

(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2009-530621

(P2009-530621A)

(43) 公表日 平成21年8月27日(2009.8.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y 2GO43
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P 2GO45
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64	F

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2009-500588 (P2009-500588)	(71) 出願人	507091897 アイコニシス インコーポレーテッド アメリカ合衆国コネチカット州06511 ニュー ヘブリン サイエンス パーク 5
(86) (22) 出願日	平成19年3月13日 (2007. 3. 13)	(74) 代理人	230000722 弁護士 ウオーレン・ジー・シミオール
(85) 翻訳文提出日	平成20年7月28日 (2008. 7. 28)	(72) 発明者	キルパトリック、ミッシェル アメリカ合衆国コネチカット州06107 ウエスト ハートフォード グレンブロッ ック ロード 45
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/063927	(72) 発明者	セッポ、アンチ アメリカ合衆国ニューヨーク州10461 ブロンクス セミノール アベニュー 1841
(87) 国際公開番号	W02007/106837		
(87) 国際公開日	平成19年9月20日 (2007. 9. 20)		
(31) 優先権主張番号	60/781, 888		
(32) 優先日	平成18年3月13日 (2006. 3. 13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/821, 550		
(32) 優先日	平成18年8月4日 (2006. 8. 4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共有結合フルオロフォアを使用して免疫染色およびFISHを組み合わせるための方法。

(57) 【要約】

蛍光信号の検出は、画像の形成に放射された蛍光を使用する落射蛍光顕微鏡を手段とすることができる（一方、従来の反射顕微鏡は、画像の形成に散乱光を使用する）。落射蛍光顕微鏡の励起光は、試料内の蛍光タグを励起させて蛍光タグに蛍光を放射させるために使用される。落射蛍光顕微鏡の利点は、蛍光分子が優先的に関心生物学的構造に付着されるように試料を調製でき、それによってかかる関心生物学的構造の同定が可能となることである。

実施形態において、FISH条件下で染色が安定するように、試料を免疫染色するための工程を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) その中に染色体材料を有する生体試料を、かかる生体試料の少なくとも 1 つの非染色体部分に対する親和性を有する 1 つ以上の抗体で処理するステップであって、前記抗体は、その上に導入された検出不能な反応複合体を有する、ステップと、

(b) 前記染色体材料の 1 つ以上の部分との高い配列相同性を有する蛍光タグ付き染色体プローブで、前記生体試料を処理するステップと、

(c) 前記生体試料の前記染色体材料または非染色体部分とではなく、前記抗体上の前記検出不能な反応複合体と反応する検出可能なタグで、前記生体試料を処理するステップと、

を順番に含む、方法。

10

【請求項 2】

(a) その中に染色体材料を有する生体試料を、かかる生体試料の少なくとも 1 つの非染色体部分に対する親和性を有する 1 つ以上の抗体で処理するステップであって、前記抗体は、その上に導入された検出可能な反応複合体を有する、ステップと、

(b) 前記染色体材料の 1 つ以上の部分との高い配列相同性を有する蛍光タグ付き染色体プローブで、前記生体試料を処理するステップと、

(c) 前記生体試料の前記染色体材料または非染色体部分とではなく、前記抗体上の前記検出可能な反応複合体と反応する検出不能または検出可能なタグで、前記生体試料を処理するステップと、

を順番に含む、方法。

20

【請求項 3】

生体材料を表面に固定する方法であって、

(a) 上清液の生体試料を取得し、前記試料の一部が固定される表面上に前記試料の少なくとも一部分を配置するステップと、

(b) 一定分量の前記上清を除去し、類似の分量のアルキルアルコールで置換するステップであって、前記除去および置換は、前記試料の一部を前記表面に徐々に固定するために複数回行われる、ステップと、

を含む、方法。

30

【請求項 4】

前記アルキルアルコールは、 $C_{1} - C_{12}$ アルコール、 $C_{1} - C_{6}$ アルコール、またはメタノールであってもよい前記アルキルアルコールから成る群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

