

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7038158号

(P7038158)

(45)発行日 令和4年3月17日(2022.3.17)

(24)登録日 令和4年3月9日(2022.3.9)

(51)国際特許分類

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

F I

G 0 1 N 21/64

B

請求項の数 23 外国語出願 (全45頁)

(21)出願番号	特願2020-49086(P2020-49086)	(73)特許権者	511227336
(22)出願日	令和2年3月19日(2020.3.19)		モレキュラー デバイシーズ, エルエル
(62)分割の表示	特願2017-552939(P2017-552939)		シー
	)の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 1
原出願日	平成28年2月25日(2016.2.25)		3 4, サン ノゼ, エヌ. ファースト
(65)公開番号	特開2020-106546(P2020-106546)	(74)代理人	100078282
	A)		弁理士 山本 秀策
(43)公開日	令和2年7月9日(2020.7.9)	(74)代理人	100113413
審査請求日	令和2年3月19日(2020.3.19)		弁理士 森下 夏樹
(31)優先権主張番号	14/682,026	(72)発明者	ミハエル カッツリンガ
(32)優先日	平成27年4月8日(2015.4.8)		オーストリア国 5 3 0 1 オイゲンドル
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	フ, グラベン 9
			エバン エフ. クロムウェル
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 蛍光検出のための方法およびシステム

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

多重化蛍光検出のための方法であって、前記方法は、  
 第1の被分析物に結合された第1の蛍光標識と、第2の被分析物に結合された第2の蛍光標識とを備えるサンプルを提供することであって、前記第1の蛍光標識は、アップコンバーティング蛍光体(UCP)を備え、前記第2の蛍光標識は、非UCP標識を備える、ことと、  
 前記第1の蛍光標識に第1の励起波長における第1の励起光を照射することであって、前記第1の蛍光標識は、第1の発光波長における第1の検出信号を発する、ことと、  
 前記第1の蛍光標識に照射した後に、前記第2の蛍光標識に前記第1の励起波長と異なる第2の励起波長における第2の励起光を照射することであって、前記第2の蛍光標識は、第2の発光波長における第2の検出信号を発する、ことと、  
 第1の測定時間において前記第1の検出信号の強度を測定することであって、前記第1の検出信号の前記強度は、前記サンプル中の前記第1の被分析物の量と相関性がある、ことと、  
 前記第2の蛍光標識に照射することを中止することと、  
 前記第2の蛍光標識に照射することを中止した後に、第2の測定時間において前記第2の検出信号の強度を測定することであって、前記第2の検出信号の前記強度は、前記サンプル中の前記第2の被分析物の量と相関性がある、ことと、  
 を含み、

前記サンプルは、第3の被分析物に結合された第3の蛍光標識を備え、前記第3の蛍光標識は、前記第2の蛍光標識と異なる非UCP標識を備え、前記方法はさらに、前記第2の蛍光標識に照射した後に、前記第3の蛍光標識に前記第1の励起波長および前記第2の励起波長と異なる第3の励起波長における第3の励起光を照射することによって、前記第3の蛍光標識は、第3の発光波長における第3の検出信号を発生することと、前記第3の蛍光標識に照射することを中止することと、前記第3の蛍光標識に照射することを中止した後に、第3の測定時間において前記第3の検出信号の強度を測定することと、を含む、方法。

【請求項2】

前記第1の蛍光標識に照射しながら、前記第1の検出信号の前記強度を測定することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記第1の蛍光標識に照射することを中止することと、前記第1の蛍光標識に照射することを中止した後に、前記第1の検出信号の前記強度を測定することとを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記第2の蛍光標識は、遷移金属キレート、ルテニウム(Ru(II))の遷移金属キレート、オスミウム(Os(II))の遷移金属キレート、およびレニウム(Re(I))の遷移金属キレートから成る群から選択され、前記第3の蛍光標識は、ランタニドキレート、サマリウム(Sm(III))のランタニドキレート、ジスプロシウム(Dy(III))のランタニドキレート、ユーロピウム(Eu(III))のランタニドキレート、およびテルビウム(Tb(III))のランタニドキレートから成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記第3の発光波長が、前記第1の発光波長および前記第2の発光波長と異なることと、前記第3の測定時間が、前記第1の測定時間および前記第2の測定時間と異なることと、のうちの少なくとも1つを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記UCPは、反ストークスシフトを呈する、ランタニドをドーブした、または遷移金属をドーブした無機化合物、ランタニドをドーブした、または遷移金属をドーブした無機化合物であって、前記無機化合物は、エルビウム(Er<sup>3+</sup>)、ツリウム(Tm<sup>3+</sup>)、ホルミウム(Ho<sup>3+</sup>)、プラセオジウム(Pr<sup>3+</sup>)、ネオジウム(Nd<sup>3+</sup>)、ジスプロシウム(Dy<sup>3+</sup>)、イッテルビウム(Yb<sup>3+</sup>)、サマリウム(Sm<sup>3+</sup>)、および前述のうちの2つ以上の組み合わせから成る群から選択される、ドーパントイオンを含む、無機化合物、ランタニドをドーブした、または遷移金属をドーブした無機化合物であって、前記無機化合物は、ハロゲン化物、酸化物、および酸硫化物から成る群から選択される、無機化合物、のうちの少なくとも1つを備える、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記第2の蛍光標識は、遷移金属キレート、ルテニウム(Ru(II))の遷移金属キレート、オスミウム(Os(II))の遷移金属キレート、レニウム(Re(I))の遷移金属キレート、ランタニドキレート、サマリウム(Sm(III))のランタニドキレート、ジスプロシウム(Dy(III))のランタニドキレート、ユーロピウム(Eu(III))のランタニドキレート、およびテルビウム(Tb(III))のランタニドキレートから成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記第1の励起波長は、近赤外範囲内であり、前記第1の発光波長は、可視範囲内である、請求項1に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 9】

前記第 2 の励起波長は、紫外線範囲内であり、前記第 2 の発光波長は、前記第 2 の励起波長よりも長い、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記第 1 の蛍光標識の前記 UCP は、第 1 の蛍光発光寿命を有し、前記第 2 の蛍光標識は、第 2 の蛍光発光寿命を有し、前記第 1 の蛍光発光寿命は、前記第 2 の蛍光発光寿命と異なる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記第 1 の蛍光標識の前記 UCP は、第 1 の蛍光発光寿命を有し、前記第 2 の蛍光標識は、第 2 の蛍光発光寿命を有し、

前記第 2 の蛍光発光寿命が 0.1 マイクロ秒～10 マイクロ秒の範囲内であること、および前記第 2 の蛍光発光寿命が 100 マイクロ秒～1 ミリ秒の範囲内であること、のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記第 2 の蛍光標識は、250 nm～350 nm の範囲内のストークスシフトを有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記第 2 の発光波長が前記第 1 の発光波長と異なること、前記第 2 の測定時間が前記第 1 の測定時間と異なること、のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記サンプルを提供することは、前記サンプルを、前記第 1 の被分析物に特異的に結合する第 1 の抗体、前記第 2 の被分析物に特異的に結合する第 2 の抗体、前記第 1 の抗体に特異的に結合する第 1 の蛍光抗体複合体であって、前記第 1 の蛍光抗体複合体は、前記第 1 の蛍光標識を備える、第 1 の蛍光抗体複合体、および、前記第 2 の抗体に特異的に結合する第 2 の蛍光抗体複合体であって、前記第 2 の蛍光抗体複合体は、前記第 2 の蛍光標識を備える、第 2 の蛍光抗体複合体と接触させることと、前記抗体および前記抗体複合体が免疫複合体を形成することを可能にするための十分な条件下でかつ十分な時間にわたって、前記サンプルを培養することを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記サンプルを提供することは、前記サンプルを、前記第 1 の被分析物に特異的に結合する第 1 の抗体、および、前記第 2 の被分析物に特異的に結合する第 2 の抗体と接触させることを含み、前記第 1 の蛍光標識が前記第 1 の抗体に直接付着させられるか、または、前記第 2 の蛍光標識が前記第 2 の抗体に直接付着させられるか、または、前述の両方である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記第 1 の被分析物および前記第 2 の被分析物は、タンパク質または膜結合タンパク質を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記第 1 の被分析物および前記第 2 の被分析物のうちの一方は、基準タンパク質であり、前記第 1 の被分析物および前記第 2 の被分析物のうちの他方は、未知のタンパク質であり、前記第 3 の被分析物は、膜結合タンパク質、未修飾タンパク質、またはタンパク質の修飾もしくはリン酸化バージョンであり、さらに、前記第 2 の検出信号を前記第 1 の検出信号に正規化すること、または前記第 1 の検出信号を前記第 2 の検出信号に正規化することを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記第 1 の被分析物および前記第 2 の被分析物のうちの一方は、未修飾タンパク質であり、前記第 1 の被分析物および前記第 2 の被分析物のうちの他方は、前記タンパク質の修飾またはリン酸化バージョンであり、前記第 3 の被分析物は、膜結合タンパク質、基準タンパク質、または未知のタンパク質であり、さらに、前記第 1 の検出信号および前記第 2 の

10

20

30

40

50

検出信号の前記測定された強度に基づいて、前記未修飾タンパク質に対する前記タンパク質の前記修飾またはリン酸化バージョンの比を計算することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

共通発光フィルタを通して、または異なる発光フィルタを通して、前記第 1 の検出信号および前記第 2 の検出信号を指向することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記第 1 の蛍光標識に照射することおよび前記第 2 の蛍光標識に照射することは、同時に、または連続的に行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記サンプルを提供することは、複数のサンプルを提供することを含み、各サンプル上で、前記第 1 の蛍光標識に照射するステップ、前記第 2 の蛍光標識に照射するステップ、前記第 1 の検出信号の強度を測定するステップ、および前記第 2 の検出信号の強度を測定するステップを行うことによって、各サンプル上で多重化蛍光検出を行うことをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 22】

各サンプル上で多重化蛍光検出を行うことは、個別のサンプルを、前記第 1 の励起光および前記第 2 の励起光を生成するために構成される光源、ならびに前記第 1 の検出信号および前記第 2 の検出信号を測定するために構成される光検出器と光学的に整合させることを含む、請求項 21 に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記個別のサンプルを前記光源および前記光検出器と光学的に整合させることは、前記個別のサンプルをカートリッジと光学的に整合させることを含み、

前記カートリッジは、前記カートリッジが光学的および/または電氣的に蛍光検出装置と通信するように、前記蛍光検出装置の装置筐体の中に除去可能に設置され、

前記カートリッジは、前記光源から整合したサンプルまでの光学経路を画定する励起光学部、または前記整合したサンプルから前記光検出器までの光学経路を画定する発光光学部、または前述の両方を封入し、

前記光源は、前記カートリッジの中または前記装置筐体の中に配置され、

前記光検出器は、前記カートリッジの中または前記装置筐体の中に配置される、請求項 22 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本願は、2015年4月8日に出願された米国特許出願第14/682,026号の利益を主張するものであり、該米国特許出願の内容は、その全体が参照により本明細書中に援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、概して、サンプルの蛍光ベースの検出または測定、具体的には、異なるフルオロフォアを利用する多重化検出のための方法、装置、およびシステムに関する。本発明は、通常の蛍光検出(FD)および時間分解蛍光(TRF)検出を含む、蛍光ベースの検出のための異なるタイプの技法を実装し得る。

40

【背景技術】

【0003】

タンパク質検出および特性評価は、医薬ならびに臨床研究のための重要なタスクである。化学発光(CL)は、生化学分析における、または表面結合および空間的に分離されたタンパク質上のタンパク質の検出のための一般的な方法である。後者の実施例は、ウェスタンブロット(WB)分析と称される、膜へのタンパク質の電気泳動転写を用いたドデシル

50

硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の方法である (Towbin et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76(9):4350-4354、Renart et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76(7):3116-3120)。電気化学発光 (ECL) もまた、特別に設計されたマルチウェルプレート (例えば、Meso Scale Diagnostics, LLCの子会社である、Meso Scale Discovery (Gaithersburg, Md.) 製 MULTI SPOT (R) および MULTI-ARRAY™ プレートならびに SECTOR™ 器具) 内のスポットに結合されたタンパク質を検出するために適用されている。

#### 【0004】

CL および ECL の利点は、サブピコグラム / ml 範囲内の溶液中のタンパク質のための検出の限界を伴う非常に高い感度である。しかしながら、これらのシステムは、一過性の信号を生成し、化学的に安定しておらず、検出のために要求される化学反応を生じるために複雑な手順を要求する。それらはまた、非線形システムであり (すなわち、1つのプローブが多くの光子を生成する)、不良な再現性を有するため、タンパク質量の定量化が所望される用途のために好適ではない。最後であるが有意な限界は、複数の CL 信号を多重化できないことである。それらの発光は、非常に広く、それは、同一の空間場所からの2つの異なる CL 発光を検出する能力を非常に困難にする。

#### 【0005】

蛍光 (FL) プローブは、CL の限界のうちのいくつかを克服する。それらは、励起光子と発光光子との間の関係が一般に線形であるため、より良好な定量化のための能力を提供する。それらはまた、他の反応性分子によるプローブへのアクセスを提供する必要性がないため、より万能である。一般に、FL プローブはまた、概して、非反応性化学種であるため、特に光から保護されるときに、より安定している。おそらく、FL プローブの最も重要な利点は、それらが多重化を行う能力を提供することである。FL 分子は、広範囲の励起および発光帯を伴う多種多様な形態で現れる。したがって、同一の空間場所における2つ (またはそれを上回る) プローブは、独立して励起させられ、検出チャンネルの間に最小限の重複 (またはクロストーク) を伴って検出されることができる。同一の空間場所から最大4つの独立したフルオロフォアを検出する能力は、カラー帯域通過フィルタを使用して、定期的に報告される。より高いレベルの多重化が、フローサイトメトリおよびマルチスペクトル画像化を用いて報告されている (Stack et al. (2014) Methods 70(1):46-58、Perfetto et al. (2004) 4(8):648-655)。

#### 【0006】

残念ながら、FL プローブは、CL と同一のレベルの感度を実証しておらず、典型的には、より低いダイナミックレンジを有する。FL プローブを用いたより低い感度の理由は、共局在化物質の自己蛍光からの背景または他のプローブからの蛍光の干渉の存在である。異なる技法が、時間分解蛍光 (TRF) と呼ばれる、より長い寿命の蛍光プローブを使用して、自己蛍光からの背景を低減させるために開発された (Zuchner et al. (2009) Anal. Chem. 81(22):9449-9453、Kemper et al. (2001) Electrophoresis 22(5):881-889、Lim et al. (1997) Anal Biochem 245(2):184-195、Huhtinen et al. (2005) Anal. Chem. 77(8):2643-2648、Vereb et al. (1998) Biophys J 74(5):2210-2222)。簡潔に述べると、自己蛍光は、典型的には、自己蛍光信号が次第に消えるまで TRF 検出が時間的に遅延されるように、比較的短い寿命 (< 20 ナノ秒) を有する。これは、技術的には時間ゲート検出であるが、一般的には時間分解と呼ばれている (Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy," 3rd Edition, Springer-Verlag, New York, 2006)。TRF 検出の

10

20

30

40

50

利益は、文書で十分に立証されており、より高い感度、より低い背景、およびより広いダイナミックレンジを含む (Eliseeva & Bunzli (2010) Chem. Soc. Rev. 39(1):189-227、Bunzli & Piguet (2005) Chem. Soc. Rev. 34(12):1048-1077、Diamandis (1991) Clin. Chem. 37(9):1486-1491)。

#### 【0007】

TRFの多重化が、多少の成功とともに報告されている。EuおよびTbベースのプロープの使用が、2つの異なるタンパク質を検出するために時間分解蛍光共鳴エネルギー移動 (TR-FRET) を使用した生化学検定において実証されている (Degorce et al. (2009) Curr. Chem. Genomics. 3:22-32、Bookout et al. (2000) J. Agric. Food Chem. 48(12):5868-5873、Hamy et al. (2001) J. Biomol. Screen. 6(3):179-187)。加えて、EuおよびSm、ならびにEu、Tb、およびSmを用いた多重化の報告も存在している (Bador et al. (1987) Clin. Chem. 33(1):48-51、Heinonen et al. (1997) Clin. Chem. 43(7):1142-1150)。しかしながら、これらのシステムは、ランタニドのうちの1つからの発光が他のランタニドの検出チャネルの中へ漏出するにつれて、クロストークに悩まされる。これは、これらの方法の有用性を、1つだけの真に敏感なチャネルを有することに限定する一方で、他方は、第2の種からの背景信号によって限定される。

#### 【0008】

したがって、チャネルの間のクロストークが最小限である、または全くない状態で、高い感度、背景除去、安定性、光漂白への耐性、および時間分解蛍光検出のダイナミックレンジを維持する、改良された多重化システムの必要性がある。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0009】

【文献】Towbin et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76(9):4350-4354  
Renart et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76(7):3116-3120

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

全体的または部分的に前述の問題、および/または当業者によって観察され得た他の問題に対処するために、本開示は、以下に記載される実装で一例として説明されるような方法、プロセス、システム、装置、器具、および/またはデバイスを提供する。

#### 【0011】

ある実施形態によると、多重化時間分解蛍光 (TRF) 検出のための方法は、第1の被分析物に結合された第1の蛍光標識と、第2の被分析物に結合された第2の蛍光標識とを備える、サンプルを提供するステップであって、第1の蛍光標識は、背景蛍光発光寿命よりも少なくとも3倍長い第1の蛍光発光寿命と、第1の励起波長と、第1の発光波長とを有し、第2の蛍光標識は、第2の蛍光発光寿命と、第2の励起波長と、第2の発光波長とを有する、ステップと、第1の励起波長を有する第1の励起光で第1の蛍光標識を励起させるステップであって、第1の蛍光標識は、第1の発光波長を有する第1の検出信号を発する、ステップと、第2の励起波長を有する第2の励起光で第2の蛍光標識を励起させるステップであって、第2の蛍光標識は、第2の発光波長を有する第2の検出信号を発する、ステップと、第1の検出信号の強度を測定するステップであって、第1の検出信号の強度は、サンプル中の第1の被分析物の量と正の相関性がある、ステップと、第2の検出信号

の強度を測定するステップであって、第 2 の検出信号の強度は、サンプル中の第 2 の被分析物の量と正の相関性がある、ステップとを含み、第 2 の蛍光発光寿命は、第 1 の蛍光発光寿命よりも少なくとも 5 倍長い。

