

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6499960号
(P6499960)

(45) 発行日 平成31年4月10日 (2019. 4. 10)

(24) 登録日 平成31年3月22日 (2019. 3. 22)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/68 (2018. 01)	C 1 2 Q 1/68	
G O 1 N 33/48 (2006. 01)	G O 1 N 33/48	P
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/532 (2006. 01)	G O 1 N 33/53	M
	G O 1 N 33/53	Y
請求項の数 30 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-523140 (P2015-523140)	(73) 特許権者	390041542
(86) (22) 出願日	平成25年7月12日 (2013. 7. 12)		ゼネラル・エレクトリック・カンパニー
(65) 公表番号	特表2015-524267 (P2015-524267A)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 2 3
(43) 公表日	平成27年8月24日 (2015. 8. 24)		4 5、スケネクタデー、リバーロード、1
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/050218		番
(87) 国際公開番号	W02014/014754	(74) 代理人	100137545
(87) 国際公開日	平成26年1月23日 (2014. 1. 23)		弁理士 荒川 聡志
審査請求日	平成28年6月29日 (2016. 6. 29)	(74) 代理人	100105588
審査番号	不服2018-1142 (P2018-1142/J1)		弁理士 小倉 博
審査請求日	平成30年1月29日 (2018. 1. 29)	(74) 代理人	100113974
(31) 優先権主張番号	13/551, 190		弁理士 田中 拓人
(32) 優先日	平成24年7月17日 (2012. 7. 17)	(72) 発明者	スード、アヌブ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州・1 2 3
			0 9、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サー
			クル、ジーイー・グローバル・リサーチ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体試料中のDNA、RNA及びタンパク質を検出する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体試料中の複数のターゲットを探索する方法であって、

(a) 試料を、RNAターゲットと直接又は間接的に結合する標識核酸プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付す工程と、

(b) RNAターゲットに結合した標識プローブからの信号を観察する工程と、

(c) 任意には、標識プローブからの信号を除去する工程と、

(d) 試料を抗原回復プロトコルに付して、試料のタンパク質エピトープを回復させる工程と、

(e) 試料を、抗体法を用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付して、1以上の抗体プローブを試料の抗原に結合させる工程と、

(f) 1以上の抗体プローブからの信号を観察する工程と、

(g) 抗体プローブからの信号を除去する工程と、

(h) 任意には、試料のDNAターゲットにアクセスするためのプロテアーゼ処理を行う工程と、

(i) 試料を、標識核酸プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付して、1以上の試料のDNAターゲットを直接又は間接的に標識する工程と、

(j) 標識DNAターゲットからの信号を観察する工程と、

(k) 任意には、1以上の標識DNAターゲットからの信号を除去する工程と

を上記の順序で含む方法。

10

20

【請求項 2】

工程 (a) における標識核酸プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション反応が、同じ RNA ターゲットを標的とする複数のプローブによるハイブリダイゼーションを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

工程 a が、DNA をブロックするプレハイブリダイゼーション工程、ハイブリダイゼーション反応におけるブロッキング剤の使用又はそれらの組合せをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

生体試料中の複数のターゲットを探索する方法であって、
(a) 試料を、RNA ターゲットと直接又は間接的に結合する標識核酸プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付す工程と、
(b) RNA ターゲットに結合した標識プローブからの信号を観察する工程と、
(c) 標識プローブからの信号を除去する工程と、
(x) 工程 a、b 及び c を、異なる RNA ターゲットに対する別の標識核酸プローブを用いて 1 回以上繰り返す工程と、
(d) 試料を抗原回復プロトコルに付して、試料のタンパク質エピトープを回復させる工程と、
(e) 試料を、抗体法を用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付して、1 以上の抗体プローブを試料の抗原に結合させる工程と、
(f) 1 以上の抗体プローブからの信号を観察する工程と、
(g) 抗体プローブからの信号を除去する工程と、
(h) 任意には、試料の DNA ターゲットにアクセスするためのプロテアーゼ処理を行う工程と、
(i) 試料を、標識核酸プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付して、1 以上の試料の DNA ターゲットを直接又は間接的に標識する工程と、
(j) 標識 DNA ターゲットからの信号を観察する工程と、
(k) 任意には、1 以上の標識 DNA ターゲットからの信号を除去する工程と
を上記の順序で含む方法。

10

20

【請求項 5】

抗体法を用いたインサイツハイブリダイゼーション反応が、免疫組織化学 (I H C) 又は免疫蛍光 (I F) 技術を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

抗体プローブが、2 以上のプローブの混合物を含む、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

混合物が、2 ~ 10 個のプローブを含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

1 以上の抗体プローブが、酵素標識、蛍光信号発生基又はそれらの組合せにコンジュゲートされている、請求項 5 記載の方法。

【請求項 9】

生体試料中の複数のターゲットを探索する方法であって、
(a) 試料を、RNA ターゲットと直接又は間接的に結合する標識核酸プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付す工程と、
(b) RNA ターゲットに結合した標識プローブからの信号を観察する工程と、
(c) 任意には、標識プローブからの信号を除去する工程と、
(d) 試料を抗原回復プロトコルに付して、試料のタンパク質エピトープを回復させる工程と、
(e) 試料を、抗体法を用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付して、1 以上の抗体プローブを試料の抗原に結合させる工程と、
(f) 1 以上の抗体プローブからの信号を観察する工程と、

40

50

(g) 抗体プローブからの信号を除去する工程と、
(y) 工程 e、f 及び g を、異なる抗原に対する別の抗体プローブを用いて 1 回以上繰り返す工程と、
(h) 任意には、試料の DNA ターゲットにアクセスするためのプロテアーゼ処理を行う工程と、
(i) 試料を、標識核酸プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付して、1 以上の試料の DNA ターゲットを直接又は間接的に標識する工程と、
(j) 標識 DNA ターゲットからの信号を観察する工程と、
(k) 任意には、1 以上の標識 DNA ターゲットからの信号を除去する工程と
を上記の順序で含み、
抗体法を用いたインサイツハイブリダイゼーション反応が、免疫組織化学 (IHC) 又は免疫蛍光 (IF) 技術を含む、方法。

10

【請求項 10】

さらに、プロテアーゼ処理後に、組織の形態を保存する工程、プレハイブリダイゼーション又はそれらの組合せを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

工程 (i) におけるインサイツハイブリダイゼーションが、ワトソン - クリック結合、フグステイン結合又はそれらの組合せを形成するための核酸結合剤による処理を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

核酸結合剤の長さが、約 4 ヌクレオチド ~ 約 1000 ヌクレオチドである、請求項 11 記載の方法。

20

【請求項 13】

核酸結合剤の長さが、約 12 ヌクレオチド ~ 約 400 ヌクレオチドである、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

生体試料中の複数のターゲットを探索する方法であって、

(a) 試料を、RNA ターゲットと直接又は間接的に結合する標識核酸プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付す工程と、

(b) RNA ターゲットに結合した標識プローブからの信号を観察する工程と、

30

(c) 任意には、標識プローブからの信号を除去する工程と、

(d) 試料を抗原回復プロトコルに付して、試料のタンパク質エピトープを回復させる工程と、

(e) 試料を、抗体法を用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付して、1 以上の抗体プローブを試料の抗原に結合させる工程と、

(f) 1 以上の抗体プローブからの信号を観察する工程と、

(g) 抗体プローブからの信号を除去する工程と、

(h) 任意には、試料の DNA ターゲットにアクセスするためのプロテアーゼ処理を行う工程と、

(i) 試料を、標識核酸プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付して、1 以上の試料の DNA ターゲットを直接又は間接的に標識する工程と、

40

(j) 標識 DNA ターゲットからの信号を観察する工程と、

(k) 1 以上の標識 DNA ターゲットからの信号を除去する工程と、

(z) 工程 i、j 及び k を、異なる DNA ターゲットに対する別の標識核酸プローブを用いて 1 回以上繰り返す工程と
を上記の順序で含む方法。

【請求項 15】

工程 c、g 及び k における信号を除去する工程が、信号不活性化剤、光反応、光活性化化学退色、プローブストリップ、酸化、電子移動又はそれらの組合せを含む、請求項 1 記載の方法。

50

【請求項 16】

さらに、試料の複数の画像の登録を可能にするために、1以上の対照プローブで試料を染色する工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 17】

対照プローブは、形態染色剤である、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

さらに、試料の複数の画像を登録する工程を含み、登録工程が、工程b、f、j又はそれらの組合せから、試料の複数の画像を取得する工程と、対照プローブから検出された信号に基づいて、複数の画像を整列及び重ね合わせをする工程とを含む、請求項16記載の方法。

10

【請求項 19】

さらに、重ね合わせた画像から、タンパク質、RNA及びDNAの発現を分析する工程を含む、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

さらに、観察工程b、f、j又はそれらの組合せで観察された信号の1以上の強度値を測定する工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 21】

信号の1以上の強度値を測定する工程が、信号増幅技術を含む、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

信号が、蛍光信号、発色性プローブ又はそれらの組合せを含む、請求項21記載の方法。

20

【請求項 23】

さらに、強度値を試料に存在するターゲットの量と相関させる工程を含む、請求項22記載の方法。

【請求項 24】

試料が、細胞又は組織試料を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 25】

試料が、ホルマリン固定されたパラフィン包埋(F F P E)組織試料を含む、請求項24記載の方法。

30

【請求項 26】

パラフィン包埋組織試料が、工程aの前にワックスを除去される、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

試料が、細胞懸濁液、例えば、造血細胞又は循環性腫瘍細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 28】

工程aが、懸濁液における試料を、溶液におけるインサイツハイブリダイゼーション反応に付す工程を含む、請求項27記載の方法。

【請求項 29】

1つの組織切片における3以上のターゲットを検出する工程を含み、ターゲットが、1以上のDNA、1つのRNA及び1つのタンパク質のターゲットを含む、請求項1記載の方法。

40

【請求項 30】

さらに、形態学的ターゲットの検出を含む、請求項29記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体試料中のDNA、RNA及びタンパク質を検出する方法に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

生物学及び医薬において、生体試料中の種々のターゲットを観察するために、種々の方法が使用され得る。例えば、組織学的切片及び他の細胞学的調製物中のタンパク質の分析は、組織化学、免疫組織化学（IHC）又は免疫蛍光の技術を使用して行われ得る。

【 0 0 0 3 】

個々の試料を反復的に分析する方法は、米国特許第7629125号明細書及び米国特許第7741046号明細書に記載されている。特に、米国特許第7741046号明細書は、信号発生基を不活性化するための（例えば、蛍光染料を退色させるための）酸化の使用を含む、生体試料中の複数のターゲットを検出する方法を提供する。

【 0 0 0 4 】

タンパク質及びDNAのターゲットのインサイツ検出は、ガン管理における診断ツールとしてルーチンに使用される。近年、お互い及び臨床パラメータに対するこれらのマーカーの相関関係を決定するために、同じ組織切片において共にこれらのターゲットを観察するための方法が開発されてきた。別の重要な細胞ターゲットは、RNAである。各種の異なるRNA種が特定されてきており、タンパク質合成用のテンプレートとして作用するのに加えて、数多くのこれら、例えば、miRNAは、遺伝子発現を調節するため、細胞機能及び/又は疾患進行を調節する。RNAの安定性には、固有の課題が存在する。RNAase汚染を防止するために、極端な警戒が一般的に必要とされる。したがって、RNAの検出を、処理の初期に行うのが望ましい。しかしながら、ホルマリン固定パラフィン包埋組織におけるRNAの検出を行うための最近の方法は、一般的には、高価なプロテアーゼ処理後に行われてきた。プロテアーゼ処理は、タンパク質ターゲットの下流での検出に不適合である。

【 0 0 0 5 】

本明細書において、プロテアーゼ処理を行うことなく、RNA種を検出する方法ならびに、同じ試料中の3種類のターゲット：タンパク質、DNA及びRNAの同時検出が開示される。各ターゲットは、正常な細胞機能及び疾患進行において重要な役割を果たし、全てのターゲットと必ずしも一致しない特定の同じ調製物を必要とする。同じ試料におけるインサイツ検出は、これらの種々のターゲットの発現間のより良好な相関及び疾患に対するそれらの関係のより良好な分析を可能にするであろう。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 米国特許出願公開第2005/056354号

【 発明の概要 】

【 0 0 0 7 】

本明細書において、生体試料中の複数のターゲットを探索する新規な方法が開示される。その場合、ターゲットは、DNA、RNA及びタンパク質である。

【 0 0 0 8 】

ある実施形態では、数多くの工程を含む生体試料中の複数のターゲットを探索する方法が開示される。本方法は、試料を、RNAターゲットと直接又は間接的に結合する標識核酸プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付す工程、RNAターゲットに結合した標識プローブからの信号を観察する工程、及び、任意には、標識プローブからの信号を除去する工程を含む。方法は、さらに、試料を抗原回復プロトコルに付して、試料のタンパク質エピトープを回復させる工程、試料を、抗体法を用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付して、1以上の抗体プローブを試料の抗原に結合させる工程、1以上の抗体プローブからの信号を観察する工程、抗体プローブからの信号を除去する工程、任意には、試料のDNAターゲットにアクセスするためのプロテアーゼ処理を行う工程、試料を、標識核酸プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション反応に付して、1以上の試料のDNAターゲットを直接又は間接的に標識する工程、標識DNAターゲットからの信号を観察する工程、及び、任意には、1以上の標識DNAターゲットから

10

20

30

40

50

の信号を除去する工程を含む。

【0009】

ある実施形態では、方法は、さらに、試料の複数の画像の登録を可能にするために、1以上の対照プローブで試料を染色する工程、及び、任意には、試料の複数の画像を登録する工程を含む。さらに他の実施形態は、複数の画像からタンパク質、RNA及びDNAの発現を分析する方法を含む。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、生体試料中の複数のターゲットを探索する方法の模式図である。方法において、ターゲットは、RNA、DNA及びタンパク質を含む。

10

【図2a】図2aは、グレードIIの肺扁平上皮細胞ガン腫のRNA、タンパク質及びDNAの多重染色を示す。A：DAPIにより染色された細胞核、B：U6 RNA、C：EGFR、D：サイトケラチン7、E：IGF1R、F：NaKATPase、G：cMET及びH：EGFR。

【図2b】図2bのパネルI及びパネルJは、図2aにおけるパネルG及びパネルHの同じ視野のセクションにおいてズームされる。顕著なcMET染色は観察されなかった。

【図3a】図3aは、肺転移性腺ガンのRNA、タンパク質及びDNAの多重染色を示す。A：DAPIにより染色された細胞核、B：U6 RNA、C：EGFR、D：サイトケラチン7、E：IGF1R、F：NaKATPase、G：cMET及びH：EGFR

20

。【図3b】図3bのパネルI及びパネルJは、図3aにおけるパネルG及びパネルHの同じ視野のセクションにおいてズームされる。

【発明を実施するための形態】

【0011】

特許請求の範囲の発明の主題をより明確かつ簡潔に記載及び指摘するために、下記定義が、下記説明及び添付の特許請求の範囲において使用される特定の用語について提供される。

【0012】

単数形で記載したものであっても、特に断らない限り、複数形のもを包含する。本明細書及び特許請求の範囲全体を通したおおよその言語は、それに関連する基本的な機能における変化をもたらすことなく許容範囲内で変動され得る、任意の量的表現を修飾するのに適用され得る。したがって、「約」等の用語により修飾された値は、特定された正確な値に限定されないものである。特に断らない限り、明細書及び特許請求の範囲において使用される、成分、特性、例えば、モル重量、反応条件等の量を表現する全ての数は、全ての例において、「約」という用語により修飾されていると理解されたい。したがって、反対に示さない限り、下記明細書及び添付の特許請求の範囲において説明された数的パラメータは、本発明により取得されるのが求められる所望の特性に応じて変化し得る近似である。せめて、各数的パラメータは、報告された有効数字の数を考慮して、通常の上捨五入を適用することにより、少なくとも理解されるべきである。

