 대해 친화성 및/또는 선택성이 다른 것인 방법.

청구항 51

제43항에 있어서, 제2 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 시약과의 결합의 5% 미만인 방법.

청구항 52

제43항에 있어서, 제2 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 시약과의 결합의 1% 미만인 방법.

청구항 53

제43항에 있어서, 제2 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 시약과의 결합의 0.5% 미만인 방법.

청구항 54

제43항에 있어서, 제2 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 시약과의 결합의 0.1% 미만인 방법.

청구항 55

제43항에 있어서, 비특이적 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물과의 결합을 위해 선택된 결합 시약과의 결합의 5% 미만인 방법.

청구항 56

제43항에 있어서, 비특이적 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물과의 결합을 위해 선택된 결합 시약과의 결합의 1% 미만인 방법.

청구항 57

제43항에 있어서, 비특이적 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물과의 결합을 위해 선택된 결합 시약과의 결합의 0.5% 미만인 방법.

청구항 58

제43항에 있어서, 비특이적 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물과의 결합을 위해 선택된 결합 시약과의 결합의 0.1% 미만인 방법.

청구항 59

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 및 제2 표적화제 및 제1 및 제2 표적화제 상보체는, 각각, 결합 도메인 세트에 대해 결합 시약 세트를 맵핑하는데 사용되고 세트 내 결합 시약 각각은 상이한 관심 분석물에 결합하는 것인 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 세트 내 결합 시약 각각은 상이한 관심 분석물에 대해 우선적으로 선택적인 것인 방법.

청구항 61

제59항에 있어서, 세트 내 결합 시약 각각은 상이한 관심 분석물에 대한 친화성 및/또는 선택성이 다른 것인 방법.

청구항 62

제43항에 있어서, 제2 결합 도메인에 위치한 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 도메인에 위치한 결합 시약과의 결합의 5% 미만인 방법.

청구항 63

제43항에 있어서, 제2 결합 도메인에 위치한 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 도메인에 위치한 결합 시약과의 결합의 1% 미만인 방법.

청구항 64

제43항에 있어서, 제2 결합 도메인에 위치한 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 도메인에 위치한 결합 시약과의 결합의 0.5% 미만인 방법.

청구항 65

제43항에 있어서, 제2 결합 도메인에 위치한 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 도메인에 위치한 결합 시약과의 결합의 0.1% 미만인 방법.

청구항 66

제43항에 있어서, 비특이적 결합 도메인에 위치한 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물에 대해 지정된(assigned) 결합 도메인의 결합 시약과의 결합의 5% 미만인 방법.

청구항 67

제43항에 있어서, 비특이적 결합 도메인에 위치한 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물에 대해 지정된 결합 도메인의 결합 시약과의 결합의 1% 미만인 방법.

청구항 68

제43항에 있어서, 비특이적 결합 도메인에 위치한 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물에 대해 지정된 결합 도메인의 결합 시약과의 결합의 0.5% 미만인 방법.

청구항 69

제43항에 있어서, 비특이적 결합 도메인에 위치된 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물에 대해 지정된 결합 도메인의 결합 시약과의 결합의 0.1% 미만인 방법.

청구항 70

하기에서 선택되는 올리고뉴클레오티드:

서열	서열
acatcgtagt (서열번호 1)	cgatstagaat (서열번호 23)
aactaccgat (서열번호 2)	actctacattc (서열번호 24)
agaagaatcc (서열번호 5)	cggtttgagata (서열번호 25)
ggtctctctct (서열번호 6)	tatctcaaacg (서열번호 26)
atcattaccacc (서열번호 11)	gacataaacga (서열번호 31)
ggtgtaaatgat (서열번호 12)	tcgctttatctc (서열번호 32)
attaacggagac (서열번호 13)	gccatagtctct (서열번호 33)
gctcccattaat (서열번호 14)	agagactatgcc (서열번호 34)
cagaagtcttaa (서열번호 15)	gctaattcacca (서열번호 35)
ttaagacctctg (서열번호 16)	tggtagattagc (서열번호 36)
caagttccatt (서열번호 17)	gttgattctctc (서열번호 39)
aatggacacctg (서열번호 18)	gacagaatcaac (서열번호 40)
cctacagatatac (서열번호 21)	ttccacttaagg (서열번호 45)
gtatatcgtagg (서열번호 22)	ccctaagtggaa (서열번호 46)
	tttcccttcta (서열번호 49)
	tagcaaggaaa (서열번호 50)

청구항 71

각각 하기에서 선택되는 상이한 서열을 포함하는 4개 이상의 올리고뉴클레오티드를 별도의 바이알에 포함하는 키트:

항	서열	항	서열
1	acatcgtagt (서열번호 1)	12	cgatstagaat (서열번호 23)
	aactaccgat (서열번호 2)		actctacattc (서열번호 24)
3	agaagaatcc (서열번호 5)	13	cggtttgagata (서열번호 25)
	ggtctctctct (서열번호 6)		tatctcaaacg (서열번호 26)
6	atcattaccacc (서열번호 11)	16	gacataaacga (서열번호 31)
	ggtgtaaatgat (서열번호 12)		tcgctttatctc (서열번호 32)
7	attaacggagac (서열번호 13)	17	gccatagtctct (서열번호 33)
	gctcccattaat (서열번호 14)		agagactatgcc (서열번호 34)
8	cagaagtcttaa (서열번호 15)	18	gctaattcacca (서열번호 35)
	ttaagacctctg (서열번호 16)		tggtagattagc (서열번호 36)
9	caagttccatt (서열번호 17)	20	gttgattctctc (서열번호 39)
	aatggacacctg (서열번호 18)		gacagaatcaac (서열번호 40)
11	cctacagatatac (서열번호 21)	23	ttccacttaagg (서열번호 45)
	gtatatcgtagg (서열번호 22)		ccctaagtggaa (서열번호 46)
		25	tttcccttcta (서열번호 49)
			tagcaaggaaa (서열번호 50)

청구항 72

제71항에 있어서, 7개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 키트.

청구항 73

제71항에 있어서, 10개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 키트.

청구항 74

제71항에 있어서, 16개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 키트.

청구항 75

제71항에 있어서, 25개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 키트.

청구항 76

제71항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 각각은 바이오틴, 스트렙타비딘, 아비딘, 아미노 기, 티올 기, 알데히드 기, 히드라지드 기, 아지드 기, 알킨 기, 말레이미드 기 또는 요오도아세트아미드 기를 포함하는 연결제로 개

질되는 것인 키트.

청구항 77

제71항에 있어서, 4개 이상의 올리고뉴클레오티드 각각은 상이한 항체에 커플링되는 것인 키트.

청구항 78

제71항에 있어서, 각각의 상이한 서열은 4개 이상의 올리고뉴클레오티드의 추가적인 상이한 서열의 상보체가 아닌 것인 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 각각 2013년 3월 11일 출원한 미국 가출원 제61/775,860호, 및 2013년 3월 13일 출원한 미국 가출원 제 61/778,727호를 참조하며, 각 개시내용을 그 전체로 참조하여 본원에 편입시킨다.

[0003] **연방정부 지원 연구에 관한 진술**

[0004] 본 발명은 국립 보건원에서 수여하는 5RCA130391-04 하의 정부 지원으로 수행되었다. 정부는 본 발명의 일정 권리를 갖는다.

[0005] **본 발명의 분야**

[0006] 결합 어세이를 수행하기 위한 개선된 방법 및 생성물을 제공한다. 이들 방법은 사용자가 어세이 재료의 표준 세트로부터 그/그녀의 요구를 충족하도록 어세이를 구성할 수 있게 하는 연결제 복합체의 사용을 포함한다. 본 발명의 생성물 및 방법은 어세이 개발에서 생산성 및 탄력성을 상당히 향상시킨다.

배경 기술

[0007] 문헌의 실질적인 주요부는 샘플 내 관심 분석물의 민감한 측정을 위해, 결합 반응, 예를 들면 항원-항체 반응, 핵산 혼성화 및 수용체-리간드 반응을 적용하는 기술에 대해 개발되었다. 많은 생화학적 결합 시스템에서 고도의 특이성은 기초 연구, 인간 및 수의학적 진단법, 환경 모니터링 및 산업적 검사를 포함하여 다양한 시장에서 가치있는 많은 어세이 방법 및 시스템을 이끌어 내었다. 관심 분석물의 존재는 결합 반응에 분석물의 참여를 직접적으로 측정하여 측정할 수 있다. 일부 접근법에서, 이러한 참여는 결합 물질 중 1 이상에 부착된 관찰가능한 표지의 측정을 통해 나타낼 수 있다.

[0008] 상업적으로 입수가 가능한 어세이는 일반적으로 사용자가 그 또는 그녀에게 고유한 관심대상일 수 있는 표적(들)을 평가하기 위한 탄력성을 거의 또는 전혀 제공하지 않는, 사전 설정된 구성으로 제공된다. 이러한 상업적 패널은 거의 또는 전혀 관심없는 표적 분석물을 포함하고/하거나 목적하는 표적 분석물(들)을 포함하지 않을 수 있다. 따라서, 어세이 재료 및 방법의 표준 세트를 이용하여 사용자 정의 다중화 어세이를 구성하기 위한 탄력적인 방법을 사용자에게 제공하려는 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 다음의 특별한 실시양태를 고려한다. 본 발명의 정신 및 범주를 벗어나지 않고 당분야의 숙련가에 의해 본원에 기술된 실시양태에 다양한 변형, 부가 및 변경을 가할 수 있다. 이러한 변형, 부가, 및 변경은 청구항의 범주에 포함시키고자 한다.

[0010] 실시양태 (1): 하기 단계를 포함하는 복수의 관심 분석물에 대한 다중화(다중검출)(multiplexed) 결합 어세이를 수행하는 방법:

[0011] 1 이상의 단계로, 다음의 성분들: 제1 관심 분석물 및 제2 관심 분석물을 포함하는 샘플, 제1 결합 도메인 상에 고정화된 제1 표적화제, 연결제에 연결된 제1 표적화제 상보체로서, 제1 표적화제의 결합 파트너인 제1 표적화제 상보체, 보조(supplemental) 연결제에 연결된 제1 결합 시약으로서, 제1 분석물의 결합 파트너인 제1 결합 시약, 제2 결합 도메인 상에 고정화된 제2 표적화제, 연결제에 연결된 제2 표적화제 상보체로서, 제2 표적화제의 결합 파트너인 제2 표적화제 상보체, 보조 연결제에 연결된 제2 결합 시약으로서, 제2 분석물의 결합 파트너

인 제2 결합 시약, 및 경우에 따라서 2 이상의 가교제의 복사물을 배합하는 단계로서, 여기서 가교제가 생략되면, 각각의 연결체는 보조 연결체의 결합 파트너이거나, 또는 가교제가 포함되면, 가교제는 연결체 중 하나에 대한 제1 결합 부위 및 보조 연결체 중 하나에 대한 추가 결합 부위를 갖는 것인 단계;

[0012] 제1 표적화제, 제1 표적화제 상보체, 제1 결합 시약 및 제1 분석물을 포함하는 제1 결합 도메인 상의 제1 결합 복합체, 및 제2 표적화제, 제2 표적화제 상보체, 제2 결합 시약 및 제2 분석물을 포함하는 제2 결합 도메인 상의 제2 결합 복합체를 형성하는 단계, 및

[0013] 각각 제1 및 제2 결합 도메인 상의 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계.

[0014] 실시양태 (1)의 일례에서, 실시양태 (1)(a)를 언급하면, 샘플은 1 이상의 추가적인 관심 분석물을 함유하고 각각의 추가적인 관심 분석물에 대해서, 배합 단계는 1 이상의 단계로, 추가적인 결합 도메인 상에 고정화된 추가적인 표적화제, 연결체에 연결된 추가적인 표적화제 상보체 및 보조 연결체에 연결된 추가적인 결합 시약, 및 추가적인 표적화제, 추가적인 표적화제 상보체, 추가적인 결합 시약 및 추가의 분석물을 포함하는 추가적인 결합 도메인 상의 추가적인 결합 복합체를 배합하는 것을 더 포함하고; 형성 단계는 추가적인 표적화제, 추가적인 표적화제 상보체, 추가적인 결합 시약 및 추가의 분석물을 포함하는 추가적인 결합 도메인 상의 추가적인 결합 복합체를 형성하는 것을 더 포함하며; 측정 단계는 추가적인 결합 도메인 상의 추가의 분석물의 양을 측정하는 것을 더 포함한다.

[0015] 실시양태 (1)의 추가 예에서, 실시양태 (1)(b)를 언급하면, 제1 표적화제 상보체 및 제1 결합 시약은 연결체와 보조 연결체 간 결합 상호작용을 통해서 연결된 제1 표적화제 상보체 및 제1 결합 시약을 포함하는 사전결합된 제1 표적화 복합체로서 제공되고; 제2 표적화제 상보체 및 제2 결합 시약은 연결체와 보조 연결체 간 결합 상호작용을 통해서 연결된 제2 표적화제 상보체 및 제2 결합 시약을 포함하는 사전결합된 제2 표적화 복합체로서 제공된다.

[0016] 또한, 실시양태 (1)의 다른 예에서, 실시양태 (1)(c)를 언급하면, 제1 표적화 복합체는 제1 결합 도메인 상에 고정화된 제1 표적화제에 사전결합되어 제공되고; 제2 표적화 복합체는 제2 결합 도메인 상에 고정화된 제2 표적화제에 사전 결합되어 제공된다. 이러한 예에서, 배합 단계는 제1 및 제2 표적화 복합체를 샘플과 배합하여 이의 혼합물을 형성시키는 단계, 제1 분석물을 제1 표적화 복합체 내 제1 결합 시약에 결합시키고 제2 분석물을 제2 표적화 복합체 내 제2 결합 시약에 결합시키는 단계, 제1 및 제2 분석물에 결합된 제1 및 제2 표적화 복합체의 혼합물을 각각 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키는 단계; 및 제1 표적화 복합체를 제1 결합 도메인 상의 제1 표적화제에 결합시키고 제2 표적화 복합체를 제2 결합 도메인 상의 제2 표적화제에 결합시키는 단계를 더 포함한다.

[0017] 실시양태 (1)의 구체적인 예에서, 실시양태 (1)(d)를 언급하면, 배합 단계는 액체의 제1 부피로, 상기 제1 표적화제 상보체, 상기 제1 결합 시약 및 사용하는 경우, 상기 가교화 시약을 배합하고, 그들의 부착된 연결체를 통해서 상기 제1 표적화제 상보체 및 상기 제1 결합 시약을 연결시켜 제1 표적화 복합체를 형성시키는 단계; 및 액체의 제2 부피로, 상기 제2 표적화제 상보체, 상기 제2 결합 시약 및, 사용하는 경우, 상기 가교화 시약을 배합하고, 그들의 부착된 연결체를 통해서 상기 제2 표적화제 복합체 보체 및 상기 제2 결합 시약을 연결하여 제2 표적화 복합체를 형성시키는 단계를 더 포함한다.

[0018] 실시양태 (1)의 특정한 예에서, 실시양태 (1)(e)를 언급하면, 배합 단계는 상기 제1 및 제2 표적화 복합체를 배합하는 단계, 상기 제1 및 제2 표적화 복합체의 배합물을 상기 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키는 단계, 및 상기 제1 표적화 복합체를 상기 제1 결합 도메인 상의 상기 제1 표적화제에 결합시키고, 상기 제2 표적화 복합체를 상기 제2 결합 도메인 상의 상기 제2 표적화제에 결합시키는 단계를 더 포함한다. 이러한 예에서, 배합 단계는 제1 및 제2 표적화 복합체를 샘플과 배합하여 이의 혼합물을 형성시키는 단계, 제1 분석물을 제1 표적화 복합체 내 제1 결합 시약에 결합시키고 제2 분석물을 제2 표적화 복합체 내 제2 결합 시약에 결합시키는 단계, 제1 및 제2 분석물에 결합된 제1 및 제2 표적화 복합체의 혼합물을 각각 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키는 단계; 및 제1 표적화 복합체를 제1 결합 도메인 상의 제1 표적화제에 결합시키고 제2 표적화 복합체를 제2 결합 도메인 상의 제2 표적화제에 결합시키는 단계를 더 포함한다.

[0019] 실시양태 (1)(c) 및 (1)(e)에서, 제1 및 제2 표적화 복합체는 제1 및 제2 표적화 복합체를 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키기 전에 샘플과 배합될 수 있다. 게다가, 이들 특별한 실시양태에서, 제1 및 제2 표적화 복합체는 제1 및 제2 표적화 복합체를 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키기 전에 샘플과 배합되거나, 또는 제1 및 제2 표적화 복합체는 동시에 샘플과 배합되고 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉될 수 있다.

- [0020] 실시양태 (1)(d)에서, 배합 단계는 상기 제1 및 제2 결합 도메인 상의 상기 제1 및 제2 표적화 복합체를 상기 샘플과 접촉시키는 단계, 상기 제1 분석물을 상기 제1 표적화 복합체 내 제1 결합 시약에 결합시키는 단계 및 상기 제2 분석물을 상기 제2 표적화 복합체 내 상기 제2 결합 시약에 결합시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0021] 실시양태 (1) 및 (1)(a)-(e)에서, 가교제는 생략될 수 있고 연결제는 (a) 티올 기와 말레이미드 또는 요오도아세트아미드 기; (b) 알데히드와 히드라지드; 또는 (c) 알킨과 아지드 사이의 결합 상호작용을 통해서 보조 연결제에 결합될 수 있다.
- [0022] 실시양태 (1) 및 (1)(a)-(e)에서, 가교제는 생략될 수 있으며, (a) 연결제는 바이오틴이고, 보조 연결제는 스트렙타비딘 또는 아비딘이거나; (b) 연결제는 스트렙타비딘 또는 아비딘이고, 보조 연결제는 바이오틴이거나; (c) 연결제는 펩티드이고 보조 연결제는 항펩티드 항체이거나; 또는 (d) 연결제는 항펩티드 항체이고 보조 연결제는 펩티드이다.
- [0023] 대안적으로 또는 부가적으로, 실시양태 (1) 및 (1)(a)-(e)에서, 가교제가 포함될 수 있고, 가교제는 스트렙타비딘 또는 아비딘이고, 연결제 및 보조 연결제는 각각 바이오틴을 포함할 수 있다.
- [0024] 실시양태 (1) 및 (1)(a)-(e)에서 언급된 제1 및 제2 결합 시약은 각각 상기 제1 및 제2 분석물에 결합할 수 있는 수용체, 리간드, 항체, 합텐, 항원, 에피토프, 미미토프(mimitope), 압타머, 또는 인터칼레이터를 각각 포함할 수 있다. 예를 들면, 제1 및 제2 결합 시약은 항원이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 제1 및 제2 결합 시약은 항체이다.
- [0025] 실시양태 (1) 및 (1)(a)-(e)에서, 이 방법은 샌드위치 결합 어세이를 수행하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0026] 실시양태 (1) 및 (1)(a)-(e)의 일 특정 예에서, 배합 단계에서 배합되는 성분은 제1 분석물에 결합하는 제1 검출 시약 및 제2 분석물에 결합하는 제2 검출 시약을 더 포함하고, 제2 단계에서 형성된 제1 및 제2 복합체는 각각 제1 및 제2 검출 시약을 더 포함한다. 예를 들면, 제1 및 제2 검출 시약 각각은 검출가능한 표지를 포함한다. 이 실시양태의 다른 예에서, 제1 및 제2 결합 시약과 제1 및 제2 검출 시약은 항체이다. 또한, 제1 및 제2 검출 시약은 제1 또는 제2 분석물에 결합할 수 있고, 경우에 따라 제1 및 제2 검출 시약 각각은 검출가능한 표지를 포함한다. 특별한 예에서, 제1 및 제2 결합 시약은 항원이고, 분석물은 그 항원에 대한 항체이며, 검출 시약은 항면역글로불린 항체, 단백질 A, 단백질 G 또는 단백질 L을 포함한다.
- [0027] 실시양태 (1) 및 (1)(a)-(e)의 방법은 경쟁적 결합 어세이를 수행하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0028] 여전히 또한, 실시양태 (1) 및 (1)(a)-(e)에서 배합되는 성분은, 제1 결합 시약과의 결합에 대해 제1 분석물과 경쟁하는 제1 검출 시약 및 제2 결합 시약과의 결합에 대해 제2 분석물과 경쟁하는 제2 검출 시약을 더 포함할 수 있다.
- [0029] 실시양태 (1) 및 (1)(a)-(e)에서, 방법의 하기 추가적인 성분 중 하나 또는 그 이상을 포함한다: 제1 및 제2 검출 시약은 검출가능한 표지를 포함할 수 있다; 제1 및 제2 결합 시약은 항체이고 제1 및 제2 검출 시약은 분석물의 구조적 유사체이다; 측정 단계는 광학 흡광도, 형광, 인광, 화학발광, 전기화학발광, 광산란, 또는 자성을 통해 제1 및 제2 검출가능한 표지의 존재를 측정하는 단계를 포함할 수 있다; 제1 및 제2 검출가능한 표지는 전기화학발광성 표지이며, 측정 단계는 전기화학발광성 신호를 측정하는 단계 및 그 신호와 샘플 내 제1 및 제2 분석물의 양을 상호관련시키는 단계를 더 포함한다; 제1 및 제2 결합 도메인은 전극 상에 위치시키고, 측정 단계는 전극에 전압 과형을 인가하여 전기화학발광을 생성시키는 단계를 더 포함한다; 제1 및 제2 결합 도메인 각각은 결합 도메인의 어레이의 성분(element)이고, 경우에 따라, 어레이는 다중웰 플레이트의 웰 내에 위치한다; 제1 및 제2 결합 도메인 각각은 개별적으로 1 또는 그 이상의 미세입자의 표면 상에 위치하고, 경우에 따라 이 입자는 특정 입자의 식별, 및 제1 및 제2 결합 도메인간 구별이 가능하도록 암호화된다.
- [0030] 실시양태 (1)(f)는 실시양태 (1)의 성분, 및 실시양태 (1)(a)-(e)의 1 이상의 추가적인 특징을 포함하며, 여기서 제1 표적화제와 제1 표적화제 상보체 및 제2 표적화제와 제2 표적화제 상보체는 각각이 상보성 올리고뉴클레오티드 쌍을 포함한다. 이러한 특정 예에서, 제1 및 제2 결합 시약은 각각이 항체일 수 있다. 또한, 이러한 특정 예에서, 제1 및 제2 결합 도메인 각각의 위에 위치한 상보성 올리고뉴클레오티드 쌍은 상이하고, 하기에서 선택된다:

항목	서열 (5'-3')	항목	서열 (5'-3')
1	acatcagaaatt (서열번호 1)	13	caattttagaa (서열번호 25)
2	aaactacagatg (서열번호 2)	14	tatcccaacc (서열번호 26)
3	acgtccaaatg (서열번호 3)	15	cttcaaacca (서열번호 27)
4	caactagaaatc (서열번호 4)	16	tcgcttgtag (서열번호 28)
5	aaagaaagatcc (서열번호 5)	17	ctcttccacc (서열번호 29)
6	gaattctctc (서열번호 6)	18	ctccaaagaa (서열번호 30)
7	aaattcaatgca (서열번호 7)	19	gacataaacca (서열번호 31)
8	tgactgaacct (서열번호 8)	20	tcgctttatc (서열번호 32)
9	atcaagaaatcc (서열번호 9)	21	accatadctc (서열번호 33)
10	aaactatcgt (서열번호 10)	22	aaacaaatcc (서열번호 34)
11	atcattaccacc (서열번호 11)	23	actaattcaca (서열번호 35)
12	aaatcaatgct (서열번호 12)	24	tcctaatcac (서열번호 36)
13	attacaacaaac (서열번호 13)	25	actcattatc (서열번호 37)
14	actccattaat (서열번호 14)	26	taaacacacc (서열번호 38)
15	caagactcttaa (서열번호 15)	27	atcattctcc (서열번호 39)
16	ttaaacctctc (서열번호 16)	28	accacaaacc (서열번호 40)
17	caagatccatc (서열번호 17)	29	tcaccagata (서열번호 41)
18	aatgaaacctc (서열번호 18)	30	ttattccaga (서열번호 42)
19	catccatccag (서열번호 19)	31	tccttaactag (서열번호 43)
20	ctgaattcaacc (서열번호 20)	32	tcagatcaac (서열번호 44)
21	ccctacgatatac (서열번호 21)	33	ttccacttagc (서열번호 45)
22	atatattgatag (서열번호 22)	34	ccctaagaga (서열번호 46)
23	ccaatgaaatc (서열번호 23)	35	ttcttagacc (서열번호 47)
24	actctacatcc (서열번호 24)	36	cccttaacaa (서열번호 48)
25		37	ttctccctgca (서열번호 49)
		38	taacaaacaaa (서열번호 50)

[0031]

[0032]

실시양태 (1)(g)는 실시양태 (1)의 성분 및 실시양태 (1)(a)-(e)의 1 또는 그 이상의 부가적인 특징을 포함하고, 여기서 제1 표적화제와 제1 표적화제 상보체 및 제2 표적화제와 제2 표적화제 상보체는 각각이 상보성 올리고뉴클레오티드 쌍을 포함한다. 이러한 특정 예에서, 제1 및 제2 결합 시약은 각각이 항체일 수 있다. 또한, 이러한 특정 예에서, 제1 및 제2 결합 도메인의 각각 위에 위치한 상보성 올리고뉴클레오티드 쌍은 상이하고, 다음에서 선택된다:

항목	서열	항목	서열
1	acatcagaaatt (서열번호 1)	12	caatctaaacc (서열번호 23)
2	aaactacagatg (서열번호 2)	13	acttcaactc (서열번호 24)
3	aaagaagatcc (서열번호 3)	14	cgatttagata (서열번호 25)
4	gaattctctc (서열번호 4)	15	tatctcaacc (서열번호 26)
5	atcattaccacc (서열번호 5)	16	gacataaacca (서열번호 27)
6	aaatcaatgct (서열번호 6)	17	tcctttatct (서열번호 28)
7	attacaacaaac (서열번호 7)	18	gacattatct (서열번호 29)
8	actccattaat (서열번호 8)	19	aaacactaac (서열번호 30)
9	caagactcttaa (서열번호 9)	20	actaattcaca (서열번호 31)
10	ttaaacctctc (서열번호 10)	21	tcctaatcac (서열번호 32)
11	caagatccatc (서열번호 11)	22	gttgatctctc (서열번호 33)
12	aatgaaacctc (서열번호 12)	23	gacagaaacc (서열번호 34)
13	catccatccag (서열번호 13)	24	ttccacttagc (서열번호 35)
14	ctgaattcaacc (서열번호 14)	25	ccctaagaga (서열번호 36)
15	ccctacgatatac (서열번호 15)	26	ttcttagacc (서열번호 37)
16	atatattgatag (서열번호 16)	27	cccttaacaa (서열번호 38)
17	ccaatgaaatc (서열번호 17)	28	ttctccctgca (서열번호 39)
18	actctacatcc (서열번호 18)	29	taacaaacaaa (서열번호 40)

[0033]

[0034]

실시양태 (1)(f) 및/또는 (1)(g)에서, 적어도 7개 결합 도메인, 또는 적어도 10개 결합 도메인; 또는 적어도 16개 결합 도메인; 또는 적어도 25개 결합 도메인이 존재한다.

[0035]

실시양태 (1) 및 (1)(a)에서, 제1 및 제2 상보성 표적화제의 각각은 개별적으로 제1 및 제2 결합 도메인 중 하나에 선택적으로 결합할 수 있다. 예를 들면, 다른 결합 도메인과 상보성 표적화제의 결합에 대한 교차 반응성은 결합 도메인 중 하나와의 결합의 5% 미만이거나; 또는 제3 결합 도메인과 제1 및 제2 상보성 표적화제 각각의 결합에 대한 교차 반응성은 결합 도메인 중 하나와의 결합의 1% 미만이거나; 또는 제3 결합 도메인과 제1 및 제2 상보성 표적화제 각각의 결합에 대한 교차 반응성은 결합 도메인 중 하나와의 결합의 0.5% 미만이거나; 또는 제3 결합 도메인과 제1 및 제2 상보성 표적화제 각각의 결합에 대한 교차 반응성은 결합 도메인 중 하나와의 결합의 0.1% 미만이다.

[0036]

실시양태 (1) 및 (1)(a)에서, 제1 및 제2 결합 시약은 각각 상이한 관심 분석물에 결합하거나 또는 제1 및 제2 결합 시약은 각각 상이한 관심 분석물에 대해서 우선적으로 선택적이다.

[0037]

전술한 실시양태 중 어느 하나의 제1 및 제2 결합 시약은 상이한 관심 분석물에 대한 친화성 및/또는 선택성이 다를 수 있으며, 예를 들면, 제2 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 시약과의 결합의 5% 미만이거나, 또는 제2 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 시약과의 결합의 1% 미만이거나, 또는 제2 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 시약과의 결합의 0.5% 미만이거나, 또는 제2 결합 시약에 대한 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 시약과의 결합의 0.1% 미만이거나, 또는 비특이적 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물과의 결합에 대해 선택된 결합 시약과의 결합의 5% 미만이거나, 또는 비특이적 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물과의 결합에 대해 선택된 결합 시약과의 결합의 1% 미만이거나, 또는 비특이적 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 반응 교차성은 그 분석물과의 결합에 대해 선택된 결합 시약과의 결합의 0.5% 미만이거나, 또는 비특이적 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물과의 결합에 대해 선택된 결합 시약과의 결합의 0.1% 미만이다. 전술한 실시양태의 이러한 특정 예에서 여전히 더, 제2 결합 도메인에 위치한 결합 시약과 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 도메인에 위치하는 결합 시약과의 결합의 5% 미만이거나, 또는 제2 결합 도메인에 위치하는 결합 시약과 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 도메인에 위치하는 결합 시약과의 결합의 1% 미만이거나, 또는 제2 결합 도메인에 위치하는 결합 시약과 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 도메인에 위치하는 결합

시약과의 결합의 0.5%이거나, 또는 제2 결합 도메인에 위치하는 결합 시약과 제1 분석물의 교차 반응성은 제1 결합 도메인에 위치하는 결합 시약과의 결합의 0.1% 미만이거나, 또는 비특이적 결합 도메인에 위치하는 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물에 대해 지정된 결합 도메인 내 결합 시약과의 결합의 5% 미만이거나, 또는 비특이적 결합 도메인에 위치하는 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물에 대해 지정된 결합 도메인 내 결합 시약과의 결합의 1% 미만이거나, 또는 비특이적 결합 도메인에 위치하는 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물에 대해 지정된 결합 도메인 내 결합 시약과의 결합의 0.5% 미만이거나, 또는 비특이적 결합 도메인에 위치하는 결합 시약에 대한 관심 분석물의 관찰된 교차 반응성은 그 분석물에 대해 지정된 결합 도메인 내 결합 시약과의 결합의 0.1% 미만이다.

[0038] 실시양태 (1) 및 (1)(a)에서, 제1 및 제2 표적화제과 제1 및 제2 표적화제 상보체는 각각이 결합 시약 세트의 결합 도메인 세트에 대해 맵핑하는데 사용될 수 있고 세트 내 결합 시약 각각은 상이한 관심 분석물에 결합한다. 예를 들면, 세트 내 결합 시약 각각은 상이한 관심 분석물에 대해 우선적으로 선택적이거나, 또는 세트 내 결합 시약 각각은 상이한 관심 분석물에 대한 친화성 및/또는 선택성이 상이하다.