密度遠心分離勾配を負荷する方法であって、

(a) 遠心分離勾配を調製するステップと、

(b) 毛細管漏斗を用いて前記遠心分離勾配に試料を適用するステップと、

を含む、方法。

40

【請求項 6】

多数の細胞内成分の同時同定方法であって、

同定される前記細胞内成分のそれぞれに特異的な抗体で、細胞の試料を免疫染色するステップと、

同定される前記細胞内成分のそれぞれを識別するように異なるフルオロフォアを含む 1 つ以上の蛍光性原位置ハイブリダイゼーションプローブで、前記細胞の試料を同時に処理するステップと、

顕微鏡システムを使用して、前記プローブによって生成された蛍光信号を可視化および定量化するステップと、

を含む、方法。

【請求項 7】

蛍光マーカを用いて生体内原位置でハイブリダイズされた核成分に関して生成された蛍光

50

性原位置ハイブリダイゼーション(「FISH」)信号を同定および列挙するための過程であって、

落射蛍光顕微鏡を使用して、前記ハイブリダイズされたFISHマーカに対応する各蛍光チャンネルにおける異なる焦点面で、複数の画像を取得するステップと、

各核に対して前記複数の画像から最良の焦点画像を選択するステップと、

前記落射蛍光顕微鏡を使用して、各核に対する前記最良の焦点画像の前記焦点面より上部および下部の複数の画像を取得するステップと、

前記画像が最も良く焦点を合わされた前記最良の焦点画像の前記焦点面より上部の1つの焦点面および下部の1つの焦点面を、各核に対して選択するステップと、

前記核の組み合わせられた画像を生成するために、前記最良の焦点画像より上部および下部の前記1つの焦点面からの前記画像と、各核の前記最良の焦点画像とを組み合わせるステップと、

背景画素を信号画素から分離し、非アーチファクトの標的に対応する事前設定サイズおよび形状基準に対応する生成信号の範囲を判断するために、各核の前記組み合わせられた画像を分析するステップと、

を含む、工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、共有結合している小分子タグを使用して、免疫染色およびFISHを組み合わせるための方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

試料の顕微分析に役立つ多くの方法が既知である。例えば、限定されないが、特定の色素は特定の細胞構造に対する親和性を有することが知られている。したがって、かかる色素は、かかる構造をさらに解明することによって分析に役立つように使用することができる。

【0003】

細胞および組織の蛍光顕微鏡検査法は、当技術分野において既知である。顕微鏡において蛍光細胞を撮像し、これらの細胞に発生する空間分布および経時変化に関する情報を抽出するための方法が開発されている。これらの方法の一部およびその応用範囲は、*American Scientist* 80(1992)、p. 322-335のTaylorらの論文に記載されている。これらの方法は、細胞内の蛍光レポーター分子の分布、量および生物化学環境の高い空間および時間分解能撮像測定のために、少数の検体を調製できるように設計および最適化されている。

【0004】

蛍光信号の検出は、画像の形成に放射された蛍光を使用する落射蛍光顕微鏡を手段とすることができる(一方、従来の反射顕微鏡は、画像の形成に散乱光を使用する)。落射蛍光顕微鏡の励起光は、試料内の蛍光タグを励起させて蛍光タグに蛍光を放射させるために使用される。落射蛍光顕微鏡の利点は、蛍光分子が優先的に関心生物学的構造に付着されるように試料を調製でき、それによってかかる関心生物学的構造の同定が可能となることである。

【0005】

頭字語「FISH」は、染色体構造を検出するために光で照射された場合に、二次信号を放射する発色団タグ(フルオロフォア)を使用する技術を参照する。FISHは、高い配列相同性を示す染色体の部分のみ結合する蛍光プローブを使用する。かかるタグは、特定の染色体および特定の染色体領域へ方向付けることができる。プローブは、その標的(ゲノム内の類似配列とではない)と特にハイブリダイズするのに十分な長さでなければならぬが、ハイブリダイゼーション過程を妨害するほど大き過ぎてはならない。通常、プローブはフルオロフォアで直接タグを付けられる。これは、例えば、ニックトランスレーシ