30

【0013】

本明細書で用いる「抗体」という用語は、別の分子に特異的に結合されることにより、同別の分子の特定の空間的及び極性的組織と相補と規定される免疫グロブリンを意味する。抗体は、モノクローナルでもよいし、又は、ポリクローナルでもよく、当該分野において周知の技術、例えば、宿主の免疫化及び血清の収集（ポリクローナル）により、又は、連続的なハイブリッド細胞株を調製し、分泌タンパク質を収集すること（モノクローナル）により、又は、ヌクレオチド配列又はその変異したバージョンをクローニング及び発現させ、天然抗体の特異的結合に必要とされるアミノ酸配列について少なくともコードすることにより調製され得る。抗体は、完全な免疫グロブリン又はそのフラグメントを含み得る。その免疫グロブリンとしては、種々の分類及びアイソタイプ、例えば、IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b及びIgG3、IgMがあげられる。機

40

50

能的な抗体フラグメントは、全長抗体に類似する親和性での結合を保持可能な抗体の一部（例えば、Fab、Fv及びF(ab')₂又はFab'）を含み得る。さらに、特定の分子に対する結合親和性が実質的に適切に維持される限り、免疫グロブリン又はそのフラグメントの凝集体、ポリマー及びコンジュゲートが使用され得る。

【0014】

本明細書で用いる「結合剤」という用語は、生体試料中の1以上のターゲットに結合し得る分子を意味する。結合剤は、ターゲットに特異的に結合し得る。適切な結合剤は、1以上の天然又は修飾されたペプチド、タンパク質（例えば、抗体、アフィボディ又はアプタマー）、核酸（例えば、ポリヌクレオチド、DNA、RNA又はアプタマー）；多糖類（例えば、レクチン、糖）、脂質、酵素、酵素基質もしくは阻害剤、リガンド、受容体、抗原又はハプテンを含み得る。適切な結合剤は、分析される試料及び検出に利用可能なターゲットに応じて選択され得る。例えば、試料中のターゲットは、リガンドを含む場合があり、結合剤は、受容体を含む場合がある。又は、ターゲットは、受容体を含む場合があり、結合剤は、リガンドを含む場合がある。同様に、ターゲットは、抗原を含む場合があり、結合剤は、抗体又は抗体フラグメントを含む場合があり、又はその逆もあり得る。ある実施形態では、ターゲットは、核酸を含む場合があり、結合剤は、相補の核酸を含む場合がある。ある実施形態では、ターゲット及び結合剤の両方が、互いに結合可能なタンパク質を含み得る。

10

【0015】

本明細書で用いる「生体試料」という用語は、生物学的対象から取得された試料、例えば、生体組織又はインピボもしくはインピトロにおいて取得された流体起源の試料を意味する。このような試料は、制限されず、体液（例えば、血液、血漿、血清又は尿）、器官、組織、断片及び、哺乳類、例えば、ヒトから単離された細胞であり得る。生体試料は、組織を含む生体試料の切片（例えば、器官又は組織の断面部）も含み得る。生体試料は、生体試料からの抽出物、例えば、生物流体（例えば、血液又は尿）由来の抗原も含み得る。

20

【0016】

生体試料は、原核生物由来又は真核生物由来（例えば、昆虫、原虫、鳥類、魚類、爬虫類）のものであり得る。ある実施形態では、生体試料は、哺乳類（例えば、ラット、マウス、ウシ、イヌ、ロバ、モルモット又はウサギ）である。特定の実施形態では、生体試料は、霊長類起源のもの（例えば、チンパンジー又はヒト）である。

30

【0017】

本明細書で用いる「プローブ」という用語は、結合剤及び標識、例えば、信号発生基又は酵素を有する作用剤を意味する。ある実施形態では、結合剤及び標識（信号発生基又は酵素）は、1つの実体において具現化される。結合剤及び標識は、直接的に（例えば、結合剤内に包含された蛍光分子を介して）又は間接的に（例えば、開裂部位を含み得るリンカーを介して）付着されることができ、1つの工程において生体試料に適用されることができる。別の実施形態では、結合剤及び標識は、別々の実体（例えば、ターゲットと結合可能な一次抗体及び一次抗体と結合可能な、酵素もしくは信号発生基で標識された二次抗体）において具現化される。結合剤及び標識（信号発生基又は酵素）が別々の実体である場合、それらは、1つの工程又は複数の工程において生体試料に適用され得る。本明細書で用いる「蛍光プローブ」という用語は、蛍光信号発生基に結合された結合剤を有する作用剤を意味する。

40

【0018】

本明細書で用いる「信号発生基」という用語は、1以上の検出技術（分光法、熱量測定法、分光顕微法又は目視による観察）を使用して検出可能な信号を提供可能な分子を意味する。検出可能な信号の適切な例は、光学信号及び電気信号又は放射性信号を含み得る。信号発生基の例としては、1以上の発色団、蛍光体、ラマン-活性タグ又は放射性標識があげられる。上記されたように、プローブに関して、ある実施形態では、信号発生基及び結合剤は、1つの実体（例えば、蛍光標識を含むターゲット結合タンパク質）に存在し得

50

る。又は、結合剤及び信号発生基は、試料の導入前又は同導入中に互いに会合する、別々の実体（例えば、受容体タンパク質とその特定の受容体タンパク質に対する標識された抗体）であり得る。

【0019】

本明細書で用いる「対照プローブ」という用語は、信号発生基が蛍光プローブを不活性化するのに使用される信号不活性化剤の溶液と接触した後に、80%以上の信号を保持するように、信号発生基に結合された結合剤又は直接染色可能な信号発生基を有する作用剤を意味する。対照プローブ中の適切な信号発生基は、信号不活性化剤と接触した際に、実質的に不活性化されない。信号発生基の適切な例は、放射性標識又は非酸化性蛍光体（例えば、DAPI）を含み得る。

10

【0020】

本明細書で用いる「酵素」という用語は、基質の化学反応を触媒し得るタンパク質分子を意味する。ある実施形態では、適切な触媒は、基質の化学反応を触媒して、試料又は試料が結合されている固体支持体に存在する受容体（例えば、フェノール基）に結合し得る反応生成物を形成する。受容体は、外来性（すなわち、試料又は固体支持体に外来的に付着した受容体）又は内在性（試料又は支持体中に内在的に存在する受容体）であり得る。適切な酵素の例としては、ペルオキシダーゼ、オキシダーゼ、ホスファターゼ、エステラーゼ及びグリコシダーゼがあげられる。適切な酵素の具体例としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、リパーゼ及びグルコースオキシダーゼがあげられる。

20

【0021】

本明細書で用いる「酵素基質」という用語は、酵素により化学的に触媒されて、反応生成物を形成する化合物を意味する。ある実施形態では、反応生成物は、試料又は試料が結合している固体支持体に存在する受容体に結合可能である。ある実施形態では、本明細書において、方法に使用される酵素基質は、非発色性又は非化学発光性の基質を含み得る。信号発生基は、標識として酵素基質に付着され得る。

【0022】

本明細書で用いる「発色団」という用語は、2種類の分子起動の間のエネルギー差が可視スペクトルの範囲内にある分子の一部を意味する。発色団は、可視光の特定波長の吸光及び他の波長の透過又は反射によりもたらされる分子の色をもたらし得る。

30

【0023】

本明細書で用いる「蛍光体」又は「蛍光信号発生基」という用語は、特定波長の光に曝されることにより励起された場合、異なる波長の光を発する化合物を意味する。蛍光体は、その発光プロファイル又は「色」に関して記載され得る。緑色の蛍光体（例えば、Cy3、FITC及びオレゴングリーン）は、概ね515 - 540ナノメートルの範囲の波長でのその発光により特徴付けられ得る。赤色の蛍光体（例えば、テキサスレッド、Cy5及びテトラメチルローダミン）は、概ね590 - 690ナノメートルの範囲の波長でのその発光により特徴付けられ得る。蛍光体の例としては、制限されず、4 - アセトアミド - 4' - イソチオシアナトスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸アクリジン、アクリジン誘導体及びアクリジンイソチオシアネート、5 - (2' - アミノエチル) アミノナフタレン - 1 - スルホン酸 (EDANS)、4 - アミノ - N - [3 - ビニルスルホニル] フェニル] ナフタリイミド - 3, 5 - ジスルホネート (LuciferイエローVS)、(4 - アニリノ - 1 - ナフチル) マレイミド、アントラニルアミド、ブリリアントイエロー、クマリン、クマリン誘導体、7 - アミノ - 4 - メチルクマリン (AMC、クマリン120)、7 - アミノ - トリフルオロメチルクマリン (クマラン151)、シアノジン; 4', 6 - ジアミノジノ - 2 - フェニルインドール (DAPI)、5', 5'' - ジプロモピロガロール - スルホンフタレイン (プロモピロガロールレッド)、7 - ジエチルアミノ - 3 - (4' - イソチオシアナトフェニル) 4 - メチルクマリン、4, 4' - ジイソチオシアナトジヒドロ - スチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸、4, 4' - ジイソチオシアナトスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸、5 - [ジメチルアミノ] ナフタレン - 1 - スルホニルクロリ

40

50

ド(DNS、ダンシルクロリド)、エオシン、エオシンの誘導体、例えば、エオシンイソチオシアネート、エリスロシン、エリスロシンの誘導体、例えば、エリスロシンB及びエリスロシンイソチオシアネート；エチジウム；フルオレセイン及び誘導体、例えば、5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、5-(4,6-ジクロロトリアジン-2-イル)アミノフルオレセイン(DTAF)、2'7'-ジメトキシ-4'5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、QFITC(XFITC)；フルオレスカミン誘導体(アミンとの反応に基づく蛍光)；IR144、IR1446；マラカイトグリーンイソチオシアネート；4-メチルウンベリフェロン；オルトクレゾールフタレイン；ニトロチロシン；パラロサニリン；フェノールレッド、B-フィコエリスリン；o-フタルジアルデヒド誘導体(アミンとの反応に基づく蛍光)；ピレン及び誘導体、例えば、ピレン、ピレンブチレート及びスクシンイミジル 1-ピレンブチレート；Reactiveレッド4(Cibacron.RTM.ブリリアントレッド3B-A)、ローダミン及び誘導体、例えば、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、6-カルボキシローダミン(R6G)、リサミンローダミンBスルホニルクロリド、ローダミン(Rhod)、ローダミンB、ローダミン123、ローダミンXイソチオシアネート、スルホローダミンB、スルホローダミン101及びスルホローダミン101のスルホニルクロリド誘導体(テキサスレッド)；N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)；テトラメチルローダミン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)；リボフラビン；ロゾール酸及びランタニドキレート誘導体、量子ドット、シアニン、ピレリウム染料及びスクアラインがあげられる。

10

20

【0024】

本明細書で用いる「インサイツ」という用語は、概ね、元の場所、例えば、インタクた器官もしくは組織において、又は、器官もしくは組織の代表的なセグメントにおいて起こる事象を意味する。ある実施形態では、ターゲットのインサイツ分析は、各種の供給源、例えば、有機体、器官、組織の試料由来の細胞、又は、細胞培養物において行われ得る。インサイツ分析は、ターゲットがその元の位置から除去された場合に失われ得るコンテキスト情報を提供する。したがって、ターゲットのインサイツ分析は、細胞膜が、完全にインタクトであるか、又は、ターゲット結合プローブが細胞内に残っている部分的にインタクトであるかどうかにかかわらず、細胞全体又は組織の試料内に位置したターゲット結合プローブの分析を説明する。さらに、本明細書に開示された方法は、固定されるか、又は、固定されていない細胞又は組織の試料におけるインサイツでのターゲットを分析するのに使用され得る。

30

【0025】

本明細書で用いる信号不活性化剤という用語は、信号を直接的に不活性化するか、又は、不活性化剤の存在において試料の照射後に信号を不活性化する化学物質を意味する。

【0026】

本明細書で用いる「照射」又は「照射する」という用語は、試料又は溶液を非イオン化照射に曝す作用又はプロセスを意味する。ある実施形態では、非イオン化照射は、350nmと1.3µmとの間の波長を有する。好ましい実施形態では、非イオン化照射は、波長が400~700nmの可視光である。照射は、特定の波長又は波長範囲を照射可能な線源、例えば、ランプに、試料又は溶液を曝すことにより達成され得る。ある実施形態では、光励起を受け得る分子は、照射の結果として光励起される。ある実施形態では、光励起を受け得る分子は、信号発生基、例えば、蛍光信号発生基である。ある実施形態では、蛍光信号発生基の照射は、蛍光信号発生基と信号不活性化剤との間の光反応を開始する。ある実施形態では、照射は、光活性化された化学退色により、信号発生基を実質的に不活性化する光反応を開始する。他の実施形態では、信号不活性化剤は、光励起を受けて、信号発生基と反応して信号を不活性化する反応性部分を生成する。光学フィルタは、試料又は溶液の照射を、特定の波長又は波長範囲に制限するのに使用され得る。ある実施形態では、光学フィルタは、光励起を受け得る1以上の分子の選択的な光励起用の狭い範囲の波

40

50

長に、照射を制限するのに使用され得る。「選択的な光励起」という用語は、光励起を受け得る1以上の分子が、照射後の基底電子状態のままである、光励起を受け得る1以上の他の分子の存在において光励起されることによる、作用又はプロセスを意味する。

【0027】

ある実施形態では、光励起を受け得る分子は、蛍光染料、例えば、シアニン染料である。更なる一実施形態では、620~680nm間の波長範囲に制限される照射は、Cy5染料の選択的な光励起に使用される。別の実施形態では、特定の波長における試料の照射は、レーザを使用することによっても達成され得る。

【0028】

本明細書で用いる「ペルオキシダーゼ」という用語は、電子供与体を伴う酵素基質の酸化反応を触媒する酵素分類を意味する。ペルオキシダーゼ酵素の例としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、シトクロムCペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ又はダイズペルオキシダーゼがあげられる。

【0029】

本明細書で用いる「ペルオキシダーゼ基質」という用語は、ペルオキシダーゼにより化学的に触媒されて、反応生成物を形成する化合物を意味する。ある実施形態では、本明細書の方法において使用されるペルオキシダーゼ基質は、非発色性又は非化学発光性の基質を含み得る。蛍光信号発生基は、ペルオキシダーゼ基質に、標識として付着され得る。

【0030】

本明細書で用いる「退色」、「化学退色」、「光活性化化学退色」又は「光誘引化学退色」という用語は、信号発生基により生成された信号が一連の反応において修飾されることによる作用又はプロセスを意味する。特定の実施形態では、信号発生基は、不可逆的に修飾される。

【0031】

ある実施形態では、信号は、光活性化化学退色の結果として減衰又は消去される。ある実施形態では、信号発生基は、完全に退色される、すなわち、信号の強度は、約100%まで低下する。ある実施形態では、信号は、光学信号であり、信号発生基は、光学信号発生基である。本明細書で用いる「光励起」という用語は、照射エネルギーの吸収に基づく、例えば、照射に基づく基底電子状態から励起された電子状態への分子遷移による作用又はプロセスを意味する。光励起された分子は、化学反応、例えば、電子移動反応に関係し得る。ある実施形態では、光励起を受け得る分子は、信号発生基、例えば、蛍光信号発生基である。

【0032】

本明細書で用いる「光反応」又は「光誘引反応」という用語は、1以上の反応物質の光励起の結果として開始及び/又は進行される化学反応を意味する。光反応における反応物質は、電子転移剤及び光励起を受け得る分子であり得る。ある実施形態では、光反応は、電子転移剤から光励起を受けている分子、すなわち、光励起された分子への電子転移を含み得る。別の実施形態では、光反応は、光励起を受けている分子から電子転移剤への電子転移も含み得る。ある実施形態では、光励起を受け得る分子は、蛍光信号発生基、例えば、蛍光体である。ある実施形態では、光反応は、光反応の1以上の成分の不可逆的な修飾をもたらす。ある実施形態では、光反応は、光活性化された化学退色により、信号発生基を実質的に不活性化する。

【0033】

ある実施形態では、光反応は、電子転移剤と光励起された分子との間の分子間の電子転移を含み得る。例えば、電子転移剤と光励起された分子との間の結合が一過性であり、電子転移の直前に形成され、電子転移後のかい離される際に、電子転移が起こる。

【0034】

ある実施形態では、光反応は、電子転移剤と光励起された分子との間の分子間の電子転移を含み得る。電子転移剤と光励起された分子とが、例えば、電子転移プロセスの開始前

10

20

30

40

50

に、共有的又は静電的な相互作用により、互いに結合されている際に、例えば、電子転移が起こる。分子間の電子転移に関係する光反応は、例えば、光励起を受け得る分子と電子転移剤とが対向する電荷を有し、静電的な相互作用により保持された複合体を形成する際に起こり得る。例えば、カチオン性染料、例えば、カチオン性のシアニン染料とトリフェニルブチルホウ酸アニオンとが、複合体を形成し得る。この場合、分子間の電子転移は、シアニンとホウ酸部分との間で、照射に基づいて起こり得る。他の実施形態では、電子転移プロセスは、分子間プロセスであり得る。

