



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0011724
(43) 공개일자 2025년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) C12Q 1/6804 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01) G01N 33/548 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54306 (2013.01)
C12Q 1/6804 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2025-7001537(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년05월15일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2023-7003878
원출원일자(국제) 2015년05월15일
심사청구일자 2023년03월03일
(85) 번역문제출일자 2025년01월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/030925
(87) 국제공개번호 WO 2015/175856
국제공개일자 2015년11월19일
(30) 우선권주장
61/993,581 2014년05월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
메소 스케일 테크놀로지스, 엘엘시
미국 20850 메릴랜드주 록빌 리서치 불러바드
1601
(72) 발명자
아그반얀 아나히트
미국 20878 메릴랜드주 게이터스버그 웨스트본 테
라스 16900
글레저 엘리 엔
미국 92014 메릴랜드주 텔 마 두랑고 드라이브
13746
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

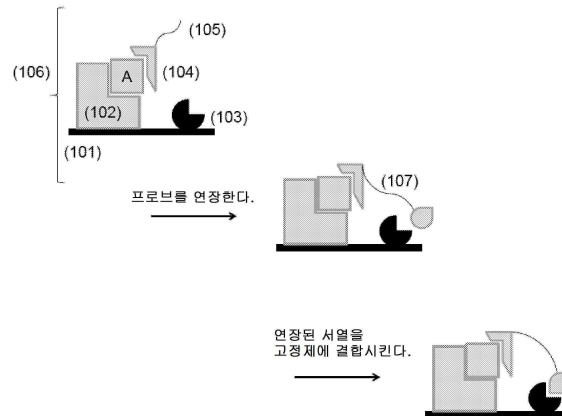
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 개선된 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 결합 분석에서 분석 특이성 및 성능을 개선하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6844 (2018.05)
G01N 33/54366 (2013.01)
G01N 33/548 (2013.01)
C12Q 2525/197 (2013.01)
C12Q 2531/125 (2013.01)
C12Q 2563/107 (2013.01)
C12Q 2565/514 (2013.01)

(72) 발명자

켄튼 존

미국 20841 메릴랜드주 보이즈 슈가 리지 테라스
 21021

시갈 조지

미국 20853 메릴랜드주 록빌 트래일웨이 드라이브
 5333

스텐젤린 마틴

미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 스틸 크릭 레
 인 606

루텐버그 데이비드

미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 골덴 에쉬 웨
 이 84

(30) 우선권주장

62/013,823	2014년06월18일	미국(US)
62/048,489	2014년09월10일	미국(US)
62/049,520	2014년09월12일	미국(US)
62/055,093	2014년09월25일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서,

- a. 상기 분석물을 (i) 고정(anchor) 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약과 분석물에 대한 포획 시약을 포함하는 표면 상의 포획 시약, (ii) 제1 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제1 검출 시약, 및 (iii) 제2 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 결합 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계;
- b. 제1 프로브 및 제2 프로브가 인접할 것을 요구하는 연장 과정을 이용하여 제2 프로브를 연장함으로써 고정 서열에 상보적인 고정 서열 상보체를 포함하는 연장된 서열을 형성하는 단계;
- c. 상기 고정 서열을 고정 서열 상보체에 혼성화시키는 단계; 및
- d. 상기 표면에 결합된 연장된 서열의 양을 측정하는 단계

를 포함하고,

상기 분석물은 G-CDF, GM-CSF, IFN감마, IL-1베타, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12/23p40, IL12p70, IL-17A, IL21, IL-22, IL-23, IL-31, IL-33, TNF알파, TSLP, VEGF, 복합체화된 PSA, 유리 PSA, A베타42, A베타40, A베타38, tau, 심장 트로포닌 I, 심장 트로포닌 T, HIV p24, C-펩티드, 및/또는 FGF21인 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 교차참조

[0002] 본 출원은, 2014년 5월 15일자 출원된 미국 가출원 제61/993,581호; 2014년 6월 18일자 출원된 제62/013,823호; 2014년 9월 10일자 출원된 제62/048,489호; 2014년 9월 12일자 출원된 제62/049,520호; 및 2014년 9월 25일자 출원된 제62/055,093호의 이익을 향유하며, 상기 문헌의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다. 또한, USSN 14/206,284(공개 공보 US-2014/0272939); USSN 14/208,040(공개 공보 US-2014/0274775); 및 USSN 14/203,638 (공개 공보 US-2014/0256588)를 참조하며, 상기 문헌의 개시 내용은 또한 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 면역분석을 수행하는 개선된 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 면역분석에서 신호를 증폭하고 이 방법에서 사용된 면역분석 복합체를 고정(anchor)시키도록 디자인된다.

배경 기술

[0005] 샘플 중의 관심있는 분석물의 민감한 측정을 위해 결합 반응, 예를 들면, 항원-항체 반응, 핵산 혼성화 및 수용체-리간드 반응을 이용하는 기법들에 대한 방대한 문헌들이 발표되어 왔다. 많은 생화학적 결합 시스템에서 고도의 특이성은 기초 연구, 인간 및 수의학 진단, 환경 모니터링 및 산업적 검사를 포함하는 다양한 상업적 분야에서 가치있는 많은 분석 방법들 및 시스템들에 이르게 하였다. 관심있는 분석물의 존재는 결합 반응에의 분석물의 참여를 직접적으로 측정함으로써 측정될 수 있다. 일부 방법들에서, 이 참여는 하나 이상의 결합 물질에 부착된 관찰가능한 표지의 측정을 통해 표시될 수 있다.

[0006] 샌드위치 면역분석 포맷(format)이 많은 적용분야에서 뛰어난 민감성 및 특이성을 제공하지만, 일부 분석물들은 통상적인 면역분석 기법에 의해 검출되기에는 너무 낮은 농도로 존재한다. 샌드위치 면역분석의 성능은 검출 항체의 비특이적 결합 및 높은 해리속도 항체를 포함하는 샌드위치 복합체의 불안정성에 의해 제한될 수도 있다.

그러나, 민감성 및 특이성을 개선하기 위해 통상적인 면역분석 기법을 개질하고자 하는 노력은 분석의 민감성 및 특이성에 크게 영향을 미칠 수 있는 각각의 단계에서의 비효율성에 의해 방해될 수 있는 보다 더 복잡한 노동 집약적인 프로토콜을 종종 초래한다. 예를 들면, 다수의 결합 사건들 및/또는 반응들을 요구하는 복잡한 분석에서, 어느 한 사건 또는 반응이 최적 미만인 경우, 전체 분석의 민감성 및 특이성은 나빠질 수 있다. 민감성을 개선하고 비특이적 결합을 감소시키고 샌드위치 복합체의 안정성을 개선함으로써 샌드위치 면역분석 성능을 개선하는 신규 기법이 필요하다.

발명의 내용

- [0007] 본 발명은 하기 구체적인 실시양태들을 고려한다. 당업자는 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 본원에 기재된 실시양태들에 대한 다양한 변형, 추가 및 변경을 만들 수 있다. 이러한 변형, 추가 및 변경은 하기 특허청구범위 내에 속하도록 의도된다.
- [0008] 실시양태 (1): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, 상기 분석물을 (i) 고정 시약(anchoring reagent)과 분석물에 대한 포획 시약(capture reagent)을 포함하는 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 검출 시약에 결합시킴으로써, 상기 포획 시약, 상기 분석물 및 상기 검출 시약을 포함하는 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; 상기 프로브를 연장하여, 상기 고정 시약에 결합하는 고정 영역을 포함하는 연장된 서열을 형성하는 단계; 상기 연장된 서열을 상기 고정 시약에 결합시키는 단계; 및 상기 표면에 결합된 연장된 서열의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법.
- [0009] 실시양태 (1)에서, 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 햅텐(hapten), 에피토프, 미미토프(mimotope) 또는 앵타머(aptamer)일 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 포획 시약은 항체이다. 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 햅텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 구체적인 실시양태에서 검출 시약은 항체이다. 실시양태 (1)의 한 구체적인 예에서, 포획 시약 및 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다. 고정 시약은 올리고뉴클레오타이드 서열, 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 햅텐, 에피토프 또는 미메토프를 포함할 수 있고, 임의적으로 고정 영역은 앵타머를 포함할 수 있고 고정 시약은 앵타머 리간드를 포함할 수 있다. 고정 영역은 핵산 서열을 포함할 수 있고, 고정 시약은 DNA 결합 단백질을 포함할 수 있다. 고정 시약은 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 고정 시약은 상보적 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 고정 영역은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0010] 실시양태 (1)의 결합 단계는 고정 영역과 고정 시약 사이에 삼중 나선을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 방법은 결합 단계 전에 고정 영역을 변형시켜 단일 가닥 서열을 노출시키는 단계; 결합 단계 전에 고정 영역을 헬리카제(helicase) 활성화에 노출시키는 단계; 및/또는 결합 단계 전에 고정 영역을 뉴클레아제(nuclease) 처리에 노출시키는 단계를 추가로 포함할 수도 있다. 이 실시양태에서, 고정 영역은 하나 이상의 햅텐-변형된 염기를 포함할 수 있고, 고정 시약은 상기 햅텐에 대해 특이적인 하나 이상의 항체를 포함할 수 있고/있거나; 고정 영역은 하나 이상의 리간드-변형된 염기를 포함할 수 있고 고정 시약은 상기 리간드에 대해 특이적인 하나 이상의 수용체를 포함할 수 있다. 연장된 서열은 하나 이상의 검출 서열을 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 검출 서열에 상보적인 복수의 표지된 프로브와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있고/있거나; 연장된 서열은 하나 이상의 변형된 염기를 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 변형된 염기에 결합할 수 있는 복수의 검출가능한 모이어티들(moieties)과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있고/있거나; 연장된 서열은 하나 이상의 표지된 염기를 포함할 수 있고, 측정 단계는 하나 이상의 표지된 염기의 존재를 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이 실시양태에서, 하나 이상의 변형된 염기는 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 햅텐, 에피토프 또는 미메토프를 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 하나 이상의 변형된 염기의 결합 파트너 및 검출가능한 표지를 포함한다. 하나 이상의 변형된 염기는 스트렙타비딘을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 스트렙타비딘 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 아비딘을 포함할 수 있고 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 아비딘 및 검출가능한 표지를 포함한다.
- [0011] 실시양태 (1)의 제1 단계는 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 분석물에 대한 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있거나; 실시양태 (1)의 제1 단계는 분석물을 하기 순서로 하기

종들: (i) 분석물에 대한 검출 시약, 및 (ii) 표면 상의 포획 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있고/있거나; 제1 단계는 분석물을 동시에 또는 실질적으로 동시에 하기 종들: (i) 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 분석물에 대한 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0012] 실시양태 (1)의 연장 단계는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시키고 상기 프로브를 증합효소 연쇄 반응으로 연장하는 단계; 및/또는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시켜 환형 핵산 주형을 형성하고 환형 주형을 롤링 서클 증폭(rolling circle amplification)으로 연장하는 단계를 포함할 수 있다. 이 실시양태에서, 연장된 프로브는 프로브 연장 후 표면 상에 위치한 상태로 남아있을 수 있다. 따라서, 복합체는 연장 단계 후 표면에 결합된 상태로 남아있을 수 있고, 예를 들면, 연장된 프로브는 표면 상의 복합체 위치의 10 μm 내지 100 μm 이내의 위치에서 고정 시약에 결합된다. 한 구체적인 실시양태에서, 연장된 프로브는 표면 상의 복합체 위치로부터 100 μm 미만, 50 μm 미만, 보다 특정하게는, 10 μm 미만의 위치에서 고정 시약에 결합된다.

[0013] 실시양태 (1)의 연장 단계는 PCR(증합효소 연쇄 반응), LCR(리가제(Ligase) 연쇄 반응), SDA(가닥 치환 증폭), 3SR(자체-지속 합성 반응) 또는 등온 증폭법을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 연장 단계는 등온 증폭법, 예를 들면, 헬리카제 의존적 증폭 또는 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함할 수 있다.

[0014] 실시양태 (1)에서 언급된 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 상기 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 플레이트의 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치하고/하거나; 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 한 실시양태에서, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재할 수 있다. 표면은 전극을 포함할 수 있고, 측정 단계는 전압 과형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 임의적으로 상기 방법은 전극 상에 입자를 수집하는 단계 및 전압 과형을 상기 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 포함한다.

[0015] 실시양태 (1)의 측정 단계는 연장된 서열을 검출가능한 표지를 갖는 검출 프로브에 결합시키는 단계; 상기 검출 가능한 표지를 측정하는 단계; 및 측정치를 샘플 중의 분석물의 양과 상호관련시키는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 이때 상기 검출 프로브는 연장된 서열의 영역에 상보적인 핵산 서열을 포함한다. 검출가능한 표지는 광산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정될 수 있다. 실시양태 (1)의 구체적인 예에서, 검출가능한 표지는 ECL 표지이고, 측정 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0016] 실시양태 (2): 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) (i) 분석물에 대한 포획 시약 및 (ii) 고정 시약을 포함하는 표면; 및 (b) 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 검출 시약을 포함하는 키트.

[0017] 실시양태 (2)의 고정 시약은 올리고뉴클레오타이드 서열, 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 헵텐, 에피토프 또는 미메토프를 포함할 수 있고, 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 포획 시약은 항체를 포함할 수 있고/있거나, 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있다. 상기 키트의 구체적인 실시양태에서, 검출 시약은 항체이다.

[0018] 실시양태 (2)의 키트의 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 상기 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 키트의 표면이 웰의 플레이트인 경우, 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치하고/하거나; 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 키트의 구체적인 예에서, 표면은 웰이고, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재할 수 있다. 나아가, 키트의 표면은 전극을 포함할 수 있다.

[0019] 실시양태 (3): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 상기 분석물을 (i) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약과 분석물에 대한 포획 시약을 포함하는 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 핵산 프로

브에 연결된, 분석물에 대한 검출 시약에 결합시킴으로써, 상기 포획 시약, 상기 분석물 및 상기 검출 시약을 포함하는 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (b) 상기 프로브를 연장하여, 고정 서열에 상보적인 고정 서열 상보체를 포함하는 연장된 서열을 형성하는 단계; (c) 상기 고정 서열을 고정 서열 상보체에 혼성화시키는 단계; 및 (d) 상기 표면에 결합된 연장된 서열의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

[0020] 실시양태 (3)에서, 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 구체적인 예에서 포획 시약은 항체이다. 마찬가지로, 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 실시양태 (3)의 구체적인 예에서 검출 시약은 항체이다. 실시양태 (3)의 한 예에서, 포획 시약 및 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다. 고정 올리고뉴클레오타이드 서열은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 연장된 서열은 하나 이상의 검출 서열을 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 검출 서열에 상보적인 복수의 표지된 프로브와 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있고; 대안적으로 또는 추가로, 연장된 서열은 하나 이상의 변형된 염기를 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 변형된 염기에 결합할 수 있는 복수의 검출가능한 모이어티들과 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0021] 구체적인 예에서, 연장된 서열은 하나 이상의 표지된 염기를 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 하나 이상의 표지된 염기의 존재를 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 변형된 염기는 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 헵텐, 에피토프 또는 미메토프를 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 하나 이상의 변형된 염기의 결합 파트너 및 검출가능한 표지를 포함한다. 하나 이상의 변형된 염기는 스트랩타비딘을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 스트랩타비딘 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 아비딘을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 아비딘 및 검출가능한 표지를 포함한다.

[0022] 실시양태 (3)의 단계 (a)는 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 분석물에 대한 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 단계 (a)는 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 분석물에 대한 검출 시약, 및 (ii) 표면 상의 포획 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 단계 (a)는 분석물을 동시에 또는 실질적으로 동시에 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 분석물에 대한 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0023] 실시양태 (3)의 연장 단계는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시키고 상기 프로브를 중합효소 연쇄 반응으로 연장하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 연장 단계는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시켜 환형 핵산 주형을 형성하고 환형 주형을 롤링 서클 증폭으로 연장하는 단계를 포함할 수 있다. 연장된 프로브는 프로브 연장 후 표면 상에 위치한 상태로 남아있을 수 있고, 예를 들면, 복합체는 연장 단계 후 표면에 결합된 상태로 남아 있다. 한 예에서, 연장된 프로브는 표면 상의 복합체 위치의 10 μm 내지 100 μm 이내의 위치에서 고정 시약에 결합된다. 한 구체적인 실시양태에서, 연장된 프로브는 표면 상의 복합체 위치로부터 100 μm 미만, 50 μm 미만, 보다 특정하게는, 10 μm 미만의 위치에서 고정 시약에 결합된다. 이 구체적인 실시양태에서, 연장 단계는 PCR (중합효소 연쇄 반응), LCR (리가제 연쇄 반응), SDA (가닥 치환 증폭), 3SR (자체-지속 합성 반응) 또는 등온 증폭법을 포함할 수 있다. 예를 들면, 연장 단계는 등온 증폭법, 예를 들면, 헬리카제 의존적 증폭 또는 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함할 수 있다.

[0024] 실시양태 (3)의 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 상기 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 플레이트의 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재할 수 있다. 구체적인 예에서, 표면은 전극을 포함할 수 있고, 측정 단계는 전압 파형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 방법은 전극 상에 입자를 수집하는 단계 및 전압 파형을 상기 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 측정 단계는 연장된 서열을 검출가능한 표지를 갖는 검출 프로브에 결합시키는 단계; 상기 검출가능한 표지를 측정하는 단계; 및 측정치를 샘플 중의 분석물의

양과 상호관련시키는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 이때 상기 검출 프로브는 연장된 서열의 영역에 상보적인 핵산 서열을 포함한다. 이 실시양태에서, 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정된다. 예를 들면, 검출가능한 표지는 ECL 표지이고, 측정 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0025] 실시양태 (4): 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) (i) 분석물에 대한 포획 시약, 및 (ii) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약을 포함하는 표면; 및 (b) 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 검출 시약을 포함하는 키트.

[0026] 실시양태 (4)의 키트는 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 펩텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함하는 포획 시약을 포함한다. 구체적인 예에서, 포획 시약은 항체를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 펩텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 구체적으로 검출 시약은 항체를 포함할 수 있다.

[0027] 실시양태 (4)의 키트는 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있는 표면을 포함한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치하고, 예를 들면, 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 예를 들면, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재한다. 실시양태 (4)의 표면은 전극을 포함할 수 있다.

[0028] 실시양태 (5): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 상기 분석물을 (i) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약과 분석물에 대한 포획 시약을 포함하는 표면 상의 포획 시약, (ii) 제1 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제1 검출 시약, 및 (iii) 제2 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 결합 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (b) 제1 프로브 및 제2 프로브가 인접할 것을 요구하는 연장 과정을 이용하여 제2 프로브를 연장함으로써 고정 서열에 상보적인 고정 서열 상보체를 포함하는 연장된 서열을 형성하는 단계; (c) 상기 고정 서열을 고정 서열 상보체에 혼성화시키는 단계; 및 (d) 상기 표면에 결합된 연장된 서열의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

[0029] 실시양태 (5)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 펩텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있다. 구체적인 예에서, 포획 시약은 항체이다. 마찬가지로, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 펩텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 구체적인 예에서 제1 검출 시약은 항체이다. 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 펩텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고; 구체적인 예에서, 제2 검출 시약은 항체이다. 보다 구체적으로, 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.

[0030] 실시양태 (5)에서, 고정 올리고뉴클레오타이드 서열은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 이 실시양태에서, 연장된 서열은 하나 이상의 검출 서열을 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 검출 서열에 상보적인 복수의 표지된 프로브와 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 연장된 서열은 하나 이상의 변형된 염기도 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 변형된 염기에 결합할 수 있는 복수의 검출가능한 모이어티들과 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 연장된 서열은 하나 이상의 표지된 염기를 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 하나 이상의 표지된 염기의 존재를 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 변형된 염기는 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 펩텐, 에피토프 또는 미메토프를 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 하나 이상의 변형된 염기의 결합 파트너 및 검출가능한 표지를 포함한다. 예를 들면, 하나 이상의 변형된 염기는 스트렙타비딘을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 스트렙타비딘 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 아비딘을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 아비딘 및 검출가능한 표지를 포함한다.

[0031] 실시양태 (5)의 단계 (a)는 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약; 및 (ii) 분석물에 대

한 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 단계 (a)는 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 분석물에 대한 검출 시약, 및 (ii) 표면 상의 포획 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있거나; 단계 (a)는 분석물을 동시에 또는 실질적으로 동시에 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 분석물에 대한 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0032] 실시양태 (5)의 연장 단계는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시키고 상기 프로브를 중합효소 연쇄 반응으로 연장하는 단계를 포함할 수 있다. 연장 단계는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시켜 환형 핵산 주형을 형성하고 환형 주형을 롤링 서클 증폭으로 연장하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 연장된 프로브는 프로브 연장 후 표면 상에 위치한 상태로 남아있을 수 있고, 예를 들면, 복합체는 연장 단계 후 표면에 결합된 상태로 남아있다. 연장된 프로브는 표면 상의 복합체 위치의 10 μm 내지 100 μm 이내의 위치에서 고정 시약에 결합될 수 있다. 한 구체적인 실시양태에서, 연장된 프로브는 표면 상의 복합체 위치로부터 100 μm 미만, 50 μm 미만, 보다 특정하게는, 10 μm 미만의 위치에서 고정 시약에 결합된다. 연장 단계는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LCR(리가제 연쇄 반응), SDA(가닥 치환 증폭), 3SR(자체-지속 합성 반응) 또는 등은 증폭법을 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 연장 단계는 등은 증폭법, 예를 들면, 헬리카제 의존적 증폭 또는 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함할 수 있다.

[0033] 실시양태 (5)의 연장 과정은 단계 (a)에서 형성된 복합체를, (i) 제2 프로브에 상보적인 내부 서열 및 (ii) 제1 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 2개의 말단 서열을 포함하는 커넥터(connector) 서열과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 커넥터 올리고뉴클레오타이드의 2개의 말단 서열을 결합시켜 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 연장 과정은 실시양태 (5)의 단계 (a)에서 형성된 복합체를, 제1 프로브의 제1 영역 및 제2 프로브의 제1 영역에 상보적인 제1 커넥터 프로브 서열을 포함하는 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드 서열, 및 제1 프로브의 제2 비중첩 영역 및 제2 프로브의 제2 비중첩 영역에 상보적인 제2 프로브 서열을 포함하는 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계; 및 임의적으로, 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드와 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 결합시켜 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0034] 실시양태 (5)의 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 플레이트의 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수도 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면이 플레이트의 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재할 수 있다. 구체적인 예에서, 표면은 전극을 포함할 수 있고, 측정 단계는 전압 파형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 임의적으로 실시양태 (5)의 방법은 전극 상에 입자를 수집하는 단계 및 전압 파형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0035] 실시양태 (5)의 측정 단계는 연장된 서열을 검출가능한 표지를 갖는 검출 프로브에 결합시키는 단계; 검출가능한 표지를 측정하는 단계; 및 측정치를 샘플 중의 분석물의 양과 상호관련시키는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 이때 검출 프로브는 연장된 서열의 영역에 상보적인 핵산 서열을 포함한다. 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정될 수 있다. 구체적인 예에서, 검출가능한 표지는 ECL 표지이고, 측정 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0036] 실시양태 (6): 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) (i) 분석물에 대한 포획 시약 및 (ii) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약을 포함하는 표면; (b) 제1 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제1 검출 시약; 및 (c) 제2 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제2 검출 시약을 포함하는 키트.

[0037] 실시양태 (6)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 구체적인 예에서 포획 시약은 항체를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 구체적인 예에서 제1 검출 시약은 항체를 포함할 수 있다. 유사하게, 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 구체적인 예에서 제2 검출 시약은 항체를 포함할 수 있다.

- [0038] 실시양태 (6)의 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치하고/하거나; 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재할 수 있다. 구체적인 예에서, 표면은 전극을 포함할 수 있다.
- [0039] 실시양태 (7): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 상기 분석물을 (i) 고정 시약과 포획 시약을 포함하는 표면 상의 분석물에 대한 포획 시약, (ii) 제1 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약, 및 (iii) 제2 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 포획 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 검출 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (b) 단계 (a)에서 형성된 검출 복합체를, (i) 제2 인접 프로브에 상보적인 내부 서열 및 (ii) 제1 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 2개의 말단 서열을 포함하는 커넥터 서열과 접촉시키는 단계; (c) 상기 커넥터 서열을 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브에 혼성화시키는 단계; (d) 커넥터 올리고뉴클레오타이드의 2개의 말단 서열을 결합시켜 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계; (e) 제2 인접 프로브를 표적 서열의 롤링 서클 증폭으로 연장하여, 고정 시약에 결합하는 결합 도메인을 포함하는 앰플리콘(amplicon)을 생성하는 단계; (f) 상기 앰플리콘을 상기 고정 시약에 결합시키는 단계; 및 (g) 상기 표면 상의 앰플리콘의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법.
- [0040] 실시양태 (8): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 상기 분석물을 (i) 고정 시약과 포획 시약을 포함하는 표면 상의 분석물에 대한 포획 시약, (ii) 제1 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약, 및 (iii) 제2 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 포획 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 검출 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (b) 단계 (a)에서 형성된 검출 복합체를 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드 및 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계로서, 이때 (i) 제1 커넥터의 제1 말단 및 제2 커넥터의 제1 말단이 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적이고, (ii) 제1 커넥터의 제2 말단 및 제2 커넥터의 제2 말단이 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적인 것인 단계; (c) 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드 및 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브에 혼성화시키는 단계; (d) 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드와 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 결합시켜 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계; (e) 제2 인접 프로브를 표적 서열의 롤링 서클 증폭으로 연장하여, 고정 시약에 결합하는 결합 도메인을 포함하는 앰플리콘을 생성하는 단계; (f) 상기 앰플리콘을 상기 고정 시약에 결합시키는 단계; 및 (g) 상기 표면 상의 앰플리콘의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법.
- [0041] 실시양태 (7) 및 (8)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 구체적인 예에서 포획 시약은 항체이다. 유사하게, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 예를 들면, 제1 검출 시약은 항체이다. 추가로, 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제2 검출 시약은 항체이다. 실시양태 (7) 및 (8)의 구체적인 예에서, 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.
- [0042] 실시양태 (7) 및 (8)의 고정 시약은 올리고뉴클레오타이드, 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 헵텐, 에피토프 또는 미메토프를 포함할 수 있다. 한 예에서, 결합 도메인은 앵타머를 포함할 수 있고, 고정 시약은 앵타머 리간드를 포함할 수 있다. 결합 도메인은 핵산 서열을 포함할 수 있고, 고정 시약은 DNA 결합 단백질을 포함할 수 있고/있거나; 고정 시약은 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 앰플리콘은 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0043] 실시양태 (7) 및 (8)의 앰플리콘은 하나 이상의 검출 서열을 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 검출 서열에 상보적인 복수의 표지된 프로브와 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 나아가, 앰플리콘은 하나 이상의 변형된 염기를 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 변형된 염기에 결합할 수 있는 복수의 검출가능한 모이어티들과 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 추가로, 앰플리콘은 하나 이상의 표지된 염기를 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 하나 이상의 표지된 염기의 존재를 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 변형된 염기는 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원,

리간드, 수용체, 헵텐, 에피토프 또는 미메토프를 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 하나 이상의 변형된 염기의 결합 파트너 및 검출가능한 표지를 포함한다. 하나 이상의 변형된 염기는 스트렙타비딘을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 스트렙타비딘 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 아비딘을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 아비딘 및 검출가능한 표지를 포함한다.

[0044] 실시양태 (7) 및 (8)의 단계 (a)는 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약; 및 (ii) 분석물에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 단계 (a)는 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 분석물에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약; 및 (ii) 표면 상의 포획 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 추가로, 단계 (a)는 분석물을 동시에 또는 실질적으로 동시에 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약; 및 (ii) 분석물에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0045] 실시양태 (7) 및 (8)의 앰플리콘은 프로브 연장 후 표면 상에 위치한 상태로 남아있을 수 있다. 복합체는 연장 단계 후 표면에 결합된 상태로 남아있을 수 있다. 예를 들면, 앰플리콘은 표면 상의 복합체 위치의 10 μm 내지 100 μm 이내의 위치에서 고정 시약에 결합된다. 한 구체적인 실시양태에서, 연장된 프로브는 표면 상의 복합체 위치로부터 100 μm 미만, 50 μm 미만, 보다 특정하게는, 10 μm 미만의 위치에서 고정 시약에 결합된다.

[0046] 실시양태 (7) 및 (8)의 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 상기 표면상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 플레이트의 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면이 플레이트의 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 구체적인 예에서, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재한다.

[0047] 추가로, 표면은 전극을 포함할 수 있고, 측정 단계는 전압 파형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 이 실시양태들((7) 및 (8))에서, 상기 방법은 전극 상에 입자를 수집하는 단계 및 전압 파형을 상기 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 측정 단계는 앰플리콘을, 검출가능한 표지를 갖는 검출 프로브에 결합시키는 단계; 상기 검출가능한 표지를 측정하는 단계; 및 측정치를 샘플 중의 분석물의 양과 상호관련시키는 단계를 포함할 수 있고, 이때 상기 검출 프로브는 앰플리콘의 영역에 상보적인 핵산 서열을 포함한다. 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정된다. 예를 들면, 검출가능한 표지는 ECL 표지이고, 측정 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0048] 실시양태 (9): 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) (i) 분석물에 대한 포획 시약, 및 (ii) 고정 시약을 포함하는 표면; (b) 제1 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약; (c) 제2 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약; 및 (d) (i) 제2 인접 프로브에 상보적인 내부 서열 및 (ii) 제1 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 2개의 말단 서열을 포함하는 커넥터 서열을 포함하는 키트.

[0049] 실시양태 (10): 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) (i) 분석물에 대한 포획 시약, 및 (ii) 고정 시약을 포함하는 표면; (b) 제1 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약; (c) 제2 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약; 및 (d) (i) 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드 및 (ii) 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 이때 (x) 제1 커넥터의 제1 말단 및 제2 커넥터의 제1 말단이 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적이고 (y) 제1 커넥터의 제2 말단 및 제2 커넥터의 제2 말단이 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적인 것인 키트.

[0050] 실시양태 (9) 및 (10)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 포획 시약은 항체를 포함할 수 있다. 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 구체적인 예에서 제1 검출 시약은 항체를 포함할 수 있다. 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고

고뉴클레오티드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 구체적인 예에서 제2 검출 시약은 항체를 포함할 수 있다.

[0051] 실시양태 (9) 및 (10)의 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 플레이트의 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 구체적인 예에서, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재한다.

[0052] 실시양태 (9) 및 (10)의 표면은 전극을 포함할 수 있다.

[0053] 실시양태 (11): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 상기 분석물을 (i) 고정 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 고정 시약과 포획 시약을 포함하는 표면 상의 분석물에 대한 포획 시약, (ii) 제1 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약, 및 (iii) 제2 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 포획 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 검출 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (b) 단계 (a)에서 형성된 검출 복합체를 (i) 제2 인접 프로브에 상보적인 내부 서열, (ii) 제1 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 2개의 말단 서열들 및 (iii) 고정 서열과 매칭되는 서열을 포함하는 커넥터 서열과 접촉시키는 단계; (c) 상기 커넥터 서열을 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브에 혼성화시키는 단계; (d) 커넥터 올리고뉴클레오티드의 2개의 말단 서열을 결합시킴으로써 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계; (e) 제2 인접 프로브를 표적 서열의 롤링 서클 증폭으로 연장하여, 고정 서열에 상보적인 복수의 고정 서열 상보체들을 포함하는 앰플리콘을 생성하는 단계; (f) 고정 서열을 고정 서열 상보체들 중 하나에 혼성화시키는 단계; 및 (g) 표면 상의 앰플리콘의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

[0054] 실시양태 (12): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 상기 분석물을 (i) 고정 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 고정 시약과 포획 시약을 포함하는 표면 상의 분석물에 대한 포획 시약, (ii) 제1 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약, 및 (iii) 제2 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 포획 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 검출 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (b) 단계 (a)에서 형성된 검출 복합체를 제1 커넥터 올리고뉴클레오티드 및 제2 커넥터 올리고뉴클레오티드와 접촉시키는 단계로서, 이때 (i) 제1 커넥터의 제1 말단 및 제2 커넥터의 제1 말단이 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적이고, (ii) 제1 커넥터의 제2 말단 및 제2 커넥터의 제2 말단이 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적이고, (iii) 제1 커넥터 및/또는 제2 커넥터가 고정 서열과 매칭되는 서열도 포함하는 것인 단계; (c) 제1 커넥터 올리고뉴클레오티드 및 제2 커넥터 올리고뉴클레오티드를 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브에 혼성화시키는 단계; (d) 제1 커넥터 올리고뉴클레오티드와 제2 커넥터 올리고뉴클레오티드를 결합시켜 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계; (e) 제2 인접 프로브를 표적 서열의 롤링 서클 증폭으로 연장하여, 고정 서열에 상보적인 복수의 고정 서열 상보체들을 포함하는 앰플리콘을 생성하는 단계; (f) 고정 서열을 고정 서열 상보체들 중 하나에 혼성화시키는 단계; 및 (g) 표면 상의 앰플리콘의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

[0055] 실시양태 (11) 및 (12)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오티드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이다. 구체적인 예에서, 포획 시약은 항체이다. 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오티드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 구체적인 예에서 제1 검출 시약은 항체이다. 마찬가지로, 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오티드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 구체적인 예에서 제2 검출 시약은 항체이다. 한 예에서, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.

[0056] 실시양태 (11) 및 (12)의 앰플리콘은 하나 이상의 검출 서열을 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 검출 서열에 상보적인 복수의 표지된 프로브와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 나아가, 앰플리콘은 하나 이상의 변형된 염기를 포함할 수도 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 변형된 염기에 결합할 수 있는 복수의 검출가능한 모이어티들과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 앰플리콘은 하나 이상의 표지된 염기를 추가로 포함하고, 측정 단계는 하나 이상의 표지된 염기의 존재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 하나 이상의 변형된 염기는 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 헵텐, 에피토프 또는

미메토프를 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 하나 이상의 변형된 염기의 결합 파트너 및 검출가능한 표지를 포함한다. 하나 이상의 변형된 염기는 스트렙타비딘을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 스트렙타비딘 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 아비딘을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 아비딘 및 검출가능한 표지를 포함한다.

[0057] 실시양태 (11) 및 (12)의 단계 (a)는 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약; 및 (ii) 분석물에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 단계 (a)는 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 분석물에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약; 및 (ii) 표면 상의 포획 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 추가로, 단계 (a)는 분석물을 동시에 또는 실질적으로 동시에 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약; 및 (ii) 분석물에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0058] 실시양태 (11) 및 (12)의 앰플리콘은 프로브 연장 후 표면 상에 위치한 상태로 남아있을 수 있고, 임의적으로 복합체는 연장 단계 후 표면에 결합된 상태로 남아있다. 예를 들면, 앰플리콘은 표면 상의 복합체 위치의 10 μm 내지 100 μm 이내의 위치에서 고정 시약에 결합된다. 한 구체적인 실시양태에서, 연장된 프로브는 표면 상의 복합체 위치로부터 100 μm 미만, 50 μm 미만, 보다 특정하게는, 10 μm 미만의 위치에서 고정 시약에 결합된다.

[0059] 실시양태 (11) 및 (12)의 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 임의적으로, 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 상기 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재할 수 있다.

[0060] 실시양태 (11) 및 (12)의 표면은 전극을 포함할 수 있고, 측정 단계는 전압 파형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 임의적으로, 실시양태 (11) 및 (12)는 전극 상에 입자를 수집하는 단계 및 전압 파형을 상기 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 측정 단계는 앰플리콘을, 검출가능한 표지를 갖는 검출 프로브에 결합시키는 단계, 상기 검출가능한 표지를 측정하는 단계 및 측정치를 샘플 중의 분석물의 양과 상호관련시키는 단계를 포함할 수도 있고, 이때 상기 검출 프로브는 앰플리콘의 영역에 상보적인 핵산 서열을 포함한다. 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정될 수 있다. 한 예에서, 검출가능한 표지는 ECL 표지이고, 측정 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0061] 실시양태 (11) 및 (12)의 샘플은 하나 이상의 분석물 분자를 포함할 수 있고, 표면은 표면 상에 위치한 복수의 해상가능한 결합 영역들에 걸쳐 분포된 하나 이상의 분석물 분자에 대한 복수의 포획 시약들을 포함할 수 있고, 상기 방법은 (x) 하나 이상의 분석물 분자를 표면 상의 하나 이상의 포획 시약에 결합시키는 단계; (y) 각각의 결합 영역에서 분석물 분자의 존재 또는 부재를 확인하는 단계; 및 (z) 분석물 분자를 함유하는 결합 영역의 수 및/또는 분석물 분자를 함유하지 않는 분석물 도메인의 수를 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 측정 단계는 표면으로부터의 광학 신호를 영상화하여 복수의 화소를 포함하는 영상, 및 상기 영상 내의 하나 이상의 화소에 대한 각각의 해상가능한 결합 영역 맵(maps)을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 해상가능한 결합 영역은 어레이의 요소일 수 있고/있거나, 상기 해상가능한 결합 영역은 개별 입자를 격리하도록 구성된다. 각각의 해상가능한 결합 영역은 100 nl 미만의 부피를 갖는 개별 나노-웰일 수 있고, 예를 들면, 이때 99% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유하고/하거나, 약 95% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유하고/하거나, 약 80% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유하고/하거나, 약 50% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유한다. 실시양태 (11) 및 (12)에서 샘플 중의 분석물 분자의 농도는 적어도 부분적으로 하나 이상의 또는 하나의 분석물 분자를 함유하는 결합 영역의 수의 보정 곡선, 포아송(Poisson) 분포 분석 및/또는 가우스(Gaussian) 분포 분석을 이용함으로써 측정될 수 있다.

[0062] 실시양태 (11) 및 (12)에서, 샘플은 하나 이상의 분석물 분자를 포함할 수 있고, 표면은 분석물 분자에 대한 복수의 결합 시약들을 각각 포함하는 복수의 입자들을 포함할 수 있고, 이때 상기 복수의 입자들은 복수의 해상가

능한 결합 영역들에 걸쳐 분포되어 있고, 상기 방법은 (i) 하나 이상의 분석물 분자를 표면 상의 하나 이상의 결합 시약에 결합시키는 단계, (ii) 해상가능한 결합 영역의 어레이에 걸쳐 복수의 입자들을 분포시키는 단계, 및 (iii) 분석물 분자를 함유하는 결합 영역의 수 및/또는 분석물 분자를 함유하지 않는 결합 영역의 수를 확인하기 위해 각각의 해상가능한 결합 영역에서 분석물 분자의 존재 또는 부재를 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[0063] 실시양태 (13): 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) (i) 분석물에 대한 포획 시약, 및 (ii) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약을 포함하는 표면; (b) 제1 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약; (c) 제2 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약; 및 (d) (i) 제2 인접 프로브에 상보적인 내부 서열 및 (ii) 제1 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 2개의 말단 서열을 포함하는 커넥터 서열을 포함하는 키트.

[0064] 실시양태 (14): 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) (i) 분석물에 대한 포획 시약, 및 (ii) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약을 포함하는 표면; (b) 제1 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약; (c) 제2 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약; 및 (d) (i) 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드 및 (ii) 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 이때 (x) 제1 커넥터의 제1 말단 및 제2 커넥터의 제1 말단이 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적이고 (y) 제1 커넥터의 제2 말단 및 제2 커넥터의 제2 말단이 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적인 것인 키트.

[0065] 실시양태 (13) 및 (14)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 예를 들면, 상기 포획 시약은 항체를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 예를 들면, 상기 제1 검출 시약은 항체를 포함할 수 있다. 유사하게, 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 예를 들면, 상기 제2 검출 시약은 항체를 포함할 수 있다.

[0066] 실시양태 (13) 및 (14)의 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 상기 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재할 수 있고, 임의적으로 표면은 전극을 포함할 수 있다.

[0067] 실시양태 (15): 샘플 중의 분석물의 검출 방법으로서, (a) 분석물을 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 각각 포함하는 검출 복합체를 형성하는 단계로서, 이때 제1 검출 시약이 제1 검출가능한 표지를 갖고 제2 검출 시약이 제2 검출가능한 표지를 갖는 것인 단계; (b) 대다수의 반응기들이 하나 이하의 분석물을 함유하도록 복수의 반응기들에 걸쳐 분석물을 분할하는 단계; 및 (c) 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지를 함유하는 반응기의 수를 카운팅함으로써 분석물 분자의 수를 검출하는 단계를 포함할 수 있는 방법. 이 실시양태 (15)에서, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 예를 들면, 상기 제1 검출 시약은 항체이다. 마찬가지로, 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 예를 들면, 상기 제2 검출 시약은 항체이다. 구체적인 예에서, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.

[0068] 실시양태 (15)의 단계 (a)는 상기 분석물 및 상기 검출 시약들을 포함하는 용액을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 단계 (b)는 동일한 용기에서 비결합된 제1 검출 시약 및 비결합된 제2 검출 시약을 발견할 가능성이 10분의 1 미만이도록 복수의 반응기들에 걸쳐 상기 용액을 분할하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 실시양태 (15)의 단계 (a)는 상기 분석물 및 상기 검출 시약들을 포함하는 용액을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 단계 (b)는 동일한 용기에서 비결합된 제1 검출 시약 및 비결합된 제2 검출 시약을 발견할 가능성이 100분의 1 미만이도록 복수의 반응기들에 걸쳐 상기 용액을 분할하는 단계를 포함할 수 있다. 추가로, 실시양태 (15)의 단계 (a)는 상기 분석물 및 상기 검출 시약들을 포함하는 용액을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 단계 (b)는 동일한 용기에서 비결합된 제1 검출 시약 및 비결합된 제2 검출 시약을 발견할 가능성이 1000분

의 1 미만이도록 복수의 반응기들에 걸쳐 상기 용액을 분할하는 단계를 포함할 수 있다. 나아가, 실시양태 (15)의 단계 (a)는 상기 분석물 및 상기 검출 시약들을 포함하는 용액을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 단계 (b)는 동일한 용기에서 비결합된 제1 검출 시약 및 비결합된 제2 검출 시약을 발견할 가능성이 10000분의 1 미만이도록 복수의 반응기들에 걸쳐 상기 용액을 분할하는 단계를 포함할 수 있다.

[0069] 실시양태 (16): 샘플 중의 분석물의 검출 방법으로서, (a) 분석물을 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 포획 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 각각 포함하는 검출 복합체를 형성하는 단계로서, 이때 (i) 상기 제1 검출 시약이 제1 검출가능한 표지를 갖고 제2 검출 시약이 제2 검출가능한 표지를 갖고, (ii) 포획 시약이 표면 상에 존재하는 것인 단계; (b) 대다수의 반응기들이 하나 이하의 분석물을 함유하도록 복수의 반응기들에 걸쳐 분석물을 분할하는 단계; 및 (c) 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지를 함유하는 반응기의 수를 카운팅함으로써 분석물 분자의 수를 검출하는 단계를 포함할 수 있는 방법. 이 실시양태에서, 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 예를 들면, 포획 시약은 항체이다. 마찬가지로, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 예를 들면, 상기 제1 검출 시약은 항체이다. 나아가, 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 예를 들면, 상기 제2 검출 시약은 항체이다. 예를 들면, 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.

[0070] 실시양태 (16)의 단계 (b)는 동일한 용기에서 비결합된 제1 검출 시약 및 비결합된 제2 검출 시약을 발견할 가능성이 10분의 1 미만이도록 복수의 반응기들에 걸쳐 상기 용액을 분할하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 나아가, 실시양태 (16)의 단계 (b)는 동일한 용기에서 비결합된 제1 검출 시약 및 비결합된 제2 검출 시약을 발견할 가능성이 100분의 1 미만이도록 복수의 반응기들에 걸쳐 상기 용액을 분할하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 실시양태 (16)의 단계 (b)는 동일한 용기에서 비결합된 제1 검출 시약 및 비결합된 제2 검출 시약을 발견할 가능성이 1000분의 1 미만이도록 복수의 반응기들에 걸쳐 상기 용액을 분할하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 추가로, 실시양태 (16)의 단계 (b)는 동일한 용기에서 비결합된 제1 검출 시약 및 비결합된 제2 검출 시약을 발견할 가능성이 10000분의 1 미만이도록 복수의 반응기들에 걸쳐 상기 용액을 분할하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0071] 실시양태 (16)의 검출 복합체에서 포획 시약은 포획 시약을 분석물에 결합시키기 전에 표면 상에 존재할 수 있거나; 상기 검출 복합체에서 포획 시약은 포획 시약을 표면 상에 고정화시키기 전에 분석물에 결합한다. 한 예에서, 포획 시약은 표적화 모이어티를 포함할 수 있고, 표면은 표적화 모이어티 상보체를 포함할 수 있다. 표적화 모이어티 및 표적화제 결합 파트너는 하기 결합 쌍들로부터 선택된다: 아비딘-바이오틴, 스트렙타비딘-바이오틴, 수용체-리간드, 항체-항원 및 핵산-핵산 상보체.

[0072] 실시양태 (16)의 표면은 입자이고, 임의적으로 포획 시약은 복수의 입자들 상에 고정화되고, 분석물의 분할은 분석물을 포획 시약에 결합시키고 입자를 복수의 반응기들 내로 분할함으로써 달성된다. 포획 시약은 복수의 입자들 상에 고정화될 수 있고, 분석물의 분할은 입자들을 복수의 반응기들 내로 분할한 후 분석물을 포획 시약에 결합시킴으로써 달성된다.

[0073] 실시양태 (16)은 복수의 입자들을 복수의 반응기들 내로 분할하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 이때 상기 복수의 입자들은 표적화 모이어티를 포함하고, 포획 시약은 표적화 모이어티 상보체를 포함하고, 분석물의 분할은 표적화 모이어티 상보체를 표적화 모이어티에 결합시킴으로써 달성된다. 실시양태 (16)은 분할 단계 전에 및/또는 분할 단계 후에 입자를 세척하는 단계를 포함할 수도 있다.

[0074] 실시양태 (16)의 표면은 반응기들 중 하나 내에 위치할 수 있다. 이 실시양태에서, 포획 시약은 복수의 반응기들의 표면 상에 고정화될 수 있고, 분석물의 분할은 분석물을 포획 시약에 결합시킴으로써 달성된다. 임의적으로, 반응기는 그 위에 고정화된 표적화 모이어티를 갖는 표면을 갖고, 포획 시약은 표적화 모이어티 상보체를 포함하고, 분석물의 분할은 표적화 모이어티 상보체를 표적화 모이어티에 결합시킴으로써 달성된다. 이 구체적인 예에서, 상기 방법은 검출 단계 전에 반응기를 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0075] 실시양태 (16)의 복수의 반응기들은 나노웰의 어레이를 포함할 수 있다. 복수의 반응기들은 10,000개 이상의 반응기들을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 반응기는 100 nL 미만의 부피를 갖는다. 임의적으로, 50% 미만의 반응기들이 검출 시 분석물을 함유하고/하거나, 10% 미만의 반응기들이 검출 시 분석물을 함유하고/하거나, 1% 미만의 반응기들이 검출 시 분석물을 함유하고/하거나, 0.1% 미만의 반응기들이 검출 시 분석물을 함유한다.

- [0076] 실시양태 (16)의 한 양태에서, 제1 검출가능한 표지는 커플링된 효소 반응 시스템의 제1 효소이고, 제2 검출가능한 표지는 커플링된 효소 반응 시스템의 제2 효소이고, 단계 (d)는 상기 반응 시스템의 하나 이상의 기질을 첨가하는 단계, 상기 효소 반응 시스템의 생성물을 생성하는 단계 및 상기 생성물을 함유하는 반응기를 카운팅하는 단계를 포함할 수 있다. 이 실시양태에서, 상기 생성물은 제1 효소와 제2 효소가 가깝게 인접할 때에만 생성될 수 있고, 예를 들면, 제1 효소와 제2 효소는 서로 200 nM 이내에 존재하거나, 제1 효소와 제2 효소는 서로 50 nM 이내에 존재한다. 예를 들면, 제1 효소는 옥시다제(oxidase)이고, 제2 효소는 퍼옥시다제(peroxidase)이고, 기질은 옥시다제 기질 및 표지된 앰플렉스 레드(Amplex Red) 또는 루미놀(luminol) 유도체를 포함한다. 이 실시양태에서, 옥시다제는 글루코스 옥시다제일 수 있고, 옥시다제 기질은 글루코스이다. 한 실시양태에서, 검출 복합체에서 제1 효소 및 제2 효소에 의해 촉매작용된 반응은 표지된 앰플렉스 레드 또는 루미놀이 표면 상에 고정화되게 하고, 임의적으로 상기 방법은 표면 상의 표지된 앰플렉스 레드 또는 루미놀을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 표지된 앰플렉스 레드 또는 루미놀은 임의적으로 바이오틴-앰플렉스 레드 또는 루미놀이로, 상기 방법은 표지된 스트렙타비딘을 첨가하는 단계 및 스트렙타비딘 상의 표지를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0077] 실시양태 (16)의 단계 (d)는 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지가 동일한 분석물 분자에 결합될 때 생성된 인접성 의존적 신호를 측정하는 단계, 및 인접성 의존적 신호를 생성하는 반응기의 수를 카운팅하는 단계를 포함할 수 있고, 예를 들면, 상기 인접성 의존적 신호는 PLA-RCA에 의해 생성된다. 예를 들면, 제1 검출가능한 표지는 FRET 공여자일 수 있고, 검출가능한 표지는 FRET 수용자이고, 인접성 의존적 신호는 FRET 공여자를 여기시키고 FRET 수용자로부터의 방사를 측정함으로써 측정된다. 한 예에서, 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 독립적으로 측정될 수 있다. 임의적으로, 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 분광성면에서 서로 상이한 발광 표지들이다. 한 예에서, 제1 검출가능한 표지는 제1 기질과 반응하여 제1 신호를 생성하는 제1 효소이고, 제2 검출가능한 표지는 제2 기질과 반응하여 상이한 제2 신호를 생성하는 제2 효소이고, 실시양태 (16)의 단계 (d)는 제1 효소 기질 및 제2 효소 기질을 첨가하는 단계, 및 제1 신호 및 제2 신호가 생성되는 반응기의 수를 카운팅하는 단계를 포함할 수 있다. 제1 신호 및 제2 신호는 상이한 분광성을 갖는 흡광도의 변화일 수 있다. 임의적으로, 제1 신호 및 제2 신호는 상이한 분광성을 갖는 발광 신호이다. 제1 효소 및 제2 효소는 예를 들면, 포스파타제(phosphatase), 설페타제(sulfatase), 갈락토시다제(galactosidase), 글루쿠로니다제(glucuronidase) 및 이들의 조합으로부터 선택된 가수분해효소일 수 있고, 제1 기질 및 제2 기질은 포스페이트, 설페이트, 갈락토사이드 및 글루쿠로나이드 변형 안정화 디옥세탄, 4-메틸움벨리페릴(methylumbelliferyl), 플루오레세인(fluorescein), 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 구체적인 예에서, 제1 효소 및 제2 효소는 호스라디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase), 베타-갈락토시다제(beta-galactosidase) 및 알칼리성 포스파타제(alkaline phosphatase)로부터 선택된다. 실시양태 (16)의 검출 단계는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 발광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합을 통한 검출을 포함할 수 있다.
- [0078] 실시양태 (17): 샘플 중의 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) 제1 검출가능한 표지를 포함하는 제1 검출 시약; (b) 제2 검출가능한 표지를 포함하는 제2 검출 시약; 및 (c) 하나 이하의 분석물 분자를 함유하도록 구성된 복수의 반응기들을 포함하는 키트.
- [0079] 실시양태 (18): 샘플 중의 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) 제1 검출가능한 표지를 포함하는 제1 검출 시약; (b) 제2 검출가능한 표지를 포함하는 제2 검출 시약; (c) 포획 시약을 포함하는 표면; 및 (d) 하나 이하의 분석물 분자를 함유하도록 구성된 복수의 반응기들을 포함하는 키트.
- [0080] 실시양태 (17) 및 (18)의 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프, 앵타머 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 한 예에서, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 항체를 포함한다. 포획 항체는 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 예를 들면, 포획 항체는 항체를 포함할 수 있다. 한 예에서, 포획 시약은 표적화 모이어티를 포함할 수 있고, 표면은 표적화 모이어티 상보체를 포함할 수 있고, 예를 들면, 표적화 모이어티 및 표적화제 결합 파트너는 하기 결합 쌍들로부터 선택된다: 아비딘-바이오틴, 스트렙타비딘-바이오틴, 수용체-리간드, 항체-항원 및 핵산-핵산 상보체.
- [0081] 실시양태 (17) 및 (18)의 표면은 입자일 수 있고, 예를 들면, 포획 시약은 복수의 입자들 상에 고정화된다. 대안적으로, 표면은 반응기들 중 하나 내의 위치이고, 예를 들면, 포획 시약은 복수의 반응기들의 표면 상에 고정화된다. 임의적으로, 반응기는 그 위에 고정화된 표적화 모이어티를 갖는 표면을 갖고, 포획 시약은 표적화 모이어티 상보체를 포함한다. 복수의 반응기들은 나노웰의 어레이, 또는 유중수 에멀전 내에 분산된 수적(water

droplets)을 포함할 수 있다. 복수의 반응기들은 10,000개 이상의 반응기들을 포함할 수 있고, 임의적으로 복수의 반응기는 100 nl 미만의 부피를 갖는다.

