

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-525763

(P2009-525763A)

(43) 公表日 平成21年7月16日(2009.7.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 3
G O 1 N 21/65 (2006.01)	G O 1 N 21/65	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 1 Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

(21) 出願番号 特願2008-554509 (P2008-554509)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月8日 (2007.2.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年9月24日 (2008.9.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/061878
 (87) 国際公開番号 W02007/092941
 (87) 国際公開日 平成19年8月16日 (2007.8.16)
 (31) 優先権主張番号 60/771,766
 (32) 優先日 平成18年2月8日 (2006.2.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/832,917
 (32) 優先日 平成18年7月24日 (2006.7.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/870,963
 (32) 優先日 平成18年12月20日 (2006.12.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506355338
 オクソニカ・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9404
 3-4003, マウンテン・ビュー, イー
 スト・ミドルフィールド・ロード325
 (74) 代理人 100077481
 弁理士 谷 義一
 (74) 代理人 100088915
 弁理士 阿部 和夫
 (72) 発明者 ナタン, マイケル
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9402
 4, ロス・アルトス, カーサ・ボニータ・
 コート 726

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 SERSナノタグアッセイ

(57) 【要約】

表面増進ラマン散乱ナノタグ (SERSナノタグ) を用いて、均一 (無洗浄)、不均一または配列検出アッセイ基盤を生成するための方法およびシステム。特定の態様において、磁気粒子と組み合わせてSERSナノタグを用いる。多重化アッセイ基盤もまた開示する。特定の態様において、アッセイは、臨床的プロテオミクスに有用である。生物学的マトリックス内、例えば全血または血清内で使用するのに適したアッセイ基盤もまた開示する。本明細書に記載するアッセイ形式を用いて、限定されるわけではないが、全血または血清、潜在性の (occul t) 試料、尿、糞便、空気、飲料水、ファージ、任意の生物、細胞の多細胞塊、例えば癌組織ホモジネートを含む、任意のタイプの生物学的 (動物界または植物界) 試料または環境試料において、限定されるわけではないが、細胞、ウイルス、細菌、タンパク質、DNA、RNA、または小分子の検出を含めて、関心対象の任意の分析物を検出してもよい。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

関心対象のヌクレオチドを検出する方法であって：

磁気粒子にコンジュゲート化された捕捉配列を含む捕捉プローブを提供し；

捕捉分子にコンジュゲート化された検出配列を含む検出プローブを提供し；

捕捉分子に選択的に結合可能な相補ターゲットにコンジュゲート化された S E R S ナノタグを提供し；

関心対象のヌクレオチドの存在下で、捕捉プローブおよび検出プローブをハイブリダイズさせ；

ハイブリダイズした捕捉プローブおよび検出プローブを、S E R S ナノタグ複合体と接触させ；そして

S E R S ナノタグと会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを検出する工程を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

磁気粒子を磁気的に選択する工程をさらに含む、請求項 1 の関心対象のヌクレオチドを検出する方法。

【請求項 3】

関心対象のヌクレオチドを検出する方法であって：

磁気粒子にコンジュゲート化された捕捉配列を含む捕捉プローブを提供し；

S E R S ナノタグにコンジュゲート化された検出配列を含む検出プローブを提供し；

関心対象のヌクレオチドの存在下で、捕捉プローブおよび検出プローブをハイブリダイズさせ；そして

S E R S ナノタグと会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを検出する工程を含む、前記方法。

20

【請求項 4】

磁気粒子を磁気的に選択する工程をさらに含む、請求項 3 の関心対象のヌクレオチドを検出する方法。

【請求項 5】

関心対象のヌクレオチドを検出する方法であって：

関心対象のヌクレオチドを多数のセクションに切断し；

関心対象のヌクレオチドの別々の部分に対する別個のハイブリダイゼーション・アフィニティーを有する多数の捕捉プローブを提供し、多数の該捕捉プローブが、磁気粒子にコンジュゲート化された捕捉配列で構成され；

関心対象のヌクレオチドの別々の部分に対する別個のハイブリダイゼーション・アフィニティーを有する多数の検出プローブを提供し、該検出プローブが、S E R S ナノタグにコンジュゲート化された検出配列で構成され；

切断された関心対象のヌクレオチドの存在下で、捕捉プローブおよび検出プローブをハイブリダイズさせ；そして

S E R S ナノタグと会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを検出する工程を含む、前記方法。

30

40

【請求項 6】

ヌクレオチドを制限酵素で多数のセクションに切断する、請求項 5 の関心対象のヌクレオチドを検出する方法。

【請求項 7】

磁気粒子を磁気的に選択する工程をさらに含む、請求項 5 の関心対象のヌクレオチドを検出する方法。

【請求項 8】

関心対象のヌクレオチドを検出する方法であって：

磁気粒子にコンジュゲート化された捕捉配列を含む捕捉プローブを提供し；

R C A プローブを提供し；

50

関心対象のヌクレオチドの存在下で、捕捉プローブおよび R C A プローブをハイブリダイズさせ；

最初のハイブリダイゼーション産物に対して、ローリングサークル増幅を実行し；

S E R S ナノタグにコンジュゲート化された検出配列を含む検出プローブを提供し；

検出プローブの存在下で、最初のハイブリダイゼーション産物をインキュベーションし；そして

S E R S ナノタグと会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを検出する工程を含む、前記方法。

【請求項 9】

最初のハイブリダイゼーション産物に対してローリングサークル増幅を実行した後、磁気粒子を磁氣的に選択する工程をさらに含む、請求項 8 の関心対象のヌクレオチドを検出する方法。

10

【請求項 10】

検出プローブの存在下で、最初のハイブリダイゼーション産物をインキュベーションした後、磁気粒子を磁氣的に選択する工程をさらに含む、請求項 8 の関心対象のヌクレオチドを検出する方法。

【請求項 11】

検出プローブの存在下で、最初のハイブリダイゼーション産物をインキュベーションした後、磁気粒子を磁氣的に選択する工程をさらに含む、請求項 9 の関心対象のヌクレオチドを検出する方法。

20

【請求項 12】

ヌクレオチドを検出するためのアッセイであって；

磁気粒子にコンジュゲート化された捕捉配列を含む捕捉プローブ；

捕捉分子にコンジュゲート化された検出配列を含む検出プローブ；および

捕捉分子に選択的に結合可能な相補ターゲットにコンジュゲート化された S E R S ナノタグを含む、前記アッセイ。

【請求項 13】

ヌクレオチドを検出するためのアッセイであって；

磁気粒子にコンジュゲート化された捕捉配列を含む捕捉プローブ；および

S E R S ナノタグにコンジュゲート化された検出配列を含む検出プローブを含む、前記アッセイ。

30

【請求項 14】

ヌクレオチドを検出するためのアッセイであって；

関心対象のヌクレオチドを多数のセクションに切断するための手段；

関心対象のヌクレオチドの別々の部分に対する別個のハイブリダイゼーション・アフィニティーを有する多数の捕捉プローブであって、磁気粒子にコンジュゲート化された捕捉配列で構成される、前記の多数の捕捉プローブ；および

関心対象のヌクレオチドの別々の部分に対する別個のハイブリダイゼーション・アフィニティーを有する多数の検出プローブであって、S E R S ナノタグにコンジュゲート化された検出配列で構成される、前記検出プローブ

40

を含む、前記アッセイ。

【請求項 15】

関心対象の分子を検出する方法であって；

分子にコンジュゲート化された磁気ビーズを提供し；

磁気ビーズを、該分子に選択的に結合可能な相補ターゲットとハイブリダイズさせ、該ターゲットが検出部分とさらに会合しており；

検出部分に結合可能な S E R S ナノタグと、ハイブリダイズした磁気ビーズを接触させ；そして

S E R S ナノタグと会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを検出する

50

工程を含む、前記方法。

【請求項 16】

ターゲットが核酸分子である、請求項 15 の方法。

【請求項 17】

関心対象の分子を検出する方法であって：

分子にコンジュゲート化された S E R S ナノタグを提供し；

該分子に選択的に結合可能な相補ターゲットと、S E R S ナノタグをハイブリダイズさせ、該ターゲットが検出分子とさらに会合しており；

検出部分に結合可能な磁気粒子と、ハイブリダイズした S E R S ナノタグを接触させ；
磁気粒子を磁氣的に選択し；そして

S E R S ナノタグと会合しているラマンスペクトルを検出する

10

工程を含む、前記方法。

【請求項 18】

ターゲットが核酸分子である、請求項 17 の方法。

【請求項 19】

関心対象の分子を検出する方法であって：

第一の分子にコンジュゲート化された第一の S E R S ナノタグを提供し；

第二の分子にコンジュゲート化された第二の S E R S ナノタグを提供し、第二の S E R S ナノタグが、照合に際して第一の S E R S ナノタグとは異なるラマンスペクトルを提示し；

第一および第二の S E R S ナノタグを、第一および第二の分子の 1 つに選択的に結合可能な相補ターゲットとハイブリダイズさせ、該ターゲットが検出部分とさらに会合しており；

検出部分に結合可能な磁気粒子と、ハイブリダイズした第一および第二の S E R S ナノタグを接触させ；

磁気粒子を磁氣的に選択し；そして

第一および第二の S E R S ナノタグの 1 つのラマンスペクトルを検出する

20

工程を含む、前記方法。

【請求項 20】

第一および第二の分子が核酸分子である、請求項 19 の方法。

30

【請求項 21】

関心対象の分析物を検出するための方法であって：

前記分析物に選択的に結合可能な第一の分子にコンジュゲート化された捕捉粒子を提供し；

前記分析物に選択的に結合可能な第二の分子にコンジュゲート化された S E R S ナノタグ検出粒子を提供し；

捕捉粒子および検出粒子と、関心対象の分析物を含有しうる試料を接触させ、それによって、分析物に結合した捕捉粒子および検出粒子から、2 粒子複合体を形成し；

2 粒子複合体を濃縮し；そして

S E R S ナノタグと会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを検出する

40

工程を含む、前記方法。

【請求項 22】

捕捉粒子が磁気粒子である、請求項 21 の方法。

【請求項 23】

濃縮工程が、磁気粒子濃縮装置上で実行される、請求項 22 の方法。

【請求項 24】

2 粒子複合体が、試験容器の内壁上で濃縮される、請求項 21 の方法。

【請求項 25】

2 粒子複合体が、試験容器の内壁上で捕捉される、請求項 21 の方法。

【請求項 26】

50

関心対象の分子を検出する方法であって：
分子にコンジュゲート化された磁気ビーズを提供し；
該分子に選択的に結合可能な相補ターゲットと、磁気ビーズをハイブリダイズさせ、該ターゲットが検出部分とさらに会合しており；
検出部分と結合可能な S E R S ナノタグと、ハイブリダイズした磁気ビーズを接触させ；そして
S E R S ナノタグと会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを検出する工程を含む、前記方法。

【請求項 27】

ターゲットが核酸分子である、請求項 26 の方法。

10

【請求項 28】

関心対象の分子を検出する方法であって：
分子にコンジュゲート化された S E R S ナノタグを提供し；
該分子に選択的に結合可能な相補ターゲットと、S E R S ナノタグをハイブリダイズさせ、該ターゲットが検出部分とさらに会合しており；
検出部分に結合可能な磁気粒子と、ハイブリダイズした S E R S ナノタグを接触させ；
磁気粒子を磁気的に選択し；そして
S E R S ナノタグと会合しているラマンスペクトルを検出する工程を含む、前記方法。

【請求項 29】

ターゲットが核酸分子である、請求項 28 の方法。

20

【請求項 30】

関心対象の分子を検出する方法であって：
第一の分子にコンジュゲート化された第一の S E R S ナノタグを提供し；
第二の分子にコンジュゲート化された第二の S E R S ナノタグを提供し、第二の S E R S ナノタグが、照合に際して第一の S E R S ナノタグとは異なるラマンスペクトルを提示し；
第一および第二の S E R S ナノタグを、第一および第二の分子の 1 つに選択的に結合可能な相補ターゲットとハイブリダイズさせ、該ターゲットが検出部分とさらに会合しており；
検出部分に結合可能な磁気粒子と、ハイブリダイズした第一および第二の S E R S ナノタグを接触させ；
磁気粒子を磁気的に選択し；そして
第一および第二の S E R S ナノタグの 1 つのラマンスペクトルを検出する工程を含む、前記方法。

【請求項 31】

第一および第二の分子が核酸分子である、請求項 30 の方法。

30

【請求項 32】

関心対象の分析物を検出する方法であって：
前記分析物に選択的に結合可能な第一の分子にコンジュゲート化された捕捉粒子を提供し；
前記分析物で誘導体化された S E R S ナノタグ検出粒子を提供し；
関心対象の分析物を含む試料と、捕捉粒子および S E R S ナノタグ検出粒子を接触させ、それによって、分析物 / 捕捉粒子複合体および S E R S ナノタグ検出粒子 / 捕捉粒子複合体の両方を形成し；
捕捉粒子複合体を濃縮し；そして
S E R S ナノタグ検出粒子と会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを検出する工程を含む、前記方法。

40

【請求項 33】

50

捕捉粒子が磁気粒子である、請求項 3 2 の方法。

【請求項 3 4】

濃縮工程が、磁気粒子濃縮装置上で実行される、請求項 3 3 の方法。

【請求項 3 5】

関心対象の分析物を検出する方法であって：

前記分析物で誘導体化された捕捉粒子を提供し；

前記分析物と選択的に結合可能な第一の分子にコンジュゲート化された S E R S ナノタグ検出粒子を提供し；

関心対象の分析物を含有しうる試料と、捕捉粒子および S E R S ナノタグ検出粒子を接触させ、それによって、分析物 / S E R S ナノタグ検出粒子複合体および捕捉粒子 / S E R S ナノタグ検出粒子複合体の両方を形成し；

捕捉粒子 / S E R S ナノタグ検出粒子複合体を濃縮し；そして

S E R S ナノタグ検出粒子と会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを検出する

工程を含む、前記方法。

【請求項 3 6】

捕捉粒子が磁気粒子である、請求項 3 5 の方法。

【請求項 3 7】

濃縮工程が、磁気粒子濃縮装置上で実行される、請求項 3 6 の方法。

【請求項 3 8】

関心対象の分析物を検出するための方法であって：

前記分析物に選択的に結合可能な第一の分子にコンジュゲート化された捕捉粒子を提供し；

前記分析物に選択的に結合可能な第二の分子にコンジュゲート化された S E R S ナノタグ検出粒子を提供し；

捕捉粒子および検出粒子と、関心対象の分析物を含有しうる試料を接触させ、それによって、分析物に結合した捕捉粒子および検出粒子から、2 粒子複合体を形成し；

2 粒子複合体を濃縮し；そして

S E R S ナノタグと会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを検出する工程を含む、前記方法。

【請求項 3 9】

捕捉粒子が磁気粒子である、請求項 3 8 の方法。

【請求項 4 0】

濃縮工程が、磁気粒子濃縮装置上で実行される、請求項 3 9 の方法。

【請求項 4 1】

2 粒子複合体が試験容器の内壁上で濃縮される、請求項 3 8 の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

技術分野

[0 0 0 1] 本発明は、表面増強ラマン散乱ナノタグ (S E R S ナノタグ) を使用して、多様なアッセイ基盤を生成するための方法およびシステムに対して向けられる。

【0 0 0 2】

発明の背景

[0 0 0 2] 粒子、および特に磁気粒子は、固相捕捉種または検出種として、診断アッセイで広範囲に用いられている。微粒子に基づくアッセイは、2 つの主なカテゴリー：均一 (無分離) および不均一アッセイに分類可能である。

【0 0 0 3】

[0 0 0 3] 均一 (無分離) アッセイ形式では、結合性反応物質を混合し、そして検出前にいかなる続く洗浄工程も伴わずに測定する。こうしたシステムの利点は、アッセイ工

10

20

30

40

50

程がより少なく、体積が少なく、そして無駄が少ないため、迅速な溶液相動力学で、アッセイ形式が単純であり、器具使用がより単純で、ならびにコストがより低いことである。均一なイムノアッセイは、結合した分析物および遊離の (f r e e) 分析物の物理的分離を必要とせず、そしてしたがって、不均一イムノアッセイよりも実行がより迅速でそしてより容易でありうる。小さい試料サイズを用い、試薬体積が少なく、そしてインキュベーション時間が短い、均一イムノアッセイシステムは、迅速な入れ替え時間を提供する。このタイプのアッセイの不都合な点は、ダイナミックレンジおよび感度が限定されうることである。シグナル検出前に、遊離分析物の分離がないため、感度はさらに損なわれうる。また、試料および捕捉試薬または検出試薬間の相互作用による干渉によって、高いバックグラウンドが引き起こされうる。Alpha Screen、SPA、蛍光偏光およびフローサイトメトリーに基づくアッセイなどのハイスループット・スクリーニング基盤において、ならびに検出法として比濁分析または比濁法を用いた粒子凝集アッセイなどの診断アッセイにおいて、均一アッセイは好ましいアッセイ形式である。

10

【0004】

[0004] 遊離分析物および未結合検出物質の分離を必要とする、ならびに特定の例における、不均一イムノアッセイは、均一アッセイよりも多用途でありうる。洗浄工程または物理的分離工程は、大部分の干渉物質を除去し、そして一般的に、検出/定量化工程に干渉しない。より大きい試料サイズを可能にし、これが次に感度を改善し、そして標準的なアッセイ曲線よりも広いダイナミックレンジを生じる、段階的な不均一アッセイが可能である。不均一イムノアッセイの不都合な点は、これらのはるかにより労働集約的であり、時間がかかり、そして典型的には専門の分析装置を必要とすることである。さらに、自動化不均一システムは、洗浄工程および分離工程を提供するために、より複雑な設計または多数の装置を必要とする。多くの臨床的分析装置は、不均一診断アッセイのため、磁気微粒子を用いて、関心対象の分析物と選択的に結合させ、そして次いで、磁場を用いて、取り巻くマトリックスから該分析物を分離する (The Immunoassay Handbook (2001) Nature Publ, ロンドン)。この形式に基づく分析装置には、Bayer DiagnosticsのACS 180およびImmuno I、Beckman CoulterのAccess、ならびにRoche DiagnosticsのElectrysが含まれる。

20

【0005】

[0005] 伝統的に、上述のものなどの不均一アッセイで疾患を診断するためには、1つのバイオマーカーしか用いられていない：例えば、前立腺特異的抗原 (PSA) は、特異性が低い可能性があるにもかかわらず、前立腺癌のために選択されるマーカーである (Lu - Yaoら (2003) J Natl Cancer Inst. 95:1792 - 1797)。プロテオミクスの出現で、いくつかのバイオマーカーを伴う診断アッセイが、正確さ、特異性を増加させ、そして類似の症状を提示する異なる疾患間を区別するのを補助するであろうと考えられている。ゲノミクス分野ですで行われているように、いくつかのマーカーに関するスクリーニングは、1つのバイオマーカーのみに関するスクリーニングよりも、よりすぐれた診断または予後情報を提供する。例えば、Genomic Health's Oncotype Dx Breast Cancer Assay (2005) (www.genomichealth.com) を参照されたい。