10

20

30

40

50

ョンまたはタグ付きヌクレオチドを使用したPCRなどの種々の方法において実行することができる。顕微鏡の検出閾値を上回るために信号増幅が必要な場合（プローブ標識効率、プローブの種類および蛍光色素などの多くの要因に依存する）、二次抗体またはストレプトアビジンはタグ分子に結合され、信号を増幅させる。

【0006】

FISH技術は、染色体異常および遺伝子マッピングを同定するために使用することができる。例えば、21番染色体のFISHプローブは、ダウン症候群の原因である過剰21番染色体、21番染色体トリソミーを有する細胞に対する「fish」を可能にする。多色DNAプローブを備えるFISHキットは市販されている。例えば、Vysis division of Abbott Laboratoriesの販売するAneuplysis Multicolor DNA Probe Kitは、中期および間期核における蛍光性原位置ハイブリダイゼーション（fluorescence in situ hybridization: FISH）を介し、羊水試料内で13番、18番、21番、XおよびY染色体の異常を対外臨床検査できるように設計されている。Aneuplysis Assay（CEP18、X、Y-アルファサテライト、LSI13および21）Multicolor Probe Panelは、18番、XおよびY染色体の動原体領域におけるアルファサテライト配列を検出するためにCEP18/X/Yプローブを、ならびに13q14領域および21q22.13から21q22.2領域を検出するためにLSI13/21プローブを使用する。解明された色の組み合わせは、正常染色体数またはトリソミーがあるかどうかを判断するために使用される。同様に、Vysis division of Abbott LaboratoriesのUroVysisキットは、膀胱癌の疑いがある血尿をともなう人物からの尿検体において、蛍光性原位置ハイブリダイゼーション（fluorescence in situ hybridization: FISH）を介し、3番、7番、17番染色体の異数性および9p21染色体遺伝子座消失を検出することによって、膀胱癌の発現および進行に関連する染色体異常を検出できるように設計されている。

【0007】

関心構造を検出するための別の工程は免疫染色である。免疫染色は、抗体を使用して生体材料を検出する実験室過程をいう。これらの抗体は、顕微鏡で見ることができるといえる蛍光化合物で標識されることが多い。例えば、生体試料内の関心タンパク質を検出する抗体は、異種宿主種（ポリクローナル抗体）または培養された免疫細胞クローン（モノクローナル抗体）によって生成される。異種タンパク質への曝露後、抗体は収集され、非常に特異的および感受性高い探知剤として使用できる。そのように生成された抗体は、関心タンパク質に直接結合されるため、「一次抗体」として知られる。特定の免疫染色剤は、単一のステップで使用でき、そこでは、一次抗体が着色剤に直接結合される。他の場合では、一次抗体は、一次抗体の構造の種特異的な部分を標的にする「二次」抗体によって標的にされる。多数の二次抗体信号が一次抗体に結合するため、後者の技術は信号が増幅されるという点で有利な場合がある。高多様性の一次抗体もまた可能となり、研究者は独自の抗体を作ることができ、着色剤自体と共役させる必要がない。最後に、種々の着色剤は、二次抗体の任意の一定の種と共役させることができ、即時供給で利用可能であることを意味する。これは、幾つかのタンパク質が共局在化され得る「二重標識」実験を可能にした。

【特許文献1】なし

【非特許文献1】American Scientist 80（1992）、p.322-335のTaylor

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従来、FISHと免疫染色技術の組み合わせは困難である。最初に免疫染色が行われる場合、その後のFISH処理は、殆どの非共有抗体と抗原の相互作用を無効にする可能性がある。同様に、FISHが最初に行われる場合、その後の抗体処理は、その低塩濃度のた