[0082] 실시양태 (17) 및 (18)의 키트에서, 제1 검출가능한 표지는 커플링된 효소 반응 시스템의 제1 효소일 수 있고, 제2 검출가능한 표지는 커플링된 효소 반응 시스템의 제2 효소이고, 상기 키트는 하나 이상의 추가 바이알, 용기 또는 구획 내에 반응 시스템의 하나 이상의 기질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 제1 효소는 옥시다제이고, 제2 효소는 퍼옥시다제이고, 기질은 옥시다제 기질 및 표지된 앰플렉스 레드 또는 루미놀 유도체를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 옥시다제는 글루코스 옥시다제이고, 옥시다제 기질은 글루코스이다. 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 인접성 의존적 시스템의 성분일 수 있고, 예를 들면, 제1 검출가능한 표지는 FRET 공여자이고, 검출가능한 표지는 FRET 수용자이다. 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 독립적으로 측정될 수 있다. 임의적으로, 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 분광성 면에서 서로 상이한 발광 표지들이다.

[0083] 실시양태 (17) 및 (18)의 키트에서, 제1 검출가능한 표지는 제1 기질과 반응하여 제1 신호를 생성하는 제1 효소이고, 제2 검출가능한 표지는 제2 기질과 반응하여 상이한 제2 신호를 생성하는 제2 효소이고, 상기 키트는 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 제1 효소 기질 및 제2 효소 기질을 포함할 수 있다. 임의적으로, 제1 신호 및 제2 신호는 상이한 분광성을 갖는 흡광도의 변화이다. 한 예에서, 제1 신호 및 제2 신호는 상이한 분광성을 갖는 발광 신호이다. 제1 효소 및 제2 효소는 가수분해효소일 수 있다. 한 예에서, 제1 효소 및 제2 효소는 포스파타제, 설파타제, 갈락토시다제, 글루쿠로니다제 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 제1 기질 및 제2 기질은 포스페이트, 설페이트, 갈락토사이드 및 글루쿠로나이드 변형 안정화 디옥세탄, 4-메틸움벨리페릴, 플루오레세인, 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다. 임의적으로, 제1 효소 및 제2 효소는 호스라디쉬 퍼옥시다제, 베타-갈락토시다제 및 알칼리성 포스파타제로부터 선택된다.

[0084] 실시양태 (19): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 분석물을 포획 시약, 제1 검출가능한 표지를 갖는 제1 검출 시약 및 제2 검출가능한 표지를 갖는 제2 검출 시약에 결합시켜 복합체를 형성하는 단계로서, 이때 상기 복합체에서 포획 시약이 표면 상에 고정화되는 것인 단계; (b) 제1 검출 시약과 제2 검출 시약을 교차연결하여 교차연결된 생성물을 형성하는 단계; (c) 교차연결된 생성물을 표면으로부터 용출물 내로 유리시키는 단계; 및 (d) 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지 둘 다를 포함하는 상기 용출물 중 개별 교차연결된 생성물을 카운팅하는 단계를 포함하는 방법. 이 예 (19)에서, 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 구체적인 예에서 포획 시약은 항체이다. 마찬가지로, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 구체적인 예에서 제1 검출 시약은 항체이다. 나아가, 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 구체적으로 제2 검출 시약은 항체일 수 있다. 한 구체적인 예에서, 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.

[0085] 실시양태 (19)는 교차커넥터를 첨가하여 제1 검출 시약과 제2 검출 시약을 교차연결하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 예를 들면, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 반응성 모이어티를 포함하고, 교차커넥터는 반응성 모이어티를 연결하는 다작용성 교차커넥터이다. 예를 들면, 반응성 모이어티는 아민, 티올, 하이드라지드, 알데하이드, 에스테르, 요오도아세트아미드, 말레이미드, 클릭 화학(click chemistry) 시약 및 이들의 조합을 포함한다. 교차커넥터는 아민, 티올, 하이드라지드, 알데하이드, 에스테르, 요오도아세트아미드, 말레이미드, 클릭 화학 시약 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 결합 모이어티를 포함할 수 있고, 교차커넥터는 결합 모이어티의 다가 결합 파트너이다. 한 예에서, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 동물 종의 항체이고, 교차커넥터는 동물 종의 항체를 표적화하는 다가 항-종 항체이다. 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 바이오틴을 포함할 수 있고, 교차커넥터는 스트렙타비딘이고/이거나; 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 스트렙타비딘을 포함하고, 교차커넥터는 바이오틴이고/이거나; 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 스트렙타비딘에 연결되고, 교차커넥터는 복수의 바이오틴 분자들을 포함하는 중합체이고/이거나; 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 각각 제1 핵산 프로브 및 제2 핵산 프로브를 포함하고, 교차커넥터는 제1 핵산 프로브에 상보적인 서열 및 제2 핵산 프로브에 상보적인 별도의 서열을 포함할 수 있는 올리고뉴클레오타이드이다.

[0086] 실시양태 (19)의 표면은 입자, 반응기, 예를 들면, 튜브 또는 앰플을 포함할 수 있고/있거나, 상기 표면은 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 실시양태 (19)의 방법은 입자를 수집하는 단계 및 입자를 세척하여 불순물을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 임의적으로 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 광산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정된다. 구체적인 예에서, 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 ECL 표지를 포함하고, 카운팅

단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0087] 실시양태 (20): 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) 고정화된 포획 시약을 포함하는 표면; (b) 제1 검출가능한 표지를 갖는 제1 검출 시약; (c) 제2 검출가능한 표지를 갖는 제2 검출 시약; 및 (d) 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약과 반응하는 교차커넥터를 포함하는 키트.
- [0088] 실시양태 (20)의 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 반응성 모이어티를 포함할 수 있고, 교차커넥터는 반응성 모이어티를 연결하는 다작용성 교차커넥터이다. 반응성 모이어티는 아민, 티올, 하이드라지드, 알데하이드, 에스테르, 요오도아세트아미드, 말레이미드, 클릭 화학 시약 및 이들의 조합을 포함할 수 있고; 교차커넥터는 아민, 티올, 하이드라지드, 알데하이드, 에스테르, 요오도아세트아미드, 말레이미드, 클릭 화학 시약 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 실시양태 (20)의 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 결합 모이어티를 포함할 수 있고, 교차커넥터는 결합 모이어티의 다가 결합 파트너이고, 예를 들면, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 동물 종의 항체이고, 교차커넥터는 동물 종의 항체를 표적화하는 다가 항-종 항체이고; 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 바이오틴을 포함하고, 교차커넥터는 스트렙타비딘이고/이거나; 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 스트렙타비딘을 포함하고, 교차커넥터는 바이오틴이고/이거나; 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 스트렙타비딘에 연결되고, 교차커넥터는 복수의 바이오틴 분자들을 포함하는 중합체이고/이거나; 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 각각 제1 핵산 프로브 및 제2 핵산 프로브를 포함하고, 교차커넥터는 제1 핵산 프로브에 상보적인 서열 및 제2 핵산 프로브에 상보적인 별도의 서열을 포함할 수 있다.
- [0089] 실시양태 (20)의 표면은 입자, 멀티-웰 플레이트의 웰, 반응기, 예를 들면, 튜브 또는 앰플을 포함할 수 있다. 추가로, 상기 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약은 표면 상의 상이한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약은 웰 내의 상이한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면은 전극을 포함할 수도 있다.
- [0090] 실시양태 (21): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 분석물을 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시켜 복합체를 형성하는 단계로서, 이때 상기 제1 검출 시약이 제1 검출가능한 표지 및 제1 핵산 프로브를 포함할 수 있고 제2 검출 시약이 제2 검출가능한 표지 및 제2 핵산 프로브를 포함할 수 있고, 상기 복합체에서 포획 시약이 표면 상에 고정화되는 것인 단계; (b) (i) 제1 프로브를 제2 프로브에 혼성화시키거나, (ii) 제1 프로브 및 제2 프로브를 제1 프로브 및 제2 프로브에 상보적인 영역을 갖는 제3 핵산에 혼성화시키거나, (iii) 제1 프로브와 제2 프로브를 결합시킴으로써 제1 검출 시약과 제2 검출 시약을 교차연결하는 단계; (c) 교차연결된 생성물을 표면으로부터 용출물 내로 유리시키는 단계; 및 (d) 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지 둘 다를 포함하는 상기 용출물 중 개별 교차연결된 생성물을 카운팅하는 단계를 포함하는 방법.
- [0091] 실시양태 (21)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 예를 들면, 포획 시약은 항체이다. 마찬가지로, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제1 검출 시약은 항체이고; 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 예를 들면, 제2 검출 시약은 항체이다. 구체적인 예에서, 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.
- [0092] 실시양태 (21)의 표면은 입자, 반응기, 예를 들면, 튜브 또는 앰플, 또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 실시양태 (21)의 방법은 입자를 수집하는 단계 및 입자를 세척하여 불순물을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정될 수 있다. 구체적인 예에서, 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 ECL 표지를 포함하고, 카운팅 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0093] 실시양태 (22): 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) 고정화된 포획 시약을 포함하는 표면; (b) 제1 검출가능한 표지 및 제1 핵산 프로브를 갖는 제1 검출 시약; (c) 제2 검출가능한 표지 및 제2 핵산 프로브를 갖는 제2 검출 시약; 및 (d) 제1 핵산 프로브 및 제2 핵산 프로브에 상보적인 영역을 갖는 제3 핵산을 포함하는 키트.
- [0094] 실시양태 (22)의 표면은 입자, 멀티-웰 플레이트의 웰, 또는 반응기, 예를 들면, 튜브 또는 앰플을 포함할 수

있다. 상기 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약은 표면 상의 상이한 결합 도메인 상에 위치하고; 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약은 웰 내의 상이한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면은 임의적으로 전극을 포함할 수 있다.

[0095] 실시양태 (23): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 상기 분석물을 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시켜 복합체를 형성하는 단계로서, 이때 상기 제1 검출 시약이 제1 핵산 프로브를 포함할 수 있고 제2 검출 시약이 제2 핵산 프로브를 포함할 수 있고, 상기 복합체에서 포획 시약이 표면 상에 고정화되는 것인 단계; (b) 제2 핵산 프로브를 연장하여, 검출가능한 표지를 포함하는 연장된 서열을 형성하는 단계로서, 이때 연장이 복합체에서 제1 핵산 프로브 및 제2 핵산 프로브의 공존(co-localization)에 의존하는 것인 단계; (c) 연장된 서열을 표면으로부터 용출물 내로 유리시키는 단계; 및 (d) 상기 용출물 중 개별 연장된 서열을 카운팅하는 단계를 포함하는 방법.

[0096] 이 실시양태에서, 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이다. 구체적인 예에서, 포획 시약은 항체이다. 마찬가지로, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 구체적인 예에서 제1 검출 시약은 항체이다. 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 구체적으로 제2 검출 시약은 항체이다. 구체적인 예에서, 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.

[0097] 실시양태 (23)의 표면은 입자, 반응기, 예를 들면, 튜브 또는 앵플, 또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 실시양태 (23)의 방법은 입자를 수집하는 단계 및 입자를 세척하여 불순물을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0098] 실시양태 (23)의 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정될 수 있다. 구체적인 예에서, 표지는 ECL 표지를 포함할 수 있고, 카운팅 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0099] 실시양태 (23)의 연장 단계는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시키는 단계 및 상기 프로브를 중합효소 연쇄 반응으로 연장하는 단계를 포함할 수 있다. 연장 단계는 제1 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시키는 단계, 환형 핵산 주형을 형성하는 단계 및 환형 주형을 롤링 서클 증폭으로 연장하는 단계도 포함할 수 있다. 연장 단계는 제1 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시키는 단계, 제2 프로브를 주형 서열에 결합시키는 단계 및 상기 제1 프로브와 상기 제2 프로브를 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 임의적으로, 표지는 형광 표지이고, 개별 연장된 서열의 카운팅은 단일 분자 형광 검출을 포함할 수 있고, 예를 들면, 형광 상관관계 분광법 및/또는 형광 교차-상관관계 분광법을 포함할 수 있다. 단일 분자 형광 검출은 모세관을 통해 용출물을 유동시키는 단계, 광원을 모세관 내의 부피에 집중시켜 호출 대역(interrogation zone)을 생성하는 단계, 및 상기 호출 대역을 광 검출기로 관찰하여 상기 호출 대역을 통한 형광 분자의 통과를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 단일 분자 형광 검출은 모세관을 통해 용출물을 유동시키는 단계, 광원을 상기 모세관 내의 부피에 집중시켜 호출 대역을 생성하는 단계, 및 상기 호출 대역을 광 검출기로 관찰하여 상기 호출 대역을 통한 형광 분자의 통과를 검출하는 단계도 포함할 수 있다.

[0100] 실시양태 (24): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 분석물을 포획 시약, 제1 검출가능한 표지를 갖는 제1 검출 시약 및 제2 검출가능한 표지를 갖는 제2 검출 시약에 결합시켜 복합체를 형성하는 단계로서, 이때 상기 복합체에서 상기 포획 시약이 표면 상에 고정화되는 것인 단계; (b) 고정화된 포획 시약을 표면으로부터 용출물 내로 해리시켜 형성된 복합체를 상기 표면으로부터 유리시키는 단계; 및 (c) 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지 둘 다를 포함하는 상기 용출물 중 개별 생성물을 카운팅하는 단계를 포함하는 방법. 이 실시양태에서, 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 포획 시약은 항체이고; 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제1 검출 시약은 항체이고; 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제2 검출 시약은 항체이고; 구체적인 예에서 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.

[0101] 실시양태 (24)의 표면은 입자, 반응기, 예를 들면, 튜브 또는 앵플, 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 실시양태 (24)의 방법은 입자를 수집하는 단계 및 입자를 세척하여 불순물을 제거하는 단계를 포함할 수 있다. 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생

체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정될 수 있고, 구체적인 실시양태에서 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 ECL 표지를 포함하고, 카운팅 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0102] 실시양태 (25): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 상기 분석물을 (i) 분석물에 대한 포획 시약을 포함하는 표면 상의 포획 시약, (ii) 제1 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제1 검출 시약, 및 (iii) 제2 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 결합 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (b) 제1 프로브 및 제2 프로브가 인접할 것을 요구하는 연장 과정을 이용하여 제2 프로브를 연장하여, 연장된 서열을 형성하는 단계; 및 (c) 상기 표면에 결합된 연장된 서열의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법. 이 실시양태에서, 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 포획 시약은 항체이고; 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제1 검출 시약은 항체이고; 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제2 검출 시약은 항체이고; 구체적인 예에서 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.

[0103] 실시양태 (25)의 연장된 서열은 하나 이상의 검출 서열을 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 검출 서열에 상보적인 복수의 표지된 프로브와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있고/있거나; 연장된 서열은 하나 이상의 변형된 염기를 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 변형된 염기에 결합할 수 있는 복수의 검출가능한 모이어티들과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있고/있거나; 연장된 서열은 하나 이상의 표지된 염기를 포함할 수 있고, 측정 단계는 하나 이상의 표지된 염기의 존재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 하나 이상의 변형된 염기는 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 헵텐, 에피토프 또는 미메토프를 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 하나 이상의 변형된 염기의 결합 파트너 및 검출가능한 표지를 포함한다. 하나 이상의 변형된 염기는 스트랩타비딘을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 스트랩타비딘 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 아비딘을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 아비딘 및 검출가능한 표지를 포함한다.

[0104] 실시양태 (25)의 단계 (a)는 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 분석물에 대한 검출 시약에 결합시키는 단계; 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 분석물에 대한 검출 시약, 및 (ii) 표면 상의 포획 시약에 결합시키는 단계; 또는 분석물을 동시에 또는 실질적으로 동시에 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 분석물에 대한 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 연장 단계는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시키고 상기 프로브를 증합효소 연쇄 반응으로 연장하는 단계; 또는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시켜 환형 핵산 주형을 형성하고 상기 환형 주형을 롤링 서클 증폭으로 연장하는 단계를 포함할 수 있다. 이 실시양태에서, 연장된 프로브는 프로브 연장 후 표면에 위치한 상태로 남아있을 수 있고, 예를 들면, 복합체는 연장 단계 후 표면에 결합된 상태로 남아있다. 연장 단계는 PCR(증합효소 연쇄 반응), LCR(리가제 연쇄 반응), SDA(가닥 치환 증폭), 3SR(자체-지속 합성 반응) 또는 등온 증폭법을 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 연장 단계는 등온 증폭법, 예를 들면, 헬리카제 의존적 증폭 또는 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함할 수 있다.

[0105] 실시양태 (25)의 연장 과정은 단계 (a)에서 형성된 복합체를, (i) 제2 프로브에 상보적인 내부 서열 및 (ii) 제1 프로브의 비중첩 영역들에 상보적인 2개의 말단 서열을 포함하는 커넥터 서열과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 과정은 커넥터 올리고뉴클레오타이드의 상기 2개의 말단 서열을 결합시켜 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 실시양태 (25)의 연장 과정은 단계 (a)에서 형성된 복합체를, 제1 프로브의 제1 영역 및 제2 프로브의 제1 영역에 상보적인 제1 커넥터 프로브 서열을 포함하는 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드 서열, 및 제1 프로브의 제2 비중첩 영역 및 제2 프로브의 제2 비중첩 영역에 상보적인 제2 프로브 서열을 포함하는 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계도 포함할 수 있다. 상기 과정은 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드와 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 결합시켜 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계도 포함할 수 있다.

[0106] 실시양태 (25)의 표면은 입자 또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약(들)은 상기 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이

웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약(들)은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약(들)은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치하고; 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약(들)은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면은 전극을 포함할 수 있고, 측정 단계는 전압 파형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 임의적으로 전극 상에 입자를 수집하는 단계 및 전압 파형을 상기 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 포함한다. 측정 단계는 연장된 서열을 검출가능한 표지를 갖는 검출 프로브에 결합시키는 단계, 상기 검출가능한 표지를 측정하는 단계 및 측정치를 샘플 중의 분석물의 양과 상관관계시키는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 이때 상기 검출 프로브는 연장된 서열의 영역에 상보적인 핵산 서열을 포함한다. 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정될 수 있다. 구체적인 예에서, 검출가능한 표지는 ECL 표지이고, 측정 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0107] 실시양태 (26): 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) 분석물에 대한 포획 시약을 포함하는 표면; (b) 제1 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제1 검출 시약; 및 (c) 제2 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제2 검출 시약을 포함하는 키트.

[0108] 실시양태 (26)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 펩텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 예를 들면, 포획 시약은 항체를 포함할 수 있고; 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 펩텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 예를 들면, 제1 검출 시약은 항체를 포함할 수 있고; 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 펩텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 예를 들면, 제2 검출 시약은 항체를 포함할 수 있고; 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약(들)은 상기 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치하고; 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약(들)은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 임의적으로, 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약(들)은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치하고; 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약(들)은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면은 전극을 포함할 수 있다.

[0109] 실시양태 (1) 내지 (26)의 표면은 분석 용기, 예를 들면, 시험관, 큐벳(cuvette), 유동 셀, FACS 세포 분류기, 카트리지, 또는 멀티-웰 플레이트의 웰의 내부 표면을 포함할 수 있다. 상기 표면은 슬라이드, 분석 칩 또는 분석 어레이; 핀, 프로브, 비드 또는 여과 매질; 또는 측류 매질, 예를 들면, 여과 막을 포함할 수도 있다.

[0110] 실시양태 (27): 하나 이상의 분석물 분자를 포함하는 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 상기 샘플을 표면 상에 위치한 복수의 해상가능한 결합 영역들을 포함하는 표면과 접촉시키는 단계로서, 이때 각각의 해상가능한 결합 영역이 샘플 중의 하나 이상의 분석물 분자에 대한 복수의 포획 시약들을 포함하는 것인 단계; (b) 하나 이상의 분석물 분자를 (i) 상기 표면 상의 하나 이상의 포획 시약, (ii) 제1 검출가능한 표지를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약, 및 (iii) 제2 검출가능한 표지를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 포획 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 검출 복합체를 상기 표면 상의 해상가능한 결합 도메인 상에서 형성하는 단계로서, 이때 제1 검출 가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지가 상이한 표지 화합물인 단계; (c) 각각의 결합 영역에서 분석물 분자의 존재 또는 부재를 확인하는 단계; 및 (d) 분석물 분자를 함유하는 결합 영역의 수 및/또는 분석물 분자를 함유하지 않는 결합 영역의 수를 확인하는 단계를 포함하는 방법. 확인 단계는 표면으로부터의 광학 신호를 영상화하여 복수의 화소를 포함하는 영상, 및 상기 영상 내의 하나 이상의 화소에 대한 각각의 해상가능한 결합 영역 맵을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 해상가능한 결합 영역은 어레이의 요소일 수 있고/있거나, 개별 입자를 격리하도록 구성될 수 있다. 각각의 해상가능한 결합 영역은 100 nL 미만의 부피를 갖는 개별 나노-웰일 수 있고/있거나, 99% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유하거나, 약 95% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유하거나, 약 80% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유하거나, 약 50% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유한다. 샘플 중의 분석물 분자의 농도는 적어도 부분적으로 하나 이상의 또는 하나의 분석물 분자를 함유하는 결합 영역의 수의 보정 곡선, 포아송 분포 분석 및/또는 가우스 분포 분석을 이용함으로써 측정될 수 있다.

[0111] 실시양태 (27)의 표면은 분석물 분자에 대한 복수의 포획 시약들을 각각 포함하는 복수의 입자들을 포함할 수 있고, 이때 상기 복수의 입자들은 복수의 해상가능한 결합 영역들에 걸쳐 분포되고, 상기 방법은 (i) 하나 이

상의 분석물 분자를 표면 상의 하나 이상의 포획 시약, 및 하나 이상의 분석물 분자 각각에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시키는 단계로서, 이때 상기 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약이 각각 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지를 포함하는 것인 단계; (ii) 복수의 입자들을 해상가능한 결합 영역의 어레이에 걸쳐 분포시키는 단계; 및 (iii) 분석물 분자를 함유하는 결합 영역의 수 및/또는 분석물 분자를 함유하지 않는 결합 영역의 수를 확인하기 위해 각각의 해상가능한 결합 영역에서 분석물 분자의 존재 또는 부재를 확인하는 단계를 포함할 수 있고, 이때 임의적으로 각각의 해상가능한 결합 영역은 100 nl 미만의 부피를 갖는 개별 나노-웰이고/이거나, 99% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유하고/하거나, 약 95% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유하고/하거나, 약 80% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유하고/하거나, 약 50% 이상의 결합 영역은 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유한다.

[0112] 실시양태 (27)에서 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 포획 시약은 항체이고; 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제1 검출 시약은 항체이고; 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제2 검출 시약은 항체이다. 구체적인 예에서, 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.

[0113] 실시양태 (27)의 단계 (a)는 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 분석물에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시키는 단계; 분석물을 하기 순서로 하기 중들: (i) 분석물에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약, 및 (ii) 표면 상의 포획 시약에 결합시키는 단계; 또는 분석물을 동시에 또는 실질적으로 동시에 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 분석물에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0114] 실시양태 (27)의 표면은 입자 또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 표면은 전극을 포함할 수 있고, 확인 단계는 전압 파형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 실시양태 (27)의 방법은 전극 상에 입자를 수집하는 단계 및 전압 파형을 상기 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 제1 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정되고/되거나; 제2 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정된다. 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 독립적으로 측정될 수 있고, 한 예에서 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 분광성 면에서 서로 상이한 발광 표지이다.

[0115] 실시양태 (27)의 표면은 분석 용기, 예를 들면, 시험관, 큐벳, 유동 셀, FACS 세포 분류기, 카트리지, 또는 멀티-웰 플레이트의 웰의 내부 표면을 포함할 수 있다. 상기 표면은 슬라이드, 분석 칩 또는 분석 어레이; 핀, 프로브, 비드 또는 여과 매질; 또는 측류 매질, 예를 들면, 여과 막을 포함할 수도 있다.

[0116] 실시양태 (28): 하나 이상의 분석물 분자를 포함하는 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, (a) 샘플 중의 하나 이상의 분석물 분자에 대한 복수의 포획 시약을 각각 포함하는, 표면 상에 위치한 복수의 해상가능한 결합 영역들을 포함하는 표면; (b) 제1 검출가능한 표지를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약; 및 (c) 제2 검출가능한 표지를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약을 포함하고, 이때 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지가 상이한 표지 화합물인 키트.

[0117] 실시양태 (28)의 해상가능한 결합 영역이 어레이의 요소일 수 있고/있거나 개별 입자를 격리하도록 구성될 수 있다. 각각의 해상가능한 결합 영역은 임의적으로 100 nl 미만의 부피를 갖는 개별 나노-웰이다. 표면은 분석물 분자에 대한 복수의 포획 시약들을 각각 포함하는 복수의 입자들을 포함할 수 있고, 이때 복수의 입자들은 복수의 해상가능한 결합 영역들에 걸쳐 분포되고, 키트는 하나 이상의 분석물 분자 각각에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함할 수 있고, 이때 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 각각 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지를 포함한다.

[0118] 실시양태 (28)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 포획 시약은 항체이고; 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제1 검출 시약은 항체이고; 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제2 검출 시약은 항체이다. 구체적인 예에서, 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 분석물에 대한 항체이다.

- [0119] 실시양태 (28)의 표면은 입자 또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 표면은 전극을 포함할 수 있고, 확인 단계는 전압 과형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 제1 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정되고/되거나; 제2 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정된다. 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 독립적으로 측정될 수 있고, 한 예에서 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 분광성 면에서 서로 상이한 발광 표지이다.
- [0120] 실시양태 (28)의 표면은 분석 용기, 예를 들면, 시험관, 큐벳, 유동 셀, FACS 세포 분류기, 카트리지, 또는 멀티-웰 플레이트의 웰의 내부 표면을 포함할 수 있다. 상기 표면은 슬라이드, 분석 칩 또는 분석 어레이; 핀, 프로브, 비드 또는 여과 매질; 또는 측류 매질, 예를 들면, 여과 막을 포함할 수도 있다.
- [0121] 실시양태 (29): 샘플 중의 HIV p24의 검출 방법으로서, (a) HIV p24를 (i) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약과 HIV p24에 대한 포획 시약을 포함하는 표면 상의 포획 시약, (ii) 제1 핵산 프로브에 연결된, HIV p24에 대한 제1 검출 시약, 및 (iii) 제2 핵산 프로브에 연결된, HIV p24에 대한 제2 검출 시약에 결합 시킴으로써, 결합 시약, HIV p24, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (b) 제1 프로브와 제2 프로브가 인접할 것을 요구하는 연장 과정을 이용하여 제2 프로브를 연장하여, 고정 서열에 상보적인 고정 서열 상보체를 포함하는 연장된 서열을 형성하는 단계; (c) 상기 고정 서열을 상기 고정 서열 상보체에 혼성화시키는 단계; 및 (d) 상기 표면에 결합된 연장된 서열의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법.
- [0122] 실시양태 (29)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있다. 구체적인 예에서, 포획 시약은 항체이다. 마찬가지로, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 구체적인 예에서 제1 검출 시약은 항체이다. 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머일 수 있고, 구체적인 예에서 제2 검출 시약은 항체이다. 보다 구체적으로, 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 HIV p24에 대한 항체이다.
- [0123] 실시양태 (29)에서, 고정 올리고뉴클레오타이드 서열은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 이 실시양태에서, 연장된 서열은 하나 이상의 검출 서열을 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 검출 서열에 상보적인 복수의 표지된 프로브와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 연장된 서열은 하나 이상의 변형된 염기도 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 변형된 염기에 결합할 수 있는 복수의 검출가능한 모이어티들과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 연장된 서열은 하나 이상의 표지된 염기를 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 하나 이상의 표지된 염기의 존재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 하나 이상의 변형된 염기는 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 헵텐, 에피토프 또는 미메토프를 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 하나 이상의 변형된 염기의 결합 파트너 및 검출가능한 표지를 포함한다. 예를 들면, 하나 이상의 변형된 염기는 스트렙타비딘을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 스트렙타비딘 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 아비딘을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함하고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 아비딘 및 검출가능한 표지를 포함한다.
- [0124] 실시양태 (29)의 단계 (a)는 HIV p24를 하기 순서로 하기 종들: (i) 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) HIV p24에 대한 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 단계 (a)는 HIV p24를 하기 순서로 하기 종들: (i) HIV p24에 대한 검출 시약, 및 (ii) 표면 상의 포획 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있거나; 단계 (a)는 HIV p24를 동시에 또는 실질적으로 동시에 하기 종들: (i) 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) HIV p24에 대한 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0125] 실시양태 (29)의 연장 단계는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시키고 상기 프로브를 중합효소 연쇄 반응으로 연장하는 단계를 포함할 수 있다. 연장 단계는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시켜 환형 핵산 주형을 형성하고 환형 주형을 롤링 서클 증폭으로 연장하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 연장된 프로브는 프로브 연장 후 표면 상에 위치한 상태로 남아있을 수 있고, 예를 들면, 복합체는 연장 단계 후 표면에 결합된 상태로 남아있다. 연장된 프로브는 표면 상의 복합체 위치의 10 μm 내지 100 μm 이내의 위치에서 고정 시약에 결합될 수 있다. 한

구체적인 실시양태에서, 연장된 프로브는 표면 상의 복합체 위치로부터 100 μm 미만, 50 μm 미만, 보다 특정하게는, 10 μm 미만의 위치에서 고정 시약에 결합된다. 연장 단계는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LCR(리가제 연쇄 반응), SDA(가닥 치환 증폭), 3SR(자체-지속 합성 반응) 또는 등은 증폭법을 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 연장 단계는 등은 증폭법, 예를 들면, 헬리카제 의존적 증폭 또는 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함할 수 있다.

[0126] 실시양태 (29)의 연장 과정은 단계 (a)에서 형성된 복합체를, (i) 제2 프로브에 상보적인 내부 서열 및 (ii) 제1 프로브의 비중첩 영역들에 상보적인 2개의 말단 서열을 포함하는 커넥터 서열과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 커넥터 올리고뉴클레오타이드의 2개의 말단 서열을 결합시켜 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 연장 과정은 실시양태 (29)의 단계 (a)에서 형성된 복합체를, 제1 프로브의 제1 영역 및 제2 프로브의 제1 영역에 상보적인 제1 커넥터 프로브 서열을 포함하는 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드 서열, 및 제1 프로브의 제2 비중첩 영역 및 제2 프로브의 제2 비중첩 영역에 상보적인 제2 프로브 서열을 포함하는 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계; 및 임의적으로, 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드와 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 결합시켜 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0127] 실시양태 (29)의 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 플레이트의 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수도 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면이 플레이트의 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재할 수 있다. 구체적인 예에서, 표면은 전극을 포함할 수 있고, 측정 단계는 전압 파형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 포함할 수 있고, 임의적으로 실시양태 (29)의 방법은 전극 상에 입자를 수집하는 단계 및 전압 파형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0128] 실시양태 (29)의 측정 단계는 연장된 서열을 검출가능한 표지를 갖는 검출 프로브에 결합시키는 단계, 검출가능한 표지를 측정하는 단계, 및 측정치를 샘플 중의 p24의 양과 상호관련시키는 단계를 포함할 수 있고, 이때 검출 프로브는 연장된 서열의 영역에 상보적인 핵산 서열을 포함한다. 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정될 수 있다. 구체적인 예에서, 검출가능한 표지는 ECL 표지이고, 측정 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0129] 실시양태 (30): 샘플 중의 HIV p24를 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) (i) HIV p24에 대한 포획 시약 및 (ii) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약을 포함하는 표면; (b) 제1 핵산 프로브에 연결된, HIV p24에 대한 제1 검출 시약; 및 (c) 제2 핵산 프로브에 연결된, HIV p24에 대한 제2 검출 시약을 포함하는 키트.

[0130] 실시양태 (30)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 구체적인 예에서 포획 시약은 항체를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 구체적인 예에서 제1 검출 시약은 항체를 포함할 수 있다. 유사하게, 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머를 포함할 수 있고, 구체적인 예에서 제2 검출 시약은 항체를 포함할 수 있다.

[0131] 실시양태 (30)의 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치하고/하거나; 표면이 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재할 수 있다. 구체적인 예에서, 표면은 전극을 포함할 수 있다.

[0132] 실시양태 (31): 샘플 중의 HIV p24의 검출 방법으로서, (a) HIV p24를 (i) 고정 시약과 포획 시약을 포함하는 표면 상의 HIV p24에 대한 포획 시약, (ii) 제1 인접 프로브를 포함하는, HIV p24에 대한 제1 검출 시약, 및

(iii) 제2 인접 프로브를 포함하는, HIV p24에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 포획 시약, HIV p24, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 검출 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (b) 단계 (a)에서 형성된 검출 복합체를, (i) 제2 인접 프로브에 상보적인 내부 서열 및 (ii) 제1 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 2개의 말단 서열을 포함하는 커넥터 서열과 접촉시키는 단계; (c) 상기 커넥터 서열을 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브에 혼성화시키는 단계; (d) 커넥터 올리고뉴클레오타이드의 2개의 말단 서열을 결합시켜 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계; (e) 제2 인접 프로브를 표적 서열의 롤링 서클 증폭으로 연장하여, 고정 시약에 결합하는 결합 도메인을 포함하는 앰플리콘을 생성하는 단계; (f) 상기 앰플리콘을 상기 고정 시약에 결합시키는 단계; 및 (g) 상기 표면 상의 앰플리콘의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

[0133] 실시양태 (32): 샘플 중의 HIV p24의 검출 방법으로서, (a) HIV p24를 (i) 고정 시약과 포획 시약을 포함하는 표면 상의 HIV p24에 대한 포획 시약, (ii) 제1 인접 프로브를 포함하는, HIV p24에 대한 제1 검출 시약, 및 (iii) 제2 인접 프로브를 포함하는, HIV p24에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 포획 시약, HIV p24, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 검출 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (b) 단계 (a)에서 형성된 검출 복합체를 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드 및 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계로서, 이때 (i) 제1 커넥터의 제1 말단 및 제2 커넥터의 제1 말단이 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적이고, (ii) 제1 커넥터의 제2 말단 및 제2 커넥터의 제2 말단이 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적인 것인 단계; (c) 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드 및 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브에 혼성화시키는 단계; (d) 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드와 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 결합시켜 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성하는 단계; (e) 제2 인접 프로브를 표적 서열의 롤링 서클 증폭으로 연장하여, 고정 시약에 결합하는 결합 도메인을 포함하는 앰플리콘을 생성하는 단계; (f) 상기 앰플리콘을 상기 고정 시약에 결합시키는 단계; 및 (g) 상기 표면 상의 앰플리콘의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

[0134] 실시양태 (31) 및 (32)의 포획 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 구체적인 예에서 포획 시약은 항체이다. 유사하게, 제1 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제1 검출 시약은 항체이다. 추가로, 제2 검출 시약은 항체, 항원, 리간드, 수용체, 올리고뉴클레오타이드, 헵텐, 에피토프, 미미토프 또는 앵타머이고, 예를 들면, 제2 검출 시약은 항체이다. 실시양태 (31) 및 (32)의 구체적인 예에서, 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 HIV p24에 대한 항체이다.

[0135] 실시양태 (31) 및 (32)의 고정 시약은 올리고뉴클레오타이드 서열, 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 헵텐, 에피토프 또는 미메토프를 포함할 수 있다. 한 예에서, 결합 도메인은 앵타머를 포함할 수 있고, 고정 시약은 앵타머 리간드를 포함할 수 있다. 결합 도메인은 핵산 서열을 포함할 수 있고, 고정 시약은 DNA 결합 단백질을 포함할 수 있고/있거나; 고정 시약은 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 앰플리콘은 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0136] 실시양태 (31) 및 (32)의 앰플리콘은 하나 이상의 검출 서열을 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 검출 서열에 상보적인 복수의 표지된 프로브와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 나아가, 앰플리콘은 하나 이상의 변형된 염기를 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 연장된 서열을 하나 이상의 변형된 염기에 결합할 수 있는 복수의 검출가능한 모이어티들과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 추가로, 앰플리콘은 하나 이상의 표지된 염기를 추가로 포함할 수 있고, 측정 단계는 하나 이상의 표지된 염기의 존재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 하나 이상의 변형된 염기는 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 헵텐, 에피토프 또는 미메토프를 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 하나 이상의 변형된 염기의 결합 파트너 및 검출가능한 표지를 포함한다. 하나 이상의 변형된 염기는 스트렙타비딘을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 스트렙타비딘 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 아비딘을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 바이오틴 및 검출가능한 표지를 포함하고/하거나; 하나 이상의 변형된 염기는 바이오틴을 포함할 수 있고, 복수의 검출가능한 모이어티들은 각각 아비딘 및 검출가능한 표지를 포함한다.

[0137] 실시양태 (31) 및 (32)의 단계 (a)는 HIV p24를 하기 순서로 하기 중들: (i) 표면 상의 포획 시약; 및 (ii) HIV p24에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 단계 (a)는 HIV p24를 하기 순서로 하기 중들: (i) HIV p24에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약; 및 (ii) 표면 상의

포획 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다. 추가로, 단계 (a)는 HIV p24를 동시에 또는 실질적으로 동시에 하기 종들: (i) 표면 상의 포획 시약; 및 (ii) HIV p24에 대한 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0138] 실시양태 (31) 및 (32)의 앰플리콘은 프로브 연장 후 표면 상에 위치한 상태로 남아있다. 복합체는 연장 단계 후 표면에 결합된 상태로 남아있을 수 있다. 예를 들면, 앰플리콘은 표면 상의 복합체 위치의 10 μm 내지 100 μm 이내의 위치에서 고정 시약에 결합된다. 한 구체적인 실시양태에서, 연장된 프로브는 표면 상의 복합체 위치로부터 100 μm 미만, 50 μm 미만, 보다 특정하게는, 10 μm 미만의 위치에서 고정 시약에 결합된다.

[0139] 실시양태 (31) 및 (32)의 표면은 입자 및/또는 멀티-웰 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 상기 표면 상의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면이 플레이트의 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 2개의 상이한 결합 도메인들 상에 위치한다. 표면은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 표면이 플레이트의 웰인 경우, 웰은 복수의 상이한 결합 도메인들을 포함할 수 있고, 포획 시약 및 고정 시약은 웰 내의 동일한 결합 도메인 상에 위치한다. 구체적인 예에서, 포획 시약 및 고정 시약은 표면 상에서 10 nm 내지 100 nm 이내에 존재한다.

[0140] 추가로, 표면은 전극을 포함할 수 있고, 측정 단계는 전압 파형을 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 이 실시양태들((31) 및 (32))에서, 상기 방법은 전극 상에 입자를 수집하는 단계 및 전압 파형을 상기 전극에 인가하여 전기화학발광 신호를 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 측정 단계는 앰플리콘을 검출가능한 표지를 갖는 검출 프로브에 결합시키는 단계, 상기 검출가능한 표지를 측정하는 단계, 및 측정치를 샘플 중의 분석물의 양과 상관관계시키는 단계를 포함할 수 있고, 이때 상기 검출 프로브는 앰플리콘의 영역에 상보적인 핵산 서열을 포함한다. 검출가능한 표지는 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생체발광, 인광, 방사능, 자기장 또는 이들의 조합의 측정에 의해 측정된다. 예를 들면, 검출가능한 표지는 ECL 표지이고, 측정 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0141] 실시양태 (33): 샘플 중의 관심있는 분석물의 검출 방법으로서, (a) 상기 샘플을 제1 검출 시약에 결합된 분석물을 포함하는 분석물 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에 농축하는 단계로서, 이때 제1 검출 시약은 제1 핵산 프로브에 연결된 것인 단계; (b) 단계 (a)에서 형성된 분석물 복합체를, (i) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약과 분석물에 대한 포획 시약을 포함하는 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 제2 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 포획 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (c) 제1 프로브 및 제2 프로브가 인접할 것을 요구하는 연장 과정을 이용하여 제2 프로브를 연장함으로써 고정 서열에 상보적인 고정 서열 상보체를 포함하는 연장된 서열을 형성하는 단계; (d) 상기 고정 서열을 고정 서열 상보체에 혼성화시키는 단계; 및 (e) 상기 표면에 결합된 연장된 서열의 양을 측정하는 단계를 포함하는 방법. 농축 단계 (a)는 (i) 분석물을 포함하는 샘플을 제1 핵산 프로브의 적어도 일부에 상보적인 표적화제에 연결된 고체상과 접촉시킴으로써, 제1 핵산 프로브와 표적화제 사이의 결합 반응을 통해 고체상에 결합한 분석물을 포함하는 농축 복합체를 형성하는 단계; (ii) 농축 복합체를 수집하는 단계; (iii) 샘플의 비결합된 성분을 농축 복합체로부터 분리하는 단계; 및 (iv) 고체상이 분석물로부터 분리되어 분석물 복합체를 형성하도록 농축 복합체를 유리시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0142] 실시양태 (34): 샘플 중의 관심있는 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) (i) 분석물에 대한 포획 시약 및 (ii) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약을 포함하는 표면; (b) 제1 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제1 검출 시약; (c) 제2 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제2 검출 시약을 포함하는 키트; 및 (d) 제1 핵산 프로브의 적어도 일부에 상보적인 표적화제를 포함하는 고체상을 포함하는 키트.

[0143] 실시양태 (35): 샘플 중의 엑소좀(exosome)의 검출 방법으로서, (a) 상기 엑소좀을 (i) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약과 엑소좀에 대한 포획 시약을 포함하는 표면 상의 포획 시약, (ii) 제1 핵산 프로브에 연결된, 엑소좀에 대한 제1 검출 시약, 및 (iii) 제2 핵산 프로브에 연결된, 엑소좀에 대한 제2 검출 시약에 결합시킴으로써, 결합 시약, 엑소좀, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 복합체를 상기 표면 상에 형성하는 단계; (b) 제1 프로브 및 제2 프로브가 인접할 것을 요구하는 연장 과정을 이용하여 제2 프로브를 연장함으로써 고정 서열에 상보적인 고정 서열 상보체를 포함하는 연장된 서열을 형성하는 단계; (c) 상기 고정 서열을 고정 서열 상보체에 혼성화시키는 단계; 및 (d) 상기 표면에 결합된 연장된 서열의 양을 측정하는 단계

를 포함하는 방법.

[0144] 실시양태 (36): 샘플 중의 관심있는 엑소좀을 검출하기 위한 키트로서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 (a) (i) 엑소좀에 대한 포획 시약 및 (ii) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약을 포함하는 표면; (b) 제1 핵산 프로브에 연결된, 엑소좀에 대한 제1 검출 시약, 및 (c) 제2 핵산 프로브에 연결된, 엑소좀에 대한 제2 검출 시약을 포함하는 키트.

도면의 간단한 설명

[0145] 도 1a 내지 1c는 면역분석에서 고정 시약의 사용을 예시한다. 도 1a는 포획 시약, 관심있는 분석물, 및 핵산 프로브를 포함하는 검출 시약을 포함하는 검출 복합체에 결합하여 이 복합체를 안정화시키기 위한 고정 시약의 사용을 보여준다. 핵산 프로브는 고정 시약에 결합하도록 연장된다. 도 1b에서, 고정 시약은 검출 시약 상에서 형성되는 연장된 서열의 일부에 상보적인 영역을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 도 1c는 핵산 프로브를 각각 포함하는 2개의 검출 시약들이 분석물을 결합시키는 데에 사용되는 구체적인 실시양태를 보여준다. 검출 시약 상의 프로브는 한 연장된 프로브와 고정 올리고뉴클레오타이드 서열의 혼성화를 가능하게 하는 증폭 과정으로 처리된다.

도 2a는 고정 시약을 보유하는 표면 상에 형성된 면역복합체가 복수의 검출가능한 종들을 상기 면역복합체에 부착된 연장된 서열 내에 도입하기 위한 PLA-RCA 과정으로 처리되는 구체적인 실시양태를 보여준다. 도 2b 및 2c는 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 연결 올리고뉴클레오타이드의 2개의 대안적 구성이다.

도 3은 올리고뉴클레오타이드를 단백질에 부착시키는 한 방법을 보여준다.

도 4a는 표면에 결합된 복합체가 포획 시약, 분석물 및 2개의 검출 시약(커넥터 프로브에 결합되어 롤링 서클 증폭에 의해 증폭되는 환형 DNA 주형을 형성하며 각각 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브에 부착됨) 사이에 형성되는 본 발명의 바람직한 실시양태를 예시한다. 도 4a는 분석 방법이 진행됨에 따라 형성되는 앰플리콘의 서열에 상보적인 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 증폭 시약도 포함한다. 도 4b는 제1 환형 DNA 주형 Circ-1, 검출 올리고뉴클레오타이드 서열, 앰플리콘의 불활성 영역, 및 제2 인접 프로브에 혼성화되도록 설계된 부분 PP2의 예시적 서열을 보여준다. 도 4c는 한 대안적 실시양태를 도식화한다.

도 5, 및 도 6a 및 6b는 롤링 서클 증폭에 의해 증폭될 수 있는 앰플리콘을 생성하는 대안적인 방법을 예시한다.

도 7은 샌드위치 복합체에서 각각의 인접 프로브의 일부가 각각의 절편(segment)에 혼성화된 짧은 RNA 가닥에 의해 일시적으로 보호되는 대안적 실시양태를 예시한다. 이 가닥은 인접 프로브들이 서로 혼성화되고 췌가 연장되도록 효소에 의해 제거된다.

도 8은 인접 프로브들이 포획 시약 및 검출 시약에 부착되고 각각의 인접 프로브의 일부가 도 8에 대해 전술된 바와 같이 그에 혼성화된 짧은 RNA 가닥에 의해 일시적으로 보호되는 추가 실시양태를 보여준다.

도 9는 실시예 1에 기재된 방법을 이용함으로써 수행된 IL-10 분석에 대한 보정 곡선을 보여준다.

도 10a 및 10b는 고정 시약을 사용한 경우(a) 및 고정 시약을 사용하지 않은 경우(b) 형광 현미경관찰 영상을 보여준다.

도 11a는 결합 부위 1 또는 2를 포함하는 단일 선형 커넥터 올리고뉴클레오타이드 서열의 구성, 및 본 발명의 분석에서 이 커넥터들의 사용을 보여준다. 도 11b는 Circ-1과 Circ-2의 조합을 사용한 분석 대 결합 부위 1을 포함하는 단일 선형 커넥터 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 결합 부위 2를 포함하는 단일 선형 커넥터 올리고뉴클레오타이드 서열을 사용한 분석에 대한 비교 성능 데이터를 보여준다.

도 12는 실시예 1 및 6에 기재된 방법을 이용함으로써 수행된 HIV p24 분석에 대한 보정 곡선을 보여준다.

도 13은 실시예 1 및 6에 기재된 방법을 이용한 혈청전환 패널의 분석 결과를 보여준다.

도 14의 (a)-(c)는 분석물 농축 단계를 포함하는 HIVp24에 대한 분석 결과를 보여준다.

도 15는 분석물 농축 단계를 포함하는 HIVp24 분석에 대한 보정 곡선을 보여준다.

도 16은 분석물 농축 단계를 포함하는 본원에 기재된 바와 같은 분석 방법의 개략도이다.

도 17은 본원에 기재된 바와 같은 분석 방법의 개략도이며 여기서 앰플리콘은 포획 시약 및/또는 고정 시약을

통해 표면에 결합하기 전에 용액에 형성된다.

도 18은 앰플리콘에 부착하도록 복수의 스테이플(staple) 서열의 이용을 도입함으로써 표면 상에 보다 소형의 구조를 형성하는 분석 방법의 개략도이다.

도 19는 3AB PLA-RCA 기법 및 포획 시약을 표면에 결합시키기 위한 표적화 모이어티 및 이의 상보체의 이용을 도입하는 가교 면역분석 포맷의 개략도이다.

도 20a 내지 도20b는 주형 형성에 대한 생합성 방법의 개략도이다.

도 21은 샘플 다중화의 개략도이다.