[0039] 실시양태 (2): 하기에서 선택된 올리고뉴클레오티드:

acatcagagt (지열번호 1)	tatctcaacc (지열번호 26)
aactccatct (지열번호 2)	cttaaacgca (지열번호 27)
acatccactt (지열번호 3)	taagattatg (지열번호 28)
caactagacc (지열번호 4)	ctttctgac (지열번호 29)
agaaagatcc (지열번호 5)	atcccaaaa (지열번호 30)
agatctctct (지열번호 6)	acataaaca (지열번호 31)
agcttcagca (지열번호 7)	tcctttatg (지열번호 32)
tcactgaact (지열번호 8)	gcatatctt (지열번호 33)
atcaaatagc (지열번호 9)	agaactatg (지열번호 34)
acatctcat (지열번호 10)	actaatca (지열번호 35)
atctaacac (지열번호 11)	tgatgattac (지열번호 36)
agatgaact (지열번호 12)	agctatctta (지열번호 37)
attaacagac (지열번호 13)	taaacagacc (지열번호 38)
gtctccatatt (지열번호 14)	attgattctg (지열번호 39)
caagctttaa (지열번호 15)	gacagatcac (지열번호 40)
ttaagacctg (지열번호 16)	taccagata (지열번호 41)
caatctcat (지열번호 17)	tatttcagta (지열번호 42)
aatgaacctc (지열번호 18)	tgattactta (지열번호 43)
ctctcaatcc (지열번호 19)	ccaatcaga (지열번호 44)
ctaatagatg (지열번호 20)	ttccactaac (지열번호 45)
ctcagatata (지열번호 21)	ccctaaagaa (지열번호 46)
gtatctcaga (지열번호 22)	ttctctaac (지열번호 47)
caatctagac (지열번호 23)	gacctaacaa (지열번호 48)
actctacctg (지열번호 24)	tttccctacta (지열번호 49)
caatttgaat (지열번호 25)	taacaaagaa (지열번호 50)

[0040]

[0041] 실시양태 (3): 하기에서 선택된 올리고뉴클레오티드:

번호	시열	번호	시열
1	acatcagagt (지열번호 1)	12	caatctagac (지열번호 23)
2	aactccatct (지열번호 2)	13	actctacctg (지열번호 24)
3	agaaagatcc (지열번호 5)	14	caatttgaat (지열번호 25)
4	agatctctct (지열번호 6)	15	tatctcaacc (지열번호 26)
5	atctaacacc (지열번호 11)	16	gacataagca (지열번호 31)
6	agatgaact (지열번호 12)	17	tcctttatg (지열번호 32)
7	attaacagac (지열번호 13)	18	gcatatctt (지열번호 33)
8	gtctccatatt (지열번호 14)	19	agaactatg (지열번호 34)
9	caagctttaa (지열번호 15)	20	actaatca (지열번호 35)
10	ttaagacctg (지열번호 16)	21	tgatgattac (지열번호 36)
11	caatctcat (지열번호 17)	22	attgattctg (지열번호 39)
12	aatgaacctc (지열번호 18)	23	gacagatcac (지열번호 40)
13	ctctcaatcc (지열번호 19)	24	ttccactaac (지열번호 45)
14	ctaatagatg (지열번호 20)	25	ccctaaagaa (지열번호 46)
15	ctcagatata (지열번호 21)	26	ttctctaac (지열번호 47)
16	gtatctcaga (지열번호 22)	27	gacctaacaa (지열번호 48)
17	caatctagac (지열번호 23)	28	tttccctacta (지열번호 49)
18	actctacctg (지열번호 24)	29	taacaaagaa (지열번호 50)
19	caatttgaat (지열번호 25)		

[0042]

[0043] 실시양태 (4): 각각 하기에서 선택된 상이한 서열을 포함하는, 적어도 4 올리고뉴클레오티드를 별도의 바이알에 포함하는, 키트:

acatcagagt (지열번호 1)	tatctcaacc (지열번호 26)
aactccatct (지열번호 2)	cttaaacgca (지열번호 27)
acatccactt (지열번호 3)	taagattatg (지열번호 28)
caactagacc (지열번호 4)	ctttctgac (지열번호 29)
agaaagatcc (지열번호 5)	atcccaaaa (지열번호 30)
agatctctct (지열번호 6)	acataaaca (지열번호 31)
agcttcagca (지열번호 7)	tcctttatg (지열번호 32)
tcactgaact (지열번호 8)	gcatatctt (지열번호 33)
atcaaatagc (지열번호 9)	agaactatg (지열번호 34)
acatctcat (지열번호 10)	actaatca (지열번호 35)
atctaacac (지열번호 11)	tgatgattac (지열번호 36)
agatgaact (지열번호 12)	agctatctta (지열번호 37)
attaacagac (지열번호 13)	taaacagacc (지열번호 38)
gtctccatatt (지열번호 14)	attgattctg (지열번호 39)
caagctttaa (지열번호 15)	gacagatcac (지열번호 40)
ttaagacctg (지열번호 16)	taccagata (지열번호 41)
caatctcat (지열번호 17)	tatttcagta (지열번호 42)
aatgaacctc (지열번호 18)	tgattactta (지열번호 43)
ctctcaatcc (지열번호 19)	ccaatcaga (지열번호 44)
ctaatagatg (지열번호 20)	ttccactaac (지열번호 45)
ctcagatata (지열번호 21)	ccctaaagaa (지열번호 46)
gtatctcaga (지열번호 22)	ttctctaac (지열번호 47)
caatctagac (지열번호 23)	gacctaacaa (지열번호 48)
actctacctg (지열번호 24)	tttccctacta (지열번호 49)
caatttgaat (지열번호 25)	taacaaagaa (지열번호 50)

[0044]

[0045] 실시양태 (5): 각각 하기에서 선택된 상이한 서열을 포함하는, 적어도 4 올리고뉴클레오티드를, 개별 바이알에 포함하는, 키트:

번호	서열	번호	서열
1	acatccagatt (서열번호 1)	12	caaatatagat (서열번호 23)
	aactaccatct (서열번호 2)		actttacatcc (서열번호 24)
3	aaagaaatcc (서열번호 5)	13	cgatttagaca (서열번호 25)
	agttttttctt (서열번호 6)		tatttcaaacg (서열번호 26)
6	atcattaccac (서열번호 11)	16	gacataaacga (서열번호 31)
	gatataaat (서열번호 12)		tgattttatct (서열번호 32)
7	attaacaaac (서열번호 13)	17	acctaatctct (서열번호 33)
	gttcccttaat (서열번호 14)		agaactatag (서열번호 34)
8	caaaactctaa (서열번호 15)	18	actaatcaaca (서열번호 35)
	ttaagactctg (서열번호 16)		tgtgaattag (서열번호 36)
9	caagttccat (서열번호 17)	20	atctttctatc (서열번호 39)
	aaagcaactg (서열번호 18)		gacgaatcac (서열번호 40)
11	ctctaccatcc (서열번호 21)	23	ttccacttaaac (서열번호 45)
	atatacatag (서열번호 22)		ccctaatgaaa (서열번호 46)
		25	tttcccttacta (서열번호 49)
			taacaaaaaa (서열번호 50)

[0046]

[0047]

실시양태 (4) 및 (5)의 키트에서, 이 키트는 적어도 7개 올리고뉴클레오티드, 또는 적어도 10개 올리고뉴클레오티드, 또는 적어도 16개 올리고뉴클레오티드, 또는 적어도 25개 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 이들 특별한 실시양태의 올리고뉴클레오티드 각각은 바이오틴, 스트렙타비딘, 아비딘, 아미노 기, 티올 기, 알데히드 기, 히드라지드 기, 아지드 기, 알킨 기, 말레이미드 기 또는 요오도아세트아미드 기를 포함하는 연결체에 의해 개질될 수 있다. 실시양태 (4) 및 (5)의 다른 특정 예에서, 적어도 4개 올리고뉴클레오티드 각각은 상이한 항체에 커플링될 수 있고, 경우에 따라, 각각의 상이한 서열은 적어도 4개 올리고뉴클레오티드의 추가적인 상이한 서열의 상보체가 아니다.

[0048]

실시양태 (6): 각각이 하기에서 선택된 상이한 서열을 포함하는, 적어도 4개 올리고뉴클레오티드를 포함하는 혼합물로서, 여기서 상이한 서열 각각은 상이한 항체에 커플링되는 것인 혼합물:

acatccagatt (서열번호 1)	tatttcaaacg (서열번호 26)
aactaccatct (서열번호 2)	cttcaaacgca (서열번호 27)
acatcccaatt (서열번호 3)	taccatttag (서열번호 28)
caactaaatct (서열번호 4)	ctttctagac (서열번호 29)
aaagaaatcc (서열번호 5)	atcccaaacag (서열번호 30)
agttttttctt (서열번호 6)	gacataaacga (서열번호 31)
agtttcaatgca (서열번호 7)	tccgtttatct (서열번호 32)
tccactaacct (서열번호 8)	gctaatgctct (서열번호 33)
atcaagttacc (서열번호 9)	aaagacttag (서열번호 34)
acatctctat (서열번호 10)	actaatcaaca (서열번호 35)
atcattaccac (서열번호 11)	tgtgaattag (서열번호 36)
gatataaat (서열번호 12)	agttttatct (서열번호 37)
attaacaaac (서열번호 13)	taaacacacc (서열번호 38)
gttcccttaat (서열번호 14)	gttatttctg (서열번호 39)
caaaactctaa (서열번호 15)	gacgaatcac (서열번호 40)
ttaagactctg (서열번호 16)	taccagaata (서열번호 41)
caagttccat (서열번호 17)	tatttcaaacg (서열번호 42)
aaagcaactg (서열번호 18)	tgttacttag (서열번호 43)
ctctaccatcc (서열번호 19)	caagactaac (서열번호 44)
ctaaatagat (서열번호 20)	ttccacttaaac (서열번호 45)
ctctaccatcc (서열번호 21)	ccctaatgaaa (서열번호 46)
atatacatag (서열번호 22)	tatttcaaacg (서열번호 47)
caagtttagat (서열번호 23)	acctaatctct (서열번호 48)
acttttagat (서열번호 24)	tttcccttacta (서열번호 49)
caagtttagat (서열번호 25)	taacaaaaaa (서열번호 50)

[0049]

[0050]

실시양태 (7): 각각이 하기에서 선택된 상이한 서열을 포함하는, 적어도 4개 올리고뉴클레오티드를 포함하는 혼합물로서, 여기서 상이한 서열 각각은 상이한 항체에 커플링되는 것인 혼합물:

번호	서열	번호	서열
1	acatccagatt (서열번호 1)	12	caaatatagat (서열번호 23)
	aactaccatct (서열번호 2)		actttacatcc (서열번호 24)
3	aaagaaatcc (서열번호 5)	13	cgatttagaca (서열번호 25)
	agttttttctt (서열번호 6)		tatttcaaacg (서열번호 26)
6	atcattaccac (서열번호 11)	16	gacataaacga (서열번호 31)
	gatataaat (서열번호 12)		tgattttatct (서열번호 32)
7	attaacaaac (서열번호 13)	17	acctaatctct (서열번호 33)
	gttcccttaat (서열번호 14)		agaactatag (서열번호 34)
8	caaaactctaa (서열번호 15)	18	actaatcaaca (서열번호 35)
	ttaagactctg (서열번호 16)		tgtgaattag (서열번호 36)
9	caagttccat (서열번호 17)	20	atctttctatc (서열번호 39)
	aaagcaactg (서열번호 18)		gacgaatcac (서열번호 40)
11	ctctaccatcc (서열번호 21)	23	ttccacttaaac (서열번호 45)
	atatacatag (서열번호 22)		ccctaatgaaa (서열번호 46)
		25	tttcccttacta (서열번호 49)
			taacaaaaaa (서열번호 50)

[0051]

[0052]

실시양태 (6) 및 (7)에서, 혼합물은 적어도 7개 올리고뉴클레오티드, 또는 적어도 10개 올리고뉴클레오티드; 또는 적어도 16개 올리고뉴클레오티드; 또는 적어도 25개 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 실시양태 (6) 및 (7)의 특정 실시예에서, 각각의 상이한 서열은 적어도 4개 올리고뉴클레오티드의 추가적인 상이한 서열의 상보체가 아니다.

[0053]

실시양태 (8): 복수의 적어도 4개 결합 도메인을 포함하는 어레이로서, 여기서 하나 또는 그 이상의, 경우에 따라 각각의 결합 도메인은 하기에서 선택된 상이한 올리고뉴클레오티드 서열이 그위에 고정화된다:

acatccagttg (서열번호 1)	tatctcaaccg (서열번호 26)
aactaccgat (서열번호 2)	cttacaagcca (서열번호 27)
acatccagttg (서열번호 3)	tgcattatagz (서열번호 28)
caactgagact (서열번호 4)	ctttctgacac (서열번호 29)
aaaaaaatcc (서열번호 5)	atcccaaaaag (서열번호 30)
agatcttctct (서열번호 6)	acataaaacac (서열번호 31)
agattccagta (서열번호 7)	tcactttatgc (서열번호 32)
tgcactgaact (서열번호 8)	gccatgatctc (서열번호 33)
atcaggatagc (서열번호 9)	aaagactatgc (서열번호 34)
gatctctgat (서열번호 10)	gctaattacca (서열번호 35)
atcattaccac (서열번호 11)	tgtgasttagc (서열번호 36)
atctaatgat (서열번호 12)	gctctatitca (서열번호 37)
attaacaaaac (서열번호 13)	taaaacagacc (서열번호 38)
atctccatgaa (서열번호 14)	atgaattatgc (서열번호 39)
caaaagttaa (서열번호 15)	acaaatgac (서열번호 40)
ttaagaccttg (서열번호 16)	taccagaataa (서열번호 41)
caastctcat (서열번호 17)	ttaattcaata (서열번호 42)
aaataaccctc (서열번호 18)	tacttaacttga (서열번호 43)
catccaaatccg (서열번호 19)	ccaaatcaaga (서열번호 44)
ctgaatagatg (서열번호 20)	ttaacttaagg (서열번호 45)
ctcagatatac (서열번호 21)	ccctaagtgaa (서열번호 46)
gatatactgag (서열번호 22)	ttaattcaagc (서열번호 47)
caaatatagat (서열번호 23)	gcaataaaca (서열번호 48)
actctaacatcc (서열번호 24)	tttcccttacta (서열번호 49)
caattatgata (서열번호 25)	tacaagaaaa (서열번호 50)

[0054]

[0055]

실시양태 (9): 복수의 적어도 4개 결합 도메인을 포함하는 어레이로서, 여기서 하나 또는 그 이상의, 경우에 따라, 각각의 결합 도메인은 하기에서 선택된 상이한 올리고뉴클레오티드 서열이 그위에 고정화된다:

번호	서열	번호	서열
1	acatccagttg (서열번호 1)	12	caaatatagat (서열번호 23)
2	aactaccgat (서열번호 2)	13	actctaacctg (서열번호 24)
3	acatccagttg (서열번호 3)	14	cgatttaataa (서열번호 25)
4	caactgagact (서열번호 4)	15	tatctcaaccg (서열번호 26)
5	aaaaaaatcc (서열번호 5)	16	gacataaagca (서열번호 31)
6	agatcttctct (서열번호 6)	17	tcactttatgc (서열번호 32)
7	agattccagta (서열번호 7)	18	gccatgatctc (서열번호 33)
8	tgcactgaact (서열번호 8)	19	aaagactatgc (서열번호 34)
9	atcaggatagc (서열번호 9)	20	gctaattacca (서열번호 35)
10	gatctctgat (서열번호 10)	21	tgtgasttagc (서열번호 36)
11	atcattaccac (서열번호 11)	22	gctctatitca (서열번호 37)
12	atctaatgat (서열번호 12)	23	gcaataaaca (서열번호 48)
13	attaacaaaac (서열번호 13)	24	tttcccttacta (서열번호 49)
14	atctccatgaa (서열번호 14)	25	tacaagaaaa (서열번호 50)
15	caaaagttaa (서열번호 15)		
16	ttaagaccttg (서열번호 16)		
17	caastctcat (서열번호 17)		
18	aaataaccctc (서열번호 18)		
19	catccaaatccg (서열번호 19)		
20	ctgaatagatg (서열번호 20)		
21	ctcagatatac (서열번호 21)		
22	gatatactgag (서열번호 22)		
23	caaatatagat (서열번호 23)		
24	actctaacatcc (서열번호 24)		
25	caattatgata (서열번호 25)		

[0056]

[0057]

실시양태 (8) 및 (9)에서, 어레이는 적어도 7개 결합 도메인, 또는 적어도 10개 결합 도메인, 또는 적어도 16개 결합 도메인, 또는 적어도 25개 결합 도메인을 포함할 수 있고, 경우에 따라, 각각의 상이한 서열은 적어도 4개 올리고뉴클레오티드의 추가적인 상이한 서열의 상보체가 아니다.

[0058]

실시양태 (10): 플레이트의 적어도 하나의 웰(들) 내에 올리고뉴클레오티드 어레이의 1 이상의 복제물을 갖는 다중웰 플레이트, 상기 어레이는 복수의 결합 도메인 상에 위치되고, 여기서 결합 도메인 중 1 또는 그 이상, 경우에 따라 적어도 4개는 하기에서 선택된 상이한 올리고뉴클레오티드 서열을 그 위에 고정시킨다:

acatccagttg (서열번호 1)	tatctcaaccg (서열번호 26)
aactaccgat (서열번호 2)	cttacaagcca (서열번호 27)
acatccagttg (서열번호 3)	tgcattatagz (서열번호 28)
caactgagact (서열번호 4)	ctttctgacac (서열번호 29)
aaaaaaatcc (서열번호 5)	atcccaaaaag (서열번호 30)
agatcttctct (서열번호 6)	acataaaacac (서열번호 31)
agattccagta (서열번호 7)	tcactttatgc (서열번호 32)
tgcactgaact (서열번호 8)	gccatgatctc (서열번호 33)
atcaggatagc (서열번호 9)	aaagactatgc (서열번호 34)
gatctctgat (서열번호 10)	gctaattacca (서열번호 35)
atcattaccac (서열번호 11)	tgtgasttagc (서열번호 36)
atctaatgat (서열번호 12)	gctctatitca (서열번호 37)
attaacaaaac (서열번호 13)	taaaacagacc (서열번호 38)
atctccatgaa (서열번호 14)	atgaattatgc (서열번호 39)
caaaagttaa (서열번호 15)	acaaatgac (서열번호 40)
ttaagaccttg (서열번호 16)	taccagaataa (서열번호 41)
caastctcat (서열번호 17)	ttaattcaata (서열번호 42)
aaataaccctc (서열번호 18)	tacttaacttga (서열번호 43)
catccaaatccg (서열번호 19)	ccaaatcaaga (서열번호 44)
ctgaatagatg (서열번호 20)	ttaacttaagg (서열번호 45)
ctcagatatac (서열번호 21)	ccctaagtgaa (서열번호 46)
gatatactgag (서열번호 22)	ttaattcaagc (서열번호 47)
caaatatagat (서열번호 23)	gcaataaaca (서열번호 48)
actctaacatcc (서열번호 24)	tttcccttacta (서열번호 49)
caattatgata (서열번호 25)	tacaagaaaa (서열번호 50)

[0059]

[0060]

실시양태 (11): 플레이트의 적어도 한 웰(들) 내에 올리고뉴클레오티드 어레이의 1 이상의 복제물을 구비한 다중웰 플레이트로서, 어레이는 복수의 결합 도메인 상에 위치하고, 여기서 결합 도메인 중 1 또는 그 이상, 경우에 따라, 적어도 4개는 하기에서 선택된 상이한 올리고뉴클레오티드 서열을 그 위에 고정시킨다:

항	서열	항	서열
1	acatcgaggtt (서열번호 1)	12	caatataaat (서열번호 23)
	aactaccatgt (서열번호 2)		actttacatg (서열번호 24)
3	agagaagctc (서열번호 5)	13	cgattttagata (서열번호 25)
	agctctttctct (서열번호 6)		tatctcaaacg (서열번호 26)
6	atcattaccac (서열번호 11)	16	gacataaacga (서열번호 31)
	gctaatatgt (서열번호 12)		tcgttttatc (서열번호 32)
7	ataaagaaac (서열번호 13)	17	gcataatctct (서열번호 33)
	gtctccattat (서열번호 14)		aaaacctaac (서열번호 34)
8	caaaagctctaa (서열번호 15)	18	gctaatcaaca (서열번호 35)
	ttaagaccttg (서열번호 16)		tgtgaaatag (서열번호 36)
9	caagatccatc (서열번호 17)	20	gttaattctac (서열번호 39)
	aaataacactg (서열번호 18)		gacaaataac (서열번호 40)
11	ctcacgatac (서열번호 21)	23	ttccacttaag (서열번호 45)
	atatatcataag (서열번호 22)		ccctaataaaa (서열번호 46)
		25	tttcccttacta (서열번호 49)
			taacaaaaaa (서열번호 50)

[0061]

[0062]

실시양태 (10) 및 (11)의 플레이트는 적어도 24 웰, 또는 적어도 96 웰, 또는 적어도 384 웰을 포함하고/하거나, 경우에 따라, 어레이는 적어도 7개 올리고뉴클레오티드, 또는 적어도 10개 올리고뉴클레오티드, 또는 적어도 16개 올리고뉴클레오티드, 또는 적어도 25개 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 경우에 따라, 각각의 상이한 서열은 적어도 4개 올리고뉴클레오티드의 추가적인 상이한 서열의 상보체가 아니다.

[0063]

실시양태 (12): 1 이상의 바이알에 적어도 4개 미세입자 시약의 세트를 포함하는 키트로서, 여기서 세트의 미세입자 시약 각각은 하기에서 선택된 상이한 올리고뉴클레오티드 서열이 그 위해 고정화되는 미세입자를 포함하는 것인 키트:

acatcgaggtt (서열번호 1)	tatctcaaacg (서열번호 26)
aactaccatgt (서열번호 2)	cttaacaagca (서열번호 27)
acatccagctg (서열번호 3)	tggcattaaa (서열번호 28)
caactcaagctc (서열번호 4)	ctttctagcac (서열번호 29)
aaaaaagctc (서열번호 5)	atcacaaaaa (서열번호 30)
aaatctttctc (서열번호 6)	gacataaaaa (서열번호 31)
aaatctcaaca (서열번호 7)	tcgttttatc (서열번호 32)
tgcattgaactc (서열번호 8)	gcataatctct (서열번호 33)
atcaggatagc (서열번호 9)	aaaacctaac (서열번호 34)
gcatcttgat (서열번호 10)	gctaatcaaca (서열번호 35)
atcattaccac (서열번호 11)	tgtgaaatag (서열번호 36)
gctaatatgt (서열번호 12)	gctaatatctc (서열번호 37)
ataaagaaac (서열번호 13)	tcaaacagacc (서열번호 38)
gtctccattat (서열번호 14)	atcattctctc (서열번호 39)
caaaagctctaa (서열번호 15)	gacaaataac (서열번호 40)
ttaagaccttg (서열번호 16)	taccgaaatac (서열번호 41)
caagatccatc (서열번호 17)	ttaattcagata (서열번호 42)
aaataacactg (서열번호 18)	tacttaactta (서열번호 43)
ctcacgatac (서열번호 19)	ccaagtcaaga (서열번호 44)
ctaaatagata (서열번호 20)	ttccacttaag (서열번호 45)
ctcacgatac (서열번호 21)	ccctaataaaa (서열번호 46)
atatatcataag (서열번호 22)	tttctcaaac (서열번호 47)
caatataaat (서열번호 23)	accttaaacaa (서열번호 48)
actttacatctc (서열번호 24)	tttcccttacta (서열번호 49)
caattataata (서열번호 25)	taacaaaaaa (서열번호 50)

[0064]

[0065]

실시양태 (13): 1 이상의 바이알에, 적어도 4개 미세입자 시약 세트를 포함하는 키트로서, 여기서 세트의 각 미세입자 시약은 하기에서 선택된 상이한 올리고뉴클레오티드 서열을 그위에 고정시킨 미세입자를 포함한다:

항	서열	항	서열
1	acatcgaggtt (서열번호 1)	12	caatataaat (서열번호 23)
	aactaccatgt (서열번호 2)		actttacatg (서열번호 24)
3	agagaagctc (서열번호 5)	13	cgattttagata (서열번호 25)
	agctctttctct (서열번호 6)		tatctcaaacg (서열번호 26)
6	atcattaccac (서열번호 11)	16	gacataaacga (서열번호 31)
	gctaatatgt (서열번호 12)		tcgttttatc (서열번호 32)
7	ataaagaaac (서열번호 13)	17	gcataatctct (서열번호 33)
	gtctccattat (서열번호 14)		aaaacctaac (서열번호 34)
8	caaaagctctaa (서열번호 15)	18	gctaatcaaca (서열번호 35)
	ttaagaccttg (서열번호 16)		tgtgaaatag (서열번호 36)
9	caagatccatc (서열번호 17)	20	gttaattctac (서열번호 39)
	aaataacactg (서열번호 18)		gacaaataac (서열번호 40)
11	ctcacgatac (서열번호 21)	23	ttccacttaag (서열번호 45)
	atatatcataag (서열번호 22)		ccctaataaaa (서열번호 46)
		25	tttcccttacta (서열번호 49)
			taacaaaaaa (서열번호 50)

[0066]

[0067]

실시양태 (12) 및 (13)의 키트는 적어도 7개 미세입자의 세트, 또는 적어도 10개 미세입자의 세트, 또는 적어도 16개 미세입자의 세트, 또는 적어도 25개 미세입자의 세트를 포함하고/하거나, 경우에 따라, 각각의 상이한 서열은 적어도 4개 올리고뉴클레오티드의 추가적인 상이한 서열의 상보체가 아니다.

[0068]

실시양태 (12) 및 (13)의 미세입자는 암호화될 수 있고, 상이한 미세입자 시약은 상이한 식별 코드를 가질 수 있다.

[0069]

실시양태 (14): 플레이트의 적어도 한 웰(들) 내에 올리고뉴클레오티드 어레이의 1 이상의 복제물을 구비한 다중웰 플레이트를 포함하는 키트로서, 어레이는 복수의 결합 도메인 상에 위치하고, 여기서 결합 도메인 중 하나 또는 그 이상, 경우에 따라, 적어도 4개는 하기에서 선택된 상이한 올리고뉴클레오티드 서열을 그위에 고정시킨, 키트:

acatccgtagtt (지열번호 1)	tatctcaaacg (지열번호 26)
aactaccgatct (지열번호 2)	cttacaagcca (지열번호 27)
acatcccagttc (지열번호 3)	tgcattatagc (지열번호 28)
caactcaaacct (지열번호 4)	ctttctcaaac (지열번호 29)
aaacaagaatcc (지열번호 5)	atcccaaaaag (지열번호 30)
agatctctctct (지열번호 6)	gacataaacac (지열번호 31)
agatccagtagc (지열번호 7)	tcactttatgc (지열번호 32)
tgcactgaacct (지열번호 8)	gccatgctctc (지열번호 33)
atcagagtagc (지열번호 9)	agaactatagc (지열번호 34)
gatctctgat (지열번호 10)	gctaactcaac (지열번호 35)
atcattaccac (지열번호 11)	tgtgacttagc (지열번호 36)
gctctaatgat (지열번호 12)	gctctatttca (지열번호 37)
attaacaaagc (지열번호 13)	tgaacagacc (지열번호 38)
atcccaattaat (지열번호 14)	attgaattgct (지열번호 39)
caagaatttaa (지열번호 15)	gcaaatatagc (지열번호 40)
ttaagacctctg (지열번호 16)	taccagaatac (지열번호 41)
caaatctccat (지열번호 17)	ttaattcaagta (지열번호 42)
aaataaacctca (지열번호 18)	tacttaacttagc (지열번호 43)
catccaatccag (지열번호 19)	ccaactcaaac (지열번호 44)
ctagatagatg (지열번호 20)	tccaactgaagc (지열번호 45)
cctacagatatac (지열번호 21)	ccctaagtaga (지열번호 46)
gatctctcagag (지열번호 22)	ttaattcaagcc (지열번호 47)
caaatctagat (지열번호 23)	gccatcaaac (지열번호 48)
actctcaattcc (지열번호 24)	tttcccttacta (지열번호 49)
caatttaaatga (지열번호 25)	tacaaaaaaga (지열번호 50)

[0070]

[0071]

[0072]

및,

(i) 하기에서 선택된 2 또는 그 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 세트로서, 여기서 성분 (ii)의 올리고뉴클레오티드는 성분 (i)의 올리고뉴클레오티드에 상보적이다:

acatccgtagtt (지열번호 1)	tatctcaaacg (지열번호 26)
aactaccgatct (지열번호 2)	cttacaagcca (지열번호 27)
acatcccagttc (지열번호 3)	tgcattatagc (지열번호 28)
caactcaaacct (지열번호 4)	ctttctcaaac (지열번호 29)
aaacaagaatcc (지열번호 5)	atcccaaaaag (지열번호 30)
agatctctctct (지열번호 6)	gacataaacac (지열번호 31)
agatccagtagc (지열번호 7)	tcactttatgc (지열번호 32)
tgcactgaacct (지열번호 8)	gccatgctctc (지열번호 33)
atcagagtagc (지열번호 9)	agaactatagc (지열번호 34)
gatctctgat (지열번호 10)	gctaactcaac (지열번호 35)
atcattaccac (지열번호 11)	tgtgacttagc (지열번호 36)
gctctaatgat (지열번호 12)	gctctatttca (지열번호 37)
attaacaaagc (지열번호 13)	tgaacagacc (지열번호 38)
atcccaattaat (지열번호 14)	attgaattgct (지열번호 39)
caagaatttaa (지열번호 15)	gcaaatatagc (지열번호 40)
ttaagacctctg (지열번호 16)	taccagaatac (지열번호 41)
caaatctccat (지열번호 17)	ttaattcaagta (지열번호 42)
aaataaacctca (지열번호 18)	tacttaacttagc (지열번호 43)
catccaatccag (지열번호 19)	ccaactcaaac (지열번호 44)
ctagatagatg (지열번호 20)	tccaactgaagc (지열번호 45)
cctacagatatac (지열번호 21)	ccctaagtaga (지열번호 46)
gatctctcagag (지열번호 22)	ttaattcaagcc (지열번호 47)
caaatctagat (지열번호 23)	gccatcaaac (지열번호 48)
actctcaattcc (지열번호 24)	tttcccttacta (지열번호 49)
caatttaaatga (지열번호 25)	tacaaaaaaga (지열번호 50)

[0073]

[0074]

실시양태 (15): 플레이트의 1 이상의 웰(들) 내에 올리고뉴클레오티드 어레이의 1 이상의 복사물을 구비한 다중 웰 플레이트를 포함하는 키트로서, 어레이는 복수의 결합 도메인 상에 위치하고, 여기서 결합 도메인 중 1 이상, 경우에 따라 적어도 4개는 하기에서 선택된 상이한 올리고뉴클레오티드 서열을 그 위에 고정시킨 것인 키트:

번호	서열	번호	서열
1	acatccgtagtt (지열번호 1)	12	caaatatagat (지열번호 23)
	aactaccgatct (지열번호 2)		acttcaattcc (지열번호 24)
3	aaacaagaatcc (지열번호 5)	13	cgatttaaatga (지열번호 25)
	agatctctctct (지열번호 6)		tatctcaaacg (지열번호 26)
6	atcattaccac (지열번호 11)	16	gacataaacag (지열번호 31)
	gctctaatgat (지열번호 12)		tcactttatgc (지열번호 32)
7	attaacaaagc (지열번호 13)	17	gccatgctctc (지열번호 33)
	atcccaattaat (지열번호 14)		agaactatagc (지열번호 34)
8	caagaatttaa (지열번호 15)	18	gctaactcaac (지열번호 35)
	ttaagacctctg (지열번호 16)		tgtgacttagc (지열번호 36)
9	caaatctccat (지열번호 17)	20	gctctatttca (지열번호 39)
	aaataaacctca (지열번호 18)		gcaaatatagc (지열번호 40)
11	catccaatccag (지열번호 21)	23	tccaactgaagc (지열번호 45)
	gatctctcagag (지열번호 22)		ccctaagtaga (지열번호 46)
		25	tttcccttacta (지열번호 49)
			tacaaaaaaga (지열번호 50)

[0075]

[0076]

[0077]

및

(i) 하기에서 선택된 2 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 세트로서, 여기서 성분 (ii)의 올리고뉴클레오티드는 성분 (i)의 올리고뉴클레오티드에 상보적이다:

영	지열	영	지열
1	acactcggagtt (지열번호 1)	12	ccattatagat (지열번호 23)
	aaactccactatc (지열번호 2)		actttatcatc (지열번호 24)
3	agaaaagatcc (지열번호 5)	13	cgatttcagatc (지열번호 25)
	gactctctctc (지열번호 6)		tatctcaaac (지열번호 26)
6	atcattaccac (지열번호 11)	16	gacataaacgc (지열번호 31)
	gctatgatgat (지열번호 12)		tcgctttatc (지열번호 32)
7	ataacgaaac (지열번호 13)	17	gcctagctctc (지열번호 33)
	gtccctattat (지열번호 14)		aaaacctaac (지열번호 34)
8	caagctcttaa (지열번호 15)	18	gctaatcaaca (지열번호 35)
	ttaaagctctc (지열번호 16)		tgatgatgac (지열번호 36)
9	caagctccatc (지열번호 17)	20	gttatctctc (지열번호 39)
	aaataacactc (지열번호 18)		acaaatcac (지열번호 40)
11	ctctacgatac (지열번호 21)	23	ttccactaagc (지열번호 45)
	atatacataga (지열번호 22)		ccctaataaaa (지열번호 46)
		25	tttccctgata (지열번호 49)
			taacaaaaaa (지열번호 50)

[0078]

[0079]

실시양태 (16): 복수의 분석물에 대해 결합 어세이를 수행하는 방법으로서, (a) 제1 결합 시약에 결합된 제1 분석물 및 제2 결합 시약에 결합된 제2 분석물을 포함하는 복합체를 형성하도록 개별적으로 복수 분석물 중 제1 및 제2 분석물에 각각 결합된 적어도 제1 및 제2 결합 시약에 연결된 2 이상의 결합 도메인과 샘플을 접촉시키는 단계로서, 여기서 (x) 제1 결합 도메인은 (i) 제1 결합 도메인 및 제1 표적화제 상보체에 결합된 제1 표적화제; 및 (ii) 연결 복합체를 통해서 제1 표적화제 상보체에 결합된 제1 결합 시약을 포함하는 제1 결합 시약 복합체를 포함하고; (y) 제2 결합 도메인은 (i) 제2 결합 도메인 및 제2 표적화제 상보체에 결합된 제2 표적화제; 및 (ii) 연결 복합체를 통해서 제2 표적화제 상보체에 결합된 제2 결합 시약을 포함하는 제2 결합 시약 복합체를 포함하는 것인 단계;

[0080]

(b) 제2 분석물 또는 제1 분석물을 포함하는 복합체에 결합된 제1 검출 시약, 및 제2 분석물 또는 제2 분석물을 포함하는 복합체에 결합된 제2 검출 시약을 포함하는 복수의 검출 시약과 제1 및 제2 결합 시약을 접촉시키는 단계; 및 (c) 2 이상의 결합 도메인에 결합된 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

[0081]

실시양태 (16)에서, 하기 특징 중 1 이상을 채택할 수 있다: 제1 및 제2 결합 시약은 각각이, 개별적으로 제1 및 제2 분석물에 결합할 수 있는 수용체, 리간드, 항체, 합텐, 항원, 에피토프, 미미토프, 압타머, 또는 인터칼레이터를 포함하며, 예를 들어 제1 및 제2 결합 시약 각각은, 개별적으로 제1 및 제2 분석물에 결합할 수 있는 항체를 포함한다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드 및 상보성 올리고뉴클레오티드, 수용체-리간드 쌍, 항원-항체 쌍, 합텐-항체 쌍, 에피토프-항체 쌍, 미미토프-항체 쌍, 압타머-표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 또는 인터칼레이터-표적 분자 쌍을 포함한다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드 및 상보성 올리고뉴클레오티드, 수용체-리간드 쌍, 항원-항체 쌍, 합텐-항체 쌍, 에피토프-항체 쌍, 미미토프-항체 쌍, 압타머-표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 또는 인터칼레이터-표적 분자 쌍을 포함한다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 각각 올리고뉴클레오티드 및 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함하거나; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 각각 올리고뉴클레오티드 및 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함한다; 연결 복합체는 그에 연결된 연결제 및 보조 연결제를 포함하고, 예를 들면, 연결 복합체는 (a) 티올기와 말레이미드 또는 요오도아세트아미드; (b) 알데히드와 히드라지드; 또는 (c) 알킨과 아지드 사이의 결합 상호작용에 의해 형성된다; 또는 (a) 연결제는 바이오틴이고 보조 연결제는 스트렙타비딘 또는 아비딘이거나; (b) 연결제는 스트렙타비딘 또는 아비딘이고 보조 연결제는 바이오틴이거나; (c) 연결제는 펩티드이고 보조 연결제는 항펩티드 항체이거나; 또는 (d) 연결제는 항펩티드 항체이고 보조 연결제는 펩티드이다.