30

40

【0006】

[0006] 試料採取から診断までの時間を短くするように設計したアッセイは、緊急治療室またはポイントオブケア設定で等しく重要である。例えば、Biosite Inc. は、心不全の重症度および急性冠動脈症候群のリスク層化の迅速診断および評価のため、側方流動イムノアッセイを提供する (Biosite Website (2005) <http://www.biosite.com/products/cardiac.aspx>)。したがって、プロテオミクス研究を通じて新規に同定された多くのバイオマーカーを臨床的に実行するには、より単純で、より正確で、そしてより迅速なアッセイ技術が必要である。迅速で、洗浄がなく、試料調製がないバイオアッセイにおいて、同時

50

に3以上のタンパク質を定量化する能力は、疾患診断および予後における、ならびに疾患進行監視における、当該技術分野の技術状態を劇的に改善する。

【0007】

[0007] 本発明は、上に論じる1以上の問題を克服することに向けられる。

発明の概要

[0008] 本発明は、表面増進ラマン散乱ナノタグ (SERSナノタグ) を用いて、均一 (無洗浄)、不均一または配列検出アッセイ基盤を生成するためのいくつかの方法およびシステムを提供する。特定の態様において、磁気粒子と組み合わせてSERSナノタグを用いる。多重化アッセイ基盤もまた開示する。特定の態様において、アッセイは、臨床的プロテオミクスに有用である。生物学的マトリクス内、例えば全血または血清内で使用するのに適したアッセイ基盤もまた開示する。本明細書に記載するアッセイ形式を用いて、限定されるわけではないが、全血または血清、潜在性の (occult) 試料、尿、糞便、空気、飲料水、ファージ、任意の生物、細胞の多細胞塊、例えば癌組織ホモジネートを含む、任意のタイプの生物学的 (動物界または植物界) 試料または環境試料において、限定されるわけではないが、細胞、ウイルス、細菌、タンパク質、DNA、RNA、または小分子の検出を含めて、関心対象の任意の分析物を検出してもよい。

10

【0008】

[0009] 以下の本発明の詳細な説明には、以下のサブセクションが含まれる：

A. 生物学的アッセイのためのSERSナノタグの一般的な議論。

B. 試験容器内壁と会合した捕捉抗体を特徴とする均一または不均一サンドイッチイムノアッセイの態様。

20

【0009】

C. 磁気捕捉粒子を特徴とする均一または不均一サンドイッチイムノアッセイの態様。

D. SERS磁気DNAアッセイを補助するSERS/磁気ビーズハイブリダイゼーション。

【0010】

E. 競合的SERS/磁気ビーズアッセイ。

F. ヌクレオチド配列検出アッセイ。

[0010] 以下に論じる特定のアッセイにおいて、磁気捕捉粒子の使用は、存在する臨床的分析装置との容易な統合を可能にするであろう。SERSナノタグの使用は (以下に詳述するように)、無洗浄の多重化アッセイ形式の使用を可能にするであろう。典型的にはマイクロ流体およびナノ流体技術の使用によって、小型化に向けた産業界全体で新たに起こりつつある傾向があることに注目することが重要であり、こうした技術は、各実験に關与する試薬および試料体積を減少させるとともに、反応時間を減少させることによって、診断分野に影響を及ぼすであろう。したがって、小型化は、実験あたりの総費用を潜在的に低下させうる。しかし、小型化の利点を達成するには、緻密で、そして正確な液体取り扱い法に関する必要性などの新たな一連の難問を克服しなければならない。多くの例において、本明細書に論じるアッセイ法および基盤は、液体取り扱いを必要とせず、したがってマイクロおよびナノ流体学の問題を回避する。本発明のアッセイ法および基盤は、いかなる体積サイズも等しくよく取り扱い、そして探查するであろう。

30

40

【0011】

発明の詳細な説明

[0048] A. 生物学的アッセイのためのSERSナノタグの一般的考察。

[0049] 均一多重化アッセイ基盤は、典型的には、2粒子システムを中心として設計される。捕捉粒子を抗体にコンジュゲート化して、生物学的試料から関心対象の抗原を捕捉する。検出粒子は、やはり関心対象の抗原に対する結合アフィニティーを持つ検出抗体にコンジュゲート化された、以下に記載するようなSERSナノタグ粒子であってもよい。SERSナノタグには、以下に記載するようなラマンレポーター分子が含まれる。関心対象の抗原の存在下で、捕捉粒子および検出粒子の両方が結合して、SERS活性2粒子免疫複合体を形成する。SERSナノタグは、検出タグとして、少なくとも3つの内在

50

性の利点を提供する。(1)これらは、近赤外で励起可能であり、そしてしたがって全血測定と適合する。(2)SERSナノタグは、光退色に耐性であり、より高い出力およびより長いデータ獲得時間を可能にし、より高感度の測定を生じる。(3)多数の別個のタグが存在し、非常に多重化されたアッセイが可能になる。

【0012】

[0050]SERSナノタグは、表面増進ラマン散乱(SERS)に基づく新規のナノ粒子光学検出タグである(Mulvaneyら(2003)Langmuir 19: 4784-4790; Natan、米国特許第6,514,767号)。ラマン散乱(Long(2002)The Raman Effect; A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules. John Wiley & Sons Ltd, Chichester; Modern Techniques in Raman Spectroscopy(1996)John Wiley & Sons Ltd, Chichester; Analytical Applications of Raman Spectroscopy(1999)Blackwell Science Ltd, マサチューセッツ州モルデン)。SERSは、レーザーに基づく光学分光であり、分子に関して、典型的な蛍光よりはるかに狭い特徴を持つ、フィンガープリント様の振動スペクトルを生じる。ラマン散乱は、単色性遠赤色または近赤外光を用いて励起可能であり、この際の光子エネルギーは非常に低く、生物学的試料中の内在性のバックグラウンド蛍光を励起しない。ラマン・スペクトルは、典型的には、 $300 \sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ の振動エネルギーを含むため、1ダース(以上)のタグをすべて、単一の光源を用いて、同時に測定することが可能でありうる。しかし、通常のラマンスペクトルは非常に弱く、生物分析化学に関する有用性は限定される。SERSでは、貴金属表面(金、銀、銅)上のナノスケールの粗い特徴に非常に近接した分子が、散乱効率の数百万倍から数兆倍の増加(増強係数(EF)として知られる)を生じさせる(Moskovits(1985)Rev. Mod. Phys. 57: 783-826; Ottoら(1992)J. Phys. Cond. Mat. 4: 1143-1212; ChampionおよびKambhampati(1998)Chem. Soc. Rev. 27: 241-249; Tianら(2002)J. Phys. Chem. B 106: 9463-9483; CAS Online Search, 2004年4月)。より重要なことに、SERSはまた、個々の金属ナノ粒子に吸着した分子を検出するためにも使用可能であり(Emoryら(1998)J. Am. Chem. Soc. 120: 8009-8010; Moyerら(2000)J. Am. Chem. Soc. 122: 5409-5410)、そして単一分子の検出を示すために用いられてきている(NieおよびEmory(1997)Science 275: 1102-1106; Kneippら(1997)Phys. Rev. Lett. 78: 1667-1670; Michaelsら(1999)J. Am. Chem. Soc. 121: 9932-9939; Xuら(1999)Phys. Rev. Lett. 83: 4357-4360; Gouletら(2003)Anal. Chem. 75: 1918-1923)。

【0013】

[0051]典型的なSERSナノタグ10を図1に示す。例示するSERSナノタグ10には、金属ナノ粒子コア12、およびSiO₂(ガラス)シェル14が含まれる。限定されるわけではないが、多様なタイプのポリマーを含む他の物質もまた、本発明に一致した被包物質またはシェルとして用いてもよい。典型的なSERSナノタグの使用、製造および特性に関する詳細は、米国特許第6,514,767号、表題「Surface Enhanced Spectroscopy - Active Composite Nanoparticles」に含まれ、この特許は本明細書に援用される。本発明は、単一ナノ粒子コア12から調製されるSERSナノタグに関して記載されるが、SERSナノタグの調製において、ナノ粒子コアクラスターまたは凝集体を用いてもよいことが理解

10

20

30

40

50

されるものとする。金属コロイドの凝集体のクラスターを調製するための方法が、当業者に知られる。米国特許第6,861,263号に記載されるようなサンドイッチ型粒子の使用もまた意図され、この特許は本明細書に援用される。

【0014】

[0052] ナノ粒子コア12は、ラマン増進性であることが当該技術分野に知られるいかなる物質であってもよい。ナノ粒子コア12は等方性または異方性であってもよい。異方性ナノ粒子は、長さおよび幅を有してもよい。いくつかの態様において、異方性ナノ粒子の長さは、ナノ粒子が産生される開口部に平行な次元である。異方性ナノ粒子の場合、いくつかの態様において、ナノ粒子は、350nm以下の直径(幅)を有する。他の態様において、ナノ粒子は250nm以下の直径を有し、そしていくつかの態様において、100nm以下の直径を有する。いくつかの態様において、幅は、15nm~300nmの間である。いくつかの態様において、ナノ粒子は、約10~350nmの長さを有する。

10

【0015】

[0053] SERSナノタグのコアであるのに適しているナノ粒子には、コロイド金属、中空または充填ナノパー、磁気、常磁性、伝導性または絶縁性ナノ粒子、合成粒子、ヒドロゲル(コロイドまたはパー)等が含まれる。本発明で用いるナノ粒子は、単一ナノ粒子として、あるいはナノ粒子のクラスターまたは凝集体として存在してもよい。

【0016】

[0054] 限定されるわけではないが、スフェロイド、ロッド、ディスク、ピラミッド、立方体、シリンダー、ナノらせん、ナノスプリング、ナノリング、ロッド型ナノ粒子、矢状ナノ粒子、ティアドロップ型ナノ粒子、テトラポッド型ナノ粒子、プリズム型ナノ粒子、ならびに複数の他の幾何学および非幾何学的形状を含む、多様な形状で、ナノ粒子が存在してもよいことが、一般の当業者には認識されるであろう。記載されている別の種類のナノ粒子には、内部表面領域を持つものが含まれる。これらには、中空粒子および多孔または半多孔粒子が含まれる。さらに、これらの形状の粒子を調製する方法、および特定の場合、これらの形状のSERS活性粒子を調製する方法が、文献に記載されていることが理解される。粒子形状および縦横比は、ナノ粒子の物理的、光学的、および電気的特性に影響を及ぼしうることが認識されているが、特定の形状、縦横比、または内部表面領域の存在/非存在は、ナノ粒子としての粒子の性質に影響しない。

20

30

【0017】

[0055] ナノ粒子にはまた、金属が、コア-シェル粒子におけるように、さらなる構成要素を含むナノ粒子も含まれる。例えば、J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 7961に記載されるもののような、Agコア/Auシェル粒子、またはAuコア/Agシェル粒子、またはSERS活性金属を伴う任意のコア-シェルの組み合わせが使用可能である。AuまたはAgナノ粒子官能化シリカ/アルミナコロイド、AuまたはAg官能化TiO₂コロイド、Auナノ粒子キャップ化Auナノ粒子(例えば、Mucicら, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 12674を参照されたい)、Auナノ粒子キャップ化TiO₂コロイド、銀キャップ化SiO₂コロイドまたは金キャップ化SiO₂コロイド(例えば、Jacksonら, 2004 Proc Natl Acad Sci U S A. 101(52):17930-5; Talleyら, Nano Letters(2005)を参照されたい)などの、金属シェル(「ナノシェル」)を伴うSiコアを有する粒子などの、コア-シェル粒子で使用するのに適した他の組み合わせが、本発明に含まれる。中空ナノ球体および中空ナノ結晶などの中空ナノ粒子もまた、SERSナノタグで利用可能である。

40

【0018】

[0056] 各SERSナノタグは、ユニークなレポーター16を伴ってコードされ、ナノ粒子コアおよびガラスまたは他の適切な被包物質のシェルの間の界面に、有機または無機分子を含む。検出タグに対するこのアプローチは、高解像度分子分光ツールとしてのラマン散乱の力およびSERSに関連する増進を利用する一方、再現が困難であり、そし

50

て選択性がないなどの、独立SERS支持体を作製する際にしばしば出会う欠点を回避する。SERSナノタグは、633および785nm励起波長で、強いスペクトルを示し(10⁶を超える増強係数)、これらの波長は、全血などの生物学的試料における、ならびにガラスおよびプラスチックのようなマトリックスにおける、内在性のバックグラウンド蛍光を回避するのに優れている。本質的にSERS不活性であるガラスコーティングは、凝集に対して粒子を安定化させ、レポーターが拡散するのを防止し、望ましくない種の競合的吸着を防止し、そしてバイオアッセイ発展のために生体分子をコンジュゲート化可能な、非常に優れた、よく確立された表面を提供する(AslamおよびDent(1998) Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, Grove's Dictionaries Inc, ニューヨーク州ニューヨーク)。

10

【0019】

[0057] タグの多数のユニークなフレーバーが利用可能である。図2は、多重化アッセイに利用可能な、明らかに区別される特徴を持つ、5つのユニークなSERSタグのスペクトルのグラフ18を示す。多重化アッセイでは、単一のスペクトルが獲得され、そしてそのスペクトルを構成要素に定量的に分離することが必要であろう。個々の構成要素のスペクトル・デコンボリューションおよび定量化のため、改良された商業的ソフトウェアパッケージを用いて、標準として各タグ由来の純粋なスペクトルを用いて、線形最小二乗分析を実行してもよい。

【0020】

20

[0058] B. 試験バイアル内壁上の、捕捉抗体でのサンドイッチイムノアッセイ。

[0059] 本発明と一致した不均一および均一イムノアッセイの特定の態様は、試験バイアルの内壁を捕捉抗体で誘導体化することを特徴とする。全血または血清アッセイは、特にラマンスペクトル獲得前に過剰な「未結合」タグを除去する場合、この形式で実現可能でありうる。この形式下で、無希釈(neat)の血漿または全血の存在下、SERSタグが読取り可能であり、そして検出システムが適切に狭い被写界深度を提供する場合、過剰なタグの除去は必要ではない。

【0021】

[0060] 以下の実施例1に詳述する方法にしたがって、試験バイアル壁に基づく代表的なアッセイが調製されてきている。本発明のこの側面に一致したアッセイを調製するかまたは実行するのに、他の方法が等しく適している。

30

【0022】

[0061] 代表的な連続(不均一)試験バイアル壁アッセイを図3に図解的に例示する。捕捉抗体30は容器の底に共有結合し、そして検出抗体32は、SERSナノタグ34に共有結合している。

【0023】

[0062] 連続アッセイにおいて、試料をバイアルに添加し、そして2.5時間インキュベーションした。未結合分析物を洗い流した後、SERSナノタグとさらに2時間インキュベーションする。ガラスバイアルの底壁上に焦点を当ててラマンスペクトルを採取した後、未結合SERSナノタグを除去し、そして過剰なタグを洗い流した後に再び採取した。

40

【0024】

[0063] このアッセイ形式を用いて、抗体をスクリーニングし、そして抗体対を選択した。種々さまざまなものを組み合わせた一連の実験を行った後、捕捉抗体として、モノクローナル抗IL-2抗体を選択し、そして誘導体化バイアルにコンジュゲート化した。検出抗体としてポリクローナルを選択した。

【0025】

[0064] 図4のグラフ40および42は、上述の連続形式アッセイで得た標準曲線を例示する。ブランク試料(各工程後の洗浄、分析物不含)の20回の読取りに渡って採取したデータは、約100pg/mlの検出限界を生じた。

50

【0026】

【0065】各IL-4用量に関して、ラマンスペクトルを収集した。古典的最小二乗法を用いて、図4に示すラマンスペクトルを相対ラマン単位(RRU)と称される数に数学的に換算した(reduced)。この数は、ピーク強度に比例し、これを、同じSERSナノタグの保存した参照スペクトルに対して標準化する。

【0027】

【0066】別の均一アッセイ形式を図5に図解的に例示する。試料(分析物)添加前に、検出コンジュゲート50をバイアル内に装填した。1時間のインキュベーション後、バイアルを、1)未結合タグの存在下で、2)上清(未結合タグ)の除去後、そして再び3)バイアル洗浄(非特異的に結合したタグの除去)後に読み取った。

10

【0028】

【0067】図6のチャート60は、過剰な未結合タグを除去する前の、図5の均一アッセイの用量反応曲線を例示する。連続洗浄アッセイと比較して、すべてのIL-4濃度に関して、より高いシグナルが観察され、ダイナミックレンジの低下が伴い、これは、溶液中の未結合タグの寄与を示す。この「遊離タグ」干渉は、おそらく、ラマン読取り装置の広い被写界深度に起因する。

【0029】

【0068】高いバックグラウンドが、溶液中の遊離タグのためであることを立証するため、ポリリジンでコーティングしたガラスカバースリップに、単層未満(submonolayer)のBPEタグを装填した。異なるタグ(DPY)の懸濁物を、カバースリップに添加した。50x対物レンズ(~2ミクロンの収集深度;Renishawラマン顕微鏡)で、カバースリップ表面に焦点を当てて、異なる時間間隔でラマンスペクトルを収集した。

20

【0030】

【0069】図7のグラフ70は、上述のように調製したカバースリップ表面の2分後(トレース72)および10分後(トレース74)のラマンスペクトル、ならびにガラス表面上のDPYタグの懸濁物のスペクトル(11分後のバルクスペクトル76)を例示する。「2分後の表面スペクトル」は、本質的にBPEスペクトルであり、DPYタグからはほとんど寄与はなかった。予期されるように、DPYスペクトル寄与は、タグがイオン相互作用を介して表面に結合し始めるにつれて、時間とともに増加している。表面上の溶液から採取したスペクトルは、DPYタグの存在のみを明らかにする。これは、狭い被写界深度を持つ対物レンズを用いた場合、表面結合タグを、溶液中のタグから区別可能であることを立証する。図4のデータ収集に用いた、ラマン読取り装置収集深度(現在、50xよりも1000倍深い)は、表面および溶液タグの間の区別を可能にせず、したがって、ラマンスペクトルを取る前に、上清を除去(そして洗浄)することを必要とする。

30

【0031】

【0070】過剰なタグを洗い流したら、バックグラウンドシグナルは、図8のグラフ80に示すように劇的に減少する。また、「洗浄バイアル」の全体のシグナルは、非常に多様であることが観察され、これは、「洗浄緩衝液」が最適化されていないことを示す。洗浄緩衝液最適化の努力はまったくなされなかった。

40

【0032】

【0071】アッセイ性能に対する生物学的マトリックスの効果を調べる前に、血漿または血液の存在下で、SERSナノタグが読取り可能であることを立証した。図9A、9Bおよび9Cは、ポリリジンでコーティングしたガラスバイアルの底壁に結合したSERSナノタグのスペクトル画像化に対する、水およびPBS中の1%BSA(図9A)、全血漿(図9B)、ならびに血漿および全血混合物(図9C)の影響を記載する。無希釈血漿および全血両方が、波数700~1800の間で、波数が増加するに伴う散乱強度の不連続(discrete)減少以外には、有意なラマン散乱強度を持たないことにまず注目すべきである。これは、ナノタグ励起のためのエネルギーの減少を生じる、試料によるエネルギー吸収に起因する可能性もある。あるいは、生物学的マトリックスは、バイ