10

20

30

40

50

めに F I S H プローブを解放する可能性がある。生体試料の特定部分の免疫染色および同じ生体試料の他の領域の F I S H 染色は有利となり得るため、システムが組み合わされた免疫染色を可能にする場合および F I S H 染色が発達し得れば有利であろう。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本明細書において開示される実施形態は以下を含む。

【0010】

(a) その中に染色体材料を有する生体試料を、かかる生体試料の少なくとも1つの非染色体部分に対する親和性を有する1つ以上の抗体で処理するステップであって、該抗体は、その上に導入された検出不能な反応複合体を有する、ステップと、(b) 該染色体材料の1つ以上の部分との高い配列相同性を有する蛍光タグ付き染色体プローブで、該生体試料を処理するステップと、(c) 該生体試料の該染色体材料または非染色体部分とではなく、該抗体上の該検出不能な反応複合体と反応する検出可能なタグで、該生体試料を処理するステップと、を順番に含む、方法。該検出不能な反応複合体は、ピオチン標識タイラミドである場合があり、それと反応する該検出可能なタグは、フルオロフォアでタグしたストレプトアビジンであり得る。

10

【0011】

あるいは、(a) その中に染色体材料を有する生体試料を、かかる生体試料の少なくとも1つの非染色体部分に対する親和性を有する1つ以上の抗体で処理するステップであって、該抗体は、その上に導入された検出可能な反応複合体を有する、ステップと、(b) 該染色体材料の1つ以上の部分との高い配列相同性を有する蛍光タグ付き染色体プローブで、該生体試料を処理するステップと、(c) 該生体試料の該染色体材料または非染色体部分とではなく、該抗体上の該検出可能な反応複合体と反応する検出不能または検出可能なタグで、該生体試料を処理するステップと、を順番に含む方法が提供される。

20

【0012】

生体材料を表面に固定する方法がさらに提供され、該方法は、(a) 上清液の生体試料を取得し、該試料の一部が固定される表面上に該試料の少なくとも一部分を配置するステップと、(b) 一定分量の該上清を除去し、類似の分量のアルキルアルコールで置換するステップであって、該除去および置換は、該試料の一部を該表面に徐々に固定するために複数回行われる、ステップと、を含む。該アルキルアルコールは、 $C_1 - C_{12}$ アルコール、 $C_1 - C_6$ アルコール、またはメタノールであってもよい。

30

【0013】

密度遠心分離勾配を負荷する方法がその上さらに提供され、該方法は、

(a) 遠心分離勾配を調製するステップと、(b) 毛細管漏斗を用いて該遠心分離勾配に試料を適用するステップと、を含む。

【0014】

また、多数の細胞内成分の同時同定方法も開示され、該方法は、同定される該細胞内成分のそれぞれに特異的な抗体で、細胞の試料を免疫染色するステップと、同定される該細胞内成分のそれぞれを識別するように異なるフルオロフォアを含む1つ以上の蛍光性原位置ハイブリダイゼーションプローブで、該細胞の試料を同時に処理するステップと、顕微鏡システムを使用して、該プローブによって生成された蛍光信号を可視化および定量化するステップと、を含む。

40

【0015】

蛍光マーカを用いて生体内原位置でハイブリダイズされた核成分に関して生成された蛍光性原位置ハイブリダイゼーション(「F I S H」)信号を同定および列挙するための工程がさらに開示され、該工程は、落射蛍光顕微鏡を使用して、該ハイブリダイズされた F I S H マーカに対応する各蛍光チャンネルにおける異なる焦点面で、複数の画像を取得するステップと、各核に対して該複数の画像から最良の焦点画像を選択するステップと、該落射蛍光顕微鏡を使用して、各核に対する該最良の焦点画像の該焦点面より上部および下部の複数の画像を取得するステップと、該画像が最も良く焦点を合わされた該最良の焦点画像