【 0 0 1 2 】

別の実施形態によると、サンプルはさらに、付加的被分析物に結合された少なくとも 1 つの付加的蛍光標識を備え、付加的蛍光標識は、標識特有の励起波長と、標識特有の発光波長と、背景発光寿命よりも少なくとも 3 倍長い標識特有の蛍光発光寿命とを有し、第 1 の蛍光発光寿命、第 2 の蛍光発光寿命、および標識特有の蛍光発光寿命はそれぞれ、相互と少なくとも 1 桁異なる。付加的蛍光標識は、標識特有の励起波長を有する標識特有の励起光で励起させられ、付加的蛍光標識は、標識特有の発光波長を有する標識特有の検出信号を発する。次いで、標識特有の検出信号の強度が、測定され、標識特有の検出信号の強度は、サンプル中の付加的被分析物の量と正の相関性がある。付加的被分析物に結合された少なくとも 1 つの付加的蛍光標識はまた、異なる被分析物に結合された複数の異なる蛍光標識を備えてもよい。

10

【 0 0 1 3 】

別の実施形態によると、多重化時間分解蛍光 ( T R F ) 検出装置またはシステムは、方法の励起させるステップおよび測定するステップ等の本明細書に開示される方法のうちのいずれかの全てまたは一部を行うために構成される。

【 0 0 1 4 】

別の実施形態によると、蛍光検出を行うための装置またはシステムは、本明細書に開示される方法のうちのいずれかの全てまたは一部を行うために構成される、プロセッサと、メモリとを含む。

20

【 0 0 1 5 】

別の実施形態によると、コンピュータ可読記憶媒体は、本明細書に開示される方法のうちのいずれかの全てまたは一部を行うための命令を含む。

【 0 0 1 6 】

別の実施形態によると、装置またはシステムは、コンピュータ可読記憶媒体を含む。

【 0 0 1 7 】

別の実施形態によると、多重化時間分解蛍光 ( T R F ) 検出装置は、サンプルを支持するために構成されるサンプル支持体であって、前記サンプルは、第 1 の蛍光標識と、第 2 の蛍光標識とを備え、第 1 の蛍光標識は、背景蛍光発光寿命よりも少なくとも 3 倍長い第 1 の蛍光発光寿命と、第 1 の励起波長と、第 1 の発光波長とを有し、第 2 の蛍光標識は、第 2 の蛍光発光寿命と、第 2 の励起波長と、第 2 の発光波長とを有し、第 2 の蛍光発光寿命は、第 1 の蛍光発光寿命よりも少なくとも 5 倍長い、サンプル支持体と、第 1 の励起波長における第 1 の励起光および第 2 の励起波長における第 2 の励起光を生成するために構成される、光源と、第 1 の励起光による励起にตอบสนองしてサンプルから発せられる第 1 の検出信号、および第 2 の励起光による励起にตอบสนองしてサンプルから発せられる第 2 の検出信号を測定するために構成される、光検出器と、タイミングシーケンスに従って第 1 の励起光および第 2 の励起光を生成するように光源を制御し、第 1 の検出信号および第 2 の検出信号の測定に対応する電気出力を光検出器から受信するために構成される、コンピューティングデバイスとを含む。

30

40

【 0 0 1 8 】

別の実施形態によると、多重化蛍光検出のための方法は、第 1 の被分析物に結合された第 1 の蛍光標識と、第 2 の被分析物に結合された第 2 の蛍光標識とを備える、サンプルを提供するステップであって、第 1 の蛍光標識は、アップコンバーティング蛍光体 ( U C P ) を備え、第 2 の蛍光標識は、非 U C P 標識を備える、ステップと、第 1 の蛍光標識に第 1 の励起波長における第 1 の励起光を照射するステップであって、第 1 の蛍光標識は、第 1 の発光波長における第 1 の検出信号を発する、ステップと、第 2 の蛍光標識に第 1 の励起波長と異なる第 2 の励起波長における第 2 の励起光を照射するステップであって、第 2 の蛍光標識は、第 1 の発光波長と異なる第 2 の発光波長における第 2 の検出信号を発する、

50

ステップと、第1の測定時間において第1の検出信号の強度を測定するステップであって、第1の検出信号の強度は、サンプル中の第1の被分析物の量と相関性がある、ステップと、第2の蛍光標識を照射することを中止するステップと、第2の蛍光標識を照射することを中止した後に、第1の測定時間と異なる第2の測定時間において第2の検出信号の強度を測定するステップであって、第2の検出信号の強度は、サンプル中の第2の被分析物の量と相関性がある、ステップとを含む。

【0019】

別の実施形態によると、サンプルは、第3の被分析物に結合された第3の蛍光標識を備え、第3の蛍光標識は、第2の蛍光標識と異なる非UCP標識を備え、本方法はさらに、第3の蛍光標識に第1の励起波長および第2の励起波長と異なる第3の励起波長における第3の励起光を照射するステップであって、第3の蛍光標識は、第1の発光波長および第2の発光波長と異なる第3の発光波長における第3の検出信号を発する、ステップと、第3の蛍光標識を照射することを中止するステップと、第3の蛍光標識を照射することを中止した後に、第1の測定時間および第2の測定時間と異なる第3の測定時間において第3の検出信号の強度を測定するステップとを含む。

10

【0020】

別の実施形態によると、蛍光検出装置は、少なくとも、本明細書に開示される方法のうちのいずれかの照射するステップおよび測定するステップを行うために構成され、第1の励起光および第2の励起光を生成するために構成される光源と、第1の検出信号および第2の検出信号を測定するために構成される光検出器とを含む。

20

【0021】

別の実施形態によると、蛍光検出装置は、サンプルを支持するために構成されるサンプル支持体であって、前記サンプルは、第1の被分析物に結合された第1の蛍光標識と、第2の被分析物に結合された第2の蛍光標識とを備え、第1の蛍光標識は、アップコンバージョン蛍光体(UCP)を備え、第2の蛍光標識は、非UCP標識を備える、サンプル支持体と、第1の励起波長における第1の励起光および第1の励起波長と異なる第2の励起波長における第2の励起光を生成するために構成される、光源と、第1の励起光による励起にตอบสนองして第1の発光波長においてサンプルから発せられる第1の検出信号、および第2の励起光による励起にตอบสนองして第2の発光波長においてサンプルから発せられる第2の検出信号を測定するために構成される、光検出器と、所定の励起時間において、かつ所定の持続時間にわたって、第1の励起光および第2の励起光をそれぞれ生成するように光源を制御し、第1の測定時間において第1の検出信号を測定するように、かつ第2の測定時間において第2の検出信号を測定するように、光検出器を制御するために構成される、コンピューティングデバイスとを含む。

30

【0022】

別の実施形態によると、サンプルは、第3の被分析物に結合された第3の蛍光標識を備え、第3の蛍光標識は、第2の蛍光標識と異なる非UCP標識を備え、光源は、第1の励起波長および第2の励起波長と異なる第3の励起波長において第3の励起光を生成するために構成され、光検出器は、第3の発光波長における第3の検出信号を測定するために構成され、コンピューティングデバイスは、所定の励起時間において、かつ所定の持続時間にわたって、第3の励起光を生成するように光源を制御し、第3の測定時間において第3の検出信号を測定するように光検出器を制御するために構成される。

40

【0023】

別の実施形態によると、蛍光検出装置またはシステムは、装置筐体と、装置筐体の中に除去可能に設置されるカートリッジと、光源からサンプルまでの光学経路を画定するために構成される励起光学部と、サンプルから光検出器までの光学経路を画定するために構成される発光光学部とを含み、光源は、カートリッジの中または装置筐体の中に配置され、光検出器は、カートリッジの中または装置筐体の中に配置され、コンピューティングデバイスは、装置筐体の中に配置される。

【0024】

50



別の実施形態によると、蛍光検出装置またはシステムは、本明細書に開示される方法のうち  
のいずれかの全てまたは一部を行うために構成される。

【0025】

別の実施形態によると、蛍光検出を行うための装置またはシステムは、本明細書に開示さ  
れる方法のうちいずれかの全てまたは一部を行うために構成される、プロセッサと、メモ  
リとを含む。

【0026】

別の実施形態によると、コンピュータ可読記憶媒体は、本明細書に開示される方法のうち  
のいずれかの全てまたは一部を行うための命令を含む。

【0027】

別の実施形態によると、装置またはシステムは、コンピュータ可読記憶媒体を含む。

【0028】

本発明の他のデバイス、装置、システム、方法、特徴、および利点が、以下の図ならびに  
発明を実施するための形態の検討に応じて、当業者に明白であろう、または明白となる  
。全てのそのような付加的システム、方法、特徴、および利点は、本説明に含まれ、本発  
明の範囲内であり、添付の請求項によって保護されることが意図される。

本明細書は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目1)

多重化蛍光検出のための方法であって、

第1の被分析物に結合された第1の蛍光標識と、第2の被分析物に結合された第2の蛍  
光標識とを備える、サンプルを提供するステップと、

前記第1の蛍光標識に第1の励起波長における第1の励起光を照射するステップであっ  
て、前記第1の蛍光標識は、第1の発光波長における第1の検出信号を発する、ステップ  
と、

前記第2の蛍光標識に前記第1の励起波長と異なる第2の励起波長における第2の励起  
光を照射するステップであって、前記第2の蛍光標識は、第2の発光波長における第2の  
検出信号を発する、ステップと、

第1の測定時間において前記第1の検出信号の強度を測定するステップであって、前記  
第1の検出信号の前記強度は、前記サンプル中の前記第1の被分析物の量と相関性がある  
、ステップと、

前記第2の蛍光標識を照射することを中止するステップと、

前記第2の蛍光標識を照射することを中止した後に、第2の測定時間において前記第2  
の検出信号の強度を測定するステップであって、前記第2の検出信号の前記強度は、前記  
サンプル中の前記第2の被分析物の量と相関性がある、ステップと、

を含む、方法。

(項目2)

前記第1の蛍光標識は、アップコンバーティング蛍光体(UCP)を備え、前記第2の  
蛍光標識は、非UCP標識を備える、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記第1の蛍光標識を照射しながら、前記第1の検出信号の前記強度を測定するステッ  
プを含む、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記第1の蛍光標識を照射することを中止するステップと、前記第1の蛍光標識を照射  
することを中止した後に、前記第1の検出信号の前記強度を測定するステップとを含む、  
項目2に記載の方法。

(項目5)

前記UCPは、

反ストークスシフトを呈する、ランタニドをドーブした、または遷移金属をドーブした  
無機化合物、

ランタニドをドーブした、または遷移金属をドーブした無機化合物であって、前記無機

10

20

30

40

50

化合物は、エルビウム ( $Er^{3+}$ )、ツリウム ( $Tm^{3+}$ )、ホルミウム ( $Ho^{3+}$ )、プラセオジウム ( $Pr^{3+}$ )、ネオジウム ( $Nd^{3+}$ )、ジスプロシウム ( $Dy^{3+}$ )、イッテルビウム ( $Yb^{3+}$ )、サマリウム ( $Sm^{3+}$ )、および前述のうちの2つまたはそれを上回るものの組み合わせから成る群から選択される、ドーパントイオンを含む、無機化合物、

ランタニドをドーブした、または遷移金属をドーブした無機化合物であって、前記無機化合物は、ハロゲン化物、酸化物、および酸硫化物から成る群から選択される、無機化合物、

のうちの少なくとも1つを備える、

項目2に記載の方法。

(項目6)

前記第1の励起波長は、近赤外範囲内であり、前記第1の発光波長は、可視範囲内である、項目2に記載の方法。

(項目7)

前記第2の励起波長は、紫外線範囲内であり、前記第2の発光波長は、前記第2の励起波長よりも長い、項目2に記載の方法。

(項目8)

前記第1の蛍光標識および前記第2の蛍光標識のうちの少なくとも1つは、遷移金属キレート、ルテニウム ( $Ru(II)$ ) の遷移金属キレート、オスmium ( $Os(II)$ ) の遷移金属キレート、レニウム ( $Re(I)$ ) の遷移金属キレート、ランタニドキレート、サマリウム ( $Sm(III)$ ) のランタニドキレート、ジスプロシウム ( $Dy(III)$ ) のランタニドキレート、ユーロピウム ( $Eu(III)$ ) のランタニドキレート、およびテルビウム ( $Tb(III)$ ) のランタニドキレートから成る群から選択される、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記サンプルは、第3の被分析物に結合された第3の蛍光標識を備え、前記方法はさらに、

前記第3の蛍光標識に前記第1の励起波長および前記第2の励起波長と異なる第3の励起波長における第3の励起光を照射するステップであって、前記第3の蛍光標識は、第3の発光波長における第3の検出信号を發する、ステップと、

前記第3の蛍光標識を照射することを中止するステップと、

前記第3の蛍光標識を照射することを中止した後に、第3の測定時間において前記第3の検出信号の強度を測定するステップと、

を含む、項目1に記載の方法。

(項目10)

前記第1の蛍光標識は、アップコンバージョン蛍光体 (UCP) を備え、前記第2の蛍光標識は、非UCP標識を備え、前記第3の蛍光標識は、前記第2の蛍光標識と異なる非UCP標識を備える、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記第3の発光波長が、前記第1の発光波長および前記第2の発光波長と異なることと、前記第3の測定時間が、前記第1の測定時間および前記第2の測定時間と異なることと、のうちの少なくとも1つを含む、

項目9に記載の方法。

(項目12)

前記第1の蛍光標識は、第1の蛍光発光寿命を有し、前記第2の蛍光標識は、第2の蛍光発光寿命を有し、前記第2の蛍光発光寿命は、

前記第2の蛍光発光寿命が、前記第1の蛍光発光寿命と異なること、

前記第2の蛍光発光寿命が、前記第1の蛍光発光寿命よりも長いこと、

前記第2の蛍光発光寿命が、前記第1の蛍光発光寿命よりも少なくとも5倍長いこと、

前記第2の蛍光発光寿命が、前記第1の蛍光発光寿命よりも少なくとも100倍長いこ

10

20

30

40

50

と、

前記第2の蛍光発光寿命が、前記第1の蛍光発光寿命よりも少なくとも1,000倍長いこと、

前記第2の蛍光発光寿命が、0.1マイクロ秒～10マイクロ秒の範囲内であること、および

前記第2の蛍光発光寿命が、100マイクロ秒～1ミリ秒の範囲内であること、から成る群から選択される、

項目1に記載の方法。

(項目13)

前記第1の蛍光標識および前記第2の蛍光標識のうちの少なくとも1つは、20nmを上回るストークスシフト、100nmを上回るストークスシフト、250nmを上回るストークスシフト、および約250nm～約350nmの範囲内のストークスシフトから成る群から選択される、ストークスシフトを有する、項目1に記載の方法。

10

(項目14)

前記第2の発光波長が、前記第1の発光波長と異なること、

前記第2の測定時間が、前記第1の測定時間と異なること、

のうちの少なくとも1つを含む、

項目1に記載の方法。

(項目15)

前記第1の被分析物および前記第2の被分析物は、タンパク質または膜結合タンパク質を含み、さらに、

20

前記第1の被分析物および前記第2の被分析物のうちの一方は、基準タンパク質であり、前記第1の被分析物および前記第2の被分析物のうちの他方は、未知のタンパク質であり、さらに、前記第2の検出信号を前記第1の検出信号に正規化するステップ、または前記第1の検出信号を前記第2の検出信号に正規化するステップを含む、ことと、

前記第1の被分析物および前記第2の被分析物のうちの一方は、未修飾タンパク質であり、前記第1の被分析物および前記第2の被分析物のうちの他方は、前記タンパク質の修飾またはリン酸化バージョンであり、さらに、前記第1の検出信号および前記第2の検出信号の前記測定された強度に基づいて、前記未修飾タンパク質に対する前記タンパク質の前記修飾またはリン酸化バージョンの比を計算するステップを含む、ことと

30

のうちの少なくとも1つを含む、項目1に記載の方法。

(項目16)

前記第1の蛍光標識を照射するステップおよび前記第2の蛍光標識を照射するステップは、同時に、または連続的に行われる、項目1に記載の方法。

(項目17)

前記サンプルをカートリッジと光学的に整合させるステップを含み、

前記カートリッジは、前記カートリッジが光学的および/または電氣的に蛍光検出装置と通信するように、前記蛍光検出装置の装置筐体の中に除去可能に設置され、

前記カートリッジは、前記光源から整合したサンプルまでの光学経路を画定する励起光学部、または前記整合したサンプルから前記光検出器までの光学経路を画定する発光光学部、または前述の両方を封入し、

40

前記光源は、前記カートリッジの中または前記装置筐体の中に配置され、

前記光検出器は、前記カートリッジの中または前記装置筐体の中に配置される、

項目1に記載の方法。

(項目18)

少なくとも、項目1に記載の方法の照射するステップおよび測定するステップを行うために構成される、蛍光検出装置であって、

前記第1の励起光および前記第2の励起光を生成するために構成される光源と、

前記第1の検出信号および前記第2の検出信号を測定するために構成される光検出器と、

を備える、蛍光検出装置。

50

( 項目 1 9 )

サンプルを支持するために構成されるサンプル支持体であって、前記サンプルは、第 1 の被分析物に結合された第 1 の蛍光標識と、第 2 の被分析物に結合された第 2 の蛍光標識とを備える、サンプル支持体と、

第 1 の励起波長における第 1 の励起光および前記第 1 の励起波長と異なる第 2 の励起波長における第 2 の励起光を生成するために構成される、光源と、

前記第 1 の励起光による励起にตอบสนองして、第 1 の発光波長において前記サンプルから発せられる第 1 の検出信号、および前記第 2 の励起光による励起にตอบสนองして、第 2 の発光波長において前記サンプルから発せられる第 2 の検出信号を測定するために構成される、光検出器と、

10

コンピューティングデバイスであって、

所定の励起時間において、かつ所定の持続時間にわたって、前記第 1 の励起光および前記第 2 の励起光をそれぞれ生成するように前記光源を制御することと、

第 1 の測定時間において前記第 1 の検出信号を測定するように、かつ第 2 の測定時間において前記第 2 の検出信号を測定するように、前記光検出器を制御することと

を行うように構成される、コンピューティングデバイスと、

を備える、蛍光検出装置。

( 項目 2 0 )

装置筐体と、前記装置筐体の中に除去可能に設置されるカートリッジと、前記光源から前記サンプルまでの光学経路を画定するために構成される励起光学部と、前記サンプルから前記光検出器までの光学経路を画定するために構成される発光光学部とを備え、

20

前記光源は、前記カートリッジの中または前記装置筐体の中に配置され、

前記光検出器は、前記カートリッジの中または前記装置筐体の中に配置され、

前記励起光学部の少なくとも一部、または前記発光光学部の少なくとも一部、または前記励起光学部の少なくとも一部および前記発光光学部の少なくとも一部は、前記カートリッジの中または前記装置筐体の中に配置される、

項目 1 9 に記載の蛍光検出装置。

**【図面の簡単な説明】****【 0 0 2 9 】**

本発明は、以下の図を参照することによって、より深く理解されることができる。図中の構成要素は、必ずしも一定の縮尺ではなく、代わりに、本発明の原理を例証することに重点が置かれている。図中、同一参照番号は、異なる図の全体を通して対応する部分を指定する。