50

アル表面から、いくつかのSERSナノタグを洗い落とす可能性もある。

【0033】

[0072] アッセイ性能に対するヒト血漿および血液の影響もまた調べた。総アッセイ体積の30%の血漿または血液濃度は、洗浄前および洗浄後、バックグラウンドシグナルが高く、そしてスパイク回収が劣っているかまたはまったくないことによって、アッセイ性能に負に影響を及ぼした。しかし、図10のグラフ100は、アッセイが、16%全血または16%血漿において、IL-4スパイク(50 ng)を回収する能力を示す。

【0034】

実施例1:

[0073] 試験バイアル内壁上の検出タグの捕捉を特徴とするアッセイを調製するための代表的な方法。

【0035】

[0074] 材料および試薬

- ・ 商業的に入手可能なラマンスペクトル検出デバイス上で読取りを行った。
- ・ Dynabeads M-270カルボン酸、2.8 μm、製品番号143.05、DynaL Biotech (ノルウェイ・オスロ)。

【0036】

- ・ BcMag シリカ修飾磁気ビーズ、1 μm、カタログ番号FF-101は、BioC Lone Inc. (カリフォルニア州サンディエゴ) の製品であった。
- ・ 抗ヒトIL-4モノクローナル(MAB 604)およびヤギ・ポリクローナル(A F 204Na)をR&D Systems (ミネソタ州ミネアポリス) から得た。

【0037】

- ・ 抗ヒトCRP抗体、クローン265-10032および265-10036をOEM Concepts (ニュージャージー州トムズリバー) から得た。
- ・ Nanoplex REFで開発された標準的プロトコルを用いて、検出抗体をSERSナノタグに共有結合させた。

【0038】

- ・ APTMS、EDCおよび無水コハク酸をSigmaから得た。
- ・ (3-グリシドキシプロピル)-トリメトキシシラン。United Chemical Technologies。

【0039】

- ・ ウシ血清アルブミンはPierceの製品であった。
- ・ ガラスバイアル、12 x 32 mm、パーツ番号CTV-1002はChromTech, Inc. (ミネソタ州) の製品である。

【0040】

[0075] 緩衝液

- ・ MES 50 mM、pH 4.5
- ・ PBS
- ・ 磁気粒子保存緩衝液：0.1% BSA、PBS
- ・ バイアルに基づくアッセイのためのアッセイ緩衝液：1% BSA、0.5% PEG、0.05% Tween 20、PBS
- ・ 磁気ビーズに基づくアッセイのためのアッセイ緩衝液：5% BSA、0.5% PEG、0.05% Tween 20、PBS
- ・ 洗浄緩衝液：1% BSA、0.25% Tween 20、PBS

[0076] 方法およびプロトコル

[0077] Dynabeadsへの抗体コンジュゲート化のための一般的な方法

1. 200 μl MESで1 mg Dynabeads M-270カルボン酸を洗浄する(2回)。

【0041】

2. 100 μl MESでエッペンドルフ試験管(500 μl)内に再懸濁する。

10

20

30

40

50

3. 30 μ l の抗体 (1 mg / ml) を添加する。

4. 試験管に 100 μ l ME S を添加する。

【0042】

5. よく混合し、そしてゆっくり傾斜回転させながら室温で 30 分間インキュベーションする。

6. 使用直前に、冷 100 mM ME S、pH 5 に EDC を溶解して、100 mg / ml の濃度にする。

【0043】

7. Dynabeads / リガンド懸濁物に 10 μ l EDC 溶液 (1 mg) を添加する。よく混合する。

8. ゆっくり傾斜回転させながら室温で 2 時間インキュベーションする。

【0044】

9. 200 μ l エタノールアミン 50 mM、PBS (3 mg / ml) でブロッキングする。

10. ゆっくり傾斜回転させながら室温で 0.5 時間インキュベーションする。

【0045】

11. 300 μ l 1% BSA、PBS で 1 回洗浄する。

12. 1% BSA、PBS で、4 で一晩ブロッキングする。

13. PBS 中の 0.1% BSA、0.05% Tween で 2 回洗浄する。

【0046】

14. 1% BSA、PBS 中、1 mg / ml でコンジュゲートを保存する。

[0078] ガラスバイアル誘導体化: APTMS

1. EtOH 中の 2% APTMS / 2% 水の 80 μ l 溶液をバイアルに添加する。
底面を覆うのにちょうど十分な体積 - 最大体積 = 80 μ l。

【0047】

2. 室温で 30 分間反応させる。

3. 溶液を取り除く。

4. EtOH、500 μ l を添加して、そしてホットプレート上に 30 分間セットする (最低の設定)。

【0048】

5. EtOH で洗浄し、そして 1 回リンスする。

6. DI 水で 3 回洗浄する。

7. 200 μ l の水中で保存する。

【0049】

[0079] APTMS 誘導体化バイアルの無水コハク酸誘導体化

1. APTMS コーティング粒子の水をホウ酸緩衝液と交換する。

2. DMSO 中の無水コハク酸 (40 mg / ml) の溶液を調製する。

【0050】

3. 1 ml ホウ酸中の 40 μ l の無水コハク酸溶液の 100 μ l を添加する。室温で 30 分間インキュベーションする。

4. 工程 3 を反復する。

【0051】

5. DI 水で 3 回洗浄する。

6. 1 mg / ml で、DI 水中で保存する。

[0080] チオール化 SERS タグへの抗体コンジュゲート化

1. 水中、1 mg / ml のスルホ - SMCC 溶液を調製する。

【0052】

2. 抗体 50 μ g あたり、100 μ l のスルホ - SMCC を添加する。

3. 混合物をボルテックスして、そして 30 ~ 45 分間反応させる。

4. 製造者の指示にしたがって、Sephadex G25 マイクロスピンド脱塩カラ

10

20

30

40

50

△ (Amersham) を用いて、マレイミド活性化抗体溶液を精製する。

【0053】

5. チオール化タグ (1 ml 水中、 4×10^{11} 粒子) に 100 μ l の PBS を添加して、1 mM PBS 溶液を生じる。

6. 精製マレイミド活性化タンパク質を溶液に添加する。よく混合し、そして室温で 2 時間反応させる。粒子を穏やかに攪拌するか、または時々ボルテックスして、反応を促進する。

【0054】

7. 水中で、MESA の 10 mg/ml 溶液を調製する。タグに 50 μ l を添加し、そして 20 ~ 30 分間反応させる。

8. 5% BSA 溶液 25 μ l をタグに添加し、そして遠心分離して精製する。~ 1500 RCF (Jouan 14 微量遠心分離装置上、3800 RPM) で、12 分間スピンのする。

【0055】

9. 1 ml の 0.1 x PBS + 25 μ l の 5% BSA 中に粒子を再懸濁する。再び遠心分離する。さらに 1 または 2 回反復する (総数 3 または 4 回の遠心分離工程)。

10. 0.1% BSA を含有する所望の緩衝液中、所望の濃度まで粒子を再懸濁する。

【0056】

[0081] APTMS およびカルボキシ - APTMS コーティングバイアルに対する抗体コンジュゲート化

1. 10 μ l の抗体ストックを取り、そして 1 ml PBS 中に希釈する - バイアルへのコンジュゲート化を 10 μ g/ml で行う。

【0057】

2. 100 μ l をバイアルに添加する。

3. 30 分間インキュベーションする。

4. EDC 溶液を調製する (1 M、200 mg/ml DMSO)。

【0058】

5. 抗体を含有するバイアル内に、EDC 溶液 10 μ l を添加する。

6. 4 で一晩保存する。

7. 100 μ l (PBS、BSA 1%) を添加する - ブロッキング。

【0059】

8. 1 時間、軌道振盪する。

9. 200 μ l PBS、0.1% BSA で 3 回洗浄する。

[0082] 連続 IL-4 アッセイ法 - バイアルアッセイ

1. IL4 を 0.1% BSA / PBS 溶液で希釈する - 100 ng/ml の IL-4 ストック溶液。

【0060】

2. 関連するバイアルに 100 μ l 添加する。

3. プレート振盪装置上で、室温で 2.5 時間インキュベーションする。

4. 溶液を吸引する。

【0061】

5. 200 μ l PBS、0.05% BSA、0.25% Tween で 3 回洗浄する。

6. 10 x IL4 - SER S コンジュゲートを適切な濃度に希釈する。

【0062】

7. 100 μ l を関連するバイアルに添加する。

8. プレート振盪装置上で、2 時間インキュベーションする。

9. 吸引し、そして Ocean Optics 読取り装置上で読み取る。

【0063】

10

20

30

40

50

[0 0 8 3] 均一 I L - 4 アッセイ法 - バイアル

1 . 0 . 1 % B S A / P B S を用いて、1 0 x I L 4 - S E R S コンジュゲートを適切な濃度に希釈する。

【 0 0 6 4 】

2 . 1 0 0 μ l を関連するバイアルに添加する。

3 . 1 0 0 μ l 試料 - 反応緩衝液、血漿または血液を添加する。

4 . P B S 、 0 . 1 % B S A 中で I L - 4 を希釈する。

【 0 0 6 5 】

5 . 1 0 0 μ l を関連するバイアルに添加する。

6 . プレート振盪装置上で、室温で 1 時間インキュベーションする。

7 . 溶液を取り除く。

【 0 0 6 6 】

8 . O c e a n O p t i c s 読取り装置上でスペクトルを読み取る。

9 . 所望により：2 0 0 μ l P B S 、 0 . 0 5 % B S A 、 0 . 2 5 % T w e e n で 3 回洗浄する。

【 0 0 6 7 】

1 0 . O c e a n O p t i c s 読取り装置上でスペクトルを読み取る。

[0 0 8 4] C . 磁気捕捉粒子を使用するサンドイッチイムノアッセイ

[0 0 8 5] 本発明と一致する不均一および均一イムノアッセイの特定の態様は、磁気捕捉粒子の使用を特徴とする。磁気捕捉粒子および S E R S ナノタグ検出粒子を組み合わせた特性は、ロボットの使用、大規模なまたは複雑な試料調製および分析分離を回避する一方、単純で定量的な、迅速（リアルタイム）で、そして多重化されたタンパク質測定を可能にする、生物分析基盤を生じる。図 1 1 は、1 つのアッセイ形式を図解的に例示する。捕捉抗体 1 0 0 を磁気粒子 1 0 2 に共有結合させ、そして検出抗体 1 0 4 を S E R S ナノタグ 1 0 6 に共有結合させる。捕捉粒子および検出粒子の両方を、容器、たとえばポリプロピレン試験管内に装填し（適切な希釈緩衝液であらかじめ希釈する）、その後、試料を装填する。化学薬品、タンパク質または関心対象の物質と会合した抗原 1 0 8 は、捕捉粒子および検出粒子と結合することによって、2 粒子免疫複合体の形成を引き起こす。例えば回転混合ホイール上でのインキュベーション後、試験管を磁気粒子濃縮装置上に置いて、2 粒子免疫複合体に加えて遊離磁気粒子を試験管の底にブルダウンする。次いで、試験管を S E R S 読取り装置上に置いて、そしてレーザーの焦点を磁気粒子上に当てた後、S E R S ナノタグと会合したレポーター分子由来のラマンスペクトルを記録する。したがって、別個の工程において、磁気粒子を分離および洗浄することなく、捕捉された分析物および複合体化した検出粒子を、試料マトリックスおよび過剰な遊離検出粒子がなお存在する間に、反応容器内の特定の位置で濃縮する、本発明の 1 つの側面を実行する。磁気粒子および S E R S ナノタグを用いて実行するアッセイは、全血または血清中のタンパク質の検出に特に有用でありうる。調製の変動およびこの生物分析基盤アッセイの使用を示す例を、以下のセクションで論じる。

【 0 0 6 8 】

[0 0 8 6] 以下の実施例 2 に詳述する方法にしたがって、代表的な磁気捕捉粒子に基づくアッセイを調製した。本発明のこの側面に一致したアッセイを調製するかまたは実行するための他の方法が等しく適切である。

【 0 0 6 9 】

[0 0 8 7] 実施例 2 の方法にしたがって、捕捉粒子および検出粒子の両方を、ポリプロピレン試験管内に装填し（適切な希釈緩衝液であらかじめ希釈する）、その後、試料を装填する。回転混合ホイール上でのインキュベーション後、試験管を磁気粒子濃縮装置上に置いて、磁気粒子を試験管の底にブルダウンする。次いで、試験管を S E R S 読取り装置上において、そしてレーザーの焦点を磁気粒子上に当てた後、ラマンスペクトルを記録する。

【 0 0 7 0 】

10

20

30

40

50

[0 0 8 8] 上述のように、捕捉抗体で誘導体化された磁気粒子、およびレポーターとしての S E R S ナノタグにコンジュゲート化された検出抗体を用いて、C 反応性タンパク質に関する無洗浄（均一）サンドイッチイムノアッセイを調製した。結果は、洗浄を伴わず、そして低コスト検出システムを用いて、生物学的マトリックスの存在下で、2 粒子複合体を分析可能であることを示す。

【 0 0 7 1 】

[0 0 8 9] I L - 4 磁気ガラスコーティングビーズに基づくアッセイの結果を、図 1 2 の用量反応曲線 1 2 0 によって例示する。高濃度の粒子および 1 時間の比較的長いインキュベーション時間を用いて、これらの I L - 4 予備的結果を得た。好ましくは、I L - 4 アッセイの感度を最適化した結果、インキュベーション時間を 3 0 分間または実質的により少なく減少させてもよい。図 1 3 のグラフ 1 3 0 に示すように、インキュベーション時間を 3 0 分間に減少させ、そして検出粒子を 1 0 倍減少させても、シグナルの大きさおよび試験のダイナミックレンジの予期される変化以外には、アッセイ性能に負の影響はなかった。検出粒子濃度をさらに 2 倍減少させると、図 1 4 のグラフ 1 4 0 に示すように、1 m l あたり 1 フェントグラムのアッセイ感度範囲を生じる。図 1 4 の例において、粒子量の減少に伴って、非特異的なシグナルが減少したが、それに応じて全体のシグナル強度もまた減少する。にもかかわらず、これらの結果は、1 0 0 フェントグラム / m l に近いアッセイ感度が達成可能であることを示す。

10

【 0 0 7 2 】

[0 0 9 0] 上述の 1 工程 3 0 分間無洗浄アッセイは、同じ抗体を用いるが、多数の洗浄工程および 2 0 0 μ l の試料体積を含めて、全日に渡る、多数の工程を行うことを必要とする、商業的に入手可能なアッセイの感度（ $\sim 1 0 0$ f g / m l ）に非常に好都合に匹敵する。

20

【 0 0 7 3 】

[0 0 9 1] 限定されるわけではないが、以下を含む多くの要因が、アッセイ感度に影響を及ぼしうる：

- ・ 捕捉粒子および検出粒子表面上の生体適合性コーティング、
- ・ 粒子にコンジュゲート化された抗体量、
- ・ アッセイ緩衝液組成、
- ・ 捕捉粒子および検出粒子濃度、ならびに
- ・ 読取り装置感度。

30

これらの要因の特定のもの、およびこれらの要因の最適化を、以下に詳細に論じる。

【 0 0 7 4 】

[0 0 9 2] 生体適合性コーティング：

[0 0 9 3] 通常、異なる長さ、電荷および極性の天然または合成ポリマーから選択される、生体適合性コーティングの賢明な選択によって、非特異的粒子 - 粒子相互作用の減少を達成してもよい。

【 0 0 7 5 】

[0 0 9 4] S E R S ナノタグ上の抗体濃度：

[0 0 9 5] コンジュゲート化プロセス中、1 0 倍および 1 0 0 倍少ない抗体を用いて、一連の抗体 S E R S ナノタグ・コンジュゲートを調製した。生じたコンジュゲートを試験し、そして減少していない濃度のコンジュゲートと比較した。どちらのコンジュゲートも活性を示さず、これはおそらく、システムにおける検出抗体濃度の全体の減少のためである可能性が最も高い。しかし、有効なアッセイの調製に適した抗体の最小量はまだ決定されていない。

40

【 0 0 7 6 】

[0 0 9 6] アッセイ緩衝液組成：

[0 0 9 7] 緩衝液組成および緩衝液添加物は、アッセイ性能に劇的な影響を有しうる。アッセイブロッキング剤のいくつかの性質を調べた。C R P アッセイに好ましいアッセイ緩衝液は、P B S 中の 5 % B S A、0 . 0 5 % P E G、0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含

50

有する。IL - 4 アッセイには、PBS 中の 1% BSA 溶液が適切である。

【0077】

[0098] 捕捉粒子および検出粒子濃度：

[0099] 多次元マトリックス実験を実行して、アッセイ性能に対する捕捉粒子および検出粒子濃度の影響を主に調べた。図15のグラフ150は、この最適化プロセス中に得られた最適な用量反応曲線を例示する。図14に記載する実験と比較して、試薬濃度がさらに減少し、そしてしたがってアッセイのダイナミックレンジがさらに減少したことに注目されたい。図15のアッセイの結果は、商業的に入手可能な製品と比較して「無洗浄アッセイ」に効果的であり、そして10フェントグラム/mlの感度が達成可能であることを示す。

10

【0078】

[00100] ゼロ較正物質（ブランク）の18の複製物の平均値プラス2標準偏差から計算した検出限界として、アッセイ感度を定義してもよい。あるいは、計時の適切な管理下で、6つの「ゼロ較正物質」を平行して分析してもよい。以下の表1は、「ブランク」または「ゼロ較正物質」の6つの複製物の多数の測定から得た）非特異的シグナルを提供する。~31%の変動係数（cv）を決定したが、これは、独立の実験実行に渡って定期的に見られる平均非特異的シグナル変動と一致する。

【0079】

[00101] 表1：「ブランク」試料の6つの複製物の相対的強度（恣意的単位）
（各試料に関して最低3回測定）。

20

【0080】

【表1】

複製物	1	2	3	4	5	6
測定1	98	282	361	254	303	304
測定2	95	249	267	295	294	307
測定3	128	267	360	251	311	338
測定4	121				315	340
測定5					309	

30

平均 266

標準偏差 81

cv 0.31

【0081】

[00102] 表1に示す、この相対的に高い変動係数は、2粒子間の非特異的相互作用のより十分な対照が望ましいことを示すが、これらの量を減少させると、非特異的結合のため、全体のシグナルが最小化されるようである。

【0082】

[00103] このcvがすべてのアッセイ実行に渡って適用可能であると仮定して、大部分の用量反応曲線に関して、500フェントグラム/ml未満の検出限界を決定してもよい。ここで、決定を行うために、18複製物でなく6複製物を用いたため、ゼロ較正物質（ブランク）の平均値プラス3標準偏差から、検出限界を概算した。