【0035】

本明細書で用いる「固体支持体」という用語は、生体試料に存在するターゲットが固定化され、その後に本明細書に記載された方法により検出されることが出来る物品を意味する。ターゲットは、支持体上に、物理的吸着、共有結合の形成又はそれらの組合せにより固定され得る。固体支持体は、ポリマー性、ガラス性又は金属性の材料を含み得る。固体支持体の例としては、メンブレン、マイクロタイタープレート、ビーズ、フィルタ、試験片、スライド、カバーガラス及び試験管があげられる。

10

【0036】

本明細書で用いる「特異的結合」という用語は、他方について、他の分子を実質的にほとんど認識しないのと比較して、2種類の分子の内的一方の特異的な認識を意味する。分子は、1以上の静電的な相互作用、水素結合又は疎水性の相互作用から生じる2つの分子間の特異的な認識を生じさせる、その表面上又はキャビティ中の領域を有し得る。特異的な結合の例としては、制限されず、抗体-抗原の相互作用、酵素-基質の相互作用、ポリヌクレオチドの相互作用等があげられる。ある実施形態では、結合剤分子は、大気条件、例えば、約6~約8のpH及び約0~約37の範囲の温度下において、約 10^5M^{-1} より低くない、ターゲットに対する内在的な平衡会合定数(KA)を有し得る。

20

【0037】

本明細書で用いる「ターゲット」という用語は、生体試料中に存在する場合、検出され得る生体試料の成分を意味する。ターゲットは、天然由来の特異的結合剤(例えば、抗体)が存在するか、又は、特異的結合剤が調製され得る(例えば、小分子結合剤又はアプタマー)、任意の物質であり得る。一般的には、結合剤は、ターゲットの1以上の別々の化学部分又はターゲットの三次元構造成分(例えば、ペプチドフォールディングに由来する3D構造)を介して、ターゲットに結合し得る。ターゲットは、1以上の天然又は修飾されたペプチド、タンパク質(例えば、抗体、アフィボディ又はアプタマー)、核酸(例えば、ポリヌクレオチド、DNA、RNA又はアプタマー);多糖類(レクチン又は糖)、脂質、酵素、酵素基質、リガンド、受容体、抗原又はハプテンを含み得る。ある実施形態では、ターゲットは、タンパク質又は核酸を含み得る。

30

【0038】

本発明は、分析、診断又は予後の用途、例えば、検体検出、組織化学、免疫組織化学、免疫蛍光、インサイツハイブリダイゼーションにおける発色又はインサイツハイブリダイゼーションにおける蛍光(FISH)に適用可能な方法に概ね関連する実施形態を含む。ある実施形態では、本明細書に開示された方法は、組織化学、免疫染色、免疫組織化学、免疫アッセイ又は免疫蛍光に、特に適用可能であり得る。ある実施形態では、本明細書に開示された方法は、免疫プロット技術、例えば、ウエスタンプロット又は免疫アッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)に、特に適用可能であり得る。

40

【0039】

開示された方法は、1つの生体試料における複数のターゲットの検出に概ね関連する。ある実施形態では、同じ検出チャネルを使用して1つの生体試料における複数のターゲットを検出する方法が開示される。ターゲットは、懸濁液における細胞表面上、細胞学的塗沫標本上、組織切片の表面上、細胞アレイもしくは細胞ライゼートアレイの表面上、固体支持体(例えば、ゲル、プロット、ガラススライド、ビーズもしくはELISAプレート)の表面上に存在し得る。本明細書に開示された方法は、生体試料の完全性にほとんど影響しないか、又は、同完全性に影響しない、同じ生体試料中の複数のターゲットの検出を

50

可能にし得る。同じ生体試料中のターゲットを検出する工程は、生体試料中のターゲットについての空間情報をさらに提供し得る。本明細書に開示された方法は、限定された量の生体試料が分析に利用可能であり、同じ試料が複数の分析に処理されなければならない場合がある分析用途にも適用可能でもあり得る。本明細書に開示された方法は、実質的にターゲットを取り除くことなく、固体状の試料（例えば、組織切片）又は固体支持体に付着された試料（例えば、プロット）の複数の分析も容易にし得る。さらに、同じ検出チャンネルは、試料中の種々のターゲットの検出に使用されることができ、複数のターゲットの分析にほとんど化学的要求をしないことを可能にする。方法は、分解できる信号の制限により、同時に検出可能なターゲットの数が制限され得る検出法に基づく分析をさらに容易にし得る。例えば、蛍光ベース検出を使用して、同時に検出され得るターゲットの数は、約 4 つの蛍光信号のみがその励起及び発光波長特性に基づいて分解可能であり得る場合、約 4 つに制限され得る。ある実施形態では、本明細書に開示された方法は、蛍光ベース検出システムを使用して、4 つのターゲットより多い検出を可能にし得る。

10

【 0 0 4 0 】

ある実施形態では、生体試料中の DNA、RNA 及びタンパク質のターゲットを検出する方法は、生体試料中のターゲットの連続的な検出を含む。方法は、概ね、生体試料中の第 1 のターゲットを検出する工程、薬剤を使用して第 1 のターゲットからの信号を修飾する工程、及び、生体試料中の第 2 のターゲットを検出する工程を含む。方法は、第 2 のターゲットからの信号を修飾し、続けて、生体試料中の第 3 のターゲットを検出する等の工程を繰り返す工程をさらに含み得る。

20

【 0 0 4 1 】

特定の実施形態では、生体試料は、固体支持体に付着されることができ、又は、懸濁液、例えば、制限されず、生物学的流体、例えば、血液試料中の造血細胞又は循環性の腫瘍細胞であり得る。したがって、特定の実施形態では、生体試料中の DNA、RNA 及びタンパク質のターゲットを検出する工程は、生体試料（生体試料は、懸濁液である。）中のターゲットの連続的な検出、例えば、溶液におけるインサイツハイブリダイゼーション反応を含む。

【 0 0 4 2 】

図 1 は、方法の一実施形態の略図である。方法では、生体試料が、生体試料のパラフィン又は凍結切片から調製され、RNA ターゲット用の 1 以上の特異的に標識核酸プローブを使用するインサイツハイブリダイゼーションに付される（工程 A）。これに続けて、工程 B において、プローブに直接又は間接的に付着された標識からの信号を観察し、任意には、工程 C において、複数種の RNA が工程 A - C を繰り返すことによる複数のサイクルにおいて検出される場合、RNA プローブからの信号を除去する。

30

【 0 0 4 3 】

図 1 にさらに示されたように、ついで、試料は、抗原回復及び検出に付され得る。これは、工程 D に示される。この工程により、試料は、タンパク質エピトープを回復するために、抗原回復プロトコルに付され得る。抗原回復は、制限されず、熱誘導法又はタンパク質分解消化を含み得る。

【 0 0 4 4 】

特定の実施形態では、これに続いて、工程 E において、抗体法を使用するターゲットに対するハイブリダイゼーション及び抗原への抗体プローブの付着がされる。これによっても、RNA プローブからの信号の除去がもたらされ得る。特定の実施形態では、標準的な免疫組織化学（IHC）又は免疫蛍光（IF）技術が使用され得る。ハイブリダイゼーションが完了すると、ハイブリダイズした抗体の検出は、直接的又は間接的な方法により起こり（工程 F）、続けて、抗体プローブからの信号が除去される（工程 G）。工程 E - G は、複数のタンパク質を検出するために、複数回繰り返され得る。

40

【 0 0 4 5 】

ついで、プロテアーゼ処理が、DNA ターゲットを明らかにし、又は、同 DNA ターゲットにアクセスするために適用される（工程 H）。続けて、DNA を付着し、標的にする

50

ために、インサイトハイブリダイゼーション法（ISH）が行われる（工程I）。プローブに直接又は間接的に付着された標識を検出する（工程J）。特定の実施形態では、信号の不活性化又はプローブの除去のいずれかにより、信号をさらに除去する工程（工程K）が、更なるDNAターゲットが検出される場合、行われ得る。特定の実施形態では、発色性検出が使用され得る。

【0046】

特定の実施形態では、プロテアーゼ処理後に、組織の形態の保存、プレハイブリダイゼーションをする工程又は類似の処理工程が適用され得る。

【0047】

特定の実施形態では、1以上の対照プローブにより、試料を染色、例えば、形態染色、例えば、DAPI染色するための工程が追加され得る。対照プローブは、試料に、1回又は複数回適用され得る。特定の実施形態では、これは、検出されたバイオマーカーによる試料の1以上の合成画像が取得され得るように、形態マーカーに基づく複数の画像の登録を可能にし得る。

10

【0048】

特定の実施形態では、工程A、B及びC、工程E、F及びGならびに工程I、J及びKが、複数回繰り返され得る。

【0049】

特定の実施形態では、生体試料は、固体支持体に付着された複数のターゲットを含み得る。ある実施形態では、生体試料は、組織試料、細胞全体、細胞成分、サイトスピン又は細胞塗沫標本を含み得る。ある実施形態では、生体試料は、基本的に、組織試料又は組織成分を含む。組織試料は、類似の機能を有し得る生物学的対象の組織から取得された類似の細胞収集物を含み得る。ある実施形態では、組織試料は、ヒトの組織から取得された類似の細胞収集物を含み得る。ヒトの組織の適切な例としては、制限されず、（1）上皮組織；（2）結合組織、例えば、血管、骨及び軟骨；（3）筋肉組織；ならびに（4）神経組織があげられる。組織試料の供給源は、新鮮、凍結及び/もしくは保存された器官もしくは組織の試料から取得された固体組織、又は、生検もしくは吸引液；血液もしくは任意の血液成分；体液、例えば、脳脊髄液、羊水、腹膜液もしくは間質液；又は、対象の妊娠もしくは発生における任意のタイミング由来の細胞であり得る。ある実施形態では、組織試料は、初代又は培養細胞、循環性疾患もしくは正常な細胞、例えば、循環性の腫瘍細胞、感染因子に応答する活性化された白血球又は細胞株を含み得る。

20

30

【0050】

ある実施形態では、生体試料は、健康又は疾患の組織試料からの組織切片（例えば、結腸、胸部組織、前立腺由来の組織切片）を含む。組織切片は、組織試料の単体又は一片、例えば、組織の薄スライス又は組織試料から切断された細胞を含み得る。ある実施形態では、組織試料の複数の切片が、例えば、組織マイクロアレイに利用され、分析に付され得る。ただし、本明細書に開示された方法は、（分子レベル、例えば、RNA、タンパク質及びDNAにおいて、）少なくとも3種類のターゲットに関して、組織試料の同じ切片の分析に使用され得る。ある実施形態では、組織試料の同じ切片は、（形態学的又は分子レベルにおいて）少なくとも4種類のターゲットに関して分析され得る。ある実施形態では、組織試料の同じ切片は、（形態学的又は分子レベルにおいて）4種類より多いターゲットに関して分析され得る。ある実施形態では、組織試料の同じ切片は、形態学的及び分子レベルの両方において分析され得る。

40

【0051】

生体試料として使用される場合、組織切片は、約100マイクロメートル未満の範囲、約50マイクロメートル未満の範囲、約25マイクロメートル未満の範囲、又は、約10マイクロメートル未満の範囲の厚みを有し得る。

【0052】

ある実施形態では、生体試料又は生体試料中のターゲットは、固体支持体に付着され得る。固体支持体は、マイクロアレイ（例えば、DNA又はRNAのマイクロアレイ）、ゲ

50

ル、プロット、ガラススライド、ビーズ又はE L I S Aプレートを含み得る。ある実施形態では、生体試料又は生体試料中のターゲットは、ナイロン、ニトロセルロース及びポリビニリデンジフルオライドから選択されるメンブレンに付着され得る。ある実施形態では、固体支持体は、ポリスチレン、ポリカーボネート及びポリプロピレンから選択されるプラスチック表面を含み得る。

【0053】

本発明の一実施形態に基づく生体試料は、固体又は流体であり得る。生体試料の適切な例は、制限されず、培養物、血液、血漿、血清、唾液、脳脊髄液、胸膜液、乳、リンパ、唾液、精液、尿、糞、涙、唾液、ニードル吸引液、皮膚の外側セクション、呼気、腸管及び尿生殖管、腫瘍、器官、細胞培養物もしくは細胞培養物成分又は固体の組織切片を含み得る。ある実施形態では、生体試料は、現状のまま、すなわち、所望のターゲットの収集及び/又は単離をすることなく分析され得る。

10

【0054】

生体試料は、その物理的条件、例えば、制限されず、凍結もしくは染色又は他の方法で処理されているかにかかわらず、前述の試料のいずれかを含み得る。ある実施形態では、生体試料は、本質的に試料に自然には混合されない化合物、例えば、保存剤、抗凝血剤、緩衝液、定着剤、栄養剤、抗生物質等を含み得る。

【0055】

試料は、凍結組織切片又はパラフィン包埋試料であり得る。パラフィン試料は、生体試料が、例えば、パラホルムアルデヒド中で予め固定され、続けて、ワックス中に包埋されているそれらの試料を意味する。ある実施形態では、組織試料は、組織試料が切片化され得るように、まず、固定され、ついで、上昇する一連のアルコールにより脱水され、パラフィン又は他の切片化媒体により浸透及び包埋され得る。別の実施形態では、組織試料は、切片化され、その後固定され得る。ある実施形態では、組織試料は、パラフィンに包埋及び処理され得る。使用され得るパラフィンの例としては、制限されず、Paraplast、Broid及びTissuemayがあげられる。組織試料が包埋されると、試料は、約3ミクロン～約5ミクロンの範囲の厚みを有し得る切片に、ミクロトームにより切片化され得る。切片化されると、切片は、接着剤を使用してスライドに取り付けられ得る。スライド接着剤の例は、制限されず、シラン、ゼラチン、ポリ-L-リジンを含み得る。実施形態では、パラフィンが包埋材料として使用される場合、組織切片は、水において脱パラフィン化及び再水和され得る。組織切片は、例えば、有機剤、例えば、キシレン及び徐々に上昇する一連のアルコール又は界面活性剤を使用することにより、脱パラフィン化され得る。

20

30

【0056】

ある実施形態では、上記された試料調製手順とは別に、組織切片は、インサイツハイブリダイゼーション及び/又は免疫組織化学前、最中又は後に、更なる処理に付され得る。例えば、ある実施形態では、組織切片は、エプトー回復法、例えば、クエン酸緩衝液中での組織試料の加熱に付され得る。ある実施形態では、組織切片は、任意には、任意の非特異的結合を最小化するために、ブロッキング工程に付され得る。

【0057】

ある実施形態では、生体試料もしくは生体試料の一部又は生体試料（例えば、細胞ライゼート）中に存在するターゲットは、固体支持体（例えば、ゲル、プロット、ガラススライド、ビーズ又はE L I S Aプレート）の表面上に付着され得る。ある実施形態では、生体試料中に存在するターゲットは、固体支持体の表面上に付着され得る。生体試料中のターゲットは、物理的結合の形成、共有結合の形成又は両方により、固体支持体上に付着され得る。

40

【0058】

分析されるターゲットの適切性は、生体試料に必要とされる分析の種類及び性質により決定され得る。ある実施形態では、ターゲットは、生体試料における検体の存在又は不在についての情報を提供し得る。別の実施形態では、ターゲットは、生体試料の状態につ

50

いての情報を提供し得る。例えば、生体試料が組織試料を含む場合、本明細書に開示された方法は、異なる種類の細胞もしくは組織を比較する、異なる発生段階を比較する、疾患もしくは異常の存在を検出する、又は、疾患もしくは異常の種類を決定するのを手助けし得るターゲットを検出するのに使用され得る。

【0059】

特定の実施形態では、生体試料中のターゲットは、1以上のペプチド、タンパク質（例えば、抗体、アフィボディもしくはアプタマー）、核酸（例えば、ポリヌクレオチド、DNA、RNAもしくはアプタマー）；多糖類（例えば、レクチンもしくは糖）、脂質、酵素、酵素基質、リガンド、受容体、抗原又はハプテンを含み得る。ある実施形態では、ターゲットは、本質的に、タンパク質又は核酸を含み得る。1以上の前述のターゲットは、特定の細胞を特徴付け得る。一方、他のターゲットは、特定の疾患又は症状に関連し得る。ある実施形態では、本明細書に開示された方法を使用して検出及び分析され得るターゲットは、制限されず、予後ターゲット、ホルモンもしくはホルモン受容体ターゲット、リンパ球ターゲット、腫瘍ターゲット、細胞周期関連ターゲット、神経組織及び腫瘍ターゲット又はクラスター分化ターゲットを含み得る。