50

の該焦点面より上部の1つの焦点面および下部の1つの焦点面を、各核に対して選択するステップと、該核の組み合わせられた画像を生成するために、該最良の焦点画像より上部および下部の該1つの焦点面からの該画像と、各核の該最良の焦点画像とを組み合わせるステップと、背景画素を信号画素から分離し、非アーチファクトの標的に対応する事前設定サイズおよび形状基準に対応する生成信号の範囲を判断するために、各核の該組み合わせられた画像を分析するステップと、を含む。

【0016】

本明細書において、細胞内成分の同定を可能にするために、細胞の細胞内成分を標識するための多くの技術、および細胞内成分の画像に基づいてなされる生物医学的判断を開示する。

10

【0017】

一実施形態において、細胞内成分は、同定される細胞内成分のそれぞれに特異的な抗体を含む免疫染色を使用し、同定される細胞内成分のそれぞれを識別する異なるフルオロフォアを含む1つ以上のFISHプローブでタグを付けて染色される。生成される信号は、自動顕微鏡システムによって定量化される。

【0018】

一実施形態において、蛍光マーカを用いて生体内原位置でハイブリダイズされた核成分に関して生成された蛍光性原位置ハイブリダイゼーション(「FISH」)信号を同定および列挙するための工程が開示され、該過程は、(a)落射蛍光顕微鏡を使用して、該ハイブリダイズされたFISHマーカに対応する各蛍光チャンネルに対応する異なる焦点面で、複数の画像を取得するステップと、(b)各核に対して該複数の画像から最良の焦点画像を選択するステップと、(c)該落射蛍光顕微鏡を使用して、各核に対する該最良の焦点画像の該焦点面より上部および下部の複数の画像を取得するステップと、(d)該画像が最も良く焦点を合わされた該最良の焦点画像の該焦点面より上部の1つの焦点面および下部の1つの焦点面を、各核に対して選択するステップと、(e)該核の組み合わせられた画像を生成するために、該最良の焦点画像より上部および下部の該1つの焦点面からの該画像と、該最良の焦点画像とを組み合わせるステップと、(f)背景画素を信号画素から分離し、非アーチファクトの標的に対応する事前設定サイズおよび形状基準に対応する生成信号の範囲を判断するために、各核の組み合わせられた画像を分析するステップと、を含む。

20

30

【0019】

別の実施形態において、複数の細胞内成分の同時同定方法が提供され、該方法は、(a)同定される細胞内成分のそれぞれに特異的な抗体で、細胞の試料を免疫染色するステップと、(b)同定される細胞内成分のそれぞれを識別するように異なるフルオロフォアを含む1つ以上の蛍光性原位置ハイブリダイゼーションプローブで、細胞の試料を同時に処理するステップと、(c)顕微鏡システムを使用して、プローブによって生成された蛍光信号を可視化および定量化するステップと、を含む。

【0020】

細胞内成分は、いかなる細胞成分であってもよい。例えば、細胞内成分は、発育年齢の指標であってもよい。例えば、テロメアの長さは、信号から判断することができ、細胞の年齢を判断するために使用することができる。

40

【0021】

テストは多くの顕微鏡用スライド上で実行されてもよく、かかるスライドは、その上の試料または試料上で行われるテストを記述するデジタル可読情報で随意にコード化されてもよい。

【0022】

例えば、少なくとも試料がスライド上に沈着される一領域に沿った、その上にポリエルリジンコーティングを有する顕微鏡用スライドが活用されてもよい。ポリエルリジンコーティングは、スライドへの細胞、細胞物質および他の生体材料の接着に役立つ。ポリエルリジンで被覆されたスライド部分への生体材料の適用は、スライド上に沈着される材料が配