도 22는 본원에 기재된 방법을 이용하는 지방단백질 복합체 검출의 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0146] 본원에서 달리 정의되어 있지 않은 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학 용어 및 기술 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 문맥이 달리 요구하지 않은 한, 단수형 용어는 복수형 용어를 포함할 것이고, 복수형 용어는 단수형 용어를 포함할 것이다. "하나" 및 "한"은 이의 하나 또는 하나 초과(즉, 하나 이상)의 문법적 목적어를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들면, "한 요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.
- [0147] 본 발명은 (i) 표적 분석물과 분석에서 사용된 하나 이상의 분석물 결합 시약 사이에 형성된 검출 복합체를 고정시키는 단계; 및/또는 (ii) 표지된 검출 복합체로부터 신호를 증폭하는 단계를 포함하는 개선된 면역분석 방법을 포함한다. 고정된 낮은 결합 친화성 상호작용 및/또는 고분자량 표지(들) 또는 표지 부위(들)를 포함하는 복합체를 안정화시키는 데에 사용될 수 있다. 신호 증폭은 연장된 프로브를, 다수의 표지들 또는 검출 표지 부위들을 함유하는 결합 복합체에 부착시켜 각각의 개별 검출 복합체에 대한 검출가능한 신호를 증폭함으로써 달성될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 방법은 다수의 표지들 또는 검출 표지 부위들을 포함하는 연장된 프로브를 검출 복합체에 부착시키는 단계, 및 상기 복합체를 표면에 고정시켜 상기 복합체가 표면 상에 보유되게 하는 단계를 포함한다. 이 개질된 분석 방법은 극도로 낮은 수의 결합 사건, 심지어 개별 분석물-결합 시약 복합체를 검출하는 데에 사용될 수 있다. 기본 방식은 면역분석에 제한되지 않고, 다른 클래스의 결합 시약을 사용하는 결합 분석을 수행하는 데에 이용될 수 있다.
- [0148] 결합 분석을 개선하는 데에 이용될 수 있는 한 방법은 관심있는 분석물을 포함하는 검출 복합체를 표면에 부착시키고 상기 검출 복합체를 안정화시키기 위한 표면 결합된 고정 시약의 사용이다. 이 방식은 검출 복합체를 형성하는 시약들 사이의 낮은 결합 친화성을 극복하고/하거나 후속 프로세싱 전에 상기 복합체가 표면으로부터 해리되는 것을 방지하는 데에 이용될 수 있다. 결합 분석에서 고정 시약의 사용은 도 1a에 예시되어 있다. 표면 (101)은 분석물 A에 결합하는 포획 시약(102), 및 고정 시약(103)을 포함한다. 하나 이상의 단계에서, 분석물은 포획 시약에 결합되고, 분석물은 검출 시약(104)에도 결합되고, 이때 상기 검출 시약은 핵산 프로브(105)에 연결되어 있다. 분석물은 동시에 또는 실질적으로 동시에 포획 시약 및 검출 시약에 결합될 수 있거나, 분석물은 포획 시약 및 검출 시약 각각에 순차적으로(어느 순서로든지) 결합될 수 있다. 따라서, 포획 시약, 분석물 및 검출 시약을 포함하는 복합체(106)가 표면 상에 형성된다. 프로브는 고정 시약에 결합하는 고정 영역을 포함하는 연장된 서열(107)을 형성하도록 연장된다. 연장된 서열은 고정 시약에 결합되고, 표면에 결합된 연장된 서열의 양이 측정된다.
- [0149] 결합 분석 분야에서 숙련된 자는 본 방법에서 사용될 수 있는 포획 시약 및 동반 결합 파트너의 범위를 용이하게 이해할 것이다. 이러한 쌍의 비한정적 목록은 (어느 순서로든지) 수용체/리간드 쌍, 항체/항원, 천연 또는 합성 수용체/리간드 쌍, 헵텐/항체 쌍, 항원/항체 쌍, 에피토프/항체 쌍, 미미토프/항체 쌍, 앵타머/표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 및 인터칼레이터(intercalater)/표적 분자 쌍을 포함한다. 한 실시양태에서, 결합 분석은 관심있는 분석물에 대한 포획 시약 및/또는 검출 시약으로서 항체 또는 다른 수용체 단백질을 사용한다. 용어 "항체"는 (항체 서브유닛의 시험관내 재조합에 의해 조립된 하이브리드 항체를 비롯한) 온전한 항체 분자, 항체 단편, 및 항체의 항원 결합 도메인을 포함하는 재조합 단백질 구축물(예를 들면, 문헌(Porter, R. R. and Weir, R. C. J. Cell Physiol., 67 (Suppl); 51-64 (1966)) 및 문헌(Hochman, I. Inbar, D. and Givol, D. Biochemistry 12: 1130 (1973))에 기재된 바와 같음)뿐만 아니라, 예를 들면, 검출가능한 표지의 도입에 의해 화학적으로 변형된 항체 구축물도 포함한다.
- [0150] 마찬가지로, 고정 시약 및 상응하는 고정 구성원 또는 영역은 임의의 적합한 결합 쌍, 예를 들면, 수용체/리간

드 쌍, 항체/항원, 천연 또는 합성 수용체/리간드 쌍, 헵텐/항체 쌍, 항원/항체 쌍, 에피토프/항체 쌍, 미미토프/항체 쌍, 앵타머/표적 분자 쌍, 혼성화 파르너, 인터칼레이터/표적 분자 쌍, 및 정전기 전하에 의해 결합된 표면 및 고정 시약의 사용을 포함할 수 있다. 예를 들면, 고정 시약은 올리고뉴클레오타이드 서열, 앵타머, 앵타머 리간드, 항체, 항원, 리간드, 수용체, 헵텐, 에피토프 또는 미메토프일 수 있고, 상응하는 고정 영역은 각각 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열, 앵타머 리간드, 앵타머, 항원, 항체, 수용체, 리간드 또는 항체를 포함한다. 한 구체적인 실시양태에서, 고정 영역은 올리고뉴클레오타이드 서열이고, 고정 시약은 DNA 결합 단백질을 포함한다. 대안적으로, 고정 영역이 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열인 경우, 고정 시약은 인터칼레이터를 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 고정 영역은 하나 이상의 변형된 올리고뉴클레오타이드 염기를 포함할 수 있고, 상응하는 고정 시약은 고정 영역 상의 변형된 염기에 결합하는 하나 이상의 모이어티를 포함한다. 예를 들면, 변형된 염기는 헵텐 또는 리간드를 포함할 수 있고, 상응하는 고정 시약은 헵텐 또는 리간드에 대해 특이적인 하나 이상의 항체 또는 리간드를 각각 포함한다. 나아가, 고정 영역은 검출 복합체를 검출하는 데에 사용될 수 있는 복수의 표지된 뉴클레오타이드 염기들을 포함할 수 있다.

[0151] 도 1b에 도식화된 구체적인 실시양태에서, 표면 결합된 고정 시약은 검출 복합체를 표면에 고정시키는 데에 사용되는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 고정 올리고뉴클레오타이드 서열은 검출 복합체에 부착되는 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열에 결합한다. 이 실시양태에서, 표면(108)은 분석물 A에 결합하는 포획 시약(109), 및 고정 올리고뉴클레오타이드 서열(111)을 포함하는 고정 시약(110)을 포함한다. 하나 이상의 단계에서, 분석물은 포획 시약에 결합되고 분석물은 검출 시약(112)에도 결합되고, 이때 상기 검출 시약은 핵산 프로브(113)에 연결되어 있다. 도 1a에 대해 기술된 바와 같이, 분석물은 동시에 또는 실질적으로 동시에 포획 시약 및 검출 시약에 결합될 수 있거나, 분석물은 포획 시약 및 검출 시약 각각에 순차적으로(어느 순서로든지) 결합될 수 있다. 따라서, 결합 시약, 분석물 및 검출 시약을 포함하는 복합체(114)가 표면 상에 형성된다. 프로브는 고정 서열에 상보적인 고정 서열 상보체를 포함하는 연장된 서열(115)을 형성하도록 연장된다. 고정 서열은 고정 서열 상보체에 혼성화되고, 표면에 결합된 연장된 서열의 양이 측정된다.

[0152] 검출 복합체는 예를 들면, 분석물에 대한 분석의 특이성을 향상시키기 위해 하나 이상의 검출 시약을 포함할 수 있다. 다수의 검출 시약들의 사용은 예를 들면, 검출 시약들 각각이 분석물에 인접하면 검출가능한 신호를 방출하도록 분석이 디자인된 경우, 또는 분석물에 결합된 단일 검출 시약으로부터의 신호가 분석물에 결합된 다수의 검출 시약들로부터 방출된 신호와 구별될 수 있는 경우 분석의 특이성을 향상시킬 수 있다. 이러한 분석의 한 실시양태는 도 1c에 나타나 있다. 표면(116)은 분석물 A에 결합하는 포획 시약(117), 및 고정 올리고뉴클레오타이드 서열(119)을 포함하는 고정 시약(118)을 포함한다. 하나 이상의 단계에서, 분석물은 포획 시약 및 분석물에 결합하는 2개(또는 이보다 많은 수)의 검출 시약들(각각 120 및 121) 각각에 결합하고, 이때 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약 각각은 핵산 프로브(122 및 123, 각각 제1 핵산 프로브 및 제2 핵산 프로브)에 연결된다. 분석물은 동시에 또는 실질적으로 동시에, 또는 순차적인 단계적 방식으로 포획 시약 및 검출 시약에 결합될 수 있다. 따라서, 포획 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 복합체(124)가 표면 상에 형성된다. 제1 프로브와 제2 프로브가 서로 인접할 것을 요구하는 연장 과정을 이용하여 제1 프로브를 연장하여, 고정 서열에 상보적인 고정 서열 상보체를 포함하는 연장된 서열(125)을 형성한다. 끝에서 두 번째 단계에서, 고정 서열은 고정 서열 상보체에 혼성화되고, 표면에 결합된 연장된 서열의 양이 측정된다.

[0153] 도 1c에 도식화된 방법의 구체적인 실시양태는 도 2a에 나타나 있고, 이때 고정 시약은 검출 복합체를 표면에 부착시키는 데에 사용되고, 검출 복합체에 부착된 프로브는 고정 시약에 결합하는 연장된 영역을 생성하도록 연장된다. 이 실시양태에서, 인접 프로브에 결합된 2개의 검출 시약들을 사용하여 복합체를 검출한다. 상기 방법은 검출 시약을 커넥터 서열과 연결한 후 상기 커넥터 서열을 결합시켜 환형 표적 서열을 형성하고 롤링 서클 증폭으로 증폭하여 고정 시약에 결합하는 앰플리콘을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 표면(201)은 포획 시약(202) 및 고정 시약(203)을 포함한다. 하나 이상의 단계에서, 분석물은 포획 시약, 제1 인접 프로브(205)를 포함하는 제1 검출 시약(204), 및 제2 인접 프로브(207)를 포함하는 제2 검출 시약(206)에 결합함으로써, 표면 상에 검출 복합체(208)를 형성한다. 검출 복합체는 제1 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 말단 서열 및 제2 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 말단 서열을 각각 포함하는 2개의 커넥터 서열들(209a 및 209b)과 접촉된다. 상기 커넥터 서열들은 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브에 혼성화되고, 커넥터 올리고뉴클레오타이드들의 말단 서열들은 결합되어 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열(210)을 형성한다. 제2 인접 프로브는 롤링 서클 혼성화에 의해 연장되어 고정 시약에 결합하는 결합 시약을 포함하는 앰플리콘을 생성하고, 표면에 결합된 앰플리콘의 양이 측정된다. 제1 인접 프로브는 제1 프로브의 연장을 방해하도록 캡핑될 수 있거나 다른 방식으로 변형될 수 있다. (대안적 실시양태에서, 제1 인접 프로브는 연장되고, 제2 인접 프로브는 연장을 방해하도록 캡핑될 수 있거나 다른 방식으로 변형될 수 있다.) 도 2a에 도식화된 실시

양태에서, 앰플리콘은 앰플리콘에 혼성화되고 표면에 결합된 앰플리콘의 양을 측정하는 데에 사용되는 표지된 검출 프로브에 상보적인 2개 이상의 검출 서열도 포함한다. (도 2a에 도식화되지 않은) 대안적 실시양태에서, 연장 과정은 앰플리콘에 상보적인 하나 이상의 표지된 프로브를 첨가하지 않고 표면 상에서 앰플리콘을 직접적으로 검출하는 데에 사용되는 표지된 뉴클레오티드 염기를 앰플리콘 내로 도입한다. 도 2b는 제1 커넥터 올리고 뉴클레오티드 및 제2 커넥터 올리고뉴클레오티드(각각 209a 및 209b)를 보이는 커넥터 서열들의 성분들을 개략적으로 나타내고, 이때 제1 커넥터의 제1 말단($C_{1(E1)}$) 및 제2 커넥터의 제1 말단($C_{2(E1)}$)은 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적이고, 제1 커넥터의 제2 말단($C_{1(E2)}$) 및 제2 커넥터의 제2 말단($C_{2(E2)}$)은 제2 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적이다. 제1 커넥터 및 제2 커넥터는 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브에 혼성화되고, 제1 커넥터와 제2 커넥터는 결합되어 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열을 형성한다.

[0154] 도 2c는 커넥터의 대안적 실시양태를 보여준다. 커넥터 서열(211)은 제2 인접 프로브에 상보적인 내부 서열(C_{IS}) 및 제1 인접 프로브의 비중첩 영역들에 상보적인 2개의 말단 서열들(각각 C_{E1} 및 C_{E2})을 포함한다. 이 실시양태에서, 롤링 서클 증폭을 위한 환형 표적 서열을 형성하기 위해 1개의 결합 사건만이 필요하지만(즉, 제1 인접 프로브에 혼성화된 말단 C_{E1} 과 C_{E2} 의 결합), 프라이밍/연장이 제2 인접 프로브로부터 비롯되기 때문에, 2개의 인접 프로브들의 인접성에 대한 요구가 유지된다. 바람직하게는, 제1 인접 프로브는 제1 프로브의 연장을 방해하도록 캡핑되거나 다른 방식으로 변형된다.

[0155] 그 후, 제2 인접 프로브는 환형 표적 서열의 롤링 서클 증폭에 의해 연장되어 고정 시약에 결합하는 결합 영역을 포함하는 앰플리콘을 생성하고, 표면에 결합된 앰플리콘의 양이 측정된다.

[0156] 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브의 서열은 당업자에게 공지된 방법에 의해 디자인될 수 있다. 예를 들면, 각각의 프로브는 길이에 있어서 대략 20개 내지 50개의 염기, 바람직하게는 길이에 있어서 25개 내지 40개의 염기, 가장 바람직하게는 길이에 있어서 약 30개 내지 35개의 염기를 갖는다. 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브는 본원에 기재된 과정에서 사용된 하나 이상의 커넥터 서열 또는 이의 일부에 상보적인 서열도 포함한다. 한 실시양태에서, 검출 복합체는 제1 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 말단 서열 및 제2 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 말단 서열을 각각 포함하는 2개의 커넥터 서열들(209a 및 209b)과 접촉된다. 따라서, 이 실시양태에서, 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브는 상기 커넥터들의 말단 서열에 상보적인 비중첩 영역을 각각 포함한다. 대안적으로, 1개의 커넥터만이 사용될 수 있고, 커넥터 서열(211)은 제2 인접 프로브에 상보적인 내부 서열(C_{IS}) 및 제1 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 2개의 말단 서열들(각각 C_{E1} 및 C_{E2})을 포함한다. 따라서, 이 실시양태에서, 제1 인접 프로브는 커넥터의 2개의 말단 서열들(각각 C_{E1} 및 C_{E2})에 상보적인 비중첩 영역을 포함하고, 제2 인접 프로브는 커넥터의 내부 서열(C_{IS})에 상보적인 서열을 포함한다. 제1 인접 프로브는 제1 프로브의 연장을 방해하도록 캡핑될 수 있거나 다른 방식으로 변형될 수 있다. (대안적 실시양태에서, 제1 인접 프로브는 연장되고, 제2 인접 프로브는 연장을 방해하도록 캡핑될 수 있거나 다른 방식으로 변형될 수 있다.)

[0157] 따라서, 도 1 및 2에 예시된 실시양태들은 결합 분석이 고정 시약을 도입하도록 변형될 수 있고/있거나 검출 복합체로부터의 신호가 증폭될 수 있다는 것을 입증한다. 바람직한 실시양태에서, 고정 시약 및 신호 증폭법이 결합 분석에서 이용된다. 고정 시약의 이용을 포함하는 실시양태에서, 표면 상에 존재하는 고정 시약의 농도는 0.2-200 ug/mL, 구체적으로, 1.0-50 ug/mL, 보다 구체적으로, 3.0-10 ug/mL이다. 대안적으로, 단지 하나의 방법 또는 다른 방법이 향상된 결합 분석을 달성하는 데에 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 고정 시약이 누락되어 있는 도 1 및 2에 기재된 신호 증폭법을 이용하는 분석을 포함한다.

[0158] 고정 시약이 표면에 직접적으로 또는 간접적으로(예를 들면, 결합 반응을 통해) 결합된 고정 서열을 포함하는 실시양태에서, 공유 부착 방법 및 비공유 부착 방법을 비롯한 당분야에서 확립된 올리고뉴클레오티드 고정화 방법을 이용하여 고정 시약을 생성할 수 있다. 한 실시양태에서, 고정 시약은 고정 서열에 연결된 또는 다른 방식으로 결합된 단백질을 포함한다. 이 실시양태에서, 표면 상에 (공유적으로 또는 비공유적으로) 고정화될 수 있고 고정 올리고뉴클레오티드에 의해 변형될 수 있는 임의의 단백질이 사용될 수 있다. 비한정적 예로는 스트렙타비딘, 아비딘 또는 소 혈청 알부민(BSA)이 있다. 바람직한 실시양태에서, 고정 시약은 BSA를 포함한다. 단백질은 고정 올리고뉴클레오티드에 의해 변형될 수 있고 공지된 방법을 이용하여, 예를 들면, 도 3에 예시된 바와 같이 잘 확립된 이중작용성 교차커넥터인 설포석신이미드-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(설포-SMCC)를 사용함으로써 표면에 부착될 수 있다. SMCC의 N-하이드록시석신이미드(NHS) 기와 소 혈청 알부민

(BSA)의 반응은 BSA를 티올 반응성 말레이미드 기로 표지한다. 그 다음, 말레이미드 기는 티올-변형된 올리고뉴클레오타이드와 반응하여 안정한 티오에테르 결합을 통해 연결된 BSA-올리고뉴클레오타이드 접합체를 형성한다. 한 구체적인 예에서, 어레이는 일련의 BSA-올리고뉴클레오타이드 접합체들을 흑연질 탄소 표면, 바람직하게는 스크린 인쇄된 탄소 잉크 전극 상에 인쇄함으로써 형성된다. 대안적으로, 단백질이 아비딘 또는 스트렙타비딘인 경우, 고정 서열은 바이오틴에 연결되고 바이오틴-아비딘 또는 바이오틴-스트렙타비딘 상호작용을 통해 고정화된 아비딘 또는 스트렙타비딘에 연결될 수 있다.

[0159] 고정 시약에 부착된 고정 올리고뉴클레오타이드는 연장 과정 동안 발생한 연장된 서열(또는 앰플리콘)에 혼성화된 임의의 서열일 수 있다. 고정 올리고뉴클레오타이드는 표면과 상보적(혼성화) 영역 사이의 링커 서열로서 사용되어 표면으로부터 상보적 영역을 연장하는 비상보적 영역(예를 들면, 폴리(A) 서열)도 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 인접 또는 검출 프로브("불활성" 영역)와의 결합과 관련되지 않은 앰플리콘의 영역에 대한 혼성화 서열이 선택된다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, 앰플리콘의 불활성 영역의 전체 길이에 상보적인 혼성화 서열(바람직하게는 길이에 있어서 약 25개의 뉴클레오타이드를 가짐)이 단독으로, 또는 예를 들면, 길이에 있어서 최대 30개의 뉴클레오타이드를 갖는 폴리(A) 아암(arm)과의 조합으로 포함된다. 바람직하게는, 고정 올리고뉴클레오타이드는 (i) (앰플리콘의 불활성 영역에 대한 전체 길이 상보체, 길이에 있어서 25개의 뉴클레오타이드)-(20개의 뉴클레오타이드를 갖는 폴리(A) 아암); 또는 (ii) (앰플리콘의 불활성 영역의 일부에 대한 상보체, 길이에 있어서 15개의 뉴클레오타이드)-(30개의 뉴클레오타이드를 갖는 폴리(A) 아암)로부터 선택된다.

[0160] 한 실시양태에서, 인접 결합 증폭(PLA)을 수행하여 제2 인접 프로브를 연장한다. 도 2a 내지 2c에 대해 전술된 바와 같이, 2개의 인접 프로브들을 포함하는 복합체는 하나 이상의 커넥터 올리고뉴클레오타이드(209a-209b 및 211)와 접촉되고, 혼성화된 커넥터 서열들의 결합은 환형의 롤링 서클 증폭(RCA)으로 제2 인접 프로브를 연장하는 데에 사용되는 환형 올리고뉴클레오타이드를 형성한다. 인접 결합 증폭에 적합한 프로브 디자인 및 증폭 조건은 당분야에서 잘 확립되어 있다. 본 발명의 독특한 양태는 고정 시약에서 사용되는 서열과 동일한 서열이 커넥터들 중 하나에 포함된다는 것이다. 제2 인접 프로브의 연장 동안, 연장된 영역은 고정 시약에 혼성화되는 고정 서열의 상보체를 포함함으로써 샌드위치 복합체를 안정화시키고 제2 인접 프로브의 해리를 방해한다. 연장된 제2 인접 프로브는 표면 상의 분석물의 양을 측정하기 위해 측정될 수 있는 검출가능한 표지를 (예를 들면, RCA 연장 반응 동안 표지된 뉴클레오타이드의 포함에 의해) 함유할 수 있다. 대안적으로, 검출가능한 표지를 포함하는 복수의 표지된 프로브들이 첨가되고 연장된 제2 인접 프로브에 혼성화되고, 표면에 결합된 분석물의 양이 측정된다.

[0161] PCR(중합효소 연쇄 반응), LCR(리가제 연쇄 반응), SDA(가닥 치환 증폭), 3SR(자체-지속 합성 반응), 및 등은 증폭법, 예를 들면, 헬리카제 의존적 증폭 및 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 적합한 증폭 기법을 이용하여 연장된 서열(또는 앰플리콘)을 생성할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, RCA는 민감성, 다중화, 동역학 범위 및 확장성의 관점에서 상당한 장점을 갖기 때문에 사용된다. RCA를 위한 기법은 당분야에서 공지되어 있다(예를 들면, 문헌(Baner et al, Nucleic Acids Research, 26:5073 5078, 1998; Lizardi et al., Nature Genetics 19:226, 1998; Schweitzer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10113 119, 2000; Faruqi et al., BMC Genomics 2:4, 2000; Nallur et al., Nucl. Acids Res. 29:e118, 2001; Dean et al. Genome Res. 11:1095 1099, 2001; Schweitzer et al., Nature Biotech. 20:359 365, 2002); 및 미국 특허 제 6,054,274호, 제6,291,187호, 제6,323,009호, 제6,344,329호 및 제6,368,801호 참조). 선형 RCA(LRCA) 및 기하급수적 RCA(ERCA)를 비롯한 RCA의 여러 상이한 변형들이 공지되어 있다. RCA는 환형 주형의 수천 카피들을 생성하고, 이때 카피들의 쇄는 원래의 표적 DNA에 부착되어 표적의 공간적 해상 및 신호의 신속한 증폭을 가능하게 한다. RCA는 (i) 단일 표적 분자의 검출; (ii) 단백질로부터의 신호, 및 DNA 및 RNA로부터의 신호의 증폭; (iii) 고체 표면 상에서 증폭된 분자의 위치의 확인; (iv) 많은 상이한 표적들의 동시적인 측정; 및 (v) 용액상 또는 고체상에서의 하나 이상의 표적의 분석을 용이하게 한다. 검출 복합체를 사용한 RNA 생성물의 공간적 위치 확인은 다중화된 결합 분석을 어레이 또는 입자-기초 포맷으로 수행할 때 특히 유리하다.

[0162] 고정 시약 및 신호 증폭 과정 둘 다가 사용되는 본 발명의 구체적인 실시양태는 도 4a에 도식화되어 있다. 표면(401)상에서 포획 시약(402), 분석물(403) 및 2개의 검출 시약(304 및 305)(각각 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브(406 및 407)를 포함함) 사이에 복합체가 형성된다. 제1 커넥터 올리고뉴클레오타이드 및 제2 커넥터 올리고뉴클레오타이드(도 4a에서 각각 Circ-1(408) 및 Circ-2(409))가 첨가되며, 이는 두 인접 프로브들이 복합체에 존재할 때 각각 두 인접 프로브에 혼성화되며 가교를 생성한다. 결합된 커넥터 프로브들은 각각 결합 부위 1 및 2(410 및 411)에서 결합되어 환형 DNA 주형(412)을 형성한다. 환형 DNA 주형을 롤링 서클 증폭으로 증폭하여 제2 인접 프로브를 연장함으로써 하나 이상의 검출 서열(413) 및 고정 올리고뉴클레오타이드 서열 상보체(414)(부분

적 고정 서열 상보체(415)를 포함함)를 포함하는 앰플리콘을 생성한다. (포획 모이어티(417)에 부착된) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열(416)과 이의 상보체는 혼성화되고, 복수의 검출 프로브들은 복수의 검출 프로브 서열들에 혼성화되고, 표면에 결합된 분석물의 양이 측정된다(표시되어 있지 않으나, 도 1a에 예시되어 있음). 도 4b는 (제1 인접 프로브(PP1)에 혼성화되도록 디자인된) 제1 환형 DNA 주형 Circ-1(408), 검출 올리고뉴클레오타이드 서열, (고정 올리고뉴클레오타이드 서열에 전체적으로 또는 부분적으로 결합하는 데에 사용될 수 있는) 앰플리콘의 불활성 영역, 및 (제2 인접 프로브에 혼성화되도록 디자인된) 부분 PP2의 예시적 서열을 보여준다. 환형 DNA 주형을 롤링 서클 증폭으로 증폭하여 복수의 검출 서열들(각각 418 및 419)을 포함하는 앰플리콘을 생성하는 추가 실시양태는 도 4c에 도식화되어 있다. 추가 실시양태에서, 포획 모이어티(417)에 부착된 고정 올리고뉴클레오타이드 서열(416)은 유리 3' 말단을 갖는 프라이머로서 작용할 수 있다. 이 실시양태에서, 제2 인접 프로브는 검출 서열(413)에 상보적인 서열을 포함한다.

[0163] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 분석 포맷은 검출 서열에 커플링된 검출 시약을 5' 말단에서 사용하고 3' 말단은 커넥터 프로브로의 결합을 가능하게 하도록 노출시켜 환형 DNA 주형을 형성한 후, 상기 환형 DNA 주형을 롤링 서클 증폭으로 증폭하여 제2 인접 프로브(PP2)를 연장시킨다. 이 실시양태에서, PP1은 잠재적으로 독립적으로 중합효소에 의한 연장이 가능하지만 이 사안은 중합효소에 의한 프라이밍을 방해하도록 변형된 염기를 첨가함으로써 다루어질 수 있다. 대안적으로, 결합 주형 PP1은 이의 3' 말단을 통해 검출 시약에 직접 커플링되어 상기 올리고뉴클레오타이드가 이것이 분해될 때라도 DNA 중합효소에 대한 프라이머로서 참여하는 것을 방해할 수 있다.

[0164] RCA 또는 임의의 적합한 증폭법에 의해 증폭되는 표적 서열을 생성하는 또 다른 방법은 도 5에 예시되어 있다. 이 실시양태에서, 각각의 인접 프로브는 루핑된 헤어핀 구조물로 폴딩될 수 있다. 이 헤어핀 구조물의 형성은 재조합 신호를 함유하는 단일 가닥 루프 및 이중 가닥 부분을 생성한다. 2개의 헤어핀 구조물들의 재조합을 유도하여 전술된 바와 같이 추후에 RCA로 처리되는 환형 DNA 주형을 형성하기 위해 재조합효소(recombinase)가 첨가된다. 앰플리콘은 표지되고 임의적으로 고정 시약에 고정되고, 분석물이 검출된다. 이 실시양태의 핵심 요소는 서열 특이적 재조합 부위를 함유하는 DNA의 부위 특이적 재조합을 촉매작용하는 재조합효소의 능력이다. 예를 들면, 박테리오파지 P1로부터의 Cre 재조합효소는 loxP 부위를 함유하는 부위에서 재조합을 촉매작용하고, 다른 비한정적 예로는 플립라제(Flippase)(flp, 효모로부터 유래됨), Hin(살모넬라), 및 Cre의 조작된(진화된) 버전인 Tre가 있으나 이들로 한정되지 않는다. 이 대안적 방법은 추가 성분, 예컨대, 올리고뉴클레오타이드 주형, ATP 및 dNTP들의 첨가를 요구하지 않는다. 이 실시양태에서, loxP(재조합) 부위는 바람직하게는 비대칭성을 가짐으로써 정상 평형을 원하는 재조합된 생성물의 형성 쪽으로 이동시키도록 변형된다. 이것은 도 5에 예시되어 있고, 이때 재조합 부위는 명/암 음영으로 표시되어 있다.

[0165] 나아가, 도 6a는 RCA 또는 임의의 적합한 증폭법에 의해 증폭되는 표적 서열을 생성하는 또 다른 방법을 예시한다. 검출 시약에 부착된 인접 프로브들 각각은 Cre 재조합효소에 의한 2개의 올리고뉴클레오타이드들 사이의 부위 특이적 재조합을 가능하게 함으로써, loxP 부위를 플랭킹하는 한 인접 프로브의 5' 부분 및 다른 인접 프로브의 3' 부분으로 구성된 새로운 올리고뉴클레오타이드 서열의 형성을 야기하는 loxP 부위를 포함한다. 그 후, 새로 생성된 표적 서열은 전술된 바와 같이 임의의 적합한 방법으로 증폭될 수 있고 표지될 수 있고 임의적으로 고정될 수 있고 검출될 수 있다. 도 6a는 증폭을 위한 작동가능한 요소로서 T7 RNA 중합효소 프로모터를 사용하는 이 실시양태를 예시한다. 다른 RNA 중합효소 부위, 예컨대, 인접 프로브의 3' 또는 5' 부분에 연결된 T3 및 SP6이 이 방법에서 사용되기에 동등하게 적합하다는 것도 이해될 것이다. 이 실시양태에서, loxP(재조합) 부위는 바람직하게는 비대칭성을 가짐으로써 정상 평형을 원하는 재조합된 생성물의 형성 쪽으로 이동시키도록 변형된다. 도 6b에 나타난 바와 같이, 상기 방법을 이용하여 RCA에서 사용될 수 있는 환형 DNA 주형을 생성할 수도 있다.

[0166] 본 발명은 분석물의 검출 방법으로서, 분석물을 표면 상의 포획 시약 및 2개의 검출 시약들에 결합시켜 검출 복합체를 형성하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다. 이 방법은 검출 복합체를 측정하는 단계를 포함하고, 이때 측정 방법은 2개의 검출 시약들 중 하나만을 포함하는 복합체에 비해 검출 시약들 둘 다를 포함하는 복합체를 우선적으로 측정한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 복합체를 형성한 후 검출 시약을 가교연결하는 단계 및 가교연결된 시약을 검출하는 단계를 포함한다. 임의의 적합한 가교연결 화학반응을 이용하여 검출 복합체의 성분들을 연결할 수 있다. 예를 들면, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 반응성 모이어티들을 연결하는 다작용성 가교커넥터의 첨가에 의해 반응하고 연결되는 반응성 모이어티들을 포함할 수 있다. 이 실시양태에서, 반응성 모이어티 및 가교커넥터는 아민, 티올, 하이드라지드, 알데하이드, 에스테르, 요오도아세트아미드, 말레이미드, 클릭 화학 시약 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 결합 모이어티를 포함할 수 있고, 가교커넥터는 결합 모이어티의 다가 결합 파트너이다. 이 실시양태의 여러

비한정적 예로는 하기 실시양태들이 있다: (a) 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 동물 종의 항체이고, 가교커넥터는 동물 종의 항체를 표적화하는 다가 항-종 항체이거나; (b) 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 바이오틴을 포함하고, 가교커넥터는 스트렙타비딘이거나(또는 역의 경우도 가능); (c) 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 스트렙타비딘에 연결되고, 가교커넥터는 복수의 바이오틴 분자들을 포함하는 중합체이거나(또는 역의 경우도 가능); (d) 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 각각 제1 핵산 프로브 및 제2 핵산 프로브를 포함하고, 가교커넥터는 제1 핵산 프로브에 상보적인 서열 및 제2 핵산 프로브에 상보적인 별도의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드이다.

[0167] 구체적 실시양태에서, 샘플 중의 관심있는 분석물은 분석물을 고정화된 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시켜 복합체를 형성함으로써 검출될 수 있고, 이때 제1 검출 시약은 제1 검출가능한 표지 및 제1 핵산 프로브를 포함하고, 제2 검출 시약은 제2 검출가능한 표지 및 제2 핵산 프로브를 포함한다. 이 실시양태에서, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 (i) 제1 프로브를 제2 프로브에 혼성화시키거나, (ii) 제1 프로브 및 제2 프로브를, 제1 프로브 및 제2 프로브에 상보적인 영역을 갖는 제3 핵산에 혼성화시키거나, (iii) 제1 프로브와 제2 프로브를 결합시킴으로써 교차연결된다.

[0168] 교차연결된 생성물은 표면에 결합되면 검출될 수 있거나, 임의적으로 교차연결된 생성물은 표면으로부터 용출물 내로 유리된 후 검출될 수 있다. 이와 관련하여, 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지 둘 다를 포함하는 개별 교차연결된 생성물만이 용출물에서 카운팅된다. 임의의 적합한 검출 방법을 이용하여 용출물에서 표지의 존재를 검출할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 표지는 형광 분자이고, 용출물에 존재하는 표지된 교차연결된 생성물은 단일 분자 형광 검출, 예를 들면, 형광 상관관계 분광법 및/또는 형광 교차-상관관계 분광법에 의해 카운팅된다. 이 실시양태에서, 단일 분자 형광 검출은 모세관을 통해 용출물을 유동시키고 광원을 모세관 내의 부피에 집중시켜 호출 대역을 생성하고 상기 호출 대역을 광 검출기로 관찰하여 상기 호출 대역을 통한 형광 분자의 통과를 검출하는 단계를 포함한다. 상기 검출 방법은 제1 표지와 관련된 제1 형광 신호 및 제2 표지와 관련된 제2 형광 신호를 검출하는 단계, 및 두 신호들이 호출 대역으로부터 검출될 때 검출 사건을 카운팅하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 한 표지는 형광 공명 에너지 전달(FRET) 공여자이고, 다른 표지는 FRET 수용자이고, 검출 방법은 호출 대역에서 FRET 공여자를 여기시키는 단계 및 FRET 수용자로부터의 형광 신호를 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0169] 특정 실시양태에서, 샘플 중의 분석물은 분석물을 고정화된 포획 시약, 제1 핵산 프로브를 포함하는 제1 검출 시약 및 제2 핵산 프로브를 포함하는 제2 검출 시약에 결합시켜 복합체를 형성하고; 제2 핵산 프로브를 연장하여, 검출가능한 표지를 포함하는 연장된 서열을 형성하고(이때, 연장은 상기 복합체에서 제1 핵산 프로브와 제2 핵산 프로브의 공존에 의존함); 연장된 서열을 표면으로부터 용출물 내로 유리시키고; 상기 용출물에서 개별 연장된 서열을 카운팅함으로써 검출될 수 있다. 연장 단계는 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시키고 상기 프로브를 중합효소 연쇄 반응으로 연장하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 연장 단계는 제1 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시켜 환형 핵산 주형을 형성하는 단계 및 상기 환형 주형을 롤링 서클 증폭으로 연장하는 단계를 포함한다. 연장 단계는 제1 프로브를 주형 핵산 서열에 결합시키는 단계, 제2 프로브를 주형 서열에 결합시키는 단계 및 제1 프로브와 제2 프로브를 결합시키는 단계도 포함할 수 있다.

[0170] 포획 시약을 사용하는 본 발명의 방법에서, 포획 시약은 고체상에 직접적으로 고정화될 수 있거나 이차 결합 시약, 예컨대, 후술된 표적화 시약을 통해 간접적으로 고정화될 수 있다. 예를 들면, 포획 시약은 고체상 상의 고정화된 표적화 시약 상보체에 결합하는 표적화 시약에 연결될 수 있거나 이러한 표적화 시약을 포함할 수 있다. 표적화 시약과 그의 상보체의 결합은 직접적인 결합일 수 있거나(예를 들면, 표적화 시약은 스트렙타비딘일 수 있고, 상보체는 바이오틴일 수 있음) 가교제를 통한 간접적인 결합일 수 있다(예를 들면, 표적화 시약 및 상보체는 바이오틴일 수 있고, 가교제는 다가 바이오틴 결합 수용체, 예컨대, 스트렙타비딘일 수 있음). 한 실시양태에서, 표적화제 및 그의 상보체는 제1 올리고뉴클레오티드 및 상보적 올리고뉴클레오티드, 수용체-리간드 쌍, 항원-항체 쌍, 헵텐-항체 쌍, 에피토프-항체 쌍, 미메토프-항체 쌍, 앵타머-표적 분자 쌍, 혼성화 파트너, 또는 인터칼레이터-표적 분자 쌍을 포함한다. 분석에서 사용되는 표적화제 및 상보체는 분석에 의해 측정된 분석물에 대한 포획 시약 또는 검출 시약과 관련된 표적화제 및 상보체가 분석에 의해 측정된 다른 분석물에 대한 포획 시약 또는 검출 시약과 관련된 표적화제 및 상보체와 실질적으로 교차반응하지 않도록 선택된다. 예를 들면, (그의 관련된 표적화제 및 표적화제 상보체를 통한) 결합 시약과 그의 관련된 결합 도메인의 결합은 다른 분석물(및 제시되는 상이한 표적화제 상보체)과 관련된 결합 도메인과 그의 결합보다 실질적으로 더 커야 한다. 바람직하게는, 분석물에 대한 포획 시약 또는 검출 시약과 다른 분석물과 관련된 결합 도메인의 결합에 대한 교차반응성은 정확한 결합 도메인과의 결합에 비해 1% 미만, 보다 바람직하게는 0.1% 미만, 보다 바람직하게는

0.01% 미만이다. 바람직한 실시양태에서, 표적화제/표적화제 상보체는 상보적 서열을 포함하는 한 쌍의 올리고 뉴클레오타이드를 포함하고, 표적화제 및 그의 상보체는 표적화제를 그의 상보체에 혼성화시키기에 충분한 조건 하에서 접촉된다.

[0171] 표적화제가 사용되는 경우, 분석 방법에서 사용되는 포획 시약이 고체상에 고정화될 때에 대한 어느 정도의 유연성이 존재한다. 한 실시양태에서, 표적화제-표적화제 상보체 상호작용을 통해 고체상에 미리 고정화된 포획 시약이 사용자에게 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 표적화제에 연결된 포획 시약 및 고정화된 표적화제 상보체를 지지하는 고체상이 별도의 성분으로서 제공된다. 따라서, 분석 방법은 (직접적으로 또는 가교제의 사용을 통해) 표적화제를 그의 상보체에 결합시킴으로써, 포획 시약을 고체상에 고정화시키는 단계를 추가로 포함한다. 이 단계는 검출 복합체의 형성과 관련된 단계 전에, 이러한 단계와 동시에, 또는 이러한 단계 후에 수행될 수 있다.

[0172] 구체적인 실시양태에서, 다작용성 표적화제가 본원에 기재된 분석 방법 및 성분에서 사용될 수 있다. 다작용성 표적화제는 (a) 제1 절편 상보체를 통해 포획 시약에 결합하도록 디자인된 제1 절편(즉, 포획 시약은 다작용성 표적화제의 제1 절편에 상보적인 표적화제 상보체를 포함함), 및 (b) 앰플리콘에 결합하도록 디자인된 제2 절편(즉, 다작용성 표적화제의 제2 절편이 표면 상의 고정 시약으로서 작용함)을 포함할 수 있다. 따라서, 이 실시양태에서, 표면은 제1 절편과 제1 절편 상보체 사이의 연결을 통해 표적화제에 결합하는 포획 시약과 접촉되는 다작용성 표적화제를 포함한다. 3-AB RCA/PLA 분석은 본원에 기재된 바와 같이 진행되고, 앰플리콘은 측정 단계 전에 다작용성 표적화제의 고정 절편에 결합한다. 본 방법은 분석 방법에서 사용되는 포획 시약 대 고정 시약의 1:1 비율을 보장하도록 사용될 수 있다.

[0173] 결합 분석 분야로부터의 통상적인 표면을 비롯한 매우 다양한 표면들이 본 발명의 방법에서 사용되기에 적합하다. 표면은 중합체(예를 들면, 폴리스티렌 및 폴리프로필렌), 세라믹, 유리 및 복합 물질(예를 들면, 탄소-중합체 복합체, 예컨대, 탄소-기재 잉크)을 비롯한 다양한 상이한 물질들로부터 만들어질 수 있다. 적합한 표면은 거시적 물체의 표면, 예컨대, 분석 용기(예를 들면, 시험관, 큐벳, 유동 셀, FACS 세포 분류기, 카트리지, 멀티-웰 플레이트의 웰 등), 슬라이드, 분석 칩(예컨대, 유전자 또는 단백질 칩 측정에서 사용되는 분석 칩), 핀 또는 프로브, 비드, 여과 매질, 측류 매질(예를 들면, 측류 시험 스트립에서 사용되는 여과 막) 등의 내부 표면을 포함한다.

[0174] 적합한 표면은 다른 종류의 입자-기초 분석에서 통상적으로 사용되는 입자(콜로이드 또는 비드를 포함하나 이들로 한정되지 않음), 예를 들면, 자석, 폴리프로필렌 및 라텍스 입자, 고체상 합성에서 전형적으로 사용되는 물질, 예를 들면, 폴리스티렌 및 폴리아크릴아미드 입자, 및 크로마토그래피 적용분야에서 전형적으로 사용되는 물질, 예를 들면, 실리카, 알루미늄, 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌도 포함한다. 상기 물질은 섬유, 예컨대, 탄소 원섬유일 수도 있다. 미세입자는 무생물일 수 있거나, 대안적으로 생물의 생물학적 물질, 예컨대, 세포, 바이러스, 세균 등을 포함할 수 있다. 본 방법에서 사용되는 입자는 하나 이상의 포획 또는 검출 시약에 부착되기에 적합하고 예를 들면, 원심분리, 중력, 여과 또는 자기 수집을 통해 수집될 수 있는 임의의 물질로 구성될 수 있다. 포획 또는 검출 시약에 부착될 수 있는 매우 다양한 상이한 종류의 입자들이 결합 분석에서의 사용을 위해 시판된다. 이들은 비-자기 입자뿐만 아니라 입자가 자기장에 의해 수집될 수 있게 하는 자기화가능한 물질을 포함하는 입자도 포함한다. 한 실시양태에서, 입자는 전도성 물질 및/또는 반전도성 물질, 예를 들면, 콜로이드성 금 입자로 구성된다. 미세입자는 매우 다양한 크기 및 형태를 가질 수 있다. 예를 들면 비한정적으로, 미세입자는 5 nm 내지 100 μm 의 크기를 가질 수 있다. 바람직하게는, 미세입자는 20 nm 내지 10 μm 의 크기를 갖는다. 입자는 구형, 타원형, 막대-유사 형태 등일 수 있거나 형태에서 불규칙할 수 있다.

[0175] 본 발명에서 사용되는 입자는 입자의 혼합물에서 특정 입자 또는 입자 하위집단을 확인할 수 있도록 암호화될 수 있다. 이러한 암호화된 입자는 결합 분석을 위한 고체상 지지체로서 입자를 사용하는 분석의 다중화를 가능하게 하기 위해 사용되고 있다. 한 방법에서, 입자는 하나 이상의 형광 염료를 포함하도록 제조되고, 입자의 특정 집단은 하나 이상의 파장에서의 형광 방사의 강도 및/또는 상대적 강도에 기초하여 확인된다. 이 방법은 루미넥스(Luminex) xMAP 시스템(예를 들면, 미국 특허 제6,939,720호 참조) 및 벡톤 디킨슨 사이토메트릭(Becton Dickinson Cytometric) 비드 어레이 시스템에서 사용되고 있다. 대안적으로, 입자는 다른 물성, 예컨대, 크기, 형태, 새겨진 광학 패턴 등에서의 차이를 통해 암호화될 수 있다. 입자의 혼합물 또는 세트에 제공된 하나 이상의 입자는 입자 광학 성질, 크기, 형태, 새겨진 광학 패턴 등에 의해 상기 혼합물 중의 다른 입자로부터 구별될 수 있도록 암호화될 수 있다.

[0176] 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법은 복수의 상이한 분석물들을 이 분석물들에 대한 복수의 포획 시약들에 결

합시킴으로써, 다중화된 포맷으로 사용될 수 있고, 이때 암호화가 특정 비드에 대한 포획 시약(및 분석물 표적)을 확인하도록 포획 분석물을 암호화된 비드 상에 고정화시킨다. 상기 방법은 (본원에 기재된 검출 방법을 이용하여) 결합된 분석물을 갖는 비드의 수를 카운팅하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0177] 대안적으로 또는 추가로, 개별 분석 신호가 각각의 결합 도메인 상에서 생성되고 각각의 결합 도메인으로부터 측정되도록 예를 들면, 결합 도메인이 개별 어레이 요소인 결합 어레이 또는 결합 도메인이 개별 비드인 비드 세트에서와 같이 검출 복합체 및/또는 포획 시약을 하나 이상의 고체상 상의 상이한 개별 결합 도메인들에 직접적으로 또는 간접적으로 결합시킬 수 있다. 상이한 분석물들에 대한 포획 시약이 상이한 결합 도메인들에 고정화되는 경우, 상기 도메인들에 결합된 상이한 분석물들은 독립적으로 측정될 수 있다. 이러한 실시양태의 한 예에서, 결합 도메인은 관심있는 분석물에 결합하는 포획 시약의 개별 도메인을 하나 이상의 표면 상에 고정화시킴으로써 제조된다. 임의적으로, 표면(들)은 샘플을 보유하거나 샘플이 통과되는 용기(예를 들면, 유동 셀, 웰, 큐벳 등)의 하나 이상의 경계를 부분적으로 한정할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 개별 결합 도메인은 전기화학 또는 전기화학발광 분석에서 사용되는 전극 상에서 형성된다. 복수의 결합 도메인들을 포함하는 표면 상에서 전기화학발광을 이용한 분석물의 다중화된 측정은 메소 스케일 디아그노스틱스 엘엘씨(Meso Scale Diagnostics, LLC)의 멀티-어레이(MULTI-ARRAY)[®] 및 섹터(SECTOR)[®] 이미지 제품 생산 라인에서 이용되고 있다 (예를 들면, 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제7,842,246호 및 제6,977,722호 참조).

[0178] 추가로, 검출 복합체 및/또는 포획 시약은 전술된 바와 같이 임의적으로 상이한 개별 결합 도메인들을 포함하는 전극 표면에 직접적으로 또는 간접적으로 결합될 수 있다. 전극 표면은 멀티-웰 플레이트 및/또는 유동 셀의 성분일 수 있다. 전극은 전도성 물질, 예를 들면, 금속, 예컨대, 금, 은, 백금, 니켈, 강철, 이리듐, 구리, 알루미늄, 전도성 알로우(allow) 등을 포함할 수 있다. 전극은 산화물로 코팅된 금속, 예를 들면, 산화알루미늄으로 코팅된 알루미늄도 포함할 수 있다. 전극은 동일한 또는 상이한 물질로 만들어질 수 있는 작업 전극 및 대향 전극, 예를 들면, 금속 대향 전극 및 탄소 작업 전극을 포함할 수 있다. 한 구체적인 실시양태에서, 전극은 탄소-기재 물질, 예컨대, 탄소, 탄소 블랙, 흑연성 탄소, 탄소 나노튜브, 탄소 원섬유, 흑연, 그래핀(graphene), 탄소 섬유 및 이들의 혼합물을 포함한다. 한 실시양태에서, 전극은 탄소 원소, 예를 들면, 흑연, 탄소 블랙, 탄소 나노튜브 등을 포함한다. 유리하게는, 전극은 전도성 탄소-중합체 복합체, 매트릭스에 분산된 전도성 입자(예를 들면, 탄소 잉크, 탄소 페이스트, 금속 잉크, 그래핀 잉크), 및/또는 전도성 중합체를 포함할 수 있다. 본 발명의 한 구체적인 실시양태는 탄소, 예를 들면, 탄소 층, 및/또는 탄소 잉크의 스크린-인쇄된 층을 포함하는 전극 (예를 들면, 작업 전극 및/또는 대향 전극)을 갖는 분석 모듈, 바람직하게는 멀티-웰 플레이트이다.

[0179] 본 발명은 개별 검출 복합체를 검출하고 카운팅하는 방법을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 표면은 샘플에 존재하는 하나 이상의 분석물 분자에 대한 복수의 포획 시약들을 포함할 수 있고, 상기 복수의 포획 시약들은 표면 상에 위치한 복수의 해상가능한 결합 영역들에 걸쳐 분포되어 있다. 측정을 수행하고 분석하기 위해 사용된 조건 하에서 "해상가능한 결합 영역"은 추가 개별 결합 사건이 일어나는 또 다른 영역으로부터 해상될 수 있고 구별될 수 있는, 개별 결합 사건과 관련된 최소 표면 영역이다. 따라서, 상기 방법은 하나 이상의 분석물 분자를 표면 상의 하나 이상의 포획 시약에 결합시키는 단계, 표면 상의 복수의 해상가능한 결합 영역들에서 분석물 분자의 존재 또는 부재를 확인하는 단계, 및 분석물 분자를 함유하는 해상가능한 결합 영역의 수 및/또는 분석물 분자를 함유하지 않는 분석물 도메인의 수를 확인하는 단계로 구성된다.

[0180] 해상가능한 결합 영역은 전체적으로 또는 부분적으로 광학적으로 호출될 수 있고, 즉 각각의 개별 해상가능한 결합 영역은 개별적으로 광학적으로 호출될 수 있고/있거나, 복수의 해상가능한 결합 영역들을 포함하는 전체 표면은 영상화될 수 있고, 그 영상 내의 하나 이상의 화소 또는 화소 군은 개별 해상가능한 결합 영역으로 맵핑될 수 있다. 해상가능한 결합 영역은 복수의 미세입자 내의 미세입자일 수도 있다. 그의 광학 특징에서의 변화를 나타내는 해상가능한 결합 영역은 통상적인 광학 검출 시스템에 의해 확인될 수 있다. 검출된 종(예를 들면, 형광 물질의 종류 등) 및 작동 파장에 따라, 특정 파장으로 디자인된 광학 필터가 해상가능한 결합 영역의 광학 호출을 위해 사용될 수 있다. 광학 호출이 사용되는 실시양태에서, 시스템은 하나 초과의 광원, 및/또는 광원의 파장 및/또는 강도를 조절하기 위한 복수의 필터를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 해상가능한 결합 영역들로부터의 광학 신호는 CCD 카메라를 이용함으로써 포착된다. 영상을 포착하는 데에 사용될 수 있는 카메라 영상화 시스템의 다른 비한정적 예로는 당업자에게 공지되어 있을 전하 주입 장치(CID), 상보적 산화 금속 반도체(CMOS) 장치, 과학적 CMOS(sCMOS) 장치 및 시간 지연 적분(TDI) 장치가 있다. 일부 실시양태에서, 광다이오드 또는 광전증배관(PMT)과 커플링된 스캐닝 거울 시스템이 영상화를 위해 사용될 수 있다.