[0082]

또한, 실시양태 (16)은 하기 특징 중 1 이상을 경우에 따라 포함할 수 있다: 복수의 검출 시약 각각은 검출가능한 표지를 포함한다; 복수의 검출 시약의 서브세트는 검출가능한 표지를 포함한다; 측정 단계는 광학 흡광도, 형광, 인광, 화학발광, 전기화학발광, 광산란, 또는 자성을 통한 샘플 내 검출가능한 표지의 존재의 측정을 포함한다; 검출가능한 표지는 전기화학발광성 표지이고, 측정 단계는 전기화학발광성 신호를 측정하는 단계와 그 신호와 샘플 내 분석물의 양을 상호관련시키는 단계를 포함하고, 예를 들면, 2 이상의 결합 도메인은 전극 상에 위치하며, 측정 단계는 전극에 전압 과형을 인가하여 전기화학 발광을 생성시키는 단계를 더 포함하고, 경우에 따라, 2 이상의 결합 도메인은 다중웰 플레이트 중 1 이상 내에 위치한다.

[0083]

실시양태 (16)은 샌드위치 면역어세이 또는 경쟁적 면역어세이를 수행하는 단계를 포함할 수 있다.

[0084]

실시양태 (16)에서, 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함할 수 있으며, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영 #	지열 (5'-3')	영 #	지열 (5'-3')
1	acatcgaggt (지열번호 1)	13	cggttagata (지열번호 25)
2	aaactaccgat (지열번호 2)	14	tatctcaaac (지열번호 26)
3	aaacaaagctc (지열번호 3)	15	ctttctcaac (지열번호 27)
4	aaactaacctc (지열번호 4)	16	gacataagca (지열번호 28)
5	aaacaaagctc (지열번호 5)	17	gacataagca (지열번호 29)
6	aaactaacctc (지열번호 6)	18	gacataagca (지열번호 30)
7	aaactaacctc (지열번호 7)	19	gacataagca (지열번호 31)
8	aaactaacctc (지열번호 8)	20	gacataagca (지열번호 32)
9	aaactaacctc (지열번호 9)	21	gacataagca (지열번호 33)
10	aaactaacctc (지열번호 10)	22	gacataagca (지열번호 34)
11	aaactaacctc (지열번호 11)	23	gacataagca (지열번호 35)
12	aaactaacctc (지열번호 12)	24	gacataagca (지열번호 36)
13	aaactaacctc (지열번호 13)	25	gacataagca (지열번호 37)
14	aaactaacctc (지열번호 14)	26	gacataagca (지열번호 38)
15	aaactaacctc (지열번호 15)	27	gacataagca (지열번호 39)
16	aaactaacctc (지열번호 16)	28	gacataagca (지열번호 40)
17	aaactaacctc (지열번호 17)	29	gacataagca (지열번호 41)
18	aaactaacctc (지열번호 18)	30	gacataagca (지열번호 42)
19	aaactaacctc (지열번호 19)	31	gacataagca (지열번호 43)
20	aaactaacctc (지열번호 20)	32	gacataagca (지열번호 44)
21	aaactaacctc (지열번호 21)	33	gacataagca (지열번호 45)
22	aaactaacctc (지열번호 22)	34	gacataagca (지열번호 46)
23	aaactaacctc (지열번호 23)	35	gacataagca (지열번호 47)
24	aaactaacctc (지열번호 24)	36	gacataagca (지열번호 48)
25	aaactaacctc (지열번호 25)	37	gacataagca (지열번호 49)
26	aaactaacctc (지열번호 26)	38	gacataagca (지열번호 50)

[0085]

[0086]

또한, 실시양태 (16)에서, 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함할 수 있고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영	지열	영	지열
1	acatcgaggt (지열번호 1)	12	caaatagat (지열번호 23)
2	aaactaccgat (지열번호 2)	13	acttacatc (지열번호 24)
3	aaacaaagctc (지열번호 3)	14	cggttagata (지열번호 25)
4	aaactaacctc (지열번호 4)	15	tatctcaaac (지열번호 26)
5	aaacaaagctc (지열번호 5)	16	gacataagca (지열번호 27)
6	aaactaacctc (지열번호 6)	17	gacataagca (지열번호 28)
7	aaactaacctc (지열번호 7)	18	gacataagca (지열번호 29)
8	aaactaacctc (지열번호 8)	19	gacataagca (지열번호 30)
9	aaactaacctc (지열번호 9)	20	gacataagca (지열번호 31)
10	aaactaacctc (지열번호 10)	21	gacataagca (지열번호 32)
11	aaactaacctc (지열번호 11)	22	gacataagca (지열번호 33)
12	aaactaacctc (지열번호 12)	23	gacataagca (지열번호 34)
13	aaactaacctc (지열번호 13)	24	gacataagca (지열번호 35)
14	aaactaacctc (지열번호 14)	25	gacataagca (지열번호 36)
15	aaactaacctc (지열번호 15)	26	gacataagca (지열번호 37)
16	aaactaacctc (지열번호 16)	27	gacataagca (지열번호 38)
17	aaactaacctc (지열번호 17)	28	gacataagca (지열번호 39)
18	aaactaacctc (지열번호 18)	29	gacataagca (지열번호 40)
19	aaactaacctc (지열번호 19)	30	gacataagca (지열번호 41)
20	aaactaacctc (지열번호 20)	31	gacataagca (지열번호 42)
21	aaactaacctc (지열번호 21)	32	gacataagca (지열번호 43)
22	aaactaacctc (지열번호 22)	33	gacataagca (지열번호 44)
23	aaactaacctc (지열번호 23)	34	gacataagca (지열번호 45)
24	aaactaacctc (지열번호 24)	35	gacataagca (지열번호 46)
25	aaactaacctc (지열번호 25)	36	gacataagca (지열번호 47)
26	aaactaacctc (지열번호 26)	37	gacataagca (지열번호 48)
27	aaactaacctc (지열번호 27)	38	gacataagca (지열번호 49)
28	aaactaacctc (지열번호 28)	39	gacataagca (지열번호 50)

[0087]

[0088]

실시양태 (16)의 일례에서, 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함할 수 있고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영 #	지열 (5'-3')	영 #	지열 (5'-3')
1	acatcgaggt (지열번호 1)	13	cggttagata (지열번호 25)
2	aaactaccgat (지열번호 2)	14	tatctcaaac (지열번호 26)
3	aaacaaagctc (지열번호 3)	15	ctttctcaac (지열번호 27)
4	aaactaacctc (지열번호 4)	16	gacataagca (지열번호 28)
5	aaacaaagctc (지열번호 5)	17	gacataagca (지열번호 29)
6	aaactaacctc (지열번호 6)	18	gacataagca (지열번호 30)
7	aaactaacctc (지열번호 7)	19	gacataagca (지열번호 31)
8	aaactaacctc (지열번호 8)	20	gacataagca (지열번호 32)
9	aaactaacctc (지열번호 9)	21	gacataagca (지열번호 33)
10	aaactaacctc (지열번호 10)	22	gacataagca (지열번호 34)
11	aaactaacctc (지열번호 11)	23	gacataagca (지열번호 35)
12	aaactaacctc (지열번호 12)	24	gacataagca (지열번호 36)
13	aaactaacctc (지열번호 13)	25	gacataagca (지열번호 37)
14	aaactaacctc (지열번호 14)	26	gacataagca (지열번호 38)
15	aaactaacctc (지열번호 15)	27	gacataagca (지열번호 39)
16	aaactaacctc (지열번호 16)	28	gacataagca (지열번호 40)
17	aaactaacctc (지열번호 17)	29	gacataagca (지열번호 41)
18	aaactaacctc (지열번호 18)	30	gacataagca (지열번호 42)
19	aaactaacctc (지열번호 19)	31	gacataagca (지열번호 43)
20	aaactaacctc (지열번호 20)	32	gacataagca (지열번호 44)
21	aaactaacctc (지열번호 21)	33	gacataagca (지열번호 45)
22	aaactaacctc (지열번호 22)	34	gacataagca (지열번호 46)
23	aaactaacctc (지열번호 23)	35	gacataagca (지열번호 47)
24	aaactaacctc (지열번호 24)	36	gacataagca (지열번호 48)
25	aaactaacctc (지열번호 25)	37	gacataagca (지열번호 49)
26	aaactaacctc (지열번호 26)	38	gacataagca (지열번호 50)

[0089]

[0090]

실시양태 (16)의 추가 예에서, 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함할 수 있고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영	지열	영	지열
1	acatcgaggt (지열번호 1)	12	caaatagat (지열번호 23)
2	aaactaccgat (지열번호 2)	13	acttacatc (지열번호 24)
3	aaacaaagctc (지열번호 3)	14	cggttagata (지열번호 25)
4	aaactaacctc (지열번호 4)	15	tatctcaaac (지열번호 26)
5	aaacaaagctc (지열번호 5)	16	gacataagca (지열번호 27)
6	aaactaacctc (지열번호 6)	17	gacataagca (지열번호 28)
7	aaactaacctc (지열번호 7)	18	gacataagca (지열번호 29)
8	aaactaacctc (지열번호 8)	19	gacataagca (지열번호 30)
9	aaactaacctc (지열번호 9)	20	gacataagca (지열번호 31)
10	aaactaacctc (지열번호 10)	21	gacataagca (지열번호 32)
11	aaactaacctc (지열번호 11)	22	gacataagca (지열번호 33)
12	aaactaacctc (지열번호 12)	23	gacataagca (지열번호 34)
13	aaactaacctc (지열번호 13)	24	gacataagca (지열번호 35)
14	aaactaacctc (지열번호 14)	25	gacataagca (지열번호 36)
15	aaactaacctc (지열번호 15)	26	gacataagca (지열번호 37)
16	aaactaacctc (지열번호 16)	27	gacataagca (지열번호 38)
17	aaactaacctc (지열번호 17)	28	gacataagca (지열번호 39)
18	aaactaacctc (지열번호 18)	29	gacataagca (지열번호 40)
19	aaactaacctc (지열번호 19)	30	gacataagca (지열번호 41)
20	aaactaacctc (지열번호 20)	31	gacataagca (지열번호 42)
21	aaactaacctc (지열번호 21)	32	gacataagca (지열번호 43)
22	aaactaacctc (지열번호 22)	33	gacataagca (지열번호 44)
23	aaactaacctc (지열번호 23)	34	gacataagca (지열번호 45)
24	aaactaacctc (지열번호 24)	35	gacataagca (지열번호 46)
25	aaactaacctc (지열번호 25)	36	gacataagca (지열번호 47)
26	aaactaacctc (지열번호 26)	37	gacataagca (지열번호 48)
27	aaactaacctc (지열번호 27)	38	gacataagca (지열번호 49)
28	aaactaacctc (지열번호 28)	39	gacataagca (지열번호 50)

[0091]

[0092]

실시양태 (16)은 다음의 성분 중 1 이상을 포함할 수 있다: 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 개별적으로 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드는 각각 대략 10 내지 50 염기를 포함한다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 개별적으로 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드는 각각 대략 10 내지 25 염기를 포함한다; 제1 결합 시약은 바이오틴 분자를 포함하는 항체이고, 제1 표적화제는 스트렙타비딘 분자를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드이며, 연결 복합체는 바

이오틴 스트렙타비딘 분자 간 반응에 의해 형성된다; 및/또는 제2 결합 시약은 추가의 바이오틴 분자를 포함하는 항체이고, 제2 표적화제는 추가의 스트렙타비딘 분자를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드이고, 연결 복합체는 추가의 바이오틴과 추가의 스트렙타비딘 분자 간 반응에 의해 형성된다.

[0093] 실시양태 (17): 복수의 분석물에 대해 결합 어세이를 수행하는 방법으로서, (a) 복수의 분석물 중 제1 분석물에 대해 특이적인 제1 결합 시약 및 제1 표적화제를 포함하는 제1 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 제1 결합 시약은 연결제에 결합되고 제1 표적화제는 보조 연결제에 결합되며, 이때 제1 결합 시약 복합체는 연결제와 보조 연결제 사이의 반응에 의해 형성되는 것인 단계; (b) 복수의 분석물 중 제2 분석물에 특이적인 제2 결합 시약 및 제2 표적화제를 포함하는 제2 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 제2 결합 시약은 제2 연결제에 결합되고 제2 표적화제는 제2 연결제 상보체에 결합되며 이때 제2 결합 시약 복합체는 제2 연결제와 연결제 상보체 사이의 반응에 의해 형성되는 것인 단계; (c) 제1 표적화제를 제1 표적화제 상보체에 결합시키고 제2 표적화제를 제2 표적화제 상보체에 결합시키기에 충분한 조건 하에서, 개별적으로 제1 표적화제 상보체 및 제2 표적화제 상보체에 각각 연결된 2 이상의 결합 도메인과 제1 및 제2 결합 시약 복합체를 혼합시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 형성된 혼합물에 복수의 분석물을 포함하는 샘플을 혼합시키는 단계; (e) 단계 (d)에서 형성된 혼합물에 복수의 추가적인 결합 시약을 부가하는 단계로서, 여기서 복수의 추가적인 결합 시약은 (i) 제1 분석물 및/또는 제1 결합 시약-제1 분석물 복합체에 특이적인 제1 검출 시약; 및 (ii) 제2 분석물 및/또는 제2 결합 시약-제2 분석물 복합체에 특이적인 제2 검출 시약을 포함하는 것인 단계; 및 (f) 결합 도메인에 결합된 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계를 포함한다.

[0094] 실시양태 (17)은 다음의 특징 중 1 이상을 포함할 수 있다: 제1 및 제2 결합 시약 각각은 개별적으로 제1 및 제2 분석물에 결합할 수 있는 수용체, 리간드, 항체, 합텐, 항원, 에피토프, 미미토프, 압타머, 또는 인터칼레이터를 포함하고, 예를 들면, 제1 및 제2 결합 시약은 각각 개별적으로 제1 및 제2 분석물에 결합할 수 있는 항체를 포함한다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드 및 상보성 올리고뉴클레오타이드, 수용체-리간드 쌍, 항원-항체 쌍, 합텐-항체 쌍, 항원-항체 쌍, 에피토프-항체 쌍, 미미토프-항체 쌍, 압타머-표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 또는 인터칼레이터-표적 분자 쌍을 포함한다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드 및 상보성 올리고뉴클레오타이드, 수용체-리간드 쌍, 항원-항체 쌍, 합텐-항체 쌍, 항원-항체 쌍, 에피토프-항체 쌍, 미미토프-항체 쌍, 압타머-표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 또는 인터칼레이터-표적 분자 쌍을 포함한다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드 및 상보성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드 및 상보성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다; 연결 복합체는 연결제 및 그에 연결된 보조 연결제를 포함하며, 예를 들면, 연결 복합체는 (a) 티올기와 말레이미드 또는 요오도아세트아미드; (b) 알데히드와 히드라지드; 또는 (c) 알킨과 아지드 사이의 결합 상호작용에 의해 형성된다; (a) 연결제는 바이오틴이고 보조 연결제는 스트렙타비딘 또는 아비딘이거나; (b) 연결제는 스트렙타비딘 또는 아비딘이고 보조 연결제는 바이오틴이거나; (c) 연결제는 펩티드이고 보조 연결제는 항펩티드 항체이거나; 또는 (d) 연결제는 항펩티드 항체이고 보조 연결제는 펩티드이다.

[0095] 또한, 실시양태 (17)은 다음의 특징 중 1 이상을 더 포함할 수 있다: 복수의 검출 시약 각각은 검출가능한 표적을 포함하며, 예를 들어 복수의 검출 시약의 서브세트는 검출가능한 표지를 포함한다; 측정 단계는 광학 흡광도, 형광, 인광, 화학발광, 전기화학발광, 광산란, 또는 자성을 통해 샘플 내 검출가능한 표지의 존재를 측정하는 단계를 포함한다; 검출가능한 표지는 전기화학발광성 표지이고 측정 단계는 전기화학발광성 신호를 측정하는 단계 및 그 신호와 샘플 중 분석물의 양을 상호관련시키는 단계를 포함한다; 2 이상의 결합 도메인은 전극 상에 위치하고 측정 단계는 전극에 전압 파형을 인가하여 전기화학발광을 생성시키는 단계를 더 포함하고, 예를 들면 2 이상의 결합 도메인은 다중웰 플레이트의 1 이상의 웰 내에 위치한다.

[0096] 실시양태 (17)은 샌드위치 면역어세이 또는 경쟁적 면역어세이를 수행하는 단계를 포함할 수 있다.

[0097] 실시양태 (17)에서, 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드의 쌍을 포함하고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영 #	서열 (5'-3')	영 #	서열 (5'-3')
1	acatcgtagt (서열번호 1)	13	cggttagata (서열번호 25)
2	aaactaccat (서열번호 2)	14	tatctcaaac (서열번호 26)
3	acgtcccaatt (서열번호 3)	15	ctttctaacg (서열번호 27)
4	caactcaaac (서열번호 4)	16	gacataaacg (서열번호 28)
5	aaasaaatcc (서열번호 5)	17	ctttctaacg (서열번호 29)
6	aaattttttt (서열번호 6)	18	atcccaaacg (서열번호 30)
7	agtttagtca (서열번호 7)	19	gacataaacg (서열번호 31)
8	taactaaact (서열번호 8)	20	tcgtttatgc (서열번호 32)
9	atcagatgac (서열번호 9)	21	gacataaacg (서열번호 33)
10	aaattatgat (서열번호 10)	22	aaactaacgc (서열번호 34)
11	atcattaccg (서열번호 11)	23	atcattaccg (서열번호 35)
12	aaataaat (서열번호 12)	24	taactaatgc (서열번호 36)
13	atcaaacgac (서열번호 13)	25	gacataaacg (서열번호 37)
14	gtccctaat (서열번호 14)	26	taaacacgac (서열번호 38)
15	caagatctaa (서열번호 15)	27	gtttatctgc (서열번호 39)
16	ttaaacctta (서열번호 16)	28	gacataaacg (서열번호 40)
17	caagatctaa (서열번호 17)	29	taaacacgac (서열번호 41)
18	aaataaacct (서열번호 18)	30	ttattcaaac (서열번호 42)
19	taacaaacgc (서열번호 19)	31	taactaatgc (서열번호 43)
20	ttcaatctaa (서열번호 20)	32	taaacacgac (서열번호 44)
21	ctcagatctaa (서열번호 21)	33	ttccctaacg (서열번호 45)
22	gttatctaat (서열번호 22)	34	ccctaataac (서열번호 46)
23	caaatatgat (서열번호 23)	35	tttttagaac (서열번호 47)
24	atctaatctc (서열번호 24)	36	aaactaacgc (서열번호 48)
25		37	tttcttctca (서열번호 49)
		38	taaacacgac (서열번호 50)

[0098]

[0099]

실시양태 (17)의 특정 예에서, 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함하고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영	서열	영	서열
1	acatcgtagt (서열번호 1)	12	caaatatgat (서열번호 23)
2	aaactaccat (서열번호 2)	13	acttaccatg (서열번호 24)
3	aaasaaatcc (서열번호 3)	14	cggttagata (서열번호 25)
4	aaattttttt (서열번호 4)	15	tatctcaaac (서열번호 26)
5	atcattaccg (서열번호 5)	16	gacataaacg (서열번호 27)
6	aaataaat (서열번호 6)	17	tcgtttatgc (서열번호 28)
7	atcaaacgac (서열번호 7)	18	gacataaacg (서열번호 29)
8	gtccctaat (서열번호 8)	19	aaactaacgc (서열번호 30)
9	caagatctaa (서열번호 9)	20	atcattaccg (서열번호 31)
10	ttaaacctta (서열번호 10)	21	taactaatgc (서열번호 32)
11	caagatctaa (서열번호 11)	22	taaacacgac (서열번호 33)
12	aaataaacct (서열번호 12)	23	ttccctaacg (서열번호 34)
13	taacaaacgc (서열번호 13)	24	ccctaataac (서열번호 35)
14	ctcagatctaa (서열번호 14)	25	tttttagaac (서열번호 36)
15	gttatctaat (서열번호 15)	26	aaactaacgc (서열번호 37)
16	caaatatgat (서열번호 16)	27	tttcttctca (서열번호 38)
17	atctaatctc (서열번호 17)	28	taaacacgac (서열번호 39)
18	aaataaacct (서열번호 18)	29	taaacacgac (서열번호 40)
19	taacaaacgc (서열번호 19)	30	ttccctaacg (서열번호 41)
20	ctcagatctaa (서열번호 20)	31	ccctaataac (서열번호 42)
21	gttatctaat (서열번호 21)	32	tttttagaac (서열번호 43)
22	caaatatgat (서열번호 22)	33	aaactaacgc (서열번호 44)
23	atctaatctc (서열번호 23)	34	tttcttctca (서열번호 45)
24		35	taaacacgac (서열번호 46)
25		36	taaacacgac (서열번호 47)
		37	ttccctaacg (서열번호 48)
		38	ccctaataac (서열번호 49)
		39	tttttagaac (서열번호 50)

[0100]

[0101]

실시양태 (17)의 추가예에서, 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함하고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영 #	서열 (5'-3')	영 #	서열 (5'-3')
1	acatcgtagt (서열번호 1)	13	cggttagata (서열번호 25)
2	aaactaccat (서열번호 2)	14	tatctcaaac (서열번호 26)
3	acgtcccaatt (서열번호 3)	15	ctttctaacg (서열번호 27)
4	caactcaaac (서열번호 4)	16	gacataaacg (서열번호 28)
5	aaasaaatcc (서열번호 5)	17	ctttctaacg (서열번호 29)
6	aaattttttt (서열번호 6)	18	atcccaaacg (서열번호 30)
7	agtttagtca (서열번호 7)	19	gacataaacg (서열번호 31)
8	taactaaact (서열번호 8)	20	tcgtttatgc (서열번호 32)
9	atcagatgac (서열번호 9)	21	gacataaacg (서열번호 33)
10	aaattatgat (서열번호 10)	22	aaactaacgc (서열번호 34)
11	atcattaccg (서열번호 11)	23	atcattaccg (서열번호 35)
12	aaataaat (서열번호 12)	24	taactaatgc (서열번호 36)
13	atcaaacgac (서열번호 13)	25	gacataaacg (서열번호 37)
14	gtccctaat (서열번호 14)	26	taaacacgac (서열번호 38)
15	caagatctaa (서열번호 15)	27	gtttatctgc (서열번호 39)
16	ttaaacctta (서열번호 16)	28	gacataaacg (서열번호 40)
17	caagatctaa (서열번호 17)	29	taaacacgac (서열번호 41)
18	aaataaacct (서열번호 18)	30	ttattcaaac (서열번호 42)
19	taacaaacgc (서열번호 19)	31	taactaatgc (서열번호 43)
20	ttcaatctaa (서열번호 20)	32	taaacacgac (서열번호 44)
21	ctcagatctaa (서열번호 21)	33	ttccctaacg (서열번호 45)
22	gttatctaat (서열번호 22)	34	ccctaataac (서열번호 46)
23	caaatatgat (서열번호 23)	35	tttttagaac (서열번호 47)
24	atctaatctc (서열번호 24)	36	aaactaacgc (서열번호 48)
25		37	tttcttctca (서열번호 49)
		38	taaacacgac (서열번호 50)

[0102]

[0103]

실시양태 (17)의 추가예에서, 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함하고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영	서열	영	서열
1	acatcgtagt (서열번호 1)	12	caaatatgat (서열번호 23)
2	aaactaccat (서열번호 2)	13	acttaccatg (서열번호 24)
3	aaasaaatcc (서열번호 3)	14	cggttagata (서열번호 25)
4	aaattttttt (서열번호 4)	15	tatctcaaac (서열번호 26)
5	atcattaccg (서열번호 5)	16	gacataaacg (서열번호 27)
6	aaataaat (서열번호 6)	17	tcgtttatgc (서열번호 28)
7	atcaaacgac (서열번호 7)	18	gacataaacg (서열번호 29)
8	gtccctaat (서열번호 8)	19	aaactaacgc (서열번호 30)
9	caagatctaa (서열번호 9)	20	atcattaccg (서열번호 31)
10	ttaaacctta (서열번호 10)	21	taactaatgc (서열번호 32)
11	caagatctaa (서열번호 11)	22	taaacacgac (서열번호 33)
12	aaataaacct (서열번호 12)	23	ttccctaacg (서열번호 34)
13	taacaaacgc (서열번호 13)	24	ccctaataac (서열번호 35)
14	ctcagatctaa (서열번호 14)	25	tttttagaac (서열번호 36)
15	gttatctaat (서열번호 15)	26	aaactaacgc (서열번호 37)
16	caaatatgat (서열번호 16)	27	tttcttctca (서열번호 38)
17	atctaatctc (서열번호 17)	28	taaacacgac (서열번호 39)
18	aaataaacct (서열번호 18)	29	taaacacgac (서열번호 40)
19	taacaaacgc (서열번호 19)	30	ttccctaacg (서열번호 41)
20	ctcagatctaa (서열번호 20)	31	ccctaataac (서열번호 42)
21	gttatctaat (서열번호 21)	32	tttttagaac (서열번호 43)
22	caaatatgat (서열번호 22)	33	aaactaacgc (서열번호 44)
23	atctaatctc (서열번호 23)	34	tttcttctca (서열번호 45)
24		35	taaacacgac (서열번호 46)
25		36	taaacacgac (서열번호 47)
		37	ttccctaacg (서열번호 48)
		38	ccctaataac (서열번호 49)
		39	tttttagaac (서열번호 50)

[0104]

[0105]

실시양태 (17)은 다음의 성분 중 1 이상을 포함할 수 있다: 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 개별적으로 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드는 각각 대략 10 내지 50 염기를 포함한다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 개별적으로 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드는 각각 대략 10 내지 25 염기를 포함한다; 제1 결합 시약은 바이오틴 분자를 포함하는 항체이고 제1 표적화제는 스트렙타비딘 분자를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 연결 복합체는

바이오틴과 스트렙타비딘 분자 사이의 반응에 의해 형성된다; 제2 결합 시약은 추가의 바이오틴 분자를 포함하는 항체이고 제2 표적화제는 추가의 스트렙타비딘 분자를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하며 연결 복합체는 추가의 바이오틴과 추가의 스트렙타비딘 분자 사이의 반응에 의해 형성된다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 개별적으로 제2 올리고뉴클레오타이드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오타이드는 각각 대략 10 내지 50 염기를 포함한다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 개별적으로 제2 올리고뉴클레오타이드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오타이드는 각각 대략 10 내지 25 염기를 포함한다; 제2 결합 시약은 바이오틴 분자를 포함하는 항체이고, 제2 표적화제는 스트렙타비딘 분자를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 연결 복합체는 바이오틴과 스트렙타비딘 사이의 반응에 의해 형성된다; 및/또는 상기 방법은 혼합 단계 (d) 전에 단계 (c)에서 형성된 혼합물을 세척하는 단계를 더 포함한다.

[0106] 실시양태 (18): 샘플 내 복수의 분석물에 대해 결합 어세이를 수행하는 방법으로서, (a) 복수의 분석물 중 제1 분석물에 특이적인 제1 결합 시약 및 제1 표적화제를 포함하는 제1 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 제1 결합 시약은 연결체에 결합되고 제1 표적화제는 보조 연결체에 결합되며 이때 제1 결합 시약 복합체는 연결체와 보조 연결체 사이의 반응에 의해 형성되는 것인 단계; (b) 복수의 분석물 중 제2 분석물에 특이적인 제2 결합 시약 및 제2 표적화제를 포함하는 제2 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 제2 결합 시약은 제2 연결체에 결합되고 제2 표적화제는 제2 연결체 상보체에 결합되며 이때 제2 결합 시약 복합체는 제2 연결체와 제2 연결체 상보체 사이의 반응에 의해 형성되는 것인 단계; (c) 제1 표적화제를 제1 표적화제 상보체와 결합시키고 제2 표적화제를 제2 표적화제 상보체에 결합시키기에 충분한 조건 하에서, 개별적으로 제2 표적화제 상보체 및 제2 표적화제 상보체에 각각 연결된 2 이상의 결합 도메인과 제1 및 제2 결합 시약 복합체 및 샘플을 혼합시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 형성된 혼합물에 복수의 추가적인 결합 시약을 부가하는 단계로서, 여기서 복수의 추가적인 결합 시약은 (i) 제1 분석물 및/또는 제1 결합 시약-제1 분석물 복합체에 특이적인 제1 검출 시약; 및 (ii) 제2 분석물 및/또는 제2 결합 시약-제2 분석물 복합체에 특이적인 제2 검출 시약을 포함하는 것인 단계; 및 (e) 결합 도메인에 결합된 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계를 포함한다.

[0107] 또한, 실시양태 (18)는 다음 중 1 이상을 포함할 수 있다: 제1 및 제2 결합 시약 각각은 개별적으로 제1 및 제2 분석물에 결합할 수 있는 수용체, 리간드, 항체, 합텐, 항원, 에피토프, 미미토프, 압타머, 또는 인터칼레이터를 포함한다; 제1 및 제2 결합 시약 각각은 개별적으로 제1 및 제2 분석물에 결합할 수 있는 항체를 포함한다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드 및 상보성 올리고뉴클레오타이드, 수용체-리간드 쌍, 항원-항체 쌍, 합텐-항체 쌍, 항원-항체 쌍, 에피토프-항체 쌍, 미미토프-항체 쌍, 압타머-표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 또는 인터칼레이터-표적 분자 쌍을 포함한다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드 및 상보성 올리고뉴클레오타이드, 수용체-리간드 쌍, 항원-항체 쌍, 합텐-항체 쌍, 항원-항체 쌍, 에피토프-항체 쌍, 미미토프-항체 쌍, 압타머-표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 또는 인터칼레이터-표적 분자 쌍을 포함한다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드 및 상보성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드 및 상보성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다; 연결 복합체는 연결체 및 그에 연결된 보조 연결체를 포함하며, 예를 들어 연결 복합체는 (a) 티올기와 말레이미드 또는 요오도아세트아미드; (b) 알데히드와 히드라지드; 또는 (c) 알킨과 아지드 사이의 결합 상호작용에 의해 형성된다; 예를 들면, (a) 연결체는 바이오틴이고 보조 연결체는 스트렙타비딘 또는 아비딘이다; (b) 연결체는 스트렙타비딘 또는 아비딘이고 보조 연결체는 바이오틴이다; (c) 연결체는 펩티드이고 보조 연결체는 항펩티드 항체이다; 또는 (d) 연결체는 항펩티드 항체이고 보조 연결체는 펩티드이다.