40

【0083】

[00104] 以下に詳細に記載するように、さらに最適化することなく、生物学的マトリックスの存在下で、IL - 4 アッセイを実行してもよい（例えば15%および30%の全血および血清中、中程度の範囲のIL - 4 スパイクが回収可能である）。図16のグラフ160に例示するように、磁気捕捉粒子と免疫複合体を形成するSERSタグは、血清および全血の両方で、検出可能である。「15%血清 - スパイクなし」結果は、500fgのIL - 4とほぼ同じシグナルを生じ、血清試料において、およそ10pg/mlの

50

IL-4濃度が得られた(50 μ l血清中、 \sim 500fg)。5pg/mlでスパイク処理したIL-4の回収は非常に低く、そして試料濃度を増加させると、特異的および非特異的シグナルの両方が劇的に減少した。「15%血清」試料中で、最適な回収(\sim 32%)が得られた。

【0084】

[00105]磁気捕捉粒子およびSERSナノタグ検出粒子を用いて調製したアッセイは、多重化アッセイの実行に特によく適している。IL-4およびCRPの組み合わせに関して、多重化用量反応曲線を実行するため、各分析物に関するユニークな検出タグを調製しなければならない。さらに、2つのアッセイは、同じ緩衝液中で機能する必要がある(アッセイ条件の調和)。第一のBPE SERSナノタグを用いて、例のアッセイを調製した。第二のタグとしてDPYを選択し、そしてIL-4およびCRP両方に対する検出抗体を両方のタグにコンジュゲート化した。さらに、CRPに関する好ましいアッセイ緩衝液は、5%BSA、0.05%PEGおよび0.05%Tween 20を含有するPBSであり、一方、IL-4に関する好ましい緩衝液は、PBS中の1%BSAであるため、調和した緩衝液条件を同定する必要がある。

10

【0085】

[00106]図17のグラフ170は、多重化アッセイのIL-4部分に関する検出タグおよび緩衝液スクリーニング結果を要約し、そしてBPEおよび1%BSAがこのアッセイに関して選択される条件であることを確認する。IL-4 50pg/mlおよび非存在の間のシグナル強度の相違は、1%BSA中のBPEタグで最大である。DPYタグコンジュゲートは、5%BSA(5%BSA、0.05%PEGおよび0.05%Tween 20を含有するPBS)中で十分な陽性シグナルを生じない。

20

【0086】

[00107]図18のグラフ180は、多重化アッセイのCRP部分に関する検出タグおよび緩衝液スクリーニング結果を要約し、両方の検出タグおよび両方のアッセイ条件は、適度によく働き、最適条件は、5%BSA中のBPEタグである。適切な多重化アッセイは、IL-4に関するBPEタグ、および緩衝液の好ましい選択肢としての1%BSAに基づいてもよい。したがって、CRPに関しては、DPYタグを選択してもよい。図19のグラフ190に示すように、アッセイのCRP部分は、これらの理想的な条件より劣る条件下で、依然として機能する。図20のグラフ200は、CRPおよびIL-4両方に関する陰性対照および陽性対照のシグナル強度(単一)、その後、多重化実験(二重陰性および二重陽性)を示す。多重化アッセイにおいて、4つのアッセイシグナルのうち3つでシグナル強度が減少していることが注目された。IL-4(0)シグナル強度のみが、単一アッセイで示したものと類似のままであった。にもかかわらず、陽性読取り値の回収は、CRPアッセイに関しては依然として同じであり(単一および多重化アッセイ両方で、 \sim 400単位の相違)、一方、IL-4の場合、回収は強く抑制された。これは、アッセイ間干渉を示す。例えば、CRPに基づく複合体が過剰に存在すると、はるかに少数のIL-4特異的複合体の正確な読取りが妨げられうる。IL-4スパイクの全体のシグナル抑制および低い回収の根底にある理由を理解し、そして解明するには、さらなる研究が必要である。

30

40

【0087】

実施例2:

[00108]磁気捕捉粒子を用いて調製したアッセイの以下の実施例を例示目的のためだけに提供し、そしてこれは、本発明の範囲を限定することを意図しない。出願者らは、図11に示すものなどのアッセイに関して実験を行った。

【0088】

[00109]1. チオール化SERSナノタグに対する抗体コンジュゲート化

[00110]スルホ-SMCCの溶液(100 μ l、水中、1mg/ml)を、PBS中の抗体の溶液(50 μ g、50 μ l)に添加した。30分後、Sephadex G 25マイクロスピン脱塩カラム(Amersham)を用いて、マレイミド活性化抗体を

50

精製した。次いで、精製したコンジュゲートをチオール化SERSタグ(100 µl PBS中、 4×10^{10} 粒子)に添加した。室温で2時間後、MESAの溶液(50 µl、10 mg/ml)、その後、5%BSA溶液(25 µl)で、反応を30分間停止した。タグコンジュゲートを洗浄し、遠心分離によって精製し、そして所望の緩衝液中、所望の濃度で、0.1%BSAに再懸濁した。

【0089】

[00111] 2. 磁気ガラスコーティングビーズのカルボキシル化

[00112] Bioclonerの磁気ガラスコーティングビーズ(4 mg)をエタノール(1 ml)で2回洗浄した後、エタノール中の2%APTMS(3-アミノプロピルトリメトキシシラン)(1 ml)の溶液で、室温で30分間処理した。磁氣的ブルダウンを介してビーズを洗浄し、そしてホットプレート(50)上、エタノール(500 µl)で30分間処理した。エタノールおよび水で洗浄した後(3回)、4 mg/mlで、水中で磁気粒子を保存した。DMSO中の無水コハク酸(20 µl、40 mg/ml)で30分間処理することによって、ホウ酸緩衝液中、カルボキシル化を行った。カルボキシル化ビーズを洗浄し、そして水中で保存した。

10

【0090】

[00113] 3. カルボキシル化磁気ガラスコーティングビーズおよびDynabeadsへの抗体コンジュゲート化のための一般的な方法

[00114] PBS(100 µl)中のカルボキシル化磁気ガラスコーティングビーズまたはDynabeads M-270カルボン酸(1 mg)を、EDC溶液(10 µl、1 mg)の添加前に、抗体(30 µl、1 mg/ml)で30分間処理した。混合物を室温で2時間、ゆっくり傾斜回転させながらインキュベーションした後、PBS中のエタノールアミン(200 µl、3 mg/ml)で0.5時間ブロッキングした。次いで、コンジュゲートを洗浄し、そしてPBS中の1%BSA溶液で、一晩さらにブロッキングし、そして同じ緩衝液中、4 で保存した。

20

【0091】

[00115] 4. C反応性タンパク質(CRP)に関する、磁気ビーズに基づく均一アッセイ

[00116] エッペンドルフ試験管(ポリプロピレン、500 µl)に以下の試薬を連続して装填した。

30

【0092】

- A. 10 µl 磁気ガラスビーズ-抗CRPコンジュゲート(10 µgビーズ)
- B. 100 µl 緩衝液(PBS、1%BSA)
- C. PBS、1%BSA中の100 µl 抗CRP-SERSコンジュゲート
- D. 100 µl 分析物溶液(PBS、1%BSA)

[00117] 混合ホイール上で30分間穏やかに混合することによって、混合物を室温でインキュベーションした。磁気粒子濃縮装置を用いて、試験管の底に磁気粒子を引っ張った。試験管をラマン読取り装置上に置き、そして光学検出システムの焦点面内に、試験管の底(すなわち磁気ビーズ)が置かれるように調整した。1秒間の読取り時間後、獲得したデータを、分析物濃度測定を可能にする私有のソフトウェアパッケージで換算した。

40

【0093】

[00118] 緩衝液中のCRPを検出するため、Dyna1の1 µmガラスコーティング磁気粒子、およびビス(4-ピリジル)エチレン(BPE)SERSナノタグを用いて、データを収集した。Delta Nu社のInspectorラマン装置上でラマンスペクトルを収集した。Inspectorラマンシステムは、40 mW、785 nmレーザー励起、自由空間光通信を使用し、持ち運び可能であり、そしてラップトップコンピュータにインターフェースで接続可能である。スペクトルの最小二乗適合を実行して、複雑な混合物における構成要素を定量化するソフトウェアプログラムを用いて、データを分析した。図21のグラフ210は、炎症および心臓血管疾患の診断のための生物学的に適

50

切なターゲットである、CRPに関する用量反応曲線を示す。したがって、アッセイは、約25分間で行われる、1工程均一無洗浄法である。1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CRPでのSER S反応が、100 ng/ml での反応より低いという観察は、過剰な分析物が、捕捉抗体および検出抗体部位の両方を飽和させ、したがって免疫サンドイッチの形成を禁じる、阻止帯または「フック効果」に起因する。

【0094】

[00119] 上述の緩衝液中の用量反応を数回反復すると、同じ試験管の3つ組読取りに関する15%未満の変動係数(c v)を持つ標準偏差を生じることによって、優れたアッセイ再現性があった。ブランクを20回読み取って、20%のc vおよび200 pg/ml のアッセイ内検出限界を得た。この検出限界は、ヒトCRPの平均の正常生理学的濃度(100 ng/ml)より500倍よりも低い。

10

【0095】

[00120] 血漿または血液などの生物学的マトリックスのバックグラウンド中で、SER Sナノタグを読み取ることも可能である。図9Cは、ガラスバイアル中、全血および血漿の70:30混合物のSER Sスペクトルを示す。無希釈血漿および全血が、どちらも、700~1800波数の間で、有意なラマン散乱強度を持たないことに注目することが重要である。図9Aの上部のトレース90は、SER Sナノタグを同じ生物学的カクテルに添加した際と、同じスペクトルを示す。これは、生物学的マトリックスにおいて、適切なシグナル対ノイズ比を持つSER Sナノタグの読取りが実現可能であることを例示する。

20

【0096】

[00121] すべてのコンジュゲート化抗体が、活性のままではないし、そしてすべての粒子がコンジュゲート化後、コロイド的に安定なままであるわけではない。各分析物に関して、多数の付着化学反応、多数のタイプの磁気粒子(サイズ、組成および表面官能性が異なる)、多数のSER Sタグ官能性および多数の抗体を調べてもよい。

【0097】

[00122] 捕捉粒子および検出粒子の両方に対するバイオコンジュゲート化の頑強でそして調節可能な方法を発展させることが重要である。適切なSER Sナノタグおよび磁気粒子は、ガラス被包であってもよい。同じバイオコンジュゲート化化学反応を用いることが可能でありうる。商業的に入手可能なカルボキシ-、メルカプト-、およびアルデヒド-シランで表面シラノール基を容易に誘導体化させて、広い最適化空間を研究することを可能にしてもよい。表面修飾のための好ましいプロトコルは、チオール化SER Sナノタグに頼る。カルボキシレート、アミンおよびアルデヒド官能性は、より安定な中間産物を生じうる。異なる付着化学反応(異なる反応条件に対応する)を調べてもよい。これは、表2に示すように、大部分の生物学的分子に関する緩衝液必要性(Pi)を含み、そしてコンジュゲート化中の凝集および変性の可能性を回避すべきである(Kricka(2005) *Microchips, microarrays, biochips and nanochips - personal laboratories for the 21st century*. <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol12no4/vol12no4a2.htm>; MacBeathおよびSchreiber(2000) *Science* 289: 1760-1763; KusnezowおよびHoheisel(2003) *J. Molecular Recognition* 16: 165-176; Nemzekら(2001) *J. Immunol. Methods* 255: 149-157)。例えば、還元的アミノ化は、カルボジイミド反応(EDC)より広いpH範囲に渡って働き、そしてしたがって、pHを調節し、そして抗体安定性/緩衝液必要性に適応させることが可能であるため、いくつかの利点を提供する(Hermanson(1996) *Bioconjugate Techniques*. Academic Press.)。この方式で、抗体沈降または粒子凝集を回避することも可能である。他の利点は、アミン結合がアミド結合よりも安定であり、抗体の全体の電荷が還元的アミノ化後にそのままであり、そしてカルボジイ

30

40

50

ミド反応中に、非常にしばしば観察されるようには、抗体架橋がまったく起こらないことである。

【0098】

[00123]表2：表面官能化およびコンジュゲート化化学反応のリスト

【0099】

【表2】

粒子官能性	コンジュゲート化 化学反応	条件、pH
カルボキシレート	EDC	5~7
チオール	マレイミド	7~8
アルデヒド	還元的アミノ化	7~10

10

【0100】

[00124]主な変化点は、非特異的結合(NSB)の排除、ならびに磁気粒子およびSERSナノタグ間の相互作用の理解にある。異なるコンジュゲート化プロトコル、および表面被覆の各々がNSBに影響を及ぼすレベルを調べてもよい。標準的ブロッキング剤および洗浄緩衝液(異なるpHおよび緩衝液に加えて、例えば、BSA、Tweenおよびカゼイン)の使用を調べてもよい。反応時間および粒子の濃度もまた重要であろう。粒子が非特異的に凝集しないことが重要であろう。磁気粒子およびSERSナノタグが同じ表面特性を有する際に、非特異的結合が最小限になると予期される。NSBが克服不能であると証明されたら、すべて低いNSBを有することが知られる、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコールおよびデキストラン、ポリエチレンイミン(Leeら(2002)Bioconj. Chem. 13:97-103)、ならびに dendriマー(Le Berreら(2003)Nucleic Acids Res. 31:e88)などのポリマーに基づく、SERSナノタグガラスシェルの誘導体化を調べる。対のアクセシ性能を評価し;緩衝液中の感度、ダイナミックレンジおよび特異性を決定することによって、SERSナノタグおよび磁気粒子の生体機能化(biofunctionalization)の最適化プロトコルを選択してもよい。

20

30

【0101】

[00125]ガラスコーティングした超常磁性粒子を捕捉粒子として用いてもよい。分子生物学において、磁気分離に一般的に利用され、そしてDyna1、Bangs Laboratories、CPG Inc.およびPerSeptive Biosystemsなどの企業を通じて容易に入手可能な他の粒子もまた、考慮してもよい。これらの典型的な磁気化可能粒子は、広いサイズ範囲で(50nm~数マイクロメートル)、酵素イムノアッセイ(8)において、そして他の結合アッセイのため、広範囲で用いられてきている。Dyna1の2.8ミクロンのカルボキシル化ポリスチレンでコーティングした磁気粒子を、Biocloneの1ミクロンのガラスコーティング磁気粒子(Bioclone Magnetic Particles(2005)http://www.bioclon.com/functional-magnetic-paramagnetic-NH2-COOH-silica-epoxy-IDA-beads.html)と比較し、そしてCRP用量反応データにおいて、より多孔性でないガラスコーティング粒子が、SERSナノタグのより低い非特異的相互作用を生じることを見出した。アミン、カルボキシ、アルデヒド、エポキシ、シリカ、ヒドラジド、および抗体の安定度そして共有的な結合に用いられている他のものなどの異なる表面官能基を伴う粒子を得てもよい。

40

【0102】

[00126]非常に再現性がある方式で、スペクトル的に別個のSERSナノタグを製造する(図2に例を示す)。より明るく、そして均一な強度を有する、将来の粒子を用

50

いて、よりよい検出限界を達成することも可能である。

【0103】

【00127】ポリプロピレンで作製されたエッペンドルフ試験管中で、上に論じるデータを得た。ラマン分析の主な利点は、バイオアッセイ・コミュニティで用いるアッセイ容器の多くの材料が、ラマン光散乱に対して透過性であり、そしてこれらの材料のバックグラウンド・ラマンシグナルが、一般的に最小限であることである。多くの提唱されるアッセイ形式は、(蛍光の場合に非常にしばしばそうであるようには)アッセイ容器の性質によって限定されず、より重要なことに、多くのアッセイ容器の壁材料を通じて、SERSシグナルを読み取ることも可能である。唯一の限定は、容器壁が、レーザー光エネルギー(典型的には650または783nm)に干渉せず/これを吸収しないことである。96ウェルプレート、試験管、バイアル、パキュテナーおよびカップを含む、非常に多様な、安価でそして一般的に用いられるアッセイ容器が、記載するアッセイに適している可能性もある。以下の材料タイプ:ガラス、シリカ、シリコン、シラン化ガラス、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリウレタン、テフロン、ポリスチレン、ニトロセルロース、セルロース、ポリエステル、およびポリカーボネートが、アッセイ容器で使用するのに適している可能性もある。

10

【0104】

【00128】D. SERS / 磁気ビーズハイブリダイゼーションおよびDNAアッセイ。

【00129】SERS磁気DNAアッセイとして機能するように、SERSナノタグおよび磁気ビーズをハイブリダイズさせてもよい。図22は、SERS磁気ビーズハイブリダイゼーションの1つの方法を例示する模式図である。より明るい球体2200およびより暗い球体2202は、カルボキシル表面を持つ、ガラスコーティング磁気ビーズを代表する。標準的EDC化学反応を用いて、ビーズの2つの集団を、2つの異なるオリゴヌクレオチド配列2204および2206にコンジュゲート化する。ピオチン部分2208を含有する相補的/非相補的オリゴヌクレオチド配列2207に、各集団を別個にハイブリダイズさせる。したがって、この時点では真の多重化は起こらず、むしろ各配列を、別個のエッペンドルフ試験管中で反応させる。記載するプロセスは、多重化試験のためのビーズハイブリダイゼーションにもまた適用可能である。ストレプトアビジンにコンジュゲート化されたSERSナノタグ2210を反応に添加し、そして磁場を用いてペレットを単離する。最初の実験において、Renishaw InViaラマン顕微鏡などのラマン読取り装置2212を用いて、ペレットを読み取った。あるいは、より安価なまたは持ち運び可能なラマン検査デバイスを利用してもよい。代表的なアッセイを以下の実施例3に記載する。他の方法が、本発明のこの側面と一致するアッセイを調製するかまたは実行するのに等しく適している。

20

30

【0105】

【00130】ピオチン:ストレプトアビジン・ハイブリダイゼーション・アプローチの利点は、照合中のターゲット配列をSERSタグで標識する必要がなく、その代わりに、ピオチンで標識してもよいことである。しかし、多重化は困難である。3片連結を使用して、多重化を可能にすることが望ましい可能性もある。あるいは、コンジュゲート化の順番を逆にして、元来の配列をまず、異なる「フレーバー」のSERSナノタグに付着させ、その後、磁気粒子をストレプトアビジン・コーティングしてもよい。

40

【0106】

【00131】図23のグラフ2300は、上述のようなSERS磁気ビーズシステムでのp53突然変異体DNAの検出を例示する。図22および23のアッセイは最適化されていないアッセイである。p53遺伝子中のL344P突然変異体から選択したオリゴヌクレオチド配列の2つの変異体を設計し、N30AおよびN30Bと名付けた。N30AおよびN30B変異体のターゲット配列は以下のとおりである:

【00132】表3

【0107】

50

【表 3】

オリゴ名	設計	野生型/ 突然変異体	コドン変化	配列	Tm
N30A N30A-T	プローブ ターゲット	p53 L344P	CTG-CCG Leu-Pro	アミン-C12-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	70
				5'ビオチン CTCATTCCAGCTCTCGG	70
N30B N30B-T	プローブ ターゲット	p53 L344P	CTG-CCG Leu-Pro	アミン-C12-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	72
				5'ビオチン CTCATTCCGGCTCTCGG	72