50

置され得る少なくとも部分的に開口した上部および下部を有する壁付きチャンバの使用によって支援されてもよい。壁付きチャンバは、コードされてもよく、それとともに間在されてもよい（例えば、突端および溝構成内）顕微鏡用スライドを保持するように操作可能に構成された底部に接続されてもよい。試料が配置される顕微鏡用スライドの部分は、画定された被覆領域を設定できるように、壁構造下に位置付けできる。顕微鏡用スライドが、スライドを押すまたは引くことによって底部へ配置または底部から除去される際、壁付きチャンバは、壁付きチャンバの上回転を可能にするように固定点で固定されてもよい。

【0023】

生体材料は、(a) 上清液の生体試料を取得し、該試料の一部が固定される表面上に該試料の少なくとも一部分を配置するステップと、(b) 一定分量の該上清を除去し、類似の分量のアルキルアルコールで置換するステップであって、該除去および置換は、該試料の一部を該表面に徐々に固定するために複数回行われる、ステップと、を含む方法によってスライドの表面に固定することができる。アルキルアルコールは、 $C_1 - C_{12}$ アルコール、 $C_1 - C_6$ アルコール、またはメタノールから成る群から選択されてもよい。

10

【0024】

蛍光マーカを用いて生体内原位置でハイブリダイズされた核成分に関して生成された蛍光性原位置ハイブリダイゼーション（「FISH」）信号の同定および列挙は、多くの異なる方法によって行なうことができる。利用できる可能性がある一方法は、落射蛍光顕微鏡を使用して、ハイブリダイズされたFISHマーカに対応する各蛍光チャンネルにおける異なる焦点面で、複数の画像を取得するステップと、各核に対して該複数の画像から最良の焦点画像を選択するステップと、該落射蛍光顕微鏡を使用して、各核に対する該最良の焦点画像の該焦点面より上部および下部の複数の画像を取得するステップと、該画像が最も良く焦点を合わされた該最良の焦点画像の該焦点面より上部の1つの焦点面および下部の1つの焦点面を、各核に対して選択するステップと、該核の組み合わせられた画像を生成するために、該最良の焦点画像より上部および下部の該1つの焦点面からの該画像と、各核の該最良の焦点画像とを組み合わせるステップと、背景画素を信号画素から分離し、非アーチファクトの標的に対応する事前設定サイズおよび形状基準に対応する生成信号の範囲を判断するために、各核の組み合わせられた画像を分析するステップと、を含む。

20

【0025】

循環有核胎児細胞を検出する一実施形態の方法において、例えば、血液は、拡張した容積で円錐管に移動してもよい。その後、容積を混合し、調製した勾配に追加してもよい。密度遠心分離勾配を、分注器を使用して手動で負荷してもよく、あるいは、重力による勾配の非補助負荷を可能にする使い捨ての毛細管漏斗を使用してもよいことが分かっている。その後、減速時の勾配の中断を防ぐために遠心分離制動機を停止して、管を遠心分離してもよい。有核細胞を除去、さらに希釈、その後再度遠心分離してもよい。上清の除去後、例えばPBS中で細胞を再懸濁してもよい。

30

【0026】

その後、上記のようなポリエリジン被覆スライドまたはスライドチャンバなどの顕微鏡用スライド上に細胞を沈着することができる。メタノールと、その後メタノール排出後のPBS（＝例えばpH7.4などのリン酸緩衝生理食塩水）中2%のホルムアルデヒドとを、細胞をスライドに固定するために使用してもよい。メタノールを徐々に導入しながら、上清を一定分量除去してもよい。かかる技術は、溶媒特性の急激な変化を回避し、標的材料を徐々に固定できる。すべてのメタノール/ホルムアルデヒド/PBS溶液を除去した後、固定した細胞を、免疫染色の準備ができるまでPBST（＝0.05%のTween 20を有するPBS）中に保存してもよい。