[0108] 여전히 더욱, 실시양태 (18)은 다음 중 1 이상을 포함할 수 있다: 복수의 검출 시약 각각은 검출가능한 표지를 포함한다; 복수의 검출 시약은 검출가능한 표지를 포함한다: 측정 단계는 광학 흡광도, 형광, 인광, 화학발광, 전기화학발광, 광산란, 또는 자성을 통해서 샘플 내 검출가능한 표지의 존재를 측정하는 단계를 포함한다; 검출가능한 표지는 전기화학발광성 표지이고 측정 단계는 전기화학발광성 신호를 측정하는 단계 및 그 신호와 샘플 내 분석물의 양을 상관관계시키는 단계를 포함한다; 2 이상의 결합 도메인은 전극 상에 위치하고 측정 단계는 전극에 전압 과형을 인가하여 전기화학발광을 생성시키는 단계를 더 포함한다; 및/또는 2 이상의 결합 도메인은 다중웰 플레이트의 1 이상의 웰 내에 위치한다.

[0109] 실시양태 (18)는 샌드위치 면역어세이 또는 경쟁적 면역어세이를 수행하는 단계를 포함할 수 있다.

[0110] 실시양태 (18)의 특정 예에서, 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드의 쌍을 포함하고, 여기서 이러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영 #	지열 (5'-3')	영 #	지열 (5'-3')
1	acatcgtagt (지열번호 1)	13	cggttagata (지열번호 25)
2	aaactaccat (지열번호 2)	14	tatctcaaac (지열번호 26)
3	acgtcccaat (지열번호 3)	15	ctttctaacg (지열번호 27)
4	caactcaaac (지열번호 4)	16	gacatcaacc (지열번호 28)
5	aaasaaatcc (지열번호 5)	17	ctttctaacg (지열번호 29)
6	aaattttttt (지열번호 6)	18	cttcccaaaa (지열번호 30)
7	agtttagtca (지열번호 7)	19	gacataaccg (지열번호 31)
8	tcactcaact (지열번호 8)	20	tcgtttatgc (지열번호 32)
9	atcagptacc (지열번호 9)	21	acctatctct (지열번호 33)
10	acatcagatg (지열번호 10)	22	aaactataga (지열번호 34)
11	atcattaccg (지열번호 11)	23	actaattacc (지열번호 35)
12	aatatgat (지열번호 12)	24	tactaatagc (지열번호 36)
13	atcaaacacc (지열번호 13)	25	gcatatttca (지열번호 37)
14	gtccctaat (지열번호 14)	26	taaacaccgc (지열번호 38)
15	caagatctaa (지열번호 15)	27	gttatctcgc (지열번호 39)
16	ttaaacctta (지열번호 16)	28	gacatctacc (지열번호 40)
17	caagttccat (지열번호 17)	29	taccagataa (지열번호 41)
18	aaataaccct (지열번호 18)	30	ttattcaaat (지열번호 42)
19	atcccaaccg (지열번호 19)	31	tacttacttg (지열번호 43)
20	ttcaatagat (지열번호 20)	32	ctaacctacc (지열번호 44)
21	ctccagatag (지열번호 21)	33	ttcccttacc (지열번호 45)
22	gttatctagg (지열번호 22)	34	ccctaataaa (지열번호 46)
23	caaatatgat (지열번호 23)	35	ttctcttacc (지열번호 47)
24	actcaatctc (지열번호 24)	36	acctaaacca (지열번호 48)
		37	tttctcttca (지열번호 49)
		38	taacaaaaaa (지열번호 50)

[0111]

[0112]

실시양태 (18)의 다른 예에서, 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함하고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영	지열	영	지열
1	acatcgtagt (지열번호 1)	12	caaatatgat (지열번호 23)
2	aaactaccat (지열번호 2)	13	acttaccatg (지열번호 24)
3	aaasaaatcc (지열번호 3)	14	cggttagata (지열번호 25)
4	aaattttttt (지열번호 4)	15	tatctcaaac (지열번호 26)
5	atcattaccg (지열번호 5)	16	gacatcaacc (지열번호 27)
6	aatatgat (지열번호 6)	17	ctttctaacg (지열번호 28)
7	atcaaacacc (지열번호 7)	18	cttcccaaaa (지열번호 29)
8	gtccctaat (지열번호 8)	19	gacataaccg (지열번호 30)
9	caagatctaa (지열번호 9)	20	tcgtttatgc (지열번호 31)
10	ttaaacctta (지열번호 10)	21	acctatctct (지열번호 32)
11	caagttccat (지열번호 11)	22	aaactataga (지열번호 33)
12	aaataaccct (지열번호 12)	23	actaattacc (지열번호 34)
13	atcccaaccg (지열번호 13)	24	tactaatagc (지열번호 35)
14	ttcaatagat (지열번호 14)	25	gcatatttca (지열번호 36)
15	ctccagatag (지열번호 15)	26	taaacaccgc (지열번호 37)
16	gttatctagg (지열번호 16)	27	gttatctcgc (지열번호 38)
17	caaatatgat (지열번호 17)	28	gacatctacc (지열번호 39)
18	actcaatctc (지열번호 18)	29	taccagataa (지열번호 40)
19	ttctcttacc (지열번호 19)	30	ttattcaaat (지열번호 41)
20	acctaaacca (지열번호 20)	31	tacttacttg (지열번호 42)
21	tttctcttca (지열번호 21)	32	ctaacctacc (지열번호 43)
22	taacaaaaaa (지열번호 22)	33	ttcccttacc (지열번호 44)
		34	ccctaataaa (지열번호 45)
		35	ttctcttacc (지열번호 46)
		36	taacaaaaaa (지열번호 47)

[0113]

[0114]

실시양태 (18)의 또 다른 예에서, 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함하고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영 #	지열 (5'-3')	영 #	지열 (5'-3')
1	acatcgtagt (지열번호 1)	13	cggttagata (지열번호 25)
2	aaactaccat (지열번호 2)	14	tatctcaaac (지열번호 26)
3	acgtcccaat (지열번호 3)	15	ctttctaacg (지열번호 27)
4	caactcaaac (지열번호 4)	16	gacatcaacc (지열번호 28)
5	aaasaaatcc (지열번호 5)	17	ctttctaacg (지열번호 29)
6	aaattttttt (지열번호 6)	18	cttcccaaaa (지열번호 30)
7	agtttagtca (지열번호 7)	19	gacataaccg (지열번호 31)
8	tcactcaact (지열번호 8)	20	tcgtttatgc (지열번호 32)
9	atcagptacc (지열번호 9)	21	acctatctct (지열번호 33)
10	acatcagatg (지열번호 10)	22	aaactataga (지열번호 34)
11	atcattaccg (지열번호 11)	23	actaattacc (지열번호 35)
12	aatatgat (지열번호 12)	24	tactaatagc (지열번호 36)
13	atcaaacacc (지열번호 13)	25	gcatatttca (지열번호 37)
14	gtccctaat (지열번호 14)	26	taaacaccgc (지열번호 38)
15	caagatctaa (지열번호 15)	27	gttatctcgc (지열번호 39)
16	ttaaacctta (지열번호 16)	28	gacatctacc (지열번호 40)
17	caagttccat (지열번호 17)	29	taccagataa (지열번호 41)
18	aaataaccct (지열번호 18)	30	ttattcaaat (지열번호 42)
19	atcccaaccg (지열번호 19)	31	tacttacttg (지열번호 43)
20	ttcaatagat (지열번호 20)	32	ctaacctacc (지열번호 44)
21	ctccagatag (지열번호 21)	33	ttcccttacc (지열번호 45)
22	gttatctagg (지열번호 22)	34	ccctaataaa (지열번호 46)
23	caaatatgat (지열번호 23)	35	ttctcttacc (지열번호 47)
24	actcaatctc (지열번호 24)	36	acctaaacca (지열번호 48)
		37	tttctcttca (지열번호 49)
		38	taacaaaaaa (지열번호 50)

[0115]

[0116]

실시양태 (18)의 추가 예에서, 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함하고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

영	지열	영	지열
1	acatcgtagt (지열번호 1)	12	caaatatgat (지열번호 23)
2	aaactaccat (지열번호 2)	13	acttaccatg (지열번호 24)
3	aaasaaatcc (지열번호 3)	14	cggttagata (지열번호 25)
4	aaattttttt (지열번호 4)	15	tatctcaaac (지열번호 26)
5	atcattaccg (지열번호 5)	16	gacatcaacc (지열번호 27)
6	aatatgat (지열번호 6)	17	ctttctaacg (지열번호 28)
7	atcaaacacc (지열번호 7)	18	cttcccaaaa (지열번호 29)
8	gtccctaat (지열번호 8)	19	gacataaccg (지열번호 30)
9	caagatctaa (지열번호 9)	20	tcgtttatgc (지열번호 31)
10	ttaaacctta (지열번호 10)	21	acctatctct (지열번호 32)
11	caagttccat (지열번호 11)	22	aaactataga (지열번호 33)
12	aaataaccct (지열번호 12)	23	actaattacc (지열번호 34)
13	atcccaaccg (지열번호 13)	24	tactaatagc (지열번호 35)
14	ttcaatagat (지열번호 14)	25	gcatatttca (지열번호 36)
15	ctccagatag (지열번호 15)	26	taaacaccgc (지열번호 37)
16	gttatctagg (지열번호 16)	27	gttatctcgc (지열번호 38)
17	caaatatgat (지열번호 17)	28	gacatctacc (지열번호 39)
18	actcaatctc (지열번호 18)	29	taccagataa (지열번호 40)
19	ttctcttacc (지열번호 19)	30	ttattcaaat (지열번호 41)
20	acctaaacca (지열번호 20)	31	tacttacttg (지열번호 42)
21	tttctcttca (지열번호 21)	32	ctaacctacc (지열번호 43)
22	taacaaaaaa (지열번호 22)	33	ttcccttacc (지열번호 44)
		34	ccctaataaa (지열번호 45)
		35	ttctcttacc (지열번호 46)
		36	taacaaaaaa (지열번호 47)

[0117]

[0118]

실시양태 (18)은 다음 특징 중 1 이상을 포함할 수 있다: 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 개별적으로 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드 각각은 대략 10 내지 50 염기를 포함한다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 개별적으로 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오티드 각각은 대략 10 내지 25 염기를 포함한다; 제1 결합 시약은 바이오틴 분자를 포함하는 항체이고 제1 표적화제는 스트렙타비딘을 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드를 포함하며 연결 복합체는 바이

오틴과 스트랩타비딘 분자 사이의 반응에 의해 형성된다; 제2 결합 시약은 추가의 바이오틴 분자를 포함하는 항체이고 제2 표적화제는 추가의 스트랩타비딘 분자를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하고 연결 복합체는 추가의 바이오틴과 추가의 스트랩타비딘 분자 사이의 반응에 의해 형성된다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 개별적으로 제2 올리고뉴클레오티드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 제2 올리고뉴클레오티드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오티드 각각은 대략 10 내지 50 염기를 포함한다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 개별적으로 제2 올리고뉴클레오티드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 제2 올리고뉴클레오티드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오티드 각각은 대략 10 내지 25 염기를 포함한다; 제2 결합 시약은 바이오틴 분자를 포함하는 항체이고 제2 표적화제는 스트랩타비딘 분자를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하며 연결 복합체는 바이오틴과 스트랩타비딘 분자 사이의 반응에 의해 형성된다; 및/또는 상기 방법은 혼합 단계 (d) 전에 단계 (c)에서 형성된 혼합물을 세척하는 단계를 더 포함한다.

[0119] 실시양태 (19): (a) 개별적으로 각각 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 복수의 개별 결합 도메인을 포함하는 다중웰 플레이트; (b) 별도의 바이알, 용기, 또는 구획내, 연결체에 결합된 제1 올리고뉴클레오티드 상보체 및 제2 연결체에 결합된 제2 올리고뉴클레오티드 상보체를 포함하는 표적화 시약 세트를 포함하는 키트로서, 여기서 (i) 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 올리고뉴클레오티드 상보체는 올리고뉴클레오티드의 제1 쌍을 포함하고, (ii) 제2 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드 상보체는 올리고뉴클레오티드의 제2 쌍을 포함하며, 이때 올리고뉴클레오티드의 제1 및 제2 쌍은 개별적으로, 하기에서 선택되는 것인 키트:

항 #	시열 (5'-3')	항 #	시열 (5'-3')
1	actcggaggt (시열번호 1)	13	cggttgaaat (시열번호 25)
	aactcacatg (시열번호 2)		catctcaaca (시열번호 26)
2	ctctccaattg (시열번호 3)	14	cttacacacg (시열번호 27)
	caactcaactc (시열번호 4)		tcgattataa (시열번호 28)
3	aaacaactc (시열번호 5)	15	ctttctaacg (시열번호 29)
	ggctttttct (시열번호 6)		gtccagaaag (시열번호 30)
4	aggttcagag (시열번호 7)	16	gactcaaacg (시열번호 31)
	tgactaaact (시열번호 8)		tcglttatgc (시열번호 32)
5	atcagagacg (시열번호 9)	17	gcaatgctct (시열번호 33)
	ccatctctat (시열번호 10)		aaacatagc (시열번호 34)
6	atcataccac (시열번호 11)	18	actaatcaac (시열번호 35)
	aatatataat (시열번호 12)		tactcaaacg (시열번호 36)
7	atcacagacg (시열번호 13)	19	gctcatctta (시열번호 37)
	gtccctaat (시열번호 14)		tcaaacacgc (시열번호 38)
8	caagacttta (시열번호 15)	20	gttgctctgc (시열번호 39)
	tttagctctt (시열번호 16)		gcaagatcac (시열번호 40)
9	caagatcaat (시열번호 17)	21	taccagaaat (시열번호 41)
	aatagacact (시열번호 18)		ttatctcaatg (시열번호 42)
10	catccaacag (시열번호 19)	22	tgttgatgga (시열번호 43)
	cttgattagc (시열번호 20)		ccaagtcaag (시열번호 44)
11	ctcaagatac (시열번호 21)	23	ttccacttag (시열번호 45)
	gcttatcaga (시열번호 22)		ccctagagag (시열번호 46)
12	caaatatgat (시열번호 23)	24	ttctctagac (시열번호 47)
	actctactca (시열번호 24)		accataaacg (시열번호 48)
		25	ttctcttacta (시열번호 49)
			taccagaaat (시열번호 50)

[0120] 실시양태 (20): (a) 개별적으로 각각 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 복수의 개별 결합 도메인을 포함하는 다중웰 플레이트; (b) 별도의 바이알, 용기, 또는 구획에, 연결체에 결합된 제1 올리고뉴클레오티드 상보체 및 제2 연결체에 결합된 제2 올리고뉴클레오티드 상보체를 포함하는 표적화 시약의 세트를 포함하는 키트로서, 여기서 (i) 제1 올리고뉴클레오티드 및 제1 올리고뉴클레오티드 상보체는 올리고뉴클레오티드의 제1 쌍을 포함하고, (ii) 제2 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드 상보체는 올리고뉴클레오티드의 제2 쌍을 포함하며, 이때 올리고뉴클레오티드의 제1 및 제2 쌍은 개별적으로, 하기에서 선택되는 것인 키트:

항	시열	항	시열
1	actcggaggt (시열번호 1)	12	caatctagat (시열번호 23)
	aactcacatg (시열번호 2)		actctactca (시열번호 24)
3	aaacaactc (시열번호 5)	13	cgattataa (시열번호 25)
	ggctttttct (시열번호 6)		tactcaaacg (시열번호 26)
6	atcataccac (시열번호 11)	16	gactcaaacg (시열번호 31)
	aatatataat (시열번호 12)		tcglttatgc (시열번호 32)
7	atcacagacg (시열번호 13)	17	gctcatctta (시열번호 33)
	gtccctaat (시열번호 14)		gcaagatcac (시열번호 34)
8	caagacttta (시열번호 15)	18	actaatcaac (시열번호 35)
	tttagctctt (시열번호 16)		tactcaaacg (시열번호 36)
9	caagatcaat (시열번호 17)	20	gttgctctgc (시열번호 39)
	aatagacact (시열번호 18)		gcaagatcac (시열번호 40)
11	ctcaagatac (시열번호 21)	23	ttccacttag (시열번호 45)
	gcttatcaga (시열번호 22)		ccctagagag (시열번호 46)
		25	ttctcttacta (시열번호 49)
			taccagaaat (시열번호 50)

[0122] 실시양태 (19) 및 (20)은 (b) (i) 연결체를 포함하는 제1 결합 시약으로서, 이때 제1 결합 시약은 샘플 내 제1 분석물에 특이적인 제1 결합 시약, (ii) 별도의 용기, 베슬(vessel) 또는 구획에 또는 (b)(i)의 성분으로서 제공된, 보조 연결체를 포함하는 제1 표적화제 상보체, (iii) 제2 연결체를 포함하는 제2 결합 시약으로서, 이때 제2 결합 시약은 샘플 내 제2 분석물에 특이적인 제2 결합 시약, 및 (iv) 별도의 용기, 베슬 또는 구획에 또는 (b)(iii)의 성분으로서 제공된, 제2 연결제 상보체를 포함하는 제2 표적화제 상보체를 포함하는 1 이상의 추가적인 용기, 베슬 또는 구획을 더 포함할 수 있다.

[0124] 실시양태 (21): 샘플 중 복수의 상이한 분석물을 측정하기 위한 키트로서, (a) 고상(고체) 지지체의 제1 영역에 고정화된 제1 표적화제 및 고상 지지체의 제2 영역에 고정화된 제2 표적화제를 고상 지지체 상에 포함하는

용기, 베슬 또는 구획; 및 (b) (i) 연결제를 포함하는 제1 결합 시약으로서, 여기서 제1 결합 시약은 샘플 내 제1 분석물에 대해 특이적인 것인 제1 결합 시약, (ii) 별도의 용기, 베슬 또는 구획에 또는 (b)(i)의 성분으로서 제공되는, 보조 연결제를 포함하는 제1 표적화제 상보체, (iii) 제2 연결제를 포함하는 제2 결합 시약으로서, 여기서 제2 결합 시약은 샘플 중 제2 분석물에 대해 특이적인 제2 결합 시약, 및 (iv) 별도의 용기, 베슬 또는 구획에 또는 (b)(iii)의 성분으로서 제공되는, 제2 연결제 상보체를 포함하는 제2 표적화제 상보체를 포함하는 1 이상의 추가적인 용기, 베슬 또는 구획을 포함하는 것인 키트.

[0125] 실시양태 (22): 샘플 중 복수의 상이한 분석물을 측정하기 위한 키트로서, (a) 고상 지지체의 제1 영역에 고정화된 제1 표적화제 및 고상 지지체의 제2 영역에 고정화된 제2 표적화제를 고상 지지체 상에 포함하는 용기, 베슬 또는 구획; 및 (b) (i) 제1 연결제를 포함하는 제1 결합 시약을 포함하는 제1 용기로서, 여기서 제1 결합 시약은 샘플 내 제2 분석물에 대해 특이적인 제1 용기, (ii) 별도의 용기, 베슬 또는 구획에 제공되는, 보조 연결제를 포함하는 제1 표적화제 상보체를 포함하는 제2 용기, (iii) 제2 연결제를 포함하는 제2 결합 시약을 포함하는 제3 용기로서, 여기서 제2 결합 시약은 샘플 내 제2 분석물에 특이적인 제3 용기, 및 (iv) 별도의 용기, 베슬 또는 구획에 제공되는, 제2 연결제 상보체를 포함하는 제2 표적화제 상보체를 포함하는 제4 용기를 포함하는 4 이상의 추가적인 용기, 베슬 또는 구획을 포함하는 것인 키트.

[0126] 실시양태 (23): 샘플 중 복수의 상이한 분석물을 측정하기 위한 키트로서, (a) 고상 지지체의 제1 영역에 고정화된 제1 표적화제 및 고상 지지체의 제2 영역에 고정화된 제2 표적화제를 고상 지지체 상에 포함하는 용기, 베슬 또는 구획; 및 (b) (i) 제1 연결제를 포함하는 제1 결합 시약을 포함하는 제1 용기로서, 여기서 제1 결합 시약은 샘플 내 제1 분석물에 대해 특이적인 제1 용기, 및 (ii) 제2 연결제를 포함하는 제2 결합 시약으로서, 여기서 제2 결합 시약은 샘플 내 제2 분석물에 대해 특이적인 결합 시약, 및 연결제 상보체를 포함하는 제2 표적화제 상보체를 포함하는 용기를 포함하는 2 이상의 추가적인 용기, 베슬 또는 구획을 포함하는 것인 키트.

[0127] 실시양태 (24): (a) 개별적으로 각각 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 복수의 개별 결합 도메인을 포함하는 다중웰 플레이트로서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 각각은 하기에서 선택된다:

서열 (5'-3')
acatcctagtt (서열번호 1)
aacacacatct (서열번호 2)
agctccagttc (서열번호 3)
caactaacact (서열번호 4)
aaagaaatctc (서열번호 5)
aaactctctct (서열번호 6)
agctcaatgac (서열번호 7)
aacctaacact (서열번호 8)
accagatagtc (서열번호 9)
accatctactt (서열번호 10)
atcattaccac (서열번호 11)
atagaaatgat (서열번호 12)
atcaaacacac (서열번호 13)
atcccaatatt (서열번호 14)
caagatcttat (서열번호 15)
ttaaacctctc (서열번호 16)
caagatctctc (서열번호 17)
aaagaaacttc (서열번호 18)
ctcccaatctac (서열번호 19)
ctaaatagatc (서열번호 20)
ctccagatctc (서열번호 21)
gtatgctagtc (서열번호 22)
caaatgaaact (서열번호 23)
atctctacttc (서열번호 24)
caatttaata (서열번호 25)
tatctaacacc (서열번호 26)
cttacaacaca (서열번호 27)
tggctcttacc (서열번호 28)
ttttctctctc (서열번호 29)
atcccaaacac (서열번호 30)
acatcaaacca (서열번호 31)
tggctttatct (서열번호 32)
gcaatgctctc (서열번호 33)
aaagactatgc (서열번호 34)
gtaattctaca (서열번호 35)
tactaaatgac (서열번호 36)

gctatctttaa (서열번호 37)
ttaacctgacc (서열번호 38)
attatctctc (서열번호 39)
aaacaaatcac (서열번호 40)
taccatpaaa (서열번호 41)
ttatctagata (서열번호 42)
tacttactctc (서열번호 43)
caaaatcaaaa (서열번호 44)
ttccacttagc (서열번호 45)
ctctaaagaaa (서열번호 46)
ttgcttaagcc (서열번호 47)
gocctaaagaa (서열번호 48)
ttctctctact (서열번호 49)
taccaaagaaa (서열번호 50)

[0129] [0130] 실시양태 (24)의 키트는 다음의 서열 중 1 이상을 포함할 수 있다:

서열	서열
acatcctagtt (서열번호 1)	caaatgaaact (서열번호 23)
aacacacatct (서열번호 2)	atctctacttc (서열번호 24)
aaagaaatctc (서열번호 5)	caaatgaaact (서열번호 25)
aaactctctct (서열번호 6)	tatctaacacc (서열번호 26)
agctcaatgac (서열번호 7)	aaccaaacaga (서열번호 31)
aacctaacact (서열번호 8)	tggctttatct (서열번호 32)
accagatagtc (서열번호 9)	aaacaaatcac (서열번호 40)
accatctactt (서열번호 10)	ttccacttagc (서열번호 45)
atcattaccac (서열번호 11)	ctctaaagaaa (서열번호 46)
atagaaatgat (서열번호 12)	ttgcttaagcc (서열번호 47)
atcaaacacac (서열번호 13)	gocctaaagaa (서열번호 48)
atcccaatatt (서열번호 14)	ttctctctact (서열번호 49)
caagatcttat (서열번호 15)	taccaaagaaa (서열번호 50)
ttaaacctctc (서열번호 16)	
caagatctctc (서열번호 17)	
aaagaaacttc (서열번호 18)	
ctcccaatctac (서열번호 19)	
ctaaatagatc (서열번호 20)	
ctccagatctc (서열번호 21)	
gtatgctagtc (서열번호 22)	
caaatgaaact (서열번호 23)	
atctctacttc (서열번호 24)	
caatttaata (서열번호 25)	
tatctaacacc (서열번호 26)	
cttacaacaca (서열번호 27)	
tggctcttacc (서열번호 28)	
ttttctctctc (서열번호 29)	
atcccaaacac (서열번호 30)	
acatcaaacca (서열번호 31)	
tggctttatct (서열번호 32)	
gcaatgctctc (서열번호 33)	
aaagactatgc (서열번호 34)	
gtaattctaca (서열번호 35)	
tactaaatgac (서열번호 36)	
gctatctttaa (서열번호 37)	
ttaacctgacc (서열번호 38)	
attatctctc (서열번호 39)	
aaacaaatcac (서열번호 40)	
taccatpaaa (서열번호 41)	
ttatctagata (서열번호 42)	
tacttactctc (서열번호 43)	
caaaatcaaaa (서열번호 44)	
ttccacttagc (서열번호 45)	
ctctaaagaaa (서열번호 46)	
ttgcttaagcc (서열번호 47)	
gocctaaagaa (서열번호 48)	
ttctctctact (서열번호 49)	
taccaaagaaa (서열번호 50)	

[0132] 실시양태 (24)는 복수의 분석물에 대한 결합 어세이를 수행하는 방법에서 다중웰 플레이트의 사용을 위한 지시서를 더 포함할 수 있고, 이 방법은 (a) 복수의 분석물 중 제1 분석물에 대해 특이적인 제1 결합 시약 및 제1 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제1 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 제1 결합 시약은 연결체에 결합되고 제1 올리고뉴클레오티드는 보조 연결체에 결합되며 이때 제1 결합 시약 복합체는 연결체와 보조 연결체 사이의 반응에 의해 형성되는 것인 단계; (b) 복수의 분석물 중 제2 분석물에 대해 특이적인 제2 결합 시약 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제2 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 제2 결합 시약은 제2 연결체에 결합되고 제2 올리고뉴클레오티드는 제2 연결체 상보체에 결합되며 이때 제2 결합 시약 복합체는 제2 연결체와 제2 연결체 상보체 사이의 반응에 의해 형성되는 것인 단계; (c) 제1 올리고뉴클레오티드를 제1 올리고뉴클레오티드 상보체에 결합시키고 제2 올리고뉴클레오티드를 제2 올리고뉴클레오티드 상보체에 결합시키는 충분한 조건 하에서, 개별적으로 제1 올리고뉴클레오티드 상보체 및 제2 올리고뉴클레오티드 상보체에 각각 연결된 2 이상의 결합 도메인과 제1 및 제2 결합 시약 복합체를 혼합시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 형성된 혼합물에 복수의 분석물을 포함하는 샘플을 혼합시키는 단계; (e) 단계 (d)에서 형성된 혼합물에 복수의 추가적인 결합 시약을 추가시키는 단계로서, 여기서 복수의 추가적인 결합 시약은 (i) 제1 분석물 및/또는 제1 결합 시약-제1 분석물 복합체에 특이적인 제1 검출 시약; 및 (ii) 제2 분석물 및/또는 제2 결합 시약-제2 분석물 복합체에 특이적인 제2 검출 시약을 포함하는 것인 단계; 및 (f) 결합 도메인에 결합된 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계를 포함한다.

[0133] 또한, 실시양태 (24)는 다음의 성분 중 1 이상을 포함할 수 있다: 제1 및 제2 결합 시약 각각은 개별적으로 제1 및 제2 분석물에 결합할 수 있는 수용체, 리간드, 항체, 합텐, 항원, 에피토프, 미미토프, 압타머, 또는 인터칼레이터를 포함하고, 예를 들면 제1 및 제2 결합 시약 각각은 개별적으로 제1 및 제2 분석물에 결합할 수 있는 항체를 포함다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드 및 상보성 올리고뉴클레오티드, 수용체-리간드 쌍, 항원-항체 쌍, 합텐-항체 쌍, 항원-항체 쌍, 에피토프-항체 쌍, 미미토프-항체 쌍, 압타머-표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 또는 인터칼레이터-표적 분자 쌍을 포함한다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드 및 상보성 올리고뉴클레오티드, 수용체-리간드 쌍, 항원-항체 쌍, 합텐-항체 쌍, 항원-항체 쌍, 에피토프-항체 쌍, 미미토프-항체 쌍, 압타머-표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 또는 인터칼레이터-표적 분자 쌍을 포함한다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드 및 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함한다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드 및 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함한다; 연결 복합체는 연결체 및 그에 연결되는 보조 연결체를 포함하고, 예를 들면 연결 복합체는 (a) 티올기와 말레이미드 또는 요오도아세트아미드; (b) 알데히드와 히드라지드; 또는 (c) 알킨과 아지드 사이의 결합 상호작용에 의해 형성된다; 또는 (a) 연결체는 바이오틴이고 보조 연결체는 스트렙타비딘 또는 아비딘이다; (b) 연결체는 스트렙타비딘 또는 아비딘이고 보조 연결체는 바이오틴이다; (c) 연결체는 펩티드이고 보조 연결체는 항펩티드 항체이다; 또는 (d) 연결체는 항펩티드 항체이고 보조 연결체는 펩티드이다.

[0134] 또한, 실시양태 (24)는 별도의 바이알, 용기, 또는 구획에, 복수의 검출 시약을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 복수의 검출 시약은 검출가능한 표지를 포함할 수 있고, 예를 들면 복수의 검출 시약의 서브세트는 검출가능한 표지를 포함한다. 일례에서, 검출가능한 표지는 전기화학발광성 표지이다. 2 이상의 결합 도메인은 전극 상에 위치될 수 있다. 경우에 따라, 2 이상의 결합 도메인은 다중웰 플레이트의 1 이상의 웰 내에 위치된다.

[0135] 실시양태 (24)의 특정 예에서, 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함하고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

쌍	서열	쌍	서열
1	acatcagagt (서열번호 1)	12	caatctaat (서열번호 23)
	aactaccat (서열번호 2)		actctacatc (서열번호 24)
3	agagaaatcc (서열번호 5)	13	cgattcaaca (서열번호 25)
	gattctctct (서열번호 6)		tatctcaacc (서열번호 26)
6	atcattacc (서열번호 11)	16	gacataaacga (서열번호 31)
	gatgatgat (서열번호 12)		tcgcttatcc (서열번호 32)
7	attaacagac (서열번호 13)	17	gcataatctc (서열번호 33)
	atccctaat (서열번호 14)		aaacactaac (서열번호 34)
8	caaggtctaa (서열번호 15)	18	actaatcaaca (서열번호 35)
	ttaagactctg (서열번호 16)		tgatgatgac (서열번호 36)
9	caagttccat (서열번호 17)	20	gttatctctc (서열번호 39)
	aaaaacactg (서열번호 18)		acaaatcaac (서열번호 40)
11	ctcaacatac (서열번호 21)	23	ttccactaacg (서열번호 45)
	atatacatag (서열번호 22)		ccctaataaa (서열번호 46)
		25	tttccctgata (서열번호 48)
			taacaaacaaa (서열번호 50)

[0137] 실시양태 (24)에서, 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함하고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

번호	지명 (서열)
1	acaCgagatit (서열번호 1)
	aactccaaigt (서열번호 2)
2	actccaaatg (서열번호 3)
	caactgagatg (서열번호 4)
3	acaaagatcc (서열번호 5)
	aaactctctct (서열번호 6)
4	aaactctctct (서열번호 7)
	gaaactgagat (서열번호 8)
5	atgaaatgag (서열번호 9)
	actctctctct (서열번호 10)
6	atcaatcaaac (서열번호 11)
	gattctctctct (서열번호 12)
7	atcaaacatg (서열번호 13)
	gctctctctct (서열번호 14)
8	caaaatgagat (서열번호 15)
	aaactctctct (서열번호 16)
9	caaaatgagat (서열번호 17)
	aaactctctct (서열번호 18)
10	caaaatgagat (서열번호 19)
	caaaatgagat (서열번호 20)
11	caaaatgagat (서열번호 21)
	caaaatgagat (서열번호 22)
12	caaaatgagat (서열번호 23)
	caaaatgagat (서열번호 24)
13	caaaatgagat (서열번호 25)
	caaaatgagat (서열번호 26)
14	caaaatgagat (서열번호 27)
	caaaatgagat (서열번호 28)
15	caaaatgagat (서열번호 29)
	caaaatgagat (서열번호 30)
16	caaaatgagat (서열번호 31)
	caaaatgagat (서열번호 32)
17	caaaatgagat (서열번호 33)
	caaaatgagat (서열번호 34)
18	caaaatgagat (서열번호 35)
	caaaatgagat (서열번호 36)
19	caaaatgagat (서열번호 37)
	caaaatgagat (서열번호 38)
20	caaaatgagat (서열번호 39)
	caaaatgagat (서열번호 40)

[0138]

21	caaaatgagat (서열번호 40)
	caaaatgagat (서열번호 41)
22	caaaatgagat (서열번호 42)
	caaaatgagat (서열번호 43)
23	caaaatgagat (서열번호 44)
	caaaatgagat (서열번호 45)
24	caaaatgagat (서열번호 46)
	caaaatgagat (서열번호 47)
25	caaaatgagat (서열번호 48)
	caaaatgagat (서열번호 49)
	caaaatgagat (서열번호 50)

[0139]

[0140]

실시양태 (24)의 다른 특정예에서, 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드의 쌍을 포함하고, 여기서 그러한 쌍은 하기에서 선택된다:

번호	지명	번호	지명
1	acatcagatgt (서열번호 1)	12	caaatatagat (서열번호 23)
	aaactaccatg (서열번호 2)		actctacatg (서열번호 24)
3	agaaagatcc (서열번호 5)	13	cgattcaatg (서열번호 25)
	gactctctct (서열번호 6)		tactcaaacg (서열번호 26)
6	atcattaccac (서열번호 11)	16	gacataaacg (서열번호 31)
	gactctctct (서열번호 12)		tgctttatct (서열번호 32)
7	atcaaacgac (서열번호 13)	17	gcaatctct (서열번호 33)
	gctctctct (서열번호 14)		aaactcaatg (서열번호 34)
8	caaaatgagat (서열번호 15)	18	gcaatcaatg (서열번호 35)
	aaactcaatg (서열번호 16)		tgatgaaatg (서열번호 36)
9	caaaatgagat (서열번호 17)	20	gctctctct (서열번호 39)
	aaactcaatg (서열번호 18)		aaactcaatg (서열번호 40)
11	ctctacataac (서열번호 21)	23	ttcaatcaatg (서열번호 45)
	atataatcaatg (서열번호 22)		cccaatcaatg (서열번호 46)
		25	ttctctctct (서열번호 49)
			aaactcaatg (서열번호 50)

[0141]

[0142]

실시양태 (24)는 또한 다음 중 1 이상을 포함할 수 있다: 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 개별적으로 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오타이드 각각은 대략 10 내지 50 염기를 포함한다; 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 개별적으로 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제1 상보성 올리고뉴클레오타이드 각각은 대략 10 내지 25 염기를 포함한다; 제1 결합 시약은 바이오틴 분자를 포함하는 항체이고 제1 표적화제는 스트렙타비딘 분자를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드를 포함하며 연결 복합체는 바이오틴과 스트렙타비딘 분자 사이의 반응에 의해 형성된다; 제2 결합 시약은 추가의 바이오틴 분자를 포함하는 항체이고, 제2 표적화제는 추가의 스트렙타비딘 분자를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하며 연결 복합체는 추가의 바이오틴과 추가의 스트렙타비딘 분자 사이의 반응에 의해 형성된다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 개별적으로 제2 올리고뉴클레오타이드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오타이드 각각은 대략 10 내지 50 염기를 포함한다; 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 개별적으로 제2 올리고뉴클레오타이드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드 및 제2 상보성 올리고뉴클레오타이드 각각은 대략 10 내지 25 염기를 포함한다; 및/또는 제2 결합 시약은 바이오틴 분자를 포함하는 항체이고 제2 표적화제는 스트렙타비딘 분자를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 연결 복합체는 바이오틴과 스트렙타비딘 분자 사이의 반응에 의해 형성된다.