30

**【 0 0 3 0 】**

**【図 1】** 図 1 は、いくつかの実施形態による、多重化時間分解蛍光 ( T R F ) 検出のための方法のフローチャートである。

**【図 2】** 図 2 は、いくつかの実施形態による、サンプル分析装置の実施例の概略図である。

**【図 3 A】** 図 3 A は、ある実施形態による、蛍光検出装置の実施例の概略図である。

**【図 3 B】** 図 3 B は、別の実施形態による、蛍光検出装置の実施例の概略図である。

**【図 3 C】** 図 3 C は、別の実施形態による、蛍光検出装置の実施例の概略図である。

40

**【図 3 D】** 図 3 D は、別の実施形態による、蛍光検出装置の実施例の概略図である。

**【図 3 E】** 図 3 E は、別の実施形態による、蛍光検出装置の実施例の概略図である。

**【図 3 F】** 図 3 F は、別の実施形態による、蛍光検出装置の実施例の概略図である。

**【図 3 G】** 図 3 G は、別の実施形態による、蛍光検出装置の実施例の概略図である。

**【図 3 H】** 図 3 H は、別の実施形態による、蛍光検出装置の実施例の概略図である。

**【図 4 A】** 図 4 A は、ScanLater™ ウェスタンプロット検出システム ( M o l e c u l a r D e v i c e s , L L C ( S u n n y v a l e , C A ) ) を使用する T R F 検出の方法の概略図である。

**【図 4 B】** 図 4 B は、T R F 検出の原理を図示する概略図である。

**【図 5 A】** 図 5 A は、グルタチオン S - トランスフェラーゼ ( G S T ) の 3 倍連続希釈の

50

画像である。

【図5B】図5Bは、10回の異なるウェスタンプロットの平均にわたる個々の帯域からの積分強度のグラフである。

【図6】図6は、ScanLater™カートリッジとともにSpectraMax (R) Paradigm (R) リーダを使用して、経時的なウェスタンプロット結果の安定性を示す、グラフである。

【図7】図7は、ウェスタンプロット上の単一の帯域の反復走査後のTRF試薬の光漂白の欠如を示す、グラフである。走査毎に、バーは、強度(「Intensity」)を示す。

【図8】図8は、ユーロピウム(Eu)およびテルビウム(Tb)ベースのプロープのための検出チャンネルの間のクロストーク発光を比較する、ドットプロット結果を示す。 10

【図9】図9は、ユーロピウム(Eu)およびサマリウム(Sm)ベースのプロープのための検出チャンネルの間のクロストーク発光を比較する、ドットプロット結果を示す。

【図10】図10は、ユーロピウム(Eu)およびルテニウム(Ru)ベースのプロープを用いて検出チャンネルの間のクロストーク発光を比較する、GST希釈系列のウェスタンプロット結果を示す。これらの走査は、レーザダイオード励起を使用するカートリッジを用いて取得された。

【図11】図11は、図10に示されるウェスタンプロット上のレーンを通した平均ライン走査を示す、グラフである。GST Eu - Euカートリッジ用のライン走査は、1101と標識され、GST Eu - Ruカートリッジ用のライン走査は、1102と標識され、GST Ru - Ruカートリッジ用のライン走査は、1103と標識され、GST Ru - Euカートリッジ用のライン走査は、1104と標識される。 20

【発明を実施するための形態】

【0031】

本明細書で使用されるように、「被分析物」という用語は、概して、検出される物質を指す。例えば、他の特定の形態では、多重化TRF検出を行うための方法内の第1の被分析物および第2の被分析物は、タンパク質、より具体的には、膜結合タンパク質を備える。被分析物はまた、抗原物質、ハプテン、抗体、およびそれらの組み合わせを含んでもよい。故に、被分析物は、毒素、有機化合物、タンパク質、ペプチド、微生物、アミノ酸、核酸、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬物(治療目的で投与されるもの、ならびに違法目的で投与されるものを含む)、薬物中間体または副産物、細菌、ウイルス粒子、および上記の物質のうちのいずれかの代謝産物またはそれに対する抗体を含むが、それらに限定されない。 30

【0032】

本明細書で使用されるように、「サンプル」という用語は、概して、被分析物を含有することが公知である、または疑われる物質を指す。サンプルは、供給源から取得されたまま直接的に、またはサンプルの性質を修飾する前処理後に使用されてもよい。サンプルは、血液、間質液、唾液、水晶体液、脳脊髄液、汗、尿、乳、腹水、粘液、滑液、腹腔液、膈液、羊水、または同等物を含む、生理液等の任意の生物学的起源に由来してもよい。サンプルは、血液から血漿を調製すること、粘液を希釈すること、および同等物等、使用に先立って前処理されてもよい。前処理の方法は、濾過、沈殿、希釈、蒸留、濃縮、干渉成分の不活性化、クロマトグラフィ、分離ステップ、および試薬の添加を伴うことができる。生理液以外に、水、食品、および同等物等の他の液体サンプルが、環境または食糧生産検定の実施に使用されてもよい。加えて、被分析物を含有することが公知である、または疑われる固体物質が、サンプルとして使用されてもよい。ある事例では、液体媒体を形成するように、または被分析物を放出するように、固体サンプルを修飾することが有益であり得る。 40

【0033】

本明細書で使用されるように、「光」という用語は、概して、光子として量子化可能な電磁放射線を指す。本開示に関連する場合、光は、紫外線(UV)から赤外線(IR)に及 50

ぶ波長において伝搬してもよい。本開示では、「光」という用語は、可視範囲内の電磁放射線に限定されることを意図していない。本開示では、「光」、「光子」、および「放射線」という用語は、同義的に使用される。

#### 【0034】

本発明は、通常の蛍光検出(FD)、時間分解蛍光(TRF)検出、または両方の組み合わせを使用する、長い寿命の蛍光染料およびアップコンバージョン蛍光体(UCP)を含む、種々のタイプのフルオロフォアを多重化するための方法を対象とする。蛍光発光におけるスペクトルおよび時間差の組み合わせが、複数の染色からの検定において信号を分離する能力を増進するために使用される。いわゆるマルチモードリーダ等のカートリッジベースの光学プレートリーダを組み込む、装置およびシステムを含む、本明細書に開示される方法のうちのいずれかの全てまたは一部を行うために構成される、多重化蛍光検出装置およびシステムも提供される。

10

#### 【0035】

従来のTRF検出は、光の短いパルスで蛍光標識を励起させ、次いで、典型的には、残りの長寿命蛍光信号を測定する前に、励起後ある時間待機することを伴う。このようにして、任意の短寿命蛍光背景信号および散乱励起放射線が、排除される。背景信号の大部分を排除する本能力は、従来の蛍光よりも2~4桁大きい感度をもたらす。したがって、TRF検出は、ある蛍光物質の蛍光特性を利用することによって、発光源から、または(励起放射線の散乱から生じる)散乱プロセスから背景信号を低減させるように設計される。

#### 【0036】

TRFのための蛍光標識の典型的選択基準は、比較的長い発光寿命を含む。上記で示されるように、これは、任意の短寿命背景信号が消散した後に、標識がその信号を十分に発するように所望される。長い蛍光寿命はまた、時間ゲート蛍光測定のためにフラッシュランプ励起および低コスト回路を使用することも可能にする。加えて、蛍光標識は、比較的大きい「ストークスシフト」を有し得る。「ストークスシフト」という用語は、概して、励起線または帯よりも長い発光波長への発光放射線のスペクトル線または帯の変位として定義される。比較的大きいストークスシフトは、蛍光標識の励起波長がその発光波長から遠く離れて留まることを可能にし、励起および発光波長の間の大い違いが、発せられた信号から励起放射線を排除することをより容易にするため、望ましい。さらに、大きいストークスシフトはまた、サンプル中の蛍光分子からの干渉、および/または一部の体液(例えば、血液)とともに存在するタンパク質またはコロイドに起因する光散乱も最小限にする。加えて、大きいストークスシフトはまた、背景干渉を排除するための高価な高精度フィルタの要件も最小限にする。

20

30

#### 【0037】

比較的長い発光寿命および比較的大きいストークスシフトを両方とも有する、1つのタイプの蛍光化合物は、サマリウム(Sm(III))、ジスプロシウム(Dy(III))、ユーロピウム(Eu(III))、およびテルビウム(Tb(III))のキレート等のランタニドキレートである。そのようなキレートは、実質的により短い波長におけるキレートの励起後に、強く赤方偏移した狭帯域の長寿命発光を呈することができる。典型的には、キレートは、分子中のランタニドの近くに位置する発色団に起因する、強い紫外線(UV)励起帯を保有する。発色団による励起に続いて、励起エネルギーは、励起された発色団からランタニドに転送されることができる。この後には、ランタニドに特徴的な蛍光発光が続く。ランタニドキレートは、例えば、フルオレセインのわずか約28ナノメートルと比較して、約250~約350ナノメートル(nm)の例外的に大きいストークスシフトを有する。また、ランタニドキレートの蛍光は、他の蛍光標識の約1~約20ナノ秒(ns)と比較して、約100~約1000マイクロ秒(μs)の寿命を伴って、長寿命である。加えて、これらのキレートは、典型的には、約50%発光において約10ナノメートル未満の帯域幅を有する、非常に狭い発光スペクトルを有する。

40

#### 【0038】

比較的長い発光寿命および比較的大きいストークスシフトを両方とも有する、別のタイプ

50

の蛍光化合物は、ルテニウム (Ru(II))、オスミウム (Os(II))、およびレニウム (Re(I)) のキレート等の遷移金属キレートである。遷移金属キレートの蛍光寿命は、典型的には、約 0.1 ~ 約 10 マイクロ秒である。

【0039】

上記で説明されるように、本発明は、一側面では、TRF検出を使用して長い寿命の蛍光染料を多重化する新規の方法を対象とする。蛍光発光におけるスペクトルおよび時間差の組み合わせが、複数の染色からの検定において信号を分離する能力を増進するために使用される。本方法は、1%を下回るまで、より具体的には、0.01%を下回るまで、クロストークを低減させるように、TRF染料の間の時間ドメインおよび波長ドメイン差を両方とも活用する。

10

【0040】

本発明の多重化TRF検出方法は、従来の方法と比較して、いくつかの利点を提供する。例えば、改良された定量化が、基準または標準として1つのチャンネルを使用することによって、達成されてもよい。例えば、ウェスタンブロットを行うようにゲル上のカラムの中へサンプルを装填するための従来の方法を使用するとき、どれだけのサンプルが実際にレーンに辿り着くかに有意な誤差があり得る。1つのチャンネルで(ハウスキーピングタンパク質としても公知である)基準タンパク質信号を利用することによって、次いで、第2(または第3)のチャンネル内の「未知の」タンパク質からの信号は、相対正確度を向上させるように基準チャンネルに正規化されることができる。

【0041】

本発明の多重化TRF検出方法の別の利点は、それらが改良されたレシオメトリック測定を可能にすることである。ウェスタンブロットの一般的な用途は、信号伝達事象のインジケータとしてタンパク質のリン酸化反応を見て、未修飾(または総)タンパク質に対するリンタンパク質の比を計算することである。そのような比を計算するために単一チャンネルウェスタンブロットを使用することは、第1のタンパク質を測定し、ウェスタンブロット膜を剥離し、次いで、第2のタンパク質を再精査して測定することを要求する。2チャンネル検出は、同時にリンおよび総タンパク質の両方の精査ならびに測定を可能にする。これは、剥離して再精査する必要がないことによって、実験誤差の原因が除去されるため、有意な時間を節約し、正確度を増加させる。

20

【0042】

図1は、いくつかの実施形態による、多重化TRF検出のための方法100のフローチャートである。最初に、第1の被分析物に結合された第1の蛍光標識と、第2の被分析物に結合された第2の蛍光標識とを備える、サンプルが提供され、第1の蛍光標識は、背景蛍光発光寿命よりも少なくとも3倍長い第1の蛍光発光寿命と、第1の励起波長と、第1の発光波長とを有し、第2の蛍光標識は、第2の蛍光発光寿命と、第2の励起波長と、第2の発光波長とを有し、第2の蛍光発光寿命は、第1の蛍光発光寿命よりも少なくとも5倍長い(ステップ110)。次に、第1の蛍光標識は、第1の励起波長を有する第1の励起光で励起させられ、第1の蛍光標識は、第1の発光波長を有する第1の検出信号を発する(ステップ120)。次いで、第2の蛍光標識は、第2の励起波長を有する第2の励起光で励起させられ、第2の蛍光標識は、第2の発光波長を有する第2の検出信号を発する(ステップ130)。次に、第1の検出信号の強度が測定され、第1の検出信号の強度は、サンプル中の第1の被分析物の量と正の相関性がある(ステップ140)。次いで、第2の検出信号の強度が測定され、第2の検出信号の強度は、サンプル中の第2の被分析物の量と正の相関性がある(ステップ150)。特定の実施形態では、第2の蛍光発光寿命は、第1の蛍光発光寿命よりも少なくとも100倍または少なくとも1,000倍長い。

30

40

【0043】

いくつかの実施形態では、図1のフローチャートは、上記で説明される方法100のステップの全てまたは一部を実施するために構成される、サンプル分析装置を概略的に表すと見なされてもよい。サンプル分析装置のさらなる実施例が、以下で説明される。

【0044】

50

他の特定の実施形態では、多重化TRF検出を行うための方法は、100マイクロ秒～1ミリ秒の範囲内の第2の蛍光発光寿命を有する、第2の蛍光標識の使用を含み、より具体的には、第2の蛍光標識は、サマリウム(Sm(III))、ジスプロシウム(Dy(III))、ユーロピウム(Eu(III))、およびテルビウム(Tb(III))のランタニドキレートから成る群から選択される。さらなる特定の実施形態では、多重化TRF検出を行うための方法は、0.1マイクロ秒～10マイクロ秒の範囲内の第1の蛍光発光寿命を有する、第1の蛍光標識の使用を含み、より具体的には、第1の蛍光標識は、ルテニウム(Ru(II))、オスミウム(Os(II))、およびレニウム(Re(I))の遷移金属キレートから成る群から選択される。

【0045】

さらなる特定の実施形態では、多重化TRF検出を行うための方法内の蛍光標識は、約20ナノメートルを上回る、いくつかの実施形態では、100ナノメートルを上回る、いくつかの実施形態では、約250～約350ナノメートルのストークスシフトを有する。

【0046】

さらなる実施形態では、ステップ110に先立って、サンプルは、以下のステップ、すなわち、

a) サンプルを、

i) 第1の被分析物に特異的に結合する第1の抗体と、

ii) 第2の被分析物に特異的に結合する第2の抗体と

iii) 第1の抗体に特異的に結合する第1の蛍光抗体複合体であって、第1の蛍光抗体複合体は、第1の蛍光発光寿命と、第1の励起波長と、第1の発光波長とを有する、第1の蛍光標識を備える、第1の蛍光抗体複合体と

iv) 第2の抗体に特異的に結合する第2の蛍光抗体複合体であって、第2の蛍光抗体複合体は、第2の蛍光発光寿命と、第2の励起波長と、第2の発光波長とを有する、第2の蛍光標識を備える、第2の蛍光抗体複合体と、

接触させるステップと、

b) 抗体および抗体複合体が免疫複合体を形成することを可能にするための十分な条件下で、かつ十分な時間にわたって、サンプルを培養するステップとに従って調製される。いくつかの実施形態では、抗体および抗体複合体は、溶液中の混合物の形態で提供されてもよい、または抗体および/または抗体複合体は、固形支持体の表面に付着させられてもよい。固形支持体は、磁気ビーズ、金ナノ粒子、生分解性有機ポリマーナノ粒子、マイクロウェル、またはマイクロタイタープレートであってもよいが、それらに限定されない。他の実施形態では、第1または第2の抗体は、それらに直接付着させられ、抗体複合体の必要性を排除する、第1または第2の蛍光標識を有してもよい。故に、本開示される方法は、膜に結合されたタンパク質、ビーズに結合されたタンパク質、(潜在的に分離された)マイクロ流体チャネル内のタンパク質、マルチウェルプレートのウェル内のタンパク質、および/または(潜在的に分離された)ゲルまたは他の粘性媒体内のタンパク質の検出等の被分析物の検出のための広範囲の検定を包含する。

【0047】

他の特定の実施形態では、多重化TRF検出を行うための方法内のサンプルは、付加的被分析物に結合された少なくとも1つの付加的蛍光標識を備える。付加的蛍光標識は、標識特有の励起波長と、標識特有の発光波長と、背景発光寿命よりも少なくとも3倍長くあり得る、標識特有の蛍光発光寿命とを有する。さらに、第1の蛍光発光寿命、第2の蛍光発光寿命、および標識特有の蛍光発光寿命はそれぞれ、相互と少なくとも1桁異なり得る。付加的蛍光標識は、標識特有の励起波長を有する標識特有の励起光で励起させられ、それによって、付加的蛍光標識は、標識特有の発光波長を有する標識特有の検出信号を発する。次いで、標識特有の検出信号の強度が、測定され、標識特有の検出信号の強度は、サンプル中の付加的被分析物の量と正の相関性がある。付加的被分析物に結合された少なくとも1つの付加的蛍光標識はまた、異なる被分析物に結合された複数の異なる蛍光標識を備えてもよい。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 4 8 】

さらなる実施形態では、多重化 T R F 検出を行うための方法内で、第 1 の被分析物は、基準タンパク質であり、第 2 の被分析物は、未知のタンパク質であり、さらに、第 2 の検出信号は、第 1 の検出信号に正規化される。

## 【 0 0 4 9 】

別の実施形態では、多重化 T R F 検出を行うための方法内で、第 1 の被分析物は、タンパク質であり、第 2 の被分析物は、タンパク質の修飾バージョンであり、さらに、未修飾タンパク質に対する修飾タンパク質の比が、計算され、具体的には、タンパク質の修飾バージョンは、タンパク質のリン酸化バージョンである。