[0181] 상기 방법의 측정 단계는 표면(또는 이의 일부)으로부터의 광학 신호를 영상화하여 복수의 화소들로 구성된 영

상을 생성하는 단계를 포함할 수 있고, 이때 각각의 해상가능한 결합 영역은 상기 영상 내의 하나 이상의 화소 또는 화소 군으로 맵핑된다. 결합 사건(검출 복합체)을 표시하는 신호를 갖는 화소 또는 화소 세트를 확인하기 위한 영상 분석은 당분야에서 인정된 방법, 예를 들면, 형광 현미경관찰 영상에서 표지된 생물학적 구조물을 확인하고 카운팅하는 데에 이용될 수 있는 수많은 영상 분석 알고리즘 및 소프트웨어를 이용함으로써 달성될 수 있다. 한 실시양태에서, 대규모 신호 구배를 제거하기 위해 영상을 역광한 후, 절편화 역치를 이용하여 영상을 이원 영상으로 전환한다. 역치를 초과하는 강도의 인접 영역을 확인함으로써 해상가능한 결합 영역을 발견한다. 결합 도메인은 크기 및 강도 요건을 충족시키는 경우 결합 사건으로서 분류된다.

[0182] 한 실시양태에서, 해상가능한 결합 영역은 어레이의 요소이다. 바람직한 실시양태에서, 어레이는 마이크로-웰 또는 나노-웰, 예를 들면, 단일 기관의 개별 오목부 또는 웰의 어레이이다. 바람직하게는, 웰의 부피는 100 nL 미만, 바람직하게는 50 nL 미만이다. 한 실시양태에서, 웰의 부피는 대략 10 aL 내지 100 pL이다. 임의적으로, 웰은 미세입자를 보유하도록 구성될 수 있다.

[0183] 한 실시양태에서, 기관 상에 위치하고 분석 동안 처리되는 해상가능한 결합 영역의 50% 이상이 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유한다. 바람직하게는, 해상가능한 결합 영역의 80% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상이 0개 또는 1개의 분석물 분자를 함유한다. 샘플 중의 분석물 분자의 농도는 적어도 부분적으로 하나 이상의 분석물 분자를 함유하는 결합 영역의 수의 보정 곡선, 포아송 분포 분석 및/또는 가우스 분포 분석을 이용함으로써 측정된다. 구체적인 실시양태에서, 표면은 분석물 분자에 대한 복수의 포획 시약들을 각각 포함하는 복수의 입자들을 포함하고, 상기 복수의 입자들은 복수의 해상가능한 결합 영역들(예를 들면, 마이크로-웰 또는 나노-웰의 어레이)에 걸쳐 분포한다. 따라서, 상기 방법은 (i) 하나 이상의 분석물 분자를 표면 상의 하나 이상의 포획 시약에 결합시키는 단계, (ii) 복수의 입자들을 해상가능한 결합 영역의 어레이에 걸쳐 분포시키는 단계; 및 (iii) 분석물 분자를 함유하는 결합 도메인의 수 및/또는 분석물 분자를 함유하지 않는 결합 도메인의 수를 확인하기 위해 각각의 해상가능한 결합 영역에서 분석물 분자의 존재 또는 부재를 확인하는 단계를 포함한다.

[0184] 본 발명의 방법들 중 하나 이상의 방법을 이용하여 한정된 부피에서 분석물을 검출하는 것이 유리할 수도 있다. 이 실시양태들에서, 샘플 중의 분석물 분자들, 구별가능한 표지를 각각 보유하는 한 쌍의 검출 시약에 결합시키고, 대다수의 반응기들이 1개 이하의 분석물을 함유하도록 분석물을 복수의 위치들, 예를 들면, 웰 또는 반응기(본원에서 "반응기"로서 지칭됨), 기관, 예를 들면, 플레이트, 접시, 칩, 광학 섬유, 그리드 등에 걸쳐 분할한다. 이 방법은 사용자가 분석물에 부착된 구별가능한 표지 각각을 함유하는 반응기의 수를 카운팅함으로써 분석물 분자를 검출할 수 있게 한다. 일부 경우, 처리되는 복수의 반응기들은 하나 이상의 분석물 분자를 함유할 수 있는(예를 들면, 하나 이상의 분석물 분자와 관련되어 있을 수 있거나 임의의 분석물 분자와 관련되어 있지 않을 수 있는) 반응기의 총량의 일부 또는 본질적으로 전부이다. 하기 공개된 미국 특허출원들 및 국제 특허출원을 참조한다: 미국 특허출원 공보 제20070259448호; 미국 특허출원 공보 제20070259385호; 미국 특허출원 공보 제20070259381호; 및 국제 특허출원 제PCT/US07/019184호; 및 국제 특허출원 제PCT/US09/005428호. 이 공보들 각각의 개시내용은 본원에 참고로 도입된다. 반응기의 적어도 일부가 처리될 수 있고, 하나 이상의 분석물 분자 또는 입자를 함유하는 반응기의 수/백분율을 표시하는 측정이 수행될 수 있다. 일부 경우, 유체 샘플 중의 분석물 분자의 농도의 측정치는 상기 수/백분율에 기초하여 결정될 수 있다.

[0185] 한정된 부피에서 분석물 분자를 검출할 수 있게 하는 구체적인 실시양태에서, 분석물을 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시켜 검출 복합체를 형성함으로써 샘플 중의 분석물을 검출할 수 있다. 각각의 검출 복합체는 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하고, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 각각 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지를 갖는다. 검출 복합체는 동시에, 실질적으로 동시에 또는 순차적으로 형성될 수 있다. 대다수의 반응기들이 1개 미만의 검출 복합체를 함유하도록 검출 복합체를 복수의 반응기들에 걸쳐 분할하고, 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지 각각을 함유하는 반응기의 수를 카운팅함으로써 분석물 분자의 수를 검출한다. 바람직하게는, 동일한 용기에서 비결합된 제1 검출 시약 및 비결합된 제2 검출 시약을 검출할 가능성이 약 10분의 1 미만이도록, 바람직하게는 약 100분의 1 미만이도록, 보다 바람직하게는 약 1000분의 1 미만이도록, 가장 바람직하게는 약 10,000분의 1 미만이도록 검출 복합체를 복수의 반응기들에 걸쳐 분할한다. 검출 복합체가 지지체 상의 개별 반응기 내로 분리되도록, 예를 들면, 검출 복합체의 일부를 복수의 반응기들에 걸쳐 분취하고/하거나 검출 복합체를 포함하는 용액을 복수의 반응기들에 걸쳐 유동시킴으로써 수동으로 검출 복합체를 복수의 반응기들에 걸쳐 분할한다(즉, 부분 또는 일부로 나누거나 분리한다).

[0186] 추가 실시양태에서, (a) 분석물을 표면에 결합된 포획 시약, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약에 결합시켜 검출 복합체를 형성함으로써 샘플 중의 분석물을 검출할 수 있고, 이때 (i) 각각의 검출 복합체는 포획 시약, 분석

물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하고, (ii) 제1 검출 시약은 제1 검출가능한 표지를 갖고 제2 검출 시약은 제2 검출가능한 표지를 갖는다. 성분들을 임의의 순서로 첨가함으로써, 예를 들면, 성분들을 동시에 또는 실질적으로 동시에 접촉시키거나 각각의 성분을 순차적으로 첨가하여 검출 복합체를 단계적 방식으로 구축함으로써 검출 복합체를 형성할 수 있다. 대다수의 반응기들이 1개 미만의 분석물을 함유하도록 검출 복합체를 복수의 반응기들에 걸쳐 분할하고, 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지를 함유하는 반응기의 수를 카운팅함으로써 분석물 분자의 수를 검출한다. 각각의 단계 후에 및 검출 단계 전에 세척을 이용하거나 이용하지 않으면서 상기 방법을 수행할 수 있다.

[0187] 표면은 입자일 수 있고, 임의적으로 복수의 포획 시약들이 입자 또는 복수의 입자들 상에 고정화된다. 이 실시양태에서, 분할 단계는 다수의 방식으로 수행될 수 있다: (i) 포획 시약을 복수의 입자들 상에 고정화시키고, 분석물을 포획 시약에 결합시키고 입자들을 복수의 반응기들 내로 분할함으로써 분석물의 분할을 달성하거나; (ii) 포획 시약을 복수의 입자들 상에 고정화시키고, 입자들을 복수의 반응기들 내로 분할한 후 분석물을 포획 시약에 결합시킴으로써 분석물의 분할을 달성한다.

[0188] 복수의 반응기들은 유증수 에멀전에 분산된 수적도 포함할 수 있다. 최대 100 μm 의 직경 및 거의 1 nL의 부피를 갖는 소적을 갖는 에멀전을 만들 수 있다. 높은 용량, 즉 에멀전 1 μL 당 10^{10} 개 초과와 소적, 에멀전의 제조 용이성 및 넓은 범위의 조건들에 걸쳐 그의 높은 안정성 때문에 에멀전은 생화학적 분석을 구현화하는 이상적인 수단이 된다. 각각의 수적은 독립적인 반응기로서 작용하고, 임의적으로 입자에 부착된 검출 복합체는 복수의 수적들에 걸쳐 분할될 수 있다.

[0189] 대안적으로, 표면은 반응기들 중 하나 내의 위치이고, 예를 들면, 반응기가 플레이트의 웰인 경우, 표면은 플레이트의 웰들 중 하나 내의 도메인 또는 영역일 수 있다. 이 실시양태에서, 포획 시약을 복수의 반응기들의 도메인 또는 영역 상에 고정화시킬 수 있고, 분석물 분자를 포획 시약에 결합시킴으로써 분할 단계를 달성한다. 또 다른 실시양태에서, 복수의 반응기들은 그에 고정화된 표적화 모이어티를 갖는 영역을 포함하고, 포획 시약은 표적화 모이어티 상보체를 포함하고, 표적화 모이어티 상보체를 복수의 반응기들 내에 위치한 표적화 모이어티에 결합시킴으로써 분할 단계를 달성한다.

[0190] 추가 또는 대안적인 실시양태에서, 본원에 기재된 결합 분석은 예를 들면, 샘플 중의 분석물의 농도를 증가시키고/시키거나 분석의 성능을 방해할 수 있는, 샘플에 존재할 수 있는 외래 물질의 농도를 감소시킴으로써 분석 성능을 개선하기 위한 예비-농축 단계도 포함할 수 있다. 이것은 (a) 관심있는 분석물을 포함하는 샘플을 이 분석물에 결합하는 제1 결합 시약에 연결된 고체상, 예를 들면 입자와 접촉시켜 상기 제1 결합 시약에 결합된 분석물을 포함하는 복합체를 형성하고; (b) 상기 복합체를 수집하고; (c) 상기 샘플의 비결합된 성분을 상기 복합체로부터 분리하고; (d) 상기 복합체를 유리시킴으로써 수행될 수 있다. 이 분석물의 농축 방법은 본원에 기재된 결합 분석이 분석 성능을 방해할 불순물을 제거하기 위해 수행되기 전에 수행될 수 있다. 이와 관련하여, 그의 개시내용이 본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 공보 제2010/0261292호를 참조한다.

[0191] 특히, 농축 단계는 분석물을 포함하는 샘플을 제1 검출 시약에 결합된 분석물을 포함하는 분석물 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에 처리하는 것을 수반하며, 이때 제1 검출 시약은 제1 핵산 프로브에 연결된다. 그 후, 농축 단계의 완료시 형성된 분석물 복합체는 (i) 고정 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 고정 시약과 분석물에 대한 포획 시약을 포함하는 표면 상의 포획 시약, 및 (ii) 제2 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 제2 검출 시약에 결합되어, 포획 시약, 분석물, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 복합체를 상기 표면 상에 형성한다. 표면에 결합된 복합체는 제1 프로브 및 제2 프로브가 인접할 것을 요구하는 연장 과정으로 처리되어 제2 프로브를 연장함으로써 고정 서열에 상보적인 고정 서열 상보체를 포함하는 연장된 서열을 형성한다. 이후 고정 서열은 고정 서열 상보체에 혼성화되고, 표면에 결합된 연장된 서열의 양이 측정된다. 구체적인 실시양태에서, 농축 단계는 (i) 분석물을 포함하는 샘플을 제1 핵산 프로브의 적어도 일부에 상보적인 표적화제에 연결된 고체상과 접촉시킴으로써, 제1 핵산 프로브와 표적화제 사이의 결합 반응을 통해 고체상에 결합한 분석물을 포함하는 농축 복합체를 형성하는 단계; (ii) 농축 복합체를 수집하는 단계; (iii) 샘플의 비결합된 성분을 농축 복합체로부터 분리하는 단계; 및 (iv) 고체상이 분석물로부터 분리되어 분석물 복합체를 형성하도록 농축 복합체를 유리시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0192] 본원에 사용된 바와 같은 수집은 혼합물 중 물질의 물리적 국제화를 의미한다. 수집은 결합 반응 또는 흡착을 통한 물질의 국제화를 포함한다. 예를 들면, 혼합물 중 물질은 고체상 상의 물질의 흡착에 의해 또는 물질의 고체상 상의 결합 시약에의 결합에 의해 고체상 상에 수집될 수 있다. 그러나, 수집은 고체상에서의 국제화에 제한되지 않으며, 보다 큰 유체 부피 내의 위치/부피에 물질을 국제화시키는 당 분야의 기법, 예를 들면, 광학 집

게(광을 이용하여 단일 원자만큼 작은 미세 물체를 조작하는 것, 이때 집중된 레이저 빔으로부터의 방사압이 작은 입자를 포획할 수 있다), 전기장 또는 자기장, 집중 흐름(focused flow), 밀도 구배 원심분리 등의 이용을 통한 물질의 국제화도 포함할 수 있다.

[0193] 본 발명의 일부 실시양태는 미세입자 또는 미세입자에 결합한 물질의 수집을 포함한다. 적합한 수집 방법은 현탁액으로부터 미세입자의 국제화를 달성하는 미세입자-기초 분석의 당해 분야에 공지된 다수의 방법을 포함한다. 이는 중력 하의 또는 원심분리에 의한 침강, 필터 또는 다공막 상의 여과, 자기장의 적용에 의한 (자기화가능한 입자의) 국제화, 입자의 거시적인 고체상으로의 결합 또는 흡착, 광학 집계의 사용 등을 포함한다.

[0194] 본원에 사용된 바와 같이, 우리는 이전에 수집된 물질의 탈국제화를 지칭한다. 화학 결합을 통해 또는 특이적 또는 비특이적 결합 상호작용을 통해 국제화된 위치에서 유지되는 물질은 물질이 주변 매질 내로 분산되거나 혼합될 수 있도록 결합 또는 상호작용을 끊음으로써 탈국제화될 수 있다. 가혹한 조건을 요구하지 않으면서 절단될 수 있는 공유 결합을 제공하는, 사용될 수 있는 잘 확립된 절단가능한 화학 링커는 많다. 예를 들면, 디설피드 함유 링커는 티올 또는 기타 환원제를 이용하여 절단될 수 있고, cis-디올 함유 링커는 페리오테이트를 이용하여 절단될 수 있고, 금속-리간드 상호작용(예컨대 니켈-히스티딘)은 pH를 변화시키거나 경쟁 리간드를 도입함으로써 절단될 수 있다. 유사하게, (친화성 크로마토그래피 분야에서 식별된 것을 비롯한) 이용할 수 있는 잘 확립된 가역적 결합 쌍은 많다. 예를 들면, 다수의 항체-리간드 쌍의 결합은 pH에서의 변화, 단백질 변성제 또는 카오트로픽 시약의 첨가, 경쟁 리간드의 첨가 등을 통해 역전될 수 있다. 다른 적합한 가역적 결합 쌍은 상보적인 핵산 서열을 포함하며, 이의 혼성화는 pH 변화, 염 농도 감소, 쌍에 대한 녹는 점 초과량의 온도 증가 및/또는 핵산 변성제(예컨대 포름아미드) 첨가를 비롯한 다양한 조건 하에 역전될 수 있다. 이러한 가역적 결합 쌍은 (전술한 바와 같이) 표적화제로서 사용될 수 있고, 예를 들면, 제1 표적화제는 분석물에 결합하는 제1 결합 시약에 연결될 수 있고, 제2 표적화제는 고체상에 연결될 수 있고, 제1 표적화제와 제2 표적화제의 결합 상호작용은 고체상 상의 제1 결합 시약을 가역적으로 고정화하도록 사용될 수 있다.

[0195] 우리는 예를 들면, 혼합, 진탕, 불텍싱, 대류 유체 흐름, 자기, 전기 또는 광학적 힘의 적용에 의한 혼합 등에 의한 물리적 탈국제화도 포함한다. 미세입자 또는 미세입자에 결합한 물질이 수집된 경우, 이러한 물리적 방법을 이용하여 주변 매트릭스에 입자를 재현탁할 수 있다. 우리는 단순히 (예를 들면 전술된 기작 중 임의의 것에 의한) 이전 수집 단계의 역일 수 있거나, 또는 수집 및 우리는 두가지 상이한 기작에 의해 진행될 수 있다. 한 이러한 예에서, 입자에 결합한 물질(예컨대 분석물 또는 분석물을 포함하는 복합체)의 수집은 입자의 물리적 수집에 의해 달성될 수 있다. 이후 물질은 결합을 절단함으로써 또는 입자상의 물질을 유지하는 결합 반응을 역전 시킴으로써 유리된다. 두번째 이러한 예에서, 물질(예컨대 분석물 또는 분석물을 포함하는 복합체)은 표면에 연결된 결합 시약과의 결합 상호작용을 통해 표면에 수집된다. 이후 물질은 결합 또는 결합 시약을 표면에 연결하는 제2 결합 상호작용을 깨뜨림으로써 유리된다.

[0196] 수집에 이은 우리는 샘플에서의 분석물을 농축 및/또는 정제하기 위해 사용될 수 있다. 제1 부피에서의 수집 및 보다 작은 제2 부피에서의 유리에 의해, 샘플 내의 분석물은 농축될 수 있다. 농축을 통해, 후속 측정 단계의 민감성을 현저하게 개선하는 것이 종종 가능하다. 샘플로부터의 수집 및 비수집된 샘플의 일부 또는 전부의 제거에 의해, 샘플 중 잠재적인 분석 간섭이 감소 또는 제거될 수 있다. 임의적으로, 비결합된 샘플의 제거는 후속 분석 단계를 위한 균일한 매트릭스를 제공하도록 정의된 액체 시약(예를 들면, 분석 또는 세척 완충제)을 이용한 수집된 물질의 세척 및 상기 정의된 액체 시약 내로의 수집 물질의 유리를 포함할 수 있다.

[0197] 본원에 참고로 도입된 제2010/0261292호의 도 3a에 예시된 바와 같이, 본 방법은 표적 분석물을 포함하는 샘플을 표적 분석물에 결합하는 제1 결합 시약에 연결된 입자와 접촉시키는 단계를 포함하며, 이때 제1 결합 시약은 제1 표적화제에 연결되고 입자는 제2 표적화제에 연결되며, 제1 결합 시약과 입자는 제1 표적화제와 제2 표적화제 사이의 결합 반응을 통해 연결되어 상기 제1 결합 시약에 결합된 상기 표적 분석물을 포함하는 복합체를 형성한다. 이후 복합체는 수집되고 샘플 중 비결합된 성분은 복합체로부터 분리된다. 복합체는 유리되고 유리된 복합체는 고체상에 결합된 제2 결합 시약과 접촉되며 이때 제2 결합 시약이 복합체에 결합한다. 이 구체적인 실시양태는 도 16에 예시되어 있다. 입자(1601)는 포획 올리고뉴클레오타이드 서열(1602)을 포함하도록 변형되며, 이는 적어도 일부가 인접 프로브의 서열에 상보적이며, 이는 검출 항체(1604)에 결합한다. 입자는 인접 프로브와 혼합되어 포획 서열을 프로브 서열에 혼성화시켜 복합체(1605)를 형성한다. 이후 복합체는 분석물(1606), 및 임의적으로, 하나 이상의 오염물질(1607-1608)을 포함하는 샘플과 혼합된다. 분석물은 검출 항체(1609)에 결합하고 오염 물질은 제거된다(1610). 입자는 적합한 조건 하에 결합한 분석물을 포함하는 복합체로부터 제거되어 인접 프로브에 결합한 분석물(1611)의 농축된 용액을 형성하며, 이는 면역분석에서 본원에 기재된 바와 같이 사용될 수 있고, 여기서 추가 인접 프로브는 분석물에 결합하고 3-항체 복합체는 RCA-PLA로 처리되어 예를 들어

도 2a 및 첨부된 설명에 기재된 바와 같이 샘플 중 분석물(1612)의 존재를 검출한다.

[0198] 또 다른 실시양태에서, 검출 항체와 분석물 사이의 면역분석 복합체가 용액에 형성되고, 증폭시킨 후, 증폭된 생성물을 포획 시약 및/또는 고정제를 통해 입자에 부착시킨다. 임의적으로, 증폭된 생성물은 여과된 후 포획 시약 및/또는 고정을 통해 입자 상에 포획될 수 있다. 이 방법은 도 17에 예시되어 있다. 분석물, A(1701)는 인접 프로브(각각 1704 및 1705)에 각각 결합된 검출 항체(각각 1702 및 1703)에 결합되며 검출 항체(1706)에 각각 결합된 분석물을 포함하는 검출 복합체가 형성된다. 검출 복합체는 제1 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 말단 서열 및 제2 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 말단 서열을 각각 포함하는 2개의 커넥터 서열들(1707a 및 1707b)과 접촉된다. 상기 커넥터 서열들은 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브에 혼성화되고, 커넥터 올리고뉴클레오타이드들의 말단 서열들은 결합되어 제1 인접 프로브 및 제2 인접 프로브 둘 다에 혼성화되는 환형 표적 서열(1708)을 형성한다. 제2 인접 프로브는 롤링 서클 혼성화에 의해 연장되어 고정 시약에 상보적인 결합 시약을 포함하는 앰플리콘을 생성한다. 앰플리콘은 포획 시약(1710) 및 고정 시약(1711)을 포함하는 표면(1709)과 접촉되고 표면에 결합한 앰플리콘의 양은 복수의 표지된 프로브(1712)를 이용하여 표지함으로써 측정된다.

[0199] 추가로, 본원에 기재된 방법은 올리고머 분석물의 검출 및 정량에 사용될 수 있다. 표적 항원이 호모-올리고머, 즉 2 이상의 동일한 서브유닛을 갖는 항원인 경우, 검출 항체는 결합 주형 올리고뉴클레오타이드 및 프라이머 올리고뉴클레오타이드 둘 다와 독립적으로 표지될 필요가 있다. 이는 비효율적이 될 수 있는데, 주형 올리고뉴클레오타이드만을 갖는 두 항체 또는 프라이밍 올리고뉴클레오타이드만을 갖는 두 항체는 결합할 수 있고 이러한 비생리적인 복합체는 본 방식의 민감성을 감소시킬 수 있기 때문이다. 이 문제점은 이 방식이 특이적 올리고머 구조의 검출에 적용될 때 가증될 수 있으며, 여기서 추가적인 특이적 주형 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 올리고머의 특이적 검출을 가능하게 한다. 따라서, 본원에 기재된 방법은, 롤링 서클 주형의 형성을 위한 주형과 함께, 원하는 올리고머 분석물에 효율적으로 결합하도록 구성된 검출 항체 세트의 예비형성을 포함할 수 있다. 이는 추가 올리고뉴클레오타이드 서열, 예를 들면 스캐폴딩 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 달성될 수 있으며, 이는 구체적으로 항체 커플링된 올리고뉴클레오타이드에 혼성화되어 항체가 표적 항원 올리고머에 매칭되는 올리고머 형태로 검출 항체 혼합물에 구성되게 할 수 있다. 이 예비조직화 단계는 검출 항체의 표적 올리고머로의 최적 결합을 가능하게 한다. 검출 항체의 올리고머 항원으로의 결합에 이어, 스캐폴딩 올리고뉴클레오타이드는 엑소뉴클레아제 분해(exonuclease degradation) 또는 다른 적합한 화학적 방법 또는 엔도뉴클레아제 처리(endonuclease treatment)를 통해 제거될 수 있다. 일단 스캐폴딩 올리고뉴클레오타이드가 제거되면, 인접성 결합 롤링 서클 증폭 분석이 본원에 기재된 바와 같이 진행될 수 있다.

[0200] 추가 실시양태에서, 본원에 기재된 분석 포맷은 하나 이상의 대조군 분석을 추가로 포함한다. 음성 대조군은 상응하는 검출 항체를 갖지 않는 포획 항체를 포함하는 결합 도메인 상에 포함될 수 있고, 이로써 모든 샘플에 대한 일정한 배경 신호를 제공한다. 현재의 역치 값을 초과하는 신호의 측정은 부적절한 분석 과정 또는 표지된 검출 프로브의 비특이적 결합을 야기하는 샘플 의존적 매트릭스 효과의 존재를 나타낼 수 있다. 나아가, 건본 대조군은 다수의 조절 기능을 수행하는 인간 표적 항원(예컨대 분비 또는 세포내 단백질)에 대한 분석에도 포함될 수 있다. 양성 신호는 인간 물질의 존재 및 따라서 샘플 추가 및 품질에 대한 시험을 나타낼 것이다. 인간 항원은 세균 항원 추출에 대한 가공 대조군으로서 기능할 수도 있다. 예를 들면, 세포내 인간 분석물은 건본 대조군으로서 선택될 수 있고, 이는 Akt와 같이 검출되기 위해 용균 및 추출을 요구하기도 한다. 미리 결정된 역치 미만의 신호의 측정은, 샘플이 첨가되지 않았거나, 시약 또는 공정에서의 실패가 발생하였거나, 증폭 또는 검출에 간섭하는 물질이 존재한다는 점을 나타낼 것이다. 내부 대조군 외에도, 외부 양성 및 음성 대조군이 또한 본 방법 및/또는 키트와 함께 사용될 수 있다. 양성 대조군은 다중화된 패널에 의해 검출된 모든 특이적 표적 항원을 나타내는 비감염성 세균 추출물의 혼합물을 포함할 수 있으며, 시험시 모든 분석에 대한 양성 신호를 제공한다. 음성 대조군은 임의 표적 단백질이 없는 대표적 매트릭스를 포함한다.

[0201] 본 발명의 방법에 의해 분석될 수 있는 샘플의 예로는 식품 샘플(식품 추출물, 식물 균질화물, 음료 등을 포함함), 환경 샘플(예를 들면, 토양 샘플, 환경 쓰레기, 수집된 환경 에어로졸, 환경 수건, 물 여과액 등), 산업 샘플(예를 들면, 산업 생산 공정으로부터의 출발 물질, 생성물 또는 중간체), 인간 임상 샘플, 수의학 샘플 및 생물학적 유래의 다른 샘플이 있으나 이들로 한정되지 않는다. 분석될 수 있는 생물학적 샘플은 대변, 점막 면봉, 생리학 샘플, 및/또는 세포의 현탁액을 함유하는 샘플을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 생물학적 샘플의 구체적인 예로는 혈액, 혈청, 혈장, 대변, 점막 면봉, 조직 흡입물, 조직 균질화물, 세포 배양물 및 세포 배양 상청액(진핵 세포 및 원핵 세포의 배양물을 포함함), 소변, 침, 객담 및 뇌척수 샘플이 있다.

[0202] 본 발명의 방법을 이용하여 측정할 수 있는 분석물은 단백질, 독소, 핵산, 미생물, 바이러스, 세포, 진균,

포자, 탄수화물, 지질, 당단백질, 지단백질, 다당류, 약물, 호르몬, 스테로이드, 영양분, 대사물질 및 상기 분자들의 임의의 변형된 유도체, 또는 상기 분자들 중 하나 이상의 분자 또는 이들의 조합을 포함하는 임의의 복합체를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 샘플 중의 관심있는 분석물의 수준은 질환 또는 질환 상태를 표시할 수 있거나, 단순히 환자가 그 분석물에 노출되었는지를 표시할 수 있다.

[0203] 구체적인 실시양태에서, 관심있는 분석물은 엑소좀, 즉 거의 모든 세포 유형에 의해 유리된 작은 막 소포이다. 엑소좀의 유리 및 후속 포착(uptake)은 세포간 통신(cell-to-cell communication) 방법이며 많은 생리학적 및 병리학적 과정의 조절에서 역할을 한다. 엑소좀은, 표면 결합된 및 세포기질 내 단백질, 지질, mRNA, 및 miRNA를 포함하나 이에 제한되지 않는 광범위하게 다양한 신호 분자를 함유하는 것으로 나타나며, 각 엑소좀 내 상기 종의 동일성 및 농도를 이용하여 이의 세포 기원 및 기능을 추론할 수 있음이 암시되어 있다. 따라서, 환자의 전체 엑소좀 집단(population)의 유전자 또는 단백질 프로파일링은 무엇보다도 암, 감염성 질환, 신장 및 간 질환, 및 외상성 뇌손상을 비롯한 다양한 병리학적 질환에 대한 귀중한 예후 정보를 제공할 수 있다.

[0204] 엑소좀은 통상적으로, 생물학적 유체로부터 다수의 엑소좀을 분리하는 것, 이의 막을 파괴시키는 것, 및 웨스턴 블랏, PCR, 또는 서열분석과 같은 종래 방법에 의해 내용물을 분석하는 것에 의해 집합체(aggregate)에서 측정된다. 그러나, 본 발명의 방법 및 키트는 표면 상의 엑소좀(들)의 포획 및 엑소좀에 의해 발현된 표적 분자의 후속 검출을 통해 엑소좀을 특성화하도록 사용될 수 있다. 몇가지 단백질, 예를 들어 CD9, CD63, CD81, Hsp70, PDCD6IP, Tsg101이 대부분의 엑소좀 중에서 공통적인 것으로 식별되며, 한 실시양태에서, 상기 표적은 개별적으로 또는 조합으로 사용되어 하나 이상의 포획 시약과 하나 이상의 공통 엑소좀 표적 단백질 사이의 결합 상호작용을 통해 표면 상의 엑소좀을 포획할 수 있다. 대안적인 또는 추가 실시양태에서, 엑소좀 상에 또는 그 내에 존재하는 질환 관련 마커는 하나 이상의 포획 시약과 질환-관련 엑소좀 마커 사이의 결합 상호작용을 통해 표면 상의 엑소좀을 포획하는 데 사용된다.. 포획된 엑소좀(들)은 이후, 공통 엑소좀 단백질 중 하나 이상에 대해, 또는 엑소좀의 일부 분획의 표면 상에 또는 그 내에 존재하는 하나 이상의 추가 분자 표적에 대해 유도된 하나 이상의 검출 시약을 이용하여 탐지될 수 있다. 상이한 표적들이 포획 시약 및 검출 시약에 대해 선택되는 경우, 두 표적 모두를 포함하는 엑소좀만이 엑소좀의 하위집단을 식별 및 정량하는 데 추가 특이성을 가능하게 하며 탐지될 것이다. 구체적인 실시양태에서, 사용된 샘플은 정제된 엑소좀 조제물이다.

[0205] 구체적인 실시양태에서, 특정 표현형적으로 상이한 엑소좀 하위집단의 검출은 본원에 기재된 바와 같은 인접한 표적과의 결합 상호작용에 의해 인접하게 될 때만 신호를 생성하는 검출 시약의 쌍을 이용하여 수행될 수 있다. 본 실시양태에서, 인접한 표적은 동일한 분자 상의 상이한 에피토프일 수 있고, 이들은 동일한 엑소좀의 막에 결합한 또는 단일 엑소좀 내부 안에 인접하여 유지된 동일한 분자 종의 상이한 카피일 수 있거나, 또는 단일 엑소좀 중 또는 그 상의 상이한 상호작용 중, 예컨대 두 상호작용 단백질(예를 들면 테트라스판닌-인테그린 복합체), 단백질 수용체 및 리간드(예를 들면 EFG 및 EGFR), 또는 mRNA 분자 및 RNA 결합 단백질(예를 들면 아거노트(Argonaute) 1-4, 또는 GW182)일 수 있다. 추가로, 본원에 기재된 방법의 이용은 셋 이하의 상이한 표적 분자의 분석을 가능하게 하며, 이들은 기능적으로 연결되지 않지만 단일 엑소좀 내의 존재에 의해 연결될 수 있다. 본원에 기재된 PLA/RCA 방법에서 이용된 인접 프로브는 연장되어 엑소좀 상에 또는 엑소좀에 멀리 떨어져 위치한 표적 분자의 결합 및 후속 증폭을 가능하게 할 수 있다. 한 실시양태에서, PLA/RCA 분석은 앰플리콘에 대한 특이적 형광 프로브를 이용하여 수행된다. 그 후, 포획 엑소좀은 포괄적인 형광 시약, 예를 들면 엑소좀 내 RNA에 대한 아크리딘 오렌지로 표지되고, 포획 엑소좀은 두 형광 특징 사이의 상관관계를 결정하도록 영상화된다. 포괄적인 형광 시약의 이용은 크기 및 염색 강도에 기초하여 원하는 엑소좀 또는 이의 하위집합으로부터의 신호의 선택을 가능하게 한다.

[0206] 내부 표적 분자(카고 단백질, 지질 또는 RNA 분자)를 탐지하기 위해, 포획 중에 또는 후에 그러나 검출 시약 첨가 전에, 엑소좀은 고정화 및 투과화될 수 있다. 투과화된 엑소좀이 본원에 기재된 방법을 이용하여 호출되는 경우, 검출 시약 중 하나 또는 둘 모두는 특정 RNA 서열에의 결합, mRNA, miRNA의 검출 가능화, 및/또는 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 가능하게 하는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함할 수 있다.

[0207] 엑소좀은 고정 시약을 사용하거나 사용하지 않은 본원에 기재된 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 전술한 바와 같이, 결합 분석에서 고정 시약의 사용은 도 1a에 예시되어 있고, 분석물이 엑소좀인 경우, 표면(101)은 예를 들면 공통 엑소좀 표적 단백질에 유도된 포획 시약을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 표면은 고정 시약(103)도 포함한다. 하나 이상의 단계에서, 엑소좀은 포획 시약에 결합되고, 엑소좀은 동일 또는 상이한 엑소좀 표적 단백질을 통해 엑소좀에도 결합하는 검출 시약(104)에도 결합되고, 이때 상기 검출 시약은 핵산 프로브(105)에 연결되어 있다. 따라서, 포획 시약, 엑소좀 및 검출 시약을 포함하는 복합체가 표면 상에 형성된다. 프로브는 고정 시약에 결합하는 고정 영역을 포함하는 연장된 서열(107)을 형성하도록 연장된다. 연장된 서열은 고

정 시약에 결합되고, 표면에 결합된 연장된 서열의 양이 측정된다.

[0208]

마찬가지로, 도 1b에 예시된 방법은 엑소좀의 검출에도 적용될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 검출 복합체는 예를 들어 도 1c에 예시된 바와 같이 엑소좀에 대한 분석의 특이성을 향상시키기 위한 하나 이상의 검출 시약을 포함할 수 있다. 하나 이상의 단계에서, 엑소좀은 포획 시약 및 엑소좀에 의해 발현된 표적 단백질에 결합하는 2개(또는 이보다 많은 수)의 검출 시약들(각각 120 및 121) 각각에 결합하고, 이때 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약 각각은 핵산 프로브(122 및 123, 각각 제1 핵산 프로브 및 제2 핵산 프로브)에 연결된다. 엑소좀은 동시에 또는 실질적으로 동시에, 또는 순차적인 단계적 방식으로 포획 시약 및 검출 시약에 결합될 수 있다. 따라서, 포획 시약, 엑소좀, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약을 포함하는 복합체(124)가 표면 상에 형성된다. 제1 프로브와 제2 프로브가 서로 인접할 것을 요구하는 연장 과정을 이용하여 제1 프로브를 연장하여, 고정 서열에 상보적인 고정 서열 상보체를 포함하는 연장된 서열(125)을 형성한다. 끝에서 두 번째 단계에서, 고정 서열은 고정 서열 상보체에 혼성화되고, 표면에 결합된 연장된 서열의 양이 측정된다. 유사하게, 도 2a 내지 도 2c 각각에서 도식화된 방법은 엑소좀을 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0209]

본 발명의 분석은 샘플 중의 1개 이상, 예를 들면, 2개 이상의 분석물의 농도를 측정하는 데에 사용될 수 있다. 따라서, 2개 이상의 분석물은 동일한 샘플에서 측정될 수 있다. 동일한 샘플에서 측정될 수 있는 분석물의 패널은 예를 들면, 질환 상태 또는 생리학적 상태와 관련된 분석물 또는 활성에 대한 분석의 패널을 포함한다. 일부 이러한 패널은 사이토카인 및/또는 그의 수용체(예를 들면, TNF-알파, TNF-베타, IL1-알파, IL1-베타, IL2, IL4, IL6, IL-10, IL-12, IFN- γ 등 중 하나 이상), 성장인자 및/또는 그의 수용체(예를 들면, EGF, VGF, TGF, VEGF 등 중 하나 이상), 남용 약물, 치료 약물, 비타민, 병원체 특이적 항체, 자가-항체(예를 들면, Sm, RNP, SS-A, SS-알파, J0-1 및 Sc1-70 항원에 대해 유도된 하나 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 등 중 하나 이상), 울혈성 심장 질환 및/또는 급성 심근경색을 비롯한 심장 질환의 마커(예를 들면, 트로포닌(Troponin) T, 트로포닌 I, 트로포닌 C, 미요글로빈, CKMB, 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase), 글루타티온 퍼옥시다제, β -나트륨이노 단백질(BNP), 알파-나트륨이노 단백질(ANP), 엔도텔린, 알도스테론, C-반응성 단백질(CRP) 등 중 하나 이상), 항상성과 관련된 마커(예를 들면, 피브린 단량체, D-이량체, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 프로트롬빈 단편 1 및 2, 항인자 Xa 등 중 하나 이상), 급성 간염 바이러스 감염의 마커(예를 들면, A형 간염 바이러스에 대한 IgM 항체, B형 간염 코어 항원에 대한 IgM 항체, B형 간염 표면 항원, C형 간염 바이러스에 대한 항체 등 중 하나 이상), 알츠하이머병의 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), 골다공증의 마커(예를 들면, 교차연결된 Nor C-텔로펩티드, 총 데옥시피리디놀린, 유리 데옥시피리디놀린, 오스테오칼신, 알칼리성 포스파타제, I형 콜라겐의 C-말단 전구펩티드, 골 특이적 알칼리성 포스파타제 등 중 하나 이상), 가임 상태 또는 가임 관련 장애의 마커(예를 들면, 에스트라디올, 프로게스테론, 여포 자극 호르몬(FSH), 황체형성 호르몬(LH), 프로락틴, hCG, 테스토스테론 등 중 하나 이상), 갑상선 장애의 마커(예를 들면, 갑상선 자극 호르몬(TSH), 총 T3, 유리 T3, 총 T4, 유리 T4 및 역 T3 중 하나 이상), 및 전립선암의 마커(예를 들면, 총 PSA, 유리 PSA, 복합체화된 PSA, 전립선 산 포스파타제, 크레아틴 키나제 등 중 하나 이상)의 패널을 포함한다. 본 발명의 일부 실시양태는 특정 질환 상태 또는 생리학적 상태와 관련된 1개 이상, 2개 이상, 4개 이상, 또는 10개 이상의 분석물(예를 들면, 패널로 함께 분류된 분석물들, 예컨대, 상기 나열된 분석물들; 예를 들면, 갑상선 장애의 진단에 유용한 패널은 예를 들면, 갑상선 자극 호르몬(TSH), 총 T3, 유리 T3, 총 T4, 유리 T4 및 역 T3 중 하나 이상을 포함할 수 있음)의 측정을 포함한다.

[0210]

바람직한 실시양태에서, 패널은 전통적인 샘플 매트릭스 내에 미량으로 존재하는 하나 이상의 분석물, 예를 들면, 약 100 fg/ml 미만의 농도, 바람직하게는 약 10 fg/ml 미만의 농도로 분석물을 포함한다. 패널에 포함될 수 있는 분석물의 비한정적 목록은 예를 들면, IL-17, IL-21, IL-31, Ab-38, Ab-40, Ab-42, Ab-39, Ab-43, Ab-15, Ab-16, Ab-17, A베타 올리고머, C-펩티드, IL-13, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12/23p40, IL-12p70, INF-g, PSA, PSAC, Tau, 인-Tau, TNFa, 트로포닌 I, 심장 트로포닌 T, 트로포닌 C, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, EPO, LC3B, 알부민, CHO-P, 이. 콜라이 HCP, IgA, IgE, IgG, IgG1, IgG4, IgM, NSO-P, Per-C6, 잔류 단백질 A, IgG2, IgG3, IgG4, AFP, CA125, 활성 캐스파제(Caspase)-3, CXCL11/I-TAC, ErbB2/HER2, HGFR/o-MET, IFN-베타, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, 베타-NGF, TFF3, TIMP1, Kim-1, 알파-2 마크로글로불린, D-이량체, ICAM-1, 미엘로퍼옥시다제, 미요글로빈, PAI-1, PCSK9, 플라스미노젠, 레닌(renin)/프로레닌(prorenin), tPA, CXCL1/GRO-알파, CCL2/MCP1, CCL3/MIP-1알파, CCL4/MIP-1베타, CCL5/Rantes, CRP, CXCL9/MIG, CXCL10/IL-10, G-CSF, GM-CSF, IFN-알파, IFN-감마, IL1-알파, IL1-베타, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL12(p70), IL13, IL15, IL18, IL-22, IL-23, IL-33, c-MET, 아디포넥틴(adiponectin), FGF21, TSLP, GLP-1, 성장호르몬, IGF1, IGF2, 인슐린, 렙틴(leptin), 프로락틴, HIV p24, HB-EGF, AKT, 인-

AKT, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0211] 구체적 실시양태에서, 패널은 종래 샘플 매트릭스 내에 미량으로 존재하는 하나 이상의 분석물, 예를 들면 약 100 fg/mL 미만, 바람직하게는 약 10 fg/mL 미만의 농도로 분석물을 포함하고, 패널은 하기 인간 표적 중 하나 이상을 포함한다: G-CDF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12/23p40, IL12p70, IL-17A, IL21, IL-22, IL-23, IL-31, IL-33, TNF α , TSLP, VEGF, 복합체화된 PSA, 유리 PSA, A β 42, A β 40, A β 38, tau, 심장 트로포닌 I, 심장 트로포닌 T, HIV p24, C-펩티드, 및/또는 FGF21.

[0212] 추가로, 본원에 기재된 방법 및 키트는 항미생물 저항성 마커(PBP2a/mecA(에스.아우레우스(*S.aureus*), 그람 양성), TEM1(이.콜라이(*E.coli*), 그람 음성))에 대한 단일 유기체 민감성을 검출하기 위해 면역분석에서 사용될 수 있다. 상기 분석은 그람 양성 및 그람 음성 세균 둘 다에서 상기 부류의 분석물에 사용될 수 있다. 반코마이신, 베타-락탐, 카바페넴, 아미노글리코사이드 및 매크로라이드 항생제에 대한 항미생물 저항성과 연관된 하기 표적 단백질 중 하나 이상이 분석에 포함될 수 있다: erm 패밀리, vanA, vanB, aac(6')-aph(2''), KPC, NDM, OXA-48, VIM, OXA-23 류, OXA-40 류, OXA-58 류, CTX-M-1 및 CTX-M-9 패밀리의 ESBL 유전자, 및 이들의 조합. 나아가, 하기 단백질 중 하나 이상이 분석에 포함될 수 있다: 50S 리보솜 단백질 L20, 30S 리보솜 단백질 S7, 30S 리보솜 단백질 S2, 50S 리보솜 단백질 L21, 50S 리보솜 단백질 L17, 30S 리보솜 단백질 S4, 50S 리보솜 단백질 L15, 30S 리보솜 단백질 S5, 50S 리보솜 단백질 L16, 30S 리보솜 단백질 S3, 50S 리보솜 단백질 L22, 50S 리보솜 단백질 L4, 리보솜 단백질 L25, 50S 리보솜 단백질 L5, 30S 리보솜 단백질 S2, 리보솜 단백질 L30, L31 및 L32, 및 이들의 조합. 추가로, 하기 표적 중 하나 이상이 단독으로 또는 본원에 식별된 마커 중 하나 이상과의 조합으로 평가될 수 있다: 예를 들면 신장 인자 EF-TU, ACP, 아실기 운반 단백질, RplL, 리보솜 단백질 GroS(MopB, 65,000), 샤프론(chaperone) 시스템 Gro-EL-Gro-ES의 성분 및 GapA, 해당과정의 효소, 및 이들의 조합.

[0213] 추가로, 본원에 기재된 방법 및 키트는 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 아시네토박터 바우마니이(*Acinetobacter baumannii*), 슈도모나스 아에루기노사, 엔테로박터(*Enterobacter*) 종, 및 장외(extra-intestinal) 병원성 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)를 포함하나 이에 제한되지 않는 의료 관련 감염물(healthcare associated infection)(HAI 유기체)을 검출하기 위한 면역분석에서도 사용될 수 있다. 각각의 HAI 유기체에 대한 저항성 마커는 하기 표에 제공된다:

병원체	약물 저항성 마커 (GenBank ID)
클렙시엘라 뉴모니아에	KPC (KPC-2: AAK70220.1)
아시네토박터 바우마니이	VIM (VIM-1: CCG05854.1)
슈도모나스 아에루기노사	IMP-1 (AAL17637.1)
엔테로박터 종	OXA-48 (AGD80396.1)
장외 병원성 에스케리치아 콜라이	NDM (NDM-1: AHF22464.1)

[0214]

[0215] 특정 외막 단백질이 본원에 기재된 면역분석에서 평가될 수 있다:

병원체	외막 단백질	GenBank 입수 #
클렙시엘라 뉴모니아에	lpp	YP_002238023.1
	ompA	WP_004144094.1
엔테로박터 클로아카에 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	lpp	YP_003612855.1
	ompA	WP_023481315.1
엔테로박터 아에로게네스 (<i>Enterobacter aerogenes</i>)	lpp	YP_004593622.1
	ompA	YP_007388430.1
에스케리치아 콜라이	lpp	NP_416192.1
	ompA	NP_286832.1
슈도모나스 아에루기노사	oprF	NP_250468.1
아시네토박터 바우마니이	omp38	YP_008889447.1

[0216]

[0217] 추가로, 본원에 기재된 방법 및 키트는 하기 유형의 바이오마커 중 하나 이상을 검출하도록 면역분석에서 사용될 수 있다: 사이토카인, 순환 중양 특이적 단백질, 하나 이상의 감염성 질환과 연관된 단백질, 세포내 마커 등, 및 이들의 조합.

[0218] 추가로, 하기 자가면역 질환은 하기 열거된 연관된 항원 중 하나 이상의 존재 또는 부재를 평가함으로써 본원에 기재된 방법 및 키트를 이용하여 식별될 수 있다:

조직 특이적 질환	연관된 항원
제 1 형 당뇨병	글루탐산 디카르복실라제 (GAD) 인슐린종-2 (IA2A) 아연 수송된 8 단백질 (ZnT8) 프로인슐린 인슐린
셀리악 병	트랜스글루타미나제 (tTG) 글리아딘 (탈아미드화) 글리아딘 펩티드의 탈아미드화 형태 (DGP)
에디슨 병	21-수산화효소 (21-OH) 17-수산화효소 (17-OH) 시토크롬 p450 측쇄 절단 효소 (SCC)
하시모토병	갑상샘 퍼록시다제 (TPO) 티로글로불린
그레이브 갑상선 기능 항진증	갑상선 자극 호르몬 수용체
부갑상선 기능 저하증	칼슘 감지 수용체
원발성 담즙성 간경변	피루브산 탈수소효소 복합체 (PDC-E2) 분지쇄 2-옥소-산 탈수소효소 복합체 (BCOADC-E2) 2-옥소글루타레이트 탈수소효소 복합체 (OGDC-E2) Gp120 Sp100 Nup62

[0219]

제 2 형 자가면역 간염	시토크롬 P450 2D6 포름이미노전달효소 시클로디아미나제
자가면역 위염	H ⁺ /K ⁺ ATPase
악성 빈혈	H ⁺ /K ⁺ ATPase
탈모	티로신 수산화효소
백반증	티로시나제 SOX-10 SOX-9

[0220]

[0221]

구체적인 실시양태에서, 패널은 전통적인 샘플 매트릭스 내에 미량으로 존재하는 하나 이상의 분석물, 예를 들면, 약 100 fg/ml 미만의 농도, 바람직하게는 약 10 fg/ml 미만의 농도로 분석물을 포함한다. 패널은 바람직하게는 하기 분석물들 중 하나 이상을 포함한다: IL-17, IL-21, IL-31, IL-22, IL-23, IL-33, 심장 트로포닌 T 및 이들의 조합. 구체적인 실시양태에서, 샘플에서 검출되는 분석물의 농도는 0.01 fM 내지 100 fM, 0.03 fM 내지 50 fM, 또는 0.03 fM 내지 10 fM의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, 실질적으로 정확히 측정될 수 있는

샘플 중의 분석물 분자의 농도는 약 100 fM 미만, 약 10 fM 미만, 약 3 fM 미만, 약 1 fM 미만, 약 0.3 fM 미만, 약 0.1 fM 미만, 약 0.03 fM 미만, 또는 그 미만이다. 샘플 중의 분석물 분자의 측정된 농도가 샘플 중의 분석물 분자의 실제 농도의 약 20% 이내에 있는 경우 샘플 중의 분석물 분자의 농도는 실질적으로 정확히 측정된 것으로 간주될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플 중의 분석물 분자의 측정된 농도는 샘플 중의 분석물 분자의 실제 농도의 약 10% 이내, 약 3% 이내 또는 약 1% 이내에 있을 수 있다. 분석에 대한 검출 한계는 배경 신호보다 2.5 이상의 표준 편차만큼 높은 신호를 제공하는 농도이고, 바람직하게는 분석은 샘플에서 대략 10개 내지 10,000개의 분자, 또는 샘플에서 100개 내지 5,000개의 분자, 또는 샘플에서 100개 내지 1,000개의 분자를 검출할 수 있다.