[0143]

전술한 실시양태 중 임의의 1 이상에서, 제2 결합 도메인 상의 제1 결합 시약의 양은 제1 결합 도메인 상의 제1 결합 시약의 양의 < 1%일 수 있다.

[0144]

실시양태 (25): 다중웰 플레이트의 1 이상의 웰(들) 내에 올리고뉴클레오타이드 어레이의 1 이상의 복제물을 구비한 다중웰 플레이트를 포함하는 키트로서, 어레이는 복수의 결합 도메인 상에 위치하고, 이때 결합 도메인의 적어도 4개는 하기에서 선택되는 상이한 올리고뉴클레오타이드를 그위에 고정시키며, 이때 상이한 올리고뉴클레오타이드 서열 각각은 연결제에 의해 개질되는(modified) 것인 키트:

acatccagtt (지열번호 1)	tatctcaaccg (지열번호 26)
aactaccatct (지열번호 2)	cttacaagcca (지열번호 27)
acatccagtt (지열번호 3)	tgcattatag (지열번호 28)
caactcaagct (지열번호 4)	ctttctgac (지열번호 29)
asasaaatcc (지열번호 5)	atcccaaaa (지열번호 30)
agatctctct (지열번호 6)	gacataaac (지열번호 31)
agatccagca (지열번호 7)	tcacttatct (지열번호 32)
tgcactaacct (지열번호 8)	gccatgctct (지열번호 33)
atcagagacc (지열번호 9)	asagatagc (지열번호 34)
gatctctgt (지열번호 10)	gcaatcaaca (지열번호 35)
atcattacc (지열번호 11)	tgtgatag (지열번호 36)
gatctatgt (지열번호 12)	gctctgtta (지열번호 37)
atcaaacacc (지열번호 13)	tcaaacacc (지열번호 38)
atccatgaa (지열번호 14)	atgatgctct (지열번호 39)
caagatctaa (지열번호 15)	accaatcac (지열번호 40)
ttaagctctg (지열번호 16)	taccgaata (지열번호 41)
caatctcat (지열번호 17)	tattcaagta (지열번호 42)
aaataacact (지열번호 18)	tacttaagta (지열번호 43)
catcaatcag (지열번호 19)	ccagtaaga (지열번호 44)
ctagatgag (지열번호 20)	ttaactgag (지열번호 45)
ctcagatatac (지열번호 21)	ccctaagaa (지열번호 46)
gatctctgag (지열번호 22)	tattcaagc (지열번호 47)
caatctatgt (지열번호 23)	ccctaagaa (지열번호 48)
actctacatcc (지열번호 24)	tttctctgta (지열번호 49)
caattgagta (지열번호 25)	tacaagaaa (지열번호 50)

[0145]

[0146]

실시양태 (26): 다중웰 플레이트의 1 이상의 웰(들) 내에 올리고뉴클레오티드 어레이의 1 이상의 복제물을 구비한 다중웰 플레이트를 포함하는 키트로서, 어레이는 복수의 결합 도메인 상에 위치되고, 여기서 결합 도메인 중 적어도 4개는 하기에서 선택되는 상이한 올리고뉴클레오티드를 그위에 고정시킨 것인 키트:

번호	지열	번호	지열
1	acatccagtt (지열번호 1)	12	caatataag (지열번호 23)
	aactaccatct (지열번호 2)		acttcatag (지열번호 24)
3	asasaaatcc (지열번호 5)	13	cgattgaaa (지열번호 25)
	agatctctct (지열번호 6)		tatctcaaccg (지열번호 26)
6	atcattacc (지열번호 11)	16	gacataaac (지열번호 31)
	gatctatgt (지열번호 12)		tcacttatct (지열번호 32)
7	atcaaacacc (지열번호 13)	17	gccatgctct (지열번호 33)
	atccatgaa (지열번호 14)		asagatagc (지열번호 34)
8	caagatctaa (지열번호 15)	18	gcaatcaaca (지열번호 35)
	ttaagctctg (지열번호 16)		tgtgatag (지열번호 36)
9	caatctcat (지열번호 17)	20	atgatgctct (지열번호 39)
	aaataacact (지열번호 18)		accaatcac (지열번호 40)
11	catcaatcag (지열번호 21)	23	ttaactgag (지열번호 45)
	ctcagatatac (지열번호 22)		ccctaagaa (지열번호 46)
		25	tttctctgta (지열번호 49)
			tacaagaaa (지열번호 50)

[0147]

[0148]

실시양태 (25) 및 (26)은 다음의 성분 중 1 이상을 포함할 수 있다: 연결체는 바이오틴, 스트렙타비딘, 아비딘, 아미노 기, 티올 기, 알데히드 기, 히드라지드 기, 아지드 기, 알킨 기, 말레이미드 기 또는 요오도아세트아미드 기를 포함한다; 연결체는 스트렙타비딘이다; 키트는 (a) 결합 시약 쌍 세트로서, 여기서 세트의 결합 시약 각각은 복수의 분석물을 포함하는 샘플 내 분석물에 대해 특이적이고, 이때 경우에 따라 세트 내 결합 시약 쌍은 보조 연결체를 포함하는 제1 결합 시약을 포함하는 것인 결합 시약 쌍 세트를 1 이상의 별도의 바이알, 용기, 또는 구획에 더 포함하고, 여전히 또한 경우에 따라 키트는 1 이상의 별도 바이알, 용기 또는 구획에, 보조 연결체를 포함한다. 일례에서, 결합 시약은 항체이다.

[0149]

전술한 실시양태, 예를 들면 실시양태 (25) 및 (26)의 키트는, 1 이상의 별도 바이알, 용기, 또는 구획에, 어세이 완충액, 희석제, 판독 완충액 또는 이의 조합을 포함하는 1 이상의 추가 시약을 비롯하여, 표지화 키트를 더 포함할 수 있다. 표지화 키트는 1 이상의 별도 바이알, 용기 또는 구획에, SULFO-TAG™ NHS 에스테르, LC-바이오틴 NHS 에스테르, 스핀 컬럼, 표지화 완충 용액, ECL 판독 완충액, 어세이 및 항체 완충액, 및 어세이 및 항체 희석제, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0150]

실시양태 (25) 및 (26)에서, 어레이는 적어도 7개 결합 도메인, 또는 적어도 10개 결합 도메인, 또는 적어도 16개 결합 도메인, 또는 적어도 25개 결합 도메인을 포함한다. 또한, 플레이트는 적어도 24 웰, 또는 적어도 96 웰, 또는 적어도 384 웰을 포함한다. 어레이는 또한 적어도 10개 올리고뉴클레오티드, 또는 적어도 16개 올리고뉴클레오티드, 또는 적어도 25 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0151]

전술한 실시양태 중 어느 하나의 특정 예에서, 세트 중 결합 시약 쌍의 개수는 어레이 내 결합 도메인의 개수와 균등하거나, 또는 세트 내 결합 시약 쌍의 개수는 어레이 내 결합 도메인의 개수보다 적다.

도면의 간단한 설명

[0152]

첨부된 도면은 본 발명의 범주를 제한하기 보다는 예시를 위해 제공된다.

도 1(a)-(d)은 개별적으로 표적화제, A", B", 및 C", 및 표적화제 상보체, A'", B'", 및 C'" 사이의 반응을 통한, 개별적으로 복수의 결합 도메인, X, Y, 및 X과 결합 시약, A', B', 및 C'의 직접 접합을 포함하는 어세이 포맷을 예시한다. 표적화제는 일련의 결합 도메인, X, Y, 및 Z 상의 결합 시약, A', B', 및 C'에 부착되어 개별

적으로 결합 시약 복합체, A_{RC} , B_{RC} , 및 C_{RC} 를 형성하고(패널 (b)), 이들은 개별적으로 분석물 A, B, 및 C와 반응한다. 고상 지지체 상에 분석물 A, B, 및 C의 존재는 개별적으로 분석물 A, B, 및 C와 반응하는 표지화된 검출 시약, A^* , B^* , 및 C^* 의 부가를 통해 검출된다(패널 (c)). 도 1(d)는 결합 도메인 X, Y, 및 Z 상에 형성된 결합 시약 복합체, 개별적으로 결합 시약 복합체, A_{RC} , B_{RC} , 및 C_{RC} 의 확대도이다.

도 2(a)-(d)는 개별적으로 올리고뉴클레오티드 표적화제, A", B", 및 C"와 올리고뉴클레오티드 표적화제 상보체, A'", B'", 및 C'" 사이의 반응을 통한, 개별적으로 복수의 결합 도메인, X, Y, 및 Z와 결합 시약, 예를 들면 항체, A', B', 및 C'의 직접 접합을 포함하는 어세이 포맷을 예시한다. 올리고뉴클레오티드 표적화제는 일련의 결합 도메인, X, Y, 및 Z 상의 결합 시약, A', B', 및 C'에 부착되어 개별적으로 결합 시약 복합체, A_{RC} , B_{RC} , 및 C_{RC} 를 형성하고(패널 (b)), 이들은 개별적으로 분석물 A, B, 및 C와 반응한다. 고상 지지체 상에 분석물 A, B, 및 C의 존재는 개별적으로 분석물, A, B, 및 C와 반응하는, 표지화된 검출 시약, A^* , B^* , 및 C^* 의 부가에 의해 검출된다(패널 (c)). 도 2(d)는 결합 도메인 X, Y, 및 Z 상에 형성된 결합 시약 복합체, 개별적으로 결합 시약 복합체 A_{RC} , B_{RC} , 및 C_{RC} 의 확대도이다.

도 3(a)-(e)는 일련의 연결 복합체를 통한, 개별적으로 복수의 결합 도메인, X, Y, 및 Z와 복수의 결합 시약, A', B', 및 C'의 접합을 포함하는 어세이 포맷을 예시한다. 패널 (a)에 도시한 바와 같이, 결합 시약 A', B', 및 C'은 연결체, L_A , L_B , 및 L_C 에 부착되는 반면, 표적화제 A", B", 및 C'은 개별적으로 보조 연결체, L_A' , L_B' , 및 L_C' 에 부착된다. 결합 시약 A', B', 및 C'은 표적화제와 혼합되어 개별적으로 결합 시약 복합체, A_{RC} , B_{RC} , 및 C_{RC} 를 형성한다. 패널 (a)에 형성된 결합 시약 복합체는 표적화제 상보체, A'", B'", 및 C'"가 결합된, 복수의 결합 도메인, X, Y, 및 Z와 혼합되어(패널 (b)) 결합 시약 복합체가 결합 도메인에 부착된다(패널 (c) 참조). 분석물 A, B, 및 C를 포함하는 샘플을 혼합물에 추가하고, 동시에 또는 순차적으로, 검출 시약, A^* , B^* , 및 C^* 의 세트를 또한 추가하여 결합 도메인에 결합된 분석물을 검출한다. 도 3(e)는 결합 도메인 X, Y, 및 Z 상에 형성된 결합 시약 복합체, 개별적으로 결합 시약 복합체 A_{RC} , B_{RC} , 및 C_{RC} 의 확대도이다.

도 4(a)-(e)는 일련의 연결 복합체를 통한 개별적으로 복수의 결합 도메인, X, Y, 및 Z와 복수의 결합 시약, A', B', 및 C'의 접합을 포함하는 어세이 포맷을 예시한다. 패널 (a)에 도시한 바와 같이, 결합 시약 A', B', 및 C'은 연결체, L_A , L_B , 및 L_C 에 부착되는 한편, 올리고뉴클레오티드 표적화제 A", B", 및 C'는 개별적으로 보조 연결체, L_A' , L_B' , 및 L_C' 에 부착된다. 결합 시약 A', B', 및 C'은 올리고뉴클레오티드 표적화제와 혼합되어 개별적으로 결합 시약 복합체, A_{RC} , B_{RC} , 및 C_{RC} 를 형성한다. 패널 (a)에 형성된 결합 시약 복합체는 올리고뉴클레오티드 표적화제 상보체, A'", B'", 및 C'"가 결합된(패널 (b)) 복수의 결합 도메인, X, Y, 및 Z와 혼합되어 결합 시약 복합체를 결합 도메인에 부착시킨다(패널 (c) 참조). 분석물 A, B, 및 C를 포함하는 샘플을 혼합물에 추가하고, 동시에 또는 순차적으로, 검출 시약, A^* , B^* , 및 C^* 의 세트를 또한 추가하여 결합 도메인에 결합된 분석물을 검출한다. 도 4(e)는 결합 도메인 X, Y, 및 Z 상에 형성된 결합 시약 복합체, 개별적으로 결합 시약 복합체 A_{RC} , B_{RC} , 및 C_{RC} 의 확대도이다.

도 5(a)-(d)는 본 발명의 어세이 포맷에 사용될 수 있는 시약의 다양한 조합을 예시한다. 도 5(a)에서, 모든 시약은 단일 단계에서 샘플과 혼합되는 반면, 도 5(b)에서, 모든 시약은 혼합된 후 표면에 추가되고, 5(c)에서, 개질된 결합 시약 및 개질된 표적화제 상보체가 혼합되고 각각 표적화제를 포함하는 복수의 결합 도메인을 보유하는 표면에 추가되며, 표면-혼합물은 단일 단계 또는 2 단계로 샘플 및 검출 시약과 혼합된다(샘플 및 검출 시약의 단일 단계 부가는 도 5 (c)에 도시하였고 샘플 및 검출 시약의 순차적 부가는 도 5(d)에 도시한다).

도 6(a)-(f)는 본 발명의 어세이 포맷에서 사용될 수 있는 다양한 개질 표면, 예를 들면 복수의 결합 도메인을 보유하는 입자 및 기질(기재)을 도시한다.

도 7은 올리고뉴클레오티드 상의 티올 기를 통해 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있는 말레이미드-활성화된 항체를 생성하기 위해 항체를 설포-SMCC를 이용해 화학적으로 개질시키는 과정을 도시한다.

도 8(a)-(g)는 7중 케모카인 패널 및 10중 TH1/TH2 패널에 대한 직접 어세이 포맷의 결과를 도시한다.

도 9(a)-(c)는 스트렙타비딘 분자로 개질된 올리고뉴클레오티드를 이용해 바이오틴화 포획 항체를 사용하는 간접 어세이 포맷으로 다중웰 어세이 플레이트를 생산 및 사용하는 과정을 도시한다.

도 10(a)-(c)는 바이오틴화 포획 항체, 순(neat) 스트랩타비딘, 및 바이오틴화 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 간접 어세이 포맷으로 다중웰 어세이 플레이트를 생산 및 사용하는 과정을 도시한다.

도 11(a)-(g)는 사이토카인 B 패널에 대한 3종의 상이한 올리고뉴클레오타이드 매개 어세이 포맷의 LOD 값 비교를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0153] 본원에서 달리 정의하지 않으면, 본 발명과 관련하여 사용된 과학 및 기술 용어는 당분야의 숙련가들이 통상적으로 이해하는 의미를 갖는다. 또한, 문맥에서 달리 필요로하지 않으면, 단수 용어는 복수를 포함하고 복수 용어는 단수를 포함한다. 단수 관사는 본원에서 관사의 문법적 목적의 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 의미하고자 사용된다. 예로서, "하나의 성분"은 한 성분 또는 하나 이상의 성분을 의미한다.
- [0154] 본 발명은 사용자 또는 제조자가 특별한 사용자 요건을 기반으로 어세이를 구성할 수 있는 탄력적인 고체상 결합 어세이 포맷을 제공한다. 본원에 기술된 방법 및 키트는 복수의 표적 분석물에 대한 다중화 결합 어세이를 생성하기 위한 탄력적인 플랫폼을 제공한다. 일련의 포괄적인 표적화제 상보체를 보유하는 복수의 결합 도메인을 포함하는 지지체를 이용하여, 임의의 분석물 세트에 대한 다중화 어세이를 구성하는 것이 가능하다. 오직 어떠한 분석물을 어떠한 결합 도메인에서 평가할 것인지를 선택하고 적절한 결합 시약 및 표적화제를 각각의 선택된 결합 도메인과 짝지우는 것만이 필요하다. 이러한 플랫폼을 이용하여, 사용자는 개별맞춤된 어세이 패널을 구축할 수 있다.
- [0155] 이러한 탄력적인 다중화 어세이 포맷은 본원에 개시된 방법 및 생성물을 이용해 달성될 수 있다. 예를 들면, 복수의 관심 분석물에 대한 다중화 결합 어세이를 수행하는 방법은 다음의 단계를 이용해 수행될 수 있다:
- [0156] (a) 1 이상의 단계로, 하기의 성분들,
- [0157] (i) 제1 관심 분석물 및 제2 관심 분석물을 포함하는 샘플,
- [0158] (ii) 제1 결합 도메인에 고정화된 제1 표적화제,
- [0159] (iii) 연결체에 연결된 제1 표적화제 상보체로서, 제1 표적화제의 결합 파트너인 제1 표적화제 상보체,
- [0160] (iv) 보조 연결체에 연결된 제1 결합 시약으로서, 제1 분석물의 결합 파트너인 제1 결합 시약,
- [0161] (v) 제2 결합 도메인에 고정화된 제2 표적화제,
- [0162] (vi) 연결체에 연결된 제2 표적화제 상보체로서, 제2 표적화제의 결합 파트너인 제2 표적화제 상보체,
- [0163] (vii) 보조 연결체에 연결된 제2 결합 시약으로서, 제2 분석물의 결합 파트너인 제2 결합 시약, 및
- [0164] (viii) 경우에 따라, 가교제의 2 이상의 복제물
- [0165] 을 배합하는 단계로서,
- [0166] 여기서 가교제가 생략되면, 각각의 연결체는 보조 연결체의 결합 파트너이거나, 또는 가교제가 포함되면, 가교제는 연결체 중 하나에 대한 제1 결합 부위 및 보조 연결체 중 하나에 대한 추가의 결합 부위를 갖는 것인 배합 단계,
- [0167] (b) (i) 제1 표적화제, 제1 표적화제 상보체, 제1 결합 시약 및 제1 분석물을 포함하는 제1 결합 도메인 상의 제1 결합 복합체, 및
- [0168] (ii) 제2 표적화제, 제2 표적화제 상보체, 제2 결합 시약 및 제2 분석물을 포함하는 제2 결합 도메인 상의 제2 결합 복합체
- [0169] 를 형성시키는 단계, 및
- [0170] (c) 개별적으로 제1 및 제2 결합 도메인 상의 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계.
- [0171] 일 실시양태에서, 가교제가 사용되지 않으면, 이 방법은 (a) 1 이상의 단계로, 성분 (i)-(vii)을 배합시키는 단계, (b) 개별적으로 제1 및 제2 결합 도메인 상에 제1 및 제2 결합 복합체를 형성시키는 단계, 및 (c) 개별적으로 제1 및 제2 결합 도메인 상의 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 제1 표적화제 상보체 및 제1 결합 시약은 연결체와 보조 연결체 간 결합 상호작용을 통해 연결된 제1 결합 시약 및 제1 표

적화제 상보체를 포함하는 사전 결합된 제1 표적화 복합체로서 제공될 수 있고, 유사하게 제2 표적화제 상보체 및 제2 결합 시약은 연결제와 보조 연결제 간 결합 상호작용을 통해 연결된 제2 결합 시약 및 제2 표적화제 상보체를 포함하는 사전 결합된 제2 표적화 복합체로서 제공될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 제1 표적화 복합체는 제1 결합 도메인 상에 고정화된 제1 표적화제에 사전결합되어 제공될 수 있고, 유사하게, 제2 표적화 복합체는 제2 결합 도메인 상에 고정화된 제2 표적화제에 사전 결합되어 제공된다. 제1 및 제2 결합 시약은 사전 결합된 표적화 복합체에 제공되는 경우, 배합 단계는 제1 및 제2 표적화 복합체를 샘플과 배합하여 이의 혼합물을 형성시키는 단계, 제1 표적화 복합체의 제1 결합 시약에 제1 분석물을 결합시키고 제2 표적화 복합체의 제2 결합 시약에 제2 분석물을 결합시키는 단계, 개별적으로 제1 및 제2 분석물에 결합된 제1 및 제2 표적화 복합체의 혼합물을 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키는 단계를 더 포함한다. 제1 및 제2 도메인 상의 결합 복합체는 따라서 제1 결합 도메인 상의 제1 표적화제에 제1 표적화 복합체를 결합시키고 제2 결합 도메인 상의 제2 표적화제에 제2 표적화 복합체를 결합시켜 형성된다. 또한, 배합 단계는 제1 및 제2 표적화 복합체를 샘플과 배합시키는 단계, 및 제1 표적화 복합체의 제1 결합 시약에 제1 분석물을 결합시키고 제2 표적화 복합체의 제2 결합 시약에 제2 분석물을 결합시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0172] 다른 대안적인 실시양태에서, 배합 단계 (a)는 액체의 제1 부피로, 상기 제1 표적화제 상보체, 상기 제1 결합 시약 및, 사용한다면, 상기 가교 시약을 배합하는 단계 및 상기 제1 표적화제 상보체 및 상기 제1 결합 시약을 그들의 부착 연결제를 통해 연결시켜 제1 표적화 복합체를 형성시키는 단계; 및 액체의 제2 부피로, 상기 제2 표적화제 상보체, 상기 제2 결합 시약 및 사용한다면, 상기 가교 시약을 배합시키는 단계 및 상기 제2 표적화제 복합체 상보체 및 상기 제2 결합 시약을 그들의 부착 연결제를 통해 연결시켜 제2 표적화 복합체를 형성시키는 단계를 포함한다. 이러한 실시양태, 배합 단계 (a)는 또한 상기 제1 및 제2 표적화 복합체를 배합시키는 단계, 상기 제1 및 제2 표적화 복합체의 배합물을 상기 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키는 단계, 및 상기 제1 표적화 복합체를 상기 제1 결합 도메인 상의 상기 제1 표적화제에 결합시키고 상기 제2 표적화 복합체를 상기 제2 결합 도메인 상의 상기 제2 표적화제에 결합시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 배합 단계는 제1 및 제2 표적화 복합체의 배합물을 샘플과 배합시키는 단계 및 제1 분석물을 제1 표적화 복합체의 제1 결합 시약과 결합시키고 제2 분석물을 제2 표적화 복합체의 제2 결합 시약과 결합시키는 단계를 더 포함한다. 제1 및 제2 표적화 복합체는 제1 및 제2 표적화 복합체를 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키기 전에 샘플과 배합될 수 있거나; 제1 및 제2 표적화 복합체는 제1 및 제2 표적화 복합체를 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키기 전에 샘플과 배합될 수 있거나; 또는 제1 및 제2 표적화 복합체는 샘플과 배합되고 동시에 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉될 수 있다.

[0173] 가교제가 이 방법에 포함되면, 연결제 및 보조 연결제 각각은 가교제에 결합되고, 따라서 배합 단계는 이들 성분을 연결제 및 보조 연결제에 함께 부착시킨다. 예를 들면, 배합 단계 (a)는 액체의 제1 부피로, (xi) 제1 표적화제 상보체, 제1 결합 시약 및 가교 시약을 배합하는 단계를 포함하고, 보조 연결제가 결합된 가교제에 결합된 연결제를 포함하는 가교 복합체를 통해서 제1 표적화제 상보체 및 제1 결합 시약을 연결시켜 제1 표적화 복합체를 형성시키는 단계를 더 포함한다. 배합 단계 (a)는 또한 액체의 제2 부피로, (xii) 제2 표적화제 상보체, 제2 결합 시약 및 가교 시약을 배합하는 단계를 포함하고, 보조 연결제가 결합된 가교제에 결합된 연결제를 포함하는 가교 복합체를 통해 제2 표적화제 상보체 및 제2 결합 시약을 연결시켜 제2 표적화 복합체를 형성시키는 단계를 더 포함한다. 이러한 실시양태에서, 배합 단계 (a)는 또한 (xiii) 제1 및 제2 표적화 복합체를 배합하고, 제1 및 제2 표적화 복합체의 배합물을 제1 및 제2 결합 도메인과 배합시키는 단계, 및 제1 결합 도메인 상의 제1 표적화 복합체를 결합시키고 제2 결합 도메인 상의 제2 표적화 복합체를 결합시키는 단계를 더 포함한다. 이러한 실시양태에서, 배합 단계는 (xiv) 제1 및 제2 표적화 복합체를 샘플과 배합시키는 단계 및 제1 분석물을 제1 표적화 복합체의 제1 결합 시약에 결합시키고 제2 분석물은 제2 표적화 복합체의 제2 결합 시약에 결합시키는 단계를 더 포함한다. 제1 및 제2 표적화 복합체는 제1 및 제2 표적화 복합체를 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시키기 전에 샘플과 배합되거나; 제1 및 제2 표적화 복합체는 제1 및 제2 표적화 복합체를 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉시킨 후에 샘플과 배합되거나; 또는 제1 및 제2 표적화 복합체는 샘플과 배합되고 동시에 제1 및 제2 결합 도메인과 접촉될 수 있다.

[0174] 본원에서 기술된 방법은 샘플 내 복수의 관심 분석물을 다중검출하는데 사용될 수 있다. 이러한 점에서, 샘플은 1 이상의 추가의 관심 분석물을 함유하고 각각의 추가의 관심 분석물에 대해서, 배합 단계 (a)는 1 이상의 단계로, (ix) 추가적인 결합 도메인에 고정화된 추가적인 표적화제, 연결제에 연결된 추가적인 표적화제 상보체, 및 보조 연결제에 연결된 추가적인 결합 시약, 및 (x) 추가적인 표적화제, 추가적인 표적화제 상보체, 추가적인 결합 시약 및 추가의 분석물을 포함하는 추가적인 결합 도메인 상의 추가적인 결합 복합체를 배합하는 단계를 더 포함하고; 형성 단계 (b)는 (iii) 추가적인 표적화제, 추가적인 표적화제 상보체, 추가적인 결합 시약 및 추가

의 분석물을 포함하는 추가적인 결합 도메인 상의 추가적인 결합 복합체를 형성시키는 단계를 더 포함하며; 및 단계 (c)에서 측정은 추가적인 결합 도메인 상의 추가의 분석물의 양을 측정하는 단계를 더 포함한다.

[0175] 특정 실시양태에서, 본 발명은 복수의 분석물에 대한 결합 어세이를 수행하는 방법을 포함하고, 이 방법은 (a) 개별적으로 복수의 분석물의 제1 및 제2 분석물에 각각 결합하는 적어도 제1 및 제2 결합 시약에 연결된 2 이상의 결합 도메인과 샘플을 접촉시켜서 제1 결합 시약에 결합된 제1 분석물 및 제2 결합 시약에 결합된 제2 분석물을 포함하는 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 (x) 제1 결합 도메인은 (i) 제1 결합 도메인 및 제1 표적화제 상보체에 결합된 제1 표적화제; 및 (ii) 연결 복합체를 통해 제1 표적화제 상보체에 결합된 제1 결합 시약을 포함하는 제1 결합 시약 복합체를 포함하고; (y) 제2 결합 도메인은 (i) 제2 결합 도메인 및 제2 표적화제 상보체에 결합된 제2 표적화제; 및 (ii) 연결 복합체를 통해 제2 표적화제 상보체에 결합된 제2 결합 시약을 포함하는 제2 결합 시약 복합체를 포함하는 것인 단계; (b) 제1 분석물 또는 제1 분석물을 포함하는 복합체에 결합하는 제1 검출 시약, 및 제2 분석물 또는 제2 분석물을 포함하는 복합체에 결합하는 제2 검출 시약을 포함하는 복수의 검출 시약과 제1 및 제2 결합 시약 복합체를 접촉시키는 단계; 및 (c) 2 이상의 결합 도메인에 결합된 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계를 포함한다.

[0176] 다른 특정 실시양태에서, 이 방법은 (a) 복수의 분석물 중 제1 분석물에 특이적인 제1 결합 시약 및 제1 표적화제를 포함하는 제1 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 제1 결합 시약은 연결체에 결합되고 제1 표적화제는 보조 연결체에 결합되며, 이때 제1 결합 시약 복합체는 연결체와 보조 연결체 사이의 반응에 의해 형성되는 것인 단계; (b) 복수의 분석물 중 제2 분석물에 특이적인 제2 결합 시약 및 제2 표적화제를 포함하는 제2 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 제2 결합 시약 제2 연결체에 결합되고 제2 표적화제는 제2 연결체 상보체에 결합되며 이때 제2 결합 시약 복합체는 제2 연결체와 제2 연결체 상보체 사이의 반응에 의해 형성되는 것인 단계; (c) 제1 표적화제를 제1 표적화제 상보체에 결합시키고 제2 표적화제를 제2 표적화제 상보체에 결합시키기에 충분한 조건 하에서, 개별적으로 제1 표적화제 상보체 및 제2 표적화제 상보체에 각각 연결된 2 이상의 결합 도메인과 제1 및 제2 결합 시약 복합체를 혼합시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 형성된 혼합물에 복수의 분석물을 포함하는 샘플을 혼합시키는 단계; (e) 단계 (d)에서 형성된 혼합물에 복수의 추가적인 결합 시약을 부가하는 단계로서, 여기서 복수의 추가적인 결합 시약은 (i) 제1 분석물 및/또는 제1 결합 시약-제1 분석물 복합체에 특이적인 제1 검출 시약; 및 (ii) 제2 분석물 및/또는 제2 결합 시약-제2 분석물 복합체에 특이적인 제2 검출 시약을 포함하는 것인 단계; 및 (f) 결합 도메인에 결합된 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계를 포함한다.

[0177] 추가의 특정 실시양태는 (a) 복수의 분석물 중 제1 분석물에 대해 특이적인 제1 결합 시약 및 제1 표적화제를 포함하는 제1 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 제1 결합 시약은 연결체에 결합되고 제1 표적화제는 보조 연결체에 결합되며 이때 제1 결합 시약 복합체는 연결체와 보조 연결체 사이의 반응에 의해 형성되는 것인 단계; (b) 복수의 분석물 중 제2 분석물에 특이적인 제2 결합 시약 및 제2 표적화제를 포함하는 제2 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 제2 결합 시약은 제2 연결체에 결합되고 제2 표적화제는 제2 연결체 상보체에 결합되며 이때 제2 결합 시약 복합체는 제2 연결체와 제2 연결체 상보체 사이의 반응에 의해 형성되는 것인 단계; (c) 제1 표적화제를 제1 표적화제 상보체에 결합시키고 제2 표적화제를 제2 표적화제 상보체에 결합시키기에 충분한 조건 하에서, 개별적으로 제1 표적화제 상보체 및 제2 표적화제 상보체에 각각 연결된 2 이상의 결합 도메인과 제1 및 제2 결합 시약 복합체 및 샘플을 혼합시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 형성된 혼합물에 복수의 추가적인 결합 시약을 부가하는 단계로서, 여기서 복수의 추가적인 결합 시약은 (i) 제1 분석물 및/또는 제1 결합 시약-제1 분석물 복합체에 특이적인 제1 검출 시약; 및 (ii) 제2 분석물 및/또는 제2 결합 시약-제2 분석물 복합체에 특이적인 제2 검출 시약을 포함하는 것인 단계; 및 (e) 결합 도메인에 결합된 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계를 포함한다.