40

【0027】

一つの免疫染色技術において、スライドは、例えば、抗マウスIgG-HRP（＝ペルオキシダーゼ共役ウサギ抗マウスIgG）複合体および/または抗Hb_E-CRTX（抗ヘモグロビン（鎖）モノクローナル抗体）などの抗体を用いてインキュベートしてもよい。また、DAP自然二本鎖DNAを有する蛍光錯体を形成するDAPI（4'-6'-ジア

50

ミジノ - 2 - フェニルインドール) などの DNA 錯化剤を使用する事後染色も行われてもよい。スライドは、核濃度を向上させるためにペプシン原液を用いて、PBS 中で平衡化してもよい。核は、例えば、PBS 中のホルムアルデヒド、MgCl₂ 溶液、その後エタノール系中での脱水および空気乾燥を使用して、スライド上に固定してもよい。

【0028】

その後、プローブハイブリダイゼーションを行ってもよい。プローブをスライド上で熱サイクルし、その後、スライドを上記のようなラック内に配置してまとめて加湿 FISH チャンバ内に配置し、ハイブリダイズを可能にしてもよい。その後、非特異的に結合したプローブを既知の方法で除去できる。その後、プローブ処理済試料は、DAPI などの DNA 鎖で対比染色し、エタノール系中で脱水し、空気乾燥してもよい。抗体および DNA 鎖の結合を判断および結合特性から試料の特性を判断するために、スライド上の試料を造影してもよい。

10

【0029】

可能な選択において、抗体は、それ自体は検出可能ではないビオチン化チラミド官能性を含んでもよい。しかし、FISH 処理後、抗体はフルオロフォアで標識されたストレプトアビジンを使用することによって解明されてもよい。

【0030】

本発明は好適な実施形態に関して記述されているが、当業者は、添付の特許請求の範囲によって定義されるような本発明の精神および範囲から逸脱することなく、種々の変更および/または修正がなされ得ることを容易に理解されたい。

20

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/63927		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC: C12Q 1/68(2006.01);G01N 33/53(2006.01),33/48(2006.01),33/533(2006.01),33/543(2006.01),21/76(2006.01)				
USPC: 435/6,7.1,40.5;436/172,518,546				
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. : Please See Continuation Sheet				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	LAVROV. S. Combined Immunostaining and FISH Analysis of Polytene Chromosomes. From: Methods in Molecular Biology, vol. 247: Drosophila Cytogenetics Protocols	1-2, 6		
---		-----		
Y	Edited by: D. S. Henderson © Humana Press Inc., Totowa, NJ, pages 289-303.	7		
X	US 5,866,071 (LEU et al). 2 February 1999 (02.02.1999).	5		
Y	US 2003/0170703 A1 (PIPER et al) 11 September 2003 (11.09.2003), paragraph [0050].	7		
A	YE. C.J. Combined multicolor-FISH and immunostaining. Cytogenet Genome Res 114:227-234 (2006).	1-2, 6-7		
A	KAMIGUCHI. Y. Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. Hum Genet (1993) 90:533-541.	3-4		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 30 August 2008 (30.08.2008)		Date of mailing of the international search report 11 SEP 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 Christine Foster Telephone No. (571) 272-1600		

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/US07/63927**BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

Group I, claim(s) 1-2 and 6, drawn to methods of treating biological samples and to a method for the simultaneous identification of multiple sub-cellular components.

Group II, claim(s) 3-4, drawn to a method for fixing biological material to a surface.

Group III, claim(s) 5, drawn to a method for loading a density centrifugation gradient.

Group IV, claim(s) 7, drawn to a process for identifying and enumerating FISH signals

The inventions listed as Groups I-VI 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:

With respect to a group of inventions claimed in an international application, unity of invention exists only when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features.