[0222] 추가 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 최근의 노출 및/또는 감염으로 인해 미량으로 존재하는 분석물을 검출하는 데에 이용될 수 있다. 다양한 질환 또는 상태, 예를 들면, 암, 세균 감염, 예를 들면, 바실러스 안쓰라시스(*Bacillus anthracis*)(탄저병), 바이러스 감염, 예를 들면, HIV, 간염, HPV 등, 독소 노출, 예를 들면, 리신, 보툴리눔 독소 A, B 또는 E 등의 초기 진단은 이용가능한 기술, 예컨대, ELISA의 검출 한계(LOD)가 질환의 발병을 표시할 수 있는 미량으로 존재하는 단백질의 순환 농도보다 더 높다는 사실에 의해 제한된다. 패널은 전통적인 샘플 매트릭스 내에 미량으로 존재하는 하나 이상의 분석물, 예를 들면, 약 100 fg/ml 미만 또는 약 10 fg/ml 미만의 농도로 분석물을 포함할 수 있다. 패널에 포함될 수 있는 분석물의 비한정적 목록은 예를 들면, HIVgp41, HIVgp120, HIVgp160, HIVp24, HIVp66, HIVp51, HIVp17, HIVp31, Tat, Nef, Viv, A형, B형, C형, D형 또는 E형 간염 항원, HPV 16형, 18형, 31형, 33형, 35형, 39형, 45형, 51형, 52형, 56형, 58형, 59형, 68형, 73형 및/또는 82형, HPV-E6 및 E7 단백질, IL-17, IL-21, IL-31, IL-22, IL-23, IL-33, 심장 트로포닌 T, 및 이들의 조합을 포함한다. 추가로, 패널은 최근의 질환 발병, 노출 및/또는 감염으로 인해 미량으로 존재할 수 있는 하기 분석물들 중 하나 이상의 분석물도 포함할 수 있다: Ab-38, Ab-40, Ab-42, Ab-39, Ab-43, Ab-15, Ab-16, Ab-17, A베타 올리고머, C-펩티드, IL-13, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, INF-g, PSA, Tau, 인-Tau, TNF α , 트로포닌 I, 심장 트로포닌 T, 트로포닌 C, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, EPO, LC3B, 알부민, CHO-P, 이. 콜라이 HCP, IgA, IgE, IgG, IgG1, IgG4, IgM, NSO-P, Per-C6, 잔류 단백질 A, IgG2, IgG3, IgG4, AFP, CA125, 활성 캐스파제-3, CXCL11/I-TAC, ErbB2/HER2, HGFR/o-MET, IFN-베타, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, 베타-NGF, TFF3, TIMP1, Kim-1, 알파-2 마크로글로불린, D-이량체, ICAM-1, 미엘로퍼록시다제, 미요글로빈, PAI-1, PCSK9, 플라스미노젠, 레닌/프로레닌, tPA, CXCL1/GRO-알파, CCL2/MCP1, CCL3/MIP-1알파, CCL4/MIP-1베타, CCL5/Rantes, CRP, CXCL9/MIG, CXCL10/IL-10, G-CSF, GM-CSF, IFN-알파, IFN-감마, IL1알파, IL-1베타, IL-3, IL-7, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-18, c-MET, 아디포넥틴, FGF21, GLP-1, 성장호르몬, IGF1, IGF2, 인슐린, 렙틴, 프로락틴, HB-EGF, AKT, 인-AKT, 및 이들의 조합.

[0223] 본 발명의 방법은 전술된 바와 같이 매우 다양한 생물학적 물질들 및 생화학적 물질들을 검출할 수 있도록 디자인된다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 혈액, 객담, 대변, 필터, 면봉 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 다양한 관련 임상 매트릭스 및 환경 매트릭스에서 생물전 물질("BWA")을 비롯한 병원성 및/또는 잠재적 병원성 바이러스, 세균 및 독소를 검출하는 데에 이용될 수 있다. 본 발명의 방법을 이용함으로써 (단독으로 또는 함께) 분석될 수 있는 병원체 및 독소의 비한정적 목록은 다음과 같다: 바실러스 안쓰라시스(*Bacillus anthracis*)(탄저병), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*)(흑사병), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*)(콜레라), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*)(야토병), 브루셀라(*Brucella*) 종(브루셀라병), 콕시엘라 부르네티이(*Coxiella burnetii*)(Q 열병), 리스테리아(*Listeria*), 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라(*Shigella*), 비브리오 콜레라, 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 부르크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*), 마리오라(variola) 바이러스(천연두)를 비롯한 오르조포क्स(orthopox) 바이러스, 뇌염 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEE), 웨스턴 말 뇌염 바이러스(WEE), 이스턴 말 뇌염 바이러스(EEE), 알파바이러스, 출혈성 열병 바이러스, 아레나비리데(Arenaviridae), 번야비리데(Bunyaviridae), 필로비리데(Filoviridae), 플라비비리데(Flaviviridae), 에볼라(Ebola) 바이러스, 스태필로코커스 장독소(staphylococcal enterotoxins), 리신, 보툴리눔 독소(A, B, E), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 마이코톡신(mycotoxin), 푸사륨(*Fusarium*), 마이로테슘(*Myrothecium*), 세팔로스포륨(*Cephalosporium*), 트리코데르마(*Trichoderma*), 버티시모노스포륨(*Verticimonosporium*), 스타키보트리스(*Stachybotrys*), 마비저(glanders), 밀진균, 바실러스 글로비기이(*Bacillus globigii*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 황우(yellow rain), 트리코테센 마이코톡신(trichothecene mycotoxins), 살모넬라 티피뮤름(*Salmonella typhimurium*), 아플라톡신(aflatoxin), 제놉실라 체오피스(*Xenopsylla cheopis*), 디아마누스 몬타누스(*Dermanis montanus*), 백수(alastrim), 원두(monkeypox), 아레나바이러스(Arenavirus), 한타바이러스(Hantavirus), 라사(Lassa) 열병, 아르헨티나 출혈성 열병, 볼리비아 출혈성 열병, 리프트 계곡(Rift Valley) 열병 바이러스, 크림-콩고(Crimean-

Congo) 바이러스, 한타바이러스, 마르부르그(Marburg) 출혈성 열병, 황열 바이러스, 뎅기열 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 비롯한 인간 및 동물 변종을 포함함), RSV, 인간 면역결핍 바이러스 I 및 II(HIV I 및 II), A형 간염, B형 간염, C형 간염, 간염(비-A형, B형 또는 C형), 엔테로 바이러스(Enterovirus), 엡스테인-바(Epstein-Barr) 바이러스, 사이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus), 헤르페스 심플렉스(herpes simplex) 바이러스, 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 네이세리아 고노르헤아(*Neisseria gonorrhoeae*), 트리코모나스 바기날리스(*Trichomonas vaginalis*), 인간 유두종 바이러스, 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borellia burgdorferi*), 해모필루스(*Haemophilus*) 인플루엔자, 마이코플라스마 뉴모니아(*Mycoplasma pneumoniae*), 클라미도필라 뉴모니아(*Chlamydophila pneumoniae*), 레기오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스태필로코커스 엔테로톡신 B(SEB), 애브린(Abrin), 시가 독소(Shiga Toxin) 1, 시가 독소 2, 모락셀라 카타르할리스(*Moraxella catarrhalis*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 클로스트리듐 디피사일(*Clostridium difficile*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 군 A 스트렙토코커스(*streptococcus*), 이. 콜라이 0157, 코로나바이러스(coronavirus), 콕사키(Coxsackie) A 바이러스, 리노바이러스(rhinovirus), 파라인플루엔자 바이러스, 호흡 세포융합 바이러스(RSV), 메타뉴모바이러스(metapneumovirus), 백신니아(vaccinia) 및 아데노바이러스(adenovirus).

[0224] 본원에 기재된 결합 분석에 대한 개선은 결합 분석의 동력학적 범위, 즉 샘플의 희석 또는 농축 없이, 또는 유사한 결과를 제공하는 분석 조건(예를 들면, 사용된 시약의 농도 등)의 변화 없이 시스템 또는 방법에 의해 정량될 수 있는 유체 샘플 중의 분석물 분자의 농도 범위를 확장하는 데에 사용될 수 있고, 이때 분석물 분자의 측정된 농도는 실질적으로 정확히 측정될 수 있다. 유체 샘플 중의 분석물 분자의 측정된 농도가 유체 샘플 중의 분석물 분자의 실제(예를 들면, 진짜) 농도의 약 10% 이내에 있는 경우, 유체 샘플 중의 분석물 분자의 농도는 실질적으로 정확히 측정된 것으로 간주될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유체 샘플 중의 분석물 분자의 측정된 농도는 실질적으로 정확히 측정되고, 이 실시양태에서 상기 측정된 농도는 유체 샘플 중의 분석물 분자의 실제 농도의 약 5% 이내, 약 4% 이내, 약 3% 이내, 약 2% 이내, 약 1% 이내, 약 0.5% 이내, 약 0.4% 이내, 약 0.3% 이내, 약 0.2% 이내 또는 약 0.1% 이내에 있다. 일부 경우, 측정된 농도의 측정치는 약 20% 이하, 약 15% 이하, 약 10% 이하, 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하, 약 1% 이하 또는 약 0.5% 이하의 수준만큼 진짜(예를 들면, 실제) 농도와 상이하다. 일부 실시양태에서, 선택된 분석 방법을 이용하여 공지된 농도의 유체 샘플 중의 분석물 분자의 농도를 측정하고 측정된 농도를 실제 농도와 비교함으로써 분석 방법의 정확성을 측정할 수 있다.

[0225] 일부 실시양태에서, 시스템 또는 방법은 약 1000(3 log), 약 10,000(4 log), 약 100,000(5 log), 약 350,000(5.5 log), 1,000,000(6 log), 약 3,500,000(6.5 log), 약 10,000,000(7 log), 약 35,000,000(7.5 log) 또는 약 100,000,000(8 log) 이상의 동력학적 범위에 걸쳐 유체 샘플 중의 분석물 분자의 농도를 측정할 수 있다.

[0226] 일부 실시양태에서, 실질적으로 정확히 측정될 수 있는 유체 샘플 중의 분석물 분자의 농도(예를 들면, 비공지된 농도)는 약 5000 fM(펨토몰) 미만, 약 3000 fM 미만, 약 2000 fM 미만, 약 1000 fM 미만, 약 500 fM 미만, 약 300 fM 미만, 약 200 fM 미만, 약 100 fM 미만, 약 50 fM 미만, 약 25 fM 미만, 약 10 fM 미만, 약 5 fM 미만, 약 2 fM 미만, 약 1 fM 미만, 약 500 aM(아토몰) 미만, 약 100 aM 미만, 약 10 aM 미만, 약 5 aM 미만, 약 1 aM 미만, 약 0.1 aM 미만, 약 500 zM(zepto몰) 미만, 약 100 zM 미만, 약 10 zM 미만, 약 5 zM 미만, 약 1 zM 미만, 약 0.1 zM 미만, 또는 그 미만이다. 일부 경우, 검출 한계(예를 들면, 용액에서 측정될 수 있는 분석물 분자의 최저 농도)는 약 100 fM, 약 50 fM, 약 25 fM, 약 10 fM, 약 5 fM, 약 2 fM, 약 1 fM, 약 500 aM(아토몰), 약 100 aM, 약 50 aM, 약 10 aM, 약 5 aM, 약 1 aM, 약 0.1 aM, 약 500 zM(zepto몰), 약 100 zM, 약 50 zM, 약 10 zM, 약 5 zM, 약 1 zM, 약 0.1 zM 이하, 또는 그 미만이다. 일부 실시양태에서, 실질적으로 정확히 측정될 수 있는 유체 샘플 중의 분석물 분자 또는 입자의 농도는 약 5000 fM 내지 약 0.1 fM, 약 3000 fM 내지 약 0.1 fM, 약 1000 fM 내지 약 0.1 fM, 약 1000 fM 내지 약 0.1 zM, 약 100 fM 내지 약 1 zM, 약 100 aM 내지 약 0.1 zM 이하, 또는 그 미만이다. 검출 상한(예를 들면, 용액에서 측정될 수 있는 분석물 분자의 최고 농도)는 약 100 fM 이상, 약 1000 fM 이상, 약 10 pM(피코몰) 이상, 약 100 pM 이상, 약 1000 pM 이상, 약 10 nM(나노몰) 이상, 약 100 nM 이상, 약 1000 nM 이상, 약 10 μ M 이상, 약 100 μ M 이상, 약 1000 μ M 이상, 약 10 mM 이상, 약 100 mM 이상, 약 1000 mM 이상, 또는 그 초과이다. 일부 실시양태에서, 측정된 유체 샘플 중의 분

석물 분자 또는 입자의 농도는 약 50×10^{-15} M 미만, 약 40×10^{-15} M 미만, 약 30×10^{-15} M 미만, 약 20×10^{-15} M 미만, 약 10×10^{-15} M 미만 또는 약 1×10^{-15} M 미만이다.

[0227] 일부 실시양태에서, 실질적으로 정확히 측정될 수 있는 샘플 중의 분석물 분자의 농도는 약 100 fM 미만, 약 10 fM 미만, 약 3 fM 미만, 약 1 fM 미만, 약 0.3 fM 미만, 약 0.1 fM 미만, 약 0.03 fM 미만, 또는 그 미만이다. 일부 실시양태에서, 실질적으로 정확히 측정될 수 있는 샘플 중의 분석물 분자의 농도는 약 5000 fM 내지 약 0.1 fM, 약 3000 fM 내지 약 0.1 fM, 약 1000 fM 내지 약 0.1 fM, 약 1000 fM 내지 약 1 fM, 약 100 fM 내지 약 1 fM, 또는 약 100 fM 내지 약 0.1 fM이다. 샘플 중의 분석물 분자의 농도는 샘플 중의 분석물 분자의 측정된 농도가 샘플 중의 분석물 분자의 실제 농도의 약 20% 이내에 있는 경우 실질적으로 정확히 측정된 것으로 간주될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플 중의 분석물 분자의 측정된 농도는 샘플 중의 분석물 분자의 실제 농도의 약 10% 이내, 약 3% 이내 또는 약 1% 이내에 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 선택된 분석 방법을 이용하여 공지된 농도의 샘플 중의 분석물 분자의 농도를 측정함으로써 분석 방법의 정확성을 측정할 수 있다. 바람직하게는, 분석은 샘플에서 대략 10개 내지 10,000개의 분자, 바람직하게는 샘플에서 100개 내지 5,000개의 분자, 보다 바람직하게는 샘플에서 100개 내지 1,000개의 분자를 검출할 수 있다.

[0228] 예를 들면, 동일한 포획 항체 및 2개의 검출 항체들 중 어느 하나, 및 동일한 표지 및 검출 기술을 이용하여 측정하였을 때, 본원에 기재된 분석 포맷의 사용은 검출 신호 및 분석 민감성을 통상적인 샌드위치 면역분석 기법에 비해 10배만큼 많이, 바람직하게는 50배 또는 100배만큼 많이, 또는 1,000배만큼 많이 개선할 수 있다. 바람직하게는, 본원에 기재된 분석 포맷의 사용은 검출 신호 및 분석 민감성을 표준 샌드위치 면역분석에 비해 100배만큼 많이 개선한다.

[0229] 특히 민감한 광학 검출 기법에 커플링될 때 본 발명의 방법의 한 유리한 양태는 신호 증폭이 개별 결합 사건을 밝은 광점으로서 검출할 수 있게 한다는 것이다. 그 다음, (배경 노이즈(noise)로부터의 결합 사건의 개선된 구별을 제공함으로써 낮은 분석물 농도에 대한 보다 더 우수한 민감성을 제공할 수 있는) 개별 사건을 카운팅하거나, (높은 분석물 농도를 측정하기 위한 보다 더 우수한 동력학적 범위를 제공할 수 있는) 모든 결합 사건들에 대한 신호를 적분함으로써 신호의 정량을 수행할 수 있다.

[0230] 본 발명의 방법은 다양한 분석 장치들 및/또는 포맷들에서 이용될 수 있다. 분석 장치는 예를 들면, 분석이 진행될 때 첨가되었거나 분석 모듈의 웰, 챔버 또는 분석 영역 내에 미리-적재된 분석 시약(표적화제 또는 다른 결합 시약을 포함할 수 있음)을 갖는 분석 모듈, 예컨대, 분석 플레이트, 카트리지, 멀티-웰 분석 플레이트, 반응기, 시험관, 큐벳, 유동 셀, 분석 칩, 측류 장치 등을 포함할 수 있다. 이 장치들은 특정 결합 분석, 예를 들면, 면역분석 또는 면역크로마토그래피 분석을 위해 다양한 분석 포맷들을 사용할 수 있다. 예시적인 분석 장치 및 포맷은 본원에 후술되어 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 건조 상태로 저장된 분석 시약을 사용할 수 있고, 분석 장치/키트는 건조 상태로 분석 시약을 유지하기 위한 건조제 물질을 추가로 포함할 수 있거나 구비할 수 있다. 분석 시약으로 미리-적재된 분석 장치는 저장 동안 뛰어난 안정성을 유지하면서 분석 측정의 속도를 크게 개선할 수 있고 분석 측정의 복잡성을 감소시킬 수 있다. 건조된 분석 시약은 건조된 후 분석에서 사용되기 전에 재구성될 수 있는 임의의 분석 시약일 수 있다. 이들은 결합 분석에서 유용한 결합 시약, 효소, 효소 기질, 표시제 염료, 및 관심있는 분석물을 검출하는 데에 사용될 수 있는 다른 반응성 화합물을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 분석 시약은 검출 기작에 직접적으로 관여하지 않으나 분석에서 보조 역할을 수행하는 물질(차단제, 안정화제, 세제, 염, pH 완충제, 보존제 등을 포함하나 이들로 한정되지 않음)도 포함할 수 있다. 시약은 유리 형태로 존재할 수 있거나, 분석 모듈 내의 구획(예를 들면, 챔버, 채널, 유동 셀, 웰 등)의 표면, 또는 콜로이드, 비드 또는 다른 미립자 지지체의 표면을 비롯한 고체상 상에 지지될 수 있다.

[0231] 본 발명의 방법은 분석물의 양을 측정하는, 특히 고체상에 결합된 분석물의 양을 측정하는 다양한 방법들과 함께 이용될 수 있다. 이용될 수 있는 기법은 당분야에서 공지된 기법, 예컨대, 세포 배양-기초 분석, 결합 분석(응집 시험, 면역분석, 핵산 혼성화 분석 등을 포함함), 효소 분석, 비색 분석 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 다른 적합한 기법은 당업자에게 용이하게 자명할 것이다. 일부 측정 기법은 시각적 검사에 의해 측정될 수 있게 하고, 다른 측정 기법은 측정을 수행하기 위해 기계의 이용을 요구할 수 있거나 기계의 이용으로부터 이익을 얻을 수 있다.

[0232] 분석물의 양을 측정하는 방법은 i) 분석물과 표면의 결합 후 표면에서 질량 또는 굴절 지수의 변화를 측정하는 기법(예를 들면, 표면 음파 기법, 표면 플라즈몬 공명 센서, 타원편광 기법 등), ii) 질량 분광측정 기법(표면상의 분석물을 측정할 수 있는 MALDI, SELDI 등과 같은 기법을 포함함), iii) 크로마토그래피 또는 전기영동 기

법, iv) (분석물의 간접 형광에 기초할 수 있는) 형광 기법 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는 표지 부재 기법을 포함한다.

[0233] 분석물의 양을 측정하는 방법은 분석물에 직접적으로 또는 (분석물의 표지된 결합 파트너의 사용을 통해) 간접적으로 부착될 수 있는 표지의 검출을 통해 분석물을 측정하는 기법도 포함한다. 적합한 표지는 직접적으로 가시화될 수 있는 표지(예를 들면, 시각적으로 관찰될 수 있는 입자, 및 측정가능한 신호, 예컨대, 광 산란, 흡광도, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 방사능, 자기장 등을 생성하는 표지)를 포함한다. 사용될 수 있는 표지는 측정가능한 신호, 예컨대, 광 산란, 흡광도, 형광 등을 유발하는 화학적 활성을 갖는 효소 또는 다른 화학적 반응성 종도 포함한다. 표지로서의 효소의 사용은 ELISA, 효소 면역분석 또는 EIA로서도 지칭되는 효소-연결된 면역흡착 분석에서 잘 확립되어 있다. ELISA 포맷에서, 비공지된 양의 항원이 표면에 부착된 후, 특이적 항체가 항원에 결합할 수 있도록 상기 표면 상에서 세척된다. 이 항체는 효소에 연결되고, 효소에 의해 검출가능한 신호의 변화를 제공하는 생성물로 전환되는 물질이 최종 단계에서 첨가된다. 생성물의 형성은 기질에 비해 측정가능한 성질, 예컨대, 흡광도, 형광, 화학발광, 광 산란 등의 차이로 인해 검출될 수 있다. 본 발명에 따른 고체상 결합 방법과 함께 이용될 수 있는 일부(그러나, 전부가 아님) 측정 방법들은 비결합된 성분(예를 들면, 표지)을 고체상으로부터 제거하기 위한 세척 단계로부터 이익을 얻을 수 있거나 이러한 세척 단계를 요구할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 이러한 세척 단계를 포함할 수 있다.

[0234] 한 쌍의 검출가능한 표지들을 사용하는 실시양태에서, 표지된 물질들은 독립적으로 검출될 수 있는 그들의 능력, 및/또는 한 쌍의 표지들이 서로 인접할 때, 즉 검출 복합체에서 관심있는 분석물에 직접적으로 또는 간접적으로 각각 결합되어 있을 때 함께 작용하여 검출가능한 신호를 생성하는 상기 물질들의 능력에 기초하여 선택된다. 한 실시양태에서, 제1 검출가능한 표지는 커플링된 효소 반응 시스템의 제1 효소이고, 제2 검출가능한 표지는 커플링된 효소 반응 시스템의 제2 효소이고, 상기 방법은 상기 반응 시스템의 하나 이상의 기질을 첨가하여 상기 효소 반응 시스템의 검출가능한 생성물을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 검출가능한 생성물을 포함하는 반응기는 이 생성물을 포함하지 않는 반응기로부터 구별될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 제1 효소와 제2 효소가 가까이 인접할 때, 예를 들면, 200 nm 미만, 이상적으로 50 nm 미만 이내에 존재할 때에만 검출가능한 생성물이 생성된다. 한 실시양태에서, 제1 효소는 옥시다제, 예를 들면, 글루코스 옥시다제이고, 제2 효소는 퍼옥시다제이고, 기질은 옥시다제 기질, 예를 들면, 글루코스, 및 표지된 티라마이드(tyramide), 앰플렉스 레드 (10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), 또는 루미놀 유도체(본원에서 표지된 반응성 유도체로서 총칭되고, 바람직한 실시양태에서 표지된 반응성 유도체는 앰플렉스 레드 또는 루미놀을 포함함)를 포함한다. 이 실시양태에서, 제1 효소는 기질과 반응하여 생성물을 생성하고, 이 생성물은 제2 효소와 반응하여 제2 생성물을 생성하고, 이 제2 생성물은 표지된 반응성 유도체와 반응하여 검출가능한 종을 생성한다. 바람직하게는, 검출 복합체에서 제1 효소 및 제2 효소에 의해 촉매작용된 반응은 표면 상에 존재하는 분석물 분자의 수를 측정하기 위해 측정될 수 있는 표지된 반응성 유도체를 표면 상에 고정화시킨다. 한 실시양태에서, 표지된 반응성 유도체는 바이오틴-티라마이드이고, 상기 방법은 표지된 스트렙타비딘을 첨가하는 단계 및 스트렙타비딘 상의 표지를 측정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0235] 상기 방법에서 사용될 수 있는 또 다른 인접성 의존적 표지 시스템은 FRET 쌍이고, 예를 들면, 제1 검출가능한 표지는 FRET 공여자이고 검출가능한 표지는 FRET 수용자이다. 형광 공명 에너지 전달(FRET)은 2개의 염료 분자들의 전자 여기된 상태들 사이의 거리 의존적 상호작용이고, 이때 여기는 광자의 방사 없이 공여자 분자로부터 수용자 분자로 전달된다. FRET의 효율은 이것을 생물학적 거대분자의 치수에 필적할만한 거리에 걸쳐 유용하게 만드는 분자간 분리의 역 6승에 의존한다. 이 표지 시스템에서, 인접성 의존적 신호는 FRET 공여자를 여기시키고 FRET 수용자로부터의 방사를 측정함으로써 측정된다. 공여자 분자 및 수용자 분자는 바람직하게는 가까이 인접하여, 예를 들면, 약 10 내지 100 옹스트롬 이내에 존재하고, 수용자의 흡수 분광은 바람직하게는 공여자의 형광 방사 분광과 중첩되고, 공여자 및 수용자 전이 쌍극자 배향은 대략 평행해야 한다. FRET 쌍의 비한정적 목록은 하기 표 1에 제공되어 있다.

표 1

FRET 쌍의 예

공여자	수용자
플루오레세인	테트라메틸로다민
IAEDANS	플루오레세인
EDANS	덱실(Dabcyl)
플루오레세인	플루오레세인
BODIPY FL	BODIPY FL
플루오레세인	QSY 7 및 QSY 9 염료

[0236]

[0237]

광학 현미경관찰, 예를 들면, 수용자 광퇴색, 공여자 광퇴색, 비 영상화, 감작된 방사 및 형광 수명 측정을 위한 다양한 FRET 검출 방법이 존재한다.

[0238]

한 쌍의 검출 표지들을 사용하는 실시양태에서 사용될 수 있는 또 다른 적합한 표지 시스템은 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지가 독립적으로 측정될 수 있는 시스템이다. 예를 들면, 제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지는 분광성 면에서 서로 상이한 발광 표지일 수 있다. 대안적으로, 제1 검출가능한 표지는 제1 기질과 반응하여 제1 신호를 생성하는 제1 효소이고, 제2 검출가능한 표지는 제2 기질과 반응하여 상이한 제2 신호를 생성하는 제2 효소이고, 상기 방법은 제1 효소 기질 및 제2 효소 기질을 첨가하는 단계 및 제1 신호 및 제2 신호가 생성되는 반응기의 수를 카운팅하는 단계를 추가로 포함한다. 제1 신호 및 제2 신호는 흡광도의 변화, 및/또는 상이한 분광성을 갖는 발광 신호일 수 있다.

[0239]

제1 검출가능한 표지 및 제2 검출가능한 표지가 제1 효소 및 제2 효소를 포함하는 경우, 이들은 각각 가수분해 효소, 예를 들면, 포스파타제, 설파타제, 갈락토시다제, 글루쿠로나이드 또는 이들의 조합일 수 있으므로, 제1 기질 및 제2 기질은 포스페이트, 설파이트, 갈락토사이드 및 글루쿠로나이드 변형 안정화 디옥세탄, 4-메틸움벨 리페릴, 플루오레세인 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 대안적으로, 제1 효소 및 제2 효소는 호스라디쉬 퍼록시다제, 베타-갈락토시다제 및 알칼리성 포스파타제로부터 선택된다.

[0240]

대안적으로, 분석물 분자를 검출하는 데에 사용되는 표지는 단일 분자 형광 검출, 예를 들면, 형광 상관관계 분광법 및/또는 형광 교차-상관관계 분광법에서 사용될 수 있는 형광 종일 수 있다. 단일 분자 형광 검출은 모세관을 통해 검출가능한 중을 포함하는 용출물을 유동시키는 단계, 광원을 모세관 내의 부피에 집중시켜 호출 대역을 생성하는 단계, 및 상기 호출 대역을 광 검출기로 관찰하여 상기 호출 대역을 통한 형광 분자의 통과를 검출하는 단계를 포함한다.

[0241]

한 실시양태에서, 샘플 중의 관심있는 분석물(들)은 전기화학발광-기초 분석 포맷, 예를 들면, 전기화학발광(ECL)-기초 면역분석을 이용함으로써 측정될 수 있다. ECL의 높은 민감성, 넓은 동력학적 범위 및 선택성은 의학 진단에 중요한 인자이다. 상업적으로 입수가능한 ECL 기계들은 뛰어난 성능을 입증하였고 그들의 현저한 민감성, 동력학적 범위, 정밀성 및 복잡한 샘플 매트릭스의 허용성을 비롯한 이유로 널리 사용되게 되었다. ECL을 방사하도록 유도될 수 있는 종(ECL 활성 종), 예를 들면, i) 금속이 예를 들면, VIII 족의 귀금속인 유기금속성 화합물(Ru 함유 및 Os 함유 유기금속성 화합물, 예컨대, 트리스-비피리딜-루테늄(RuBpy) 모이어티를 포함함), 및 ii) 루미놀 및 관련 화합물이 ECL 표지로서 사용되고 있다. ECL 표지와 함께 ECL 과정에 참여하는 종은 본원에서 ECL 공반응물로서 지칭된다. 통상적으로 사용되는 공반응물은 삼차 아민(예를 들면, 미국 특허 제 5,846,485호 참조), 옥살레이트, 및 RuBpy로부터의 ECL을 위한 퍼셀레이트 및 루미놀로부터의 ECL을 위한 과산화수소(예를 들면, 미국 특허 제 5,240,863호 참조)를 포함한다. ECL 표지에 의해 발생된 광은 진단 절차에서 레포터 신호로서 사용될 수 있다(본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제 5,238,808호(Bard et al.)). 예를 들면, ECL 표지는 결합 물질, 예컨대, 항체, 핵산 프로브, 수용체 또는 리간드에 공유적으로 커플링될 수 있고; 결합 상호작용에의 결합 시약의 참여는 ECL 표지로부터 방사된 ECL을 측정함으로써 모니터링될 수 있다. 대안적으로, ECL 활성 화합물로부터의 ECL 신호는 화학적 환경을 표시할 수 있다(예를 들면, ECL 공반응물의 형성 또는 파괴를 모니터링하는 ECL 분석을 기술하는 미국 특허 제 5,641,623호 참조). ECL, ECL 표지, ECL 분석 및 ECL 분석을 수행하기 위한 기계에 대한 보다 많은 배경지식에 대해서는 미국 특허 제 5,093,268호, 제 5,147,806호, 제

5,324,457호, 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 공개된 PCT 특허출원 공보 제W099/63347호, 제W000/03233호, 제W099/58962호, 제W099/32662호, 제W099/14599호, 제W098/12539호, 제W097/36931호 및 제W098/57154호(이들 모두 본원에 참고로 도입됨)를 참조한다.

[0242] 본 발명의 방법은 단일 또는 다중 포맷에 적용될 수 있고, 이때 단일 샘플에 대한 다수의 분석 측정이 수행될 수 있다. 본 발명과 함께 이용될 수 있는 다중 측정은 i) 다수의 센서의 사용을 수반하거나; ii) 표면 상의 위치에 기초하여 구별될 수 있는 개별 분석 도메인들을 표면(예를 들면, 어레이) 상에서 사용하거나; iii) 입자 성질, 예컨대, 크기, 형태, 색채 등에 기초하여 구별될 수 있는, 입자 상에 코팅된 시약의 사용을 수반하거나; iv) 광학 성질(예를 들면, 흡광도 또는 방사 분광)에 기초하여 구별될 수 있는 분석 신호를 생성하거나; v) 분석 신호의 일시적 성질(예를 들면, 신호의 시간, 빈도 또는 상)에 기초하는 다중 측정을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0243] 일부 실시양태에서, 샘플 중의 분석물 분자의 농도의 측정치는 적어도 부분적으로 측정된 파라미터와 보정 표준물의 비교에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 샘플 중의 분석물 분자의 농도의 측정치를 결정하기 위해 분석물 분자를 포함하는 결합 표면의 분율을 보정 곡선과 비교할 수 있다. 보정 곡선은 시험 샘플을 분석하는 데에 사용된 조건 하에서 공지된 농도의 복수의 표준화된 샘플들을 사용하여 분석을 완결함으로써 생성될 수 있다. 각각의 표준화된 샘플에 대한 분석물 분자의 검출/정량과 관련된 신호를 판독할 수 있으므로, 분석물 분자의 검출을 분석물 분자의 공지된 농도와 관련시키는 보정 곡선이 형성될 수 있다. 그 다음, 비공지된 농도의 분석물 분자를 포함하는 샘플에 대해 분석을 완결할 수 있고, 이 분석으로부터의 분석물 분자의 검출이 보정 곡선 상에서 작도될 수 있으므로, 샘플 중의 분석물 분자의 농도의 측정치가 결정될 수 있다.

[0244] 광학 신호(예컨대, 형광, 화학발광 또는 전기화학발광)를 측정하기 위해 영상화 기법을 이용하는 특정 경우, 결합 사건은 밝은 광원점으로서 검출될 수 있다. 광원점의 표면 밀도가 낮은 경우(예를 들면, RxR 영역에서 광원점을 찾을 확률(이때, R은 검출 시스템의 공간적 해상도임)이 10% 미만인 경우), 임의의 관찰된 광원점은 단일 결합 사건으로 인한 것일 가능성이 있다. 이 조건들 하에서, 카운팅 사건은 가장 민감한 측정을 제공할 수 있다. 표면 밀도가 증가함에 따라 개별 결합 사건을 해상하고 카운팅하기가 점점 어려워진다. 이 조건들 하에서, 결합 표면에 걸쳐 광학 신호를 적분하는 것은 보다 정확한 측정을 제공한다.

[0245] 본원에 기재된 방법이 당업자에게 공지된 다수의 면역분석 플랫폼에 적용될 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다. 면역분석 플랫폼의 다양한 특징들은 구체적인 플랫폼에 잘 맞도록 조절될 수 있으나, 이러한 조절은 당업자의 기술 내에 있다. 예를 들면, 본원에 기재된 방법은 암호화된 입자를 사용하는 비드-기초 포맷에 적용될 수 있다. 이러한 시스템에서, 사용되는 비드는 자기 비드 또는 비-자기 비드일 수 있고, 비드의 표면은 포획 시약의 하나 이상의 카피를 포함하도록 변형된다. 이 시스템에서 사용되는 검출 시약은 한 쌍의 검출 시약들이다. 한 실시양태에서, 2개의 검출 시약들은 구별가능한 형광 표지를 포함한다. 대안적으로, 2개의 검출 시약들은 본원에 기재된 바와 같이 핵산 프로브에 의해 변형되고, 이 경우 면역분석 방법은 검출될 수 있는 각각의 검출 시약의 존재를 표시하는 증폭된 생성물을 생성하기 위해 연장 과정, 예를 들면, RCA-PLA를 포함한다. 검출 시약이 2개의 구별가능한 형광 표지를 포함하는 경우, 측정 단계는 비드를 유동 셀 내로 도입하는 단계, 및 비드가 자기 비드인 경우 비드를 유동 셀에서 포획하는 단계를 포함한다. 검출 시약이 핵산 프로브에 의해 변형되는 경우, 측정 단계는 비드 상에서 샌드위치 복합체를 형성하는 단계, RCA-PLA를 수행하는 단계 및 애플리콘을 형광 표지된 검출 프로브로 표지하는 단계를 포함한다. 그 다음, 표지된 비드는 유동 셀 내로 도입되고, 비드가 자기 비드인 경우 비드는 유동 셀에서 포획된다. 각각의 실시양태에서, 분석은 형광 표지된 암호화된 비드의 확인에 기초하여 분광적으로 다중화될 수 있다. 각각의 실시양태에서 여기 광원 및 다중-색채 검출을 위한 방사광 검출기를 사용하여 결합 사건을 검출할 수 있고, 정량은 검출가능한 표지들 둘 다를 갖는 비드, 또는 검출가능하게 표지된 연장 생성물을 포함하는 비드를 카운팅함으로써 달성되고, 또한 정량은 적분된 강도에 의해 달성되고, 예를 들면, 검출은 모든 결합 사건들에 대한 신호를 적분함으로써 달성된다. 따라서, 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 하기 성분들 중 하나 이상을 포함하는 키트가 전술된 방법과 함께 사용되기 위해 제공될 수 있다: (a) 포획 시약을 갖는 자기 또는 비-자기 비드; (b) 구별가능한 형광 표지를 갖는 2개의 검출 시약들; 및 (c) 분석 프로토콜을 위한 임의적 완충제 및/또는 희석제. 전술된 방법과 함께 사용될 수 있는 또 다른 키트는 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 상에 하기 성분들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (a) 포획 시약을 갖는 자기 또는 비-자기 비드; (b) 핵산 프로브에 의해 변형된 2개의 검출 시약들(임의적으로, 검출 시약은 별도로 제공되고, 인접 프로브(1 및 2)는 검출 시약을 프로브로 변경시키기 위한 설명서와 함께 추가로 제

공됨); 및 (c) 형광 표지된 프로브; 인접 프로브를 사용한 검출 시약의 변형을 위해 요구되는 임의적 시약; 분석 회석제, 보정제, 환형화 올리고뉴클레오타이드, 결합 혼합물 또는 이들의 성분, 예를 들면, 결합 완충제, ATP, BSA, 트윈 20, T4 DNA 리가제; RCA 혼합물 또는 이의 성분, 예를 들면, BSA, 완충제, dNTP, 트윈 20, Phi29 DNA 중합효소.

[0246] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 유동 셀에 의해 분석되고 비드에 기초하는 포맷에 적용될 수 있다. 이러한 시스템에서, 사용되는 비드는 자기 비드일 수 있고, 비드의 표면은 포획 시약의 하나 이상의 카피를 포함하도록 변형된다. 이 시스템에서 사용되는 검출 시약은 본원에 기재된 바와 같이 핵산 프로브에 의해 변경된 한 쌍의 검출 시약들이고, 이 경우 면역분석 방법은 검출될 수 있는 각각의 검출 시약의 존재를 표시하는 증폭된 생성물을 생성하기 위해 연장 과정, 예를 들면, RCA-PLA를 포함한다. 측정 단계는 비드 상에서 샌드위치 복합체를 형성하는 단계, RCA-PLA를 수행하는 단계 및 앰플리콘을 ECL-표지된 검출 프로브로 표지하는 단계를 포함한다. 그 다음, 표지된 비드는 유동 셀 내로 도입되고, 비드는 유동 셀에서 포획된다. 구체적으로, 자기 입자, 예를 들면, 비드를, 다양한 금속, 예를 들면, 백금을 포함할 수 있는 전극 표면으로 유인하기 위해 자기장이 적용된다. 전압 공급원을 이용하여 전압을 전극에 인가하고, 방사 광 검출기를 이용하여 결합 사건을 검출할 수 있고; 정량은 검출가능하게 표지된 연장 생성물을 갖는 비드를 카운팅함으로써 달성되고, 또한 정량은 적분된 강도에 의해 달성되고, 예를 들면, 검출은 모든 결합 사건들에 대한 신호를 적분함으로써 달성된다. 전술된 방법과 함께 사용될 수 있는 키트는 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 상에 하기 성분들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (a) 포획 시약을 갖는 자기 비드; (b) 핵산 프로브에 의해 변경된 2개의 검출 시약들(임의적으로, 검출 시약은 별도로 제공되고, 인접 프로브(1 및 2)는 검출 시약을 프로브로 변경시키기 위한 설명서와 함께 추가로 제공됨); 및 (c) ECL 표지된 프로브; 인접 프로브를 사용한 검출 시약의 변형을 위해 요구되는 임의적 시약; 분석 회석제, 보정제, 환형화 올리고뉴클레오타이드, 결합 혼합물 또는 이들의 성분, 예를 들면, 결합 완충제, ATP, BSA, 트윈 20, T4 DNA 리가제; RCA 혼합물 또는 이의 성분, 예를 들면, BSA, 완충제, dNTP, 트윈 20, Phi29 DNA 중합효소.

[0247] 유동 셀에 의해 분석되고 비드에 기초하는 포맷의 구체적인 실시양태에서, 샘플을 바이오티닐화된 단일클론 분석물 특이적 포획 항체, 및 올리고뉴클레오타이드에 각각 결합된 단일클론 분석물 특이적 항체들의 혼합물과 함께 항온처리하여 반응시킴으로써 샌드위치 복합체를 형성한다. 스트렙타비딘-코팅된 미세입자의 첨가 후, 상기 복합체는 바이오틴과 스트렙타비딘 사이의 상호작용을 통해 고체상에 결합되게 된다. 상기 혼합물에 결합 혼합물을 첨가하고, 상기 혼합물을 결합 혼합물과 함께 항온처리하고 세척하여 과량의 환형화 올리고뉴클레오타이드를 제거하고 RCA 혼합물과 함께 항온처리한다. 혼합물을 세척하고 바이오틴-표지된 검출 프로브들의 혼합물을 첨가한다. 적합한 표지, 예를 들면, 발광, 화학발광 또는 전기화학발광 표지, 예를 들면, 설포-TAG를 도입하기 위해, 말단 바이오틴 표지를 갖는 검출 프로브를 합성하고 설포-TAG-표지된 스트렙타비딘에 미리 결합시킨다. 미세입자가 자기장에 의해 전극, 예를 들면, 금속 전극, 예컨대, 백금 전극의 표면 상에 포획되어 있는 측정 셀 내로 반응 혼합물을 흡입한다. 그 다음, 비결합된 물질을 적합한 세척 완충제, 예를 들면, 프로셀(ProCell)(TPA 함유 완충제)로 제거한다. 그 다음, 전압을 전극에 인가하여 광전증배관에 의해 측정되는 화학발광 방사를 유도한다. 전압의 인가 및 발생된 방사의 측정은 임의의 적합한 유동 셀, 예를 들면, (호프만-라 로슈 리미티드 (Hoffmann-La Roche LTD.)로부터 입수가 가능한) 코바스(Cobas) 및/또는 일렉시스(Elecsys) 기계에서 수행될 수 있다.

[0248] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 개별 분자를 디지털 카운팅하기 위해 모세관 유동을 이용하는 비드-기초 포맷에 적용될 수 있다. 이러한 시스템에서, 사용되는 비드는 자기 비드일 수 있고, 비드의 표면은 포획 시약의 하나 이상의 카피를 포함하도록 변형된다. 이 시스템에서 사용되는 검출 시약은 구별가능한 형광 표지를 포함하는 한 쌍의 검출 시약들이다. 측정 단계는 포획 시약, 분석물 및 검출 시약을 포함하는 샌드위치 복합체를 형성하는 단계, 검출 시약을 가교연결하는 단계, 검출 시약을 용출하는 단계 및 비드를 유동 셀 내로 도입하는 단계를 포함한다. 여기 광원 및 다중-색채 검출을 위한 방사 광 검출기를 이용하여 결합 사건을 검출할 수 있고, 정량은 유동 셀에서 2개의 형광단의 검출을 상호관련시킴으로써 달성되고, 또한 정량은 적분된 강도에 의해 달성되고, 예를 들면, 검출은 모든 결합 사건들에 대한 신호를 적분함으로써 달성된다. 전술된 방법과 함께 사용될 수 있는 키트는 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 상에 하기 성분들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (a) 포획 시약을 갖는 자기 비드; (b) 구별가능한 형광 표지를 갖는 2개의 가교연결가능한 검출 시약들; 및 (c) 분석 프로토콜을 위한 임의적 완충제 및/또는 회석제.

[0249] 나아가, 본원에 기재된 방법은 비드를 개별 나노-웰 내로 분리하는 단계를 포함하는 비드-기초 포맷에 적용될 수 있다. 이러한 시스템에서, 사용되는 비드는 자기 비드일 수 있고, 비드의 표면은 포획 시약의 하나 이상의

카피를 포함하도록 변형된다. 이 시스템에서 사용되는 검출 시약은 구별가능한 효소 표지를 포함하는 한 쌍의 검출 시약들이다. 측정 단계는 포획 시약, 분석물 및 검출 시약을 포함하는 샌드위치 복합체를 형성하는 단계 및 2개의 효소 표지를 위한 기질을 첨가하는 단계를 포함한다. 그 다음, 비드는 개별 나노-웰에서 포획된다. 분석은 상이한 분광성을 갖는 효소 생성물의 확인에 기초하여 분광적으로 다중화될 수 있다. 여기 광원 및 다중-색채 검출을 위한 방사 광 검출기를 이용하여 결합 사건을 검출할 수 있고, 정량은 효소 생성물들 둘 다를 함유하는 나노-웰을 카운팅함으로써 달성되고, 또한 정량은 적분된 강도에 의해 달성되고, 예를 들면, 검출은 모든 나노-웰들에 대한 신호를 적분함으로써 달성된다. 전술된 방법과 함께 사용될 수 있는 키트는 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 상에 하기 성분들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (a) 포획 시약을 갖는 자기 비드; (b) 구별가능한 효소 표지에 의해 각각 변경된 2개의 검출 시약들, 예를 들면, 바이오티닐화된 검출 시약 및 헵텐-접합된 검출 시약; (c) 스트렙타비딘-베타 갈락토시다제, 항-헵텐-접합된 효소, 레소루핀(resorufin)-베타-d-갈락토피라노사이드; (d) 어레이, 예를 들면, 퀀터릭스(Quanterix) DVD 포맷 어레이; (e) 불화탄소 오일; 및 (f) 분석 프로토콜을 위한 임의적 완충제 및/또는 희석제. 이 구체적인 실시양태에서, 검출가능한 신호는 나노-웰 고민감성 시스템을 인접성-기초 검출 시스템과 병용함으로써 향상된다. 이 구체적인 실시양태는 특정 인접성-기초 검출 시스템을 이용함으로써 예시되어 있지만, 당업자는 본원에 기재된 다른 인접성-기초 검출 시스템, 예를 들면, FRET 공여자/수용자 시스템; 분광성 면에서 서로 상이한 발광 표지들; 또는 전술된 바와 같이 가수분해효소인 제1 효소 및 제2 효소, 및 수반되는 적절한 기질의 사용도 분석에서 검출가능한 신호를 향상시키는 데에 사용될 수 있다는 사실을 인식할 것이다.

[0250] 추가로, 본원에 기재된 방법은 비드-어레이-기초 플랫폼에 적용될 수 있다. 이러한 시스템에서 사용되는 비드는 비-자기 비드일 수 있고, 비드의 표면은 포획 시약의 하나 이상의 카피를 포함하도록 변형된다. 이 시스템에서 사용되는 검출 시약은 제1 핵산 프로브 및 제2 핵산 프로브를 포함하는 한 쌍의 검출 시약들이다. 측정 단계는 포획 시약, 분석물 및 검출 시약을 포함하는 샌드위치 복합체를 형성하는 단계, 상기 프로브들 중 하나를 연장하여, 연장된 서열을 형성하는 단계로서, 이때 연장이 샌드위치 복합체에서 제1 프로브 및 제2 프로브의 공존에 의존하는 것인 단계, 연장된 서열을 형광 프로브로 표지하는 단계, 및 연장된 서열을 표면으로부터 용출물 내로 유리시키는 단계를 포함한다. 여기 광원 및 다중-색채 검출을 위한 방사 광 검출기를 이용하여 결합 사건을 검출할 수 있고, 정량은 검출가능하게 표지된 개별 연장 생성물을 카운팅함으로써 달성되고, 또한 정량은 적분된 강도에 의해 달성되고, 예를 들면, 검출은 모든 결합 사건들에 대한 신호를 적분함으로써 달성된다. 전술된 방법과 함께 사용될 수 있는 키트는 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 상에 하기 성분들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (a) 포획 시약을 갖는 비-자기 비드; (b) 핵산 프로브에 의해 변경된 2개의 검출 시약들(임의적으로, 검출 시약은 별도로 제공되고, 인접 프로브(1 및 2)는 검출 시약을 프로브로 변경시키기 위한 설명서와 함께 추가로 제공됨); 및 (c) 형광 표지된 프로브; 인접 프로브를 사용한 검출 시약의 변형을 위해 요구되는 임의적 시약; 분석 희석제, 보정제, 환형화 올리고뉴클레오티드, 결합 혼합물 또는 이들의 성분, 예를 들면, 결합 완충제, ATP, BSA, 트윈 20, T4 DNA 리가제; RCA 혼합물 또는 이의 성분, 예를 들면, BSA, 완충제, dNTP, 트윈 20, Phi29 DNA 중합효소.

[0251] 본원에 기재된 개선된 결합 분석은 분석에서 사용된 성분들 세트를 포함하는 하나 이상의 키트를 사용함으로써 수행될 수 있다. 예를 들면, 샘플 중의 분석물을 검출하는 데에 사용되는 키트는 고정 시약과 분석물에 대한 포획 시약을 포함하는 표면; 및 핵산 프로브에 연결된, 분석물에 대한 검출 시약을 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 포함한다. 이러한 키트는 고정 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 고정 시약을 포함할 수 있다.

[0252] 본원에 기재된 방법을 수행하기 위해 사용될 수 있는 또 다른 키트는 고정 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 고정 시약과 분석물에 대한 포획 시약을 포함하는 표면; 제1 핵산 프로브에 연결된 제1 검출 시약; 및 제2 핵산 프로브에 연결된 제2 검출 시약을 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 포함한다.

[0253] 본원에 기재된 결합 분석을 수행하기 위해 사용될 수 있는 또 다른 키트는 고정 시약과 분석물에 대한 포획 시약을 포함하는 표면; 제1 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약; 제2 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약; 및 (i) 제2 인접 프로브에 상보적인 내부 서열 및 (i) 제1 인접 프로브의 비중첩 영역에 상보적인 2개의 말단 서열을 포함하는 커넥터 서열을 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 포함한다. 대안적으로, 키트는 고정 시약과 분석물에 대한 포획 시약을 포함하는 표면; 제1 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제1 검출 시약; 제2 인접 프로브를 포함하는, 분석물에 대한 제2 검출 시약; 및 (i) 제1 커넥터 올리고뉴클레오티드 및 (ii) 제2 커넥터 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 이때 (x) 제1 커넥터의 제1 말단 및 제2 커넥터의 제1 말단은 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적이고, (y) 제1 커넥터의 제2 말단 및 제2 커넥터의 제2 말단은 제1 인접 프로브의 2개의 비중첩 영역들에 상보적이다. 추가로,

이 키트들 중 어느 하나 또는 둘 다에서 고정 시약은 고정 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0254] 뿐만 아니라, 본원에 기재된 방법은 제1 검출가능한 표지를 포함하는 제1 검출 시약; 제2 검출가능한 표지를 포함하는 제2 검출 시약; 하나 이하의 분석물 분자를 함유하도록 구성된 복수의 반응기들; 및 임의적으로, 포획 시약을 포함하는 표면을 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 포함하는 키트를 사용함으로써 수행될 수 있다.