[0178] 본 발명의 방법의 특정 실시양태는 도 3-6에 예시하였다. 도 1 및 2는 연결 복합체를 포함하지 않는 직접 어세이 방법을 예시한다. 이들 도면은 비교 목적으로 제공된다. 도 1은 분석물 A, B, 및 C에 대한 직접 다중화 어세이를 예시한다. 개별적으로, 이들 분석물 A', B', 및 C'에 특이적인 결합 시약은 표적화제, A'', B'', 및 C''에 부착된다. 그들의 상응하는 표적화제에 부착된 이들 결합 시약을 포함하는 용액은 개별적으로 표적화제 상보체 A'', B'', 및 C''가 일련의 개별 결합 도메인에 결합된 고체상과 혼합된다. 결합 시약은 표면에 흡착되어 결합 시약 복합체, A_{RC}, B_{RC}, 및 C_{RC}를 형성하고, 각각의 결합 시약은 표적화제 상보체를 통해 표면 상의 개별 결합 도메인에 부착된다. 이 표면은 분석물 A, B, 및 C와 개별적으로 분석물 A, B, 및 C에 결합할 수 있는 검출 결합 시약, A*, B*, 및 C*, 및/또는 이들 분석물을 포함하는 복합체를 포함하는 샘플과 접촉된다. 검출 결합 시약은 검출가능한 표지를 포함한다. 대안적으로, 이 표면은 복수의 분석물을 포함하는 샘플과 접촉되고 이어서 검출

결합 시약의 혼합물과 접촉된다. 검출 결합 시약이 표면에 결합되고, 경우에 따라, 표면을 세척하여 미결합 시약을 제거하면, 각 분석물의 존재는 각각의 개별 결합 도메인에 결합된 검출 시약을 통해 검출된다. 도 2는 결합 시약으로서 항체 및 표적화제/표적화제 상보체 쌍으로서 올리고뉴클레오티드-상보성 올리고뉴클레오티드 쌍의 사용을 포함하는 도 1의 특정 실시양태를 예시한다. 도 1 및 2에 예시된 직접 방법은 사용자에게 의해 설정가능한 것이 아님은 숙련자에게 분명하다. 이러한 개별 결합 도메인은 예정된 표적화제 상보체를 포함하여서, 오직 하나의 결합 시약-표적화제가 어레이 내 단일한 결합 도메인에 결합할 수 있게 된다.

[0179] 도 3-4는 사용자에게 사용자-정의된 어레이 구성에 최적 탄력성을 제공하는 본 발명의 특정 실시양태를 예시한다. 도 3은 사용자가 그/그녀의 요구에 따라 어레이를 재단할 수 있는 일련의 연결 복합체를 도입한, 분석물 A, B, 및 C에 대한 간접 결합 포맷을 예시한다. 도 3(a)-(b)은 본 발명의 표적화 복합체를 제조하는 일반적인 접근법을 예시한다: 연결체(각각 L_A , L_B , 및 L_C)에 결합된 결합 시약(A' , B' , 및 C') 중 하나를 포함하는 일련의 용액이 형성된다. 용액은 또한 보조 연결체(각각 L_A' , L_B' , 및 L_C')에 결합된, 상응하는 표적화제(A' 에 대해 A'' , B' 에 대해 B'' , 및 C' 에 대해 C'')를 포함한다. 용액은 패널 (b)에 도시된 결합 시약-연결 복합체-표적화제 복합체의 혼합물을 형성하도록 혼합된다. 이러한 접근법의 장점은 각각의 표적화 복합체가 비가교 반응성이되는데 연결 시약을 필요로 하지 않고, 사실상, 각각 표적화 복합체에서 연결체(즉, $L_A = L_B = L_C$ 및 $L_A' = L_B' = L_C'$)가 사용되게 하지 않는다는 것이다. 도 3(c)-(e)에 예시된 일 실시양태에서, 결합 시약-연결 복합체-표적화제 복합체의 혼합물은 표적화제 상보체, A'' , B'' , 및 C'' 가 결합된 복수의 개별 결합 도메인을 포함하는 표면과 혼합시킨다. 결합 시약-연결 복합체-표적화제 복합체는 흡착되어서 패널 (c)에 도시된 바와 같이 결합 시약 복합체, A_{RC} , B_{RC} , 및 C_{RC} 를 형성한다. 결합 시약 복합체의 확대도를 도 3(e)에 도시한다. 표면은 분석물 A, B, 및 C와 각각 분석물 A, B, 및 C에 결합할 수 있는 검출 결합 시약, A^* , B^* , 및 C^* , 및/또는 이들 분석물을 포함하는 복합체를 포함하는 샘플과 접촉된다. 검출 결합 시약은 검출가능한 표지를 포함한다. 대안적으로, 표면은 복수의 분석물을 포함하는 샘플과 접촉되고 후속하여 검출 결합 시약의 혼합물과 접촉된다. 검출 결합 시약이 표면에 결합되고, 경우에 따라 표면을 세척하여 미결합된 시약을 제거하면, 각 분석물의 존재는 각 개별 결합 도메인에 결합된 검출 시약을 통해 검출된다(패널 3(d)). 도 4는 결합 시약으로서 항체 및 표적화제/표적화제 상보체로서 올리고뉴클레오티드-상보성 올리고뉴클레오티드 쌍의 사용을 포함하는 도 3의 특정 실시양태를 예시한다. 도 3에서 언급한 바와 같이, 각 결합 시약에 대한 연결체는 동일해도 되고 각 표적화제에 대한 연결체 상보체는 동일해도 된다.

[0180] 숙련가는 도 3-4에 도시한 어레이 포맷의 다양한 변경이 가능함을 쉽게 이해할 것이다. 일정한 바람직한 실시양태를 도 5(a)-(c)에 도시한다. 예를 들면, 모든 시약, 즉 보조 연결체에 의해 개질된 결합 시약, 연결체에 의해 개질된 표적화제 상보체, 검출 시약 및 샘플은 단일 단계로 표적화제-개질된 결합 도메인을 보유하는 표면과 함께 혼합되어 도 3(d) 및 4(d)에 도시된 복합체를 형성하고, 경우에 따라 세척되고, 표면에 결합된 분석물 A, B, 및 C의 존재를 분석한다(도 5(a)). 다르게, 보조 연결체에 의해 개질된 결합 시약, 및 연결체에 의해 개질된 표적화제는 단일 단계로 혼합되고, 후속 단계에서 표적화제-개질된 결합 도메인을 갖는 표면에 부가되고, 마지막 단계에서 샘플 및 검출 시약이 부가되고 분석된다(도 5(b)). 또 다른 실시양태에서, 보조 연결체에 의해 개질된 결합 시약, 및 연결체에 의해 개질된 표적화제 상보체를 혼합하고, 개별 결합 도메인의 표적화제를 보유한 표면에 부가되고, 샘플과 혼합된 후 검출 시약이 부가된다(도 5(c)). 개별 분석물 용액은 단일 혼합물의 각 결합 도메인에 순차적으로 또는 동시에 부가될 수 있고, 유사하게, 개별 검출 시약은 단일 혼합물의 각 결합 도메인에 순차적으로 또는 동시에 부가될 수 있다. 임의의 표면 결합 단계는 경우에 따라서 다음 단계를 진행하기 전에 어레이의 임의의 미결합 성분을 제거하도록 세척 단계가 후속될 수 있다.

[0181] 본 발명은 또한 본원에 기술된 방법을 실시하는데 사용될 수 있는 키트, 성분, 및 소모품을 제공한다. 이하 재료/방법을 본 발명에서 사용한다.

[0182] (i) 샘플/분석물

[0183] 본 발명의 방법에 의해 분석될 수 있는 샘플의 예에는 제한없이, 음식 샘플(음식 추출물, 음식 균질물, 음료 등), 환경 샘플(예를 들면, 토양 샘플, 환경 슬러지, 수집한 환경 에어로졸, 환경 와이프, 물 여과물 등), 산업적 샘플(예를 들면, 산업적 생산 공정 유래의 출발 물질, 생성물 또는 중간물), 인간 임상 샘플, 수의학적 샘플 및 생물학적 기원의 다른 샘플이 포함된다. 분석될 수 있는 생물학적 샘플은, 제한없이, 배설물, 점막 면봉, 생리학적 유체 및/또는 세포 현탁물을 함유하는 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플의 특정 예는 혈액, 혈청, 혈장, 배설물, 점막 면봉, 조직 흡입물, 조직 균질물, 세포 배양물 및 세포 배양 상등액(진핵생물 및 원핵생물 세포의

배양물 포함), 소변, 타액, 가래, 및 뇌척수액을 포함한다.

[0184] 본 발명의 방법을 이용해 측정할 수 있는 분석물은 제한없이, 단백질, 독소, 핵산, 미생물, 바이러스, 세포, 진균, 포자, 탄수화물, 지질, 당단백질, 지질단백질, 다당류, 약물, 호르몬, 스테로이드, 영양소, 대사산물 및 상기 분자의 임의의 개질된 유도체, 또는 상기 분자 중 1 이상을 포함하는 임의의 복합체 또는 이의 조합을 포함한다. 샘플 내 관심 분석물의 수준은 질환 또는 질환 상태를 의미하거나 또는 단순히 환자가 그러한 분석물에 노출되었는지 여부를 의미할 수 있다.

[0185] 본 발명의 어세이는 샘플 내 1 이상, 예를 들면 2 이상의 분석물의 농도를 결정하는데 사용될 수 있다. 따라서, 2 이상의 분석물은 동일한 샘플에서 측정할 수 있다. 동일 샘플에서 측정할 수 있는 분석물의 패널은 예를 들면, 질환 상태 또는 생리학적 상태와 연관된 활성 또는 분석물에 대한 어세이의 패널을 포함한다. 이러한 일정 패널은 사이토카인 및/또는 그들의 수용체(예를 들면, TNF-알파, TNF-베타, IL1-알파, IL1-베타, IL2, IL4, IL6, IL-10, IL-12, IFN- γ 중에서 1 이상 등), 성장 인자 및/또는 그들의 수용체(예를 들면, EGF, VGF, TGF, VEGF 중 1 이상 등), 남용 약물, 치료 약물, 비타민, 병원체 특이적 항체, 자가-항체(예를 들면, Sm, RNP, SS-A, SS-알파, JO-1, 및 Scl-70 항원에 대한 1 이상의 항체), 알레르겐 특이적 항체, 종양 마커(예를 들면, CEA, PSA, CA-125 II, CA 15-3, CA 19-9, CA 72-4, CYFRA 21-1, NSE, AFP 중 1 이상 등), 울혈성 심장병 및/또는 급성 심근 경색을 포함한 심장 질환의 마커(예를 들면, 트로포닌 T, 트로포닌 I, 미오글로빈, CKMB, 미엘로퍼옥시다아제, 글루타티온 퍼옥시다아제, β -나트륨이노 단백질(BNP), 알파-나트륨이노 단백질(ANP), 엔도텔린, 알도스테론, C-반응성 단백질(CRP) 중 1 이상 등), 항상성과 연관된 마커(예를 들면, 피브린 단량체, D-이량체, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 프로트롬빈 단편 1 & 2, 항-인자 Xa 중 1 이상 등), 급성 간염 바이러스 감염의 마커(예를 들면, A형 간염 바이러스에 대한 IgM 항체, B형 간염 바이러스 코어 항원에 대한 IgM 항체, B형 간염 바이러스 표면 항원, C형 간염 바이러스에 대한 항체 중 1 이상 등), 알츠하이머 질환의 마커(알파-아밀로이드, 베타-아밀로이드, A β 42, A β 40, A β 38, A β 39, A β 37, A β 34, tau-단백질 등), 골다골성의 마커(예를 들면, 가교된 Nor C-텔로펩티드, 전체 테옥시피리디놀린, 유리 테옥시프리디놀린, 오스테오칼신, 알칼리 포스파타아제, 제I형 콜라겐의 C-말단 프로 펩티드, 골특이적 알칼리 포스파타아제 중 1 이상 등), 임신 상태 또는 임신 관련 질병의 마커(예를 들면, 에스트라디올, 프로게스테론, 여포 자극 호르몬(FSH), 황체화 호르몬(LH), 프로락틴, hCG, 테스토스테론 중 1 이상 등), 갑상선 질환의 마커(예를 들면, 갑상선 자극 호르몬(TSH), 전체 T3, 유리 T3, 전체 T4, 유리 T4, 및 역 T3 중 1 이상), 및 전립선 암의 마커(예를 들면, 전체 PSA, 유리 PSA, 복합 PSA, 프로스테트산 포스파타아제, 크레아틴 키나아제 중 1 이상 등)의 패널을 포함한다. 본 발명의 일정 실시양태는 특정한 질환 상태 또는 생리학적 상태와 연관된 예를 들면, 1 이상, 2 이상, 4 이상 또는 10 이상의 분석물(예를 들면, 분석물은 예컨대 상기 열거된 것들과 같은 패널로 함께 분류된다; 예를 들면, 갑상선 질환의 진단에 유용한 패널은 예를 들면 갑상선 자극 호르몬(TSH), 전체 T3, 유리 T3, 전체 T4, 유리 T4, 및 역 T3 중 1 이상을 포함할 수 있음)을 측정하는 단계를 포함한다.

[0186] 본 발명의 방법은 상기 기술된 바와 같이, 광범위한 생물학적 및 생화학적 제제의 검출을 가능하도록 디자인된다. 일 실시양태에서, 방법은 제한없이, 혈액, 가래, 대변, 여과물, 면봉 샘플을 포함하는, 다양한 관련 임상적 및 환경적 매트릭스에서의 생물학적 무기("BWA")를 포함하여 병원성 및/또는 잠재적인 병원성 바이러스, 박테리아 및 독소를 검출하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 방법을 이용해 분석할 수 있는(단독으로 또는 조합하여) 병원균 및 독소의 비제한적인 목록은 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*)(탄저병), 예시니아 페스티스(*Yersinia pestis*)(흑사병), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*)(콜레라), 프란시셀라 투라렌시스(*Francisella tularensis*)(야토병), 브루셀라 종(*Brucella spp.*)(브루셀라병), 콕시엘라 버네티(*Coxiella burnetii*)(Q 열), 리스테리아(*listeria*), 살모넬라(*salmonella*), 시겔라(*shigella*), 브이. 콜레라(*V. cholera*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 버크홀데리아 슈노말레이(*Burkholderia pseudomallei*), 바리올라 바이러스를 포함하는 오르쏘포क्स 바이러스(천연두), 바이러스성 뇌염, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEE), 서부 말 뇌염 바이러스(WEE), 동부 말 뇌염 바이러스(EEE), 알파바이러스, 바이러스 출혈열, 아레나바이러스과, 분야바이러스과, 필로바이러스과, 플라비바이러스과, 에볼라 바이러스, 스타필로코커스 장독소, 리신, 보툴리눔 독소(A, B, E), 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 마이코독소, 푸사리움(*Fusarium*), 마이로테시움(*Myrotecium*), 세팔로스포리움(*Cephalosporium*), 트리코더마(*Trichoderma*), 버티시모노스포리움(*Verticimonosporium*), 스타키보트리스(*Stachybotrys*), 마비저, 밀 곰팡이, 바실러스 글로비기(*Bacillus globigii*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 황우, 트리코테센 마이코독소, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 아플라독소, 제노필라 케오피스(*Xenopsylla cheopis*), 디아마누스 몬타누스(*Diamanus montanus*), 맬러스트림, 윈두, 아레나바이러스, 한타바이러스, 라사열, 아르헨티나 출혈열, 볼리비아 출혈열, 리프트 밸리 열 바이러스, 크리미안-콩고 바이러스, 한타 바이러스, 마르부르크 출혈열, 황열

바이러스, 땡구열 바이러스, 인플루엔자(H5N1 조류 인플루엔자, 인플루엔자 A, 인플루엔자 A, H1 특이적, 인플루엔자 A, H3 특이적, 인플루엔자 A, H5 특이적, 인플루엔자 A, 2009-H1N1 특이적, 인플루엔자 B를 포함하는 인간 및 동물 균주 포함), RSV, 인간 면역결핍 바이러스 I 및 II(HIV I 및 II), A형 간염, B형 간염, C형 간염, 간염(비-A, B 또는 C), 엔테로바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 나이세리아 고노레아(*Neisseria gonorrhoeae*), 트리코모나스 바지날리스(*Trichomonas vaginalis*), 인간 파필로마 바이러스, 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 보렐리아 버그돌페리(*Borellia burgdorferi*), 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 마이코플라스마 뉴모니아(*Mycoplasma pneumoniae*), 클라미도필라 뉴모니아(*Chlamydophila pneumoniae*), 레지오넬라(*Legionella pneumophila*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스태필로코커스 엔테로톡신 B(*Staphylococcus Enterotoxin B*)(SEB), 아브린, 시가 독소 1, 시가 독소 2, 모라셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*), 스트렙토코커스 파이오제네스(*Streptococcus pyogenes*), 클로스트리디움 디피실(*Clostridium difficile*), 나이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 그룹 A 스트렙토코커스, 이. 콜라이(*E. Coli*) O157, 코로나바이러스, 콕사키 A 바이러스, 리노바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 메타뉴모바이러스, 백시니아, 및 아데노바이러스이다.

[0187] (ii) 결합 시약

[0188] 결합 어세이 분야의 숙련가는 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 결합제 및 동반 결합 파트너의 범주를 쉽게 이해한다. 이러한 쌍의 비제한적인 목록은 (어떠한 순서든) 올리고뉴클레오티드 및 보체, 수용체/리간드 쌍, 항체/항원, 천연 또는 합성 수용체/리간드 쌍, 아민 및 카르보닐 화합물(즉, 슈프 염기의 형성을 통한 결합), 합텐/항체 쌍, 항원/항체 쌍, 에피토프/항체 쌍, 미미토프/항체 쌍, 압타머/표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 및 인터칼레이터/표적 분자 쌍을 포함한다.

[0189] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 방법의 결합 어세이는 결합 시약으로서 항체 또는 다른 수용체 단백질을 적용한다. 용어 "항체"는 온전한 항체 분자(항체 서브유닛의 시험관내 재회합을 통해 조립된 하이브리드 항체를 포함), 항체의 항원 결합 도메인을 포함하는 항체 단편 및 재조합 단백질 구성체(예를 들면, [Porter, R. R. and Weir, R. C. *J. Cell Physiol.*, 67 (Suppl); 51-64 (1966)] 및 [Hochman, I. Inbar, D. 및 Givol, D. *Biochemistry* 12: 1130 (1973)]에 기술된 바와 같음)와, 예를 들면 검출가능한 표지의 도입을 통해, 화학적으로 개질된 항체 구성체를 포함한다.

[0190] (iii) 표적화제, 연결제 & 가교제

[0191] 결합 시약은 간접적으로 또는 직접적으로, 고체상 및/또는 서로에 그들을 부착시킬 수 있는 성분들에 연결된다. 이들 성분은 표적화제 및 연결제로서 본원에서 언급된다. 본원에서 사용하는 바와 같이, 표적화제 및 그들 보체는 표면 또는 지지체에 결합 시약을 부착시키는데 사용되는 반면, 연결제 및 보조 연결제는 하나가 사용되면, 가교제를 통해서 직접적으로 또는 간접적으로, 표적화제에 결합 시약을 부착시키는데 사용된다.

[0192] 일 실시양태에서, 표적화제 및 이의 보체는 제1 올리고뉴클레오티드 및 상보성 올리고뉴클레오티드, 수용체-리간드 쌍, 항원-항체 쌍, 합텐-항체 쌍, 에피토프-항체 쌍, 미메토프-항체 쌍, 압타머-표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 또는 인터칼레이터-표적 분자 쌍을 포함한다. 어세이에서 사용된 표적화제 및 보체는 어세이에 의해 측정된 분석물(예를 들면, 제1 분석물)에 대한 결합 시약과 회합된 표적화제 및 보체가 어세이에 의해 측정된 다른 분석물(예를 들면, 제2 분석물)에 대한 결합 시약과 회합된 표적화제 및 보체와 실질적으로 비가교 반응성이라도 선택된다. 따라서, 본 발명의 어세이에서, 그의 회합된 결합 도메인과 결합 시약의 결합(그의 회합된 표적화제 및 표적화제 상보체를 통함)은 다른 분석물(및 존재하는 상이한 표적화제 상보체)과 회합된 결합 도메인과 그 결합 보다 실질적으로 높아야 한다. 바람직하게 올바른 결합 도메인과의 결합에 비하여 다른 분석물과 연관된 결합 도메인과 분석물에 대한 결합 시약의 결합에 대한 교차 반응성은 < 1%, 보다 바람직하게는 < 0.1%, 보다 바람직하게는 < 0.01%이다. 바람직한 실시양태에서, 표적화제/표적화제 상보체는 상보성 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함하고, 표적화제 및 그의 상보체는 그의 상보체에 표적화제가 혼성화되기에 충분한 조건 하에서 접촉된다.

[0193] 바람직한 길이는 대략 5 내지 100 염기, 바람직하게, 대략 10 내지 50 염기, 보다 바람직하게 대략 10 내지 25 염기이다. 또한, 표적화 올리고뉴클레오티드 서열은 길이가 동일할 필요는 없고, 일정 실시양태에서, 예를 들면, 최대 25 베이스, 또는 최대 15 베이스, 또는 최대 10 베이스만큼, 그 결합 파트너 보다 긴 하나의 표적화

올리고뉴클레오타이드 서열을 제공하는 것이 유리할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 서열 및 그들의 상보체는 유사한 결합 에너지(또는 용융 온도) 및 낮은 쌍간 교차 반응성(예를 들면, 다중화 핵산 어세이를 위한 프로브 또는 프라이머를 선택하기 위한 산업적 또는 공공 소프트웨어)을 갖는 상보성 올리고뉴클레오타이드의 쌍을 생성시키기 위한 당분야에 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 서열은 천연 발생 핵산 염기와 비천연 발생 및/또는 개질 염기를 포함한다. 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드 서열은 EraGen Biosciences, Inc.(www.eragen.com)에서 입수할 수 있는, 개별적으로 사이토신 및 구아닌의 화학적 변이체인, Iso-dC 및/또는 Iso-dG를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드 서열로 이러한 개질 염기의 도입은 효과적으로 유전자 알파벳을 확대시키고 특이성을 증가시키고 불일치 혼성화 가능성을 감소시키는 올리고뉴클레오타이드의 합성을 허용한다. 예를 들면, Iso-dC를 함유하는 올리고뉴클레오타이드는 Iso-dG를 함유하는 상보성 올리고에 혼성화되지만 임의의 천연 발생 핵산 서열에는 혼성화하지 않도록 디자인된다.

[0194] 일 접근법에서, 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 다음의 규칙 중 1 이상, 바람직하게는 전부를 기반으로 올리고뉴클레오타이드 서열 쌍을 생성시킬 수 있다: (i) 약 40-60%, 예를 들면, 40-50%의 GC 함량; (ii) 3을 넘지 않는 서열 내 염기 반복부의 최대 스트링; (iii) 한 줄에 일치부가 4를 넘지 않는, 상이한 쌍의 서열간에 6의 염기쌍 일치 최대수; (iv) 스템 영역 내 4 이상의 염기쌍 일치부를 가지면 2-5, 올리고뉴클레오타이드의 예상 헤어핀 루프 크기를 갖는 서열은 배제(6 또는 그 이상의 루프 크기가 유지됨); 및 (v) 0-60% 또는 40-50% GC 함량에 의한 특이적 상호작용의 높은 자유 에너지(G°) (ΔG° 는 온도 및 염 농도에 의존적이고, 23° C 및 200 mM의 단가 양이온, pH 7.0에서, ΔG° 는 바람직하게 -15 kcal/mol을 넘는다). 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 선택에서, 상기 정의된 1 이상의 규칙과 함께, 적어도 상대적인 GC 함량 및 ΔG° 를 고려한다. 일 실시양태에서, 비특이적 결합이 최소화된 올리고뉴클레오타이드 서열을 디자인하는 것이 유리하고 이는 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들면, 어레이에서 사용되는 다른 뉴클레오타이드 쌍을 갖는 3을 넘지 않는 연속된 G/C 쌍을 형성하는 올리고뉴클레오타이드/올리고뉴클레오타이드 쌍을 디자인한다. 대안적으로 또는 부가적으로, 다음의 구성 중 1 이상은 피한다: 어레이에서 사용되는 다른 올리고뉴클레오타이드와 쌍을 이룰 경우 G/C-풍부 서열 사이에 위치한 단일 뉴클레오타이드 미일치부 또는 단일 뉴클레오타이드 루프의 형성.

[0195] 일 실시양태에서, 표적화제 및 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드의 쌍을 포함하고, 여기서 쌍은 하기 표 1(a)의 서열 쌍 중 하나에서 선택된다:

쌍 #	서열 (5'-3')	쌍 #	서열 (5'-3')
1	actcactaatt (서열번호 1)	13	caattcagaa (서열번호 25)
	aactaccgat (서열번호 2)		tatctcaaacg (서열번호 26)
2	agctcccaatt (서열번호 3)	14	ctctacaagcc (서열번호 27)
	caattcaaaa (서열번호 4)		tcacattcaag (서열번호 28)
3	aaagaaatcc (서열번호 5)	15	ctttctagcc (서열번호 29)
	gactctctct (서열번호 6)		atcccaaaa (서열번호 30)
4	agctcaagca (서열번호 7)	16	gacataagca (서열번호 31)
	tcaactaacct (서열번호 8)		tcacttatgc (서열번호 32)
5	atcagatagc (서열번호 9)	17	gccatagctct (서열번호 33)
	gcattatccc (서열번호 10)		aaactatagc (서열번호 34)
6	atctaccacc (서열번호 11)	18	actaattcaac (서열번호 35)
	gactcaatgc (서열번호 12)		tgetpaatgc (서열번호 36)
7	attacagacc (서열번호 13)	19	gctcatttca (서열번호 37)
	gtcccaata (서열번호 14)		taaacaccac (서열번호 38)
8	caagatttca (서열번호 15)	20	gttgattctgc (서열번호 39)
	tttaaacctct (서열번호 16)		gacaaaccac (서열번호 40)
9	caagttccat (서열번호 17)	21	taccagaaat (서열번호 41)
	aaataaacct (서열번호 18)		ttaattcaat (서열번호 42)
10	catccaatcc (서열번호 19)	22	tacttacttg (서열번호 43)
	ttagattgat (서열번호 20)		ccaagtcaag (서열번호 44)
11	ctcaaatatc (서열번호 21)	23	tccacttaag (서열번호 45)
	atcattatag (서열번호 22)		cccttagaga (서열번호 46)
12	caaatagat (서열번호 23)	24	tigtcaagc (서열번호 47)
	acttcaattc (서열번호 24)		gacctagca (서열번호 48)
		25	tttccctact (서열번호 49)
			taacaaagaa (서열번호 50)

[0196] 특정한 실시양태에서, 표적화제 및 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오타이드의 쌍을 포함하고, 여기서 쌍은 표 1(b)의 하기 서열 쌍 중 하나에서 선택된다:

쌍 #	서열	변형	서열
1	3'	-티올	actcactaatt (서열번호 1)
	3'	-비오딘	aactaccgat (서열번호 2)
3	3'	-티올	aaagaaatcc (서열번호 5)
	3'	-비오딘	caattcaaaa (서열번호 4)
6	3'	-티올	atctaccacc (서열번호 11)
	3'	-비오딘	gactcaatgc (서열번호 12)
7	3'	-티올	attacagacc (서열번호 13)
	3'	-비오딘	gtcccaata (서열번호 14)
8	3'	-티올	caagttccat (서열번호 17)
	3'	-비오딘	aaataaacct (서열번호 18)
9	3'	-티올	caatcccatc (서열번호 19)
	3'	-비오딘	tttaaacctct (서열번호 16)
11	3'	-티올	caagatttca (서열번호 15)
	3'	-비오딘	tttaaacctct (서열번호 16)
12	3'	-티올	caaatagat (서열번호 23)
	3'	-비오딘	acttcaattc (서열번호 24)
13	3'	-티올	caattatagc (서열번호 22)
	3'	-비오딘	tatctcaaacg (서열번호 26)
16	3'	-티올	gacataagca (서열번호 31)
	3'	-비오딘	tcacttatgc (서열번호 32)
17	3'	-티올	gccatagctct (서열번호 33)
	3'	-비오딘	aaactatagc (서열번호 34)
18	3'	-티올	actaattcaac (서열번호 35)
	3'	-비오딘	tgetpaatgc (서열번호 36)
20	3'	-티올	gctcatttca (서열번호 37)
	3'	-비오딘	taaacaccac (서열번호 38)
23	3'	-티올	gttgattctgc (서열번호 39)
	3'	-비오딘	gacaaaccac (서열번호 40)
24	3'	-티올	taccagaaat (서열번호 41)
	3'	-비오딘	tttaattcaat (서열번호 42)
25	3'	-티올	tacttacttg (서열번호 43)
	3'	-비오딘	ccaagtcaag (서열번호 44)
26	3'	-티올	tccacttaag (서열번호 45)
	3'	-비오딘	cccttagaga (서열번호 46)
27	3'	-티올	tigtcaagc (서열번호 47)
	3'	-비오딘	gacctagca (서열번호 48)
28	3'	-티올	tttccctact (서열번호 49)
	3'	-비오딘	taacaaagaa (서열번호 50)

[0198]

- [0199] 표적화제 및 표적화제 상보체는 1:1 비율로 존재할 수 있다. 대안적으로, 그 상보체에 표적화제가 결합하는 가능성을 증가시키기 위해서, 표적화제는 과량으로, 예를 들면 2:1의 표적화제 대 표적화제 상보체의 비율로 존재한다.
- [0200] 일 실시양태에서, 적합한 연결제 및 보조 연결제는 연결 복합체를 형성하도록 반응하는 화학 모이어티를 포함한다. 예를 들면, 연결 복합체는 연결제 및 보조 연결제 상에 존재하는 화학적 모이어티, 예를 들면 티올 기와 말레이미드 또는 요오도아세트아미드 기; 알데히드와 히드라지드; 또는 알킨과 아지드 사이의 결합 상호작용에 의해 형성된다.
- [0201] 대안적으로, 연결 복합체는 연결제와 보조 연결제 사이의 단백질-단백질 결합 반응에 의해 형성된다. 예를 들면, 단백질-단백질 결합 반응은 수용체/리간드 쌍, 합텐/항체 쌍, 항원/항체 쌍, 에피토프/항체 쌍, 미미토프/항체 쌍, 압타머/표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 및 인터칼레이터/표적 분자 쌍 사이의 결합을 통해 형성될 수 있다. 일 실시양태에서, 연결제는 바이오틴이고, 보조 연결제는 스트렙타비딘 또는 아비딘(또는 그 반대)이거나; 또는 연결제는 펩티드이고 보조 연결제는 항펩티드 항체(또는 그 반대)이다.
- [0202] 본원에 기술된 일정 실시양태는 보조 연결제에 직접 결합된 연결제를 적용한다. 이들 및 다른 이러한 실시양태에서, 서로 결합되는 연결제 및 보조 연결제는 가교제에 동시발생적으로 결합할 수 있는 연결제 및 보조 연결제로 치환될 수 있다. 이들 대안적인 실시양태에서, 가교제는 표적화 복합체를 형성시, 연결제 및 보조 연결제의 혼합물에 포함된다. 가교제는 사용되면, 연결제 및 보조 연결제에 결합된다. 예를 들면, 가교제는 연결제에 대한 결합 부위 및 보조 연결제에 대한 추가적인 결합 부위를 포함하고, 3중 성분, 즉 가교제, 연결제, 및 보조 연결제의 배합물은 가교 복합체를 포함한다. 일 실시양태에서, 가교제는 스트렙타비딘 또는 아비딘(이들 각각은 바이오틴에 대한 4개의 독립적인 결합 부위를 갖는 사량체임)이고 연결제 및 보조 연결제는 각각 바이오틴이고, 그에 따라 가교 복합체는 (바이오틴-(스트렙타비딘(또는 아비딘))-바이오틴)을 포함한다.
- [0203] 바람직한 실시양태에서, 연결 복합체는 연결제, L_A 와 보조 연결제, L_A' 사이의 결합 반응에 의해 형성된다. 다중화 어세이 포맷은 분석물 A, B, 및 C를 검출하도록 구성되고, 따라서 그들 개별 분석물과 상호작용하도록 디자인된 시약 복합체는 L_A 및 L_A' , L_B 및 L_B' , 및 L_C 및 L_C' 에서 선택된 연결제 및 보조 연결제를 포함한다. 결합 복합체를 구축하는데 사용되는 각각의 연결제/보조 연결제 쌍은 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 연결제/보조 연결제 쌍 각각은 동일한 시약 세트를 포함한다. 특히 바람직한 실시양태에서, 연결제/보조 연결제 쌍 각각은 예를 들면, 결합 시약 상의 연결제로서 바이오틴 분자 및 보조 연결제로서 표적화제 상의 스트렙타비딘 또는 아비딘 분자(또는 그 반대)를 포함한다. 또한, 연결 복합체는 또한 결합 시약 상의 바이오틴 분자와 표적화제 상의 스트렙타비딘 또는 아비딘 분자 사이의 결합 반응에 의해 형성될 수 있고, 여기서 스트렙타비딘 또는 아비딘 분자는 표적화제 상의 바이오틴 분자(가교제로서 작용)와의 반응을 통해 표적화제에 결합된다. 바람직한 실시양태에서, 연결 복합체가 개별적으로, 결합 시약 및 표적화제 상의 바이오틴과 스트렙타비딘 분자(또는 그 반대) 사이에 형성되면, 용액 중에서 배합될 수 있는 추가적인 결합 시약과 표적화제간 교차 반응을 방지하도록 과량의 유리 바이오틴 분자를 부가할 수 있다.
- [0204] (iv) 고체상
- [0205] 광범위한 고체상은 결합 어세이 분야로부터의 통상적인 고체상을 포함하는 본 발명의 방법에서 사용하는데 적합하다. 고체상은 중합체(예를 들면, 폴리스티렌 및 폴리프로필렌), 세라믹, 유리, 합성재(예를 들면, 탄소-중합체 합성재 예컨대 탄소계 잉크)를 포함한 다양한 다른 재료로부터 제조될 수 있다. 적합한 고체상은 육안으로 보이는 물체의 표면 예컨대 어세이 용기의 내면(예를 들면, 시험관, 큐벳, 플루오 셀, 카트리지, 다중웰 플레이트의 웰 등), 슬라이드, 어세이 칩(예컨대 유전자 또는 단백질 칩 측정에서 사용되는 것들), 핀 또는 프로브, 비드, 여과 매질, 측면 흐름 매질(예를 들면, 측면 흐름 시험 스트립에서 사용되는 여과막) 등을 포함한다.
- [0206] 적합한 고체상은 또한 다른 유형의 입자 기반 어세이의 다른 유형에서 통용되는 입자(제한없이, 콜로이드 또는 비드), 예를 들면 마그네틱, 폴리프로필렌, 및 라텍스 입자, 고체상 합성에서 전형적으로 사용되는 재료, 예를 들면 폴리스티렌 및 폴리아크릴아미드 입자, 및 크로마토그래피 용도에서 전형적으로 사용되는 재료, 예를 들면 실리카, 알루미늄, 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌을 포함한다. 재료들은 또한 섬유 예컨대 탄소 섬유일 수 있다. 미세입자는 무생물이거나 또는 대안적으로 살아있는 생물학적 독립체 예컨대 세포, 바이러스, 박테리아 등을 포함할 수 있다. 본 방법에서 사용되는 입자는 1 이상의 결합 시약에 부착하기 적합하고, 예를 들면 원심 분리, 중력, 여과 또는 자성 수집을 통해 채취될 수 있는 임의의 재료로 구성될 수 있다. 결합 시약에 부착될

수 있는 광범위하게 상이한 유형의 입자는 결합 어세이에서 상업적으로 사용하기 위한 고체이다. 이들은 비자성 입자를 비롯하여 입자가 자기장으로 수집될 수 있는 자기화 재료를 포함하는 입자를 포함한다. 일 실시양태에서, 입자는 도체 및/또는 반도체 재료, 예를 들면 콜로이드 금 입자로 구성될 수 있다. 미세입자는 광범위한 크기 및 형상을 가질 수 있다. 예로서 제한없이, 미세입자는 5 나노미터 내지 100 마이크로미터일 수 있다. 바람직하게, 미세입자는 크기가 20 nm 내지 10 마이크로미터이다. 입자는 구형, 직사각형, 막대유사형 등 이거나, 또는 형상이 불규칙할 수 있다.