10

【0060】

予後ターゲットの適切な例は、酵素ターゲット、例えば、ガラクトシルトランスフェラーゼII、ニューロン特異的エノラーゼ、プロトンATPase-2又は酸ホスファターゼを含み得る。

【0061】

ホルモン又はホルモン受容体ターゲットの適切な例は、ヒト絨毛性腺刺激ホルモン（HCG）、副腎皮質刺激ホルモン、ガン胎児性抗原（CEA）、前立腺特異的抗原（PSA）、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、アンドロゲン受容体、gC1q-R/p33補体受容体、IL-2受容体、p75ニューロトロフィン受容体、PTH受容体、甲状腺ホルモン受容体又はインスリン受容体を含み得る。

20

【0062】

リンパ球ターゲットの適切な例は、アルファ-1-アンチキモトリプシン、アルファ-1-アンチトリプシン、B細胞ターゲット、bc1-2、bc1-6、Bリンパ球抗原36kD、BM1（骨髄ターゲット）、BM2（骨髄ターゲット）、ガレクチン-3、グランザイムB、HLAクラスI抗原、HLAクラスII（DP）抗原、HLAクラスII（DQ）抗原、HLAクラスII（DR）抗原、ヒト好中球デフェンシン、免疫グロブリンA、免疫グロブリンD、免疫グロブリンG、免疫グロブリンM、カップ軽鎖、カップ軽鎖、ラムダ軽鎖、リンパ球/組織球抗原、マクロファージターゲット、ムラミダーゼ（ライソザイム）、p80未分化リンパ腫キナーゼ、プラズマ細胞ターゲット、分泌性白血球プロテアーゼ阻害剤、T細胞抗原受容体（JOVI1）、T細胞抗原受容体（JOVI3）、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ又は非クラスターB細胞ターゲットを含み得る。

30

【0063】

腫瘍ターゲットの適切な例は、アルファフェトタンパク質、アポリポタンパク質D、BAG-1（RAP46タンパク質）、CA19-9（sialyl lewis a）、CA50（ガン腫関連ムチン抗原）、CA125（卵巣ガン抗原）、CA242（腫瘍関連ムチン抗原）、クロモグラニンA、クラスτεリン（アポリポタンパク質J）、上皮膜抗原、上皮関連抗原、上皮特異的抗原、gross cystic disease fluid protein-15、肝細胞特異的抗原、ヘレグリン、ヒト胃ムチン、ヒト乳脂肪球、MAGE-1、マトリクスメタロプロテイナーゼ、melan A、メラノーマターゲット（HMB45）、メソテリン、メタロチオネイン、小眼球症転写因子（MITF）、Muc-1コア糖タンパク質、Muc-1糖タンパク質、Muc-2糖タンパク質、Muc-5AC糖タンパク質、Muc-6糖タンパク質、ミエロペルオキシダーゼ、Myf-3（横紋筋肉腫ターゲット）、Myf-4（横紋筋肉腫ターゲット）、MyoD1（横紋筋肉腫ターゲット）、ミオグロビン、nm23タンパク質、プラセンタアルカリホス

40

50

ファターゼ、プレアルブミン、前立腺特異的抗原、前立腺酸性ホスファターゼ、前立腺インヒピンペプチド、P T E N、腎細胞ガン腫ターゲット、小腸粘性抗原、テトラネクチン、甲状腺転写因子 - 1、マトリクスメタロプロテイナーゼ1の組織阻害剤、マトリクスメタロプロテイナーゼ2の組織阻害剤、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質 - 1、ビリリン又はフォン・ヴィルブランド因子を含み得る。

【0064】

細胞周期関連ターゲットの適切な例は、アポトーシスプロテアーゼ活性化因子 - 1、b c l - w、b c l - x、プロモデオキシウリジン、C A K (c d k - 活性化キナーゼ)、細胞アポトーシス感受性タンパク質 (C A S)、カスパーゼ2、カスパーゼ8、C P P 3 2 (カスパーゼ - 3)、C P P 3 2 (カスパーゼ - 3)、サイクリン依存性キナーゼ、サイクリンA、サイクリンB1、サイクリンD1、サイクリンD2、サイクリンD3、サイクリンE、サイクリンG、DNAフラグメント化因子 (N - 末端)、F a s (C D 9 5)、F a s - 関連死ドメインタンパク質、F a s リガンド、F e n - 1、I P O - 3 8、M c l - 1、ミニクロモソーム維持タンパク質、ミスマッチ修復タンパク質 (M S H 2)、ポリ (A D P - リボース) ポリメラーゼ、増殖性細胞核抗原、p 1 6 タンパク質、p 2 7 タンパク質、p 3 4 c d c 2、p 5 7 タンパク質 (K i p 2)、p 1 0 5 タンパク質、S t a t 1 アルファ、トポイソメラーゼI、トポイソメラーゼIIアルファ、トポイソメラーゼIIIアルファ又はトポイソメラーゼIIベータを含み得る。

【0065】

神経組織及び腫瘍のターゲットの適切な例は、アルファBクリスタリン、アルファ - インテルネクシン、アルファシヌクレイン、アミロイド前駆体タンパク質、ベータアミロイド、カルピンジン、コリンアセチルトランスフェラーゼ、励起性アミノ酸トランスポーター1、G A P 4 3、グリア線維性酸性タンパク質、グルタミン酸受容体2、ミエリン塩基性タンパク質、神経増殖因子受容体 (g p 7 5)、神経芽細胞腫ターゲット、神経フィラメント68kD、神経フィラメント160kD、神経フィラメント200kD、神経特異的エノラーゼ、ニコチン性アセチルコリン受容体アルファ4、ニコチン性アセチルコリン受容体ベータ2、ペリフェリン、タンパク質遺伝子産物9、S - 1 0 0 タンパク質、セロトニン、S N A P - 2 5、シナプシンI、シナプトフィシン、t a u、トリプトファンヒドロキシラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ又はユビキチンを含み得る。

【0066】

クラスター分化ターゲットの適切な例は、C D 1 a、C D 1 b、C D 1 c、C D 1 d、C D 1 e、C D 2、C D 3 デルタ、C D 3 イプシロン、C D 3 ガンマ、C D 4、C D 5、C D 6、C D 7、C D 8 アルファ、C D 8 ベータ、C D 9、C D 1 0、C D 1 1 a、C D 1 1 b、C D 1 1 c、C D w 1 2、C D 1 3、C D 1 4、C D 1 5、C D 1 5 s、C D 1 6 a、C D 1 6 b、C D w 1 7、C D 1 8、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 3、C D 2 4、C D 2 5、C D 2 6、C D 2 7、C D 2 8、C D 2 9、C D 3 0、C D 3 1、C D 3 2、C D 3 3、C D 3 4、C D 3 5、C D 3 6、C D 3 7、C D 3 8、C D 3 9、C D 4 0、C D 4 1、C D 4 2 a、C D 4 2 b、C D 4 2 c、C D 4 2 d、C D 4 3、C D 4 4、C D 4 4 R、C D 4 5、C D 4 6、C D 4 7、C D 4 8、C D 4 9 a、C D 4 9 b、C D 4 9 c、C D 4 9 d、C D 4 9 e、C D 4 9 f、C D 5 0、C D 5 1、C D 5 2、C D 5 3、C D 5 4、C D 5 5、C D 5 6、C D 5 7、C D 5 8、C D 5 9、C D w 6 0、C D 6 1、C D 6 2 E、C D 6 2 L、C D 6 2 P、C D 6 3、C D 6 4、C D 6 5、C D 6 5 s、C D 6 6 a、C D 6 6 b、C D 6 6 c、C D 6 6 d、C D 6 6 e、C D 6 6 f、C D 6 8、C D 6 9、C D 7 0、C D 7 1、C D 7 2、C D 7 3、C D 7 4、C D w 7 5、C D w 7 6、C D 7 7、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 8 0、C D 8 1、C D 8 2、C D 8 3、C D 8 4、C D 8 5、C D 8 6、C D 8 7、C D 8 8、C D 8 9、C D 9 0、C D 9 1、C D w 9 2、C D w 9 3、C D 9 4、C D 9 5、C D 9 6、C D 9 7、C D 9 8、C D 9 9、C D 1 0 0、C D 1 0 1、C D 1 0 2、C D 1 0 3、C D 1 0 4、C D 1 0 5、C D 1 0 6、C D 1 0 7 a、C D 1 0 7 b、C D w 1 0 8、C D 1 0 9、C D 1 1 4、C D 1 1 5、C D 1 1 6、C D 1 1 7、C D w 1 1 9、C D 1 2 0 a、

10

20

30

40

50

CD120b、CD121a、CDw121b、CD122、CD123、CD124、CDw125、CD126、CD127、CDw128a、CDw128b、CD130、CDw131、CD132、CD134、CD135、CDw136、CDw137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CDw145、CD146、CD147、CD148、CDw149、CDw150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156、CD157、CD158a、CD158b、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166及びTCR-ゼータを含み得る。

【0067】

他の適切な予後ターゲットは、セントロメアタンパク質-F (CENP-F)、giantin、インボルクリン、ラミンA&C (XB10)、LAP-70、ムチン、核孔複合体タンパク質、p180ラメラ体タンパク質、ran、r、カテプシンD、Ps2タンパク質、Her2-neu、P53、S100、上皮ターゲット抗原 (EMA)、TdT、MB2、MB3、PCNA又はKi67を含み得る。

【0068】

工程A、B及びCにおけるRNAの検出は、通常、ブロッキング用のサケ精子DNA又はtRNAによる任意のプレハイブリダイゼーション工程、続けて、高温において、所望のターゲットに対する配列特異的プローブを使用するハイブリダイゼーション工程を概ね含む。プレハイブリダイゼーション工程の不存在において、ブロッキング剤は、ハイブリダイゼーション工程中に、プローブ自体と共に使用される。最適なプローブ濃度及び温度は、最良の信号-ノイズ比について、概ね経験的に決定されるが、プローブのT_m、緩衝液組成及びプローブ種、例えば、LNA vs DNA骨格の関数である。ハイブリダイゼーション時間も、約30分以下からオーバーナイトハイブリダイゼーションで顕著に変動することができ、プローブ濃度により調節されることができる。ハイブリダイゼーション後に、試料は、1回以上のストリンジェントな洗浄に付されて、過剰及び非特異的に結合したプローブを除去する。最後に、プローブは、信号発生基がプローブに直接付着される場合は直接的に、又は、信号増幅の有無により間接的に、のいずれかで検出される。検出は、各種の技術、例えば、制限されず、手動での観察、フィルム又は他の記録装置、カメラ、ビデオ録画又はそれらの組合せを使用して起こり得る。ある実施形態では、信号は、化学的不活性化による上記された方法により除去され得る。試料は、更なるRNA種について探索され得る。又は、次の工程がタンパク質検出である他の実施形態では、信号は、酸及び/又は塩基における高温加熱を含む抗原回復プロセスによる、結合したプローブの変性又は信号の不活性化による抗原回復工程中に除去され得る。

【0069】

特定の実施形態では、ついで、前述の生体試料は、抗原回復及び検出に付され得る。抗原ターゲットは、生体試料の表面上に存在し得る (例えば、組織切片の表面上の抗原)。ある実施形態では、抗原ターゲットは、生体試料の表面上には本質的に存在しない場合があり、生体試料は、表面上で利用可能なターゲットを形成するために、処理されなければならない場合がある (すなわち、抗原回復、酵素的消化又はエピトープ回復)。

【0070】

概ね、工程D~Gに示されたように、特定の実施形態では、抗原回復後に、抗原は、先に規定されたように、結合剤によるハイブリダイゼーションに付される。特定の実施形態では、結合剤は、抗原に結合する抗体を含む。適切な抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体、例えば、二重特異的抗体又は、ターゲット抗原に特異的に結合する限りにおいて抗体フラグメントを含み得る。ある実施形態では、本明細書に開示された方法は、免疫組織化学 (IHC) に使用され得る。免疫化学は、組織又は細胞についての情報 (例えば、疾患細胞対正常細胞) を提供するために、抗原ベース結合剤にターゲット抗原を結合させる工程を含み得る。本明細書に開示された方法に結合剤として適切な抗体 (及び対応する疾患/疾患細胞) の例としては、制限されず、抗-エストロゲン受容体抗体 (乳ガン)、抗-プロゲステロン受容体抗体 (乳ガン)、抗-p53抗体 (

10

20

30

40

50

複数のガン)、抗 - Her - 2 / neu 抗体 (複数のガン)、抗 - EGF R 抗体 (上皮増殖因子、複数のガン)、抗 - カテプシン D 抗体 (乳ガン及び他のガン)、抗 - Bcl - 2 抗体 (アポトーシス性細胞)、抗 E - カドヘリン抗体、抗 - CA 125 抗体 (卵巣ガン及び他のガン)、抗 - CA 15 - 3 抗体 (乳ガン)、抗 - CA 19 - 9 抗体 (結腸ガン)、抗 - c - erb B - 2 抗体、抗 - P - 糖タンパク質抗体 (MDR、多剤耐性)、抗 - CE A 抗体 (ガン胎児抗原)、抗 - 網膜芽細胞腫タンパク質 (Rb) 抗体、抗 - ras ガンタンパク質 (p21) 抗体、抗 - Lewis X (CD15とも呼ばれる) 抗体、抗 - Ki - 67 抗体 (細胞増殖)、抗 - PCNA (複数のガン) 抗体、抗 - CD3 抗体 (T細胞)、抗 - CD4 抗体 (ヘルパーT細胞)、抗 - CD5 抗体 (T細胞)、抗 - CD7 抗体 (胸腺細胞、未成熟T細胞、NKキラー細胞)、抗 - CD8 抗体 (サブレッサT細胞)、抗 - CD9 / p24 抗体 (ALL)、抗 - CD10 (CALLAとも呼ばれる) 抗体 (一般的な急性リンパ性白血病)、抗 - CD11c 抗体 (単球、顆粒球、AML)、抗 - CD13 抗体 (骨髄性単球、AML)、抗 - CD14 抗体 (成熟単球、顆粒球)、抗 - CD15 抗体 (ホジキン病)、抗 - CD19 抗体 (B細胞)、抗 - CD20 抗体 (B細胞)、抗 - CD22 抗体 (B細胞)、抗 - CD23 抗体 (活性化B細胞、CLL)、抗 - CD30 抗体 (活性化T及びB細胞、ホジキン病)、抗 - CD31 抗体 (血管新生マーカー)、抗 - CD33 抗体 (骨髄細胞、AML)、抗 - CD34 抗体 (内皮幹細胞、間質腫瘍)、抗 - CD35 抗体 (樹状細胞)、抗 - CD38 抗体 (プラズマ細胞、活性化T、B及び骨髄細胞)、抗 - CD41 抗体 (血小板、巨核球)、抗 - LCA / CD45 抗体 (白血球共通抗原)、抗 - CD45RO 抗体 (ヘルパー、誘導性T細胞)、抗 - CD45RA 抗体 (B細胞)、抗 - CD39, CD100 抗体、抗 - CD95 / Fas 抗体 (アポトーシス)、抗 - CD99 抗体 (ユーイング肉腫マーカー、MIC2 遺伝子産物)、抗 - CD106 抗体 (VCAM - 1; 活性化された内皮細胞)、抗 - ユビキチン抗体 (アルツハイマー病)、抗 - CD71 (トランスフェリン受容体) 抗体、抗 - c - myc (ガンタンパク質及びハプテン) 抗体、抗 - サイトケラチン (トランスフェリン受容体) 抗体、抗 - ビメンチン (内皮細胞) 抗体 (B及びT細胞)、抗 - HPVタンパク質 (ヒトパピローマウイルス) 抗体、抗 - カッパ軽鎖抗体 (B細胞)、抗 - ラムダ軽鎖抗体 (B細胞)、抗 - メラノソーム (HMB45) 抗体 (メラノーマ)、抗 - 前立腺特異的抗体 (PSA) 抗体 (前立腺ガン)、抗 - S - 100 抗体 (メラノーマ、唾液、グリア細胞)、抗 - tau 抗原抗体 (アルツハイマー病)、抗 - フィブリン抗体 (上皮細胞)、抗 - ケラチン抗体、抗 - サイトケラチン抗体 (腫瘍)、抗 - アルファ - カテニン (細胞膜) 又は抗 - Tn - 抗原抗体 (結腸ガン腫、腺ガン、及び膵臓ガン) があげられる。