[0255] 마지막으로, 본원에 기재된 방법을 이용하여 분석물을 검출하기 위한 키트는 고정화된 포획 시약을 포함하는 표면; 제1 검출가능한 표지를 갖는 제1 검출 시약; 제2 검출가능한 표지를 갖는 제2 검출 시약; 및 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약과 반응하는 교차커넥터를 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 포함할 수 있다. 교차커넥터는 검출 시약에 부착된 반응성 모이어티를 연결하는 다작용성 교차커넥터, 또는 검출 시약에 부착된 결합 모이어티의 다가 결합 파트너를 포함할 수 있다. 적합한 다작용성 교차커넥터는 아민, 티올, 하이드라지드, 알데하이드, 에스테르, 요오도아세트아미드, 말레이미드, 클릭 화학 시약 및 이들의 조합을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 마찬가지로, 다가 결합 파트너의 한 예는 그 동물 종의 항체인 검출 시약을 표적화하는 다가 항-종 항체이다. 교차커넥터는 동반 결합 파트너와 쌍을 형성할 때 검출 시약에 부착되는 스트렙타비딘, 아비딘 또는 바이오틴도 포함할 수 있다. 교차커넥터는 키트의 성분에 직접적으로 또는 간접적으로 결합된 핵산 프로브에 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드일 수도 있다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에서 사용되는 키트는 고정화된 포획 시약을 포함하는 표면; 제1 검출가능한 표지 및 제1 핵산 프로브를 갖는 제1 검출 시약; 제2 검출가능한 표지 및 제2 핵산 프로브를 갖는 제2 검출 시약; 및 제1 핵산 프로브 및 제2 핵산 프로브에 상보적인 영역을 갖는 제3 핵산을 하나 이상의 바이알, 용기 또는 구획 내에 포함한다.

[0256] 본원에 기재된 키트의 표면은 하나 이상의 분석물 분자에 대한 복수의 포획 시약들을 포함할 수 있고, 이때 상기 포획 시약은 표면 상에, 예를 들면, 어레이, 멀티-웰 플레이트, 또는 마이크로-웰 또는 나노-웰 플레이트 내에 위치한 복수의 해상가능한 결합 영역들 또는 반응기들에 걸쳐 분포되어 있다. 추가로, 표면은 분석물 분자에 대한 복수의 포획 시약들을 각각 포함하는 복수의 입자들도 포함할 수 있다.

[0257] 전술된 키트는 하기 성분들 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: 하나 이상의 추가 시약, 완충제, 중합효소, 리가제 및/또는 (표지된 또는 비표지된) dNTP. 추가로, 하나 이상의 검출 시약이 검출가능한 표지를 포함하는 경우, 키트는 키트에서 사용된 검출가능한 표지에 대한 공반응물도 포함할 수 있다. 대안적으로, 하나 이상의 검출 시약이 커플링된 효소 반응 시스템의 성분인 경우, 각각의 검출 시약은 제1 효소 및 제2 효소를 포함하고, 키트는 커플링된 효소 반응 시스템을 위한 하나 이상의 기질, 및 임의적으로 커플링된 효소 반응 시스템의 생성물에 결합하도록 구성된 표지된 성분을 하나 이상의 용기, 바이알 또는 구획 내에 추가로 포함한다. 예를 들면, 제1 효소는 옥시다제일 수 있고, 제2 효소는 퍼옥시다제일 수 있고, 키트는 옥시다제 기질 및 표지된 티라마이드 유도체를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제1 검출 시약 및 제2 검출 시약은 인접성 의존적 검출 시스템의 성분, 예를 들면, FRET 공여자 및 FRET 수용자, 또는 분광성 면에서 서로 상이한 발광 표지들을 포함할 수 있다.

[0258] 추가 대안적 실시양태

[0259] 추가 실시양태는 도 7에 예시되어 있다. 패널 (a)의 샌드위치 면역분석 복합체에서 각각의 인접 프로브의 일부가 각각의 절편에 혼성화된 짧은 RNA 가닥에 의해 일시적으로 보호된다. 각각의 인접 프로브가 서로 혼성화될 수 있도록 RNA 가닥이 효소에 의해 제거되고,쇄가 바이오티닐화된 dNTP들을 사용한 중합효소 연장에 의해 연장된다(패널 (b)).쇄 내로 도입된 각각의 바이오티닐화된 염기는 검출가능한 표지로 표지된 스트렙타비딘에 결합된다(패널 (c)).

[0260] 또 다른 방법은 도 8에 예시되어 있다. (패널 (a)에 나타난 바와 같이) 인접 프로브가 고정 시약 및 검출 시약에 부착될 수 있거나, 전술된 바와 같이 각각의 인접 프로브가 2개의 검출 시약에 부착될 수 있다(표시되어 있지 않음). 도 7에 예시된 방법처럼, 각각의 인접 프로브의 일부가 각각의 절편에 혼성화된 짧은 RNA 가닥에 의해 일시적으로 보호된다. 각각의 인접 프로브가 서로 혼성화될 수 있도록 RNA 가닥이 효소에 의해 제거되고,쇄가 바이오티닐화된 dNTP들을 사용한 중합효소 연장에 의해 연장된다(패널 (b)).쇄 내로 도입된 각각의 바이오티닐화된 염기는 검출가능한 표지로 표지된 스트렙타비딘에 결합된다(패널 (c)).

[0261] 추가 실시양태는 도 18에 나타나 있다. 이 실시양태에서, 복수의 짧은 올리고뉴클레오티드는 스테이플 서열 (1801)로서 사용되어 앰플리콘의 일부에 혼성화됨으로써 생성물을 용이하게 영상화되는 소형의 구조로 폴딩하였다. 각 스테이플 서열은 각각 앰플리콘의 서열에 상보적인 2 이상의 서열(각각 1802 및 1803)을 포함하고, 각

스테이플 서열이 이의 상보체에 혼성화되는 경우, 앰플리콘은 도 18에 나타난 바와 같이 그 자체 상으로 재폴딩된다. 추가로, 앰플리콘은 상기 본원에 기재된 바와 같이 고정 시약(1804)과의 고정 상호작용을 통해 표면에 부착될 수도 있다. 스테이플링 과정은 증폭 단계 중에 반응 혼합물에 스테이플 서열을 첨가함으로써 계 내에서 수행될 수 있다. 따라서, 각 증폭 사이클이 완료되면, 스테이플 서열은 새롭게 형성된 앰플리콘에 자유롭게 혼성화될 수 있으며 이것이 폴딩되게 한다. 스테이플은 또한 증폭 과정이 완료된 후 첨가될 수 있으며, 스테이플 서열 및 이의 상응하는 상보체의 설계에 따라 선형 앰플리콘이 코일 또는 평판(flat sheet)으로 폴딩되게 한다. 표지 분자, 예를 들면, ECL 또는 형광 분자는 스테이플 서열 내로 도입될 수 있다(또는 이는 전술한 바와 같이 앰플리콘 내에 도입될 수 있다). 본 실시양태는 표면 상에 3차원 구조를 생성할 수 있으며, 표면 상의 앰플리콘의 보다 용이한 영상화를 가능하게 하는 보다 높은 신호 밀도의 보다 작은 특징을 생성한다.

[0262] 실시예

[0263] 실시예 1. 인접 결합 및 롤링 서클 증폭을 위한 일반적인 프로토콜

[0264] 인접 프로브 1 및 2를 100 μ l 완충제 중의 200 μ g 제1 검출 항체에 첨가하여 표적 분석물에 대한 한 쌍의 검출 항체들을 변경시키고, 1.74 μ l의 23 mM 설포-SMCC를 첨가하고 150 mM 포스페이트 완충제에서 희석하고 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 유리 설포-SMCC를 크기 배제 크로마토그래피로 제거하였다. 검출 항체의 최종 농도는 2 mg/ml이거나 이보다 약간 더 낮았다. 구십오(95) μ l의 300 μ M 티올-변형된 올리고뉴클레오타이드(인접 프로브 1 및 2)를 실온에서 1시간 동안 5 μ l의 100 mM 포스페이트 완충제 중의 1 mM DTT(0.5 mM EDTA, pH 8.4)로 환원시켰다. 인접 프로브 1 및 2의 서열은 다음과 같다:

[0265] 티올-변형된 인접 프로브 1: SH-AAA AAA AAA AGA CGC TAA TAG TTA AGA CGC TTU UU(서열번호 1; 이때, 3개의 U 잔기들은 2' O-메틸 RNA임)

[0266] 티올-변형된 인접 프로브 2: SH-AAA AAA AAA ATA TGA CAG AAC TAG ACA CTC TT(서열번호 2).

[0267] 예를 들면, 3개의 스핀 컬럼을 따로 사용하여 과량의 설포-SMCC 및 DTT를 제거하고 공유접합을 위해 항체 및 DNA를 모았다. 용액을 혼합하면서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 항체-인접 프로브 접합체를 예를 들면, 크기 배제 크로마토그래피로 정제하여 비접합된 항체 및 올리고뉴클레오타이드를 제거하였다.

[0268] MSD 멀티-스팟(MULTI-SPOT)[®] 플레이트를 적절한 MSD[®] 차단 용액으로 1시간 동안 차단하고 세척하였다. 플레이트 상의 각각의 결합 도메인은 포획 항체 및 고정 모이어티(BSA-올리고뉴클레오타이드 접합체로서 고정화됨, 이 올리고뉴클레오타이드는 롤링 서클 앰플리콘에 대해 특이적하도록 선택됨)를 포함하였다. 본 실시예에서 사용된 고정 올리고뉴클레오타이드의 서열은 5'-AAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTCAAAAAAAAAA-3ThioMC3-D/-3'(서열번호 3)이었다. 이십오(25) μ l의 각각의 분석 희석제 및 보정제, 또는 샘플(적절한 경우 희석됨)을 각각의 웰에 첨가하였다(50 μ l 총 부피를 발생시킴). 플레이트를 1시간 내지 3시간 동안 진탕하면서 항온처리하고 각각의 웰을 세척하였다. 전술된 바와 같이 제조된, 인접 프로브 1 및 2로 표지된 검출 항체의 용액을 각각의 웰에 첨가하고(웰 당 25 μ l), 1시간 내지 2시간 동안 진탕하면서 항온처리하였다(대안적으로, 각각의 개별 검출 항체를 순차적으로 첨가할 수 있고, 이때 첨가할 때마다 첨가 후 1시간 동안 항온처리함). 하기 성분들을 포함하는 결합 혼합물을 각각의 웰에 첨가하였다: (i) 환형화 올리고뉴클레오타이드 1(4 nM), 환형화 올리고뉴클레오타이드 2(4 nM), 결합 완충제, ATP(1 mM), T4 DNA 리가제(0.15 U/ μ l), 이때 각각의 환형화 올리고뉴클레오타이드는 다음과 같았다:

[0269] 환형화 올리고뉴클레오타이드 1: 포스페이트-CTA TTA GCG TCC AGT GAA TGC GAG TCC GTC TAA GAG AGT AGT AGA GCA GCC GTC AAG AGT GTC TA(서열번호 4).

[0270] 환형화 올리고뉴클레오타이드 2: 포스페이트-GTT CTG TCA TAT TTA AGC GTC TTA A(서열번호 5).

[0271] 플레이트를 실온에서 30분 동안 결합 혼합물과 함께 항온처리하고 세척하여 과량의 환형화 올리고뉴클레오타이드를 제거하고, 37°C에서 1.5시간 동안 RCA 혼합물과 함께 항온처리하였고, 이때 상기 RCA 혼합물은 RCA 완충제, dNTP(각각 250 μ M) 및 Phi29 DNA 중합효소(0.125 U/ml)를 함유하였다. 플레이트를 세척하고 검출 프로브의 혼합물을 첨가하고 37°C에서 30분 동안 항온처리하였고, 이때 상기 검출 프로브의 혼합물은 20 mM 트리스(Tris), 1 mM SDTA, 250 mM NaCl, 0.01% 트리톤(Triton), BSA(200 μ g/ml), 트윈 20(0.05%) 및 검출 프로브(6.25 nM)를 포함한다. 검출 프로브는 서열 CAG TGA ATG CGA GTC CGT CT(서열번호 6)이었다. 전기화학발광 표지 설포-TAG(메소 스케일 디아그노스틱스)를 도입하기 위해, 말단 바이오틴 표지를 갖는 검출 프로브를 합성하고 설포-TAG 표지된 스트렙타비딘에 미리 결합시켰다. 플레이트를 세척하고 150 μ l의 MSD 판독 완충제로 충전시키고 MSD 섹터[®] 6000 판독기 상에서 즉시 판독하였다(메소 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery)(미국 메릴랜드주 록빌 소

제)에 의해 공급된 플레이트 및 판독기).

[0272]

이 일반적인 절차를 이용하여 하기 분석물들을 검출하였다: 트로포닌 I, Akt(총), 인-Akt(473), 인-Akt(308), 인플루엔자 A 핵단백질(NP), IL-12p40, IL-12p70, A베타1-42, TNF-알파 모델 시스템을 사용한 가교 및 이소타이핑(isotyping) Ig 분석, B형 간염 표면 항원을 사용한 가교 및 이소타이핑 Ig 분석, 및 라임(Lyme) C6을 사용한 가교 및 이소타이핑 Ig 분석. 표준 샌드위치 면역분석에 비해 ECL 신호 및 분석 민감성의 증가는 분석들 사이에 상이하였지만, 100배만큼 높은 개선이 관찰되었다. 시험된 일부 분석들, 예를 들면, 트로포닌-I, Akt(총), IL-12p40, IL-12p70 및 A베타1-42의 경우, 고정 모이어티의 존재는 증폭 단계 동안 검출 복합체의 해리를 방해함으로써 신호 및/또는 희석 선형성을 개선하였다. 전술된 절차에 따라 수행된 IL-10 분석에 대한 보정 곡선은 도 9에 제시되어 있다. 추가로, (하기) 표 2는 전술된 절차에 따라 수행된 대표적인 분석 세트(제2열, "3-AB RCA/PLA 분석")에 대한 LOD를 메소 스케일 디아그노스틱스(MSD)(미국 메릴랜드주 록빌 소재, www.mesoscale.com)로부터의 표준 2개 항체 면역분석 프로토콜(제3열, "MSD V-Plex 2-AB 면역분석 프로토콜")에 대한 LOD와 비교하여 보여준다.

표 2

분석물	3-AB RCA/PLA 분석 LOD (fg/mL)	MSD V-Plex 2-AB 면역분석 프로토콜 (fg/mL)
IL-1b	2-5	80
IL-2	4	180
IL-4	0.7	40
IL-6	0.6	120
IL-10	2	60

[0273]

[0274]

실시예 2. 고정 시약을 사용하거나 사용하지 않은 분석 프로토콜

[0275]

MSD 7-스팟 멀티-스팟 플레이트를 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 각각 트로포닌 I 포획 항체(220 $\mu\text{g/mL}$)로 코팅하였다. 포획 항체를 앰플리콘에 대해 특이적인 올리고뉴클레오티드가 공유 부착된 고정 모이어티 BSA(존재하는 경우 5 $\mu\text{g/mL}$ 고정제)와 함께 스폿팅하였거나 이러한 고정 모이어티 없이 스폿팅하였다. 이십오(25) μL 의 각각의 분석 희석제, 보정제, 또는 샘플(적절한 경우 희석됨)을 각각의 웰에 첨가하였다(총 50 μL). 플레이트를 2시간 동안 진탕하면서 항온처리하고 각각의 웰을 세척하였다. 전술된 바와 같이 제조된, 인접 프로브 1 및 2로 표지된 검출 항체의 용액을 각각의 웰에 첨가하고(웰 당 25 μL), 1시간 동안 진탕하면서 항온처리하였다. 결합 혼합물을 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 30분 동안 결합 혼합물과 함께 항온처리하고 세척하여 과량의 환형화 올리고뉴클레오티드를 제거하고, 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 37°C에서 1.5시간 동안 RCA 혼합물과 함께 항온처리하였다. 플레이트를 세척하고 검출 프로브의 혼합물을 첨가하고 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 플레이트를 세척하고 150 μL 의 MSD 판독 완충제로 충전하고 MSD 섹터[®] 6000 판독기 상에서 즉시 판독하였다. 형광 영상화를 위해 MSD 전극을 플레이트 상부로부터 제거하고 PBS 및 커버 슬립을 사용하여 젖은 상태로 유지하였다. 자일라(Zyla) 카메라, 20배 대물렌즈, 2x2 비닝(binning) 및 주문제작 필터 세트를 갖춘 현미경 상에서 2초 노출로 표면을 가시화하였다.

[0276]

(하기) 표 3에 나타난 바와 같이, ECL 값은 고정 시약의 존재 하에서 4배 내지 5배 더 높았고, 검출 한계는 3배 더 낮았다(보다 더 민감하였다).

표 3

계산된 농도 (pg/ml)	+ 고정제	고정제 부재
500	134,705	29,818
50	12,713	2,486
5	1,121	270
0.5	150	60
0.05	92	43
0.005	40	86
0.0005	56	30
0	71	37
검출 한계	0.36	1.16

[0277]

[0278]

도 10a 및 10b는 5 $\mu\text{g/ml}$ 고정 시약을 갖는 플레이트 표면(패널 (a)) 및 고정 시약을 갖지 않는 플레이트 표면(패널 (b))의 형광 현미경관찰 영상을 보여준다. 상기 영상은 개별 결합 사건과 관련된 밝은 형광 스폿을 보여주고, 고정 시약의 존재 하에서의 RCA 증폭이 관찰가능한 결합 사건을 발생시키는 데에 있어서 보다 더 효율적이었다는 것을 확인시켜준다.

[0279]

실시예 3. 1개의 커넥터 올리고뉴클레오타이드와 2개의 커넥터 올리고뉴클레오타이드의 비교

[0280]

2개의 별개 결합 부위를 갖는 2개의 커넥터 올리고뉴클레오타이드 대신에 1개의 결합 부위를 갖는 단일 선형 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 실시예 2에 기재된 분석을 반복함으로써 환형 주형을 형성하였다. 도 11a에 나타난 바와 같이, 결합 부위 1 또는 결합 부위 2에서 개방된 단일 선형 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 제조하였다. 두 단일 선형 커넥터 올리고뉴클레오타이드들을 실시예 1 및 2에서 사용된 올리고뉴클레오타이드들인 Circ-1과 Circ-2의 조합과 함께 나란히 시험하였다. 실시예 2에 기재된 프로토콜을 사용하였고, 추가로 단일 선형 커넥터 올리고뉴클레오타이드를 125 nM, 62.5 nM 및 31 nM의 세가지 농도에서 시험한 반면, Circ-1 올리고뉴클레오타이드와 Circ-2 올리고뉴클레오타이드의 조합을 사용한 표준 분석을 125 nM에서 시험하였다. 도 11b에 나타난 바와 같이, 2-부분 커넥터 올리고뉴클레오타이드 혼합물(Circ-1 및 Circ-2)과 거의 동일한 효율로 2개의 단일 선형 커넥터 올리고뉴클레오타이드들을 RCA 증폭 생성물 내로 성공적으로 도입하였다. 결합 부위 1에서 개방된 단일 선형 커넥터 올리고뉴클레오타이드는 신호 강도, 비특이적 배경 및 전체 민감성에 기초할 때 상기 2-부분 커넥터 혼합물에 필적할만한 성능을 가졌다. 예측된 바와 같이, 결합 부위 2에서 개방된 단일 선형 커넥터 올리고뉴클레오타이드는 보다 더 높은 비특이적 배경 및 보다 더 낮은 민감성을 가졌다. 이 후자 경우, 결합 및 프라이밍 둘 다가 인접 프로브 #1의 존재에만 의존하므로; 인접 증폭 방식의 특이성 이익들 중

서열 설명	서열
대안적 세트(a)	
검출 올리고	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(서열번호 7)
인접 올리고 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaCACTAAGCTGTAGTCCATTACCGmUmUmU(서열번호 8)
인접 올리고 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaGCTGGAGGTTTCAGACGATTTTGCG(서열번호 9)
Circ-1	/5Phos/AACAGCTTAGTGACATCGGTAGTTAACAGATTGATCTTGACACATCGGTAGTT CGCAAAATCGTC(서열번호 10)
Circ-2	/5Phos/TGAACCTCCAGCTTTCGGTAATGGACT(서열번호 11)
고정 올리고	5'ACAGATTGATCTTGAAAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/(서열번호 12)
대안적 세트(b)	
검출 올리고	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(서열번호 7)
인접 올리고 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaAGAGTCCAGAGGCAAAGCGTGAATmUmUmU(서열번호 13)
인접 올리고 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaGATAAGGAAGGGCCTTAGCGACA(서열번호 14)
Circ-1	/5Phos/CCTCTGGACTCTACATCGGTAGTTTGAACATTTATTCTAACA TCGGTAG TTTGTCGCTAAGGC(서열번호 15)
Circ-2	/5Phos/CCCTTCCTTATCTTTATTCACGCTTTG(서열번호 16)
고정 올리고	5'GGAACATTTATTCTAAA AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/(서열번호 17)
대안적 세트(c)	
검출 올리고	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(서열번호 7)
인접 올리고 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaACAACCTCCGATTGCTTGCTTCTmUmUmU(서열번호 18)
인접 올리고 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaTAGCCCTACGTGCCCTGCATAGAC(서열번호 19)
Circ-1	/5Phos/ATCGGAGTTGTTACATCGGTAGTTCGCGCAGGTCGGGAATTAC ATCGGTAGTTGTCTATGCAGGG(서열번호 20)
Circ-2	/5Phos/CACGTAGGGCTATTGAAGAAGCAAGCA(서열번호 21)
고정 올리고	5'GCGCAGGTCGGGAATAAAA AAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/(서열번호 22)

일부가 상실되

었다.

실시예 4. 대안적 인접 프로브, 고정 올리고뉴클레오타이드 및 커넥터 서열을 사용하여 수행한 3-항체 분석

하기 대안적 시약 세트를 사용하되 실시예 1에 요약된 프로토콜을 이용하여 분석을 수행하였다:

표 4

서열 설명	서열
대안적 세트(a)	
검출 올리고	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(서열번호 7)
인접 올리고 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaCACTAAGCTGTTAGTCCATTACCGmUmUmU(서열번호 8)
인접 올리고 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaGCTGGAGGTTTCAGACGATTTTGCG(서열번호 9)
Circ-1	/5Phos/AACAGCTTAGTGACATCGGTAGTTAACAGATTGATCTTGACACATCGGTAGTT CGCAAAATCGTC(서열번호 10)
Circ-2	/5Phos/TGAACCTCCAGCTTTTCGGTAATGGACT(서열번호 11)
고정 올리고	5'ACAGATTGATCTTGAAAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/(서열번호 12)
대안적 세트(b)	
검출 올리고	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(서열번호 7)
인접 올리고 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaAGAGTCCAGAGGCAAAGCGTGAATmUmUmU(서열번호 13)
인접 올리고 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaGATAAGGAAGGGCCTTAGCGACA(서열번호 14)
Circ-1	/5Phos/CCTCTGGACTCTACATCGGTAGTTTGAACATTTTATTCTAACA TCGGTAG TTTGTCGCTAAGGC(서열번호 15)
Circ-2	/5Phos/CCCTTCCTTATCTTTATTCACGCTTTG(서열번호 16)
고정 올리고	5'GGAACATTTTATTCTAAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/(서열번호 17)
대안적 세트(c)	
검출 올리고	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(서열번호 7)
인접 올리고 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaAACAACCTCCGATTGCTTGCTTCTmUmUmU(서열번호 18)
인접 올리고 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaTAGCCCTACGTGCCCTGCATAGAC(서열번호 19)
Circ-1	/5Phos/ATCGGAGTTGTTACATCGGTAGTTCGCGCAGGTCGGGAATTAC ATCGGTAGTTGTCTATGCAGGG(서열번호 20)
Circ-2	/5Phos/CACGTAGGGCTATTTAAGAAGCAAGCA(서열번호 21)
고정 올리고	5'GCGCAGGTCGGGAATAAAA AAA AAA AAA AAA AA/3ThioMC3-D/(서열번호 22)

[0283]

[0284]

표 5의 결과는 트로포닌의 농도가 500 pg/ml이고 멀티-스팟 플레이트의 각각의 웰이 표 4에 나열된 세트들 중 하나로부터의 고정 올리고뉴클레오타이드를 갖는 1개의 포획 스폿을 포함하는 트로포닌 분석에 대한 결과이다. 상기 분석은 실시예 1에 기재된 농도와 동일한 농도로 1개의 인접 프로브(1) 및 1개의 인접 프로브(2)를 사용하였다. 세트 (a) 내지 (c)에 대한 비특이적 결합은 이 세트들이 실시예 1에 기재된 농도에 비해 9배 더 높은 농도의 검출 올리고뉴클레오타이드-SA-STAG를 가졌기 때문에 더 높았다. 검출 올리고뉴클레오타이드-SA-STAG의 보다 더 높은 농도는 실시예 1에서와 같이 SA-STAG 단독의 적정보다는 오히려 함께 미리 결합된 복합체의 적정보로부터 비롯되었다.

표 5

PLA 세트	(a)	(b)	(c)	실시예 1
트로포닌	178,560	138,540	189,166	273,261
제로 트로포닌	412	314	545	88

[0285]

[0286] **실시예 5. 추가 면역분석 플랫폼에 대해 수행된 3-항체 분석**

[0287]

(a) 암호화된 입자를 사용하는 비드-기초 면역분석 포맷

[0288]

모든 분석 단계들을 96-웰 필터 플레이트에서 수행한다. (10 In의 Hg를 초과하지 않는) 진공 매니폴드를 사용하여 플레이트로부터 액체를 제거한다. 플레이트를 결코 뒤집지 않는다. 막히는 현상이 일어나는 경우, 끝이 뾰족한 15 ml 원추형 튜브를 사용하여 막힌 웰 아래의 영역을 약하게 누른 후, 1 ml 파스퇴르 피펫 고무 패킹을 사용하거나 엄지손가락으로 막힌 웰을 눌러 압력을 발생시킴으로써 막힘을 제거한다. 최종 흡입 단계 후, 종이 타월의 적층체 상에서 플레이트의 바닥을 가볍게 두드린 후 김와이프(Kimwipe)로 필터 플레이트의 바닥을 가볍게 눌러 잔류 액체/소적을 제거한다.

[0289]

세척 용액 제조: 20x 세척 용액 병의 전체 내용물을 285 ml의 탈이온수로 희석함으로써 1x 작업 세척 용액을 제조한다.

[0290]

분석 표준물 제조: 동결건조된 표준물을 100% 분석 희석제(혈청 및 혈장 샘플) 또는 50% 분석 희석제/50% 조직 배양 배지(조직 배양 상청액)로 재구성한다; 재구성 부피: (i) 1개 바이알: 1 ml; (ii) 2개 바이알: 바이알 당 0.5 ml. 8분 내지 10분 동안 실온에서 재수화한다. 바이알(들)을 수회 가볍게 뒤집고 바이알을 추가 3분 내지 5분 동안 정치시켜 완전한 수화를 보장한다. 1개 초과 표준물이 사용되는 경우, 동등한 부피의 각각의 표준물을 조합하고 약하게 혼합한다. 재구성된 표준물의 3배 연속 희석을 수행하여 7점 표준 곡선을 작성한다.

[0291]

분석물 포획:

[0292]

(1) 10x 포획 비드 스톡(stock)을 불택성하고(30초) 초음파처리한다(30초). 포일로 감싼 튜브에서, 10x 포획 비드 스톡(웰 당 2.5 μ l)을 작업 세척 용액(웰 당 25 μ l, 약 2,000개 내지 5,000개 비드/분석)에서 희석한다. 보다 더 높은 다중화를 위해, 보유된 10x 포획 비드 스톡의 여분의 부피를 참작하여 작업 세척 용액의 부피를 조절한다.

[0293]

(2) 표준물 및 샘플 웰을 200 μ l의 작업 세척 용액으로 미리 적신다.

[0294]

(3) 희석된 포획 비드 용액을 불택성하고(30초) 초음파처리한다(30초). 25 μ l를 즉시 각각의 분석 웰에 첨가한 후, 200 μ l의 1x 세척 용액을 첨가한다. 흡입하고 200 μ l의 작업 세척 용액으로 세척을 반복한다. 필요한 경우 필터 플레이트의 바닥을 가볍게 두드리고 누른다.

[0295]

(4) 50 μ l의 항온처리 완충제를 모든 분석 웰에 첨가한다.

[0296]

(5) 100 μ l의 표준물을 지정된 웰에 첨가한다. 샘플에 대해 지정된 웰의 경우, 50 μ l의 분석 희석제에 이어서 50 μ l의 샘플을 첨가한다. 플레이트를 덮고 케도 플레이트 진탕기(500 내지 600 rpm) 상에서 실온에서 2시간 동안 항온처리한다. 모든 항온처리 동안 분석 플레이트를 불투명한 덮개로 덮어 광으로부터 보호한다. 케도 진탕기의 반경에 따라 속도가 조절될 필요가 있을 수 있다.

[0297]

분석물 검출

[0298]

(6) 형광 표지된 검출 항체의 1x 혼합물을 제조한다: 10x 검출 항체 혼합물(웰 당 10 μ l)을 희석제(웰 당 100 μ l)로 희석한다. 혼합물은 관심있는 분석물에 대해 특이적인 한 쌍의 검출 항체들(알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 350(청색 형광 표지)으로 표지된 검출 항체, 및 알렉사 플루오르 594(적색 형광 표지)로 표지된 다른 검출 항체)(이 형광 표지들 각각은 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)(미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재; www.lifetechnologies.com)로부터 입수가 가능함)을 포함한다. 보다 더 높은 다중화를 위해, 요구된 10x 항체 혼합물 스톡의 여분의 부피를 참작하여 희석제의 부피를 조절한다. 분석 웰을 흡입하고 200 μ l의 작업 세척 용액으로 2회 세척한다. 100 μ l의 희석된 검출 항체 혼합물을 각각의 분석 웰에 첨가한다. 플레이트를 덮고 플레이트 진탕기(500 내지 600 rpm) 상에서 1시간 동안 항온처리한다.

- [0299] 분석 판독
- [0300] (8) 분석 웰을 흡입하고 200 μl 의 작업 세척 용액으로 3회 세척한다. 필터 플레이트의 바닥을 깨끗한 종이 타월로 건조하여 모든 잔류 소적들을 완전히 제거한다. 100 μl 의 작업 세척 용액을 각각의 분석 웰에 첨가하고 플레이트를 2분 내지 3분 동안 플레이트 진탕기(500 내지 600 rpm) 상에 놓는다.
- [0301] (9) 각각의 형광 표지에 대한 색채 채널을 포함하는 다중-색채 형광 입자 분석기(예컨대, FACS 시스템 또는 변경된 xMAP 기계)에서 비드 현탁액을 분석한다. 최대 민감성을 위해, 임의의 입자가 0개 또는 1개의 결합된 분석물만을 가질 가능성이 높은 조건 하에서 분석을 수행하고, 형광 표지들 둘 다를 포함하는 (입자 암호화에 기초하여) 주어진 분석물에 대해 특이적인 입자의 수를 카운팅함으로써 분석물의 양을 정량한다. 임의적으로, 암호가 비드 상의 포획 항체의 분석물 특이성을 표시하는 암호화된 비드, 및 각각의 분석물에 대한 추가 쌍의 검출 항체를 사용하여 다중 포맷으로 분석을 수행할 수 있다. 암호화가 확인된 경우, 분석기는 비드에 도입된 추가 형광 색채를 사용하는 xMAP에서와 같이 추가 색채를 측정하고 비드 암호를 확인하기 위한 추가 검출 채널을 가져야 한다.
- [0302] (b) 핵산 프로브에 의해 변경된 2개의 검출 시약들을 사용하되, 고정 모이어티를 포함하는 암호화된 입자를 사용하는 비드-기초 면역분석 포맷
- [0303] 실시예 5(a)에 요약된 바와 같이, 모든 분석 단계들을 96-웰 필터 플레이트에서 수행한다. 세척 용액 및 분석 표준물을 실시예 5(a)에 기재된 바와 같이 제조하고, 실시예 1에 기재된 바와 같이 인접 프로브 1 및 2를 첨가하여 표적 분석물에 대한 한 쌍의 검출 항체들을 변경시킨다. 분석물을 실시예 5(a)에 기재된 바와 같이 포획 비드 상에서 포획한다. 포획 비드는 롤링 서클 앰플리콘에 대해 특이적하도록 선택된 올리고뉴클레오타이드와 함께, BSA-올리고뉴클레오타이드 접합체로서 비드 표면에 고정화된 고정 모이어티를 포함한다. 사용된 고정 올리고뉴클레오타이드의 서열은 서열번호 3이다.
- [0304] 이십오(25) μl 의 분석 희석제, 보정제 또는 샘플(적절한 경우 희석됨)을 포획 비드의 혼합물과 혼합한다. 혼합물을 1시간 내지 3시간 동안 진탕하면서 항온처리하고 세척한다. 전술된 바와 같이 제조된, 인접 프로브 1 및 2로 표지된 검출 항체의 용액을 혼합물에 첨가하고 1시간 내지 2시간 동안 진탕하면서 항온처리한다(대안적으로, 각각의 개별 검출 항체를 순차적으로 첨가할 수 있고, 이때 첨가할 때마다 첨가 후 1시간 동안 항온처리한다). 실시예 1에 기재된 결찰 혼합물을 첨가한다. 혼합물을 37°C에서 30분 동안 결찰 혼합물과 함께 항온처리하고 세척하여 과량의 환형화 올리고뉴클레오타이드를 제거하고, 37°C에서 1.5시간 동안 RCA 혼합물과 함께 항온처리하였고, 이때 상기 RCA 혼합물은 상기 실시예 1에 기재되어 있다. 혼합물을 세척하고, 플루오로세인-표지된 검출 프로브의 혼합물을 첨가하고 37°C에서 30분 동안 항온처리하였고, 이때 상기 검출 프로브의 혼합물은 전술되어 있다. 혼합물을 세척하고 입자를 다중-채널 형광 입자 분석기 내로 흡입한다.
- [0305] (c) 비드-기초 포맷, 및 개별 나노-웰 내로의 포획 분석물 분자의 분리
- [0306] 샘플을 100 μl 의 25% 소 혈청(2배 내지 4배 희석)에서 제조하고, 포획 항체로 코팅된 500K 비드(상자성 2.7 μm , 임의적으로 형광 암호화된)를 샘플에 첨가한다. 샘플을 23°C에서 약 2시간 동안 항온처리한다. 샘플을 PBS(5X, 0.1% 트윈 20)로 3회 세척하고, 표지된 검출 항체의 혼합물(제1 바이오틀화된 검출 항체 및 헵텐-접합된 항체를 포함하는 혼합물)을 첨가한다. 혼합물을 23°C에서 약 1시간 동안 항온처리한다. 혼합물을 PBS(5X, 0.1% 트윈-20)로 3회 세척하고, 효소 표지를 첨가하고, 스트렙타비딘-베타-갈락토시다제(40 pM), 항-헵텐-접합된 효소도 첨가하고, 혼합물을 23°C에서 약 30분 동안(또는 시모아(Simoa) 분석기에서 3분 동안) 항온처리한다. 혼합물을 PBS(5X, 0.1% 트윈-20)로 7회 세척하고, 효소 기질인 15 μl 의 레소루핀-베타-d-갈락토피라노사이드(적재 완충제 중의 100 μM)를 첨가한다.
- [0307] 혼합물을 (원반 당 24개의 샘플을 갖는, 환형 올레핀 중합체로부터 제조된 DVD 포맷으로 쿼테릭스(Quanterix)에 의해 제공된) 나노-웰의 어레이 상으로 옮기고 2분간 침강(settle)시킨다. 상기 어레이를 완충제로 씻어내고, 상기 어레이를 불화탄소 오일로 밀봉하고 23°C에서 2분 내지 5분 동안 항온처리하고, 결과를 다중-색채 형광 이미지 상에서 판독한다. 영상 분석을 이용하여 두 형광 효소 생성물들을 함유하는 나노-웰의 수를 카운팅함으로써 샘플 중의 분석물의 농도와 상관관계를 갖는 값을 제공한다.
- [0308] (d) 유동 셀에 의해 분석된 비드-기초 면역분석 포맷
- [0309] 제1 항온처리: 10 μl 의 샘플, 바이오틀화된 단일클론 분석물 특이적 포획 항체(2.6 mg/ℓ의 작업 용액), 및 올리고뉴클레오타이드에 각각 접합된 단일클론 분석물 특이적 항체들의 혼합물(0.3 mg/ℓ의 작업 용액)을 반응시

켜 샌드위치 복합체를 형성한다. 상기 단일클론 분석물 특이적 항체들의 혼합물은 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조되고, 상기 혼합물은 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 인접 프로브 1 및 2에 접합된 한 쌍의 항체들을 포함한다.

[0310] 제2 항온처리: 스트렙타비딘-코팅된 미세입자(Dynal M280, 2.8 μm , 0.72 mg/ml, 바이오틴에 대한 결합 용량 470 ng/mg)의 첨가 후, 복합체는 바이오틴과 스트렙타비딘 사이의 상호작용을 통해 고체상에 결합되게 된다. 실시예 1에 기재된 프로토콜에 따라 제조된 결합 혼합물을 혼합물에 첨가한다. 상기 혼합물을 37°C에서 30분 동안 결합 혼합물과 함께 항온처리하고 세척하여 과량의 환형화 올리고뉴클레오타이드를 제거하고 실시예 1에 기재된 바와 같이 RCA 혼합물과 함께 항온처리한다. 혼합물을 세척하고, 바이오틴-표지된 검출 프로브의 혼합물을 첨가하고 37°C에서 30분 동안 항온처리하고, 이때 상기 검출 프로브의 혼합물은 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된다. 전기화학발광 표지 선폴-TAG(메소 스케일 디아그노스틱스)를 도입하기 위해, 말단 바이오틴 표지를 갖는 검출 프로브를 합성하고 선폴-TAG-표지된 스트렙타비딘에 미리 결합시킨다.

[0311] 미세입자가 자기장에 의해 전극의 표면 상으로 포획되어 있는 측정 셀 내로 반응 혼합물을 흡입한다. 그 다음, 비결합된 물질을 프로셀(TPA 함유 완충제)로 제거한다. 그 다음, 전압을 전극에 인가하여 광전증배관에 의해 측정되는 화학발광 방사를 유도한다. 2-점 보정에 의해 기계 특이적으로 발생된 보정 곡선 및 시약 바코드를 통해 제공된 마스터 곡선을 통해 결과를 확인한다.

[0312] 실시예 6. HIV-1 P24의 검출

[0313] 재료, 방법 및 결과:

[0314] 실시예 1에 기재된 절차를 이용하여 HIV-1 p24를 검출하였다. (세라케어 라이프 사이언시스(Seracare Life Sciences)(www.seracarecatalog.com)로부터 입수가 가능한) HIV-1 혼합된 역가 성능 패널, (마찬가지로 세라케어 라이프 사이언시스로부터 입수가 가능한) HIV-1 혈청 전환 패널, (프로메드디엑스 엘엘씨(ProMedDx, LLC)(www.promeddx.com)로부터 입수가 가능한) HIV 항체 양성 샘플, 및 (바이오리클라메이션(Bioreclamation)(www.bioreclamation.com)으로부터 입수가 가능한) 정상 매칭된 샘플로부터 대략 64개의 혈청 또는 혈장 샘플을 시험하였다. 전술된 절차에 따라 수행된 HIV-1 p24 분석에 대한 보정 곡선은 도 12에 제시되어 있다. 분석에 대한 LOD는 1.3 fg/ml인 것으로 발견되었고, LLOQ는 3.0 fg/ml이었고, ULOQ는 37,500 fg/ml이었다. 25 μl 샘플에 대한 1.3 fg/ml의 검출 한계는 대략 650개의 p24 분자들에 상응하고, 각각의 바이러스 입자(분자)는 대략 2000 카피의 p24 단백질을 생성한다.

[0315] 혼합된 역가 성능 패널인 PRA204(B)는 상업적으로 입수가 가능한 분석(바이오메리유(bioMerieux), 퍼킨 엘머(Perkin Elmer) 및 제프토메트릭스(Zeptomatrix))에 의해 측정될 때 HIV p24 항원에 대한 약한 양성 내지 강한 양성 반응성을 갖는 10개 표본의 세트로 구성되었다. 2개의 음성 표본들이 상기 패널에 포함되었다. 분석의 결과는 하기 표 6에 제시되어 있다:

표 6

패널 구성원	바이오메리유 HIV Ag VIDAS p24 (pg/mL)	퍼킨 엘머 HIV Ag p24(s/co)	젠포메트릭스 HIV Ag p24 (s/co)	MSD 3AB 포맷 (pg/mL)	MSD 3AB 포맷 (ECL)
PRA204(B)-09	>400	>42	75	>38	1915873
PRA204(B)-10	<3	1	0	0.0	174
PRA204(B)-11	85	18	16	>38	1674519
PRA204(B)-12	60	11	14	>38	1601078
PRA204(B)-13	170	47	41	>38	1902237
PRA204(B)-15	192	45	36	>38	1884816
PRA204(B)-17	>400	42	61	>38	1897359
PRA204(B)-20	<3	1	0	0.0	150
PRA204(B)-21	68	14	18	>38	1422070
PRA204(B)-22	17	3	1	10	347517
PRA204(B)-23	14	2	2	7	237726
PRA204(B)-24	15	3	3	9	306728

[0316]

[0317] 대다수의 샘플들의 경우 HIV p24 수준은 높았고 ULQ를 초과하였다. 10개의 양성 샘플들 전부가 검출될 수 있었고 상업적으로 입수가 가능한 p24 키트에 필적할만하였지만, 음성 샘플(상업적 분석에 기초할 때 각각 PRA204(B)-10 및 PRA204(B)-20)은 각각 대략 3 및 2 fg/mL로 매우 낮았다.

[0318] 혈청전환 패널의 분석에 대한 결과는 도 13에 제시되어 있다. 첫 번째 양성 샘플을 검출하는 시간의 추정된 지연, 및 PRB948 및 PRB962 패널로부터의 두 샘플들에서의 p24 수준이 PCR 키트와 비교되었을 때 3-항체 분석 포맷은 PCR만큼 민감한 것으로 발견되었고 다른 상업적 p24 분석보다 더 우수한 성능을 갖는다. 데이터는 표 7에 제시되어 있다:

표 7

패널 & 구성원	1 차 채혈 이후 날짜	에보트 BBI (s/co)	코울터 BBI (s/co)	듀폰 BBI (s/co)	인노 (s/co)	MSD 3AB (pg/ml)	MSD 3AB (ECL)	로슈 PCR (co/ml)	
패널 I-I, PRB948-01	0	0.4	0	0.1	0.4	0.001	121	BLD	
패널 I-I, PRB948-01	18	0.4	0	0.1	0.4	0.001	100	BLD	
패널 I-I, PRB948-01	20	0.5	0.2	0.5	1	3	97688	3×10^4	
패널 I-I, PRB948-01	23	5	23	15	31	>38	1736809	6×10^5	
	1 차 채혈 이후 날짜	코울터 (s/co)2	PE (s/co)2	로슈 일렉시스 (s/co)2	젠티 (s/co)2	MSD 3AB (pg/ml)	MSD 3AB (ECL)	로슈 울트라 (co/ml)	로슈 표준
패널 I-II, PRB962-01	0	0.3	0.3	0.1	0.1	0.002	149	<50	NT
패널 I-II, PRB962-02	2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.001	120	<50	NT
패널 I-II, PRB962-03	7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.021	778	NT	7.6×10^2
패널 I-II, PRB962-04	9	0.6	0.3	0.3	0.3	0.2	7603	NT	7.7×10^2
패널 I-II, PRB962-05	14	>40	30	23	10	>38	1808344	NT	7.0×10^3
패널 I-II, PRB962-06	17	>40	>49	155	24	>38	1863699	NT	1.2×10^7

에보트 BBI 는 에보트 BBI HIV-1 항원 검사를 지칭한다.

코울터 BBI 는 코울터 BBI HIV-1 항원 검사를 지칭한다.

듀폰 BBI 는 듀폰 BBI HIV-1 항원 검사를 지칭한다.

인노는 인노제네틱스 R129 HIV-1 항원 검사를 지칭한다.

로슈 PCR 은 로슈 PCR HIV RNA BBI 검사를 지칭한다.

코울터는 코울터 ELISA HIV-1 항원 검사를 지칭한다.

PE 는 퍼킨 엘머 ELISA HIV-1 항원 검사를 지칭한다.

젠티는 젠티메트릭스 ELISA HIV-1 항원 검사를 지칭한다.

로슈 울트라는 로슈 초민감성 HIV-1 RNA 검사를 지칭한다.

로슈 표준은 로슈 표준 HIV-1 RNA 검사를 지칭한다.

BLD = 검출 한계 미만, 및 NT = 검사되지 않음

[0319]

[0320] 결론:

[0321]

최근에 HIV로 감염된 환자는 질환의 전염에 불균형적으로 기여한다. 바이러스 존재량은 감염 후 처음 수주 이내에 높고, 새로 감염된 환자는 자신이 감염되어 타인에게 질환을 전염시킬 수 있다는 것을 인식할 가능성이 없다. 따라서, 급성 HIV 감염의 초기 검출은 공중 건강을 위해 매우 중요하다. PCR 방법은 민감성 면에서 최적 표준(gold standard)이다: 이 방법은 혈청 또는 혈장 ml 당 60개만큼 적은 수의 HIV RNA 카피(ml 당 30개 바이러스 입자)를 검출할 수 있다. 그러나, PCR 기술은 복잡하고 비싸므로, 모든 상황들에 적합하지는 않다. 면역분석은 보다 더 단순하고 저렴하지만, 현재 4세대 p24 면역분석의 검출 한계는 단지 약 10 pg/ml, 또는 ml 당 대략 2억5천만 개의 캡시드 단백질이다. 1개의 바이러스를 기준으로, 바이러스 당 약 2,000개의 p24 캡시드 단백질들이 존재한다는 사실에도 불구하고 이 면역분석은 PCR 시험보다 수천 배 덜 민감하다.

[0322]

본원에 기재된 바와 같이, MSD의 멀티-어레이[®] 기술에 기초한 차세대 전기화학발광 분석 포맷이 개발되었고 그 성능이 특징규명되었다. 이 신규 p24 면역분석에 대한 검출 한계는 대략 1 fg/ml이었고 현재의 p24 면역분석보다 10,000배 더 민감하였다. 1 fg/ml의 민감성은 본 발명자들의 25 μ l 샘플 부피에서 1개 미만의 바이러스 입

자에 상응한다. 정량의 하한 및 상한은 각각 3 fg/ml 및 38,000 fg/ml이었다. 플레이트 내의 CV는 7%이었고, 총 CV는 15%이었다. 스파이크(spike) 회수 및 회석 선형성은 80% 내지 120%이었다. p24는 32명의 명백히 건강한 공여자들의 혈청 또는 혈장에서 검출불가능하였다. p24 혼합된 역가 패널은 3-AB HIV p24 분석과 상업적인 p24 면역분석 사이의 우수한 상관관계를 보여주었다. 2개의 혈청전환 패널들이 시험되었다: 세라케어(SeraCare) PRB948(0일째 날 및 18일째 날, PCR 음성; 22일째 날 및 23일째 날, PCR 양성) 및 PRB962(0일째 날 및 2일째 날, PCR 음성; 7일째 날, 9일째 날, 14일째 날 및 17일째 날, PCR 양성). 두 경우에서, 3-AB HIV p24 분석은 모든 PCR 음성 샘플들에 대해 음성을 나타내었고 모든 PCR 양성 샘플들에 대해 양성을 나타내었고, 통상적인 p24 면역분석보다 충분히 먼저 감염을 검출하였다.

[0323] 종합하건대, 본원에 기재된 3-AB HIV p24 분석은 p24 ELISA의 현재 한계보다 10,000배 더 민감하고 민감성 면에서 PCR 분석에 필적할만하다. 상기 분석은 특수 장치를 요구하지 않고 MESO™ 퀵플렉스(QuickPlex) SQ 120 및 섹터® 이미저 상에서 실행될 수 있다.

[0324] **실시예 7. 분석물의 농축, 및 후속 3-AB RCA/PLA 분석**

[0325] (a) 실험의 조건은 하기 표 8a에 제시되어 있다:

[0326] [표 8a]

시약			
시약	유형	양	결합 조건
자기 비드	Dynabeads® MyOne™ 스트렙타비딘 T1	0.25 mg	NA
포획 올리고뉴클레오티드	PP1 상보체	100 pmol	희석제 100 (1 시간)
인접 프로브 (PP)- 분석물 검출 항체	HIVp24 특이적 PP1- 검출 항체	6.7 pmol	(1) 1M NaCl (40 분)
			(2) 0.5 M NaCl (40 분)
항원	HIVp24	7 pg/ml	(1) 1M NaCl (밤새)
			(2) 0.5 M NaCl (밤새)
대조군	포획 없는, PP1 및 항원 포함 비드	.25 mg	유리 단계 없는, 시험 샘플과 동일한 결합 조건
유리 조건			
PP/항원 복합체	PP1/HIVp24	0 염	25 C
			30 C
			37 C
		10 mM 염	25 C
			30 C
			37 C

[0327]

[0328] 비교적 짧은 올리고뉴클레오티드 인접 프로브 서열(예를 들면, 9-13 뉴클레오티드 길이)의 포획을 위해, 인접

프로브 서열의 위치에 상보적인 포획 올리고뉴클레오타이드를 제조하고 3' 말단을 바이오티닐화하였다. 하기 표 8b는 인접 프로브 및 포획 올리고뉴클레오타이드 서열의 상세 설명을 나타낸다:

[표 8b]

PP1 서열	/5ThioMC6-D/AAAAAAAAAAGACGCTAATAGTTAAGACGCTTmUmUmU (서열번호: 23)		
포획 올리고	서열 이름	서열 길이	서열 (5' -3') 5' /폴리 A (20 스페이서 바이오티닌/
포획 올리고 1	Cap-1:16	16	Aagcgtcttaactatt (서열번호: 24)
포획 올리고 2	Cap-1:13	13	Aagcgtcttaact (서열번호: 25)
포획 올리고 3	Cap-1:12	12	Aagcgtcttaac (서열번호: 26)
포획 올리고 4	Cap-1:11	11	Aagcgtcttaa (서열번호: 27)
포획 올리고 5	Cap-1:10	10	Aagcgtctta (서열번호: 28)
포획 올리고 6	Cap-1:9	9	Aagcgtctt (서열번호: 29)
포획 올리고 7	Cap-1:8	8	Aagcgtct (서열번호: 30)

계산된 녹는 점을 하기 표 8c에 나타내었다:

[표 8c]

Tm				
PP1 [C], nM	10	10	10	10
Cap [C], nM	10	10	10	100
염, mM	1200	500	40	40
Cap1-16	57	51	37	43
Cap1-13	51	46	33	39
Cap1-12	46	42	28	35
Cap1-11	36	32	19	26
Cap1-10	34	29	16	24
Cap1-9	34	30	18	26
Cap1-8	26	22	9	19

포획 올리고뉴클레오타이드로 변형된 비드를 하기와 같이 제조하였다: 오십(50) μ l의 Dynal MyOne 스트렙타비딘 T1 비드 슬러리를 볼텍싱 후 5개의 1.5 mL 에펜도르프 튜브에 첨가하고, 각 튜브는 2회의 결합 조건 실험에 걸친 분할에 필요한 양의 2배를 가졌다. 비드를 희석제 100 (미국 메릴랜드주 록빌 소재 메소 스케일 디스커버리 사제) 1 ml로 3회 세척하고 각 포획 올리고뉴클레오타이드 1.2 mL를 EDTA 포함 희석제 100 중 각 포획 올리고뉴클레오타이드 200 pmol/ml로 각 바이알에 첨가하였다. 용액을 실온에서 1시간 동안 회전시킴으로써 항온처리하고, 각 튜브의 용액은 유리 바이오티닌이 EDTA 포함 희석제 100 중 5 nmol/mL로 급등(spiked)하였다. 용액을 실온에서 15분동안 회전시킴으로써 항온처리하고, 비드를 0.5M NaCl/BSA 용액 1 mL로 3회 세척하였다. 튜브에 0.5 M NaCl/BSA 1 mL를 충전하고, 혼합하고, 각 포획 올리고뉴클레오타이드-비드 혼합물을 2개의 바이알로 분취하였다 (총 10개의 바이알).