## 【 0 0 5 0 】

さらなる実施形態では、1つまたはそれを上回るアップコンバージョン蛍光体 ( U C P ) が、蛍光標識として利用されてもよく、本明細書に説明されるランタニドキレートおよび遷移金属キレート等の他のタイプの蛍光標識 ( すなわち、「非 U C P」標識 ) と組み合わせて利用されてもよい。当業者によって理解されるように、U C P は、正のストークスシフトではなくて反ストークスシフト ( または負のストークスシフト ) を呈する。すなわち、光子アップコンバージョンのプロセスでは、U P C による励起光の 2 つまたはそれを上回る光子の順次吸収は、励起波長よりも長い波長ではなくて励起波長よりも短い波長において、U P C による発光をもたらす。典型的実施例では、U P C は、赤外線 ( I R ) スペクトル ( 例えば、980 nm ) 内の光を吸収することに対応して、可視スペクトル ( 例えば、600 nm ) 内の発光を発する。本明細書に説明される非 U C P 蛍光標識のように、U C P 蛍光標識は、長期発光寿命を有するように構成 ( 調合、加工 ) されることができる。また、U C P 蛍光標識が照射される I R 波長は、非 U C P 蛍光標識が照射される U V 波長と有意に異なり ( すなわち、スペクトル的に遠く分離され )、背景雑音が有意に低減させられることを可能にする。U C P 標識の発光波長もまた、測定信号の非常に良好な分解能および非常に低減したクロストークを提供するために、非 U C P 標識と十分に異なる。本開示のある側面によると、U C P 標識および 1 つまたはそれを上回る異なる非 U C P 標識等の異なる標識の使用は、非常に少ないクロストークをもたらす、異なる励起波長、異なる発光波長、および異なる発光寿命の使用を伴う。非 U C P 標識の場合のように、具体的励起波長、発光波長、および発光寿命は、所与の U C P の特定の構成に依存する。多重化 ( 例えば、二重、三重等 ) 実験において 1 つまたはそれを上回る U C P 標識の使用を 1 つまたはそれを上回る非 U C P 標識 ( 例えば、ランタニドキレートおよび / または遷移金属キレート ) と組み合わせることはまた、要求されるサンプル実験時間の量を削減し得る。加えて、ある U C P 標識が、U C P と関連付けられる非常に低い背景信号に起因して、通常の蛍光ベースの実験、すなわち、サンプルを照射しながら ( すなわち、励起と発光の検出 / 測定との間で要求される遅延が殆どまたは全くない状態で ) サンプルを同時に検出 / 測定するために有用である。したがって、本明細書に開示されるいくつかの実施形態では、本方法は、非 U C P 標識と組み合わせてそのような U C P を利用するとき、T R F または通常の蛍光および T R F の組み合わせを伴ってもよい。

## 【 0 0 5 1 】

非限定的実施例として、U C P は、反ストークスシフトを呈する、ランタニドをドーブした、または遷移金属をドーブした無機化合物であってもよい。無機化合物は、アップコンバージョン活性を有効にする、または増進する、1つまたはそれを上回るドーバントでドーブされた透明ホスト格子を含む、結晶性物質であってもよい。ある U C P の基礎を形成する無機化合物の実施例は、種々のハロゲン化物 ( 例えば、Na Y F<sub>4</sub>、Y F<sub>3</sub>、L a F<sub>3</sub> )、酸化物 ( 例えば、Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Z r O<sub>2</sub> )、および酸硫化物 ( 例えば、Y<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S、L a<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S ) を含むが、それらに限定されない。好適なドーバントの実施例は、三価ランタニドイオン、ならびにエルビウム ( E r<sup>3+</sup> )、ツリウム ( T m<sup>3+</sup> )、ホルミウム ( H o<sup>3+</sup> )、プラセオジウム ( P r<sup>3+</sup> )、ネオジウム ( N d<sup>3+</sup> )、ジスプロシウム ( D y<sup>3+</sup> )、イッテルビウム ( Y b<sup>3+</sup> )、および / またはサマリウム ( S m<sup>3+</sup> ) 等の遷移金属を含むが、それらに限定されない。別の実施例として、U C P は、その内容全体が

10

20

30

40

50

参照することによって本明細書に組み込まれる、Riuttamaki, Terhi, UP CONVERTING PHOSPHOR TECHNOLOGY: Exceptional Photoluminescent Properties Light Up Homogeneous Bioanalytical Assays, University of Turku Publications (2011)によって説明されるように、利用されてもよい。別の実施例として、好適なUCPは、Intelligent Material Solutions Inc. (Princeton, New Jersey, USA)によって製造され、Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Missouri, USA)によって市販されているSUNSTONE (R) UCPナノ結晶であってもよい。

10

**【0052】**

本明細書に開示される方法は、好適なサンプル分析装置の使用を伴って実装されてもよい。好適なサンプル分析装置の実施例が、図2-3Hを参照して以下で説明される。

**【0053】**

図2は、いくつかの実施形態による、サンプル分析装置200の実施例の概略図である。サンプル分析装置200は、これらの用語が本明細書の他の場所で定義されているように、複数の被分析物を検出するようにサンプル上で多重化蛍光検出を行うために構成される。いくつかの実施形態では、サンプル分析装置200は、ユーザが、行われる所望のタイプの光学測定、すなわち、TRF測定だけでなく、他の蛍光ベースの測定、ならびに、例えば、ルミネセンス、吸光度、細胞画像化等の他のタイプの光学測定を選択することを可能にするように構成される。例えば、ユーザは、所望のタイプの蛍光測定を行うようにサンプル分析装置200の光学部を再構成することが可能であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、サンプル分析装置200は、マルチモードリーダであってもよい。例えば、マルチモードリーダとして、サンプル分析装置200は、ユーザが、いくつかの利用可能な異なるカートリッジの間で用途特有のカートリッジを選択し、所望の用途に特有の光学および電気回路を確立するようサンプル分析装置200の中へ選択されたカートリッジを装填することを可能にすることによって、再構成可能であり得る。選択されたカートリッジは、サンプル分析装置200に結合され、それによって、サンプル分析装置200は、選択された実験を実施するために適切に構成される。カートリッジは、例えば、多重化TRF検出等の特定のタイプの用途に特有である、またはそのために最適化される光学部を含有してもよい。カートリッジ内に収納される内部光学部は、カートリッジの筐体の光学ポートを通して、サンプル分析装置200の筐体内に収納される外部光学部と通信してもよい。いくつかのカートリッジは、加えて、1つまたはそれを上回る内部光源および/または1つまたはそれを上回る光検出器を含んでもよい。カートリッジベースのマルチモードリーダの実施例は、その内容が参照することによってそれらの全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第9,188,527号および第8,119,066号で説明される。

20

30

**【0054】**

概して、光学ベースのサンプル分析器具の中に提供される種々の構成要素の構造および動作は、当業者によって理解され、したがって、本開示される主題の理解を促進するように、簡潔にのみ本明細書で説明される。図示される実施形態では、サンプル分析装置200は、分析下の1つまたはそれを上回るサンプルを支持するために構成される、サンプル支持体204と、サンプルから発せられる放射光212を受光して測定するために構成される、光検出器208とを含む。サンプル上で光学測定を実施するための動作位置にあるときのサンプル支持体204、ならびに図2に図示される光検出器208および他の構成要素は、サンプル分析装置200の装置筐体206に封入されてもよい。装置筐体206は、サンプル支持体204（および提供される場合はカートリッジ）を装填し、サンプル分析装置200の内部領域にアクセスするため等の1つまたはそれを上回るパネル、ドア、引き出し等を含んでもよい。

40

**【0055】**

50

概して、サンプル支持体 204 は、分析中に 1 つまたはそれを上回るサンプルを保持するために構成される、1 つまたはそれを上回るコンテナであってもよい。非限定的実施例として、サンプル支持体 204 は、マルチウェルプレート（マイクロタイタープレート、マイクロプレート、または光学プレートとしても公知である）、1 つまたはそれを上回るキュベット、個別のサンプルを含有するスポットまたはプロットを支持する基板等であってもよい。サンプル支持体 204 は、1 つまたはそれを上回る軸に沿ってサンプル支持体 204 を移動させるために構成される、サンプルキャリア（またはサンプル支持体キャリア）210 上に配置されてもよい。例えば、サンプルキャリア 210 は、手動作動型、半自動、または電動式ステージまたはプラットフォームであってもよい。サンプルキャリア 210 は、図 2 の矢印によって示されるように、装置筐体 206 の中へ、かつそこから外へ移動可能であり得る。サンプル、または 1 つまたはそれを上回るサンプルを含有するサンプル支持体 204 は、サンプルキャリア 210 上に搭載され得、その一方で、サンプルキャリア 210 は、例えば、サンプルキャリア 210 が少なくとも部分的に装置筐体 206 の外側に位置付けられる外側位置にあり得る。したがって、サンプルキャリア 210 はまた、サンプル支持体と見なされてもよい。次いで、サンプルキャリア 210 は、サンプルをサンプル分析装置 200 の光学構成要素および/または液体取扱構成要素と整合させる（または複数のサンプルを逐次的に整合させる）よう、サンプルキャリア 210 が完全に装置筐体 206 の中に位置付けられる、内側位置まで移動させられてもよい。

10

**【0056】**

種々の実施形態では、光検出器 208 の光学入力端は、典型的には、レンズを含む。出力端は、電力を提供し、光検出器 208 によって生成される測定信号が、サンプル分析装置 200 を提供される、またはサンプル分析装置 200 の外部にある信号処理回路（例えば、データ取得回路）に出力されることを可能にするように、電気コネクタ（例えば、接点、端子、ピン、ワイヤ支持体等）を含んでもよい。実施形態に応じて、光検出器 208 は、検出される発光波長に対する感度を最適化するように、必要に応じて、光電子増倍管（PMT）、フォトダイオード、電荷結合素子（CCD）、相補型金属酸化膜半導体（CMOS）デバイス等のアクティブピクセルセンサ（APS）等であってもよい。

20

**【0057】**

典型的実施形態では、サンプル分析装置 200 はさらに、サンプルから光検出器 208 に放射光 212 を伝達するために構成される、発光光学部 216 を含む。発光光学部 216 はまた、放射光 212 を処理するために構成されてもよい。処理の実施例は、収集、集束、平行化、フィルタ処理、ビーム操向、ビーム分割、および光学経路切替を含むが、それらに限定されない。したがって、実施形態に応じて、発光光学部 216 は、1 つまたはそれを上回るレンズ、読取ヘッド、開口、フィルタ、光ガイド、鏡、ビームスプリッタ、モノクロメータ、回折格子、プリズム、光学経路スイッチ等を含んでもよい。発光光学部 216 は、サンプルの上方（例えば、上部読取ヘッド）および/またはサンプルの下方（例えば、底部読取ヘッド）から放射光 212 を受光するために構成されてもよい。

30

**【0058】**

いくつかの実施形態では、サンプル分析装置 200 はさらに、サンプルがサンプル分析装置 200 の中に動作可能に位置付けられる前または後に、液体をサンプルに（例えば、選択されたウェルの中へ、またはサンプル支持体 204 の選択されたプロットの上に）添加するために構成される、液体分注システム 220（例えば、注入器針、管類、ポンプ、リザーバ等）を含む。例えば、標識剤が、当業者によって理解されるように、蛍光、ルミネセンス、または他のタイプの測定のために、サンプルに添加されてもよい。いくつかの実施形態では、2 つまたはそれを上回る異なるタイプの試薬が、添加されてもよい。

40

**【0059】**

本明細書に開示される蛍光検出技法等の励起を要求する実施形態では、サンプル分析装置 200 は、サンプルに指向される所望の波長の励起光 228 を生成するための 1 つまたはそれを上回る光源 224 を含む。実施形態に応じて、光源 224 は、広帯域光源（例えば、フラッシュランプ）、または 1 つまたはそれを上回る発光ダイオード（LED）、レー

50

ザダイオード（LD）、レーザ等を含んでもよい。ユーザが所望の励起波長を選択することを可能にするように、複数の光源224が提供されてもよい。典型的実施形態では、サンプル分析装置200はさらに、光源224からサンプルに励起光228を伝達するために構成される、励起光学部232を含む。励起光学部232は、例えば、上記のように、1つまたはそれを上回るレンズ、読取ヘッド、開口、フィルタ、光ガイド、鏡、ビームスプリッタ、モノクロメータ、回折格子、プリズム、光学経路スイッチ等を含んでもよい。

#### 【0060】

光源224がLED光源である、実施形態では、サンプル分析装置200（またはサンプル分析装置200に動作可能に結合されるカートリッジ）は、LED光源をパルス化することが可能である電子電流供給部、LED光源からの励起光の強度を変化させるための制御、および/またはLED光源を安定させるために使用され得る、LED光源によって生成される励起光の強度を測定することが可能であるフォトダイオードを有してもよい。好ましいLED光源は、Lumileds（San Jose, CA）、Luxeon Star, Nichia（Tokushima, Japan）、およびRoithner-Laser（Vienna, Austria）から入手される。他の実施形態では、光源224は、キセノンフラッシュランプモジュールであってもよく、モジュールは、光源としてキセノンフラッシュランプを有し、パルス状光ビームを生成するように対応する電子機器を有する。キセノンフラッシュランプ等の広帯域光源を使用する場合において、光学システムは、励起光の波長を制御するための波長セレクトラ、フィルタ、または同等物を含む。好ましいキセノンフラッシュランプモジュールは、Excelitas（Waltham, MA）およびHamamatsu Photonics（Japan）から入手される。

#### 【0061】

また、図2で概略的に図示されるように、サンプル分析装置200はさらに、コンピューティングデバイス（またはシステムコントローラ）236を含んでもよい。当業者によって理解されるように、コンピューティングデバイス236は、サンプル分析装置200の種々の機能的側面を制御、監視、および/または時間調整するため、および/または光検出器208からの測定信号等のデータまたは他の信号をサンプル分析装置200から受信し、制御信号を光検出器208および/または他の構成要素に伝送するために構成される、1つまたはそれを上回るモジュールを表してもよい。全てのそのような目的のために、コンピューティングデバイス236は、コンピューティングデバイス236と光検出器208との間の鎖線によって描写されるように、有線または無線通信リンクを介してサンプル分析装置200の種々の構成要素と通信してもよい。簡単にするために、コンピューティングデバイス236とサンプル分析装置200の他の構成要素との間に存在し得る、他の通信リンクは、示されていない。典型的実施形態では、コンピューティングデバイス236は、全体的制御を提供する主要電子プロセッサを含み、かつ専用制御動作または具体的信号処理タスクのために構成される1つまたはそれを上回る電子プロセッサを含んでもよい。コンピューティングデバイス236はまた、データおよび/またはソフトウェアを記憶するための1つまたはそれを上回るメモリおよび/またはデータベースを含んでもよい。コンピューティングデバイス236はまた、本明細書に開示される方法のうちのいずれかを行うための命令を含む、コンピュータ可読媒体236を含んでもよい。コンピューティングデバイス236の機能モジュールは、回路または他のタイプのハードウェア（またはファームウェア）、ソフトウェア、または両方を備えてもよい。例えば、モジュールは、光検出器208から測定信号を受信するための信号処理（またはデータ取得）回路と、グラフィカルデータを生成するため等の測定信号を処理するためのソフトウェアとを含んでもよい。コンピューティングデバイス236はまた、ユーザ入力デバイス（例えば、キーボード、タッチスクリーン、マウス、および同等物）、ユーザ出力デバイス（例えば、表示画面、プリンタ、視覚インジケータまたはアラート、可聴インジケータまたはアラート、および同等物）、ソフトウェアによって制御されるグラフィカルユーザインターフェース（GUI）、および電子プロセッサによって可読である媒体（例えば、ソフトウェ

10

20

30

40

50

ア、データ、および同等物で具現化される論理命令)をロードするためのデバイス等の1つまたはそれを上回るタイプのユーザインターフェースデバイスを表してもよい。コンピューティングデバイス236は、コンピューティングデバイス236の種々の機能を制御および管理するためのオペレーティングシステム(例えば、Microsoft Windows(登録商標)ソフトウェア)を含んでもよい。

#### 【0062】

いくつかの実施形態によると、分析システム200を利用する光学測定を伴う実験が、以下のように実装されてもよい。サンプルは、サンプル分析装置200の中に導入され、サンプル分析装置200の光学部および他の構成要素に対して適切な動作位置に置かれる。概して、サンプルの「動作」位置は、「光学的に整合した」位置、すなわち、サンプルからの光学データ取得のために十分な光学経路を確立する位置である。実験に応じて、動作位置はまた、サンプル分析装置200と「流体的に整合させられている」、すなわち、液体分注システム220を操作すること等によって、サンプル上に流体を分注することができるよう位置付けられている、サンプルに対応してもよい。サンプル導入は、マイクロプレートの1つまたはそれを上回るウェルまたは他のタイプのサンプル支持体204の中に1つまたはそれを上回るサンプルを装填するステップ(例えば、当業者によって理解されるように、ウェスタンブロット等のポッティング技法に従ってサンプルを調製するステップ)と、上記のようなサンプルキャリア210の使用等によって、サンプル分析装置200の中にサンプル支持体204を装填または搭載するステップとを伴ってもよい。また、上記のように、サンプルおよび行われる測定のタイプに応じて、サンプルは、当業者によって理解されるように、サンプル分析装置200の中に位置付けられることに先立って、調製または処理(培養、混合、均質化、遠心分離、緩衝、試薬添加、固相抽出等の分析分離、クロマトグラフィ、電気泳動等)を受けてもよい。

10

20

#### 【0063】

サンプル導入に加えて、サンプル分析装置200またはそのある構成要素(光学部、電子機器等)は、行われる具体的タイプの測定を実装するために構成される必要があり得る。例えば、カートリッジベースである場合、適切なカートリッジ(または複数のカートリッジ)が、サンプル分析装置200の中に設置されてもよい。カートリッジを設置した後、カートリッジの中に提供される光学部は、サンプル分析装置200の筐体206内の光学回路の一部になる。例えば、カートリッジ光学部は、発光光学部216および光検出器208と、いくつかの実施形態では、また、励起光学部232および光源224と整合させられ(光学連通し)てもよい。カートリッジを設置することは、カートリッジに、および/またはそこから、電力、データ、ならびに制御信号を伝送するための電気経路を確立することをもたらす。

30

#### 【0064】

次いで、サンプルは、蛍光に関して、液体分注システム220を使用する試薬の添加、および/または光源224ならびに関連付けられる励起光学部232を使用する照射/励起を包含し得る、サンプルからの光子の放出を誘発するように、必要に応じて処理される。発光光学部216は、サンプルから放射光212を収集し、放射光212を光検出器208に指向する。光検出器208は、これらの光学信号を電気信号(検出器信号または測定信号)に変換し、上記で説明されるようなサンプル分析装置200のコンピューティングデバイス236によって提供され得るように、電気信号を信号処理回路に伝送する。複数のサンプルの場合、サンプル支持体204は、各付加的サンプルを実験に利用されている光学部と連続的に整合させるように(上記で説明されるようなサンプルキャリア210を使用することによって等)移動させられてもよく、それによって、測定が、全てのサンプルから連続的に得られる。

40

#### 【0065】

上記のように、サンプル分析装置200は、本明細書に開示される方法のうちのいずれかの全てまたは一部を実施するために利用されてもよい。故に、サンプル分析装置200はまた、蛍光検出装置と称されてもよい。例えば、光源224は、サンプルに、サンプルの