【0071】

適切な抗体の他の特定の例は、制限されず、抗増殖性細胞核抗原、クローン pc10 (Sigma Aldrich、P8825); 抗平滑筋アルファアクチン (Sma), クローン 1A4 (Sigma、A2547); ウサギ抗ベータカテニン (Sigma、C2206); マウス抗パン・サイトケラチン、クローン PCK - 26 (Sigma、C1801); マウス抗エストロゲン受容体アルファ、クローン 1D5 (DAKO、M7047); ベータカテニン抗体、クローン 15B8 (Sigma、C7738); ヤギ抗ビメンチン (Sigma、V4630); アンドロゲン受容体クローン AR441 (DAKO、M3562); フォン・ヴィルブランド因子7、ケラチン5、ケラチン8 / 18、e - カドヘリン、Her2 / neu、エストロゲン受容体、p53、プロゲステロン受容体、ベータカテニン; ロバ抗 - マウス (Jackson Immunoresearch、715 - 166 - 150); 又はロバ抗ウサギ (Jackson Immunoresearch、711 - 166 - 152) を含み得る。

【0072】

特定の実施形態では、抗原検出プロセスは、プローブ溶液 (例えば、標識抗体溶液) を、生体試料と、十分な期間及び、ターゲット (例えば、抗原) に対する結合剤の結合に適した条件下において接触させる工程を含み得る。特定の実施形態では、直接的又は間接的な2つの検出法が使用され得る。直接的な検出では、信号発生基標識された一次抗体 (例

10

20

30

40

50

例えば、蛍光体標識された一次抗体又は酵素標識された一次抗体)は、組織試料又はメンブレンにおいて、抗原とインキュベートされ得る。抗原は、更なる抗体相互作用なしに可視化され得る。間接的な検出では、未コンジュゲートの一次抗体が、抗原とインキュベートされ、ついで、標識された二次抗体が、一次抗体に結合し得る。信号の増幅は、複数の二次抗体が一次抗体上の種々のエピトープと反応し得る際に生じ得る。ある実施形態では、2以上(多くて5つ)の(異なる種由来、標識もしくは未標識の)一次抗体が、組織試料と接触し得る。ついで、未標識の抗体は、対応する標識された二次抗体と接触され得る。別の実施形態では、一次抗体及び特異的な結合リガンド-受容体ペア(例えば、ビオチン-ストレプトアビジン)が使用され得る。一次抗体は、ペアの一員(例えば、ビオチン)に付着されることができ、他のメンバー(例えば、ストレプトアビジン)は、信号発生源又は酵素により標識され得る。二次抗体、アビジン、ストレプトアビジン又はビオチンは、それぞれ独立して、信号発生源又は酵素により標識されてもよい。

10

【0073】

一次抗体又は二次抗体が酵素標識にコンジュゲートされ得る実施形態では、蛍光信号発生源結合基質が、抗原の可視化を提供するのに添加され得る。ある実施形態では、基質及び蛍光信号発生源は、1つの分子において具現化されることができ、1つの工程に適用され得る。他の実施形態では、基質及び蛍光信号発生源は、別々の実体であることができ、1つの工程又は複数の工程において適用され得る。

【0074】

結合剤に結合された酵素は、基質と反応して、基質の化学反応を触媒し、生体試料中の蛍光信号発生源結合基質と共有結合し得る。ある実施形態では、酵素は、西洋わさびペルオキシダーゼで含むことができ、基質は、チラミンを含むことができる。西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)とチラミン基質との反応は、チラミン基質を、試料中に存在するフェノール基に共有結合させ得る。酵素-基質コンジュゲートを使用する実施形態では、信号増幅は、1つの酵素が複数の基質分子を触媒し得る際に達成され得る。ある実施形態では、本明細書に開示された方法は、間接的な検出法を使用して(例えば、一次-二次抗体を使用して)、HRP-チラミド信号増幅法を使用して、又は、両方の組合せ(例えば、間接的なHRP-チラミド信号増幅法)を使用して、低含量のターゲットを検出するのに使用され得る。

20

【0075】

特定の実施形態では、対応する信号増幅技術に相応して記載された方法内への信号増幅技術の包含は、特定のターゲットに必要なとされる感度及びプロトコルに含まれる工程数により決まり得る。

30

【0076】

信号発生源からの信号は、各種の観察又は検出システムを使用して検出され得る。使用される検出システムの性質は、使用される信号発生源の性質により決まり得る。検出システムは、電荷結合素子(CCD)検出システム、蛍光検出システム、電気的検出システム、写真フィルム検出システム、化学発光検出システム、酵素検出システム、光学検出システム、近接場検出システム又は全内部反射(TIR)検出システムを含み得る。

【0077】

1以上の前述の技術は、(結合剤と結合された、又は、酵素基質と結合された)信号発生源からの信号の1以上の特徴を観察するのに使用され得る。ある実施形態では、信号強度、信号波長、信号位置、信号頻度又は信号シフトは、1以上の前述の技術を使用して決定され得る。ある実施形態では、信号の1以上の前述の特徴が、観察、測定及び記録され得る。

40

【0078】

ある実施形態では、観察された信号は、蛍光信号であり、生体試料中のターゲットに結合したプローブは、蛍光体である信号発生源を含み得る。ある実施形態では、蛍光信号は、蛍光検出システムを使用して、蛍光波長又は蛍光強度を決定することにより測定され得る。ある実施形態では、信号は、インサイツで観察され得る。すなわち、信号は、生体試

50

料中のターゲットに対する結合剤に会合した信号発生基から直接観察され得る。ある実施形態では、信号発生基からの信号は、別々のアレイベース検出システムについての必要性を不要にして、生体試料内で分析され得る。

【 0 0 7 9 】

ある実施形態では、信号を観察する工程は、生体試料の画像をキャプチャする工程を含み得る。ある実施形態では、画像化デバイスに接続された顕微鏡が、本明細書に開示された方法に基づいて、検出システムとして使用され得る。ある実施形態では、信号発生基（例えば、蛍光体）が励起されることができ、取得された信号（例えば、蛍光信号）が、デジタル信号の形式（例えば、デジタル化された画像）で観察及び記録されることができ、同じ手順が、適切な蛍光フィルタを使用して、試料において結合した、（存在する場合）種々の信号発生基について繰り返され得る。

10

【 0 0 8 0 】

ある実施形態では、複数種類の信号が、同じ試料で観察され得る。例えば、1つのターゲットが、蛍光プローブにより検出されることができ、同じ試料中の2番目のターゲットが、発色性プローブにより検出され得る。

【 0 0 8 1 】

特定の実施形態では、抗体プローブからの信号の除去（工程G）は、生体試料を、1以上の信号発生基を選択的に修飾可能な化学剤と接触させる工程を含む。特定の実施形態では、化学剤は、蛍光信号発生基及び酵素の両方を実質的に不活性化する酸化剤である。ある実施形態では、化学剤は、本質的に、酸化剤の塩基性溶液を含み得る。

20

【 0 0 8 2 】

特定の実施形態では、化学剤に対する異なる信号発生基の感受性は、信号発生基の濃度、温度又はpHに一部決まり得る。例えば、2種類の蛍光体は、酸化剤の濃度により決まる酸化剤に対する異なる感受性を有し得る。

【 0 0 8 3 】

適切な酸化剤は、過酸化物、過ヨウ素酸ナトリウム又はオゾンから選択され得る。ある実施形態では、適切な酸化剤は、過酸化物又は過酸化物の供給源を含むことができ、塩基性溶液は、過酸化水素を含むことができる。塩基性溶液における過酸化水素の濃度は、所定期間において蛍光信号発生基を実質的に酸化するのに選択され得る。ある実施形態では、塩基性溶液における過酸化水素の濃度は、蛍光信号発生基及び酵素の両方を、所定期間において実質的に不活性化するのに選択され得る。

30

【 0 0 8 4 】

ある実施形態では、塩基性溶液は、約0.5体積%～約5体積%の範囲、約1体積%～約4体積%の範囲、又は、約1.5体積%～約3.5体積%の範囲の量で、過酸化水素を含み得る。一部の特定の実施形態では、塩基性溶液は、約3体積%の範囲の量で過酸化水素を含み得る。

【 0 0 8 5 】

ある実施形態では、工程E、F及びG：生体試料を次の（例えば、二次、三次等の）プローブと接触させる工程、信号を観察する工程及び信号発生基を退色する工程が、複数回繰り返され得る。結合、観察及び退色の工程は、各種のプローブ及び/又は信号発生基を使用して、各種のターゲットについての情報をユーザに提供するために、更なるターゲットに結合可能なn次プローブを用いて、反復的に複数回繰り返され得る。酵素に結合された結合剤がプローブとして使用され得る実施形態では、結合工程は、酵素と蛍光信号発生基に結合した酵素基質との反応を含む反応工程をさらに含み得る。

40

【 0 0 8 6 】

ある実施形態では、工程E、F及びGは、1～150回、好ましくは5～100回、又はより好ましくは5～60回繰り返され得る。ある実施形態では、一連の工程は、25～30回、又はより好ましくは2～10回繰り返され得る。ある実施形態では、一連のプローブは、生体試料の多重化された分析を取得するために、連続的な方法において、生体試料と接触され得る。ある実施形態では、一連のプローブセット（この場合、プローブセッ

50

トが、1種類のターゲット（例えば、種々のRNAターゲット又は種々のタンパク質又は種々のDNAターゲット）を標的とする2以上のプローブの混合物を含み得る。）は、生体試料の多重化分析を取得するために、連続的な方法において、生体試料と接触され得る。特定の好ましい実施形態では、混合物は、2～10個のプローブ、及び好ましくは2～5個のプローブを含む。多重化分析は、一般的には、同じ検出メカニズムを使用する生体試料中の複数のターゲットの分析を意味する。

【0087】

ある実施形態では、生体試料の成分は、信号除去、結合、（該当する場合）反応及び信号観察の工程の繰り返しサイクル後に、明らかに修飾されない。ある実施形態では、生体試料の成分は、退色工程中に明らかに修飾されない。ある実施形態では、信号除去工程中に明らかに修飾されない生体試料の成分は、ターゲットである。ある実施形態では、80%より多くのターゲットが、一連の信号除去工程において、明らかに修飾されない。ある実施形態では、95%より多くのターゲットが、明らかに修飾されない。

【0088】

特定の実施形態では、抗原検出プロセス後に、工程H、I、Jは、DNAの検出を可能にする。一般的には、方法は、試料のプロテアーゼによる処理を含む。処理時間は、試料、それが調製された方法、例えば、固定の種類、固定の長さ等、プロテアーゼ消化の温度及びプロテアーゼ自体の濃度に応じて変動し得る。プロテアーゼ処理後に、ハイブリダイゼーション緩衝液中のプローブ及び試料内のターゲットの両方が、加熱により変性されてもよく、プローブが、試料にアプライされ得る。又は、プローブ及びターゲットは、プローブが試料にアプライされた後に、互いに変性され得る。ハイブリダイゼーションは、一般的には、オーバーナイトで進行されるが、より短いハイブリダイゼーション時間を必要とするプローブが開発されてきており、ハイブリダイゼーション時間を約1時間以内に短くし得る。ハイブリダイゼーション後、ストリンジェントな洗浄が、過剰のプローブ及び非特異的に結合したプローブを除去するのに適用され得る。試料は、プローブ及び形態染色剤の信号の検出前に核を染色するために、形態染色剤により処理され得る。ある実施形態では、プレハイブリダイゼーション工程が行われ得る。他の実施形態では、プロテアーゼ処理後に、試料は、組織の形態を保存するために、固定工程に付され得る。インサイトにおけるDNA検出方法は、当該分野において周知であり、その種々のバリエーションが、Volpi & Bridgerにより、Biotechniques, 45:385-409, 2008に記載されている。同文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0089】

特定の実施形態では、核酸結合剤は、DNAターゲットと結合するのに使用され得る。核酸結合剤は、核酸ターゲットとワトソン-クリック結合を形成し得る。別の実施形態では、核酸結合剤は、核酸ターゲットとフーグスティーン結合を形成することにより、三重鎖を形成してもよい。フーグスティーン結合により結合する核酸結合剤は、そこに位置する塩基とハイブリダイズする核酸ターゲットの主溝に入り得る。上記結合剤の適切な例は、核酸の副溝及び主溝を認識し、同副溝及び主溝に結合する分子（例えば、いくつかの形式の抗生物質）を含み得る。特定の実施形態では、核酸結合剤は、ワトソン-クリック結合及びフーグスティーン結合の両方を、核酸ターゲットと形成し得る（例えば、ビスPNAプローブは、核酸に対して、ワトソン-クリック結合及びフーグスティーン結合の両方を可能である。）。

【0090】

核酸結合剤の長さは、結合特異性も決定し得る。結合剤と核酸ターゲットとの間の1つのミスマッチのエネルギーコストは、より長いものより、より短い配列について相対的に高くあり得る。ある実施形態では、より小さい核酸結合剤のハイブリダイゼーションは、より長いプローブが、ミスマッチをより受け入れることができ、条件に応じて核酸に結合し続けることができる場合、より長い核酸プローブのハイブリダイゼーションより特異的であり得る。特定の実施形態では、より短い結合剤は、所定の温度及び塩濃度において、より低い結合安定性を示し得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 1 】

短い配列と結合するのにより高い安定性を示し得る結合剤が使用され得る。例えば、特定の実施形態では、ビスPNAが使用され得る。ある実施形態では、核酸結合剤は、約4ヌクレオチドから数千塩基の範囲、好ましくは12~1000ヌクレオチド、及びより好ましくは12~400ヌクレオチドの長さを有し得る。ある実施形態では、核酸結合剤は、約1000ヌクレオチドより大きい範囲の長さを有し得る。核酸結合剤の長さにかかわらず、結合剤の全てのヌクレオチド残基は、核酸ターゲット中の相補なヌクレオチドにハイブリダイズしない場合がある。例えば、結合剤は、長さが50ヌクレオチド残基を含むことができ、それらのヌクレオチド残基の25個のみが、核酸ターゲットにハイブリダイズし得る。ある実施形態では、ハイブリダイズし得るヌクレオチド残基は、互いに連続的であり得る。核酸結合剤は、一本鎖であることができ、又は、二次構造を含み得る。ある実施形態では、生体試料は、細胞又は組織の試料であることができ、生体試料は、核酸結合剤を使用するインサイツハイブリダイゼーション(ISH)に付されることができる。ある実施形態では、組織試料は、試料からの所望の情報を取得するために、免疫組織化学(IHC)に加えて、インサイツハイブリダイゼーションに付され得る。

10

【 0 0 9 2 】

さらに他の実施形態では、方法は、1以上の対照プローブを、試料中の1以上のターゲットに結合させる工程をさらに含む。方法は、結合した蛍光プローブからの信号及び対照プローブからの対照信号を観察する工程をさらに含む。結合した蛍光プローブは、蛍光プローブを実質的に不活性化し、対照プローブを不活性化しない不活性化剤に曝される。方法は、1以上の次の蛍光プローブを、試料中に存在する1以上のターゲットに結合させ、続けて、次の結合した蛍光プローブからの信号を観察する工程をさらに含む。

20

【 0 0 9 3 】

対照プローブは、不活性化剤に対して安定である信号発生基を含んでもよいし、又は、信号発生基の信号生成特性が、不活性化剤と接触した際に、実質的に影響を受けない。信号発生基は、放射性同位体又は、不活性化剤に安定な蛍光体を含み得る。適切な放射性同位体は、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 又は ^{131}I を含み得る。適切な蛍光体は、DAPIを含み得る。

【 0 0 9 4 】

ある実施形態では、最後のプローブハイブリダイゼーション及び検出工程において、信号発生基は、種々の質量検出器、例えば、金属の安定同位体又は非退色性発色団により検出され得る1以上の安定した信号発生基を含み得る。