【 0 1 0 8 】

10

【 0 0 1 3 3 】試験管 1 において、N 3 0 A ターゲットを、N 3 0 A 配列にコンジュゲート化した磁気ビーズに添加し（図 2 3 の N 3 0 A と示す結果の左に示す）、そして試験管 2 において、N 3 0 A ターゲットを、N 3 0 B 配列にコンジュゲート化した磁気ビーズに添加した（右に示す）。N 3 0 A および N 3 0 A ターゲットの両方が存在している場合にのみ、有意なシグナルが観察され、非相補的 N 3 0 B 配列からはより小さいシグナルが生じた。試験管 3 において、N 3 0 B ターゲットを、N 3 0 A 配列にコンジュゲート化した磁気ビーズに添加し（図 2 3 の N 3 0 B と示す結果の左に示す）、そして試験管 4 において、N 3 0 B ターゲットを、N 3 0 B 配列にコンジュゲート化した磁気ビーズに添加した（右に示す）。N 3 0 B および N 3 0 B ターゲットの両方が存在している場合にのみ、有意なシグナルが観察され、非相補的 N 3 0 A 配列からはより小さいシグナルが生じた。ターゲットをまったく添加しない対照実験を実行し（グラフ 2 3 0 0 中の 3 番目の 2 本のバー）、そして予期されるように、低いシグナルが観察された。

20

【 0 1 0 9 】

【 0 0 1 3 4 】図 2 4 のグラフ 2 4 0 0 は、上述のような S E R S DNA 磁気アッセイの滴定結果をグラフで例示する。N 3 0 A コンジュゲート化磁気ビーズ内にドーピングした N 3 0 A オリゴヌクレオチドターゲットの滴定を実行して、潜在的な検出限界を決定した。

【 0 1 1 0 】

実施例 3 :

【 0 0 1 3 5 】 S E R S 磁気ビーズハイブリダイゼーションおよび DNA アッセイ

30

【 0 0 1 3 6 】 コンジュゲート化

1 . 4 0 μ l の磁気ビーズを取る (8 × 1 0 ⁷) 。 5 0 m M M E S (p H 4 . 5) でビーズを 2 回洗浄する。

【 0 1 1 1 】

2 . 1 6 3 μ l の 5 0 m M M E S (p H 4 . 5) でビーズを再懸濁し、そして 2 μ l の 5 0 μ M オリゴ (1 0 0 p m o l) を添加し、氷上に置く。

3 . 5 0 m M M E S (p H 7 . 0) 中、2 0 % E D C を作製する (5 0 μ l M E S で 1 0 m g E D C) 。

【 0 1 1 2 】

4 . 1 5 μ l の 2 0 % E D C をビーズ / オリゴに添加し、よく混合し、そして 4 1 時間振盪する。

40

5 . 5 0 0 μ l の 1 0 m M P B S で 4 回洗浄する。すべてのコンジュゲート化されていないオリゴを洗い流すことが非常に重要である。

【 0 1 1 3 】

6 . 4 0 μ l P B S 中に再懸濁する (ビーズ 8 × 1 0 ⁷) 。

【 0 0 1 3 7 】 ハイブリダイゼーション

7 . 3 3 μ l の 2 × T M A C 緩衝液を取り、5 μ l の 1 0 μ M オリゴおよび 5 μ l の磁気ビーズプローブ (4 × 1 0 ⁶) を添加する。5 5 で 1 時間ハイブリダイズする。

【 0 1 1 4 】

8 . 1 × S S C で、室温で 5 分間洗浄し、そして 0 . 1 × S S C で、5 5 で 5 分間

50

洗淨する。

9. 1 x ニュートラアビジン - B P E (S E R S タグ) を添加し、そして 3 0 分間インキュベーションする。

【 0 1 1 5 】

10. 1 0 m M P B S で 2 回洗淨する。

11. R e i n s h a w I n V i a ラマン顕微鏡によってラマンシグナルを獲得する。

【 0 1 1 6 】

[0 0 1 3 8] E . 競合的 S E R S / 磁気ビーズアッセイ。

[0 0 1 3 9] S E R S ナノタグ検出粒子および別個の捕捉粒子を使用して、本発明と一致する均一 2 粒子競合的アッセイもまた実行してもよい。捕捉粒子が磁性であるならば、以下に記載する特定の利点が達成されるが、本発明のこの側面の範囲は、磁気捕捉に限定されない。競合的アッセイ形式を選択して、任意のタイプのバイオアッセイ診断試験を実行してもよい。しかし、競合的形式は、上述のような、サンドイッチ型免疫複合体を形成可能な 2 つの異なる抗体に対応するには小さすぎる分析物の検出に、特に好適である。本明細書に記載するような競合的アッセイ形式を利用して、限定されるわけではないが、療法的薬剤、非療法的薬剤（薬剤乱用監視）、ペプチド、ホルモン、タンパク質、または関心対象の他の分析物を含む、任意のタイプの分析物を検出してもよい。競合的アッセイ形式はまた、関心対象の分析物に関して、1 つの結合剤しか容易に入手可能でない場合にも、特に好適である。

【 0 1 1 7 】

[0 0 1 4 0] 捕捉粒子および S E R S ナノタグ検出粒子を特徴とする特定の特異的競合的アッセイ形式を以下に詳細に記載する。しかし、一般的に、すべての競合的アッセイ形式は、分析物またはその類似体での捕捉粒子または検出粒子いずれかの標識を必要とする。検出粒子は、蛍光、着色または S E R S 活性粒子など、光学的に標識されていてもよい。分析物またはその類似体で標識されていない粒子を、分析物に結合するのに適した結合剤にコンジュゲート化させる。例えば、図 2 5 A に示すように、捕捉粒子 2 5 0 0 を、関心対象の分析物 2 5 0 2 で誘導体化してもよい。さらに、S E R S ナノタグ検出粒子 2 5 0 4 を、分析物 2 5 0 2 に選択的に結合可能な結合剤 2 5 0 6 にコンジュゲート化してもよい。図 2 5 A に示すように、遊離分析物 2 5 0 2 を含有する試料を、上述のように調製した捕捉粒子および S E R S ナノタグ検出粒子と接触させた結果、捕捉粒子 / S E R S 検出粒子複合体 2 5 0 8 に加えて、遊離分析物 2 5 1 0 に結合した S E R S 検出粒子が形成されるであろう。

【 0 1 1 8 】

[0 0 1 4 1] 捕捉粒子 2 5 0 0 は、磁気捕捉粒子または濃縮に適した他の粒子であってもよい。1 つの非磁性態様において、捕捉粒子は、遠心分離によってブルダウンされる巨大なまたは高密度な粒子である。巨大でそして / または高密度な捕捉粒子には、関心対象の溶媒中での遠心分離によってブルダウンされるのに十分な比重、サイズ、および形状を持つ、限定されるわけではないが、ナノバーコード（登録商標）粒子、球状または異方性金属ナノ粒子、あるいは限定されるわけではないが、ラテックス、ポリスチレン、または他の物質からなる任意のタイプの粒子が含まれる。図 2 5 A の例において、捕捉粒子 / S E R S 検出粒子複合体 2 5 0 8 を濃縮して（捕捉粒子が磁気粒子である場合、磁気濃縮装置を用いて）、そして S E R S ナノタグ検出粒子と会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを獲得してもよい。遊離分析物 2 5 0 2 は、コンジュゲート化された S E R S ナノタグ検出粒子のいくぶんかに競合的に結合するであろうため、ラマンシグナル強度は、試料に存在する遊離分析物の濃度に反比例するであろう。遊離分析物の濃度が増加するに連れて、比例して、より少ない S E R S ナノタグ検出粒子が、誘導体化された磁気捕捉粒子に結合する。

【 0 1 1 9 】

[0 0 1 4 2] あるいは、図 2 5 B に示すように、分析物 2 5 0 2 またはその類似体で

10

20

30

40

50

、SERSナノタグ検出粒子2504を誘導体化するかまたは別の方式で標識してもよい。こうした場合、磁気捕捉粒子であってもよい捕捉粒子2500を、分析物に結合するのに適した結合剤とコンジュゲート化していてもよい。こうして調製された粒子が、関心対象の分析物を含む試料と接触した際、捕捉粒子は、遊離分析物、または分析物で誘導体化されたSERSナノタグ検出粒子のいずれかと自由に結合する。記載するような、捕捉された粒子の濃縮、およびラマンスペクトルの獲得に際してもまた、ラマンシグナル強度は、試料中に存在する遊離分析物の濃度に反比例する。

【0120】

実施例4：

[00143] A. 同時試薬添加を伴う競合的アッセイ形式

[00144] 最初の競合的形式では、捕捉粒子および検出粒子を迅速な順序で、分析物含有試料に添加する。インキュベーション中、いずれかが「A」と称される遊離分析物または分析物の類似体、および粒子にコンジュゲート化された分析物の両方が、コンジュゲート化された結合剤「R」に関して競合しうる。結合剤「R」は、内因性Aに対するアフィニティーに比較して、類似体Aに対して異なるアフィニティー（好ましくはより低いアフィニティー）を有してもよい。インキュベーション後、磁気粒子（どの粒子が結合剤とコンジュゲート化されたかに応じて、遊離MP粒子およびMP-R： A -SERSまたはSERS-R： A -MP複合体を含む）を、反応容器内の決定した位置で濃縮し、その後、ラマンスペクトルを獲得してもよい。ラマンシグナル強度は、試料中に存在する遊離（内因性）分析物の濃度（量）に反比例する。この競合的アッセイで形成される可能性のある複合体は、どの粒子が分析物または類似体で誘導体化されたかに応じて：

[00145] MP-A + A + SERS-R SERS-R： A + SERS-R： A -MP；または

[00146] SERS-A + MP-R + A MP-R： A + MP-R + SERS-A + MP-R： A -SERS

である。

【0121】

[00147] B. 連続試薬添加を伴う偽競合アッセイ形式

[00148] 第二の競合的アッセイ形式において、分析物を含む試料をまず、結合剤「R」にコンジュゲート化された粒子（MP-RまたはSERS-R）と所定の時間、インキュベーションして、Aにコンジュゲート化された粒子の添加前に、内因性分析物「A」の捕捉を可能にする。次いで、後に添加される、分析物で誘導体化された粒子は、残った粒子-Rコンジュゲート（MP-RまたはSERS-R）に結合する。インキュベーション後、磁気粒子（遊離MP粒子およびMP-R： A -SERSまたはSERS-R： A -MP複合体）を反応容器内の決定した位置で濃縮し、その後、ラマンスペクトルを獲得する。分光的に決定されるMP-R： A -SERSまたはSERS-R： A -MPの数は、試料中に存在する遊離（内因性A）の濃度に反比例する。2工程偽競合的プロセスには、どの粒子が結合剤にコンジュゲート化されたかに応じて、以下の反応が含まれる。

【0122】

[00149] SERS-R + A SERS-R： A + SERS-R
(SERS-R： A + SERS-R) + MP-A SERS-R： A + SERS-R
： A -MP；または

[00150] MP-R + A MP-R： A + MP-R
(MP-R： A + MP-R) + SERS-A MP-R： A + MP-R： A -SERS

[00151] さらに別のアッセイ形式において、SERS-R： A -MP（またはMP-R： A -SERS）をあらかじめ形成し、そして液体または凍結乾燥型のいずれかで、アッセイ容器中に保存してもよい。試料の添加に際して、この粒子-粒子複合体は、以下の反応にしたがって、分析物濃度に比例して、内因性Aとの相互作用によって、解

10

20

30

40

50

離する。

【0123】

[00152] MP - R : : A - S E R S + A MP - R : : A + MP - R : : A - S E R S ; または

[00153] S E R S - R : : A - M P + A S E R S - R : : A + S E R S - R : : A - M P

[00154] F .ヌクレオチド配列検出アッセイ

[00155] また、S E R S ナノタグ検出粒子および別個の捕捉粒子を用いて、ヌクレオチド配列検出のための多様なタイプのアッセイを実行してもよい。本明細書に記載するようなアッセイによる検出に適したヌクレオチド配列は、任意の供給源または生物由来であってもよい。例えば、ヌクレオチド供給源には、限定されるわけではないが、ヒト、動物、植物、細菌、ウイルスまたは他の遺伝物質が含まれる。捕捉粒子が磁性であるならば、以下に記載するような特定の利点が達成されるが、本発明のこの側面の範囲は、磁気捕捉粒子を特徴とする態様に限定されない。本明細書記載のヌクレオチド配列検出アッセイは、洗浄工程または試料混合物の除去の必要性を伴わずに、未精製溶解物および不純な DNA 調製物において、ターゲットヌクレオチド配列の検出を可能にする。本明細書記載の特定のアッセイは、短時間で、例えば半時間以下で完了しうる。

10

【0124】

[00156] 本発明と一致する1つのヌクレオチド配列検出アッセイを図26に図解的に例示する。図26のアッセイは、粒子にコンジュゲート化された捕捉ヌクレオチド配列2602を含む、少なくとも1つの捕捉プローブ2600を特徴とする。粒子が磁気ビーズ、常磁性ビーズまたは他の磁気粒子2604であるならば、以下に記載する選択工程を最適化してもよい。このアッセイにはまた、捕捉分子2610にコンジュゲート化された検出配列2608を含むヌクレオチド配列検出プローブ2606も含まれる。捕捉配列および検出配列の両方が、関心対象のヌクレオチド配列に対するハイブリダイゼーション・アフィニティーを有するように選択する。捕捉分子は、相補ターゲットに結合するのに適したいかなる分子であってもよい。例えば、検出プローブ2606は、ピオチン化または別の方式でハプテン化した配列であってもよい。ピオチンなどの第一の捕捉分子2610にコンジュゲート化されている第一の検出配列2608、および別のハプテンなどの異なる捕捉分子2614にコンジュゲート化されている第二の検出配列2612を伴う別個の検出プローブ2606を提供することによって、多重化アッセイを調製してもよい。このアッセイは、相補ターゲットに結合可能な任意の捕捉分子2610で実行可能であることに注目することが重要である。ピオチンおよび別のハプテンを用いる前述の例は、例示目的のためのみに提示され、そして本発明の範囲を限定することを意図しない。

20

30

【0125】

[00157] 関心対象のヌクレオチド配列の存在下で、捕捉プローブおよび検出プローブをハイブリダイズさせることによって、図26に例示されるアッセイを実行してもよい。さらに、ハイブリダイズした複合体を、捕捉分子2610に選択的に結合可能な、相補ターゲット分子にコンジュゲート化されたS E R S ナノタグ2616とインキュベーションするかまたは別の方式で接触させてもよい。例えば、捕捉分子としてピオチンを選択した場合、S E R S ナノタグをニュートラアビジンにコンジュゲート化してもよい。

40

【0126】

[00158] S E R S ナノタグ複合体とハイブリダイズしたプローブのインキュベーション後、S E R S ナノタグと会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを、ラマン分光計、ラマン顕微鏡または他の検出デバイス2618で検出してもよい。生じたハイブリダイズ複合体の濃縮または選択を達成して、未結合ナノタグからハイブリダイズしたナノタグを分離しなければならない。捕捉プローブを調製するのに磁気粒子2604を用いた場合、既知の磁気濃縮技術を用いて、磁気粒子の選択を達成してもよい。

【0127】

[00159] 図26のアッセイ有効性の実験的検証のデータを図27~32に図で示

50

す。実験的に決定したアッセイの検出限界は、およそ4 pMであった。

[00160] 図27は、ヌクレオチド配列検出アッセイで使用するのに適した詳細なプローブ設計である。B1プローブを磁気粒子2604にコンジュゲート化してもよいし、そしてS1プローブをSERSTAG2616にコンジュゲート化してもよい。ハイブリダイゼーションは、Bプローブ、Sプローブおよびターゲットが、適切な条件、例えば55で存在する場合、進行するであろう。

【0128】

[00161] 図28は、図26に示すアッセイ概念の証拠を示すグラフ2800を例示する。大腸菌(E. coli)ターゲット遺伝子Stex1オリゴを1000 pMから1 pMに希釈した。データは、検出限界が約4 pMで99.7%信頼性であることを示す。

10

【0129】

[00162] 図29は、HIVおよびHCV検出用に設計された、特定のRT-PCRプライマーおよびハイブリダイゼーション・プローブを例示する。例えば、HCV 5' pおよびHCV 3' プローブをRT-PCRに用いてもよい。例示したBプローブを磁気ビーズ2604などの磁気粒子にコンジュゲート化し、そして例示したSプローブをSERSTAG2616にコンジュゲート化してもよい。図30のグラフ3000および3002は、HCV(3000)およびHIV(3002)の滴定結果を例示する。図30でやはり例示するのは、ターゲット濃度およびシグナル間の直線相関である。HCVの検出限界は約4.1 pMであることが示され、そしてHIVは約3.7 pMであることが示された。臨床試料に対するこのアッセイの有効性を確認するため、RT-PCRによって、HCVまたはHIV RNA試料を増幅し、そしてこのシステムによって、これらの産物を検出した。結果は、本明細書に記載するようなHCVプローブが、HCV配列特異的ターゲットを検出するのに適していることを例示する。HAVまたは陰性対照などの間違っただけのターゲットの誤った検出は観察されなかった(図31のグラフ3100を参照されたい)。HIVを検出する際に、類似の結果を得た。例えば、図32のグラフ3200を参照されたい。結果は、RT-PCR産物の検出限界が約0.28~2.8 pMであることを示した。これは、記載するアッセイが、0.28~4 pM程度に低いDNAターゲット濃度を検出可能であることを確認する。

20

【0130】

[00163] 別のヌクレオチド配列検出アッセイを図33に図解的に例示する。図33のアッセイにおいて、磁気粒子であってもよい粒子3302を、捕捉配列3304または3305にコンジュゲート化することによって、1以上のタイプの捕捉プローブ3300を提供する。さらに、検出配列3308、3309を、SERSTAG3310または3311に直接コンジュゲート化することによって、1以上のタイプの検出プローブ3306を提供してもよい。各場合で、捕捉配列および検出配列が、ターゲットヌクレオチド配列に対するハイブリダイゼーション・アフィニティーを有するように選択する。関心対象のヌクレオチド配列の存在下で、捕捉プローブ3300および検出プローブ3306をハイブリダイズさせてもよい。続いて、生じた複合体を選択するかまたは濃縮した後、SERSTAGと会合したラマンレポーター分子のラマンスペクトルを検出してもよい。捕捉プローブ3300を調製するのに磁気粒子3302を用いる場合、既知の磁気濃縮技術を用いて、関心対象の複合体を選択するかまたは濃縮してもよい。別個の捕捉配列3304、3305を特徴とする多数の捕捉プローブ3300、および別個のラマンレポーター分子を特徴とするSERSTAG3310、3311のタイプにコンジュゲート化されている、各タイプの別個の検出配列3308、3309を伴う多数の検出プローブ3306を提供することによって、多重化試験を調製してもよい。