50

第1の蛍光標識を励起させるために最適化される第1の励起波長を有する、第1の励起信号、およびサンプルの第2の蛍光標識を励起させるために最適化される第2の励起波長を有する、第2の励起信号を照射するように操作されてもよい。光検出器208は、第1の励起信号による励起にตอบสนองして、第1の発光波長においてサンプルから発せられる第1の検出信号、および第2の励起信号による励起にตอบสนองして、第2の発光波長においてサンプルから発せられる第2の検出信号を測定するように操作されてもよい。これらの目的のために、いくつかの実施形態では、光源224は、少なくとも2つの離散光源を含んでもよく、および/または光検出器208は、少なくとも2つの離散光検出器を含んでもよい。

#### 【0066】

別の実施形態によると、多重化蛍光検出のための装置（または多重化蛍光検出装置）が提供される。ここで図3Aを参照すると、多重化蛍光検出のための装置300が示されている。サンプル332は、マイクロプレート、またはサンプルを支持する膜または基板等のサンプル支持体334上で、装置300内に保持されてもよい。装置300は、第1の励起光320を生成する第1の光源310と、第2の励起光322を生成する第2の光源312とを備える。装置300は、図2と併せて上記で説明されるように、それぞれ、第1の励起光320および第2の励起光322をサンプル332に指向するための構成要素を有する、第1の励起光光学システム324および第2の励起光光学システム326を有する。第1の被分析物330および第2の被分析物331を含有するサンプル332は、第1の放射光340および第2の放射光342を発する。装置300は、第1の放射光340を受光する第1の放射光光学システム344と、第2の放射光342を受光する第2の放射光光学システム346とを有する。次いで、第1の放射光光学システム344は、第1の放射光340を第1の検出器350に指向し、次いで、第2の放射光光学システム346は、第2の放射光342を第2の検出器352に指向する。前述の構成要素は、装置300の主要装置筐体（例えば、図2に図示される装置筐体206）の中に位置付けられてもよい。

#### 【0067】

図3B-3Hは、いくつかの実施形態にしたがい、装置300の種々の構成要素が、1つまたはそれを上回るカートリッジの内側または外側に含有されるものとして図示される、図3Aに図示される装置300の構成要素の概略図である。すなわち、そのようなカートリッジは、概して、装置300の1つまたはそれを上回る構成要素を封入する（含有する）カートリッジ筐体を含んでもよい。そのようなカートリッジは、カートリッジが装置300の主要装置筐体（例えば、図2に図示される装置筐体206）の内部に封入されるように、装置300の中に装填または設置されてもよい。カートリッジベースのリーダの実施例は、上記で参照された米国特許第9,188,527号および第8,119,066号で説明される。

#### 【0068】

ここで図3Bを参照すると、装置300はさらに、第1の励起光光学システム324と、第2の励起光光学システム326と、第1の放射光光学システム344と、第2の放射光光学システム346とを備える、カートリッジ360を備える。

#### 【0069】

ここで図3Cを参照すると、装置300はさらに、第1の光源310と、第2の光源312と、第1の励起光光学システム324と、第2の励起光光学システム326とを備える、カートリッジ360を備える。

#### 【0070】

ここで図3Dを参照すると、装置300はさらに、第1の放射光光学システム344と、第2の放射光光学システム346と、第1の検出器350と、第2の検出器352とを備える、カートリッジ360を備える。

#### 【0071】

ここで図3Eを参照すると、装置300はさらに、第1の励起光光学システム324と、第1の光源310と、第1の放射光光学システム344と、第1の検出器350とを備え

10

20

30

40

50

る、カートリッジ 360 を備える。

【0072】

ここで図 3 F を参照すると、装置 300 はさらに、第 1 の光源 310 と、第 2 の光源 312 と、第 1 の励起光光学システム 324 と、第 2 の励起光光学システム 326 と、第 1 の放射光光学システム 344 と、第 2 の放射光光学システム 346 と、第 1 の検出器 350 と、第 2 の検出器 352 とを備える、カートリッジ 360 を備える。

【0073】

ここで図 3 G を参照すると、装置 300 はさらに、第 1 の光源 310 と、第 1 の励起光光学システム 324 と、第 1 の放射光光学システム 344 と、第 1 の光検出器 350 とを備える、第 1 のカートリッジ 360 を備える。装置 300 はさらに、第 2 の光源 312 と、第 2 の励起光光学システム 326 と、第 2 の放射光光学システム 346 と、第 2 の光検出器 352 とを備える、第 2 のカートリッジ 370 を備える。代替実施形態では、第 1 のカートリッジ 360 は、示されるような第 1 の光源 310 および第 1 の光検出器 350 の両方を含有しなくてもよく、さらなる実施形態では、第 1 の光源 310 および第 1 の光検出器 350 は両方とも、第 1 のカートリッジ 360 の外部にあってもよい。同様に、第 2 のカートリッジ 370 は、示されるような第 2 の光源 312 および第 2 の光検出器 352 の両方を含有しなくてもよく、さらなる実施形態では、第 2 の光源 312 および第 2 の光検出器 352 は両方とも、第 2 のカートリッジ 370 の外部にあってもよい。

10

【0074】

付加的被分析物に結合された少なくとも 1 つの付加的蛍光標識を伴う蛍光検出の方法に関して、装置およびシステムは、付加的蛍光標識の励起ならびに検出を行うために構成されるであろうことが、当業者に理解されるであろう。例えば、標識特有の励起波長において標識特有の励起光を生成するために構成される付加的な光源、ならびに標識特有の励起光による励起にตอบสนองして、サンプルから発せられる標識特有の検出信号を測定するために構成される付加的な光検出器が、使用され得る。付加的被分析物に結合された少なくとも 1 つの付加的蛍光標識が、異なる被分析物に結合された複数の異なる蛍光標識を備える場合、複数の異なる付加的な光源および光検出器が、使用され得る。

20

【0075】

実施例として、図 3 H に図示される実施形態では、装置 300 は、それぞれ、第 1 の励起光 320 および第 2 の励起光 322 を生成するために構成される、第 1 の光源 310 および第 2 の光源 312 に加えて、第 3 の励起光 327 を生成するために構成される、第 3 の光源 313 を含んでもよい。装置 300 はまた、それぞれ、第 1 の被分析物 330 および第 2 の被分析物 331 から発せられる第 1 の検出信号 340 および第 2 の検出信号 342 を受信して測定するために構成される、第 1 の光検出器 350 および第 2 の光検出器 352 に加えて、サンプル 332 の第 3 の被分析物 333 から発せられる第 3 の検出信号 343 を受信して測定するために構成される、第 3 の光検出器 353 を含んでもよい。装置 300 はまた、第 1 の励起光学部 324 および第 2 の励起光学部 326 に加えて、第 3 の励起光学部 327 を含んでもよい。装置 300 はまた、第 1 の発光光学部 344 および第 2 の発光光学部 346 に加えて、第 3 の発光光学部 347 を含んでもよい。

30

【0076】

本明細書に説明される他の実施形態のように、前述の構成要素のうちの 1 つまたはそれを上回るものは、装置 300 の中に除去可能に設置され得る、1 つまたはそれを上回るカートリッジ (図示せず) の中に提供されてもよい。本明細書に説明される他の実施形態のように、図 3 H に示される装置 300 は、異なる被分析物に結合された 2 つの異なる蛍光標識を採用する、二重測定に利用されてもよい。加えて、図 3 H に示される装置 300 は、異なる被分析物に結合された 3 つの異なる蛍光標識を採用する、三重測定に利用されてもよい。他の実施形態では、装置 300 は、3 つより多くの光源および / または 3 つより多くの光検出器を含んでもよい。

40

【0077】

本明細書に説明される他の実施形態のように、装置 200 はさらに、装置 300 の種々の

50

機能的側面を制御、監視、および/または時間調整し、光検出器からの検出信号等のデータまたは他の信号を装置 300 から受信し、制御信号を光検出器および/または他の構成要素に伝送するために構成される、上記で説明され、図 2 で概略的に図示される、コンピューティングデバイス（またはシステムコントローラ）236 等のコンピューティングデバイスを含んでもよい。例えば、二重実験では、コンピューティングデバイスは、所定の励起時間において、かつ所定の持続時間にわたって、それぞれ、第 1 の励起光 320 および第 2 の励起光 322 を生成するように、第 1 の光源 310 および第 2 の光源 312 を制御し、第 1 の測定時間において第 1 の検出信号 340 を測定するように第 1 の光検出器 350 を制御し、第 1 の測定時間と異なる第 2 の測定時間において第 2 の検出信号 342 を測定するように第 2 の光検出器 352 を制御するために構成されてもよい。コンピューティングデバイスはまた、第 1 の検出信号 340 および第 2 の検出信号 342 の測定に対応する、個別の光検出器 350 ならびに 352 からの電気出力を受信し、測定をサンプル 332 中の第 1 の被分析物 330 の量およびサンプル 332 中の第 2 の被分析物 331 の量と関連させるために構成されてもよい。コンピューティングデバイスはまた、第 2 の励起光 322 を生成することを中止するように第 2 の光源 312 を制御し、第 2 の励起光 322 を生成することを中止した後、第 2 の検出信号 342 を測定するように第 2 の光検出器 352 を制御するために構成されてもよい。

10

**【0078】**

別の実施例として、三重実験では、コンピューティングデバイスは、所定の励起時間において、かつ所定の持続時間にわたって、第 3 の励起光 323 を生成するように第 3 の光源 313 を制御し、第 1 の測定時間および第 2 の測定時間と異なる第 3 の測定時間において第 3 の検出信号 343 を測定するように第 3 の光検出器 353 を制御するために構成されてもよい。コンピューティングデバイスはまた、第 3 の励起光 323 を生成することを中止するように第 3 の光源 313 を制御し、第 3 の励起光 323 を生成することを中止した後、第 1 の測定時間および第 2 の測定時間と異なる第 3 の測定時間において第 3 の検出信号 343 を測定するように第 3 の光検出器 353 を制御するために構成されてもよい。コンピューティングデバイスはまた、第 3 の検出信号 343 の測定に対応する、第 3 の光検出器 353 からの電気出力を受信し、測定をサンプル 332 中の第 3 の被分析物 333 の量と関連させるために構成されてもよい。

20

**【0079】**

図 2 - 3 H に図示される実施形態のうちのいずれかでは、装置 300 のある構成要素は、1 つより多くのチャンネルに共通であり得る（またはそれらによって共有されてもよい）。したがって、提供される光源の数は、提供される光検出器の数、または励起または発光光学部のセットの数等と異なり得る。例えば、光検出器は、それが 2 つまたはそれを上回るチャンネルを経由して伝送される信号を検出することに効果的であることを可能にする、波長感度の範囲を有してもよい。別の実施例として、発光光学部は、2 つまたはそれを上回るチャンネルを経由して伝送される検出信号をフィルタ処理するために効果的な波長帯域通過を有する、発光フィルタを含んでもよい。共通または共有構成要素を提供することは、装置 300 のために要求される構成要素の総数と、それによって要求される全空間とを削減し得、装置 300 および/または装置 300 とともに利用されるカートリッジがよりコンパクトになることを可能にし得る。

30

40

**【0080】**

代表的実施形態による、多重化蛍光検出のための方法の実施例が、ここで説明されるであろう。本明細書に説明される他の装置またはシステムもまた、本方法を実装するように構成され得ると理解の下で、本方法を実装するために利用され得る蛍光検出装置 300 の実施例を図示するものとして、図 3 H が主に参照される。

**【0081】**

本方法によると、分析されるサンプル 332 が提供される。サンプル 332 は、第 1 の被分析物 330 に結合された第 1 の蛍光標識と、第 2 の被分析物 331 に結合された第 2 の蛍光標識とを含んでもよい。第 1 の蛍光標識は、アップコンバーティング蛍光体（UCP

50



) 標識であってもよく、またはそれを含んでもよく、第 2 の蛍光標識は、非 U C P 標識であってもよい、またはそれを含んでもよい。本明細書に説明されるように、U C P 標識は、反ストークスシフトを呈する、ランタニドをドーブした、または遷移金属をドーブした無機化合物であってもよく、またはそれを含んでもよく、非 U C P 標識は、(正の)ストークスシフトを呈する、遷移金属キレートまたはランタニドキレートであってもよい、またはそれを含んでもよい。非限定的実施例として、非 U C P 標識のストークスシフトは、20 nm を上回ってもよい、または 100 nm を上回ってもよい、または 250 nm を上回ってもよい、または約 250 nm ~ 約 350 nm の範囲内であってもよい。

#### 【0082】

いくつかの実施形態では、本明細書の他の場所で説明されるように、サンプル 332 は、  
 サンプル 332 を、第 1 の被分析物 330 に特異的に結合する第 1 の抗体と、第 2 の被分析物 331 に特異的に結合する第 2 の抗体と、第 1 の抗体に特異的に結合する第 1 の蛍光抗体複合体であって、第 1 の (U C P) 蛍光標識である、またはそれを含む、第 1 の蛍光抗体複合体と、第 2 の抗体に特異的に結合する第 2 の蛍光抗体複合体であって、第 2 の (非 U C P) 蛍光標識である、またはそれを含む、第 2 の蛍光抗体複合体と接触させることによって、提供されてもよい。次いで、サンプル 332 は、抗体および抗体複合体が免疫複合体を形成することを可能にするための十分な条件下で、かつ十分な時間にわたって、培養されてもよい。

10

#### 【0083】

他の実施形態では、本明細書の他の場所で説明されるように、サンプル 332 は、サンプル 332 を、第 1 の被分析物に特異的に結合する第 1 の抗体と、第 2 の被分析物に特異的に結合する第 2 の抗体と接触させることによって、提供されてもよい。第 1 の蛍光標識は、第 1 の抗体に直接付着させられてもよく、および / または第 2 の蛍光標識は、第 2 の抗体に直接付着させられてもよい。

20

#### 【0084】

第 1 の蛍光標識は、第 1 の励起波長における第 1 の励起光 320 を照射される。それに応じて、第 1 の蛍光標識は、第 1 の発光波長における第 1 の検出信号 340 を発する。第 2 の蛍光標識は、第 1 の励起波長と異なる第 2 の励起波長における第 2 の励起光 322 を照射される。それに応じて、第 2 の蛍光標識は、第 1 の発光波長と異なり得る、第 2 の発光波長における第 2 の検出信号 342 を発する。本実施形態では、第 1 の励起波長は、近赤外範囲内であってもよく、第 1 の発光波長は、可視範囲内であってもよい。第 2 の励起波長は、紫外線範囲内であり、第 2 の発光波長は、第 2 の励起波長より長い。第 1 の蛍光標識の照射および第 2 の蛍光標識の照射は、同時に、または連続的に行われてもよい。

30

#### 【0085】

第 1 の検出信号 340 の強度が、第 1 の測定時間において測定される。第 2 の蛍光標識の照射が、中止され、その後、第 2 の検出信号 342 の強度が、第 1 の測定時間と異なり得る、第 2 の測定時間において測定される。第 1 の検出信号 340 の強度は、サンプル 332 中の第 1 の被分析物 330 の量と相関性があり、第 2 の検出信号 342 の強度は、サンプル 332 中の第 2 の被分析物の量と相関性がある。発光光学部 344、346、および 347 は、共通発光フィルタを通して、または異なる発光フィルタを通して、第 1 の検出信号 340 ならびに第 2 の検出信号 342 を指向するように構成されてもよい。

40

#### 【0086】

いくつかの実施形態では、本明細書の他の場所で説明されるように、U C P 標識は、長期発光寿命を有するかどうかにかかわらず、通常の方法に従って読取値を得る (または測定を行う) ために好適である。そのような場合において、第 1 の検出信号 340 の強度は、第 1 の蛍光標識を照射しながら測定されてもよい。他の実施形態では、本明細書の他の場所で説明されるように、U C P 標識は、T R F 技法に従って読取値を得ることによって活用される、長期発光寿命を有する。そのような場合において、第 1 の蛍光標識の照射が、中止され、その後、第 1 の検出信号の強度が、測定される。いずれの場合にも、第 1 の測定時間および第 2 の測定時間は、相互と異なり得る。また、(U C P 標識の) 第 1

50

の蛍光発光寿命および（非UCP標識の）第2の蛍光発光寿命も、相互と異なり得る。非限定的実施例として、第2の蛍光発光寿命は、0.1マイクロ秒～10マイクロ秒の範囲内、または100マイクロ秒～1ミリ秒の範囲内であってもよい。

【0087】

いくつかの実施形態では、本明細書の他の場所で説明されるように、第1の被分析物330および第2の被分析物331は、タンパク質または膜結合タンパク質である、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、被分析物330および331のうち的一方は、基準タンパク質であり、他方は、未知のタンパク質である。そのような場合において、いずれの被分析物330および331が基準タンパク質であるかに応じて、第2の検出信号342は、第1の検出信号340に正規化されてもよい、または第1の検出信号340は、第2の検出信号342に正規化されてもよい。さらなる実施形態では、被分析物330および331のうち的一方は、未修飾タンパク質であり、他方は、タンパク質の修飾またはリン酸化バージョンである。そのような場合において、未修飾タンパク質に対するタンパク質の修飾またはリン酸化バージョンの比は、第1の検出信号340および第2の検出信号342の測定された強度に基づいて計算されてもよい。

10

【0088】

いくつかの実施形態では、本明細書の他の場所で説明されるように、複数のサンプルが、マルチウェルプレートの別個のウェル、または膜または他の好適な基板の別個のプロットの中で提供される。本明細書に説明されるような多重化蛍光検出は、各サンプル上で、第1の蛍光標識を照射するステップ、第2の蛍光標識を照射するステップ、第1の検出信号340の強度を測定するステップ、および第2の検出信号342の強度を測定するステップを行うことによって、各サンプル上で行われてもよい。各サンプルは、（典型的には、連続的に）第1の光源310および第1の光検出器350と、そして、第2の光源312および第2の光検出器352と光学的に整合させられてもよい。選択された光源および光検出器とのサンプルの光学的整合は、カートリッジが光学的および/または電気的に蛍光検出装置300と連通するように、蛍光検出装置300の装置筐体の中に除去可能に設置されるカートリッジとのサンプルの光学的整合を伴ってもよい。本明細書の他の場所で説明されるように、カートリッジは、蛍光検出装置300の1つまたはそれを上回る構成要素を封入してもよい。

20

【0089】

他の実施形態では、本方法は、3つまたはそれを上回る異なる蛍光標識の使用に拡張されてもよく、本明細書に説明されるように、有意に低減した信号チャネルクロストーク等の利点を提供する、2つまたは異なる部類または群の蛍光標識（例えば、UCP、ランタニドキレート、遷移金属キレート等）の組み合わせを利用してもよい。