30

【 0 0 9 5 】

ある実施形態では、適切な信号発生基は、結合剤に結合されて、対照プローブを形成し得る。例えば、放射性標識は、抗体に結合されて、対照プローブを形成することができ、抗体は、生体試料中に存在する1以上のターゲット抗原に結合し得る。他の実施形態では、適切な信号発生基は、試料中の1以上のターゲットに結合可能であることができ、検出可能な信号を提供可能でもあり得る。信号は、不活性化剤の存在において安定である。例えば、安定な対照プローブは、DAPIであり得る。DAPIは、試料中の核酸に結合可能であり、不活性化剤に安定な蛍光信号を提供可能でもある。

40

【 0 0 9 6 】

ある実施形態では、対照プローブは、反復的な染色工程に対するターゲットの安定性の指標を提供するために、本明細書に開示された方法に使用され得る。例えば、対照プローブは、試料中の公知のターゲットに結合されることができ、対照からの信号が、観察及び定量化をされることができる。ついで、対照信号は、不活性化剤に対するターゲット又は結合剤の安定性の指標を提供するために、反復的な染色工程中にモニターされ得る。ある実施形態では、対照信号の定量測定、例えば、信号強度は、反復的な探索工程後の試料中に存在するターゲットの量を定量化するのにモニターされ得る。

【 0 0 9 7 】

特定の実施形態では、対照プローブは、所望の試料の定量的な情報、例えば、試料中の

50

ターゲット濃度又は試料中のターゲットの分子量を取得するのに使用され得る。特定の実施形態では、公知の濃度又は分子量を有する対照ターゲットは、プロットング技術において、所望の試料と共に負荷され得る。対照プローブは、対照ターゲットに結合され、対照信号が観察され得る。ついで、対照信号は、所望の試料から観察された信号と相関され得る。

【0098】

特定の実施形態では、対照プローブは、反復的な探索工程から取得された複数の分子情報及び、例えば、形態染色剤、例えば、D A P Iを使用して取得された形態情報を共に登録するのを提供するのに使用され得る。

【0099】

ある実施形態では、方法は、複数の蛍光画像を、取得された明視野形態画像、例えば、H及びEを使用して取得された画像と共に登録する工程を含み得る。ある実施形態では、反復的な探索工程に使用されるプローブは、H及びE画像と共に登録するのに使用され得る共通の区画情報を有し得ない。対照プローブ、例えば、D A P Iの核染色は、明視野画像におけるヘマトキシリンにより染色された核と、蛍光画像とを共に登録するのに使用され得る。蛍光画像及び明視野画像は、2つのカテゴリー：強度系技術及び特性系技術にグループ化され得る画像登録アルゴリズムを使用して共に登録され得る。

【0100】

ある実施形態では、生体試料は、第1のプローブ又はその後のプローブとの接触工程前、最中又は後に、形態染色剤と接触され得る。形態染色剤は、細胞種又は疾患状態の特定を容易にするために、種々の細胞区画を染色し得る染料を含み得る。ある実施形態では、形態染色剤は、プローブにおける信号発生基を容易に区別可能であり得る。すなわち、染色剤は、プローブからの信号と重なり得る信号を発生し得ない。例えば、蛍光形態染色剤について、形態染色剤からの信号は、プローブに使用される蛍光体と同じ波長において自己蛍光し得ない。

【0101】

形態染色剤は、前述の工程のいずれか1つの前、最中又は後に、生体試料と接触され得る。特定の実施形態では、形態染色剤は、第1のプローブ接触工程と共に、生体試料と接触され得る。ある実施形態では、形態染色剤は、試料と化学剤とが接触する前、及び、第1のプローブがターゲットに結合した後に、生体試料と接触され得る。ある実施形態では、形態染色剤は、試料と化学剤との接触及び信号の修飾後に、生体試料と接触され得る。

【0102】

さらに他の実施形態では、形態染色剤は、第2のプローブ接触工程と共に、生体試料と接触され得る。ある実施形態では、生体試料は、第2のプローブをターゲットに結合させた後に、形態染色剤と接触され得る。ある実施形態では、形態染色剤が信号発生基からの蛍光信号についてのバックグラウンドノイズをもたらし得る場合、形態染色剤は、探索、不活性化及び再探索工程後に、生体試料と接触され得る。例えば、形態染色剤、例えば、H及びEは、本明細書に開示された方法の後に、連続的に画像化及び登録をされ得る。

【0103】

ある実施形態では、発色団、蛍光体、酵素又は酵素基質は、形態染色剤として使用され得る。形態染色剤として使用され得る発色団の適切な例（及び、その標的細胞、細胞内区画又は細胞区画）は、制限されず、エオシン（アルカリ細胞区画、細胞質）、ヘマトキシリン（核酸）、オレンジG（赤血球、脾臓及び脳下垂体の細胞）、ライトグリーンSF（コラーゲン）、ロマノウスキー-ギムザ（細胞形態全体）、May-Grunwald（血球）、ブルー対比染色（Trevigen）、エチルグリーン（CAS）（アミロイド）、Feulgen-ナフトールイエローS（DNA）、ギムザ（種々の細胞区画を差次的に染色）、メチルグリーン（アミロイド）、ピロニン（核酸）、ナフトール-イエロー（赤血球）、ナチュラルレッド（核）、パパニコロー染色剤（ヘマトキシリン、エオシンY、オレンジG及びピスマルクブラウン混合物の混合物（細胞形態全体））、レッド対比染色B（Trevigen）、レッド対比染色C（Trevigen）、シリウスレッド

10

20

30

40

50

(アミロイド)、Feulgen試薬(パラローズアニリン)(DNA)、ガロシアニククロム-アルミニウム(DNA)、ガロシアニククロム-アルミニウム及びナフトールイエローS(DNA)、メチルグリーン-ピロニンY(DNA)、チオニン-Feulgen試薬(DNA)、アクリジンオレンジ(DNA)、メチレンブルー(RNA及びDNA)、トルイジンブルー(RNA及びDNA)、アルシアンブルー(炭水化物)、ルテニウムレッド(炭水化物)、スーダンブラック(脂質)、スーダンIV(脂質)、オイルレッド-O(脂質)、Van Gieson'sトリクロム染色(酸性フクシンとピクリン酸との混合物)(筋肉細胞)、マッソントリクロム染色(ヘマトキシリン、酸性フクシン及びライトグリーンの混合物)(コラーゲン、細胞質、核小体を差次的に染色)、アルデヒドフクシン(エラスチン繊維)又はワイゲルト染色(細網線維とコラーゲン繊維とを区別)を含み得る。

10

【0104】

適切な蛍光形態染色剤及び該当する場合、その標的細胞、細胞内区画又は細胞区画の例は、制限されず、4',6-ジアミジノ-2-フェノールインドール(DAPI)(核酸)、エオシン(アルカリ細胞成分、細胞質)、ヘキスト33258及びヘキスト33342(2つのビスベンズイミド)(核酸)、ヨウ化プロピジウム(核酸)、スペクトルオレンジ(核酸)、スペクトルグリーン(核酸)、キナクリン(核酸)、フルオレセイン-ファルロイジン(アクチン繊維)、クロモマイシンA3(核酸)、アクリフラビン-Feulgen反応(核酸)、オーラミンO-Feulgen反応(核酸)、臭化エチジウム(核酸)、ニッスル染色(神経)、高親和性DNA蛍光体、例えば、POPO、BOBO、YOYO及びTOYO等ならびに、DNA結合タンパク質、例えば、ヒストンに融合した緑色蛍光タンパク質、ACMA、キノクリン及びアクリジンオレンジを含み得る。

20

【0105】

適切な酵素及びその主な細胞位置又は活性の例は、制限されず、ATPase(筋肉繊維)、コハク酸デヒドロゲナーゼ(ミトコンドリア)、シトクロムcオキシダーゼ(ミトコンドリア)、ホスホリラーゼ(ミトコンドリア)、ホスホフルクトキナーゼ(ミトコンドリア)、アセチルコリンエステラーゼ(神経細胞)、ラクターゼ(小腸)、酸ホスファターゼ(リソソーム)、ロイシンアミノペプチダーゼ(肝細胞)、デヒドロゲナーゼ(ミトコンドリア)、ミオアデニル酸デアミナーゼ(筋肉細胞)、NADHジアホラーゼ(赤血球)及びスクラーゼ(小腸)を含み得る。

30

【0106】

特定の実施形態では、形態染色剤は、不活性化剤に対して安定であり得る。すなわち、形態染色剤の信号生成特性は、不活性化剤により実質的に影響を受け得ない。ある実施形態では、生体試料が同時にプローブ及び形態染色剤により染色され得る場合、プローブからの信号を修飾するための不活性化剤の適用は、形態染色剤からの信号を修飾し得ない。ある実施形態では、形態染色剤は、反復的な探索工程から取得された分子情報及び形態染色剤から取得された形態情報の共登録に対する対照として使用され得る。

【0107】

タンパク質、RNA及びDNAの検出を含む本明細書に開示された方法は、特定の方法において、ターゲットに物理的に結合する結合剤の使用を概ね含む。なお、ある実施形態では、結合剤は、十分な特異性によりターゲットに結合し得る。すなわち、結合剤は、それが任意の他の分子に結合するより高い親和性によりターゲットに結合し得る。ある実施形態では、結合剤は、他の分子に結合してもよいが、結合は、非特異的結合がバックグラウンドレベルであり得るか、又は、バックグラウンドレベルに近くあり得るように、であり得る。ある実施形態では、所望のターゲットについての結合剤の親和性は、他の分子についてのその親和性より、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍以上の範囲であり得る。ある実施形態では、最も高い特異的な親和性を有する結合剤が使用されるが、それらは、ターゲットについての最も高い親和性を有するものでなくてもよい。

40

【0108】

ある実施形態では、ターゲットと結合剤との間の結合は、物理的結合により影響を受け

50

得る。物理的結合は、非共有相互作用を使用して達成された結合を含み得る。非共有相互作用は、制限されず、疎水性の相互作用、イオン性の相互作用、水素結合の相互作用又は親和性の相互作用（例えば、ビオチン - アビジン又はビオチン - ストレプトアビジンの複合体化）を含み得る。ある実施形態では、ターゲット及び結合剤は、物理的結合をもたらす2つの間の特異的認識を生じさせる、その表面上又はキャビティ内に領域を有し得る。ある実施形態では、結合剤は、その分子形状の一部の相互嵌合に基づいて、生物学的ターゲットに結合し得る。

【0109】

結合剤及びその対応するターゲットは、結合ペアと考えられ得る。その非限定的な例としては、免疫型結合ペア、例えば、抗原/抗体、抗原/抗体フラグメント又はハプテン/抗ハプテン；非免疫型結合ペア、例えば、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、葉酸/葉酸結合タンパク質、ホルモン/ホルモン受容体、レクチン/特定の炭水化物、酵素/酵素、酵素/基質、酵素/基質類似体、酵素/擬基質（酵素活性により触媒され得ない基質類似体）、酵素/補酵素、酵素/モジュレータ、酵素/阻害剤又はビタミンB12/内因子があげられる。結合ペアの他の適切な例は、相補な核酸フラグメント（例えば、DNA配列、RNA配列、LNA配列及びPNA配列）；プロテインA/抗体；プロテインG/抗体；核酸/核酸結合タンパク質；又はポリヌクレオチド/ポリヌクレオチド結合タンパク質を含み得る。

10

【0110】

ある実施形態では、結合剤は、配列又は構造特異的な結合剤であることができ、この場合、結合剤により認識及び結合されるターゲットの配列又は構造は、そのターゲットに対して十分固有であり得る。

20

【0111】

ある実施形態では、結合剤は、構造特異的であり、ターゲットの一次、二次又は三次構造を認識し得る。ターゲットの一次構造は、その原子組成の特異性及びそれらの原子を結合させる化学結合（例えば、立体化学）、例えば、タンパク質におけるアミノ酸の直線配置の種類及び性質を含み得る。ターゲットの二次構造は、生体分子のセグメントの全体的な三次元形状を意味し得る。例えば、タンパク質について、二次構造は、離れたアミノ酸が互いに近位にもたらされ得る、ペプチド「骨格」鎖を種々のコンフォメーションにフォールディングすることを意味し得る。二次構造の適切な例は、制限されず、アルファヘリックス、ベータブリーツシート又はランダムコイルを含み得る。ターゲットの三次構造は、その三次元構造全体であり得る。ターゲットの四次構造は、1以上の他のターゲット又は高分子とのその非共有相互作用（例えば、タンパク質相互作用）により形成された構造であり得る。四次構造の例は、ヘモグロビンを形成するための、4つのグロビンタンパク質サブユニットにより形成された構造であり得る。本発明の実施形態に基づく結合剤は、前述の構造のいずれかに特異的であり得る。

30

【0112】

構造特異的結合剤の例は、タンパク質ターゲットに結合し得るタンパク質特異的分子を含み得る。適切なタンパク質特異的分子の例は、抗体及び抗体フラグメント、核酸（例えば、タンパク質ターゲットを認識するアプタマー）又はタンパク質基質（非触媒性）を含み得る。

40

【0113】

ある実施形態では、結合剤は、配列特異的であり得る。配列特異的結合剤は、核酸を含むことができ、結合剤は、ターゲットにおけるヌクレオチド又はその誘導体の特定の直線的配置を認識可能であり得る。ある実施形態では、直線的配置は、結合剤中の対応する相補なヌクレオチドにそれぞれ結合し得る連続的なヌクレオチド又はその誘導体を含み得る。別の実施形態では、配列は、プローブ上に対応する相補な残基を有し得ない1つ、2つ又はそれ以上のヌクレオチドが存在し得る場合、連続的でない場合がある。核酸結合剤の適切な例は、制限されず、DNA又はRNAのオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含み得る。ある実施形態では、適切な核酸は、核酸類似体、例えば、ジオキシゲニン d

50

C T P、ピオチン d c T P - 7 - アザグアノジン、アジドチミジン、イノシン又はウリジンを含み得る。

【 0 1 1 4 】

結合剤及びターゲットの種類にかかわらず、タンパク質、DNA及びRNAの検出において、結合剤とターゲットとの間の結合特異性は、結合条件（例えば、相補な核酸の場合には、ハイブリダイゼーション条件）によっても影響を受け得る。適切な結合条件は、pH、温度又は塩濃度の1以上の調節により実現され得る。

【 0 1 1 5 】

結合剤は、内在的に標識されることができ（結合剤の合成中に付着された信号発生基又は酵素）、又は、外来的に標識されることができ（後の工程中に付着された信号発生基又は酵素）。例えば、タンパク質系結合剤について、内在的に標識された結合剤は、標識されたアミノ酸を使用することにより調製され得る。同様に、内在的に標識された核酸は、核酸の伸長中に直接的に信号発生基標識されたヌクレオチドを包含する方法を使用して合成され得る。ある実施形態では、結合剤は、信号発生基又は酵素が後の段階で包含され得るような方法において合成され得る。例えば、この後の標識化は、ペプチド鎖のアミノ酸内の活性なアミノ基又はチオール基の導入による化学的手段により達成され得る。ある実施形態では、結合剤、例えば、タンパク質（例えば、抗体）又は核酸（例えば、DNA）は、適切な化学を使用して直接化学的に標識されてもよい。

【 0 1 1 6 】

ある実施形態では、より高い特異性、又は、特定の実施形態では、信号の増幅を提供し得る、結合剤の組合せが使用され得る。例えば、ある実施形態では、結合剤のサンドイッチが使用され得る。この場合、第1の結合剤は、ターゲットに結合し、二次結合を提供するのに機能し得る。この場合、二次結合剤は、標識を含んでもよいし、又は、含まなくてもよい。二次結合剤は、三次結合メンバーが標識を含み得る場合、（必要であれば）三次結合をさらに提供し得る。

【 0 1 1 7 】

結合剤組合せの適切な例は、一次抗体、二次抗体、相補な核酸又は他のリガンド - 受容体ペア（例えば、ピオチン - ストレプトアビジン）を含み得る。適切な結合剤ペアのいくつかの特定の例は、c - m y c エピトープとの組換え発現タンパク質に対するマウス抗 - m y c ; H i s - タグエピトープとの組換えタンパク質に対するマウス抗 - H i s G、エピトープタグとの組換えタンパク質に対するマウス抗 - x p r e s s、ヤギ I g G 一次分子に対するウサギ抗ヤギ、核酸配列に対する相補な核酸配列；チオレドキシン融合タンパク質に対するマウス抗 - チオ、融合タンパク質に対するウサギ抗 - G F P、 - D - ガラクトースに対するジャカリン；及び、炭水化物結合タンパク質に対するメリビオース、糖、ニッケル結合マトリクス又はヘパリンを含み得る。