용액을 모든 바이알로부터 흡입하고 0.5 M 및 1 M NaCl/BSA 중 1 ug/mL(6.7 pmol/mL)으로 1 mL PP1(HIVp24에

특이적인 검출 항체에 결합한 PP1 서열)을 각 포획 튜브에 첨가하였다. 용액을 실온에서 회전시키면서 40분 동안 항온처리하였다. 각 튜브를 염 용액으로 3회 세척하였다(포획 올리고뉴클레오타이드를 포함하지 않는 대조군은 세척하지 않았다). 4개의 튜브에, 1 mL HIVp24를 7 pg/mL로 첨가하고, 항원은 스톱 용액으로부터 무 포획 대조군 튜브 내로 급등하였다. 용액을 밤새 4℃에서 회전시키면서 항온처리하고, 포획 올리고뉴클레오타이드를 갖는 각 튜브를 염 용액으로 3회 세척하였다(각 1mL). 각 튜브에 세척 완충제(0.1X PBS, 500 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% 트리톤 X-100, 2mg/mL BSA)를 1/3 충전하고, 혼합하고, 비드 400 μ L의 분취액을 2가지 유리 염 조건으로 2개 바이알 내에 첨가하였다(총 18개의 바이알). 세척 완충제를 무 포획 대조군 튜브를 제외한 모든 바이알에서 제거하고, 0.0M 및 10 mM 염 완충제 400 μ L를 튜브에 첨가하였다. 튜브의 내용물을 혼합하고 각 튜브로부터 100 μ L의 분취액(포획 없는 대조군 비드 포함)을 3가지 온도 유리 조건의 분석에 대해 3개의 매트릭스 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 5분 동안 혼합하며 열진탕기(thermoshaker)에서 각각 25℃, 30℃, 및 37℃에서 항온처리하였다. 비드를 자기적으로 분리하고 25 μ L의 상청액을 mIgG를 포함하여 5 μ L 6X PBS와 함께 급등한 분석 플레이트의 웰에 첨가하였다(조건당 3 복제물). 플레이트를 진탕하면서 실온에서 1시간동안 항온처리하고 PBS 완충제로 3회 세척하였다. 실시예 1에 기재된 바와 같이, 플레이트 상의 각 결합 도메인은 포획 항체 및 고정 모이어티를 포함하고, 항온 처리에 이어, 복합체가 항원에 결합된 포획 항체를 포함하는 각 결합 도메인 상에 형성되며, 이는 PP1서열을 갖는 검출 항체에 결합한다(대조군 결합 도메인 제외).

[0336] PP2(또는 대조군에 대해 PP1 + PP2)로 표시된 검출 항체의 용액을 각각의 웰에 첨가하고(웰 당 25 μ L), 1시간 동안 진탕하면서 항온처리한 후, 세척하였다. 실시예 1에 기재된 바와 같이, 결합 혼합물을 각 웰에 첨가하고 플레이트를 실온에서 30분 동안 결합 혼합물과 함께 항온처리하고 세척하여 과량의 환형화 올리고뉴클레오타이드를 제거하고, 37℃에서 1.5시간 동안 RCA 혼합물과 함께 항온처리하였다. 플레이트를 세척하고 검출 프로브의 혼합물을 첨가하고 37℃에서 30분 동안 항온처리하였다. 플레이트를 세척하고 150 μ L의 MSD 판독 완충제로 충전하고 MSD SECTOR 판독기 상에서 즉시 판독하였다.

[0337] 실험의 결과는 도 14에 나타나 있다.

[0338] (b) 분석물 농축 상태를 추가 평가하기 위해 추가 실험을 수행하였다. 일반 실험 조건은 표 9a에 기재되어 있다:

[0339] [표 9a]

PP1 비드를 이용한 포획-유리			
완충제	부피	시간, 온도	농축 인자
액체 상 결합			
희석제 2 (미국 메릴랜드주 록빌 소재 메소 스케일 디스커버리사제)	5 mL	밤새, 4°C	NA
유리			
0 염 용액 (1mM EDTA, 2mg/mL BSA)	100 uL	6 분, 25°C	50X
대조군 조건			
비드 없음, 포획-유리 없음, 항원 + PP1			
비드로의 포획-유리, 농축 단계 없음			
분석 플레이트 결합 (고체상 조건)			
1X PBS	3 uL 10X PBS/mIgG + 30uL 샘플	1.5 h, 실온	NA

[0340]

[0341]

오십(50) μ L의 Dynal MyOne 스트렙타비딘 T1 비드 슬러리를 볼텍싱 후 마이크로원심분리 튜브에 첨가하였다. 비드를 1 mL 희석제 100로 3회 세척하고 1 mL의 포획 올리고뉴클레오티드 Cap 1:9를 EDTA 포함 희석제 100에 첨가하였다. 용액을 실온에서 1시간 동안 회전시키므로써 항온처리하고, 용액은 유리 바이오틴이 EDTA 포함 희석제 100 중 10X 과량으로 급등하였다. 용액을 실온에서 30분동안 회전시키므로써 항온처리하고, 비드를 세척 완충제 1 mL로 3회 세척하였다. 결합 완충제 중 일(1.0) mL PP1을 첨가하고 용액을 실온에서 회전시키면서 40분 동안 항온처리하였다. 튜브를 세척 완충제로 3회 세척하고 1 mL의 희석제 2를 비드에 첨가하고, 혼합한 후, 비드 용액을 항원 수준 2-4에서 1X, 0.5X, 0.25X, 및 0.125X 비드-PP1 농도에 대해 12개 튜브에 걸쳐 나누었다. 필요한 부피의 비드-PP를 대조군 튜브에 옮겼다. 항원 및 비드-PP의 최종 농축에 필요한 HIVp24 및 희석제 2를 총 부피 5 mL로 비드 용액에 첨가하였다. 비드 대조군 튜브는 1X 농축에서만 및 모든 4 수준의 항원에서 유리 PP1을 포함하도록 급등하지 않았다. 튜브를 밤새 4°C에서 회전시키면서 항온처리하고, 1회 1 mL를 옮김으로써 5mL 비드 용액을 1.5 mL 에펜도르프 튜브에 옮겼다. 각 튜브를 세척 완충제로 세척하였다(3회). 비드가 없는 대조군 튜브는 세척하지 않았다. 3번째 세척 후에, 100 μ L의 0 염 용액을 시험 튜브에 첨가하고, 500 μ L의 0 염 용액을 대조군 튜브에 첨가한 후, 상기 튜브들을 6분 동안 25°C에서 항온처리하였다. 상청액을 분석 플레이트에 옮기고 실시예 7(a)에서와 같이 분석하였다. 결과를 하기 표 9b 내지 표 9c에 나타내었다:

[0342] [표 9b]

샘플 #	[C], fg/ml	비드 상의 포획-유리		비드 없음	신호 증가, X
		비-[C]ed	50X [C]- ed	대조군	
1	120	3,764		3,687	
2	12		15,314	369	41.5
3	1.2		1,941	71	NA
4	0.12		280	32	NA
제로			32		

[0343]

[0344] [표 9c]

Ag [C], fg/ml	~비리온 수/ml	~p24 #/ml	30 μ l 중 ~p24 #
120	1000	3,000,000	90,000
12	100	300,000	9,000
1.2	10	30,000	900
0.12	1	3000	90

[0345]

[0346] 약 50배의 신호 증가가 자기 비드를 이용한 분석물 농축 후 관찰되었다. 비농축 샘플 #1은 대조군#1 신호와 유사한 결과를 나타내며, 이는 고효율인 PP-항원 복합체의 유리를 표시한다. 분석물 예비농축을 이용하여, 0.1 fg/mL 미만의 검출을 달성하였으며, 이는 1 비리온/mL 바이러스 존재량에 필적할만했다. 대조적으로, 시판 바이러스 분석은 약 50 카피/mL를 충분히 검출할 수 있으며, 이는 25 비리온/mL에 동등하다. 본 실험에 대해 예비농축을 사용하거나 사용하지 않은 보정 곡선은 도 15에 제시되어 있다.

[0347] **실시예 8. 비스 세팅 프로토콜을 이용한 3-AB RCA/PLA 비드-기초 분석**

[0348] IL-4에 대한 3-AB RCA/PLA 분석을, Dynabead 대신 실리카 비드(____사제)를 사용한 것 외에는 실시예 7에 기재된 바와 같이 수행하였다. RCA 및 검출 항온처리를 37°C에서 정상 상태로 MSD 라지 스폿 멀티-웰 분석 플레이트(미국 메릴랜드주 록빌 소재 메소 스케일 디스커버리사제)에서 수행하였다. 비드는 고정 시약을 포함하지 않았다. 비드는 RCA 항온처리 단계 중에, 용액 부피에 따라, 약 5~8분의 침강 시간으로 중력에 의해 웰의 표면 상에 천천히 침강하게 되었다. 플레이트는 스윙 벡(bucking bucket) 원심분리기에서 플레이트를 회전시킴으로써 세척된다. 예비 시험은 회전 후 비드가 웰 표면에 걸쳐 약간의 구배만을 가진 채 균일하게 분산된다는 것을 나타낸다.

[0349] 프로토콜을 15분 대 90분 RCA 항온처리로 시험하였다. 분석의 민감성 및 동력학적 범위는 자기 포획에 비해 비드 침강 프로토콜을 이용한 15 분 RCA 항온처리를 이용하여 약 10배 개선된다는 점이 밝혀졌다. 민감성은 90 분 RCA 항온처리 단계를 이용하여 추가 개선된다(약 50~100 배 이하).

[0350] 대안적으로, 3-AB RCA/PLA 분석은 본원에 기재된 바와 같이 수행되며, 여기서 비드는 고정 시약을 포함하고 차단제(약 2.5 mg/ml)가 결합 단계 중에 첨가되어 비특이적 결합을 감소시킨다. 다양한 차단제가 사용될 수 있으며, 이는 mBSA, 전단 폴리(A), 폴리BSA-I, mIgG, 트윈, 폴리BSA-II, 효모 RNA, mBSA + 폴리(a), 및/또는 폴리BSA + 폴리(A)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0351] **실시예 9. 변형 가교 면역분석 포맷**

[0352] 전술한 바와 같이, 실시예 1에 기재된 절차는 TNF-알파 모델 시스템을 사용한 가교 및 이소타이핑 Ig 분석, Hep B 표면 항원을 사용한 가교 및 이소타이핑 Ig 분석, 및 라임 C6을 사용한 가교 및 이소타이핑 Ig 분석에 사용하

였다. 상기 절차에 대한 변형은 도 19에 나타나 있으며 여기서 자가항체(1901)를 (i) PP2-변형 항-인간 Ig 항체(1902), 및 (ii) PP1-표지된 자가항원(1903) 및 이어서 실시예 1에 기재된 바와 같은 PLA-RCA를 이용하여 검출하였다. 도 19에 나타난 포맷은 또한, 포획 모이어티, 이 경우에는 자가항원을 표면(1906)에 부착함으로써 자가항원(1905)에 부착된 표적화 모이어티(1904) 및 이의 상보체의 이용을 나타낸다.

[0353] 마찬가지로, 항체, 예를 들면 자가항체에 대한 면역분석은 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행될 수 있으며, 이 때 상기 항체에 대한 항원은 (표면에 직접 또는 표적화 모이어티 및 이의 상보체를 통해 부착된) 포획 모이어티로서 이용되며, 두 검출 종은 PP1에 부착된 이소타입 항체, 및 PP2에 부착된 항원이다(또는 역의 경우도 가능). 샌드위치 복합체가 형성되며, 실시예 1에 기재된 바와 같은 PLA-RCA이 이어진다. 상기 변형된 분석 포맷은 애플리곤을 표면에 부착하기 위한 고정 모이어티를 또한 포함할 수 있다.

[0354] 실시예 10. 인접성 결찰 롤링 서클 주형의 생성을 위한 생합성 방법

[0355] 인접성 결찰 롤링 서클 주형은 생합성적으로 생성될 수 있다. 본 방법은 효과적인 용액-기초 결찰 및 RCA 반응 시리즈에서 RCA 생성물을 생성하기 위해 초기에 고도 정제되고 우수하게 특징규명된 주형을 이용한다. 본 과정은 또한 반응의 선택성을 향상시키도록 비드 상에서 수행될 수 있다.

[0356] 시드(seed) RCA 주형의 증폭에 이어, 단일 가닥 생성물을 짧은 합성 서열과의 조합으로 독특한 제한 효소를 이용하는 부위 특이적 절단으로 처리한다. 따라서, RCA 주형은 이의 자체 생성물로부터 생성된다. 생합성 생성된 RCA 주형은 정확한 5' 및 3' 말단을 100% 함유하는 생성물을 생성하도록 HPLC 또는 겔 정제로 처리된다. 이 방법은 도 20a에 예시되어 있다. 이 방식은 원하는 결찰 부위에 절단을 유도하도록 제한 부위의 RCA 주형 내로의 부가를 필요로 한다. 약 14-20개의 염기를 제한 부위로부터 절단하는 것과 같은 제한 효소가 바람직하다. 대안적으로 단일 가닥 주형은 또한 M13 파지로부터의 단일 가닥 DNA, 또는 이의 유사물과의 조합으로 이 방식을 이용하여 밀리그램 양을 생성할 수 있다. 이 방식은 RCA 주형의 RCA-기초 증폭을 수행할 필요를 제거할 수 있으며, DNA 생성을 위한 M13 벡터 내로의 주형의 클로닝만을 필요로 한다. 이는 도 20b에 예시되어 있다.

[0357] 실시예 11. 샘플 다중화

[0358] 본원에 기재된 방법은 분광 특징의 이용에 기초한 다중 샘플에 이용된다. 다중화 샘플은 사용자에게 내부 보정 및 제어, 비용 감소 및 처리량 증가를 수행하는 능력을 제공한다. 공간 및 분광 특징에 기초한 독특한 특징의 사용을 통한 다중 분석물의 능력은, 그 분석물이 또한 다중 샘플로 이용될 수 있도록 암호화된다.

[0359] 샘플은 영상화된 증폭된 생성물의 형광 염료 비 암호화를 이용하여 다중화된다. 샘플 중의 각 분석물에 대하여, 독특한 롤링 서클 생성물을 생성할 수 있는 독특한 분석 시약의 세트를 이용하며, 각각은 독특한 검출 올리고뉴클레오티드로 검출 가능하다. 독특한 분석 시약의 세트의 합성 및 이용은 예를 들면 실시예 1에 기재된 절차에 따라 수행될 수 있다. 도 21에 예시된 바와 같이, 관심있는 분석물을 함유하는 각 샘플 A 및 B는, 각각 독특한 인접 프로브를 보유하는, 그 분석물에 특이적인 2개의 검출 항체와 함께 항온처리된다. 이 항온처리 단계는 독특한 인접 프로브 세트를 그 샘플 중의 분석물과 연결시킴으로써, 분석물과의 두 항체 복합체를 형성하고 샘플을 "암호화"한다. 이 항온처리에 이어, 암호화 샘플을 모으고, 혼합물로서 단일 포획 항체 표면에 첨가한 후, 항온처리하고 세척하였다.

[0360] 세척 단계에 이어서, 포획된 세 항체 복합체, 각 인접 프로브 세트에 대한 선형 롤링 서클 주형을 첨가하고, 혼합물을 실시예 1에 기재된 바와 같은 혼성화 조건으로 처리하였다. 이 혼합물은 결찰되어 롤링 서클 주형을 생성하고, 세척되고, 롤링 서클 증폭으로 처리된 후, 세척된다. 각 롤링 서클 애플리곤은 상보적이고 독특한 검출 올리고뉴클레오티드에 혼성화되고, 2 이상의 형광 표지의 비(들)에 기초한 독특한 분광 특징으로 암호화된다. 검출 프로브의 혼성화에 이어, 분석 표면을 영상화하고 각 롤링 서클 생성물을 이의 분광 특징, 예를 들면, 2 이상의 형광 표지의 비(들)에 기초하여 복호화하고, 카운팅하였다. 이는 다수의 샘플에서의 분석물 수준의 결정을 가능하게 한다. 이 방식을 이용하여, 사용자는 샘플과 분석물 다중화를 결합하여, 대조군 샘플과 시험에서 다수의 분석물을 동시에 시험할 수 있다.

[0361] 실시예 12. 지방단백질 복합체의 검출

[0362] 본원에 기재된 방법은 HDL 및 LDL과 같은 지방단백질 복합체에 존재하는 단백질 복합체 세트를 검출 및 정량화하기 위해 사용된다. 예를 들면, 실시예 1에 기재된 방법을 이용하여, 세 상이한 단백질 및/또는 에피토프를 지방단백질 복합체 내에서 검출하며, 따라서, 환자의 지방단백질 내의 단백질의 프로필을 분석할 수 있다.

[0363] 인간 혈액에서, 지방단백질은 5가지 큰 그룹 HDL, LDL, IDL, VLDL 및 키로미크론으로 분류된다. 이들 중에서,

HDL 및 LDL 분획은 심혈관 건강의 위험 마커로서 가장 큰 임상적 관심을 받고 있다. 이러한 핵심 지방단백질은 다수의 단백질 및 지질의 복합체로 구성된다. 상기 지방단백질과 관련된 단백질은 이의 기능에 필수적인 단백질 및 패신저(passenger) 단백질로 구성된다. 이러한 지방단백질은 개인의 위험 프로필을 변형시키는 산화와 같은 변형을 거칠수도 있다. 예를 들면, 보다 높은 수준의 산화 HDL 및 LDL은 부정적인 심혈관 사건의 위험 증가와 연관된다. LDL은 통상적으로 두 코어 단백질 Apo(a) 및 ApoB, 및 지질로 구성된다. 증가된 Apo(a)는 심장 질환의 위험 증가와 관련되며; 추가로, Apo(a) 단백질의 길이 변화는 변경된 위험 프로필과도 연관된다. Apo(a) 단백질은 크기 다형성으로 인해 크기가 다양하며, 이는 LPA 유전자에서의 소위 크링글(kringle) 반복의 가변적인 수에 의해 야기된다. LDL 입자에서의 ApoB는 다양한 조직에서의 LDL 수용체에 대한 리간드를 운반한다. 고수준의 ApoB는 플라그 형성과도 관련되며, 심혈관 질환을 야기한다. HDL은 통상적으로 ApoA1, ApoE, ApoC 및 ApoA-II를 포함하는 코어 단백질 세트에 구성된다. 이러한 코어 단백질 외에, HDL은 의료적 가치를 또한 갖는 추가 단백질과 연관된 것으로도 공지되어 있다. 예를 들면, HDL 관련 SAA 및 SP-B는 심장병 및 사망률과 연관된 것으로 입증되었다. ApoA-II 상승을 통한 HDL 구성에서의 변화는 죽종 형성(atherogenic) 위험에도 연결되어 있다.

[0364] 실시예 1에 기재된 절차에 따라, 지방단백질 복합체에 대한 다중화된 인접성 분석을 도 22에 요약된 바와 같이 수행하였다. 도 22는 HDL 지방단백질 복합체의 검출을 예시하며, 이때 코어 단백질 각각에 대해 특이적인 포획 항체는 표면에 고정화되어 지방단백질 복합체를 표면에 결합시킨다. 추가 코어 단백질에 대해 특이적인 검출 항체가 첨가되며, 각각은 인접 프로브를 보유한다. 분석은 실시예 1에 기재된 바와 같이 완료되었다.

[0365] 본 발명은 본원에 기재된 구체적인 실시양태에 의해 범위 면에서 한정되어서는 안 된다. 실제로, 본원에 기재된 변경 이외에 방법의 다양한 변경이 상기 설명 및 첨부된 도면으로부터 당업자에게 자명해질 것이다. 이러한 변경은 특허청구범위 내에 있다. 다양한 공개문헌들이 본원에서 인용되어 있고, 이들의 개시내용은 전체로서 참고로 도입된다.

[0366]

참고문헌

1. 미국 특허 제 7,306,904 호
2. 미국 특허 제 7,320,860 호
3. 미국 특허 제 7,351,528 호
4. 미국 특허 제 7,192,703 호
5. 미국 특허 제 6,878,515 호
6. Zhou et al., Genome Biology (2004), 5: R28
7. Dean et al., Genome Research (2001), 11: 1095-1099
8. Soderberg et al., Methods (2008), 45: 227-232
9. Fredriksson et al., Nature Biotech (2002), 20: 473-477
10. Fredriksson et al., Nature Methods (2007), 4(4): 327-329
11. Vincent et al., EMBO Reports (2005), 5(8): 795-800
12. Gajadjar et al., Biotechniques (2010), 48(22): 145-152
13. Schallmeiner et al., Nature Methods (2007) 4(2): 135-137
14. Ericsson et al., Nucl. Acids Research (2008), 36(8): e45
15. Darmanis et al., Biotechniques (2007), 43: 443-450
16. Dahl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (2004), 101(13): 4548-4553
17. Weibrecht et al., Expert Rev. Proteomics (2010), 7(3): 401-409
18. Spits et al., Nature Protocols (2005), 1(4): 1965-1970
19. Nordengrahn et al., Vet. Microbio (2008), 127: 227-236
20. Vuoriluoto et al., Mol. Oncology (2011), 5: 105-111
21. Zhang et al., Clinica Chimica Acta (2006), 363: 61-70
22. Andras et al., Mol. Biotech. (2001), 19: 29-44
23. Schweltzer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (2000), 97(18): 10113-10119
24. Jeong, et al., Cell. Mol. Life Sci. (2009), 66: 3325-3336

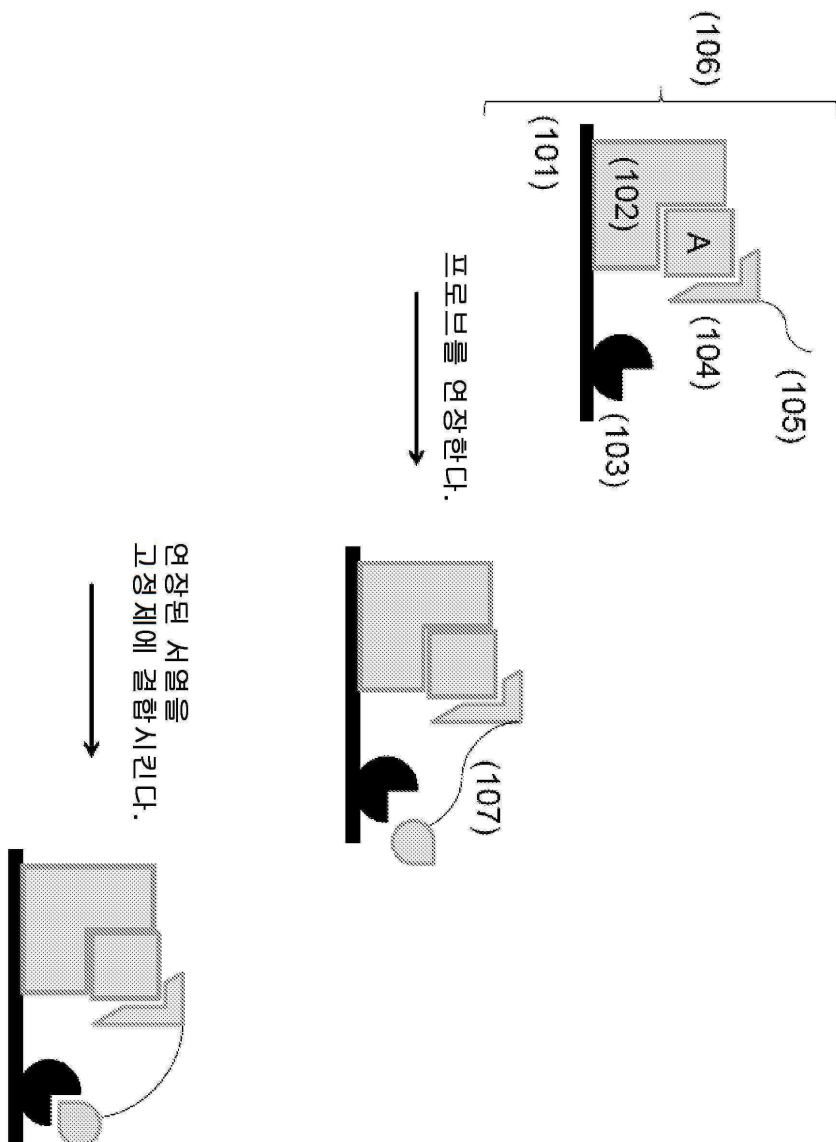
[0367]

25. Gill et al., Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids (2008), 27: 224-245
26. Gullberg, et al., Current Op. in Biotech. (2003), 14: 82-86
27. Gustafsdottir, et al., Clinical Chemistry (2006), 52(6): 1152-1160
28. 미국 특허 공보 제 20100075862 호
29. 미국 특허 제 8,222,047 호
30. 미국 특허 제 8,236,574 호
31. 미국 특허 제 8,338,776 호
32. 미국 특허 공보 제 20110212537 호
33. 미국 특허 공보 제 20120196774 호
34. 미국 특허 공보 제 20120289428 호
35. Kopecky, C., et al., Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2014 Nov. 25
36. Watanabe, J., et al., Arthritis Rheum. 2012 Jun; 64(6): 1828-37
37. Ribas, V., et al., Circ. Res. 2004 Oct. 15; 95(8): 789-97

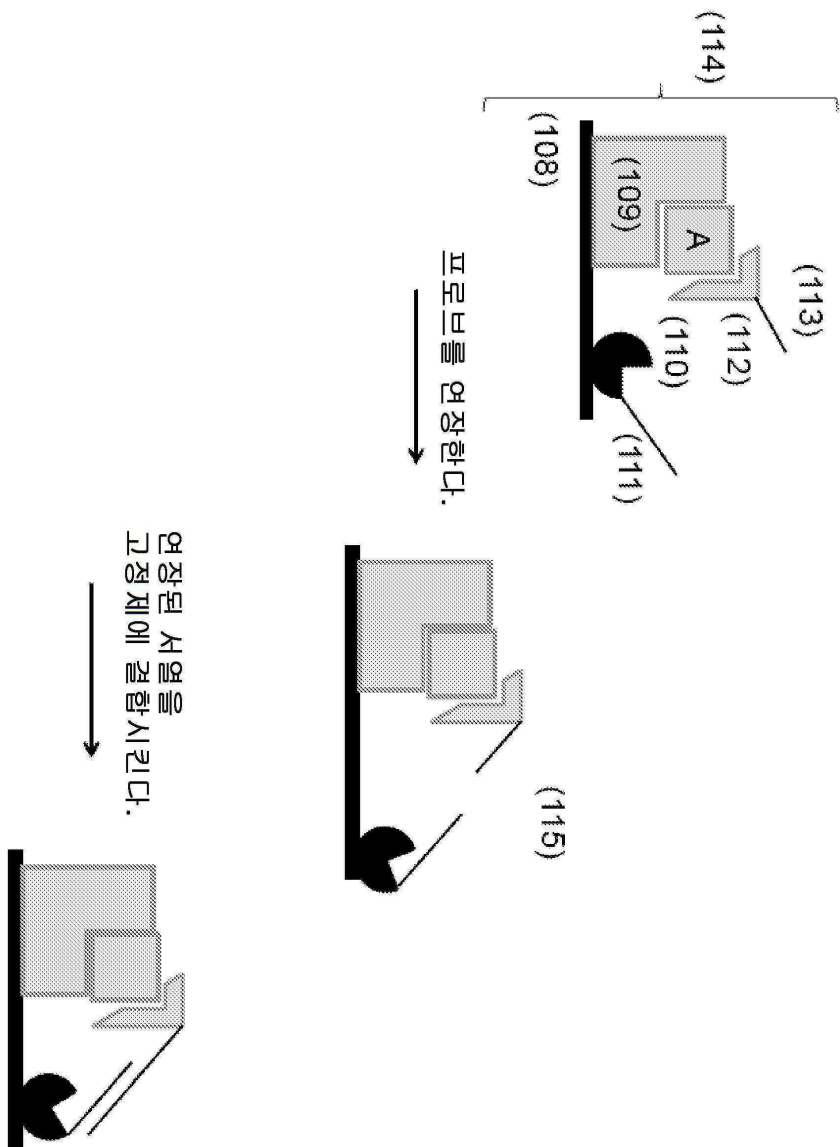
[0368]

도면

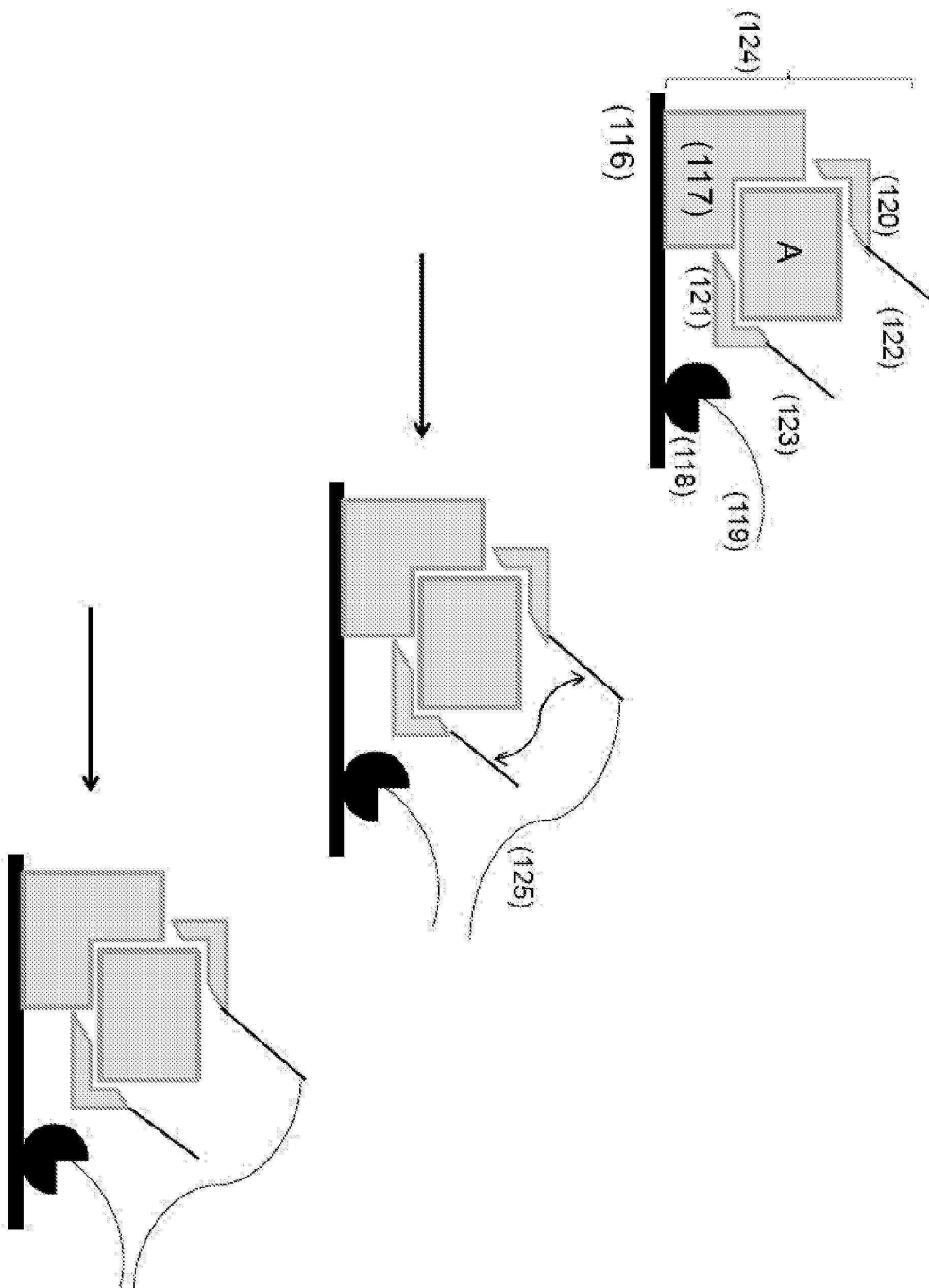
도면1a



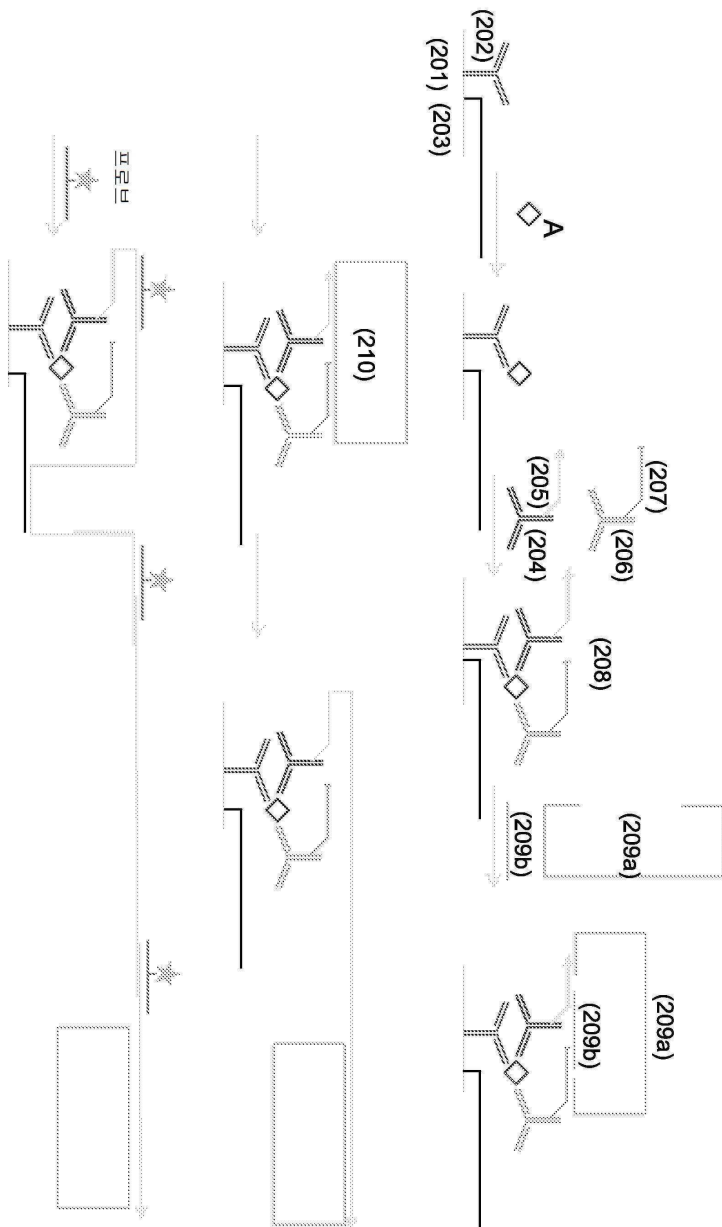
도면 1b



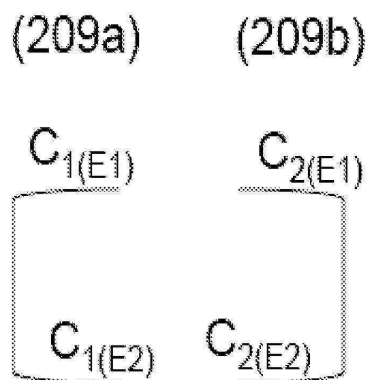
도면1c



도면2a

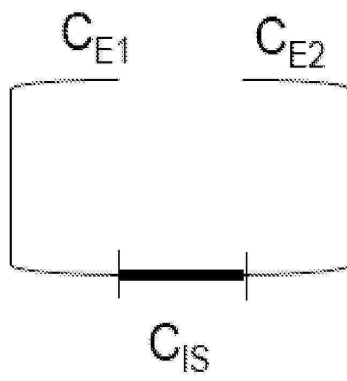


도면 2b

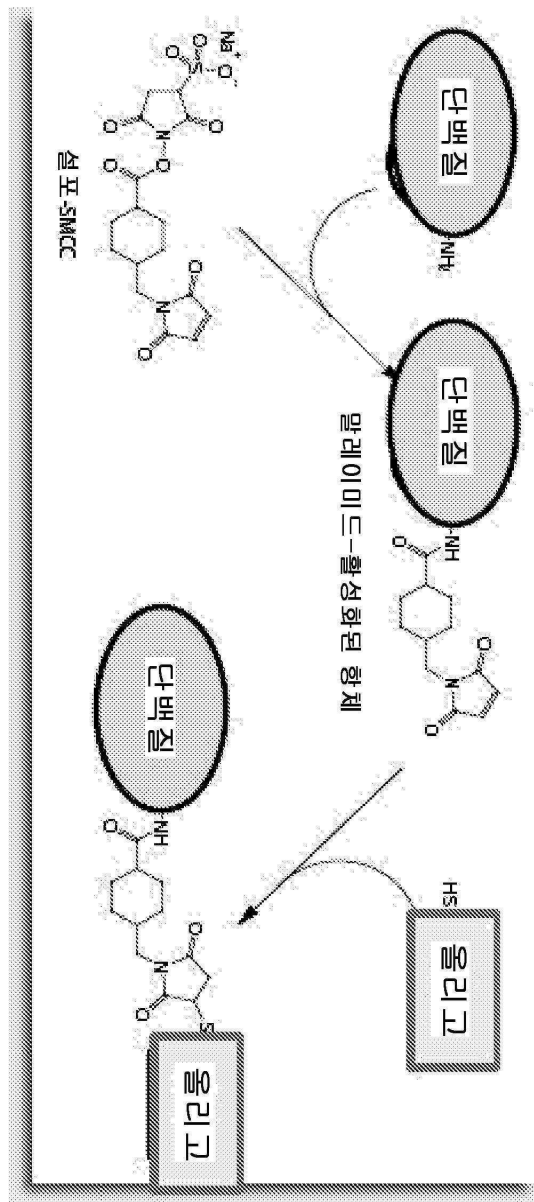


도면2c

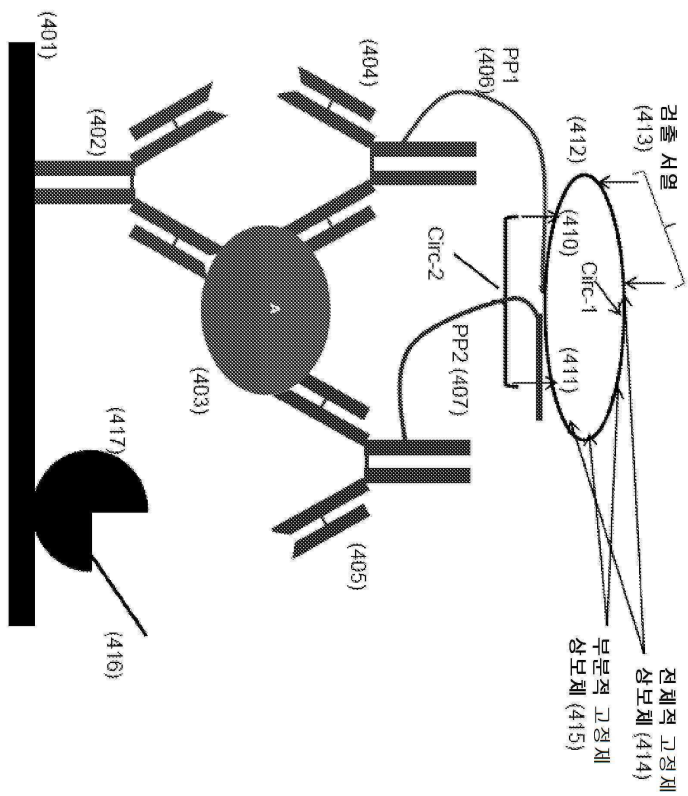
(211)



도면3



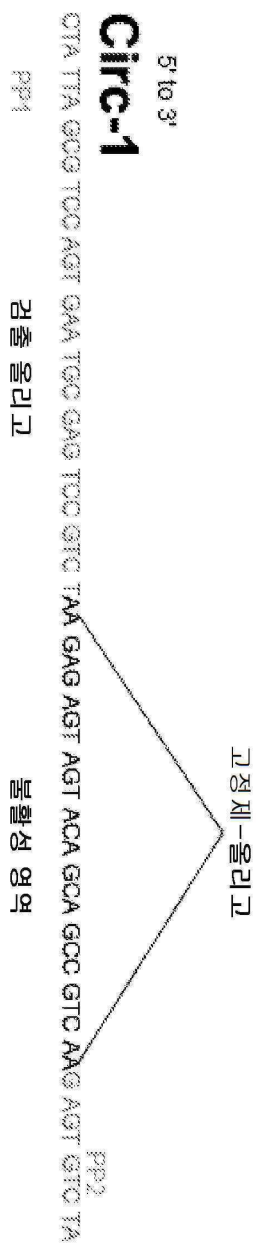
Circ 1 (408): CTA TTA GCG TCC AGT GAA TGC GAG TCC GTC TAA GAG AGT AGT AGA GCA GCC GTC AAG AGT GTC TA
Circ 2 (409): GTT CTG TCA TAT TTAAGC GTC TTA



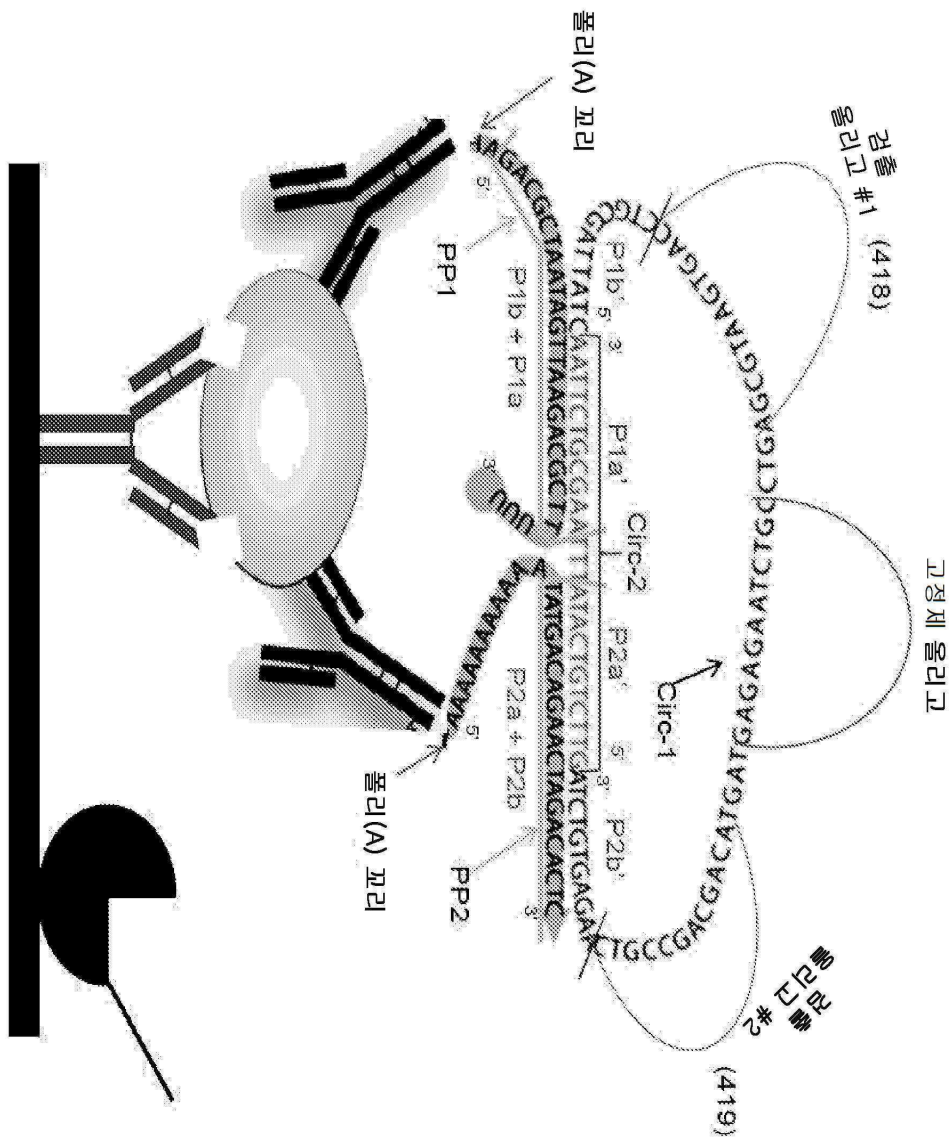
PP1: AAAAAAAAAAGACGC TAA TAG TTAAGA CGC TTU UU
PP2: AAAAAAAAAATA TGA CAG AAC TAGACA CTC TT