30

【0090】

三重蛍光検出のための方法の実施例として、サンプル332は、第3の被分析物333に結合された第3の蛍光標識を含む。抗体および抗体複合体、または直接結合が、実施形態に応じて行われてもよい。第3の被分析物333は、例えば、本明細書に説明されるように、タンパク質、膜結合タンパク質、基準タンパク質、未知のタンパク質、未修飾タンパク質、またはタンパク質の修飾またはリン酸化バージョンであってもよい。第3の蛍光標識は、第2の蛍光標識と異なる非UCP標識であってもよい、またはそれを含んでもよい。例えば、第2の蛍光標識は、遷移金属キレートであってもよく、またはそれを含んでもよく、第3の蛍光標識は、ランタニドキレートであってもよい、またはそれを含んでもよい。

40

【0091】

現在説明されている三重方法では、第3の蛍光標識は、第1の励起波長および第2の励起波長と異なる第3の励起波長における第3の励起光323を照射される。それに応答して、第3の蛍光標識は、第1の発光波長および第2の発光波長と異なり得る、第3の発光波長における第3の検出信号343を発する。次いで、第3の蛍光標識の照射が、中止され、その後、第3の検出信号343の強度が、第1の測定時間および第2の測定時間と異

50

なり得る、第3の測定時間において測定される。UCP含有被分析物(第1の被分析物330)の測定が、上記で説明されるように、通常の蛍光またはTRFによって取得されてもよい。

【0092】

いくつかの実施形態では、第1の励起波長は、近赤外範囲内であり、第1の発光波長は、可視範囲内であり、第2の励起波長および第3の励起波長のうちの少なくとも1つは、紫外線範囲内である。いくつかの実施形態では、第1の蛍光標識のUCPは、第1の蛍光発光寿命を有し、第2の蛍光標識は、第2の蛍光発光寿命を有し、第3の蛍光標識は、第3の蛍光発光寿命を有し、第1の蛍光発光寿命は、第2の蛍光発光寿命および第3の蛍光発光寿命と異なる。いくつかの実施形態では、第2の蛍光発光寿命は、第3の蛍光発光寿命よりも少なくとも5倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍、または少なくとも500倍、または1,000倍長い。

10

【実施例】

【0093】

タンパク質検出および特性評価は、医薬ならびに臨床研究のための重要なタスクである。例えば、タンパク質検出および特性評価は、細胞中のタンパク質の上方および下方調節、細胞信号伝達中のリン酸化反応、ならびにトランスフェクトタンパク質の発現についての情報を提供することができる。複数の技法が、プレートリーダーベースの酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、およびルミネセンス読み出しを利用するスポットまたはビーズベースの捕捉システムを含む、タンパク質分析のために開発されている。しかしながら、タンパク質の検出および定量化のための分析方法の改良が、疾患機構を理解することに役立つ、より良好なツールを提供するために重要である。

20

【0094】

いくつかのルミネセンスプローブが、タンパク質の検出および分析を可能にするために開発されている。典型的には、プローブは、次いで、着目タンパク質に選択的に結合する一次または二次抗体に付着させられる。これらのプローブは、別の反応性分子(例えば、基質)またはある他の刺激物(例えば、電流)と接触させられるときに光を生成するであろう、電磁放射線または反応種を用いた励起に応じて光を生成する、蛍光分子であることができる。そのようなプローブは、周知の化学反応を通して、タンパク質、ヌクレオチド、または小分子に付着させられることができるため、万能である。サンプル中のタンパク質の相対量は、タンパク質定量化を行う能力につながる、プローブによって生成される光の量によって判定されることができる。そのようなプローブはまた、低分解能(100~1000 μM)スポットまたはプロットから高分解能(<1 μM)細胞内画像化まで、着目タンパク質の空間的場所を判定することも促進する。これらのプローブは、有機染料、無機化合物、蛍光タンパク質、または酵素であることができる。

30

【0095】

化学発光(CL)は、生化学分析における、または表面結合および空間的に分離されたタンパク質上のタンパク質の検出のための一般的な方法である。後者の実施例は、ウェスタンブロット(WB)分析と称される、膜へのタンパク質の電気泳動転写を用いたドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)の方法である(Towbin et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76(9):4350-4354, Renart et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76(7):3116-3120)。電気化学発光(ECL)もまた、特別に設計されたマルチウェルプレート(例えば、Meso Scale Diagnostics, LLCの小会社である、Meso Scale Discovery(Gaithersburg, Md.)製MULTISPOT(R)およびMULTI-ARRAY™プレートならびにSECTOR™器具)内のスポットに結合されたタンパク質を検出するために適用されている。

40

【0096】

50

CLおよびECLの利点は、サブピコグラム/ml範囲内の溶液中のタンパク質のための検出の限界を伴う非常に高い感度である。しかしながら、これらのシステムは、一過性の信号を生成し、安定しておらず、検出のために要求される化学反応を生じるために複雑な手順を要求する。それらはまた、非線形システムであり(すなわち、1つのプローブが多くの光子を生成する)、不良な再現性を有するため、タンパク質量の定量化が所望される用途のために好適ではない。最後であるが有意な限界は、複数のCL信号を多重化できないことである。それらの発光は、非常に広く、それは、同一の空間場所からの2つの異なるCL発光を検出する能力を非常に困難にする。

#### 【0097】

蛍光(FL)プローブは、CLの限界のうちのいくつかを克服する。それらは、励起光子と発光光子との間の関係が一般に線形であるため、より良好な定量化のための能力を提供する。それらはまた、他の反応性分子によるプローブへのアクセスを提供する必要性がないため、より万能である。一般に、FLプローブはまた、概して、非反応性化学種であるため、特に光から保護されるときに、より安定している。おそらく、FLプローブの最も重要な利点は、それらが多重化を行う能力を提供することである。FL分子は、広範囲の励起および発光帯を伴う多種多様な形態で現れる。したがって、同一の空間場所における2つ(またはそれを上回る)プローブは、独立して励起させられ、検出チャンネルの間に最小限の重複(またはクロストーク)を伴って検出されることができる。同一の空間場所から最大4つの独立したフルオロフォアを検出する能力は、カラー帯域通過フィルタを使用して、定期的に報告される。より高いレベルの多重化が、フローサイトメトリおよびマルチスペクトル画像化を用いて報告されている(Stack et al. (2014) *Methods* 70(1): 46-58、Perfetto et al. (2004) 4(8): 648-655)。

#### 【0098】

残念ながら、FLプローブは、CLと同一のレベルの感度を実証しておらず、典型的には、より低いダイナミックレンジを有する。FLプローブを用いたより低い感度の理由は、共局在化物質の自己蛍光からの背景または他のプローブからの蛍光の干渉の存在である。異なる技法が、時間分解蛍光(TRF)と呼ばれる、より長い寿命の蛍光プローブを使用して、自己蛍光からの背景を低減させるために開発された(Zuchner et al. (2009) *Anal. Chem.* 81(22): 9449-9453、Kemper et al. (2001) *Electrophoresis* 22(5): 881-889、Lim et al. (1997) *Anal Biochem.* 245(2): 184-195、Huhtinen et al. (2005) *Anal. Chem.* 77(8): 2643-2648、Vereb et al. (1998) *Biophys J.* 74(5): 2210-2222)。簡潔に述べると、自己蛍光は、典型的には、自己蛍光信号が次第に消えるまでTRF検出が時間的に遅延されるように、比較的短い寿命(<20ナノ秒)を有する。これは、技術的には時間ゲート検出であるが、一般的には時間分解と呼ばれている(Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy," 3rd Edition, Springer-Verlag, New York, 2006)。TRF検出の利益は、文書で十分に立証されており、より高い感度、より低い背景、およびより広いダイナミックレンジを含む(Eliseeva & Bunzli (2010) *Chem. Soc. Rev.* 39(1): 189-227、Bunzli & Piguet (2005) *Chem. Soc. Rev.* 34(12): 1048-1077、Diamandis (1991) *Clin. Chem.* 37(9): 1486-1491)。

#### 【0099】

EuおよびTbに基づく最も頻用されている実体とのランタニド配位錯体に基づいて、TRFプローブを開発して最適化するために、有意な努力が行われている(Kemper et al. (1999) *J. Biomol. Screen.* 4(6): 309-

10

20

30

40

50

314、Lopez et al. (1993) Clin. Chem. 39(2): 196-201、Degorce et al. (2009) Curr. Chem. Genomics. 3:22-32)。これらのプローブは、膜以外に広範囲の用途を有し、組織切片中および生体細胞中のタンパク質の検出のための良好な感度を示している (Suet al. (2005) Anal. Biochem. 347(1): 89-93、Gahlaut & Miller (2010) Cytometry A. Dec 2010; 77(12): 1113-1125)。種々の器具が、特に2次元アレイ用のTRFの測定のために開発されている。ランタニドプローブは、紫外線(UV)励起とともに標準カメラシステムを使用して、画像化されることができ、報告された感度は、ナノグラムのタンパク質範囲内にすぎない(Kemper et al. (2001) Electrophoresis. 22(5): 881-889)。感度の改良は、細断またはパルス状高強度紫外線光源とともに時間ゲートカメラを使用することによって、行われることができる(Gahlaut & Miller (2010) Cytometry A. 77(12): 1113-1125)。しかしながら、これは、計装の全体的コストを増加させる。スポット走査システムが、パルス状紫外線レーザおよび時間ゲート光子計数を使用して開発された(Zuchner et al. (2009) Anal. Chem. 81(22): 9449-9453)。ドットプロットおよびウェスタンプロットの両方のための優れた感度、ならびに化学発光および蛍光と比較して拡張したダイナミックレンジが、報告された。

#### 【0100】

我々は、TRF染色で標識された膜結合タンパク質の検出および定量化のための能力を実証している。膜は、着目タンパク質に特異的に結合するユーロピウムキレート標識二次抗体またはストレプトアビジンを用いて培養される。ユーロピウム(Eu)は、約1ミリ秒の長い蛍光寿命を有し、検出は、短い寿命の発光の自己蛍光または他の源からの背景を有意に低減させる、50マイクロ秒遅延を伴う時間分解蛍光(TRF)モードで行われる(図4Aおよび図4B参照)。図4Aは、いくつかの実施形態では、WB検出のために特異的に構成されるカートリッジを利用し得る、ScanLater™ウェスタンプロット検出システム(Molecular Devices, LLC(Sunnyvale, CA))を使用する、TRF検出の方法の一非限定的実施例の概略図である。既存の一次抗体401が、着目タンパク質402に結合する。次いで、Eu標識二次抗体403が、一次抗体401に結合する。次いで、ScanLater™システムが、検出(測定)404に利用される。ScanLater™システム以外の検出システムが利用されてもよいことが理解されるであろう。図4Bは、TRF検出の原理を図示する概略図である。図4Bは、時間が励起パルスの開始に対応する0である、時間の関数としてランプ励起パルスおよび蛍光減衰の強度をプロットする。図4Bはまた、先行励起パルスに対して測定が行われ得る、時間期間も示す。

#### 【0101】

膜は、プレートリーダシステムの中へ置かれ、そこで、WB走査のために最適化されたフラッシュランプベースのTRFカートリッジを用いて走査される。フラッシュランプは、感度を維持しながら、以前に報告されたパルス状紫外線レーザシステムと比較して、システムのコストを削減する(Zuchner et al. (2009), Anal. Chem. 81(22): 9449-9453)。本方法は、酵素検出を伴わず、Euキレートが光漂白に耐性を示すため、信号が長い時間期間(数週間から数ヶ月)にわたって安定したままである。これは、膜の反復読取と、より正確な定量化のための既知の標準との帯強度の比較の潜在性とを可能にする。

#### 【0102】

TRF検出は、光子計数を採用する。故に、理論的ダイナミックレンジは、 $> 10^5$ である。実践では、ダイナミックレンジは、高存在量帯上の結合部位の飽和および背景膜への非特異的結合によって限定される。また、化学発光または蛍光検出で起こり得るような高強度光による飽和からのカメラ「ブルーミング」がなく、したがって、本システムは、鮮

10

20

30

40

50

明な帯域および優れた画質を生じる。本システムは、高い感度、広いダイナミックレンジ、および長期安定性を伴う膜結合タンパク質分析のための無基質環境を提供する。これは、改良された定量化と、参照のため、または器具標準としてサンプルを再走査する能力とを可能にすることによって、現在のシステムに優る利点を提供する。

#### 【0103】

グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)の3倍連続希釈が、SpectraMax(R) Paradigm(R)マルチモード検出プラットフォーム(Molecular Devices, LLC(Sunnyvale, CA))によって走査されるようなScanLater™のダイナミックレンジを実証するために使用された(図5A参照)。GSTタンパク質の検出のために、ピオチン標識ウサギ抗GST一次抗体が使用された。ScanLater™Eu標識ストレプトアビジンが、検出に使用された。プロットは、洗浄され、乾燥させられ、走査された。本システムは、GSTの量と対比した信号の肯定的反応の4ログ超を伴うGSTのサブピコグラム検出限界を実証した(図5B参照)。図5Aは、GST希釈系列の画像であり、図5Bは、10回の異なるウェスタンプロットの平均にわたる個々の帯域からの積分強度のグラフである。

10

#### 【0104】

CLおよびFL検出方法の限界は、信号安定性を含む。典型的CL試薬の場合、信号は、5~20分にわたって安定し、その後、基質が使い尽くされ、帯強度が減少する。FLに関して、有機フルオロフォアは、適切な条件に保たれるときにより安定しているが、光漂白の傾向があり、信号は、励起光への反復暴露後に減衰するであろう。TRF検出は、これらの限界の両方を回避し、改良された安定性能を提供する。長期安定性を示すために、GSTの3倍連続希釈が、57日間にわたって、信号安定性を実証するために使用された。WBが、前述のように調製され、調製の直後(第1日目)、次いで、周囲条件下で暗環境内に貯蔵してから57日後に測定された。図6は、ScanLater™カートリッジとともにSpectraMax(R) Paradigm(R)リーダを使用して、経時的なウェスタンプロット結果の安定性を示す、グラフである。2つの走査が、背景にわたる平均帯強度について分析され、結果が、図6に提示されている。WBの劣化または信号の減少は、貯蔵から57日後には観察されなかった。

20

#### 【0105】

光漂白の効果を研究するために、トランスフェリンの2倍連続希釈とともに発現されたWBが、反復読取を受けた。図7は、ウェスタンプロット上の単一の帯域の反復走査後のTRF試薬の光漂白の欠如を示す、グラフである。走査毎に、積分強度(「Int. Density」)を示すバーが、右側にある。250pg帯からの平均強度が、走査毎に測定され、結果が、図7に示されている。信号強度の系統的減少が観察されず、TRF試薬の光漂白が問題ではなかったことを示す。

30

#### 【0106】

TRFの多重化が、多少の成功とともに報告されている。EuおよびTbベースのプロープの使用が、2つの異なるタンパク質を検出するために時間分解蛍光共鳴エネルギー移動(TR-FRET)を使用した生化学検定において実証されている(Degorce et al. (2009) Curr. Chem. Genomics. 3:22-32、Bookout et al. (2000) J. Agric. Food Chem. 48(12):5868-5873、Hamy et al. (2001) J. Biomol. Screen. 6(3):179-187)。加えて、EuおよびSm、ならびにEu、Tb、およびSmを用いた多重化の報告も存在している(Bador et al. (1987) Clin. Chem. 33(1):48-51、Heinonen et al. (1997) Clin. Chem. 43(7):1142-1150)。これらのシステムのための分析方式は、励起のための単一のカラー帯域通過フィルタおよび複数の発光帯域通過フィルタとともに、フラッシュランプを使用する。

40

#### 【0107】

上記で説明される従来技術のこれらのシステムは、ランタニドのうちの1つからの発光が

50

他のランタニドの検出チャンネルの中へ漏出するにつれて、クロストークに悩まされる。実践では、良好な分離は、ランタニドスペクトル内の発光ピークの存在量のため、比のうちの1つのみでしか達成されることができない。例えば、EuおよびTbを用いると、Tbチャンネル内に最小限のEu信号しかないが、Euチャンネルの中へのTbクロストークは、10%も高くあり得る。Euチャンネルの中へのSmクロストークがないが、Smチャンネルの中への有意な(>10%)Euクロストークがある場合、EuおよびSmが逆転される。これは、これらの方法の有用性を、1つだけの真に敏感なチャンネルを有することに限定する一方で、他方は、第2の種からの背景信号によって限定される。Eu、Tb、およびSmドットプロット用のこれらの実施例が、図8ならびに図9に示されている。図8は、ユーロピウム(Eu)およびテルビウム(Tb)ベースのプロープのための検出チャンネルの間のクロストーク発光を比較する、ドットプロット結果を示す。図9は、ユーロピウム(Eu)およびサマリウム(Sm)ベースのプロープのための検出チャンネルの間のクロストーク発光を比較する、ドットプロット結果を示す。

10

#### 【0108】

本明細書の他の場所で説明されるように、本発明のある側面は、TRF検出を使用して長い寿命の蛍光染料を多重化する新規の方法に関する。我々は、複数の染色からの検定において信号を分離する能力を増進するために、蛍光発光におけるスペクトルおよび時間差の組み合わせを使用した。いくつかの実施形態では、これは、多重化ウェスタンブロット検出方式においてルテニウム(Ru)およびユーロピウム(Eu)標識の組み合わせを用いた実践に要約されたが、免疫学的検定、タンパク質アレイ、および他の多重化生物学的検定への適用も有する。Ruは、タンパク質、DNA、および他の化合物の検出のための染料として使用されているが、その長い寿命は、より短い寿命の信号を除去する分析システムを作成するために使用されている(Demas et al. (1999) Anal. Chem. 71(23):793A-800A、Berggren et al. (1999) Anal. Biochem. 276(2):129-143、Ullmer et al. (2012) Br. J. Pharmacol. 167(7):1448-1466)。しかしながら、多重化システムにおいて、RuおよびEuまたは他の非常に長い寿命のランタニドを組み合わせることの報告は存在していない。

20

#### 【0109】

我々が開発した解決策は、1%を下回るまで、より具体的には、0.01%を下回るまで、クロストークを低減させるように、TRF染料の間の時間ドメインおよび波長ドメイン差を両方とも活用する。時間的分離：その半減期が約1マイクロ秒であるRuは、より短い時間積分(2マイクロ秒)で検出され、その半減期が約800マイクロ秒であるEuは、より長い時間積分(1000マイクロ秒)で検出される。スペクトル分離：Ruは、470nmにおいて励起させられ、624nmにおいて検出され、Euは、370nmにおいて励起させられ、616nmにおいて検出される。

30

#### 【0110】

図10は、ユーロピウム(Eu)およびルテニウム(Ru)ベースのプロープを用いて検出チャンネルの間のクロストーク発光を比較する、GST希釈系列のウェスタンブロット結果を示す。これらの走査は、レーザダイオード励起を使用するカートリッジを用いて得られた。