【 0 1 1 8 】

ある実施形態では、一次抗体と二次抗体との組合せは、結合剤として使用され得る。一次抗体は、ターゲットの特定領域に結合可能であり得る。二次抗体は、一次抗体に結合可能であり得る。二次抗体は、一次抗体に結合する前に、信号発生基又は酵素に付着されてもよいし、又は、後の工程において信号発生基又は酵素に結合可能であり得る。別の実施形態では、一次抗体及び特定の結合リガンド - 受容体ペア（例えば、ピオチン - ストレプトアビジン）が使用され得る。一次抗体は、ペアの一方のメンバー（例えば、ピオチン）に付着され得る。他方のメンバー（例えば、ストレプトアビジン）は、信号発生基又は酵素により標識され得る。二次抗体、アビジン、ストレプトアビジン又はピオチンは、それぞれ独立して、信号発生基又は酵素により標識され得る。

【 0 1 1 9 】

ある実施形態では、本明細書に開示された方法は、免疫染色手法に使用され得る。一次抗体は、ターゲットタンパク質に特異的に結合するのに使用され得る。二次抗体は、一次抗体に特異的に結合することにより、必要に応じて、一次抗体とその後の試薬（例えば、信号発生基又は酵素）との間のブリッジを形成するのに使用され得る。例えば、一次抗体

10

20

30

40

50

は、マウス I g G (マウスにおいて作製された抗体)であることができ、対応する二次抗体は、マウス I g G 中の領域に結合可能な領域を有する、ヤギ抗 - マウス (ヤギにおいて作製された抗体)であることができる。

【 0 1 2 0 】

ある実施形態では、複数の二次抗体が一次抗体上のエピトープに結合し得る場合に、信号増幅が取得され得る。免疫染色手法において、一次抗体は、手法に使用される第 1 の抗体であることができ、二次抗体は、手法に使用される第 2 の抗体であることができる。ある実施形態では、一次抗体は、免疫染色手法に使用される抗体のみであり得る。

【 0 1 2 1 】

本明細書に開示された方法に適した信号発生基の種類は、各種の要因、例えば、行われる分析の性質、使用されるエネルギー源及び検出器の種類、使用される不活性化剤の種類、結合剤の種類、ターゲットの種類又は結合剤と信号発生基との間の付着方式 (例えば、開裂性又は非開裂性)により決まり得る。

10

【 0 1 2 2 】

適切な信号発生基は、検出可能な信号を提供可能な分子又は化合物を含み得る。信号発生基は、エネルギー源又は電流との相互作用に基づく特徴的な信号を提供し得る。エネルギー源は、電磁気照射源及び蛍光励起源を含み得る。電磁気照射源は、任意の波長、例えば、可視、赤外及び紫外の電磁気エネルギーを提供可能であり得る。電磁気照射は、直接的な光源の形式でもよいし、又は、発光性化合物、例えば、ドナー蛍光体により発せられ得る。蛍光励起源は、ソース蛍光を形成可能でもよいし、又は、光放射 (すなわち、電磁気照射、直接的な電場、温度、物理的接触又は機械的崩壊)を生じさせてもよい。適切な信号発生基は、各種の方法、例えば、光学測定 (例えば、蛍光)、電気導電性又は放射活性により検出され得る信号を提供し得る。適切な信号発生基は、例えば、発光、エネルギー授与、蛍光、放射性又は消光性であり得る。

20

【 0 1 2 3 】

適切な信号発生基は、それが例えば結合剤に結合された構成について、立体的及び化学的に適合可能であり得る。さらに、適切な信号発生基は、ターゲットに対する結合剤の結合と干渉しないことができ、結合剤の結合特異性に影響を及ぼさないこともできる。適切な信号発生基は、本質的に有機又は無機であり得る。ある実施形態では、信号発生基は、化学的なペプチド又は核酸の性質のものであり得る。

30

【 0 1 2 4 】

適切な信号発生基は、直接的に検出可能であり得る。直接的に検出可能な部分は、信号を発するその能力により直接的に検出され得るもの、例えば、別のより低い特徴的な波長の光による励起後に特定波長の光を発する、及び/又は、特定波長の光を吸光する蛍光標識等であり得る。

【 0 1 2 5 】

本明細書に開示された方法に基づく適切な信号発生基は、化学剤の適用についての操作に受け入れられ得る。ある実施形態では、信号発生基は、不活性化剤に対する暴露において、化学的に破壊され得る場合がある。化学的破壊は、信号発生基の完全な崩壊又は信号発生基の信号発生成分の修飾を含み得る。信号発生成分の修飾は、信号発生特性の修飾をもたらし得る、任意の化学的修飾 (例えば、付加、置換又は除去)を含み得る。例えば、コンジュゲートした信号発生基を非コンジュゲートにすることは、信号発生基の発色特性の破壊をもたらし得る。同様に、蛍光信号発生基における蛍光阻害官能基の置換は、その蛍光特性の修飾をもたらし得る。ある実施形態では、特定の化学剤による不活性化に抵抗性の 1 以上の信号発生基は、提供された方法における対照プローブとして使用され得る。

40

【 0 1 2 6 】

ある実施形態では、信号発生基は、発光性分子、放射性同位体 (例えば、 ^{32}P 又は ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 及び ^{131}I)、光学又は電子密度マーカー、ラマン - 活性タグ、電子スピン共鳴分子 (例えば、ニトロキシラジカル等)、電荷転移分子 (すなわち、電荷変換分子)、半導体ナノ結晶、半導体ナノ粒子、コロイド金ナノ結晶、マイクロビーズ、磁性ビーズ

50

、常磁性粒子又は量子ドットから選択され得る。

【0127】

ある実施形態では、信号発生基は、発光性分子を含み得る。発光性分子は、特定波長の光の照射に反応して光を発し得る。発光性分子は、発光（励起に基づく材料による電磁気照射の非熱的放射）、リン光（照射吸収の結果としての遅延した発光）、化学発光（化学反応による発光）、蛍光又は偏光蛍光による光を吸光及び発光可能であり得る。

【0128】

ある実施形態では、信号発生基は、本質的に、蛍光体を含み得る。ある実施形態では、信号発生基は、例えば、免疫組織化学分析において、本質的に、抗体に付着した蛍光体を含み得る。一次抗体にコンジュゲートされ得る適切な蛍光体としては、制限されず、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ベクターレッド、ELF（酵素標識フルオレセイン）、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy7、FluorX、カルセイン、カルセイン-AM、CRYPTOFLUOR、オレンジ（42kDa）、タンジェリン（35kDa）、ゴールド（31kDa）、レッド（42kDa）、クリムゾン（40kDa）、BHMP、BHDMAP、Br-オレゴン、Luciferイエロー、アレクサ染料ファミリー、N-[6-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル)アミノ]カプロイル（NBD）、BODIPY、ホウ素ジピロメテンジフルオリド、オレゴングリーン、MITOTRACKERレッド、フィコエリスリン、フィコピロプロテインBPE（240kDa）、RPE（240kDa）、CPC（264kDa）、APC（104kDa）、スペクトルブルー、スペクトルアクア、スペクトルグリーン、スペクトルゴールド、スペクトルオレンジ、スペクトルレッド、赤外（IR）染料、サイクリックGDP-リボース（cGDP R）、Calcofluorホワイト、リサミン、ウンベリフェロン、チロシン又はトリプトファンがあげられる。ある実施形態では、信号発生基は、本質的には、シアニン染料を含み得る。ある実施形態では、信号発生基は、本質的に、1以上のCy3染料、Cy5染料又はCy7染料を含み得る。

【0129】

ある実施形態では、信号発生基は、FRETペアの一部であり得る。FRETペアは、互いに近位に位置した場合、FRETを受けて、検出可能な信号を発生又は消去可能な2つの蛍光体を含む。ドナーのいくつかの例は、アレクサ488、アレクサ546、BODIPY493、Oyster556、Fluor（FAM）、Cy3又はTTR（Tamarra）を含み得る。アクセプタのいくつかの例は、Cy5、アレクサ594、アレクサ647又はOyster656を含み得る。

【0130】

上記されたように、1以上の前述の分子が、信号発生基として使用され得る。ある実施形態では、1以上の信号発生基が、化学的な破壊を受け入れ得ない。開裂性リンカーが、信号発生基と結合剤とを会合させるのに使用され得る。ある実施形態では、1以上の信号発生基が、信号破壊を受け入れ得ない。信号発生基は、本質的に、化学的に破壊され得る分子を含み得る。ある実施形態では、信号発生基は、酸化剤により化学的に破壊され得る蛍光体を含み得る。ある実施形態では、信号発生基は、酸化剤により化学的に破壊される、シアニン、クマリン、BODIPY、ATTO658、量子ドット又はATTO634を本質的に含み得る。ある実施形態では、信号発生基は、破壊又は消光され得る、1以上のCy3染料、Cy5染料又はCy7染料を含み得る。

【0131】

ある実施形態では、プローブは、酵素に結合した結合剤を含み得る。ある実施形態では、適切な酵素は、基質の化学反応を触媒して、試料中又は試料が結合した固体支持体に存在する受容体（例えば、フェノール基）に結合し得る反応生成物を形成する。受容体は、外因性（すなわち、試料又は固体支持体に外来的に付着した受容体）又は、内因性（試料又は固体支持体に内在的に存在する受容体）であり得る。信号増幅は、1つの酵素が基質の化学反応を触媒して、ターゲット近くの複数の信号発生基を共有結合させ得る際に達成され得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 2 】

ある実施形態では、適切な酵素は、酸化剤により不活性化され得る場合もある。適切な酵素の例としては、ペルオキシダーゼ、オキシダーゼ、ホスファターゼ、エステラーゼ及びグリコシダーゼがあげられる。適切な酵素の具体的な例としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、リパーゼ及びグルコースオキシダーゼがあげられる。ある実施形態では、酵素は、西洋わさびペルオキシダーゼ、シトクロムCペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ及びダイズペルオキシダーゼである。

【 0 1 3 3 】

ある実施形態では、結合剤及び酵素は、1つの実体、例えば、ターゲットに結合可能であり、基質の化学反応を触媒することも可能なタンパク質分子において具現化され得る。他の実施形態では、結合剤及び酵素は、別々の実体において具現化されることができ、共有結合の形成により、又は、リガンド-受容体コンジュゲートペア（例えば、ビオチン-ストレプトアビジン）を使用することにより結合され得る。

【 0 1 3 4 】

酵素基質は、使用される酵素及び、試料中又は固体支持体上での結合に利用可能なターゲットに応じて選択され得る。例えば、酵素としてHRPを含む実施形態では、基質は、置換されているフェノール（例えば、チラミン）を含み得る。チラミンに対するHRPの反応は、内因性のレポーター、電子リッチ部分（例えば、チロシンもしくはトリプトファン）又は生体試料の表面タンパク質に存在するフェノール基に結合し得る、活性化されたフェノール基質を産生し得る。別の実施形態では、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノン塩酸（MBTH）が、HRP酵素と共に基質として使用され得る。外因性の受容体、例えば、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド（DMAB）は、基質との反応前に、固体支持体又は生体試料に付着され得る。

【 0 1 3 5 】

ある実施形態では、酵素基質は、酵素との反応後に脱リン酸化され得る。脱リン酸化反応の生成物は、試料又は固体支持体における内因性又は外因性の受容体（例えば、抗体）に結合可能であり得る。例えば、酵素は、アルカリホスファターゼ（AP）を含むことができ、基質は、NADP、置換されているリン酸塩（例えば、ニトロフェニルリン酸）又はリン酸化ビオチンを含むことができる。したがって、受容体は、NAD結合タンパク質、脱リン酸化反応生成物に対する抗体（抗-ニトロフェノール）、アビジン又はストレプトアビジンを含み得る。

【 0 1 3 6 】

ある実施形態では、酵素は、 α -ガラクトシダーゼを含むことができ、基質は、フルオレセイン又はクマリンの β -ガラクトピラノシル-グルコシドを含むことができる。受容体は、脱グリコシルされた部分に対する抗体（例えば、抗-フルオレセイン又は抗-クマリン）を含み得る。ある実施形態では、複数の酵素の組合せ、例えば、HRP/APが、酵素として使用され得る。基質は、リン酸化された置換されているフェノール、例えば、リン酸化チロシンを含み得る。リン酸化された置換されているフェノールは、HRPとの反応前に、APにより脱リン酸化されて、フェノール基に結合可能な反応生成物又は電子リッチ部分系受容体を形成し得る。

【 0 1 3 7 】

酵素基質の反応生成物は、さらに、検出可能な信号を提供可能であり得る。ある実施形態では、本明細書に開示された方法に使用される酵素基質は、非発色性又は非化学発光性の基質を含み得る。すなわち、酵素と酵素基質との反応は、それ自体、検出可能な信号を生じさせ得ない。本明細書に開示された方法に使用される酵素基質は、標識として、外因性の信号発生基（例えば、蛍光体）を含み得る。信号発生基及び酵素基質は、直接的（例えば、蛍光標識を含む酵素基質）又は間接的（例えば、リガンド-受容体コンジュゲートペアを介して）に付着され得る。ある実施形態では、基質は、保護された官能基（例えば

10

20

30

40

50

、スルフヒドリル基)を含み得る。活性化された基質の受容体への結合後、官能基は、脱保護され、チオール反応性基(例えば、マレイミド又はインドアセチル)を有する信号発生基を使用して達成される信号発生基にコンジュゲートされ得る。

【0138】

ある実施形態では、標識は、西洋わさびペルオキシダーゼを含むことができ、基質は、置換されているフェノール(例えば、チラミン)から選択される。ある実施形態では、西洋わさびペルオキシダーゼは、活性化されたフェノール基質を、試料又は試料が結合した固体支持体に存在するフェノール基に共有結合させる。ある実施形態では、プローブは、HRPに結合した結合剤を含むことができ、基質は、蛍光体に結合したチラミンを含むことができる。

10

【0139】

化学剤は、信号発生基、酵素又は、(存在する場合)信号発生基と結合剤もしくは酵素基質との間の開裂性リンカーを修飾可能な1以上の化学物質を含み得る。化学剤は、固体、溶液、ゲル又は懸濁液の形式における試料と接触され得る。

【0140】

ある実施形態では、化学剤は、酸化剤、例えば、活性酸素種、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素、過酸化水素又はオゾンを含み得る。ある実施形態では、化学剤は、過酸化水素、過マンガン酸カリウム、重クロム酸ナトリウム、臭素水、ヨウ素カリウムヨウ化物又はt-ブチル過酸化水素を含み得る。

【0141】

1以上の前述の化学剤が、化学剤に対する、信号発生基、酵素、結合剤、ターゲット又は生体試料の感受性に依りて、本明細書に開示された方法に使用され得る。ある実施形態では、結合剤、ターゲット及び生体試料の完全性に本質的に影響を及ぼさない化学剤が使用され得る。ある実施形態では、結合剤とターゲットとの間の結合特異性に影響を及ぼさない化学剤が使用され得る。工程B、F及びJを参照して、特定のRNA、タンパク質又はDNAのターゲットが、検出又は観察される。ある実施形態では、工程は、試料中の1以上のターゲットの定量測定を含み得る。ある実施形態では、信号の強度値(例えば、蛍光強度)が測定されることができ、生体試料中のターゲット量に相関させることができる。ターゲット量と信号強度との間の相関は、校正標準を使用して決定され得る。ある実施形態では、第1及び第2の信号の強度値が測定され、各ターゲット量に相関されることができ、ある実施形態では、2つの信号強度を比較することにより、第1のターゲット及び第2のターゲットの(互いに対するか、又は、対照に対する)相対量が確かめられ得る。同様に、複数のターゲットが複数のプローブを用いて分析され得る場合、生体試料中の種々のターゲットの相対量が、種々の信号強度を測定することにより決定され得る。ある実施形態では、1以上の対照試料が、上記されたように使用され得る。試料中の信号の存在又は不存在を観察すること(所望の生体試料対対照)により、生体試料に関する情報が取得され得る。例えば、疾患の組織試料を正常な組織試料に対して比較することにより、疾患の組織試料中に存在するターゲットに関する情報が取得され得る。同様に、試料(すなわち、所望の試料と1以上の対照)間の信号強度を比較することにより、試料中のターゲットの発現に関する情報が取得され得る。