30

40

【0131】

[00164] 図34のグラフ3400は、図33に例示するアッセイの実験的検証の結果の代表である。模倣オリゴヌクレオチドシステムにおける検出限界は、最適化されていないアッセイ条件下で、およそ10 pMであった。モデルシステムにおける検出限界は

50

、バックグラウンドとしての関連しないゲノムDNAの存在下でハイブリダイゼーションが起こる場合に、減少する。オリゴヌクレオチドプローブが、所望の模倣オリゴターゲットの代わりに、メガ塩基ゲノムDNAターゲットにハイブリダイズする場合、検出可能性はさらに減少しうる。したがって、特定の場合、アッセイの効率および感度を増加させることが望ましい可能性もある。

【0132】

[00165]ヌクレオチドアッセイ感度を増加させる1つの方法を、図35に図解的に例示する。このアッセイには、関心対象のヌクレオチド配列3500を多数のセクションにまず切断するかまたは破壊する工程が含まれる。この工程において、ヌクレオチドをセクションに切断するいかなる既知の技術を使用してもよい。例えば、頻繁に、そして迅速に作用する制限酵素を用いて、関心対象のヌクレオチドを小片に消化してもよい。ターゲットヌクレオチドのこうして調製したセクションを、次いで、多数の別個の捕捉プローブおよび多数の別個の検出プローブとハイブリダイズさせてもよく、プローブの各タイプは、関心対象のヌクレオチド配列の別個の部分に対する別個のハイブリダイゼーション・アフィニティーを有する。上述のように、検出プローブをSERSNナノタグにコンジュゲート化し、そして捕捉プローブを磁気粒子にコンジュゲート化してもよい。アッセイ試料に存在する所望のターゲットの多数の断片が、多数の検出粒子に別個に結合可能であり、これがシグナルを増加させ、そしてしたがってアッセイ感度を増加させるため、多数の小片へのターゲットDNAの断片化は、ハイブリダイゼーション効率およびターゲット複合体濃度を効果的に増加させる。図35に例示する方法と関連する利点は、この方法が、増幅バイアスの導入を伴わずに、アッセイ感度を増加させることである。

10

20

【0133】

[00166]あるいは、より大きいヌクレオチド断片（例えば消化を伴わないかまたは最小限の消化しか伴わない、ゲノムまたは遺伝子断片）を、捕捉粒子にコンジュゲート化された捕捉配列とハイブリダイズさせてもよい。さらに、巨大ヌクレオチド断片に相補的な多数の異なる検出配列を、各々、同じSERSNナノタグとコンジュゲート化させてもよい。したがって、単一のより大きいヌクレオチド配列上の検出プローブ数が増加することによって、アッセイ感度は増加するであろう。この場合、複数のSERSNナノタグを用いることによって、アッセイ特異性もまた増加しうる。あるいは、多数の異なる検出配列が、異なるSERSNナノタグにコンジュゲート化されている場合、関心対象の領域を検出する特異的検出配列を設計することによって、特定のゲノム欠失または突然変異を同定してもよい。さらに、関心対象の異なるヌクレオチド断片に相補的な多数の異なる捕捉配列に、磁気粒子をコンジュゲート化して、各磁気粒子に対して増進されたアッセイシグナルを生じてもよい。

30

【0134】

[00167]他の方法を用いて、核酸アッセイ感度を増加させてもよい。例えば、等温ローリングサークル増幅(RCA)、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)関連増幅、T7 RNAポリメラーゼ駆動増幅、リガーゼ連鎖反応(LCR)、分枝DNA(bDNA)または他の既知の増幅法を、上述のような捕捉プローブおよび検出プローブと組み合わせ用いてもよい。RCAを特徴とするアッセイ例を図36に例示する。図36のアッセイは、磁気粒子3604にコンジュゲート化された捕捉配列3602を特徴とする捕捉プローブ3600、および関心対象のヌクレオチド配列3610の存在下でハイブリダイズ可能なRCA分子3608に各々コンジュゲート化された1以上のRCAプローブ3606を有し、その後、既知の技術を用いたRCAが続く。各々、SERSNナノタグ3614にコンジュゲート化されている1以上の検出プローブ3612と、生じた複合体を接触させて、こうして各捕捉分子と会合しているナノタグの数を実質的に増加させてもよい。続いて、ラマン分光計、ラマン顕微鏡または他の装置3616を用いて、SERSNナノタグと会合しているラマンレポーター分子のラマンスペクトルを獲得してもよい。図37のグラフ3700は、図36にしたがって調製したアッセイの感度を例示する。図37のアッセイ形式を以下の実施例5に詳細に記載する。当業者は、RCA増進アッセイにおいて、捕

40

50

捉プローブと会合している磁気捕捉粒子を用いて、RCA後、およびSERSナノタグ検出プローブの存在下での最初のハイブリダイゼーション産物のインキュベーション後に、選択および/または濃縮を促進しうることに注目するであろう。

【0135】

実施例5:

[00168] SERSタグガラスコーティングカルボキシル官能化

[00169] アミン官能化:

1. 500 μ l の20xガラスコーティングSERSタグをEtOH中で3回洗浄する。

【0136】

2. 930 μ l のEtOH中に再懸濁する。50 μ l の水および20 μ l のAPTMSを添加する。

3. 1時間混合する。

【0137】

4. 1ml DMSO中で3回洗浄する。

カルボキシル官能化:

5. 1ml DMSO中に0.04g無水コハク酸を溶解する。

【0138】

6. DMSO中のSERSタグに10 μ l の無水コハク酸溶液を添加する。1時間混合する。

7. さらに10 μ l の無水コハク酸溶液を添加する。さらに1時間混合する。

【0139】

8. 50mM MES pH4.5中で3回リンスする。

9. 500 μ l MESにSERSタグを再懸濁し、そして4 で保存する。

[00170] 官能化SERSタグに対するオリゴのコンジュゲート化

1. 40 μ l の20x官能化SERSタグを取る。50mM MES (pH4.5) で2回洗浄する。

【0140】

2. 163 μ l の50mM MES (pH4.5) にSERSタグを再懸濁し、そして2 μ l の50 μ Mオリゴ(100 pmol)を添加し、氷上に置く。

3. 50mM MES (pH7.0) 中の20%EDCを作製する(50 μ l MESで10mg EDC)。

【0141】

4. SERSタグ/オリゴに15 μ l の20%EDCを添加する。よく混合し、そして4 で1時間振盪する。

5. 500 μ l の10mM PBSで4回洗浄する。すべてのコンジュゲート化されていないオリゴを洗い流すことが非常に重要である。

【0142】

6. 40 μ l PBS中に再懸濁する。

[00171] 磁気ビーズに対するオリゴのコンジュゲート化

1. 40 μ l の磁気ビーズを取る(8×10^7)。50mM MES (pH4.5) でビーズを2回洗浄する。

【0143】

2. 163 μ l の50mM MES (pH4.5) でビーズを再懸濁し、そして2 μ l の50 μ Mオリゴ(100 pmol)を添加し、氷上に置く。

3. 50mM MES (pH7.0) 中、20%EDCを作製する(50 μ l MESで10mg EDC)。

【0144】

4. 15 μ l の20%EDCをビーズ/オリゴに添加する。よく混合し、そして4 で1時間振盪する。

10

20

30

40

50

5. 500 μ l の 10 mM PBS で 4 回洗浄する。すべてのコンジュゲート化されていないオリゴを洗い流すことが非常に重要である。

【0145】

6. 40 μ l PBS 中に再懸濁する (ビーズ 8×10^7)。

[00172] ハイブリダイゼーション

1. 33 μ l の 2x TMAC または HS 114 緩衝液を取り、5 μ l の 10 μ M オリゴおよび 5 μ l の磁気ビーズプローブ (4×10^6) を添加する。55 で 30 分間ハイブリダイズする。ラマンシグナルを獲得するかまたは以下の工程を続けるかいずれかを行う。

【0146】

2. 1x SSC で、室温で 5 分間洗浄し、そして 0.1x SSC で、55 で 5 分間洗浄する。

3. 1x ニュートラアビジン - BPE (SERS タグ) を添加し、そして 30 分間インキュベーションする。

【0147】

4. 10 mM PBS で 2 回洗浄する。

5. Reinschaw InVia ラマン顕微鏡または QE 65000 分光計でラマンシグナルを獲得する。

【0148】

[00173] SERS ローリングサークル増幅:

1. 42 μ l の HS 114 緩衝液中、5 μ l オリゴ、1 μ l の 5 μ M RCA プローブおよび 2 μ l ビーズ - プローブを添加して、最終体積 50 μ l にして、そして 55 で 30 分間インキュベーションする。

【0149】

2. PBS で 1 回洗浄し、そして 46 μ l の PBS / 0.05% Tween - 20 および 4 μ l の 10 μ M サークル 1 プローブをビーズに添加する。

3. 37 で 30 分間インキュベーションし、そして PBS で 1 回洗浄する。

【0150】

4. ビーズに、2 μ l の phi 129 DNA ポリメラーゼ (20 U)、1 μ l dNTP (20 mM / 各 dNTP)、10 μ l の 2x 緩衝液 / 1x BSA および 7 μ l H₂O を添加して、総量 20 μ l にする。

【0151】

5. 37 で 2 時間から一晩インキュベーションする。PBS で 1 回洗浄する。

6. ビーズに、50 μ l の 2x SSC / 0.05% Tween - 20 溶液中の 0.5x SERS タグ - プローブを添加し、そして 37 で 20 ~ 30 分間インキュベーションする。

【0152】

7. 1x SSC で、室温で 1 分間洗浄する。

8. 0.1x SSC で、室温で 1 分間洗浄する。

9. QE 65000 上でラマンシグナルを獲得する。

【0153】

[00174] いくつかの態様に関連して、本発明を特に示しそして記載するが、当業者には、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書に開示する多様な態様に対して、形式および詳細を変化させてもよいことが理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0154】

【図 1】 [0011] 図 1 は、本発明の選択した態様の実行に適した SERS ナノタグの模式図である。

【図 2】 [0012] 図 2 は、5 つの異なるレポーター分子を有する SERS ナノタグの SERS スペクトルのグラフ比較である。

10

20

30

40

50

【図3】 [0013] 図3は、本発明の1つの態様と一致する連続アッセイの図解例である。

【図4】 [0014] 図4は、IL-4用量反応曲線のグラフ表示である。

【図5】 [0015] 図5は、本発明と一致した均一アッセイの図解例および写真例である。

【図6】 [0016] 図6は、過剰なナノタグの存在下での、IL-4用量反応のグラフ表示である。

【図7】 [0017] 図7は、表面に結合したBPEタグのスペクトルのグラフ表示である。

【図8】 [0018] 図8は、均一アッセイIL-4用量反応のグラフ表示である。

10

【図9】 [0019] 図9A~Cは、体液の存在下で得たラマンスペクトルの多様なグラフ表示である。

【図10】 [0020] 図10は、体液におけるラマンスペクトル回収のグラフ表示である。

【図11】 [0021] 図11は、本発明と一致したアッセイの図解例である。

【図12】 [0022] 図12は、「無洗浄」IL-4アッセイの用量反応のグラフ表示である。

【図13】 [0023] 図13は、インキュベーション時間が減少し、そして検出粒子が制限された、図12のアッセイのグラフ表示である。

【図14】 [0024] 図14は、インキュベーション時間が減少し、そして検出粒子が制限された、図12のアッセイのグラフ表示である。

20

【図15】 [0025] 図15は、最適化アッセイIL-4用量反応曲線のグラフ表示である。

【図16】 [0026] 図16は、生物学的マトリックスからのスペクトル回収のグラフ表示である。

【図17】 [0027] 図17は、検出タグおよび緩衝液スクリーニング結果のグラフ表示である。

【図18】 [0028] 図18は、検出タグおよび緩衝液スクリーニング結果のグラフ表示である。

【図19】 [0029] 図19は、DPY検出タグを用いたCRP用量反応曲線のグラフ表示である。

30

【図20】 [0030] 図20は、多重化アッセイ結果のグラフ表示である。

【図21】 [0031] 図21は、CRPの用量反応曲線である。

【図22】 [0032] 図22は、SERS磁気ビーズハイブリダイゼーションアッセイの模式図である。

【図23】 [0033] 図23は、本発明と一致したDNAの検出のグラフ表示である。

【図24】 [0034] 図24は、SERS DNA磁気アッセイ滴定の結果のグラフ表示である。

【図25】 [0035] 図25Aおよび25Bは、2つの競合的アッセイ形式の図解例である。

40

【図26】 [0036] 図26は、ヌクレオチド配列検出アッセイの模式図である。

【図27】 [0037] 図27は、ヌクレオチド配列検出アッセイで使用するのに適した代表的プローブである。

【図28】 [0038] 図28は、ヌクレオチド配列検出アッセイの結果のグラフ表示である。

【図29】 [0039] 図29は、ヌクレオチド配列検出アッセイにおいて使用するのに適した代表的プローブの表示である。

【図30】 [0040] 図30は、図29のプローブを用いたアッセイ滴定のグラフ表示である。

【図31】 [0041] 図31は、選択したPCR単位複製配列に関するアッセイ結果の

50

グラフ表示である。

【図32】[0042] 図32は、連続希釈後のアッセイ結果のグラフ表示である。

【図33】[0043] 図33は、ヌクレオチド配列検出アッセイの模式図である。

【図34】[0044] 図34は、図33のアッセイ結果のグラフ表示である。

【図35】[0045] 図35は、ヌクレオチド切断を特徴とするアッセイの図解例である。

【図36】[0046] 図36は、RCAを特徴とするアッセイの図解例である。

【図37】[0047] 図37は、図36のアッセイの結果のグラフ表示である。

【図1】

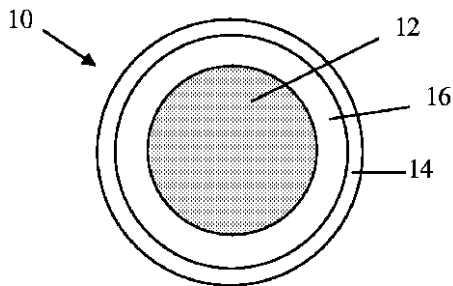
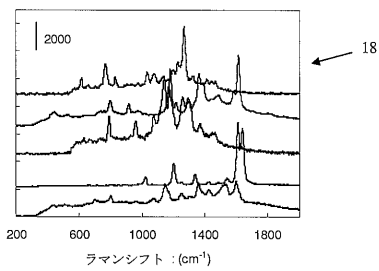
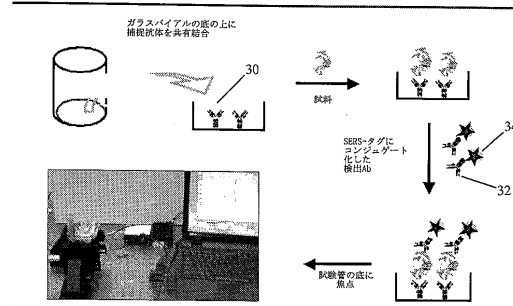


FIG. 1

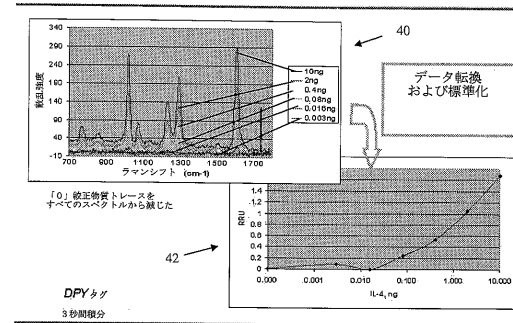
【図2】



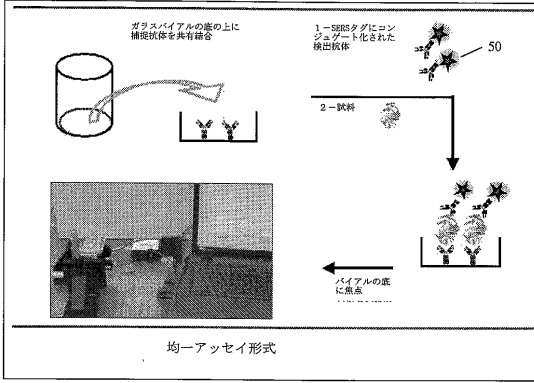
【図3】



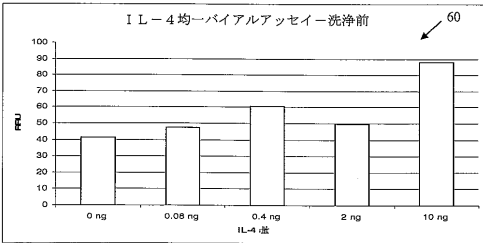
【図4】



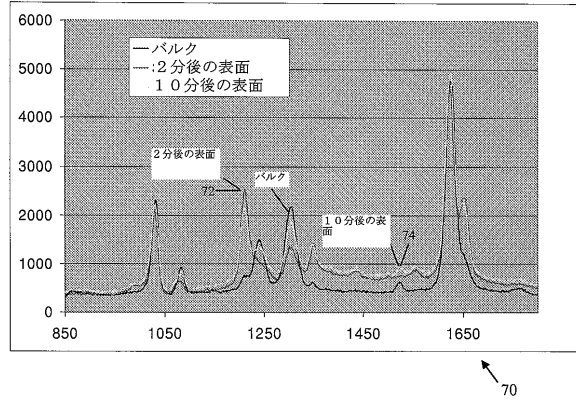
【 図 5 】



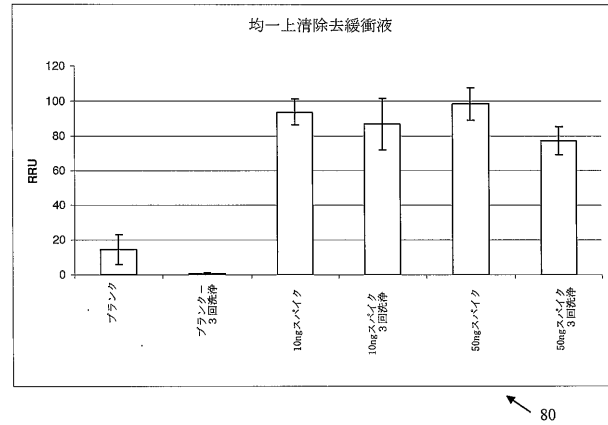
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

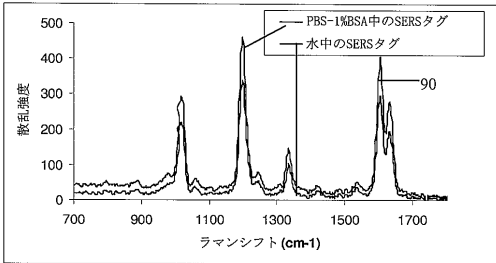
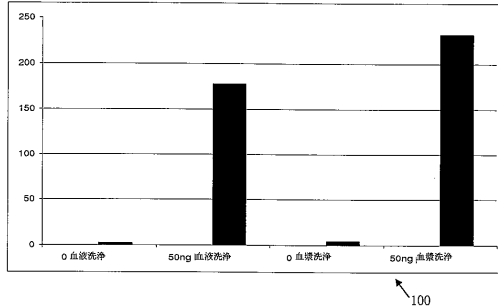