[0207] 도 6(a)-(c)은 본 발명에서 사용할 수 있는 다양한 입자 세트를 예시한다. 도 6(a)는 별개의 표적화제로 각각 개질된, 1 이상의 바이알, 용기, 또는 구획에 제공되는, 입자 세트를 도시한다. 대안적으로, 도 6(b)에 도시한 바와 같이, 입자 세트는 별개의 결합 시약으로 각각 개질된, 1 이상의 바이알 용기, 또는 구획에 제공될 수 있고, 결합 시약은 입자 표면 상의 표적화제에 결합된 표적화제 상보체에 대한 결합 시약(보조 연결체 연결을 포함)을 포함하는 표적화 복합체 내 입자에 부착된다. 여전히 또한, 도 6(c)는 입자의 혼합 세트를 제공하는 또 다른 실시양태를 도시하며, 여기서 서브세트는 각각 별개의 결합 시약(도 6(b)에서 처럼)으로 개질된 입자를 포함하고 서브세트는 각각 별개의 표적화제로 개질된 입자(도 6(a)처럼)를 포함한다. 도 6(c)에 도시된 입자는 예정된 분석물 세트에 대한 결합 시약으로 사전설정된 입자의 서브세트 및 분석물의 추가 세트에 대한 결합 시약의 추가 세트를 부착하기 위해서, 즉 추가적인 결합 시약을 포함하는 표적화 복합체의 추가적인 세트에 입자를 결합시켜서, 사용자에게 의해 개질될 수 있는 비설정 입자의 서브세트를 포함한다. 이들 추가적인 시약은 사용자에게 의해 제공되어서 사용자가 사전정의된 어세이 세트에 사용자 정의된 어세이 세트를 부가할 수 있게 한다.

[0208] 본 방법에서 사용되는 입자는 입자 혼합물 중 입자의 하위개체군 또는 특이적 입자의 식별이 가능하도록 암호화될 수 있다. 이러한 암호화된 입자의 사용은 결합 어세이를 위한 고체상 지지체로서 입자를 적용한 어세이의 다중검출이 가능하도록 사용되었다. 일 접근법에서, 입자는 1 이상의 형광발광성 염료를 포함하도록 제작되고 입자의 특별한 개체군은 1 이상의 파장에서 형광발광 발광 강도 및/또는 상대적 강도를 기반으로 식별된다. 이러한 접근법은 루미네스 xMAP 시스템(예를 들면, 미국 특허 제6,939,720호) 및 벡톤 디킨슨 혈구측정 비드 어레이 시스템에서 사용되었다. 대안적으로, 입자는 다른 물리적 특성 예컨대 크기, 형상, 내포된 광패턴 등의 차이를 통해 암호화될 수 있다. 도 6(a)-(c)에서 입자의 교차 해칭으로 표시한 바와 같이, 혼합물 또는 입자 세트로 제공된 1 이상의 입자는 입자 광학 특성, 크기, 형상, 내포된 광패턴 등에 의해 혼합물 내 다른 입자와 구별될 수 있도록 암호화될 수 있다.

[0209] 대안적으로 또는 부가적으로, 결합 시약은 결합 시약 복합체를 통해서 1 이상의 고체상 위, 예를 들면 결합 어레이 내에서 상이한 개별 결합 도메인에 결합할 수 있고, 그 결과 개별 어세이 신호가 각각의 결합 도메인 상에서 생성되고, 따라서 이들 도메인에 결합된 상이한 분석물을 독립적으로 측정할 수 있다. 이러한 실시양태의 일례에서, 결합 도메인은 개별 도메인 상에 구축된 결합 시약 복합체를 통해서, 관심 분석물에 결합하도록 구성된 표적화제의 개별 도메인을, 1 이상의 표면 상에 고정시켜서 제조된다. 경우에 따라서, 표면(들)은 샘플을 수용하거나 또는 샘플이 통과하는 용기(예를 들면, 플로우 셀, 웰, 큐벳 등)의 1 이상의 경계를, 부분적으로 한정할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 개별 결합 도메인은 전기화학 또는 전기화학발광 어세이에서 사용하기 위한 전극 상에 형성된다. 전기화학발광을 이용하는 복수의 결합 도메인을 포함하는 표면 상의 분석물의 다중화 측정은 Meso Scale Diagnostics, LLC, MULTI-ARRAY® 및 SECTOR® Imager 라인 또는 제품(예를 들면, 미국 특허 제 7,842,246호 및 제6,977,722호를 참조하며, 이들 전체를 참조하여 본원에 편입시킴)에서 사용되었다.

[0210] 도 6(d)-(f)은 본 발명에서 사용할 수 있는 별개의 결합 도메인을 포함하는 다양한 대안적인 플레이트 포맷을 예시한다. 도 6(d)는 개별 표적화제로 각각 개질된 복수의 결합 도메인을 보유하는 표면을 도시한다. 대안적으로, 도 6(e)에 도시한 바와 같이, 표면은 별개의 결합 시약으로 각각 개질된 복수의 결합 도메인을 보유하게 제공될 수 있으며, 결합 시약은 결합 도메인 상의 표적화제에 결합된 표적화제 상보체에 대한 결합 시약(보충 연결에 연결에 의함)을 포함하는 표적화 복합체의 결합 도메인에 부착된다. 여전히 또한, 도 6(f)는 표면 상의 결합 도메인의 혼합 세트를 제공하는 또 다른 실시양태를 도시하며, 여기서 서브세트는 별개의 결합 시약으로 각각 개질된 결합 도메인(도 6e에서 처럼)을 포함하고 서브세트는 별개의 표적화제에 의해 각각 개질된 결합 도메인(도 6(d)에서 처럼)을 포함한다. 도 6(f)에 도시된 결합 도메인은 예정된 분석물 세트에 대한 결합 시약으로 사전구성된 결합 도메인의 서브세트 및 분석물의 추가 세트에 대한 결합 시약의 추가 세트를 부착시키도록 사용자에게 의해 개질될 수 있는 미구성된 결합 도메인의 서브세트, 즉 이들 미구성된 결합 도메인을 추가적인 결합 시약을 포함하는 표적화 복합체의 추가 세트에 결합시킨, 서브세트를 포함한다. 이들 추가적인 시약은 사용자에게 의해 제공될 수 있고, 따라서 사용자가 사전정의된 어세이 세트에 사용자 정의된 어세이 세트를 부가할 수 있게 한다.

[0211] 시약, 즉 표적화제는 공지의 방법, 예를 들면 어세이를 형성하거나 또는 입자를 개질시키는 확립된 방법에 의해 표면에 결합될 수 있다. 표면에 단백질 또는 올리고뉴클레오티드를 부착시키는 방법의 비제한적인 일례는 도 7에 예시하였다. 이 방법은 충분히 입증된 이중성이작용성 가교연결제(cross-linking agent)인, 설포숙신이미드-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(설포-SMCC)를 사용한다. SMCC의 N-히드록시숙신이미드(NHS)기와 소 혈청 알부민(BSA)의 반응은 BSA를 티올-반응성 말레이미드 기로 표지화시킨다. 이어서 말레이미드 기는 티올-개질된 올리고뉴클레오티드와 반응하여 안정한 티오에테르 결합을 통해 연결되는 BSA-올리고뉴클레오티드 접합체를 형성한다. 이들 시약의 어레이는 단백질(예컨대 BSA)을 흡착하거나 또는 그와 반응하는 표면 위 시약의 프린팅 패턴에 의해 형성될 수 있고, 그에 따라 회합된 올리고뉴클레오티드의 패턴화 어레이가 생성된다. 특정 일례에서, 흑연 탄소 표면, 바람직하게 스크린 프린팅된 탄소 잉크 전극 상에 BSA-올리고뉴클레오티드 접합체의 어레이를 프린팅하여 형성된다. 놀랍게도, 본 발명자들은 티올-개질된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 티올-개질된 시약이 스크린-프린팅된 탄소 잉크 전극을 포함하는 흑연 탄소 표면과 비가역적으로 반응함을 발견하였다(심지어 단백질 예컨대 BSA에 접합되지 않았을 경우도). 따라서, 티올-개질된 시약(티올 개질된 올리고뉴클레오티드 및 펩티드 포함)은 탄소 표면을 시약을 함유하는 용액과 항온반응시켜서 시약이 표면과 비가역적으로 반응할 수 있게 하여 탄소 표면 상에 고정될 수 있다. 또한, 이러한 티올-개질된 시약의 어레이(티올-개질된 올리고뉴클레오티드 및/또는 펩티드를 포함하는 어레이 포함)는 탄소 표면 상에 이들 시약을 함유하는 용액을 프린팅하고, 표면 상의 패턴화된 용액을 항온반응시켜 시약이 표면과 비가역적으로 반응되도록 하여 형성될 수 있다.

[0212] (v) 어세이 장치 및 보조(보충) 시약

[0213] 본 발명의 방법은 다양한 어세이 장치 및/또는 포맷으로 사용될 수 있다. 어세이 장치는 예를 들면 어세이를 진행하면서 부가하거나 또는 웰, 챔버, 또는 어세이 모듈의 어세이 영역에 사전적재된 어세이 시약(표적화제 또는 다른 결합 시약을 포함할 수 있음)을 갖는, 어세이 모듈, 예컨대 어세이 플레이트, 카트리지, 다중웰 어세이 플레이트, 반응 베슬, 시험관, 큐벳, 플로우 셀, 어세이 칩, 측면 흐름 장치 등을 포함할 수 있다. 이들 장치는 특이적 결합 어세이를 위한 다양한 어세이 포맷, 예를 들면 면역어세이 또는 면역크로마토그래피 어세이를 적용할 수 있다. 예시적인 어세이 장치 및 포맷을 이하 본원에서 기술한다. 일정 실시양태에서, 본 발명의 방법은 건조 상태로 저장되는 어세이 시약을 적용할 수 있고 어세이 장치/키트는 건조 상태로 어세이 시약을 유지하기 위한 건조제를 더 포함하거나 또는 건조제가 제공될 수 있다. 어세이 시약이 사전적재된 어세이 장치는 보관 동안 우수한 안정성을 유지하면서 속도를 상당히 개선시키고 어세이 측정의 복잡성을 감소시킨다. 건조된 어세이 시약은 건조시키고 이어서 어세이에 사용전 재구성할 수 있는 임의의 어세이 시약일 수 있다. 이들은 제한없이, 결합 어세이에 유용한 결합 시약, 효소, 효소 기질, 지시 염료 및 관심 분석물을 검출하는데 사용할 수 있는 다른 반응성 화합물을 포함한다. 어세이 시약은 또한 제한없이, 차단제, 안정화제, 세제, 염, pH 완충제, 보존제 등을 포함하여 검출 이전에 직접적으로 관여하지 않지만 어세이에서 보조 역할을 하는 물질을 포함한다. 시약은 유리형으로 존재하거나 또는 어세이 모듈 내 구획(예를 들면, 챔버, 채널, 플로우 셀, 웰 등)의 표면 또는 콜로이드, 비드 또는 다른 미립자 지지체의 표면을 포함하는 고체상에 지지될 수 있다.

[0214] (vi) 측정 방법

[0215] 본 발명의 방법은 분석물의 양을 측정, 구체적으로 고체상에 결합된 분석물의 양을 측정하기 위한 다양한 방법을 이용할 수 있다. 사용될 수 있는 기술은 제한없이, 당분야에 공지된 기술 예컨대 세포 배양 기반 어세이, 결합 어세이(응집 시험, 면역어세이, 핵산 혼성화 어세이 등을 포함), 효소 어세이, 비색 어세이 등을 포함한다. 다른 적합한 기술은 당분야의 평균적인 숙련가가 쉽게 이해할 것이다. 일부 측정 기술은 측정을 육안 검사로 가능하게 하고, 다른 것들은 측정을 수행하는 장치의 사용을 요하거나 또는 그로부터 이득을 얻는다.

[0216] 분석물의 양을 측정하는 방법은 제한없이, i) 표면에 분석물 결합 후 표면에서의 질량 또는 굴절률 변화를 측정하는 기술(예를 들면, 표면 음파 기술, 표면 플라즈몬 공명 센서, 타원편광법 등), ii) 질량 분광분석법(표면상의 분석물을 측정할 수 있는 MALDI, SELDI 등의 기술 포함), iii) 크로마토그래피 또는 전기영동 기술, iv) 형광발광 기술(분석물의 고유한 형광발광성을 기반으로 함) 등을 포함하는 표지 무함유 기술을 포함한다.

[0217] 분석물의 양을 측정하는 방법은 또한 분석물에 직접적으로 또는 간접적으로 부착(예를 들면, 분석물의 표지화된 결합 파트너의 사용에 의함)될 수 있는 표지의 검출을 통해 분석물을 측정하는 기술을 포함한다. 적합한 표지는 직접적으로 가시화시킬 수 있는 표지를 포함한다(예를 들면, 육안으로 볼수 있는 입자 및 측정가능한 신호 예컨대 광산란, 광학 흡광도, 형광발광, 화학발광, 전기화학발광, 방사능, 자기장 등을 생성하는 표지). 또한 사용될 수 있는 표지는 효소 또는 측정가능한 신호 예컨대 광산란, 흡광, 형광발광 등을 생성하는 화학 활성을 갖는

다른 화학적 반응종을 포함한다. 표지로서 효소의 사용은 ELISA라고도 불리는 효소-연결 면역흡착 어세이, 효소 면역어세이 또는 EIA에서 충분히 확립되었다. ELISA 포맷에서, 항원의 미지량을 표면에 부착시킨 후 표면에서 특이적 항체를 세척하여 항원에 결합시킨다. 이 항체를 효소에 연결시키고 최종 단계에서 효소가 검출가능한 신호의 변화를 제공하는 생성물로 전환시키는 기질을 부가한다. 생성물의 형성은 예컨대, 흡광, 형광발광, 화학발광, 광산란 등의 측정가능한 특성에서, 기질과 비교되는 차이에 기인하여 검출할 수 있다. 본 발명에 따른 고체상 결합 방법에서 사용할 수 있는 일정(전부는 아님) 측정 방법은 고체상에서 미결합 성분(예를 들면, 표지)을 제거하기 위한 세척 단계로부터 이득을 얻거나 또는 세척 단계를 필요로 한다. 따라서, 본 발명의 방법은 이러한 세척 단계를 포함할 수 있다.

[0218] 일 실시양태에서, 샘플 내 관심 분석물(들)은 전기화학발광 기반 어세이 포맷, 예를 들면 전기화학발광(ECL) 기반 면역어세이를 이용해 측정할 수 있다. ECL의 고감도, 광범위한 역학 범위 및 선택성은 의학 진단에서 중요한 인자이다. 상업적으로 입수할 수 있는 ECL 장치는 특출한 성능이 입증되었고 이들은 그들의 우수한 감도, 역학 범위, 정밀함 및 복합체 샘플 매트릭스의 내성을 포함한 이유로 광범위하게 사용되어 왔다. ECL을 방출하도록 유도할 수 있는 중(ECL-활성종)이 ECL 표지로서 사용되는데, 예를 들면, i) 예를 들면, 금속이 Ru-함유 및 Os-함유 유기금속성 화합물 예컨대 트리스-비피리딜-루테튬(RuBpy) 모이어터를 포함한 VIII족의 귀금속에서 유래된 유기금속성 화합물 및 ii) 루미놀 및 관련 화합물이 사용되었다. ECL 과정에서 ECL 표지로 참여하는 종은 본원에서 ECL 공반응물이라고 한다. 통용되는 공반응물은 3차 아민(예를 들면, 미국 특허 제5,846,485호 참조), 옥살레이트, 및 RuBpy 유래 ECL에 대한 퍼셀레이트 및 루미놀 유래 ECL에 대한 과산화수소(예를 들면, 미국 특허 제5,240,863호 참조)를 포함한다. ECL 표지에 의해 생성되는 빛은 진단 과정에서 리포터 신호로서 사용될 수 있다(참조하여 본원에 편입시킨, Bard 등의 미국 특허 제5,238,808호). 예를 들면, ECL 표지는 결합제 예컨대 항체, 핵산 프로브, 수용체 또는 리간드에 공유적으로 커플링되고; 결합 상호작용에서 결합 시약의 참여는 ECL 표지로부터 방출되는 ECL을 측정하여 모니터링할 수 있다. 대안적으로, ECL-활성 화합물 유래의 ECL 신호는 화학적 환경을 의미할 수 있다(예를 들면, ECL 공반응물의 형성 또는 파괴를 모니터링하는 ECL 어세이를 기술한 미국 특허 제5,641,623호를 참조함). ECL 어세이를 수행하기 위한 ECL, ECL 표지, ECL 어세이 및 장치에 대한 보다 많은 배경지식은, 이하의 미국 특허 제5,093,268호; 제5,147,806호; 제5,324,457호; 제5,591,581호; 제5,597,910호; 제5,641,623호; 제5,643,713호; 제5,679,519호; 제5,705,402호; 제5,846,485호; 제5,866,434호; 제5,786,141호; 제5,731,147호; 제6,066,448호; 제6,136,268호; 제5,776,672호; 제5,308,754호; 제5,240,863호; 제6,207,369호; 제6,214,552호 및 제5,589,136호 및 PCT 공개 출원 W099/63347; W000/03233; W099/58962; W099/32662; W099/14599; W098/12539; W097/36931 및 W098/57154를 참조하며, 이들 전체를 참조하여 본원에 편입시킨다.

[0219] 본 발명의 방법은 다중 어세이 측정을 단일한 샘플에 대해 수행하는 단일검출 또는 다중검출 포맷에 적용될 수 있다. 본 발명과 사용할 수 있는 다중검출 측정은 제한없이, i) 다중 센서의 사용을 포함하거나; ii) 표면 상의 위치 기반으로 구별할 수 있는 표면(예를 들면, 어레이) 상의 개별 어세이 도메인을 이용하거나; iii) 입자 특성 예컨대 크기, 형상, 색상 등을 기반으로 구별할 수 있는 입자상에 코팅된 시약의 사용을 포함하거나; iv) 광학 특성(예를 들면, 흡광 또는 발광 스펙트럼)을 기반으로 구별할 수 있는 어세이 신호를 생성시키거나; 또는 v) 어세이 신호의 일시적 특성(예를 들면, 신호의 시간, 빈도 또는 상)을 기반으로 하는 다중 측정을 포함한다.

[0220] (vii) 키트

[0221] 일 실시양태에서, 본 발명은 각각 제1 및 제2 표적화제, 예를 들면 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 복수의 개별 결합 도메인을 포함하는 표면, 예를 들면 다중웰 플레이트 또는 다수개의 입자, 및 별도의 바이알, 용기, 또는 구획에, 연결체에 결합된 제1 올리고뉴클레오티드 상보체 및 제2 연결체에 결합된 제2 올리고뉴클레오티드 상보체를 포함하는 키트를 제공한다. 바람직한 실시양태에서, (i) 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체는 표적화제의 제1 쌍을 포함하고, (ii) 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 표적화제의 제2 쌍을 포함한다. 바람직하게, 표적화제의 제1 및 제2 쌍은 표 1에 열거된 서열 쌍에서 선택된, 개별적으로 올리고뉴클레오티드의 제1 및 제2 쌍을 포함한다.

[0222] 키트는 별도의 바이알, 용기, 또는 구획에, 표 1(a) 및/또는 표 1(b)에 열거된 서열에서 선택된 상이한 서열을 포함하는 적어도 4개 올리고뉴클레오티드를 더 포함한다. 이들 서열은 상이한 쌍에서 선택된 4개 서열을 포함하거나 또는 쌍의 1 이상의 구성원을 포함할 수 있다.

[0223] 키트는 적어도 7, 10, 16, 또는 25 표면 결합된 올리고뉴클레오티드 및 상응하는 올리고뉴클레오티드 상보체를 포함한다. 표적화제 상보체로서 사용하도록 구성된 올리고뉴클레오티드는 결합 시약 예컨대 항체에 사전결합되

어 제공되거나 또는 사용자에게 의해 결합 시약에 부착을 위해 연결제로 개질되어 제공될 수 있다. 경우에 따라서, 키트 내 각각의 올리고뉴클레오타이드 상보체는 상이한 결합 시약, 예를 들면 항체에 커플링된다. 표면 결합된 올리고뉴클레오타이드는 상이한 올리고뉴클레오타이드 서열이 개별 결합 도메인에 고정되도록 각각의 결합 도메인에 고정화된 적어도 5개의 복수(7, 10, 16, 또는 25)개 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 어레이에 도입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 다중웰 플레이트는 플레이트의 적어도 한 웰 내에 본원에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 어레이의 1 이상의 복제물을 포함할 수 있고, 여기서 어레이는 복수의 결합 도메인 상에 위치된다. 플레이트는 적어도 24, 96, 또는 384 웰을 포함하고 어레이는 적어도 7 올리고뉴클레오타이드, 또는 적어도 10, 16, 또는 25 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0224] 특정 실시양태에서, 키트는 플레이트의 적어도 한 웰(들) 내에 올리고뉴클레오타이드 어레이의 1 이상의 복제물을 구비한 다중웰 플레이트를 포함하고, 어레이는 복수의 결합 도메인 상에 위치하며, 여기서 결합 도메인 중 1 이상, 경우에 따라 적어도 4개는 표 1(a)에 열거된 서열쌍 세트로부터의 상이한 서열 쌍에서 선택된 상이한 올리고뉴클레오타이드 서열을 그 위에 고정시킨다. 특정 실시양태에서, 키트는 플레이트의 적어도 한 웰(들) 내에 올리고뉴클레오타이드 어레이의 1 이상의 복제물을 구비한 다중웰 플레이트를 포함하고, 어레이는 복수의 결합 도메인 상에 위치되고, 여기서 결합 도메인 중 1 이상, 경우에 따라 적어도 4개는 표 1(b)에 열거된 서열 쌍 세트로부터 상이한 서열 쌍에서 선택된 상이한 올리고뉴클레오타이드 서열을 그 위에 고정시킨다. 키트는 표 1(a), 및 특정 실시양태에서 표 1(b)의 서열 세트에서 선택된 2 이상의 올리고뉴클레오타이드로 구성된 올리고뉴클레오타이드의 추가 세트를 더 포함할 수 있고, 여기서 추가의 올리고뉴클레오타이드는 고정화된 올리고뉴클레오타이드에 상보적이다.

[0225] 키트는 (i) 제1 연결제를 포함하는 제1 결합 시약으로서, 샘플 내 제1 분석물에 특이적인 제1 결합 시약, (ii) 별도의 용기, 베슬 또는 구획에 또는 (i)의 성분으로서 제공되는, 보조 연결제를 포함하는 제1 표적화제 상보체, (iii) 제2 연결제를 포함하는 제2 결합 시약으로서, 샘플 내 제2 분석물에 특이적인 제2 결합 시약, 및 (iv) 별도의 용기, 베슬 또는 구획에 또는 (iii)의 성분으로서 제공되는, 제2 보조 연결제를 포함하는 제2 표적화제 상보체를 포함하는 1 이상의 추가적인 용기, 베슬 또는 구획을 더 포함할 수 있다.

[0226] 대안적으로, 본 발명은 샘플 내 복수의 상이한 분석물을 측정하기 위한 키트를 제공하고, 이 키트는 (a) 고체상의 제1 영역에 고정화된 제1 표적화제 및 상기 고체 지지체의 제2 영역에 고정화된 제2 표적화제를 포함하는 고체 지지체를 포함하는 용기, 베슬 또는 구획; 및 (b) (i) 제2 연결제를 포함하는 제1 결합 시약으로서, 상기 샘플 내 제1 분석물에 특이적인 것인 제1 결합 시약, (ii) 별도의 용기, 베슬 또는 구획에 또는 (b)(i)의 성분으로서 제공되는, 보조 연결제를 포함하는 제1 표적화제 상보체, (iii) 제2 연결제를 포함하는 제2 결합 시약으로서, 상기 샘플 내 제2 분석물에 특이적인 제2 결합 시약, 및 (iv) 별도의 용기, 베슬 또는 구획에 또는 (b)(iii)의 성분으로서 제공되는 제2 연결제 상보체를 포함하는 제2 표적화제 상보체를 포함하는 1 이상의 추가적인 용기, 베슬 또는 구획을 포함한다.

[0227] 본 발명은 또한 복수의 상이한 분석물을 측정하기 위한 키트를 고려하고, 이러한 키트는 (a) 고체 지지체 상에, 상기 고체 지지체의 제1 영역에 고정화된 제1 표적화제 및 상기 고체 지지체의 제2 영역에 고정화된 제2 표적화제를 포함하는 용기, 베슬 또는 구획; 및 (b) (i) 제1 연결제를 포함하는 제1 결합 시약을 포함하는 제1 용기로서, 여기서 상기 제1 결합 시약은 상기 샘플 내 제1 분석물에 특이적인 것인 용기, (ii) 별도의 용기, 베슬 또는 구획에 제공되는, 보조 연결제를 포함하는 제1 표적화제 상보체를 포함하는 제2 용기, (iii) 제2 연결제를 포함하는 제2 결합 시약을 포함하는 제3 용기로서, 여기서 상기 제2 결합 시약은 상기 샘플 내 제2 분석물에 특이적인 것인 용기, 및 (iv) 별도의 용기, 베슬 또는 구획에 제공되는, 제2 보조 연결제를 포함하는 제2 표적화제 상보체를 포함하는 제4 용기를 포함하는 4 이상의 추가적인 용기, 베슬 또는 구획을 포함한다.

[0228] 여전히 더욱, 본 발명은 샘플 내 복수의 상이한 분석물을 측정하기 위한 키트를 제공하고, 이러한 키트는 (a) 고체 지지체 상에, 상기 고체 지지체의 제1 영역에 고정화된 제1 표적화제 및 상기 고체 지지체의 제2 영역에 고정화된 제2 표적화제를 포함하는 용기, 베슬 또는 구획; 및 (b) (i) 제1 연결제를 포함하는 제1 결합 시약, 및 보조 연결제를 포함하는 제1 표적화제 상보체를 포함하는 제1 용기로서, 여기서 상기 제1 결합 시약은 상기 샘플 중 제1 분석물에 특이적인 것인 용기, 및 (ii) 제2 연결제를 포함하는 제2 결합 시약, 및 제2 보조 연결제를 포함하는 제2 표적화제 상보체를 포함하는 제2 용기로서, 여기서 상기 제2 결합 시약은 상기 샘플 내 제2 분석물에 특이적인 것인 용기를 포함하는 2 이상의 추가적인 용기, 베슬 또는 구획을 포함한다.

[0229] 특정 실시양태에서, 본 발명은 (a) 개별적으로 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드를 각각 포함하는 복수의 개별 결합 도메인을 포함하는 다중웰 플레이트로서, 각각의 상기 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드는 표 1(a) 및/또는

(b)에 열거된 서열로 이루어진 군에서 선택되는 것인 다중웰 플레이트를 포함하는 키트를 제공한다.