20

30

40

【0142】

ある実施形態では、検出工程は、試料中の2以上のターゲットを共に局在化する工程を含む。試料中のターゲットを共に局在化するための方法は、2007年3月15日に出願された、表題「System and Methods for Analyzing Images of Tissue Samples」の米国特許出願番号第11/686,649号;2006年8月7日に出願された、表題「System and Method for Co-Registering Multi-Channel Images of a Tissue Micro Array」の米国特許出願番号第11/500028号;2006年11月30日に出願された、表題「System and Methods for Scoring Images of a Tissue

50

Micro Array」の米国特許出願番号第11/606582号；2007年2月28日に出願された、表題「Automated Segmentation of Image Structures」の米国特許出願番号第11/680063号に記載されており、それぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。

【0143】

ある実施形態では、生体試料中の信号の位置が観察され得る。ある実施形態では、生体試料中の信号の局在化が、形態染色剤を使用して観察され得る。ある実施形態では、2以上の信号の相対位置が観察され得る。信号の位置は、生体試料中のターゲットの位置に関連され得る。相関は、生体試料中の種々のターゲットの局在化に関する情報を提供する。ある実施形態では、信号の強度値及び信号の位置は、生体試料中の種々のターゲットの局在化に関する情報を取得するのに相関され得る。例えば、特定のターゲットは、核対して細胞質において、又はその逆でより発現され得る。ある実施形態では、ターゲットの相対的な局在化に関する情報は、2以上の信号の位置及び強度値を比較することにより取得され得る。

10

【0144】

ある実施形態では、1以上の観察工程及び相関工程は、コンピュータを利用した手段を使用して行われ得る。信号発生源からの信号がデジタル画像の形式で保存され得る実施形態では、画像のコンピュータを利用した分析が行われ得る。ある実施形態では、画像（例えば、プローブ及び形態染色剤からの信号）が、生体試料の完全な情報、例えば、形態的情報及び相関情報を取得するために、コンピュータを利用した重ね合わせを使用して重ね合わせられ得る。

20

【0145】

ある実施形態では、1以上の前述の処理工程が自動化されることができ、自動化システムを使用して行われることができる。ある実施形態では、全ての工程が、自動化システムを使用して行われ得る。

【0146】

本明細書に開示された方法は、生物学及び医薬における分析、診断における用途及び治療用途を見出し得る。ある実施形態では、本明細書に開示された方法は、組織化学、特に免疫組織化学における用途を見出し得る。本明細書に開示された方法に基づく患者からの細胞又は組織試料の分析は、（例えば、特定の疾患を有する患者、特定の毒物に曝されている患者、又は、特定の治療もしくは臓器移植に十分応答している患者を特定するために）診断的に、及び、（例えば、おそらく特定の疾患が進行している患者、特定の治療に十分応答する患者、又は、特定の臓器移植を受け入れている患者を特定するために）予後的に使用され得る。本明細書に開示された方法は、同じ生体試料からの複数（例えば、可能性のある無限数）のターゲット（例えば、疾患マーカー）の正確で確かな分析を容易にし得る。

30

【実施例】

【0147】

組織試料の調製

ヒトの肺組織試料を、パラフィンに包埋された組織スライドとして取得した。試料は、正常な組織、前ガン状態の組織ならびに、進行段階（Pantomics、LUC961）のガン組織及び4つの全組織肺ガン試料の1つのマイクロアレイ（Wood Hudson Cancer Research Center）を含んだ。

40

【0148】

パラフィン包埋スライドを、組織をオープンのラックに対して表を上にして、及び、同ラックに対して平行にして、60 で1時間ベーキングした。ベーキング後、スライドを、キシレンにおいて、穏やかな振とうで10分間洗浄することにより脱パラフィンした。ついで、試料を、100%、95%、70%及び50%の順序で低下させた4つの濃度のエタノール溶液において洗浄することにより再水和し、続けて、1×リン酸緩衝生理食塩水（PBS、pH7.4）で洗浄した。再水和後、スライドを、1×PBSで洗浄した。

50

PBSにおける0.3% Triton X-100での10分の洗浄を、組織のメンブレン浸透のために行い、続けて、1×PBSで洗浄した。

【0149】

U6 snRNA染色

浸透後、スライドを、プレハイブリダイゼーション緩衝液(1×Exiqon緩衝液、Exiqon、miRCURY LNA(商標)マイクロRNA ISH最適化キット)により、室温で1時間インキュベートし、ついで、Exiqon緩衝液における100µlの50mM TYE665標識U6プローブ(Exiqon, Incからの特注のU6プローブ)と、Thermobriteにおいて、50でオーバーナイト、ハイブリダイズさせた。スライドを、0.5×SSC及び0.2×SSCにより、50で10分間洗浄し、ついで、0.1×SSCで簡単にすすいだ。スライドを、室温で15分間DAPI染色し、封入剤で封入した。画像を、20×対物レンズを備えるOlympusの顕微鏡において取得した。画像を、図2及び図3に示す。パネルA: DAPIで染色した核、パネルB: TYE665で染色したU6 snRNA。

10

【0150】

抗原回復

RNA検出処理後に、スライドを、二重緩衝液加熱誘導エピトープ回復により処理した。圧力鍋を使用して、スライドを、クエン酸緩衝液 pH6.0(Vector Unmasking Solution)に、圧力下において20分間曝し、ついで、熱いTris-EDTA緩衝液 pH9.0に移し、鍋において、大気圧で20分間静置させた。これを、続けて、室温に10分間冷却し、1×PBSにおいて一連の洗浄をした。

20

【0151】

ブロッキング

抗原回復後、スライドを、10% ロバ血清、3% ウシ血清アルブミン(BSA)溶液において、4でオーバーナイト、インキュベートすることにより非特異的結合に対するブロッキングをした。

【0152】

タンパク質染色

スライドを、DAPIで染色し、カバーガラスをした。タンパク質染色の前に、RNA検出に使用したものと同一視野を使用して、Cy3及びCy5のチャンネルからの自己蛍光のベースラインに対して、画像を20×で取得した。スライドを、1×PBSでカバーガラスを外し、1×PBSにおける3% BSAに希釈した、Cy3直接コンジュゲートサイトケラチン-7(Dako M7018、20µg/mL)及びCy5直接コンジュゲートEGFR(Cell Signaling 4267、20µg/mL)のカクテルで染色した。インキュベーションは、室温にて1時間実施された。インキュベーション後、1×PBSにおける一連の洗浄により、過剰の抗体を除去し、スライドをカバーガラスした。試料を画像化し(図2及び図3、パネルC: Cy5で染色したEGFR及びパネルD: Cy3で染色したサイトケラチン7)、ついで、直接コンジュゲートした染料を退色するために、塩基性のH₂O₂溶液で15分間処理した。15分後、スライドを、PBSで洗浄し、カバーガラスをした。画像を、退色後の自己蛍光のベースラインに対して、再度取得した。スライドを、Cy3直接コンジュゲートNaKATPase(Epitomic s2047、5µg/mL)及びCy5コンジュゲートIGF1R(Lifespan Biosciences LS-C82136、20µg/mL)の第2のカクテルで染色し、カバーガラスをし、再度画像化した(図2及び図3、パネルE: Cy5で染色したIGF1R及びパネルF: Cy3で染色したNaKATPase)。試料を、FISH処理の前に、2回退色した。

30

40

【0153】

DNA FISH

後のFISH染色を可能にするために、カバーガラスを、2×SSC緩衝液におけるインキュベーションにより取り外した。スライドを、核DNAへのアクセスを可能にするた

50

めにタンパク質構造を部分的に除去された0.05% ペプシンによる10分間の処理に供した。ついで、スライドを、4% ホルムアルデヒド水溶液を使用して、10分間固定し、洗浄し、EGFR用のFISHプローブ(PlatinumBright415、アクア蛍光体)、cMet(PlatinumBright550、レッド蛍光体)及び7番染色体のセントロメア(PlatinumBright495、クリーン蛍光体)を使用するハイブリダイゼーションに供し、DAPIにより対比染色した。ハイブリダイゼーションを、濃度を上昇させる一連のエタノール水溶液、続けて、100%エタノールを通過させることによる、スライドを脱水することにより行い、ついで、簡単に乾燥させた。プローブ混合物を、組織切片を含むスライドの領域にアプライし、ついで、カバーガラスで覆い、スライドを加熱及び冷却可能なスライドインキュベータに入れた。プローブ混合物を含むスライドを、DNAハイブリッドを変性させるために、80℃で10分間加熱し、37℃に冷却させた。ついで、スライドを、その温度で16時間維持した。ついで、スライドを、0.3% 界面活性剤NP-40を含む2×SSCにおいて洗浄し、0.3% NP-40を含む0.4×SSCにおいて、72℃で2分間洗浄し、続けて、DAPIにより対比染色した。次に、浸潤性腫瘍を有した組織切片の領域を、免疫蛍光工程において記録した座標を使用して画像化した。画像のセットを、ブルー、グリーン及びレッドの蛍光体及びDAPIに特異的なフィルターセットを使用して、40×で記録した(図2及び図3、パネルG: PlatinumBright550で染色したcMET、及びパネルH: PlatinumBright415で染色したEGFR遺伝子)。

10

【0154】

20

本発明は、その精神又は本質的な特徴から逸脱することなく、他の特定の形態において具現化され得る。したがって、前述の実施形態は、全ての局面において、本明細書に記載された発明を限定するよりむしろ、例示であると考慮されたい。このため、本発明の範囲は、前述の説明よりむしろ添付の特許請求の範囲により示される。したがって、特許請求の範囲の均等物の意味及び範囲内にある全ての変更は、それに包含されると意図される。本発明は、その精神又は本質的な特徴を逸脱することなく、他の特定の形態において具現化され得る。したがって、前述の実施形態は、全ての局面において、本明細書に記載された発明を限定するよりむしろ、例示であると考慮されたい。このため、本発明の範囲は、前述の説明よりむしろ添付の特許請求の範囲により示される。したがって、特許請求の範囲の均等物の意味及び範囲内にある全ての変更は、それに包含されると意図される。

30

【 図 1 】

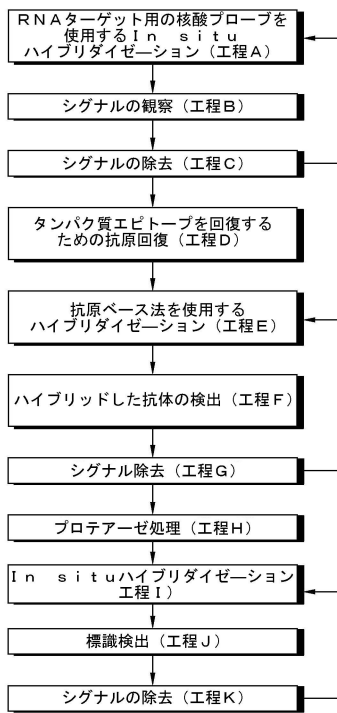
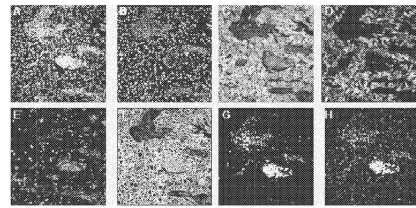
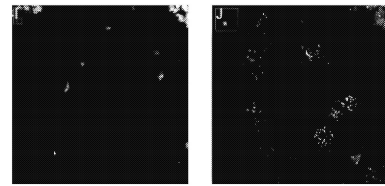


Fig. 1

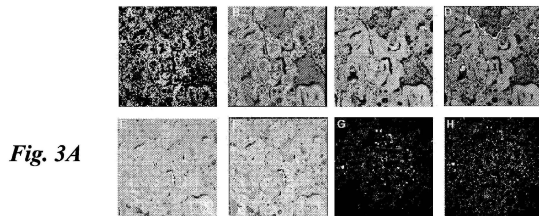
【 図 2 a 】



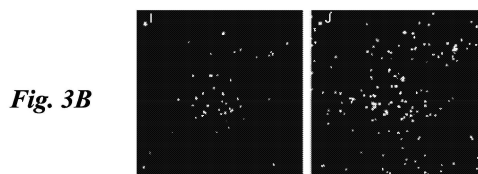
【 図 2 b 】



【 図 3 a 】



【 図 3 b 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/532 A

- (72)発明者 ガオ, ウェイ
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ジーイー・グローバル・リサーチ
- (72)発明者 ジャーデス, マイケル・ジョン
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ケイ1-5ディ39、ジーイー・グローバル・リサーチ
- (72)発明者 ジンティ, フィオナ・マリー
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ケイ15ピー39エイ、ジーイー・グローバル・リサーチ
- (72)発明者 セッポ, アンティ・エルジャス
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ジーイー・グローバル・リサーチ
- (72)発明者 コリンズ, エリザベス・マリー
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ジーイー・グローバル・リサーチ

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 小暮 道明

審判官 大宅 郁治

- (56)参考文献 特開2008-298654(JP, A)
特表2010-510493(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	检测生物样品中DNA, RNA和蛋白质的方法		
公开(公告)号	JP6499960B2	公开(公告)日	2019-04-10
申请号	JP2015523140	申请日	2013-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	通用电气公司		
申请(专利权)人(译)	通用电气公司		
当前申请(专利权)人(译)	通用电气公司		
[标]发明人	スードアヌブ ガオウエイ ジャーデスマイケルジョン ジンティフィオナマリー セツポアンティエルジャス コリンズエリザベスマリー		
发明人	スード,アヌブ ガオ,ウエイ ジャーデス,マイケル・ジョン ジンティ,フィオナ・マリー セツポ,アンティ・エルジャス コリンズ,エリザベス・マリー		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/532		
CPC分类号	C12Q1/6841 G01N33/581 G01N33/582 G01N33/6803 C12Q2521/537 C12Q1/6804 G01N33/53 C12Q2523/319 C12Q2543/10 C12Q2563/107 C12Q2565/601		
FI分类号	C12Q1/68 G01N33/48.P G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.Y G01N33/532.A		
代理人(译)	小倉 博 田中 拓人		
优先权	13/551190 2012-07-17 US		
其他公开文献	JP2015524267A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于在生物样品中搜索多个靶标的新方法。在该方法中, 靶标是DNA, RNA和蛋白质。该方法包括使与RNA靶结合的样品经历与标记的核酸探针的原位杂交反应, 观察信号, 并任选地除去信号。该方法任选地通过使用标记的核酸探针针对样品进行原位杂交反应, 抗原回收方案, 观察信号的步骤, 去除信号的步骤, 以及进行蛋白酶处理, 观察来自标记的DNA靶标的信号, 并任选地除去信号。[选图]图1

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6499960号 (P6499960)
(45) 発行日 平成31年4月10日 (2019. 4. 10)	(24) 登録日 平成31年3月22日 (2019. 3. 22)	
(5) Int. Cl. C12Q 1/68 (2018.01) G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/532 (2006.01)	F I C12Q 1/68 G01N 33/48 G01N 33/53 G01N 33/53 G01N 33/53 G01N 33/53 Y	P D M Y
(21) 出願番号 特願2015-523140 (P2015-523140)	(73) 特許権者 390041542	
(86) (22) 出願日 平成25年7月12日 (2013. 7. 12)	ゼネラル・エレクトリック・カンパニ	
(65) 公表番号 特表2015-524267 (P2015-524267A)	アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 2 3	
(43) 公表日 平成27年8月24日 (2015. 8. 24)	4 5、スケネクタディ、リバーロード、1	
(86) 国際出願番号 PCT/US2013/050218	番	
(87) 国際公開番号 W02014/014754	(74) 代理人 100137545	
(87) 国際公開日 平成26年1月23日 (2014. 1. 23)	弁理士 荒川 聡志	
審査請求日 平成28年6月29日 (2016. 6. 29)	(74) 代理人 100105588	
審判番号 不服2018-1142 (P2018-1142/J1)	弁理士 小倉 博	
審判請求日 平成30年1月29日 (2018. 1. 29)	(74) 代理人 100113974	
(31) 優先権主張番号 13/551,190	弁理士 田中 拓人	
(32) 優先日 平成24年7月17日 (2012. 7. 17)	スード, アヌブ	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(72) 発明者	
	スード, アヌブ アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 2 3 0 9、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サー クル、ジーイー・グローバル・リサーチ 最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 生体試料中のDNA、RNA及びタンパク質を検出する方法