図 9 A

【 図 10 】



100

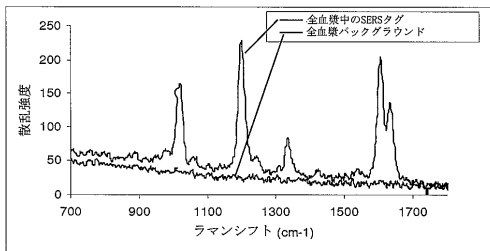


図 9 B

【 図 11 】

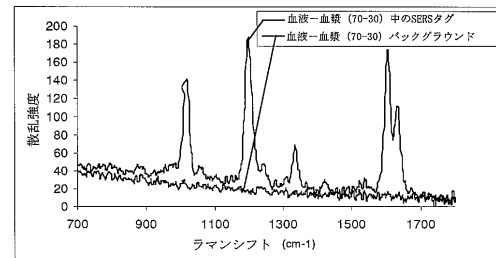
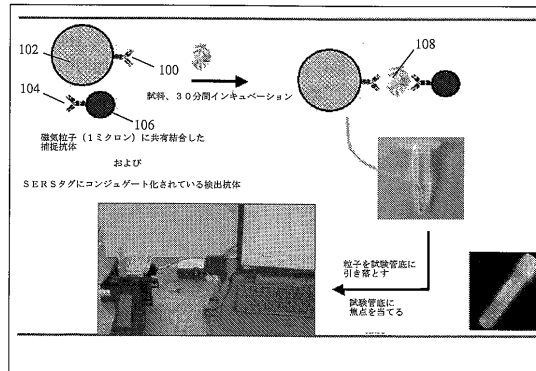
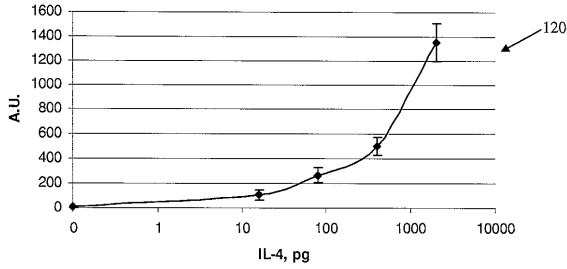


図 9 C

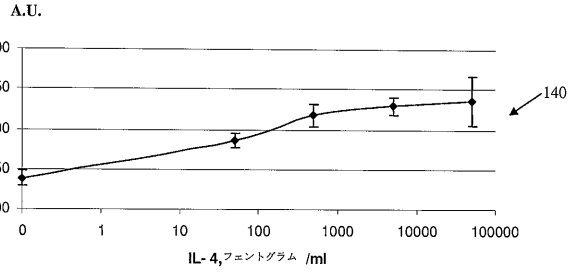
【 図 1 2 】



アッセイプロトコル

- ・総アッセイ体積：300 μ l
- ・捕捉コンジュゲート：10 μ g MGB
- ・SERSコンジュゲート：4 x 10⁸粒子
- ・上記量を含む分析物 100 μ l
- ・インキュベーション時間：60分間

【 図 1 4 】

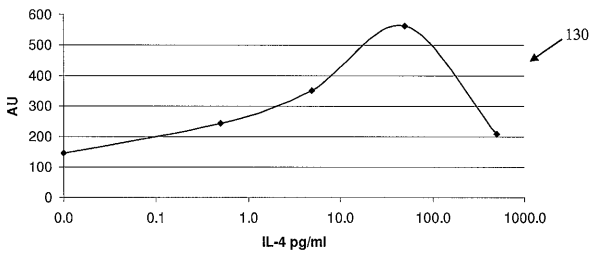


アッセイ法

- 総アッセイ体積：300 μ l
- 捕捉コンジュゲート：10 μ g MGB
- SERSコンジュゲート：2 x 10⁸粒子
- 上記濃度の分析物 100 μ l
- インキュベーション時間：30分間
- 読取り装置：Ocean Optics - 試料あたり4回の読取り

【 図 1 3 】

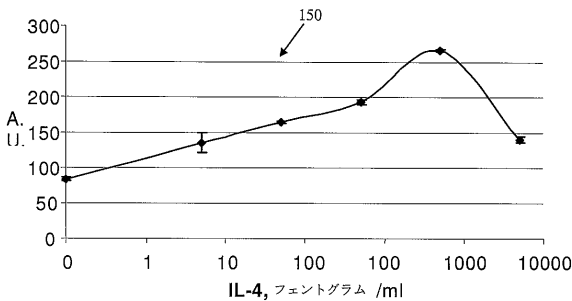
IL-4 用量反応



アッセイプロトコル

- ・総アッセイ体積：300 μ l
- ・捕捉コンジュゲート：10 μ g MGB
- ・SERSコンジュゲート：4 x 10⁸粒子
- ・上記濃度の分析物 100 μ l
- ・インキュベーション時間：30分間

【 図 1 5 】



アッセイ法

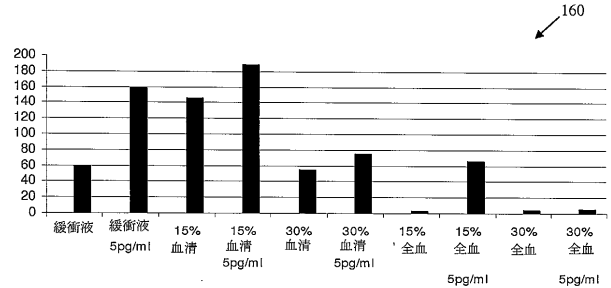
- 総アッセイ体積：300 μ l
- 捕捉コンジュゲート：5 μ g MGB
- SERSコンジュゲート：10⁸粒子
- 上記濃度の分析物 100 μ l
- インキュベーション時間：35分間
- 読取り装置：Ocean Optics - IL-4 濃度あたり1複製物、複製物あたり3回の読取り値を得る

複製物	1	2	3	4	5	6
測定 1	98	284	361	254	303	304
測定 2	95	249	267	295	294	307
測定 3	128	267	360	251	311	338
測定 4	121				315	340
測定 5					309	

平均
標準偏差
c.v

266
81
0.31

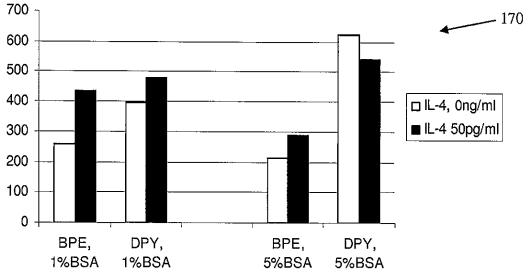
【 図 1 6 】



アッセイプロトコル

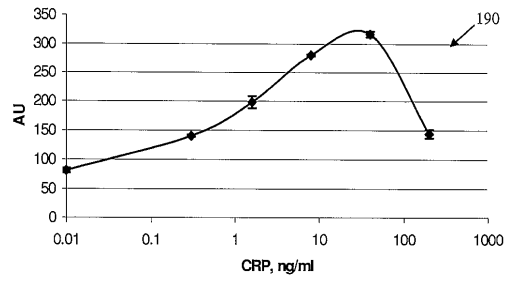
- エプペンドルフ試験管に、以下の順で連続して試薬を装填する
- 100 μ l 試料
- 100 μ l 緩衝液または IL-4 (1% BSA 中、5 pg/ml)
- 5 μ l 抗 IL-4 磁気捕捉ビーズ (5 μ g ビーズ)
- 100 μ l 抗 CRP-SERS コンジュゲート (10⁸粒子)
- 30分間インキュベーションする
- 磁気ブルダウンし、そして1秒間積分で読み取る
- 試料の定義
- 緩衝液：100 μ l の PBS 中の 1% BSA
- 15% 血清：50 μ l 血清 + 50 μ l 緩衝液 (最終血清濃度は、~16%)
- 30% 血清：100 μ l 血清 (最終血清濃度は、~33%)
- 全血実験では、血清を同じ体積の全血と交換する

【 図 1 7 】



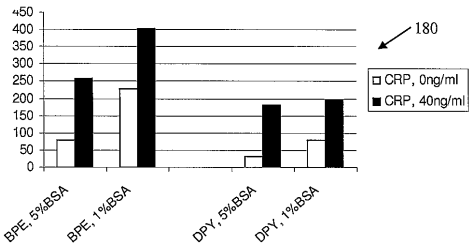
アッセイ法
 総アッセイ体積：300 μ l
 - 捕捉コンジュゲート：5 μ g MGB
 - SERSコンジュゲート：2 x 10⁸ 粒子
 - 上記濃度の分析物 100 μ l
 インキュベーション時間：35分間
 読取り装置：Ocean optics - 試料あたり3つの読取り値を得る

【 図 1 9 】



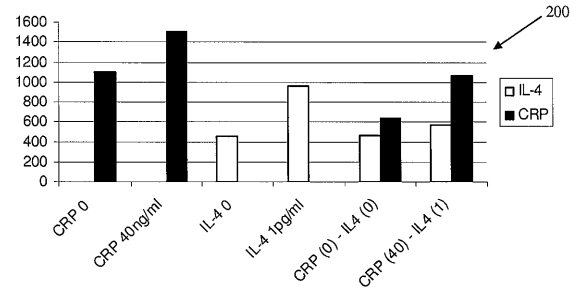
アッセイ条件および方法
 検出液：1% BSA
 検出タグ：DPY
 総アッセイ体積：300 μ l
 - 捕捉コンジュゲート：10 μ g MGB
 - SERSコンジュゲート：4 x 10⁸ 粒子
 - 上記濃度の分析物 100 μ l
 インキュベーション時間：35分間
 読取り装置：Ocean optics - 試料あたり3つの読取り値を得る

【 図 1 8 】



アッセイ法
 総アッセイ体積：300 μ l
 - 捕捉コンジュゲート：10 μ g MGB
 - SERSコンジュゲート：4 x 10⁸ 粒子
 - 上記濃度の分析物 100 μ l
 インキュベーション時間：30分間

【 図 2 0 】



【 図 2 1 】

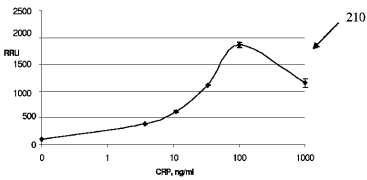
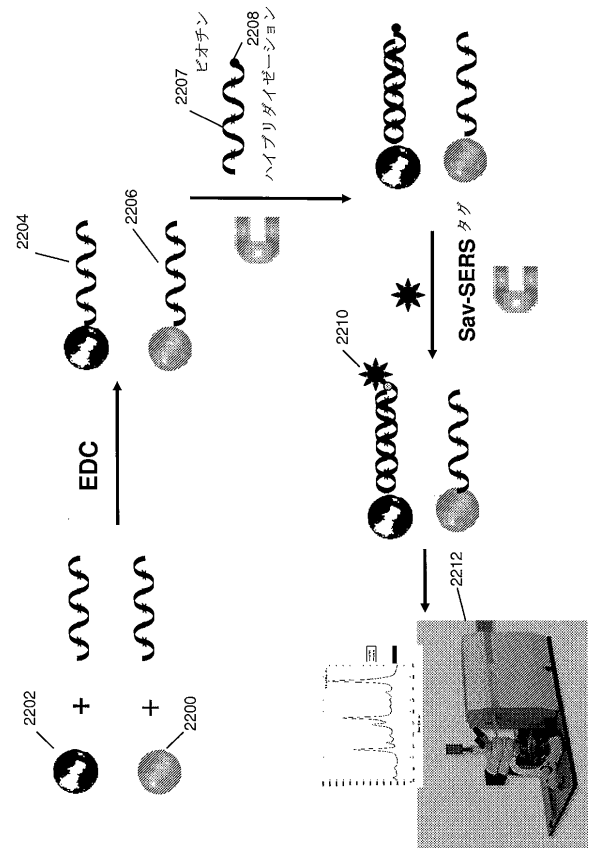
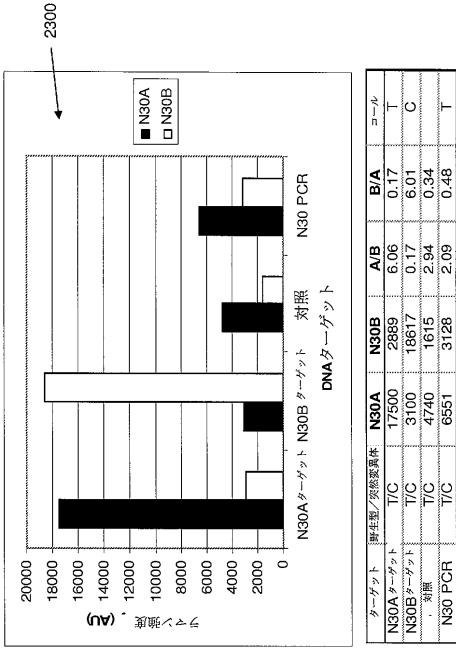


FIG. 21

【 図 2 2 】

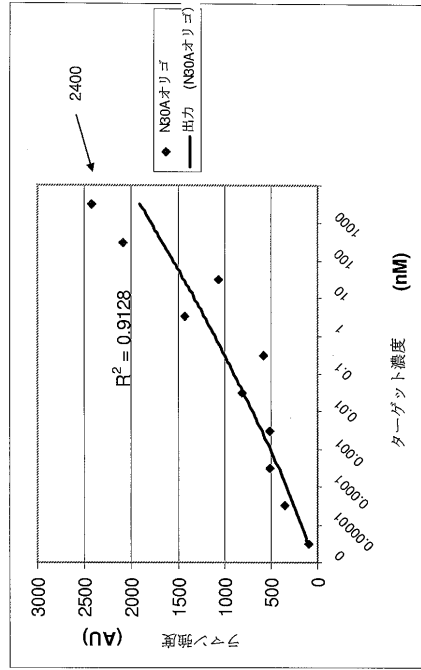


【 図 2 3 】



*N30= p53 L344P 突然変異体

【 図 2 4 】



【 図 2 5 A 】

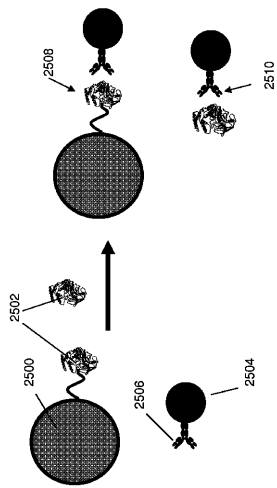


FIG. 25A

【 図 2 5 B 】

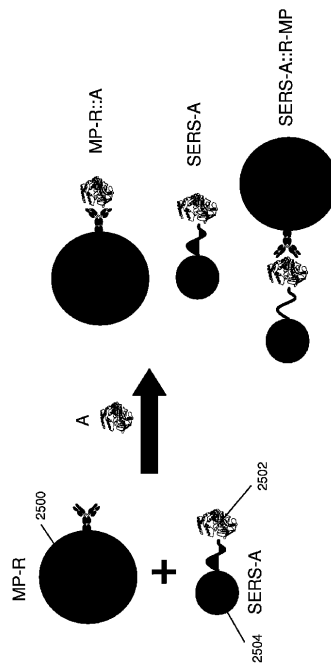
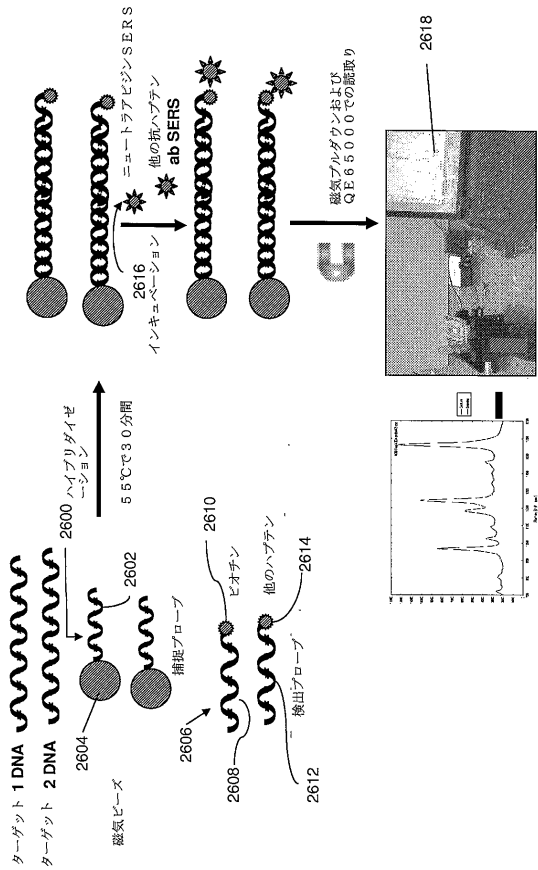
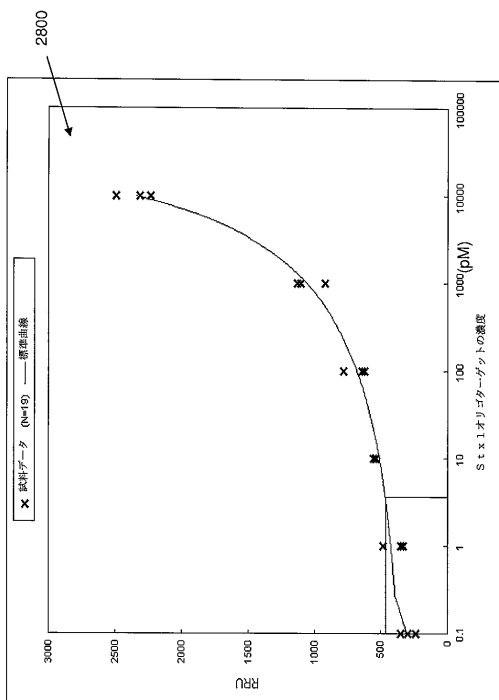