40

#### 【0111】

図11は、図10に示されるウェスタンブロット上のレーンを通した平均ライン走査を示す、グラフである。GST Eu-Euカートリッジ用のライン走査は、1101と標識され、GST Eu-Ruカートリッジ用のライン走査は、1102と標識され、GST Ru-Ruカートリッジ用のライン走査は、1103と標識され、GST Ru-Euカートリッジ用のライン走査は、1104と標識される。

#### 【0112】

これらの結果は、SpectraMax(R)Paradigm(R)リーダー内の2つの異なるカートリッジを用いて得られたが、SpectraMax(R)Paradigm

50

(R)およびSpectraMax(R)i3マルチモードマイクロプレートリーダー検出プラットフォームシステム(Molecular Devices, LLC(Sunnyvale, CA))の両方で稼働する単一のカートリッジにも拡張されることができる。

【0113】

例示的实施形態

【0114】

本開示される主題に従って提供される例示的实施形態は、以下を含むが、それらに限定されない。

1. 多重化蛍光検出のための方法であって、

第1の被分析物に結合された第1の蛍光標識と、第2の被分析物に結合された第2の蛍光標識とを備える、サンプルを提供するステップであって、第1の蛍光標識は、アップコンバージョン蛍光体(UCP)を備え、第2の蛍光標識は、非UCP標識を備える、ステップと、第1の蛍光標識に第1の励起波長における第1の励起光を照射するステップであって、第1の蛍光標識は、第1の発光波長における第1の検出信号を発する、ステップと、第2の蛍光標識に第1の励起波長と異なる第2の励起波長における第2の励起光を照射するステップであって、第2の蛍光標識は、第2の発光波長における第2の検出信号を発する、ステップと、第1の測定時間において第1の検出信号の強度を測定するステップであって、第1の検出信号の強度は、サンプル中の第1の被分析物の量と相関性がある、ステップと、

10

【0115】

第2の蛍光標識を照射することを中止するステップと、第2の蛍光標識を照射することを中止した後に、第2の測定時間において第2の検出信号の強度を測定するステップであって、第2の検出信号の強度は、サンプル中の第2の被分析物の量と相関性がある、ステップとを含む、方法。

20

【0116】

2. 第1の蛍光標識を照射しながら、第1の検出信号の強度を測定するステップを含む、実施形態1に記載の方法。

【0117】

3. 第1の蛍光標識を照射することを中止するステップと、第1の蛍光標識を照射することを中止した後に、第1の検出信号の強度を測定するステップとを含む、実施形態1に記載の方法。

30

【0118】

4. サンプルは、第3の被分析物に結合された第3の蛍光標識を備え、第3の蛍光標識は、第2の蛍光標識と異なる非UCP標識を備え、本方法はさらに、第3の蛍光標識に第1の励起波長および第2の励起波長と異なる第3の励起波長における第3の励起光を照射するステップであって、第3の蛍光標識は、第3の発光波長における第3の検出信号を発する、ステップと、第3の蛍光標識を照射することを中止するステップと、第3の蛍光標識を照射することを中止した後に、第3の測定時間において第3の検出信号の強度を測定するステップとを含む、前記実施形態のうちのいずれかに記載の方法。

【0119】

5. 第1の蛍光標識を照射しながら、第1の検出信号の強度を測定するステップを含む、実施形態4に記載の方法。

40

【0120】

6. 第1の蛍光標識を照射することを中止するステップと、第1の蛍光標識を照射することを中止した後に、第1の検出信号の強度を測定するステップとを含む、実施形態4に記載の方法。

【0121】

7. 第2の蛍光標識は、遷移金属キレートを備え、第3の蛍光標識は、ランタニドキレートを備える、実施形態4~6のいずれかに記載の方法。

【0122】

50



8. 第2の蛍光標識は、ルテニウム (Ru(II))、オスミウム (Os(II))、およびレニウム (Re(I)) の遷移金属キレートから成る群から選択される、遷移金属キレートを備え、第3の蛍光標識は、サマリウム (Sm(III))、ジスプロシウム (Dy(III))、ユーロピウム (Eu(III))、およびテルビウム (Tb(III)) のランタニドキレートから成る群から選択される、ランタニドキレートを備える、実施形態4~6のいずれかに記載の方法。

【0123】

9. 第1の励起波長は、近赤外範囲内であり、第1の発光波長は、可視範囲内であり、第2の励起波長および第3の励起波長のうちの少なくとも1つは、紫外線範囲内である、実施形態4~8のいずれかに記載の方法。

【0124】

10. 第1の蛍光標識のUCPは、第1の蛍光発光寿命を有し、第2の蛍光標識は、第2の蛍光発光寿命を有し、第3の蛍光標識は、第3の蛍光発光寿命を有し、第1の蛍光発光寿命は、第2の蛍光発光寿命および第3の蛍光発光寿命と異なる、実施形態4~9のいずれかに記載の方法。

【0125】

11. 第1の蛍光標識のUCPは、第1の蛍光発光寿命を有し、第2の蛍光標識は、第2の蛍光発光寿命を有し、第3の蛍光標識は、第3の蛍光発光寿命を有し、第2の蛍光発光寿命は、少なくとも5倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、および少なくとも1000倍から成る群から選択される倍数だけ第3の蛍光発光寿命より長い、実施形態4~9のいずれかに記載の方法。

【0126】

12. 第1の蛍光標識のUCPは、第1の蛍光発光寿命を有し、第2の蛍光標識は、第2の蛍光発光寿命を有し、第2の蛍光発光寿命および第3の発光寿命のうちの少なくとも1つが0.1マイクロ秒~10マイクロ秒の範囲内であること、ならびに第2の蛍光発光寿命および第3の発光寿命のうちの少なくとも1つが100マイクロ秒~1ミリ秒の範囲内であることのうちの少なくとも1つを含む、実施形態4~9のいずれかに記載の方法。

【0127】

13. 第2の蛍光標識および第3の蛍光標識のうちの少なくとも1つは、20nmを上回るストークスシフト、100nmを上回るストークスシフト、250nmを上回るストークスシフト、および約250nm~約350nmの範囲内のストークスシフトから成る群から選択される、ストークスシフトを有する、実施形態4~12のいずれかに記載の方法。

【0128】

14. 第2の発光波長は、第1の発光波長と異なる、実施形態4~13のいずれかに記載の方法。

【0129】

15. 第2の測定時間は、第1の測定時間と異なる、実施形態4~14のいずれかに記載の方法。

【0130】

16. 第3の発光波長は、第1の発光波長および第2の発光波長と異なる、実施形態4~15のいずれかに記載の方法。

【0131】

17. 第3の測定時間は、第1の測定時間および第2の測定時間と異なる、実施形態4~16のいずれかに記載の方法。

【0132】

18. サンプルを提供するステップは、サンプルを、第1の被分析物に特異的に結合する第1の抗体と、第2の被分析物に特異的に結合する第2の抗体と、第3の被分析物に特異的に結合する第3の抗体と、第1の抗体に特異的に結合する第1の蛍光抗体複合体であって、第1の蛍光抗体複合体は、第1の蛍光標識を備える、第1の蛍光抗体複合体と、第2の抗体に特異的に結合する第2の蛍光抗体複合体であって、第2の蛍光抗体複合体は、第

10

20

30

40

50

2の蛍光標識を備える、第2の蛍光抗体複合体と、第3の抗体に特異的に結合する第3の蛍光抗体複合体であって、第3の蛍光抗体複合体は、第3の蛍光標識を備える、第3の蛍光抗体複合体と接触させるステップと、抗体および抗体複合体が免疫複合体を形成することを可能にするための十分な条件下で、かつ十分な時間にわたって、サンプルを培養するステップとを含む、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0133】

19. サンプルを提供するステップは、サンプルを、第1の被分析物に特異的に結合する第1の抗体と、第2の被分析物に特異的に結合する第2の抗体と、第3の被分析物に特異的に結合する第3の抗体と接触させるステップを含み、第1の蛍光標識、第2の蛍光標識、および第3の蛍光標識のうち少なくとも1つは、個別の第1の抗体、第2の抗体、または第3の抗体に直接付着させられる、実施形態4~17のいずれかに記載の方法。

10

【0134】

20. 第1の被分析物、第2の被分析物、および第3の被分析物は、タンパク質または膜結合タンパク質を備える、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0135】

21. 第1の被分析物、第2の被分析物、および第3の被分析物のうち少なくとも1つは、基準タンパク質であり、第1の被分析物、第2の被分析物、および第3の被分析物のうち少なくとも1つの他方は、未知のタンパク質であり、未知のタンパク質から取得される検出信号を基準タンパク質から取得される検出信号に正規化するステップをさらに含む、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

20

【0136】

22. 第1の被分析物、第2の被分析物、および第3の被分析物のうち少なくとも1つは、未修飾タンパク質であり、第1の被分析物、第2の被分析物、および第3の被分析物のうち少なくとも1つの他方は、タンパク質の修飾またはリン酸化バージョンであり、未修飾タンパク質およびタンパク質の修飾またはリン酸化バージョンから取得される検出信号の測定された強度に基づいて、未修飾タンパク質に対するタンパク質の修飾またはリン酸化バージョンの比を計算するステップをさらに含む、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0137】

23. 共通発光フィルタを通して、第1の検出信号、第2の検出信号、および第3の検出信号のうち少なくとも2つを指向するステップを含む、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

30

【0138】

24. UCPは、反ストークスシフトを呈する、ランタニドをドーブした、または遷移金属をドーブした無機化合物を備える、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0139】

25. 無機化合物は、エルビウム( $Er^{3+}$ )、ツリウム( $Tm^{3+}$ )、ホルミウム( $Ho^{3+}$ )、プラセオジウム( $Pr^{3+}$ )、ネオジウム( $Nd^{3+}$ )、ジスプロシウム( $Dy^{3+}$ )、イッテルビウム( $Yb^{3+}$ )、サマリウム( $Sm^{3+}$ )、および前述のうち2つまたはそれを上回るものの組み合わせから成る群から選択される、ドーパントイオンを備える、実施形態24に記載の方法。

40

【0140】

26. 無機化合物は、ハロゲン化物、酸化物、および酸硫酸化物から成る群から選択される、実施形態24または25に記載の方法。

【0141】

27. 第2の蛍光標識は、遷移金属キレートまたはランタニドキレートを備える、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0142】

28. 第2の蛍光標識は、ルテニウム( $Ru(II)$ )、オスミウム( $Os(II)$ )、およびレニウム( $Re(I)$ )の遷移金属キレートから成る群から選択される、遷移金属

50

キレートを備える、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0143】

29. 第2の蛍光標識は、サマリウム(Sm(III))、ジスプロシウム(Dy(III))、ユーロピウム(Eu(III))、およびテルビウム(Tb(III))のランタニドキレートから成る群から選択される、ランタニドキレートを備える、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0144】

30. 第1の励起波長は、近赤外範囲内であり、第1の発光波長は、可視範囲内である、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0145】

31. 第2の励起波長は、紫外線範囲内であり、第2の発光波長は、第2の励起波長よりも長い、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0146】

32. 第1の蛍光標識のUCPは、第1の蛍光発光寿命を有し、第2の蛍光標識は、第2の蛍光発光寿命を有し、第1の蛍光発光寿命は、第2の蛍光発光寿命と異なる、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0147】

33. 第1の蛍光標識のUCPは、第1の蛍光発光寿命を有し、第2の蛍光標識は、第2の蛍光発光寿命を有し、第2の蛍光発光寿命が0.1マイクロ秒~10マイクロ秒の範囲内であることと、第2の蛍光発光寿命が100マイクロ秒~1ミリ秒の範囲内であることとのうちの少なくとも1つを含む、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0148】

34. 第2の蛍光標識は、20nmを上回るストークスシフト、100nmを上回るストークスシフト、250nmを上回るストークスシフト、および約250nm~約350nmの範囲内のストークスシフトから成る群から選択される、ストークスシフトを有する、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0149】

35. 第2の発光波長は、第1の発光波長と異なる、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0150】

36. 第2の測定時間は、第1の測定時間と異なる、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0151】

37. サンプルを提供するステップは、サンプルを、第1の被分析物に特異的に結合する第1の抗体と、第2の被分析物に特異的に結合する第2の抗体と、第1の抗体に特異的に結合する第1の蛍光抗体複合体であって、第1の蛍光抗体複合体は、第1の蛍光標識を備える、第1の蛍光抗体複合体と、第2の抗体に特異的に結合する第2の蛍光抗体複合体であって、第2の蛍光抗体複合体は、第2の蛍光標識を備える、第2の蛍光抗体複合体と接触させるステップと、抗体および抗体複合体が免疫複合体を形成することを可能にするための十分な条件下で、かつ十分な時間にわたって、サンプルを培養するステップとを含む、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

【0152】

38. サンプルを提供するステップは、サンプルを、第1の被分析物に特異的に結合する第1の抗体と、第2の被分析物に特異的に結合する第2の抗体と接触させるステップを含み、第1の蛍光標識は、第1の抗体に直接付着させられる、または第2の蛍光標識は、第2の抗体に直接付着させられる、または前述の両方である、実施形態1~36のいずれかに記載の方法。

【0153】

39. 第1の被分析物および第2の被分析物は、タンパク質または膜結合タンパク質を備える、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 4 】

40 . 第 1 の被分析物および第 2 の被分析物のうちの一方は、基準タンパク質であり、第 1 の被分析物および第 2 の被分析物のうちの他方は、未知のタンパク質であり、第 2 の検出信号を第 1 の検出信号に正規化するステップ、または第 1 の検出信号を第 2 の検出信号に正規化するステップをさらに含む、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

## 【 0 1 5 5 】

41 . 第 1 の被分析物および第 2 の被分析物のうちの一方は、未修飾タンパク質であり、第 1 の被分析物および第 2 の被分析物のうちの他方は、タンパク質の修飾またはリン酸化バージョンであり、第 1 の検出信号および第 2 の検出信号の測定された強度に基づいて、未修飾タンパク質に対するタンパク質の修飾またはリン酸化バージョンの比を計算するステップをさらに含む、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

10

## 【 0 1 5 6 】

42 . 共通発光フィルタを通して、または異なる発光フィルタを通して、第 1 の検出信号および第 2 の検出信号を指向するステップを含む、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

## 【 0 1 5 7 】

43 . 第 1 の蛍光標識を照射するステップおよび第 2 の蛍光標識を照射するステップは、同時に、または連続的に行われる、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

## 【 0 1 5 8 】

44 . サンプルを提供するステップは、複数のサンプルを提供するステップを含み、各サンプル上で、第 1 の蛍光標識を照射するステップ、第 2 の蛍光標識を照射するステップ、第 1 の検出信号の強度を測定するステップ、および第 2 の検出信号の強度を測定するステップを行うことによって、各サンプル上で多重化蛍光検出を行うステップをさらに含む、前記実施形態のいずれかに記載の方法。

20

## 【 0 1 5 9 】

45 . 各サンプル上で多重化蛍光検出を行うステップは、個別のサンプルを、第 1 の励起光および第 2 の励起光を生成するために構成される光源、ならびに第 1 の検出信号および第 2 の検出信号を測定するために構成される光検出器と光学的に整合させるステップを含む、実施形態 4 4 に記載の方法。

## 【 0 1 6 0 】

46 . 個別のサンプルを光源および光検出器と光学的に整合させるステップは、個別のサンプルをカートリッジと光学的に整合させるステップを含み、カートリッジは、カートリッジが光学的および/または電氣的に蛍光検出装置と通信するように、蛍光検出装置の装置筐体の中に除去可能に設置され、カートリッジは、光源から整合したサンプルまでの光学経路を画定する励起光学部、または整合したサンプルから光検出器までの光学経路を画定する発光光学部、または前述の両方を封入し、光源は、カートリッジの中または装置筐体の中に配置され、光検出器は、カートリッジの中または装置筐体の中に配置される、実施形態 4 5 に記載の方法。

30

## 【 0 1 6 1 】

47 . サンプルは、それぞれ、マルチウェルプレート of 別個のウェルまたは膜の別個のプロットの中に配置される、実施形態 4 4 ~ 4 6 のいずれかに記載の方法。

40

## 【 0 1 6 2 】

48 . 少なくとも、前記実施形態のうちのいずれかの方法の照射するステップおよび測定するステップを行うために構成される、蛍光検出装置であって、第 1 の励起光および第 2 の励起光を生成するために構成される光源と、第 1 の検出信号および第 2 の検出信号を測定するために構成される光検出器とを備える、蛍光検出装置。

## 【 0 1 6 3 】

49 . 光源が、第 1 の励起光を生成するために構成される第 1 の光源と、第 2 の励起光を生成するために構成される第 2 の光源とを備えることと、光検出器が、第 1 の検出信号を測定するために構成される第 1 の光検出器と、第 2 の検出信号を測定するために構成される第 2 の光検出器とを備えることとのうちの少なくとも 1 つを含む、実施形態 4 8 に記載

50

の蛍光検出装置。

【 0 1 6 4 】

50．第3の励起光を生成するために構成される第3の光源と、第3の検出信号を測定するために構成される第3の光検出器とをさらに備える、実施形態49に記載の蛍光検出装置。

【 0 1 6 5 】

51．サンプルを支持するために構成されるサンプル支持体であって、前記サンプルは、第1の被分析物に結合された第1の蛍光標識と、第2の被分析物に結合された第2の蛍光標識とを備え、第1の蛍光標識は、アップコンバーティング蛍光体（UCP）を備え、第2の蛍光標識は、非UCP標識を備える、サンプル支持体と、第1の励起波長における第1の励起光および第1の励起波長と異なる第2の励起波長における第2の励起光を生成するために構成される、光源と、第1の励起光による励起にตอบสนองして第1の発光波長においてサンプルから発せられる第1の検出信号、および第2の励起光による励起にตอบสนองして第2の発光波長においてサンプルから発せられる第2の検出信号を測定するために構成される、光検出器と、所定の励起時間において、かつ所定の持続時間にわたって、第1の励起光および第2の励起光をそれぞれ生成するように光源を制御し、第1の測定時間において第1の検出信号を測定するように、かつ第2の測定時間において第2の検出信号を測定するように、光検出器を制御するために構成される、コンピューティングデバイスとを備える、蛍光検出装置。

10

【 0 1 6 6 】

52．コンピューティングデバイスは、第1の検出信号および第2の検出信号の測定に対応する電気出力を光検出器から受信し、測定をサンプル中の第1の被分析物の量およびサンプル中の第2の被分析物の量と関連させるために構成される、実施形態51に記載の蛍光検出装置。

20

【 0 1 6 7 】

53．コンピューティングデバイスは、第2の励起光を生成することを中止するように光源を制御し、第2の励起光を生成することを中止した後に、第2の検出信号を測定するように光検出器を制御するために構成される、実施形態51に記載の蛍光検出装置。