도면4a

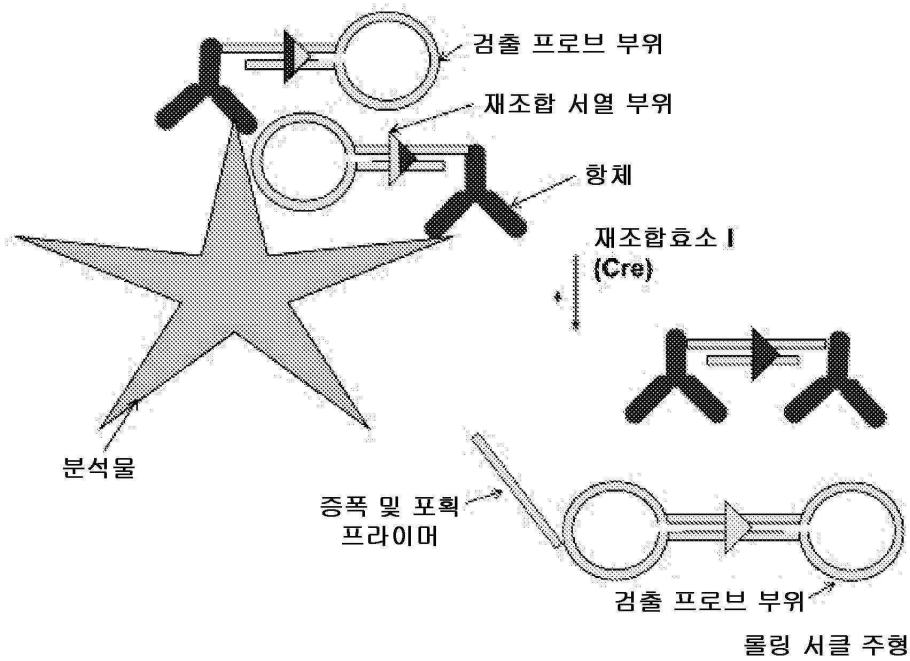
도면4b



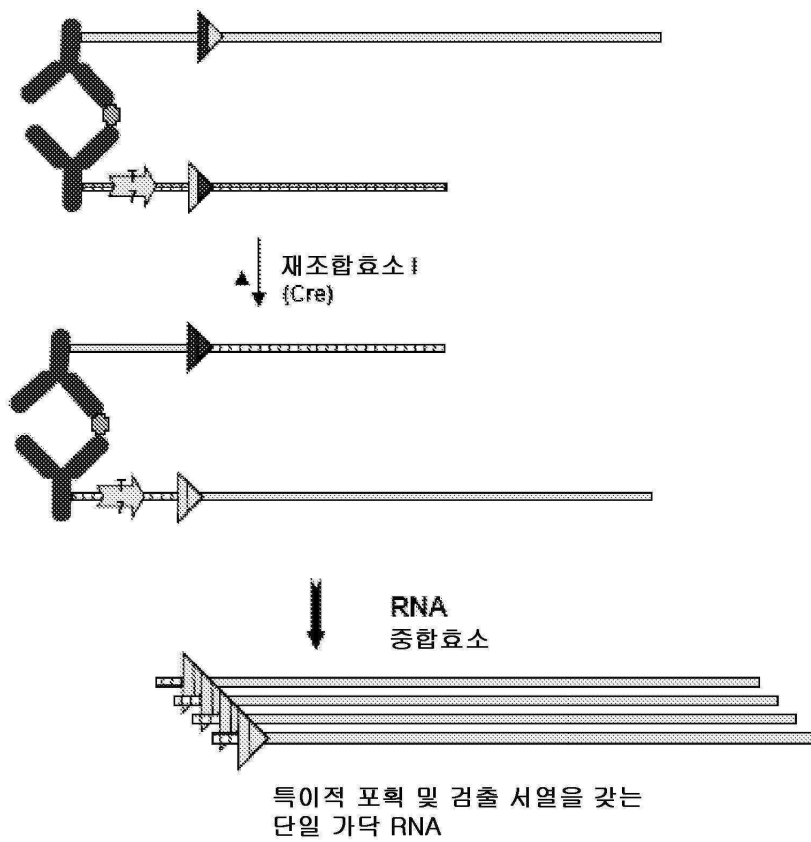
도면4c



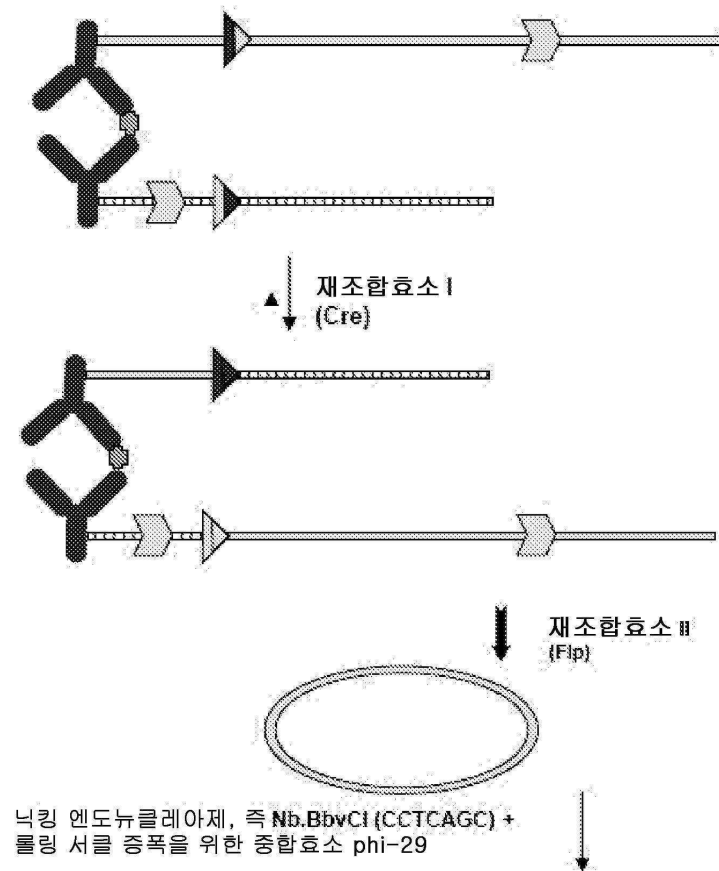
도면5



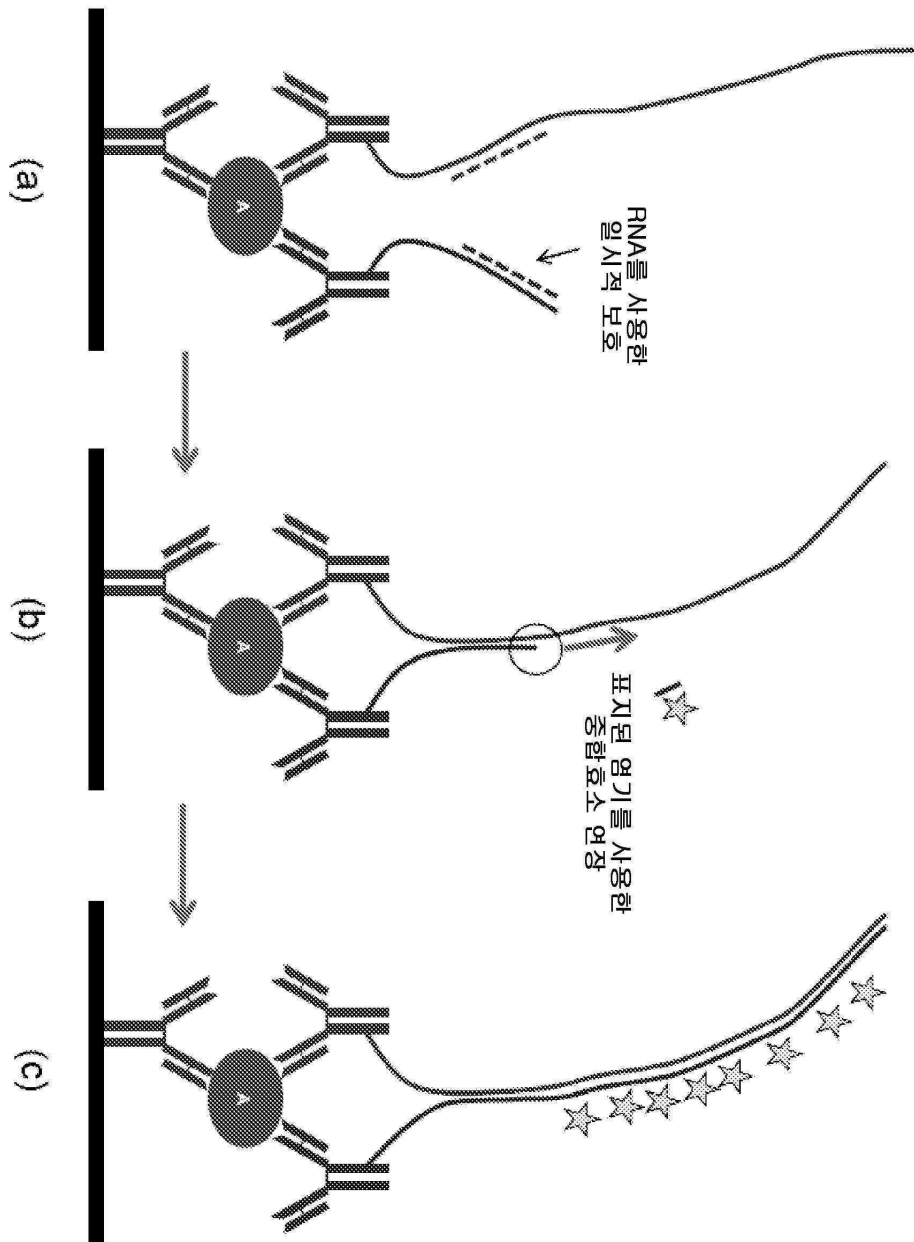
도면6a



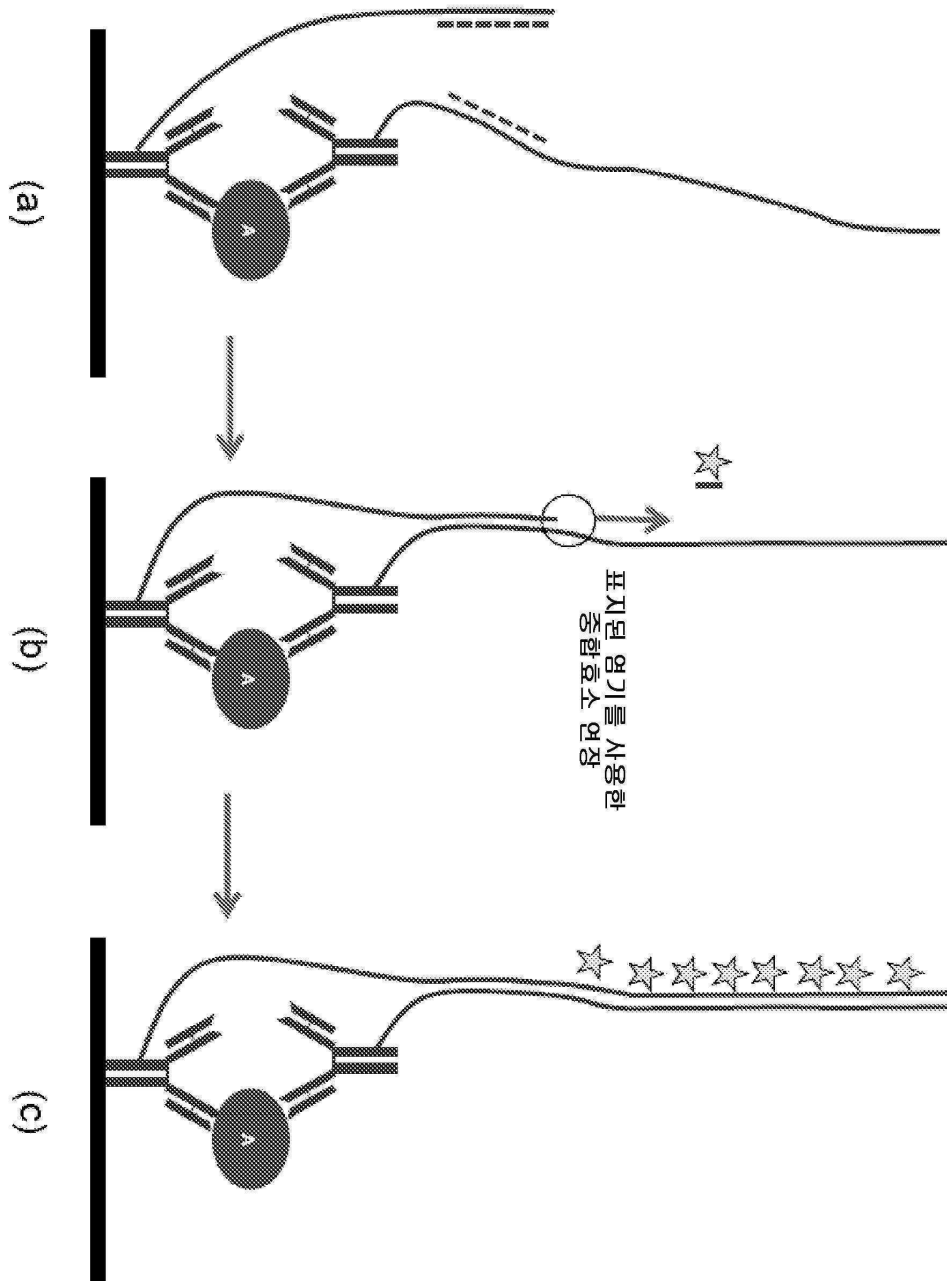
도면 6b



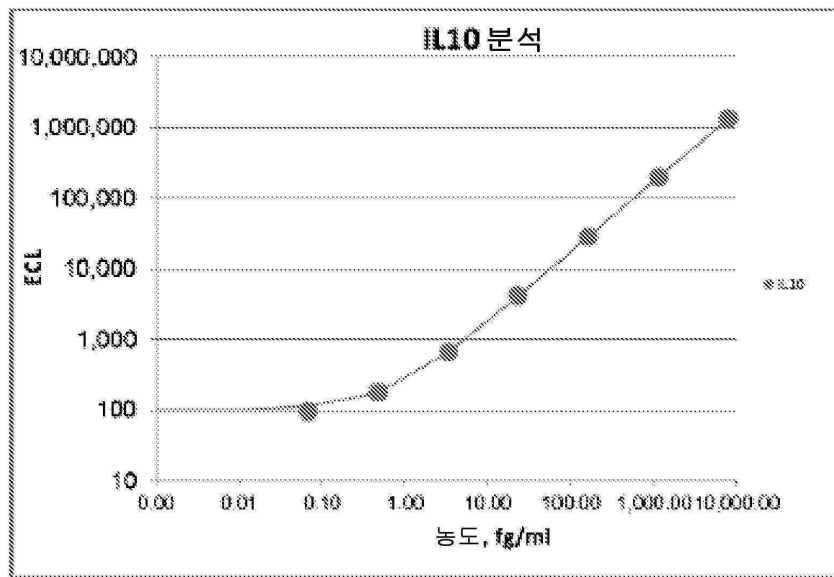
도면7



도면8

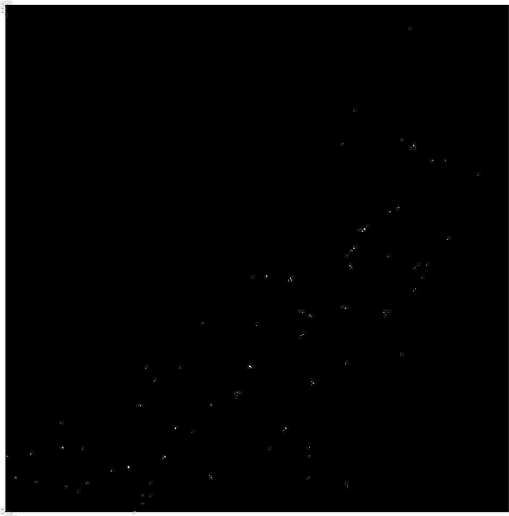


도면9

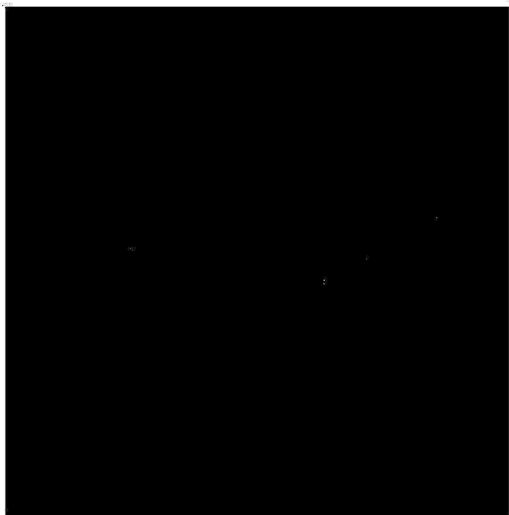


도면10

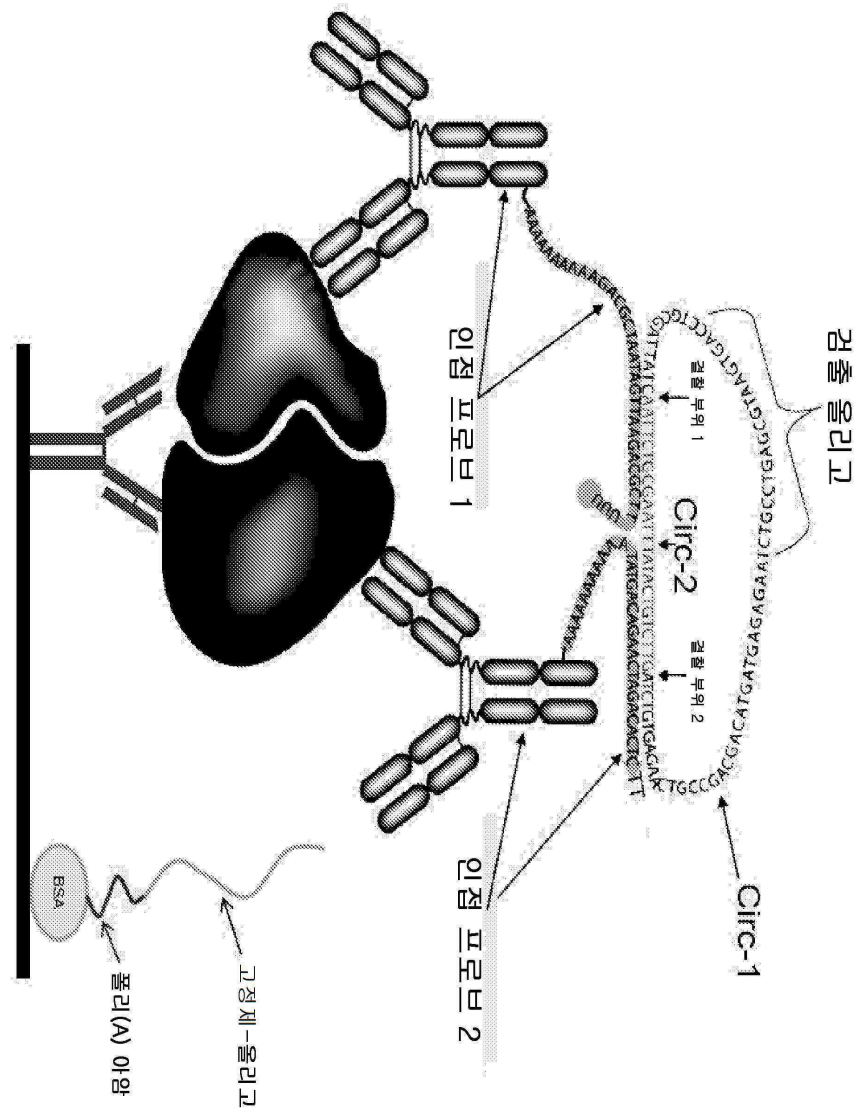
(a)



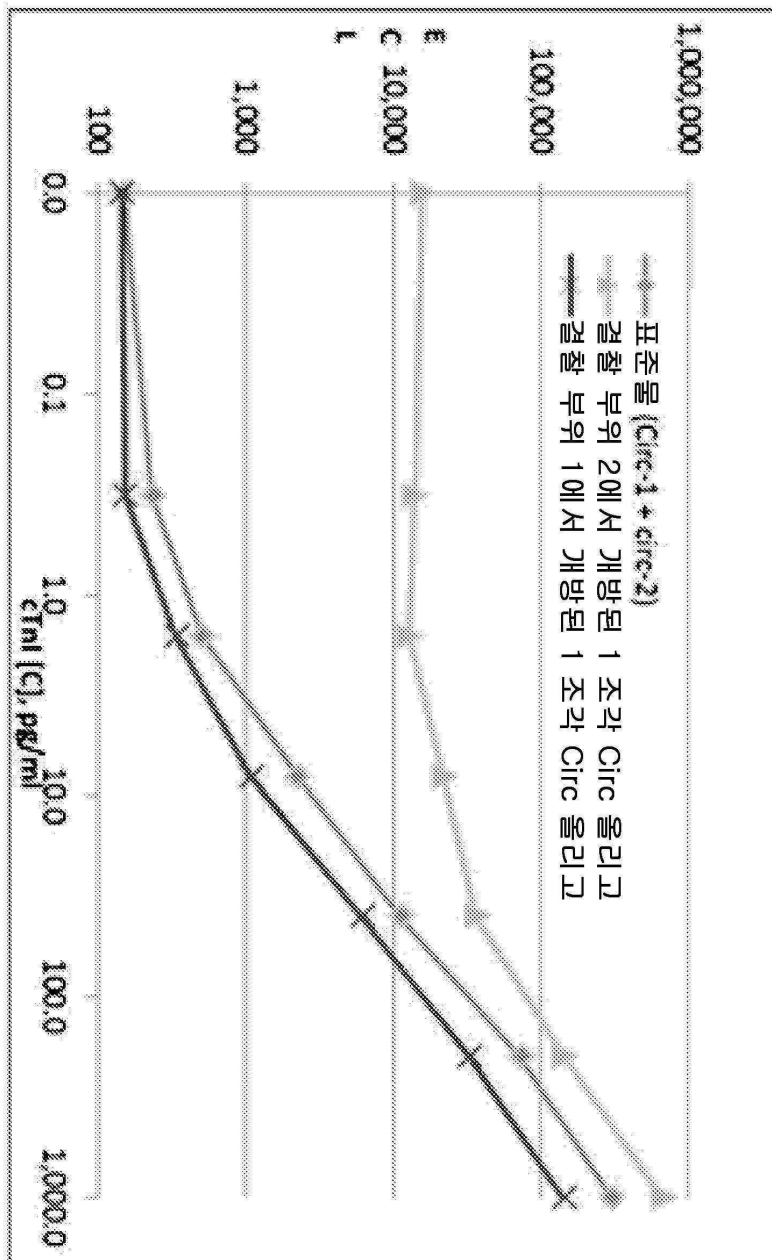
(b)



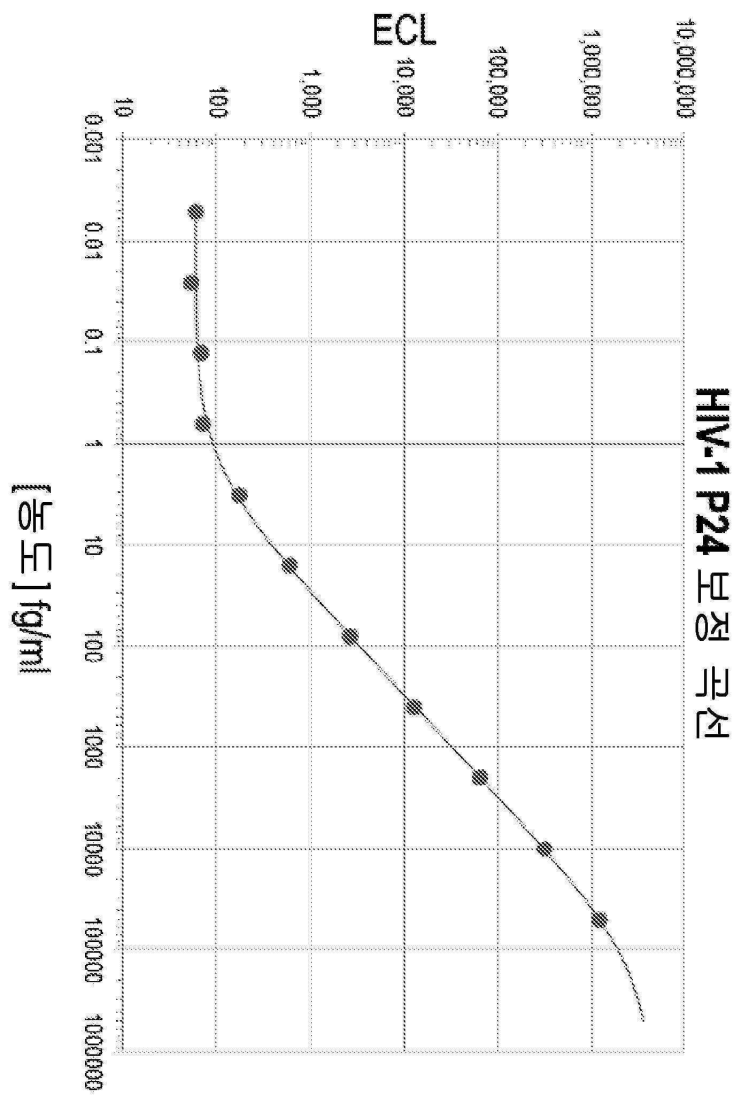
도면11a



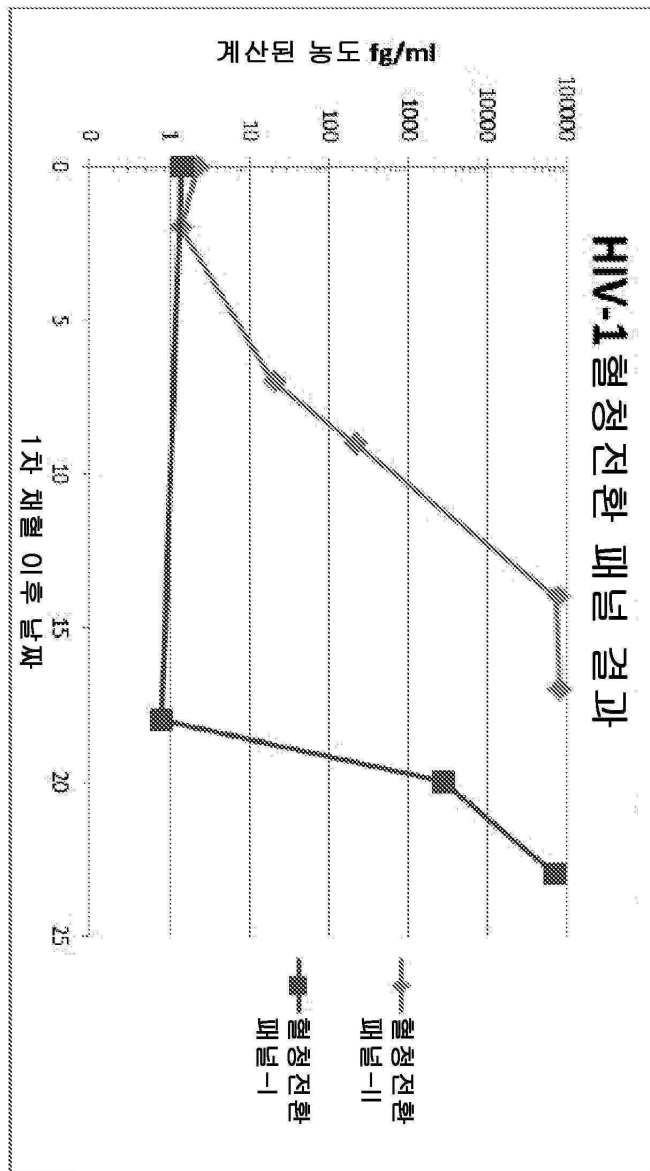
도면11b



도면12



도면13



도면14

(a)

HNS-24 분석			유리 열 [C] 온도						유리 열 [C] 온도					
			0 열			10mm			0 열			10mm		
분석	결함 [모노+]	비드-포획율리코	25C	30C	37C	25C	30C	37C	25C	30C	37C	25C	30C	37C
비드 포획-유리	1M	Cap 1:13	1,528	17,429	45,572	1,029	8,251	32,704	8%	4%	13%	20%	9%	28%
		Cap 1:11	22,642	42,265	34,946	20,260	32,714	22,385	14%	9%	7%	14%	12%	11%
		Cap 1:10	43,019	43,260	34,771	41,851	37,504	33,651	15%	7%	14%	4%	27%	15%
		Cap 1:9	45,161	42,934	42,337	43,245	42,635	40,488	10%	12%	4%	8%	9%	4%
		Cap 1:13	1,050	9,032	40,514	1,315	11,873	37,773	20%	9%	12%	17%	15%	13%
0.5M		Cap 1:11	13,206	35,266	33,755	25,633	32,878	24,881	3%	16%	19%	12%	11%	14%
		Cap 1:10	28,898	38,518	37,488	45,106	44,400	35,133	12%	11%	15%	11%	15%	12%
		Cap 1:9	30,627	38,024	40,903	40,526	44,581	42,991	17%	17%	29%	10%	13%	9%

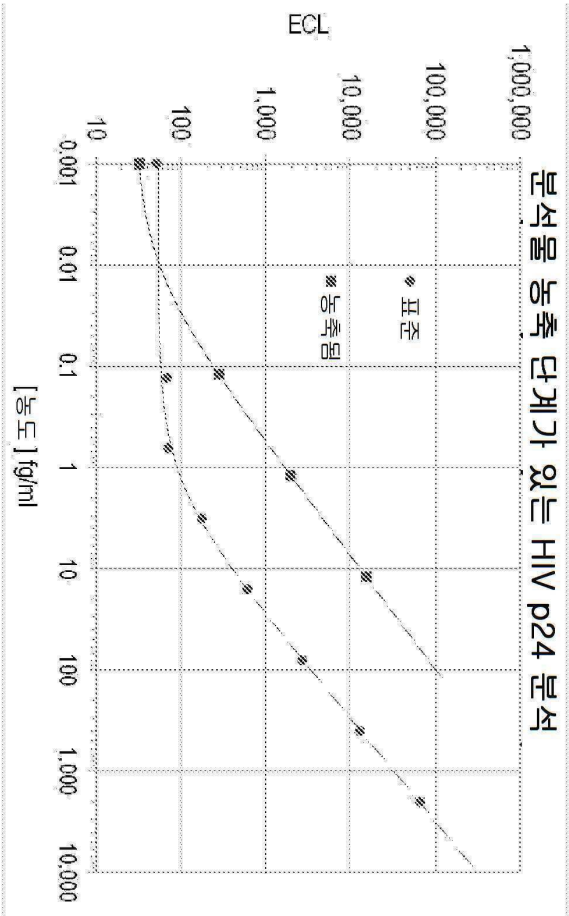
대조군 - 포획율리코 없는 비드				
저렴 처리 없음				
결함 [모노+]	25C	30C	37C	
1M	51,373	50,913	50,623	
0.5M	32,577	48,212	47,212	
1M	13%	9%	7%	
0.5M	16%	8%	8%	

(b)

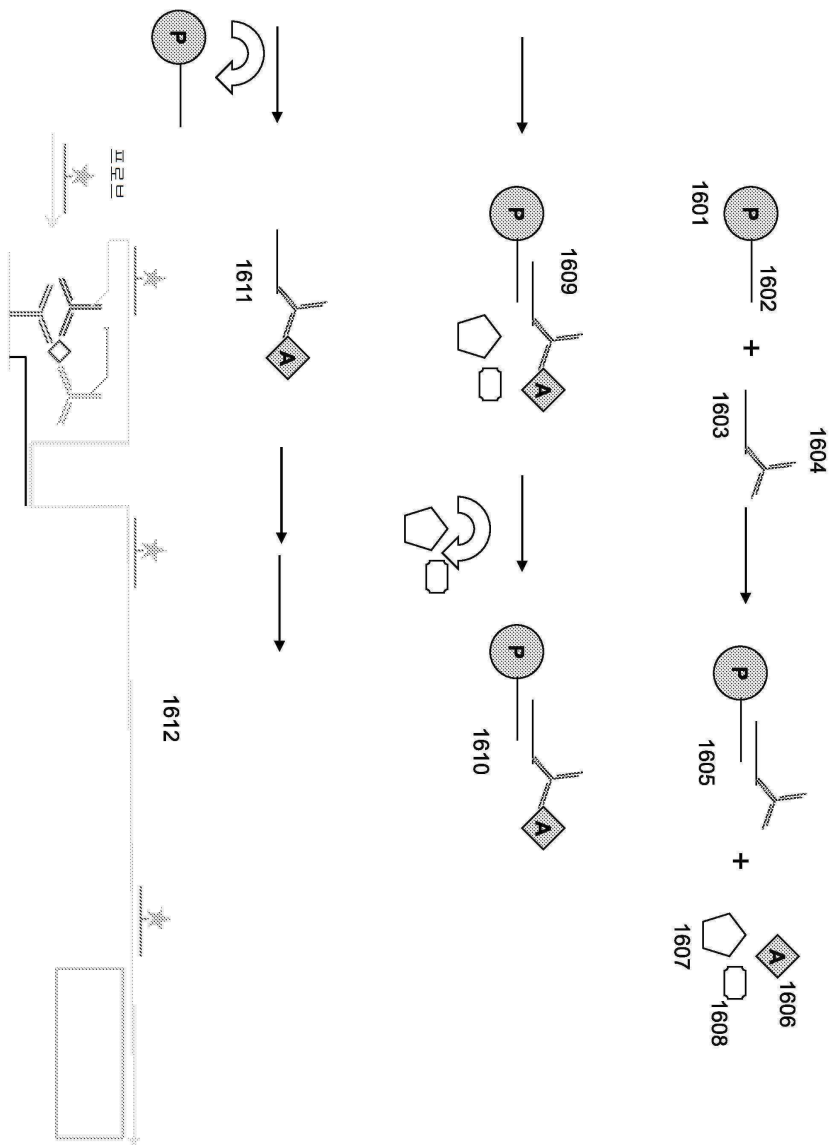
직렬 플레이트 분석		ECL		NSB	
		DI 2/11	241,492	80	
		1M	107,573		
		0.5M	213,186	105	
		DI 2/11		32	
		1M		5%	
		0.5M		9%	32

(c)

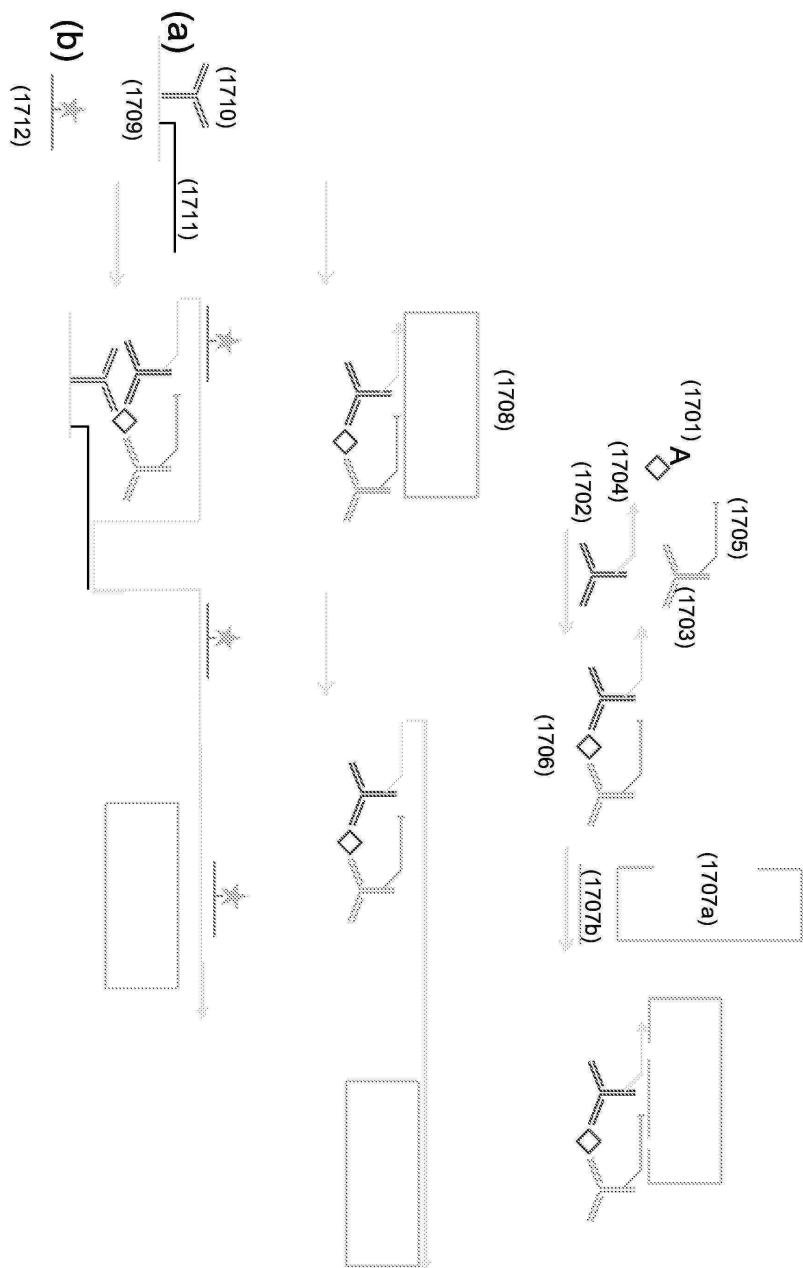
도면15



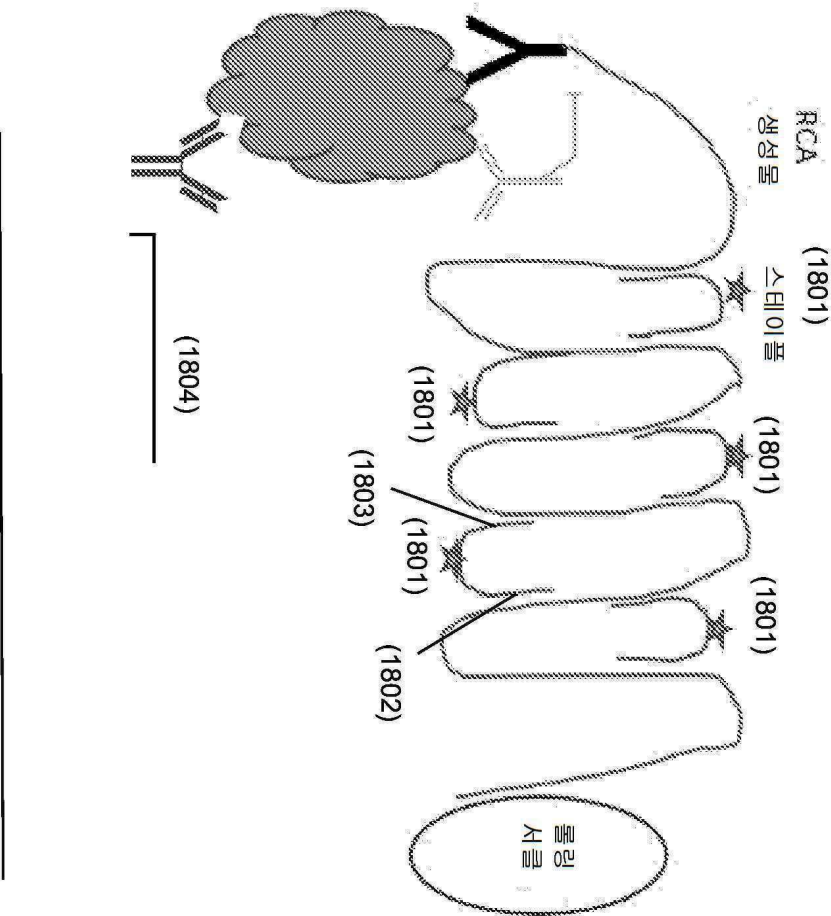
도면16



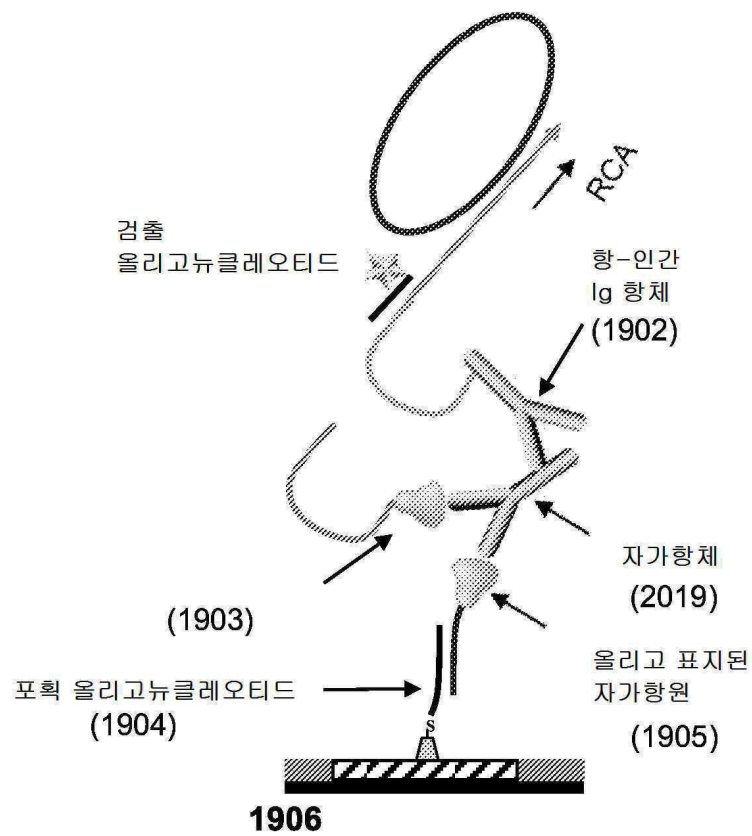
도면17



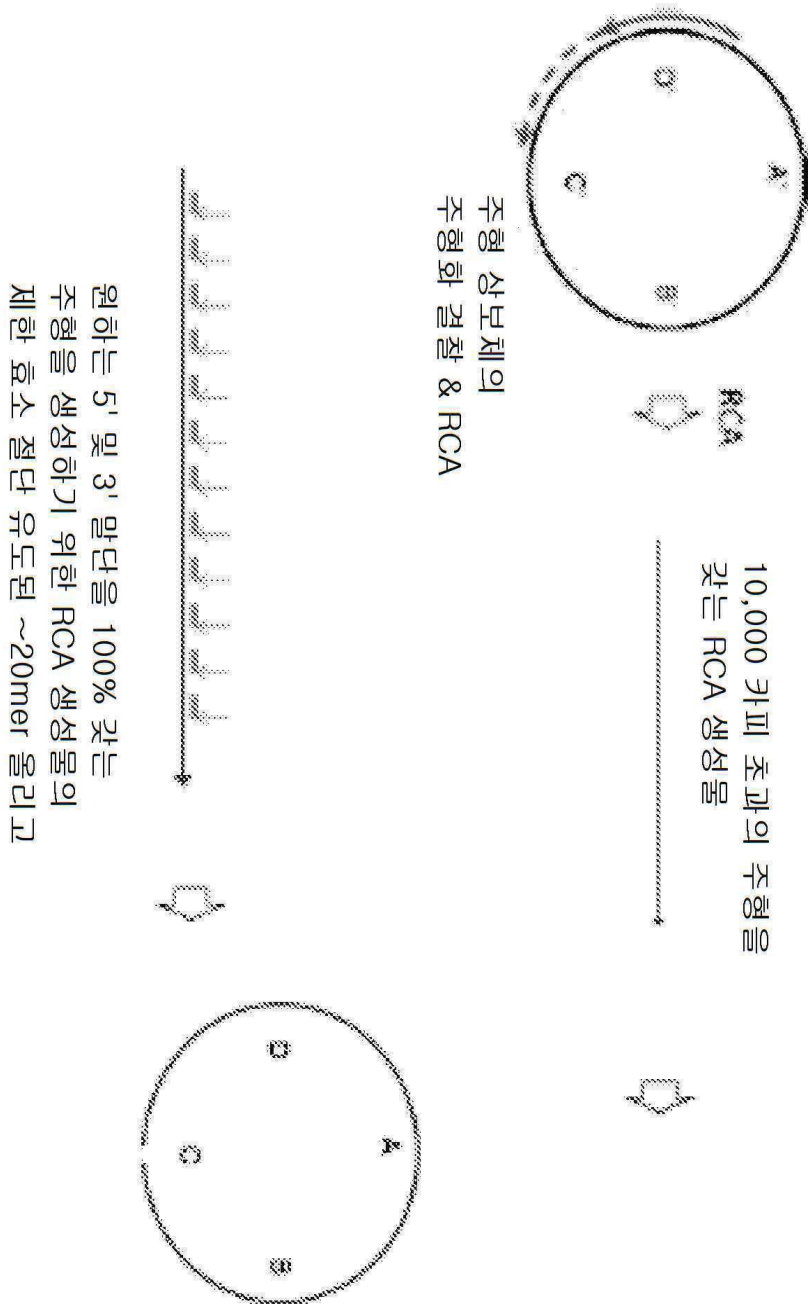
도면18



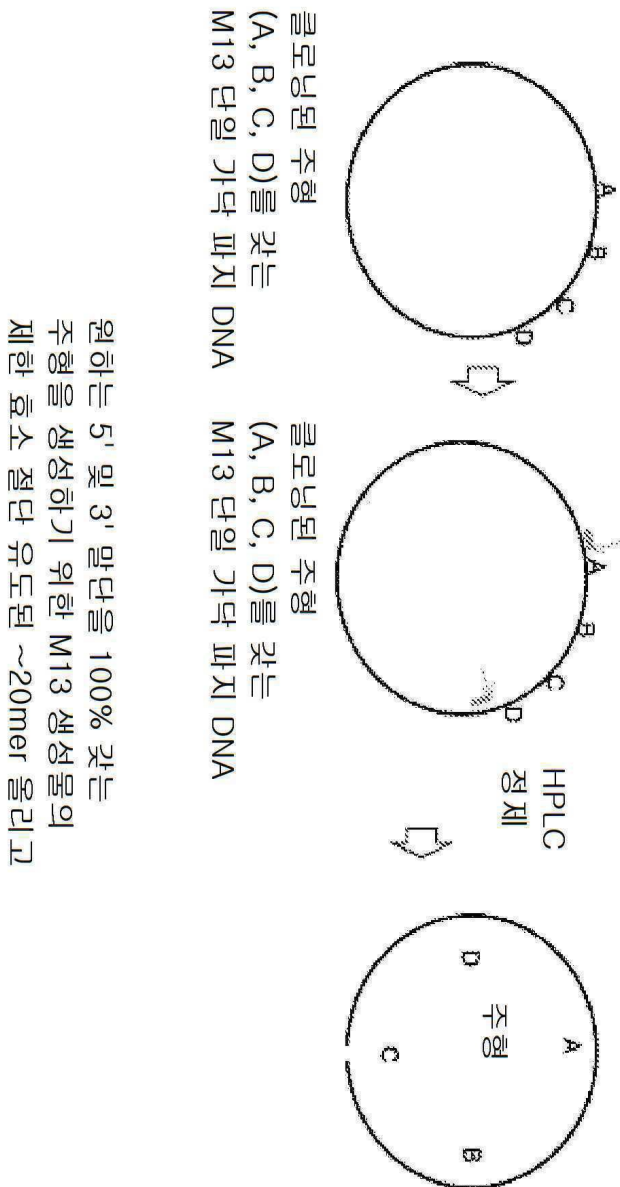
도면19



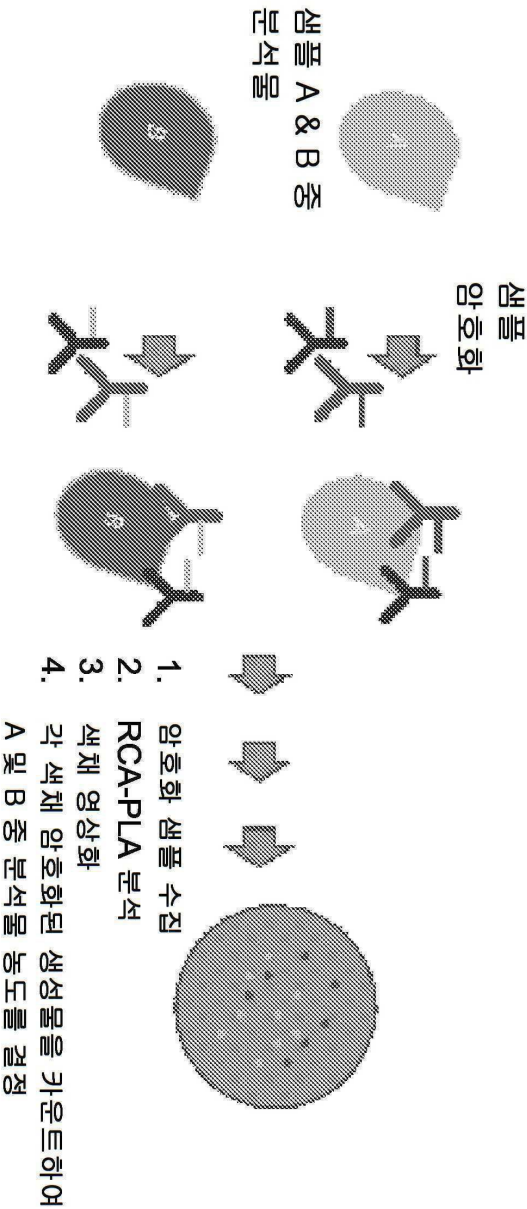
도면20a



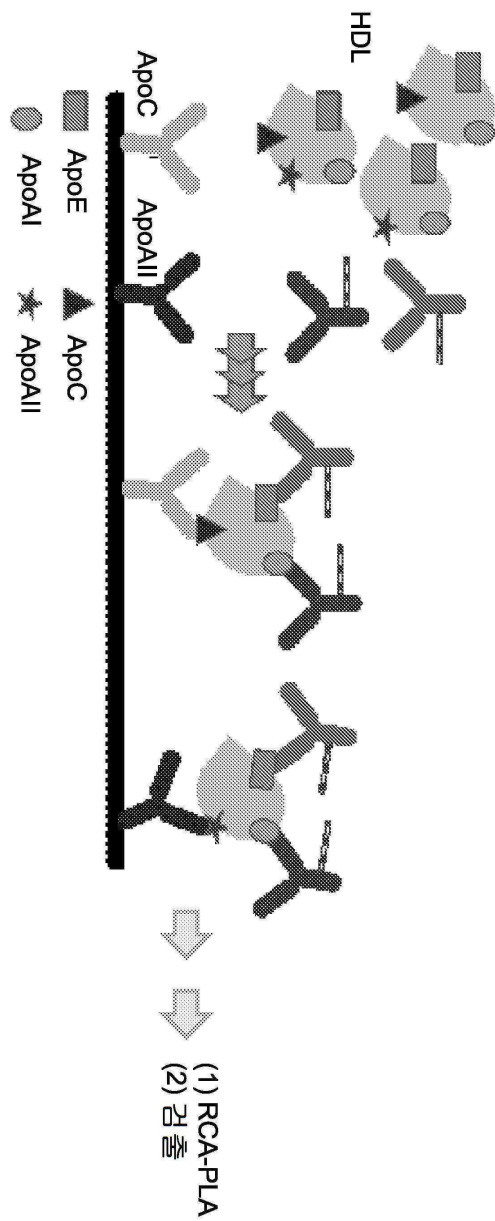
도면20b



도면21



도면22



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MESO SCALE TECHNOLOGIES, LLC.

<120> IMPROVED ASSAY METHODS

<130> 31085

<150> 61/993,581

<151> 2014-05-15

<150> 62/013,823

<151> 2014-06-18

<150> 62/048,489
 <151> 2014-09-10
 <150> 62/049,520
 <151> 2014-09-12
 <150> 62/055,093
 <151> 2014-09-25
 <160> 22
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Thiol-modified proximity probe 1
 <220><221> modified_base
 <222> (33)..(35)

 <223> um
 <400> 1
 aaaaaaaaa gagcctaata gttaagacgc ttuuu 35
 <210> 2
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Thiol-modified proximity probe 2
 <400> 2
 aaaaaaaaa tatgacagaa ctagacactc tt 32
 <210> 3
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anchoring oligonucleotide
 <400> 3
 aagagagtag tacagcagcc gtcaaaaaa aaaaa 35
 <210> 4

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Circ-1

<400> 4

ctattagcgt ccagtgaatg cgagtcggtc taagagagta gtagagcagc cgtcaagagt 60
gtcta 65

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Circ-2

<400> 5

gttctgtcat atttaagcgt cttaa 25

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Detection probe

<400> 6

cagtgaatgc ggtccgtct 20

<210> 7

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Detection oligonucleotide

<400> 7

acatcggtag tt 12

<210> 8

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Proximity oligonucleotide

<220><221> polyA_site
 <222> (1)..(10)
 <220><221> modified_base
 <222> (34)..(34)
 <223> gm
 <220><221> modified_base
 <222> (35)..(36)
 <223> um
 <400> 8
 aaaaaaaaa cactaagctg ttagtcatt accguuu 37

 <210> 9
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Proximity oligonucleotide 2
 <220><221> polyA_site
 <222> (1)..(10)
 <400> 9
 aaaaaaaaa gctggaggtt cagacgattt tgcg 34
 <210> 10
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Circ-1a
 <400> 10
 aacagcttag tgacatcggt agttaacaga ttgatcttga cacatcggtg gttcgcaaaa 60
 tcgtc 65
 <210> 11
 <211> 27

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Circ-2a
 <400> 11

tgaacctcca gctttcggta atggact 27

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anchor oligonucleotide

<400> 12

acagattgat cttgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 35

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Proximity oligonucleotide 1

<220><221> polyA_site

<222> (1)..(10)

<220><221> modified_base

<222> (34)..(34)

<223> tm

<220><221> modified_base

<222> (35)..(36)

<223> um

<400> 13

aaaaaaaaaa agagtcacaga ggcaaagcgt gaatuuu 37

<210> 14

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Promixity oligonucleotide 2

<220><221> polyA_site

<222> (1)..(10)

<400> 14

aaaaaaaaaa gataaggaag gggccttagc gaca 34

<210> 15

<211> 65

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Circ-1b
 <400>
 > 15
 cctctggact ctacatcggt agtttggaac attttattct aacatcggt gttgtcgct 60
 aaggc 65
 <210> 16
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Circ-2b
 <400> 16
 cccttcctta tctttattca cgctttg 27
 <210> 17
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anchor oligonucleotide
 <400> 17
 ggaacatddd attctaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 35
 <210> 18
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Proximity oligonucleotide 1
 <220><221> polyA_site
 <222> (1)..(10)
 <220><221> modified_base
 <222> (34)..(34)
 <223> tm
 <220><221> modified_base
 <222> (35)..(36)
 <223> um

<400> 18
 aaaaaaaaa aacaactccg attgcttgct tctuuu 37

<210> 19
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Proximity oligonucleotide 2
 <220><221> polyA_site
 <222> (1)..(10)

<400> 19
 aaaaaaaaa tagccctacg tgcctgcat agac 34

<210> 20
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Circ-1c

<400> 20
 atcggagttg ttacatcggg agttcgcgca ggtcgggaat tacatcggta gttgtctatg 60
 caggg 65

<210> 21
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Circ-2c

<400> 21
 cacgtagggc tatttaagaa gcaagca 27

<210> 22
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anchor oligonucleotide

<400> 22
 gcgcaggtcg ggaataaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 35