FIG. 25B

【 図 2 6 】



【 図 2 8 】



大腸菌 S t x 1 オリゴヌクレオチドから生成したデータ。LODは3.6 pMであり、99.7%信頼性である。

【 図 2 7 】

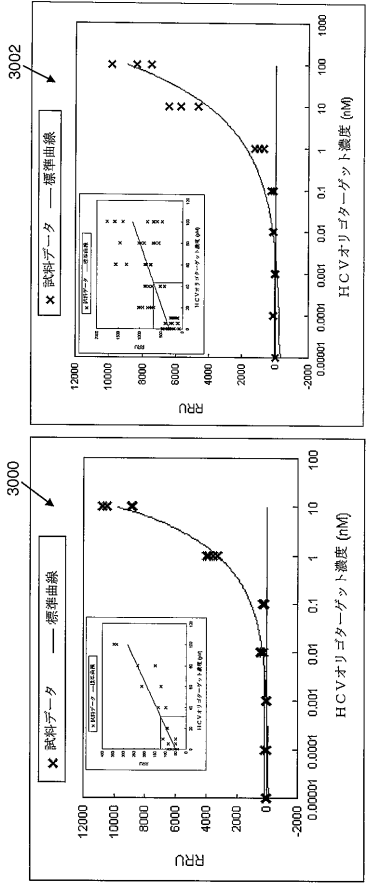
CGTACGTCAGTAGTCGCATGAGATCGACCAGATATGTTAAGGTTGCAGCTCTCTTTGAATATA
 ATTACATTTTCATTACGTTATGTTAGGTTTTCGGTGGCCGCTAAACCGCTCTCCAGGG
 GGTGGAGGATCGAAGATATGTTAGTGTGCTCAAGAGTATGTTGTAATGAAATA
 ATTTTTAGAGTGTAACTTTTTCTTTGTTATCTTTTTCAGTTAGTGTGCGAAGGAAIT
ACCTAGACTCTGCAAGAGCTA TGTAGATTGGCTGATGCTCCTCTGCA
ATAGTACTCATTACAGCTATTTCAGGAGGTACGCTTTTACTGATGATGATGGCA
 CAGGGGATATTTGTTGCAGTTGATGTGACAGGGATAGATCCAGAGGAGGGCGGTTAATAA
 TCTACGGCTATTTGTTGACGAAATAATTTATGTGACAGGATTTGTTAACAGCAAAATATGT
 TTTTATCGCTTTGCTGATTTTACATGTTACCTTTCCAGGTACAACGGGTTACATTTGCTGG
 TGACAGTAGCTATACCACTGACAGGTTGACAGGATGACGTCGACGGGATCGAGATAAAT
 CGCATTGTTGAGTACTTTTCTGAGTTTAAATGTCGATAGTGAACCTTACTGACGCGATC
 TGTGGCAGGCGGATGTTACGTTGTTACTGTGACGCTGAAGCTTTTACGTTTTCGGCAATA
 CAGAGGGGATTCGTACAACCTGGATGATCTCAGTGGGCTTTATGTAATGACTGCTGAAG
 ATGTTGATCTTACATGAACTGGGAGGTTGAGTAGTCCCTGCTGATTCATGGACAAGA
 CTCTGTTGTTAGGAAATTTCTTTGGAAGCATTAATGCAATCTGGGAGCGTGGCATTA
 TACTGAAITGTCATGATGATGCGGAGTTGCCAATGGCATGTGATGATTTCTCTTATG
 TGTCCGCGAGATGGAAGTCCGGTGGATTCACACAATAAATATGTTGGATTCATCCACTC
 TGGGGCAATCTGTATCGCAGAACTTAGCAGTTGAGGGGTAAATGAAAAAAACAATTT
 AATGCTGCATCGCTTCAITTTTTCAGCAAGTGGCTGGCCAGCCCTGATTTGTAACTGGA
 AAGTGGAGTATACAAAATAATGATGACGATACCTTTACAGTTAAAGTGGTGGTAAAGAAAT
 ATTTACCAACAGATGGAATCTTCCAGTCTCT

【 図 2 9 】

GACCTCCACC ATGAACTACCTCCCTGAGGAACACTACTGTG CTTCACGCGAG
 AAAGCGICTA GCCATGGCGT TAGTATGAGTGTCTGCAAGCTCCAGGACC B-Pro
 CCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGTCTGGGAAACCAGGGTGGTACACCCGG S-Pro
 AATTGCCAGG ACGACGGGGT CCTTCTTGGATCAACCCCGG TCAATGCCGT
 HCV 3'
 GAGATTGGG CGTGGCCCGG CAAGACTGTGCTAGCCGAGTAG TGTGGGCTCG
 CGAAAGGCTT TGTGGTACTG CCTGATAGGTTGTTGCGAG TCGCCCGGGA
 GGTCCTAG ACCGTGACC ATGACACGAACTCTAAACC TCAAGAAAA
 ACCAAACGTA ACACCAACCG TCGCCACAGGAGTCAAGT TCCGGGGTGG
 CGGTCAGATC HCV 5' UTR 領域配列

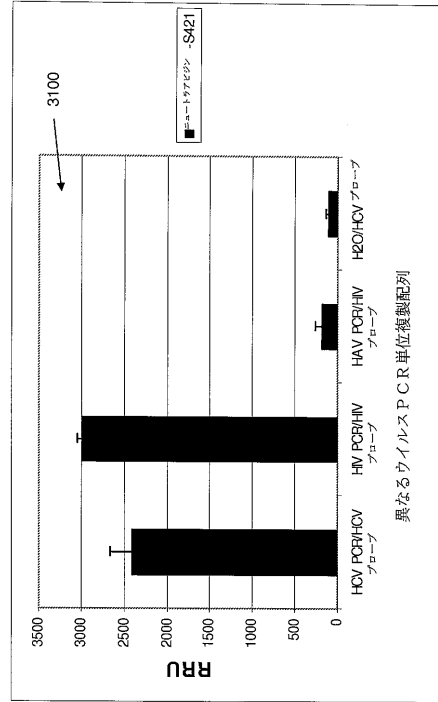
HIV 5P
 AACACAGGCG GGGGACATCA AGCAGCAGTC CABATGTGTA AAGGACCCCT
 SK462
 CAAATGAGGA GCTSCAGAT GGCATGATTT GCATCCATGC CATGAGGCGC
 HIV Sプロローブ
 CTATTCAC AGGCCAGTC AAGGATCORA GGGGAGTGA CATGAGGGA
 SK431
 ACTACTATA CCTTCAGCA AC
 HIV gag 領域配列

【 図 3 0 】

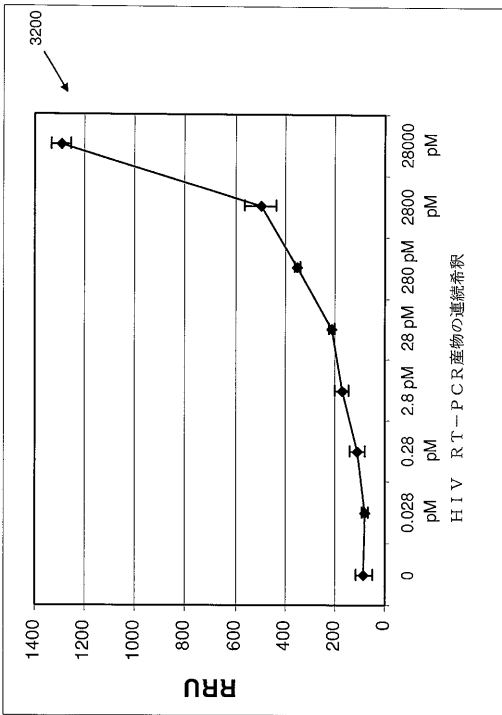


HCVおよびHIVオリゴヌクレオチドから生成したデータ

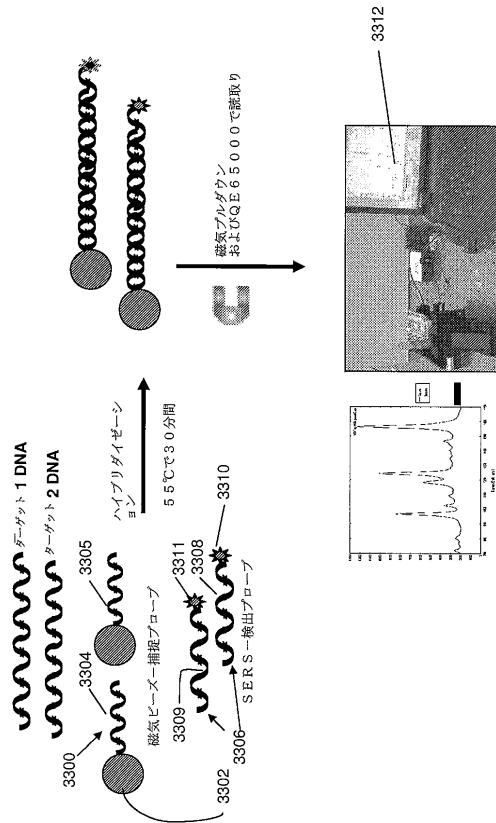
【 図 3 1 】



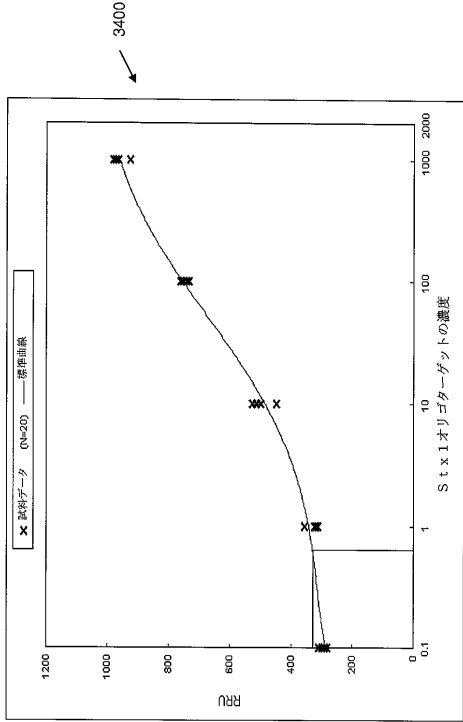
【 図 3 2 】



【 図 3 3 】

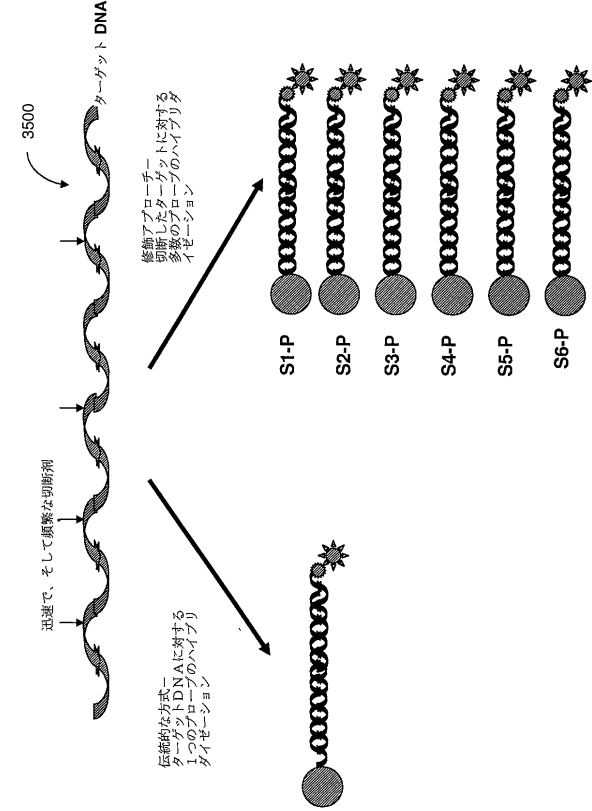


【 図 3 4 】

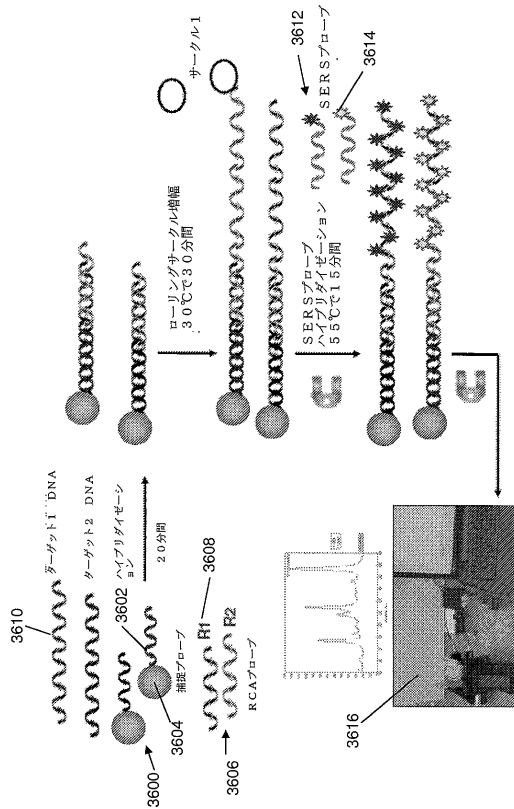


大腸菌 Stx1 オリゴヌクレオチドから生成したデータ。LODは10 pM未満である。

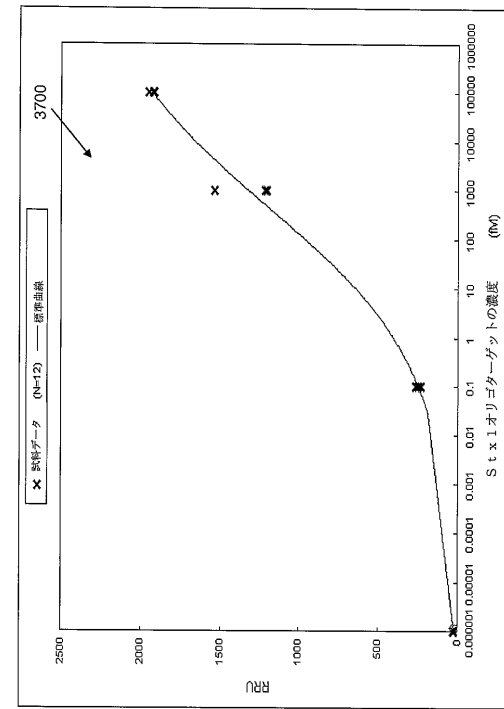
【 図 3 5 】



【 図 3 6 】



【 図 3 7 】



【 国際調査報告 】

60800740031



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/61878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC: C07H 21/04(2006.01) G01N 33/53(2006.01)												
USPC: 436/94												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/94, 800; 536/23.1, 24.3												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST (Databases: USPAT, USPGP, EPO, JPO, Derwent)												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	US 2006/0019247A1 (SU et al.) 26 January 2006 (26.02.2006), see paragraph [0053].	1-41										
Y	US 2004/0086897 A1 (MIRKIN et al.) 06 May 2004 (06.05.2004), see entire document.	1-41										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"A" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 18 July 2008 (18.07.2008)		Date of mailing of the international search report 08 AUG 2008										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer /Bradley L. Sisson/ Telephone No. (571) 272-0600 22.12.2008										

PCT/US2007/061878 08.08.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/61878

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-7 and 12-41
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT/US2007/061878 08.08.2008 m

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/61878**BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-7 and 12-14, drawn to a hybridization-based method of detecting a nucleotide of interest.

Group II, claim(s) 8-11, drawn to a rolling-circle-amplification-based method of detecting a nucleotide of interest.

Group III, claim(s) 15-20, drawn to a method of detecting a molecule of interest and claims 21-41, drawn to a method of detecting an analyte of interest using a 2-particle complex.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The inventions of Groups I-III are linked through the use of Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) nanotags to detect various molecules. US Patent Application Publication 2006/0019247 A1 (SU et al.), at paragraph 53, discloses using SERS nanotags for the identification of nucleotides in a method of sequencing nucleic acids. Accordingly, the use of SERS nanotags does not constitute a special technical feature, and thusly, the inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

- (72) 発明者 ペン, シャロン・ゲイナー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 7 0, サンカルロス, スクール・ストリート 1 5 2 9
- (72) 発明者 クローマー, レミー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 3 0, サンノゼ, コロンボ・ドライブ 4 2 6 7
- (72) 発明者 シャ, マイケル
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 3 0, サンノゼ, コロンボ・ドライブ 4 2 6 7
- (72) 発明者 スー, ホンクシャ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 5 2, カストロ・ヴァリー, ノース・キャニオン・コート
3 8 3 8
- (72) 発明者 ドーリング, ウィリアム・イー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3, マウンテン・ビュー, マリポサ・アベニュー 2 5
5 ナンバー 3
- F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA01 DA02 EA03
4B024 AA11 CA09 CA11 HA14 HA20
4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR38 QR56 QS12 QS34 QS39
QX02

专利名称(译)	SERS纳米标记测定		
公开(公告)号	JP2009525763A	公开(公告)日	2009-07-16
申请号	JP2008554509	申请日	2007-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	好吧Sonica公司		
申请(专利权)人(译)	公司的Oxonica		
[标]发明人	ナタンマイケル ペンシャロンゲイナー クローマーレミー シャマイケル スーホンクシャ ドーリングウィリアムイー		
发明人	ナタン,マイケル ペン,シャロン,ゲイナー クローマー,レミー シャ,マイケル スー,ホンクシャ ドーリング,ウィリアム,イー		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N21/65 G01N33/53 G01N33/543 C12N15/09		
CPC分类号	B82Y5/00 C12Q1/6816 G01N33/54373 Y10T436/143333 C12Q2537/125 C12Q2563/131 C12Q2563/143 C12Q2565/632 G01N21/658		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N21/65 G01N33/53.M G01N33/543.541.Z C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/CA03 2G043/DA01 2G043/DA02 2G043/EA03 4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA14 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR38 4B063/QR56 4B063/QS12 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	谷义 安倍晋三和夫		
优先权	60/771766 2006-02-08 US 60/832917 2006-07-24 US 60/870963 2006-12-20 US		
其他公开文献	JP5266066B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用表面增强拉曼散射纳米标签 (SERS纳米标签) 产生均匀 (无洗涤) , 异质或序列检测测定平台的方法和系统。在某些实施方案中, SERS纳米标签与磁性颗粒组合使用。还公开了多重测定平台。在某些实施方案中, 测定可用于临床蛋白质组学。还公开了适用于生物基质 (例如全血或血清) 的测定平台。使用本文所述的测定形式, 但不限于, 全血或血清, 潜在性 (隐性) 的样品, 尿液, 粪便, 空气, 饮用水, 噬菌体, 任何生物体, 细胞多细胞质量, 例如, 包括癌症组织匀浆, 在任何类型的生物 (或动物界植物界) 或环境样品的, 但不限于, 细胞, 病毒, 细菌, 蛋白质, DNA, RNA或者, 或者检测小分子, 可以检测任何感兴趣的分析物。

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 3
G O 1 N 21/05 (2006.01)	G O 1 N 21/65	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 1 Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)		

(21) 出願番号	特願2008-554509 (P2008-554509)	(71) 出願人	506355338
(86) (22) 出願日	平成19年2月8日(2007.2.8)		オクソニカ・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成20年9月24日(2008.9.24)		アメリカ合衆国カリフォルニア州9404
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/061878		3-4003, マウンテン・ビュー, イー
(87) 国際公開番号	W02007/092941		スト・ミドルフィールド・ロード325
(87) 国際公開日	平成19年8月16日(2007.8.16)	(74) 代理人	100077481
(31) 優先権主張番号	60/771,766		弁理士 谷 義一
(32) 優先日	平成18年2月8日(2006.2.8)	(74) 代理人	100088915
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 阿部 和夫
(31) 優先権主張番号	60/832,917	(72) 発明者	ナタン, マイケル
(32) 優先日	平成18年7月24日(2006.7.24)		アメリカ合衆国カリフォルニア州9402
(33) 優先権主張国	米国 (US)		4, ロス・アルトス, カーサ・ボニータ・
(31) 優先権主張番号	60/870,963		コート 726
(32) 優先日	平成18年12月20日(2006.12.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		