- [0230] 키트는 또한 복수의 분석물에 대해 결합 어세이를 수행하는 방법에서 다중웰 플레이트를 사용하기 위한 지시서를 포함할 수 있고, 상기 방법은
- [0231] (a) 상기 복수의 분석물 내 제1 분석물에 특이적인 제1 결합 시약 및 상기 제1 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제1 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 상기 제1 결합 시약은 연결체에 결합되고 상기 제1 올리고뉴클레오티드는 보조 연결체에 결합되며 이때 상기 제1 결합 시약 복합체는 상기 연결체와 상기 보조 연결체 사이의 반응에 의해 형성되는 것인 단계;
- [0232] (b) 상기 복수의 분석물 내 제2 분석물에 특이적인 제2 결합 시약 및 상기 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제2 결합 시약 복합체를 형성시키는 단계로서, 여기서 상기 제2 결합 시약은 제2 연결체에 결합되고 상기 제2 올리고뉴클레오티드는 제2 보조 연결체에 결합되며 이때 상기 제2 결합 시약 복합체는 상기 제2 연결체와 상기 제2 보조 연결체에 의해 형성되는 것인 단계;
- [0233] (c) 상기 제1 올리고뉴클레오티드를 상기 제1 올리고뉴클레오티드 상보체에 결합시키고 상기 제2 올리고뉴클레오티드를 상기 제2 올리고뉴클레오티드 상보체에 결합시키기에 충분한 조건 하에서, 개별적으로 제1 올리고뉴클레오티드 상보체 및 제2 올리고뉴클레오티드 상보체에 각각 연결시킨 상기 2 이상의 결합 도메인과 상기 제1 및 제2 결합 시약 복합체를 혼합시키는 단계;
- [0234] (d) 단계 (c)에서 형성된 혼합물에 상기 복수의 분석물을 포함하는 샘플을 혼합시키는 단계;
- [0235] (e) 단계 (d)에서 형성된 혼합물에 복수의 추가적인 결합 시약을 부가하는 단계로서, 여기서 상기 복수의 추가적인 결합 시약은 (i) 상기 제1 분석물 및/또는 제1 결합 시약-제1 분석물 복합체에 특이적인 제1 검출 시약; 및 (ii) 상기 제2 분석물 및/또는 제2 결합 시약-제2 분석물 복합체에 특이적인 제2 검출 시약을 포함하는 것인 단계; 및
- [0236] (f) 상기 결합 도메인에 결합된 상기 제1 및 제2 분석물의 양을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0237] 일 특정 실시양태에서, 다중웰 어세이 플레이트는 최종 사용자 개발된 어세이 패널, 즉 상기 플레이트를 이용해 어세이를 수행하기 위해 그/그녀의 결합 시약을 이용해 최종 사용자에게 의해 구축된 어세이 패널을 구성하는데 사용될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 최종 사용자는 결합 시약이 각각의 결합 도메인에 결합되게 지정한다. 다중웰 어세이 플레이트는 제1 표적화제를 갖는 제1 결합 도메인 및 제2 표적화제를 갖는 제2 결합 도메인, 및 경우에 따라서 추가적인 표적화제를 갖는 추가적인 결합 도메인을 포함하는 복수의 개별 결합 도메인을 포함하여 제공된다. 각각의 결합 도메인은 본원에 기술된 바와 같이, 결합 시약 복합체를 통해서 복수의 결합 도메인 각각에 부차되는 개별 결합 시약을 선택하여 사용자에게 의해 작용화될 수 있다. 별도의 바이알, 용기, 또는 구획에, 표적화 시약의 세트(각각 연결체에 부착됨)는 제1 표적화제 상보체, 제2 표적화제 상보체, 및 경우에 따라 추가적인 표적화제 상보체를 포함하여 제공된다. 제1 표적화제 및 제1 표적화제 상보체 및 제2 표적화제 및 제2 표적화제 상보체는 개별적으로 표적화제의 제1 및 제2 쌍으로 구성된다. 유사하게, 임의의 추가적인 표적화제 상보체는 결합 도메인 상에 상이한 추가적인 표적화제를 갖는 쌍을 형성한다. 바람직한 일 실시양태에서, 표적화제 및 표적화제 상보체는 올리고뉴클레오티드(즉, 올리고뉴클레오티드 및 이의 상보체)이다. 이러한 실시양태에서, 표적화제의 제1 및 제2 쌍, 및 표적화제의 임의의 추가쌍은 표 1(a) 및/또는 표 1(b)에 제공된 서열 목록에서 선택된다.
- [0238] 따라서, 사용자는 어떠한 표적화제/표적화제 상보체가 각각의 특별한 결합 도메인에 결합될지를 선택한다. 사용자는 또한 어떠한 결합 시약을 각각의 특별한 결합 도메인에 결합시키고 지정된 결합 도메인에 부착된 표적화제의 표적화제 상보체를 포함하는 결합 시약 복합체를 형성할지를 선택한다.
- [0239] 키트는 사용자의 결합 시약에 보조 연결체를 부착하기 위해 사용자에게 시약을 제공할 수 있다. 바이오틴이 보조 연결체인 경우, 키트는 반응성 작용기 예컨대 NHS 에스테르 또는 히드라지드 또는 말레이미드로 개질된 바이오틴을 포함할 수 있다. 표적화제 시약 세트 및/또는 플레이트는 검출가능한 표지를 어세이 성분, 예컨대 검출 시약에 부착시키기 위한 표지화 키트를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 다중웰 어세이 플레이트가 전기화학발광 반응을 수행하도록 구성되면, 표지화 키트는 SULFO-TAG™ NHS 에스테르, LC-바이오틴 NHS 에스테르, 선택적인 스핀 컬럼, 및 선택적인 표지화 완충액을 포함할 수 있다. ECL 판독 완충액 및 선택적인 어세이 및 항체 희석제가 더 제공될 수 있다.
- [0240] 표적화 시약의 세트는 바람직하게 다중웰 플레이트에 존재하는 결합 도메인의 수와 일치하는 표적화 시약의 수

량을 포함한다. 예를 들면, 다중웰 플레이트가 10개의 개별 결합 도메인을 포함하면, 10개 표적화 시약 세트를 다중웰 플레이트에서 사용한다.

[0241] 표적화제는 보조 연결체에 직접 결합되는 연결체와 제공되며, 예를 들면 보조 연결체가 바이오틴이면 스트렙타비딘 또는 아비딘이 제공된다. 연결체 및 보조 연결체가 가교제를 통해 연결되도록 구성되는 경우(예를 들면, 연결체 및 보조 연결체 둘 모두가 바이오틴인 경우), 키트는 또한 결합 시약을 표적화제 상보체에 부착시키는데 사용될 수 있는 가교 시약 용액(예를 들면, 스트렙타비딘 또는 아비딘의 용액)을 제공한다. 키트는 또한 연결/가교 반응 및 반응 중지 용액에 적절한 조건을 제공하는 반응 완충액을 제공한다. 연결 시약 중 1 이상이 바이오틴인 경우, 중지 용액은 연결체, 보조 연결체 또는 가교제로서 존재하는 스트렙타비딘 또는 아비딘의 임의의 미사용 바이오틴-결합 부위를 차단하도록 유리 바이오틴을 포함할 수 있다.

[0242] 이러한 실시양태에서, 사용자는 결합 시약, 예를 들면, 포획 및 검출 항체를 제공하고, 어떠한 결합 시약이 각각의 결합 도메인에 부착될지를 지정한다. 결합 시약, 예를 들면, 포획 항체는 선택된 연결체, 예를 들면 바이오틴으로 표지화되고, 보조 연결체, 예를 들면 스트렙타비딘을 통해 표적화제 쌍의 구성원에 부착된다. 한편, 플레이트는 표적화제를 선택된 결합 도메인에 결합시켜 준비된다. 개질된 결합 시약은 표면과 접촉하여 결합 시약에 의해 인식되는 분석물에 대한 후속 결합 어세이에 사용할 수 있는 표면-결합된 결합 시약 복합체를 형성시킨다. 관심 분석물은 결합 도메인을 표지화 결합 시약과 접촉시키고 그 결합 도메인에 존재하는 표지의 존재를 정량하여 검출된다.

[0243] 대안적으로, 다중웰 어세이 플레이트는 예를 들면 입수가능한 다중화 어세이 패널의 카탈로그로부터, 사용자 사양을 기반으로 구성될 수 있고/있거나 사용자는 분석물 세트를 선택하여 그러한 분석물 세트에 대해 사용자-주문제작된 다중화 어세이를 구성할 수 있다. 다중화 어세이 패널은 개별 어세이가 충분히 함께 기능하도록 선택되고 최적화되어야 한다. 예를 들면, 샘플은 어세이 되기 전에 희석을 필요로 할 수 있다. 관심있는 특정 샘플 매트릭스에 대한 샘플 희석은 소정 패널에 대해서 샘플 매트릭스 효과를 최소화하고, 패널 내 모든 분석물이 어세이의 역학 범위 내에 존재할 가능성을 최대화하도록 최적화된다. 바람직한 실시양태에서, 패널 내 모든 분석물은 적어도 하나의 샘플 유형에서 동일한 샘플 희석물로 분석된다. 다른 바람직한 실시양태에서, 패널 내 모든 분석물은 대부분의 샘플 유형에 대해 동일한 희석물을 이용해 측정된다.

[0244] 소정 번역어세이 패널의 경우, 검출 항체 농도 및 검출 항체에 대한 단백질 당 검출가능한 표지의 수(L/P 비율)는 모든 분석물의 예상 수준이 동일 샘플 희석에서 정량화할 수 있는 범위이도록 조정된다. 소정 분석물에 대한 정량화가능한 범위의 고가를 증가시키고자 하면, L/P는 감소시키고/시키거나 검출 항체 농도는 감소시킨다. 다른 한편으로, 정량화가능한 범위의 저가를 증가시키고자 하면, L/P는 증가시키고, 검출 항체 농도는 포화 수준이 아니면 증가시키고/시키거나 배경 신호를 낮출 수 있다.

[0245] 어세이 패널과 사용을 위한 교정 표준은 패널에 대해 추천되는 샘플 희석에 적절한 정량화 범위를 제공하도록 선택된다. 교정 표준은 패널 내 1 이상의 분석물의 기지 농도를 갖는다. 미지 샘플 내 분석물의 농도는 이들 표준을 비교하여 결정한다. 일 실시양태에서, 교정 표준은 어세이 패널에 의해 측정된 상이한 분석물의 혼합물을 포함한다. 바람직하게, 복합 교정기에서 분석물 수준은 각 분석물에 대한 어세이 신호가 비슷하도록, 예를 들면 2의 인수, 5의 인수 또는 10의 인수 내이도록 선택된다. 다른 실시양태에서, 교정 표준은 복수의 상이한 어세이 패널 유래 분석물의 혼합물을 포함한다.

[0246] 교정 곡선은 예를 들면, 당분야에 알려진 곡선 핏 예컨대 선형 핏, 4-모수 로지스틱(4-PL) 및 5-모수(5-PL) 핏을 이용해 교정 표준으로 측정된 어세이 신호에 맞출 수 있다. 이러한 핏을 이용해, 미지 샘플 내 분석물의 농도는 산출된 핏에 측정된 어세이 신호를 역맞춤하여 결정할 수 있다. 교정 표준을 이용한 측정은 또한 어세이 특정 예컨대 검출 한계(LOD), 정량화 한계(LOQ), 역학 범위, 및 선형성 한계(LOL)를 결정하는데 사용될 수 있다.

[0247] 다중화 패널 개별의 일부로서, 어세이는 교정기 및 검출 항체 비특이적 결합을 감소시키도록 최적화된다. 샌드위치 번역어세이에서, 특이성은 주로 포획 항체 결합에서 발생한다. 다중화 패널을 평가하기 위한 일부 고려 사항은 다음과 같다: (a) 포획 항체에 대한 검출 항체 비특이적 결합이 패널내 어세이의 하한 배경값까지 감소시키고, 이는 검출 항체의 농도 및 L/P를 조정하여 달성할 수 있다; (b) 패널 내 다른 교정기에 대한 검출 항체의 비특이적 결합은 역시 바람직하지 않으며 최소화되어야 한다; (c) 패널 및 다른 관련 분석물에서 다른 교정기의 비특이적 결합은 최소화되어야 한다; 교정기 비특이적 결합이 존재하면, 패널 내 어세이의 전체 특이성을 감소시킬 수 있고 또한 포획 항체 결합에 대해 교정기 경쟁이 존재하므로 신뢰할만한 결과를 산출할 수 없다.

[0248] 특정 일 실시양태에서, 키트는 어세이 프로토콜의 올바른 단계가 후속되도록 보장하기 위한 1 이상의 시약을 더 포함한다. 또한, 어세이 단계의 가변성은 어세이 독립적으로 측정될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 어세이를 수행하는데 사용되는 희석물에 희석된 일련의 상보성 올리고뉴클레오티드가 키트에 제공된다. 올바른 단계가 수행되면, 다양한 희석물 내 올리고뉴클레오티드가 결합하고 사슬을 연장시킨다. 최종 희석물은 어세이의 성공적인 진행에 대한 검출가능한 지시자를 제공하는 리포터 또는 표지를 갖는 최종 상보성 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 다중웰 플레이트의 제1 결합 도메인은 서열 A를 갖는 BSA-올리고뉴클레오티드로 코팅된다. 어세이 희석물은 서열 A, A', 및 추가 서열, B에 상보적인 올리고뉴클레오티드 서열을 포함한다. A 및 B는 서로 상호작용하지 않고, 특이적으로 오직 그들의 상보체와 상호작용한다. 최종 희석물은 올리고뉴클레오티드 B, B'의 상보체를 포함하는 보충 올리고뉴클레오티드, 및 검출가능한 표지를 함유한다. 따라서, 제1 결합 도메인으로부터의 검출가능한 신호는 샘플이 부가되거나 또는 검출 모이머가 부가되었음을 입증하는데 사용될 수 있다. 생성된 신호는 또한 시약의 올바른 부피 및 농도가 부가되었는지를 비롯하여, 샘플 취급 과정 및/또는 장비의 가변성이 존재하는지 여부를 검출하는데 사용될 수 있다. 과정에서 사용된 올리고뉴클레오티드 사슬은 복수의 중복 서열을 포함할 수 있다.

[0249] 패널 내 상이한 어세이는 최적 성능을 위해 다른 항온반응 시간 및 샘플 취급 요건을 필요로 할 수 있다. 따라서, 목표는 패널 내 대부분의 어세이에 대해 최적화된 프로토콜을 선택하는 것이다. 어세이 프로토콜의 최적화는 제한없이, 하기 프로토콜 변수 중 1 이상을 조정하는 것을 포함한다: 시기(각 단계의 항온반응 시간), 준비 과정(교정기, 샘플, 대조군 등), 및 세척 단계 횟수.

[0250] 본 발명의 이들 및 다른 실시양태는 다음의 비제한적인 실시예에서 예시한다.

[0251] **실시예**

[0252] **실시예 1 - 직접 어세이 포맷**

[0253] 직접 어세이를 위한 다중웰 플레이트의 제조 및 사용 과정은 도 2에 예시하였다. 실험 레이아웃, 즉 어떠한 올리고뉴클레오티드 서열을 다중웰 어세이 플레이트의 어떠한 결합 도메인에 위치시킬지를 표시하였다. 다중웰 어세이 플레이트는 Meso Scale Diagnostics, LLC의 지사인 Meso Scale Discovery(Rockville, MD)에서 입수하였다. 각각의 개별 올리고뉴클레오티드 서열 상보체의 작업 용액(550 μ l)은 Diluent 100에 약 50배로 서열 상보체의 스톱 용액을 희석하여 준비하였다(올리고뉴클레오티드 서열 상보체의 스톱 용액 및 Diluent 100은 Meso Scale Discovery에서 입수함).

[0254] 각각의 포획 항체는 도 5(d)에 도시한 바와 같은 통상의 커플링 프로토콜 및 이작용성 커플링 시약(셀포숙신이미드 4-(N-말레이미도메틸)-1-시클로헥산 카르복실레이트("SMCC"))을 이용해 말단 티올기를 갖는 올리고뉴클레오티드로 표지화하였으며, 예를 들면 단백질은 SMCC 중 NHS-에스테르와 반응하여 단백질이 표지화되고 얻어진 복합체는 SMCC의 말레이미드기와 반응하는 티올화 올리고뉴클레오티드와 반응한다. 항체-올리고-접합체 세트의 모아진 용액(50 μ l)을 이어서 실온에서 1시간 동안 혼성화 완충액이 있는 다중웰 플레이트의 각 웰에 부가하여 상보성 올리고뉴클레오티드 서열을 혼성화시키고 이어서 포획 항체를 다중웰 플레이트에 고정시켜 복수의 결합 시약 복합체를 형성시켰다.

[0255] 복수개의 분석물을 포함하는 용액(25 μ l의 MSD Diluent 2와, 25 μ l의 MSD Diluent 2의 교정기 용액)을 준비된 플레이트의 각 웰에 부가하고, 1시간 동안 실온에서 항온반응시킨 후 3x PBS 세척하고, 표지된 검출 항체 세트(50 μ l의 MSD Diluent 3)를 다중웰 플레이트의 각 웰에 부가하였다. 플레이트를 진탕 항온반응시키고 웰을 3x PBS로 세척하고, 150 μ l의 판독 완충액 T(Meso Scale Discovery)로 채우고 SECTOR® Imager 장비에서 분석하였다.

[0256] 이 프로토콜을 이용하여 7중(plex) 케모카인 패널에 대한 어세이를 수행하였고 결과를 도 8(a)-(g)에 도시하였다. 이 실험에서 어세이된 분석물은 에오타신, MIP-1b, TARC, IL-8, MCP-4, IP-10, 및 MCP-1(모두 인간 분석물)이었다. 또한, 이 프로토콜을 사용하여 IFN γ , IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, 및 TNF α (모두 인간 분석물)를 포함하는 10중 TH1/TH2 패널에 대한 어세이를 수행하였다. 양쪽 어세이에 대한 결과는 올리고뉴클레오티드 링커가 없는 표준 직접 면역어세이와 비교하였다.

[0257] **실시예 2 - 올리고뉴클레오티드-SA 접합체를 이용한 간접 어세이 포맷**

[0258] 올리고뉴클레오티드-SA 접합체를 이용한 간접 어세이를 위한 다중웰 플레이트의 제조 및 사용에 대한 과정은 도 9(a)-(c)에 예시하였다. 다중웰 어세이 플레이트에 대한 실험 레이아웃은 실시예 1에서 처럼 표시하였다. 스트

렙타비딘(SA)에 결합된 각각의 개별 올리고뉴클레오티드 서열 상보체의 작업 용액(550 μl)은 서열 상보체의 스톱 용액을 약 50배로 Diluent 100에 희석하여 준비하였다(올리고뉴클레오티드 서열 상보체의 스톱 용액 및 Diluent 100은 Meso Scale Discovery에서 입수하였다). 바이오틴화된 항체의 용액은 올리고뉴클레오티드 서열 상보체의 바람직한 작업 용액에 부가하여 개별 바이오틴화 포획 항체/올리고뉴클레오티드-SA 혼합물 세트를 준비하였다. 혼합물 중 바이오틴화 항체의 농도는 약 5-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위였다. 혼합물은 실온에서 30-45분간 부드럽게 혼합시켰다. 오십(50) μl 의 바이오틴 용액(Meso Scale Discovery)(대략 3배 과량의 바이오틴)을 각각의 개별 바이오틴화 항체/올리고뉴클레오티드 상보체 혼합물에 부가하고 이 혼합물을 실온에서 10-15분간 부드럽게 혼합하였다. 균등한 부피(550 μl)의 개별 바이오틴화 항체/올리고뉴클레오티드 상보체를 배합하고 총 부피의 용액을 접합 완충액(0.1 M EDTA 포함하는 PBS, pH 7.4)을 부가하여 5500 μl 로 조정하였다.

[0259] 다중웰 플레이트를 실온에서 따뜻해지게 두었다(대략 10분). 오십(50) μl 의 바이오틴화 항체/올리고뉴클레오티드 상보체를 플레이트의 각 웰에 부가하였다. 이 플레이트를 접착 밀봉으로 덮고 1시간 동안 플레이트 진탕기 상에 실온에서 항온반응시켰다. 각각의 웰을 인산 완충 용액(PBS, 3X)으로 세척하였다.

[0260] 복수개의 분석물을 포함하는 용액(25 μl 의 MSD Diluent 2와, MSD Diluent 2의 25 μl 교정기 용액)을 준비한 플레이트의 각 웰에 부가하고, 1시간 동안 실온에서 항온반응시키고, 3x PBS 세척하였으며, 표지된 검출 항체 세트(50 μl 의 MSD Diluent 3)를 다중웰 플레이트의 각 웰에 부가하였다. 이 플레이트를 진탕 항온반응시키고 웰을 3x PBS로 세척하고, 150 μl 의 판독 완충액 T(Meso Scale Discovery)로 채우고 SECTOR® Imager 장비에서 분석하였다.

[0261] **실시예 3 - 순 SA/바이오틴화 올리고뉴클레오티드를 이용한 간접 어세이 포맷**

[0262] 바이오틴화 포획 항체, 순 스트렙타비딘, 및 바이오틴화 올리고뉴클레오티드를 이용한 간접 어세이를 위한 다중웰 플레이트의 제조 및 사용 과정은 도 10(a)-(c)에 예시하였다. 다중웰 어세이 플레이트에 대한 실험 레이아웃은 실시예 1에서 처럼 표시하였다. 스트렙타비딘(SA)에 결합된 과량의 각각의 개별 올리고뉴클레오티드 서열 상보체의 작업 용액(550 μl)은 서열 상보체의 스톱 용액을 약 50배로 Diluent 100에 희석하여 준비하였다(올리고뉴클레오티드 서열 상보체 및 Diluent 100은 Meso Scale Discovery에서 입수하였다). 바이오틴화 항체의 용액을 올리고뉴클레오티드 서열 상보체의 바람직한 작업 용액에 부가하여 개별 바이오틴화 포획 항체/올리고뉴클레오티드-SA 혼합물 세트를 준비하였다. 혼합물 내 바이오틴화 항체의 농도는 약 5-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위였다. 혼합물을 부드럽게 실온에서 30-45분간 혼합하였다. 오십(50) μl 의 바이오틴 용액(Meso Scale Discovery)(대략 3배 과량의 바이오틴)을 각각의 개별 바이오틴화 항체/올리고뉴클레오티드 상보체 혼합물에 부가하였고 이 혼합물을 부드럽게 10-15분간 실온에서 혼합하였다. 균등한 부피(550 μl)의 개별 바이오틴화 항체/올리고뉴클레오티드 상보체를 배합하고 전체 부피의 용액을 접합 완충액(Meso Scale Discovery)을 부가하여 5500 μl 로 조정하였다.

[0263] 다중웰 플레이트를 실온에서 따뜻해지도록 두었다(대략 10분). 오십(50) μl 의 바이오틴화 항체/올리고뉴클레오티드 상보체를 플레이트의 각 웰에 부가하였다. 플레이트를 접착 밀봉으로 덮고 1시간 동안 플레이트 진탕기에 실온에서 항온반응시켰다. 각각의 웰을 인산 완충 염수(PBS, 3X)로 세척하였다.

[0264] 복수개의 분석물을 포함하는 용액(25 μl 의 MSD Diluent 2와 25 μl 의 MSD Diluent 2의 교정기 용액)을 준비된 플레이트의 각 웰에 부가하고, 1시간 동안 실온에서 항온반응시키고, 3x PBS로 세척하고, 표지된 검출 항체의 세트(50 μl 의 MSD Diluent 3)를 다중웰 플레이트의 각 웰에 부가하였다. 플레이트를 진탕하면서 항온반응시키고 웰을 3x PBS로 세척하고, 150 μl 의 판독 완충액 T(Meso Scale Discovery)로 충전시키고 SECTOR® Imager 장비에서 분석하였다.

[0265] **실시예 4 - 7중 사이토카인 B 패널을 이용한 3종의 어세이 포맷의 비교 결과**

[0266] 7중 사이토카인 B 패널(IL-8, hTNF-a, hEotaxin(에오타신)-3, h-Eotaxin, hMCP-1, HIP-10 및 hMIP-1a)을 실시예 1, 2, 및 3에 기술된 어세이 포맷, 즉 올리고뉴클레오티드-SA 접합체를 이용한 직접, 간접 및 순 SA/바이오틴화 올리고뉴클레오티드를 이용한 간접 어세이 포맷으로 시험하였다. 어세이에 대한 LOD 값은 8지점 교정 곡선으로부터 추산하였고 2.5 표준 편차로 추정하였다. 결과는 도 11(a)-(g)에 나타내었다. 직접 및 간접 어세이 포맷에 대한 LOD 값은 모든 시험된 어세이에 대해서 표준 수동 흡착 및 면역어세이 포맷에 대해 관찰된 LOD 값과 비교하였다. 순 SA를 이용한 간접 접근법은 LOD 값의 유의한 확산을 보여주었다: 일부 어세이, IL-8 및 hIP-10은 나머지 어세이 포맷과 비교하여 높은 LOD 값을 보인 반면, 에오타신 및 MIP-10은 낮은 LOD 값을 보였다.

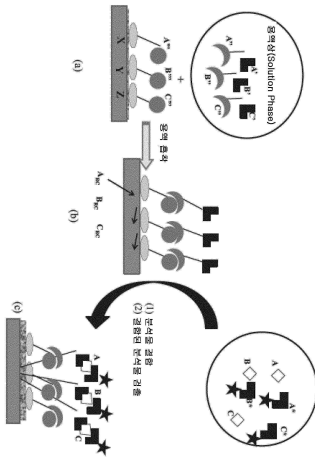
[0267] ***

[0268] 본 발명은 본원에 기술된 특정 실시양태에 의해 범위를 제한하지 않는다. 대신, 본원에 기술된 것들 이외에도

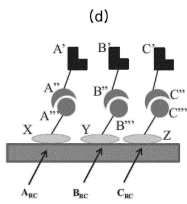
방법의 다양한 변형은 전술한 설명 및 첨부된 도면으로부터 당분야의 숙련가에게 자명하다. 이러한 변형은 청구항의 범주에 포함시키고자 한다. 다양한 공개물이 본원에 언급되었고, 그들의 내용을 그 전체로 참조하여 본원에 편입시킨다.

도면

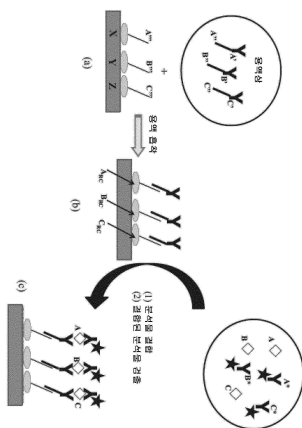
도면1a



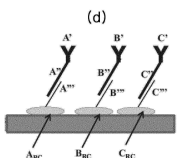
도면1b



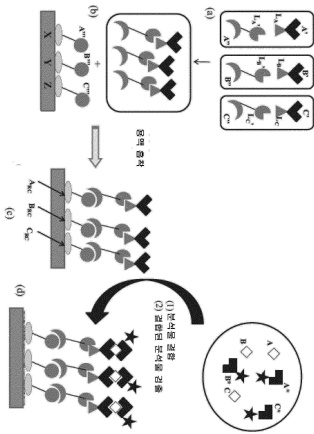
도면2a



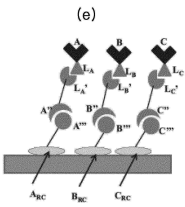
도면2b



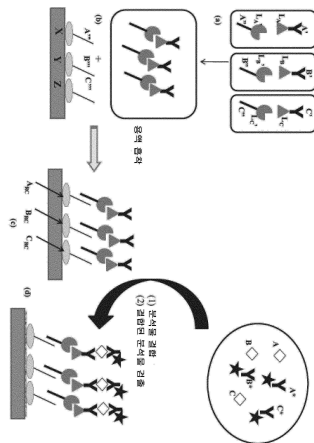
도면3a



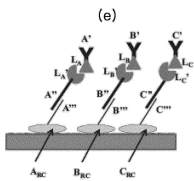
도면3b



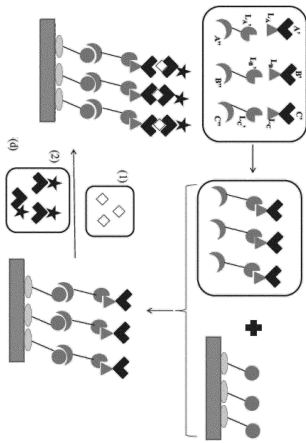
도면4a



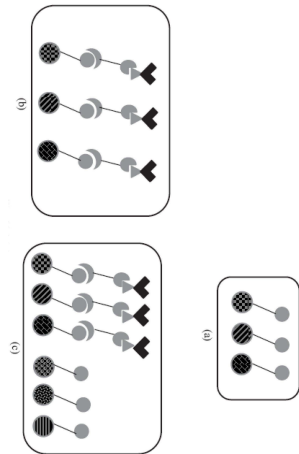
도면4b



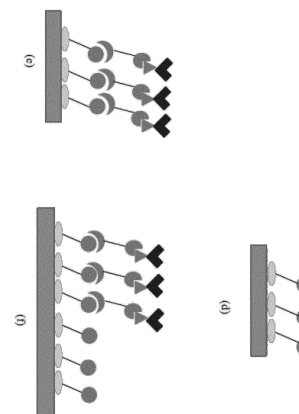
도면5d



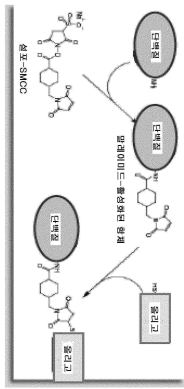
도면6a



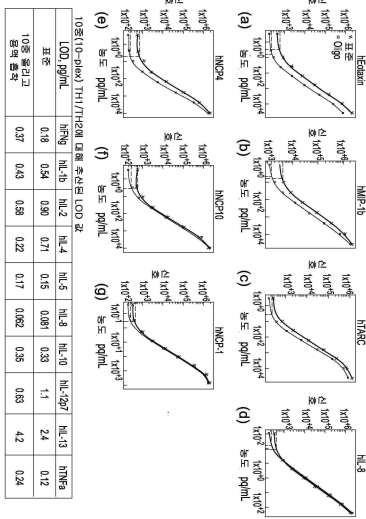
도면6b



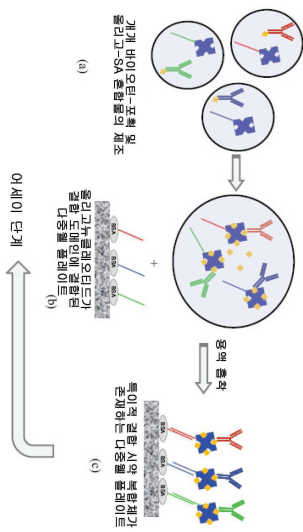
도면7



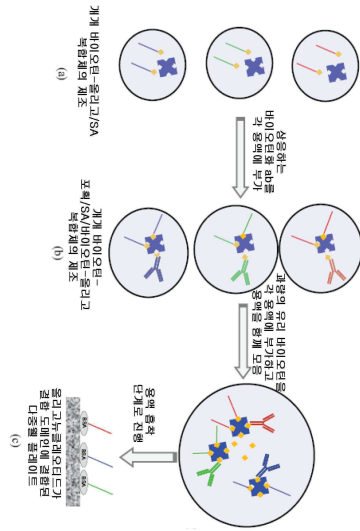
도면8



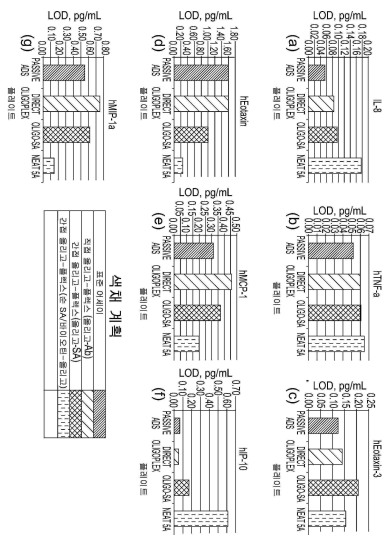
도면9



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Meso Scale Technologies, LLC.
- <120> Improved Methods for Conducting Multiplexed Assays
- <130> 29882
- <150> 61/775,860
- <151> 2013-03-11
- <150> 61/778,727
- <151> 2013-03-13
- <160> 50

<170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 1
 acatcggtag tt 12
 <210> 2
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> oligonucleotide
 <400> 2
 aactaccgat gt 12
 <210> 3
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 3
 acgtcccagt tg 12
 <210> 4
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 4
 caactgggac gt 12
 <210> 5
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide
 <400> 5
 agaagaagat cc 12
 <210> 6
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 6
 ggatcttctt ct 12
 <210> 7
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 7
 aggttcagtg ca 12

 <210> 8
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 8
 tgcactgaac ct 12
 <210> 9
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 9
 atcaggatac gc 12
 <210> 10
 <211> 12
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 10
 gcgtatcctg at 12

<210> 11
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 11
 atcattacca cc 12

<210> 12
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 12
 ggtggtaatg at 12

<210> 13
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 13
 attaacggga gc 12

<210> 14
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 14
 gctcccgta at 12

<210> 15

<211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 15
 cagaggtcctt aa 12
 <210> 16
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 16
 ttaagacctc tg 12

 <210> 17
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 17
 caggtgtcca tt 12
 <210> 18
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 18
 aatggacacc tg 12
 <210> 19
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 19

catccaatcc ag 12

<210> 20
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 20

ctggattgga tg 12

<210> 21
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 21

cctacgatat ac 12

<210> 22
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 22

gtatatcgta gg 12

<210> 23
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 23

cgaatgtaga gt 12

<210> 24
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide
 <400> 24
 actctacatt cg 12
 <210> 25
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 25
 cggtttgaga ta 12

 <210> 26
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 26
 tatctcaaac cg 12
 <210> 27
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 27
 cttacaacgc ca 12
 <210> 28
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 28
 tggcgttgta ag 12

 <210> 29
 <211> 12

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 29
 ctttctcggc ac 12
 <210> 30
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 30
 gtgccgagaa ag 12
 <210> 31
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 31
 gacataaagc ga 12

 <210> 32
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 32
 tcgctttatg tc 12
 <210> 33
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 33
 gccatagtct ct 12
 <210> 34

<211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 34
 agagactatg gc 12

<210> 35
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 35
 gctaattcac ca 12

<210> 36
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 36
 tggatgaatta gc 12

<210> 37
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 37
 ggatcgtgtt ca 12

<210> 38
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide
 <400> 38

tgaaacacga cc	12
<210> 39	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> oligonucleotide	
<400> 39	
gttgattctg tc	12
<210> 40	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> oligonucleotide	
<400> 40	
gacagaatca ac	12
<210> 41	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> oligonucleotide	
<400> 41	
taccggaat aa	12
<210> 42	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> oligonucleotide	
<400> 42	
ttattccggg ta	12
<210> 43	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> oligonucleotide	

<400> 43
 tgcttgactt gg 12

<210> 44
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide

<400> 44
 ccaagtcaag ca 12
 <210> 45
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide

<400> 45
 ttccacttag gg 12
 <210> 46
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide

<400> 46
 ccctaagtgg aa 12

<210> 47
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide

<400> 47
 ttgtctagcg gc 12
 <210> 48
 <211> 12
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> oligonucleotide
<400> 48
gccgctagac aa 12
<210> 49
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> oligonucleotide
<400> 49
tttccttgc ta 12

<210> 50
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> oligonucleotide
<400> 50
tagcaagga aa 12