No common technical features linking the Groups listed above be readily identified, such that a lack of unity of invention is directly evident a priori. In particular, the technical features of a combined immunostaining-fluorescent hybridization method that are presented in Group I are not common to Groups II-IV. In addition, Groups II-IV each have technical features that are unrelated to the other groups. Group II includes the feature of fixing biological material to a surface gradually using an alkyl alcohol, which is not a technical feature of Groups I or III-IV. Group III includes the technical feature of preparing and loading a density centrifugation gradient, which is not a technical feature of the other Groups. Group IV includes technical features such as acquiring a plurality of images at different focal planes using an epi-fluorescence microscope, and analyzing combined images to separate signal from background pixels, which are not common to the other Groups.

Accordingly, Groups I-IV are not linked by the same or a corresponding special technical feature so as to form a single general inventive concept.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/63927

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:
435/6,7.1,40.5;436/172,518,546

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/63927

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.:

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.

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, MT, 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, 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

(72)発明者 タファス、トリアンタフィロス

アメリカ合衆国コネチカット州06067 ロッキー ヒル クレメンズ ロード 9

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA05 DA01 EA01 FA01

2G045 BB24 CB01 FA11 FB02 FB03 FB12

专利名称(译)	使用共价结合的荧光团组合免疫染色和FISH的方法。		
公开(公告)号	JP2009530621A	公开(公告)日	2009-08-27
申请号	JP2009500588	申请日	2007-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	艾可尼西斯公司		
申请(专利权)人(译)	Aikonishisu公司		
[标]发明人	キルパトリックミッシェル セツポアンチ タファストリアンタフィロス		
发明人	キルパトリック、ミッシェル セツポ、アンチ タファス、トリアンタフィロス		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/582 C12Q1/6813 C12Q1/6841 G01N33/56966		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N21/64.F		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA05 2G043/DA01 2G043/EA01 2G043/FA01 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12		
优先权	60/781888 2006-03-13 US 60/821550 2006-08-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

荧光信号的检测可以基于落射荧光显微术，使用发射的荧光形成图像（而传统的反射显微镜使用散射光用于图像形成）。落射荧光显微镜的激发光用于激发样品中的荧光标签并向荧光标签发射荧光。落射荧光显微术的一个优点是可以制备样品，使得荧光分子优先附着到感兴趣的生物结构上，从而允许鉴定这种感兴趣的生物结构。在一个实施方案中，公开了免疫染色样品的方法，使得染色在FISH条件下是稳定的。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/63927
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12Q 1/68(2006.01);G01N 33/53(2006.01),33/48(2006.01),33/53(2006.01),33/54(2006.01),31/76(2006.01) USPC: 435/6,7,1,40,5,436/72,518,546 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC: Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Continuation Sheet Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAUROV, S. Combined Immunostaining and FISH Analysis of Polyline Chromosomes. From: Methods in Molecular Biology, vol. 247: Drosophila Cytogenetics Protocols Edited by: D. S. Henderson © Humana Press Inc., Totowa, NJ, pages 289-303.	1-2, 6
Y	US 5,866,071 (ELI et al.) 2 February 1999 02.02.1999.	7
X	US 2003/0170703 A1 (PIER et al.) 11 September 2003 (11.09.2003), paragraph [0050].	7
A	YE, C. J. Combined multicolor-FISH and immunostaining. Cytogenet Genome Res 114:227-234 (2006).	1-2, 6-7
A	KAMIGUCHI, Y. Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation air drying method. Hum Genet (1993) 90:533-541.	3-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Hoc. C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
D. STATEMENTS PERTAINING TO THIS REPORT		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"B" prior documents published after the international filing date or priority date and not to conflict with the application but cited to constitute the prior art or theory underlying the invention	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document which may have priority over the present application but which is not cited to establish the prior art because its priority date is later than the priority date claimed	
"C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be distinguished therefrom or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"D" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"Z" document of particular relevance, the claimed invention cannot be distinguished therefrom or cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other prior documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art	
Date of the actual completion of the international search 10 August 2008 (10.08.2008)		Date of mailing of the international search report 11 SEP 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, APO, USA45 Communications, IP Patent P.O. Box 1455 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Christine Foster  Telephone No. (571) 272-1600
Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)		