【 0 1 6 8 】

54．サンプルは、第3の被分析物に結合される第3の蛍光標識であって、第2の蛍光標識と異なる非UCP標識を備える、第3の蛍光標識を備え、光源は、第1の励起波長および第2の励起波長と異なる第3の励起波長において第3の励起光を生成するために構成され、光検出器は、第3の発光波長において第3の検出信号を測定するために構成され、コンピューティングデバイスは、所定の励起時間において、かつ所定の持続時間にわたって、第3の励起光を生成するように光源を制御し、第3の測定時間において第3の検出信号を測定するように光検出器を制御するために構成される、実施形態48～53のいずれかに記載の蛍光検出装置。

30

【 0 1 6 9 】

55．コンピューティングデバイスは、第3の励起光を生成することを中止するように光源を制御し、第3の励起光を生成することを中止した後に、第1の測定時間および第2の測定時間と異なる第3の測定時間において第3の検出信号を測定するように光検出器を制御するために構成される、実施形態54に記載の蛍光検出装置。

40

【 0 1 7 0 】

56．装置筐体と、装置筐体の中に除去可能に設置されるカートリッジと、光源からサンプルまでの光学経路を画定するために構成される励起光学部と、サンプルから光検出器までの光学経路を画定するために構成される発光光学部とを備え、光源は、カートリッジの中または装置筐体の中に配置され、光検出器は、カートリッジの中または装置筐体の中に配置され、コンピューティングデバイスは、装置筐体の中に配置される、実施形態48～55のいずれかに記載の蛍光検出装置。

【 0 1 7 1 】

50

57. 励起光学部および発光光学部のうちの少なくとも1つは、カートリッジの中に配置される、実施形態56に記載の蛍光検出装置。

【0172】

58. サンプル支持体は、マルチウェルプレートまたはマルチプロット膜を備える、またはそれを支持するために構成される、実施形態48～57のいずれかに記載の蛍光検出装置。

【0173】

本明細書に説明されるプロセス、サブプロセス、およびプロセスステップのうちの1つまたはそれを上回るものが、1つまたはそれを上回る電子またはデジタル制御型デバイス上で、ハードウェア、ファームウェア、ソフトウェア、または前述のうちの2つまたはそれを上回るものの組み合わせによって、行われ得ることが理解されるであろう。ソフトウェアは、例えば、図2で概略的に描写されるコンピューティングデバイス236等の好適な電子処理構成要素またはシステム内のソフトウェアメモリ（図示せず）の中に常駐してもよい。ソフトウェアメモリは、論理機能（すなわち、デジタル回路またはソースコード等のデジタル形態で、またはアナログ電気、音声、またはビデオ信号等のアナログソース等のアナログ形態で実装され得る「論理」）を実装するための実行可能命令の順序付けられたリストを含んでもよい。命令は、例えば、1つまたはそれを上回るマイクロプロセッサ、汎用プロセッサ、プロセッサの組み合わせ、デジタル信号プロセッサ（DSP）、または特定用途向け集積回路（ASIC）を含む、処理モジュール内で実行されてもよい。さらに、概略図は、アーキテクチャまたは機能の物理的レイアウトによって限定されない物理的（ハードウェアおよび/またはソフトウェア）実装を有する、機能の論理的分割を説明する。本明細書に説明されるシステムの実施例は、種々の構成で実装され、単一のハードウェア/ソフトウェアユニット内または別個のハードウェア/ソフトウェアユニット内のハードウェア/ソフトウェア構成要素として動作してもよい。

【0174】

実行可能命令は、電子システムの処理モジュール（例えば、図2のコンピューティングデバイス236）によって実行されると、命令を実行するように電子システムに指図する、その中に記憶された命令を有する、コンピュータプログラム製品として実装されてもよい。コンピュータプログラム製品は、命令実行システム、装置、またはデバイスから命令を選択的にフェッチし、命令を実行し得る、電子コンピュータベースのシステム、プロセッサ含有システム、または他のシステム等の命令実行システム、装置、またはデバイスによって使用するための、またはそれらと関連する、任意の非一過性のコンピュータ可読記憶媒体で選択的に具現化されてもよい。本開示と関連して、コンピュータ可読記憶媒体は、命令実行システム、装置、またはデバイスによって使用するための、またはそれらと関連する、プログラムを記憶し得る、任意の非一過性の手段である。非一過性のコンピュータ可読記憶媒体は、選択的に、例えば、電子、磁気、光学、電磁、赤外線、または半導体システム、装置、またはデバイスであってもよい。非一過性のコンピュータ可読媒体のより具体的な実施例の非包括的リストは、1つまたはそれを上回るワイヤ（電子）を有する電気接続、携帯用コンピュータディスク（磁気）、ランダムアクセスメモリ（電子）、読取専用メモリ（電子）、例えば、フラッシュメモリ（電子）等の消去可能プログラムブル読取専用メモリ、例えば、CD-ROM、CD-R、CD-RW（光学）等のコンパクトディスクメモリ、およびデジタル多用途ディスクメモリ、すなわち、DVD（光学）を含む。プログラムが、例えば、紙または他の媒体の光学走査を介して電子的に捕捉され、次いで、必要であれば、好適な様式でコンパイル、解釈、または別様に処理され、次いで、コンピュータメモリまたはマシンメモリに記憶されることができ、非一過性のコンピュータ可読記憶媒体は、プログラムが印刷される紙または別の好適な媒体でさえあり得ることに留意されたい。

【0175】

また、本明細書で使用されるような「信号通信する」という用語は、2つまたはそれを上回るシステム、デバイス、構成要素、モジュール、またはサブモジュールが、あるタイプ

10

20

30

40

50

の信号経路を經由して進行する信号を介して相互と通信することが可能であることも理解されるであろう。信号は、第1および第2のシステム、デバイス、構成要素、モジュール、またはサブモジュールの間の信号経路に沿って、第1のシステム、デバイス、構成要素、モジュール、またはサブモジュールから、第2のシステム、デバイス、構成要素、モジュール、またはサブモジュールに情報、電力、またはエネルギーを通信し得る、通信、電力、データ、またはエネルギー信号であってもよい。信号経路は、物理、電気、磁気、電磁、電気化学、光学、有線、または無線接続を含んでもよい。信号経路はまた、第1および第2のシステム、デバイス、構成要素、モジュール、またはサブモジュールの間に、付加的システム、デバイス、構成要素、モジュール、またはサブモジュールを含んでもよい。

【0176】

より一般的に、「通信する」および「と...連通する」という用語（例えば、第1の構成要素が、第2の構成要素と「通信する」または「連通する」）は、2つまたはそれを上回る構成要素または要素の間の構造、機能、機械、電気、信号、光学、磁気、電磁、イオン、または流体関係を示すために、本明細書で使用される。したがって、1つの構成要素が第2の構成要素と通信すると言われる事実は、付加的構成要素が、第1および第2の構成要素の間に存在し得る、および/またはそれらと動作可能に関連付けられ得る、または係合され得る可能性を除外することを意図していない。

本発明の種々の側面または詳細は、本発明の範囲から逸脱することなく変更され得ることが理解されるであろう。さらに、前述の説明は、限定の目的ではなく、例証の目的のためにすぎず、本発明は、請求項によって定義される。

10

20

30

40

50

【 図 面 】

【 図 1 】

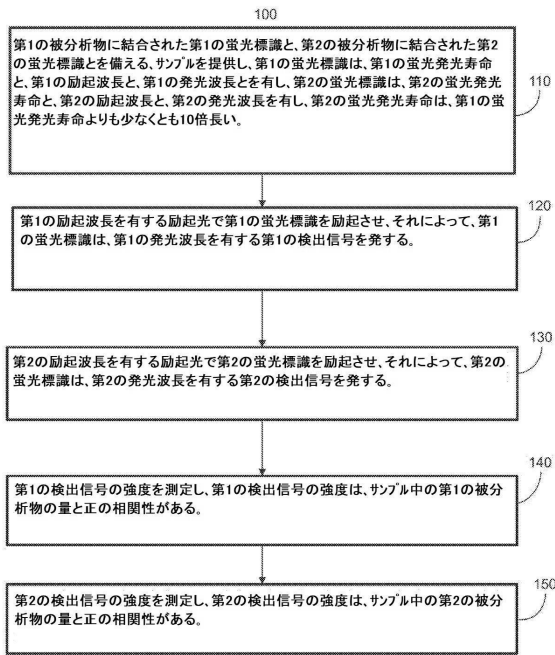


FIG. 1

【 図 2 】

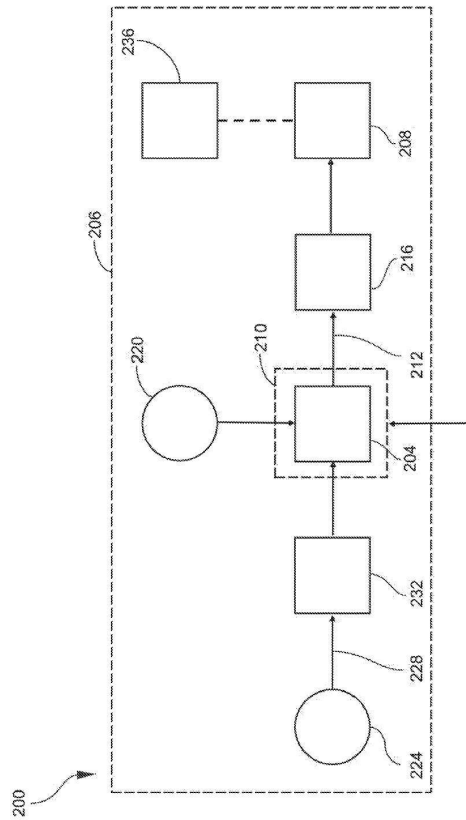


FIG. 2

【 図 3 A 】

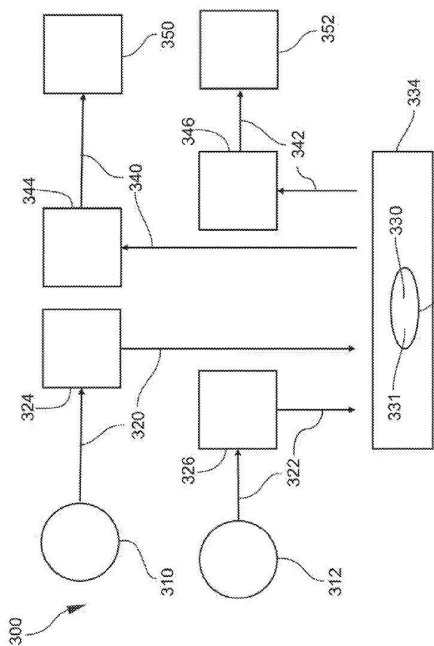


FIG. 3A

【 図 3 B 】

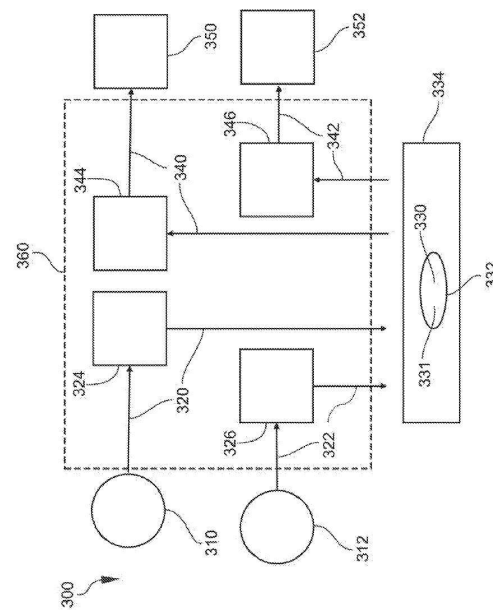


FIG. 3B

10

20

30

40

50



【 3 C 】

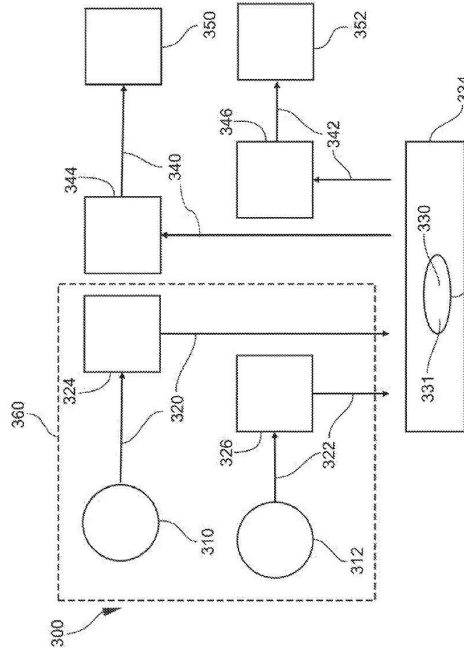


FIG. 3C

【 3 D 】

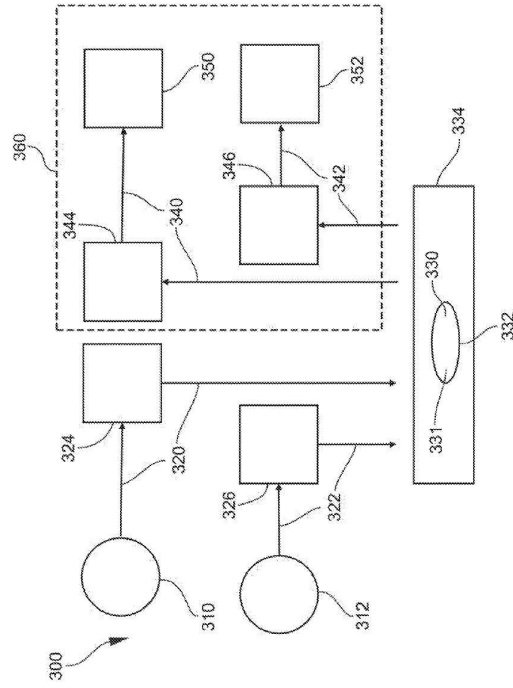


FIG. 3D

【 3 E 】

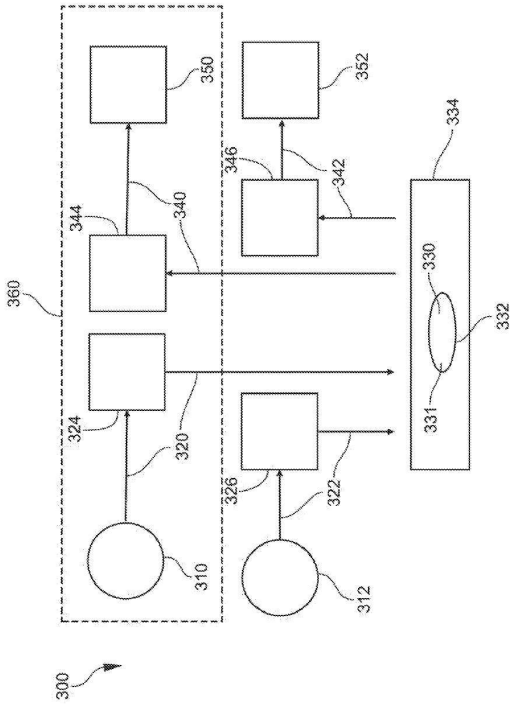


Fig. 3E

【 3 F 】

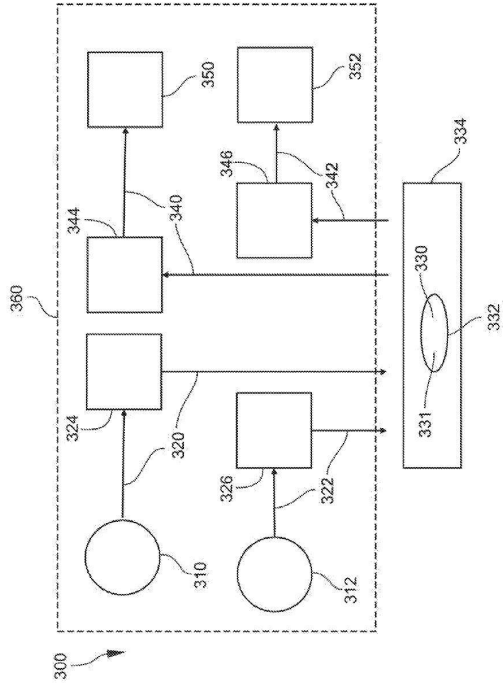


FIG. 3F

10

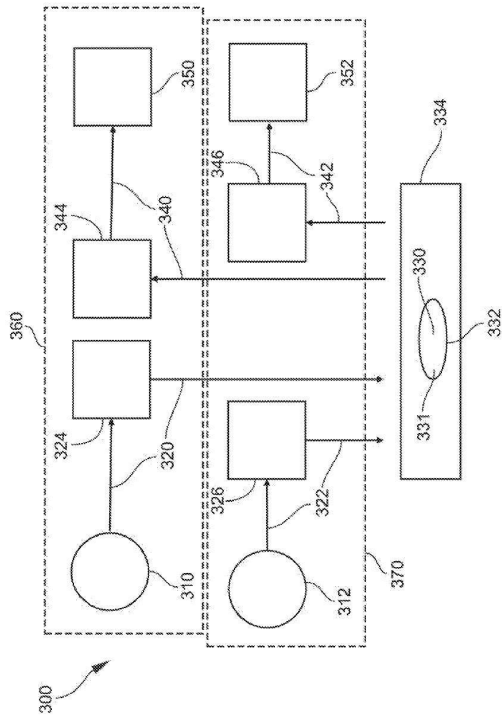
20

30

40

50

【図 3 G】



【図 3 H】

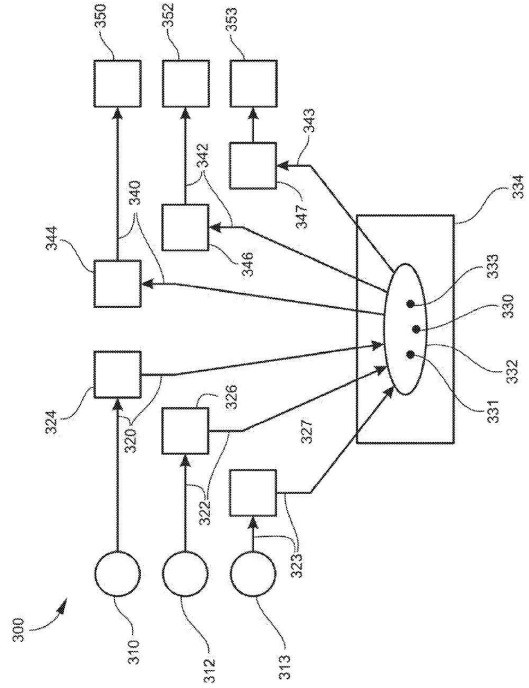


FIG. 3H

【図 4 A】

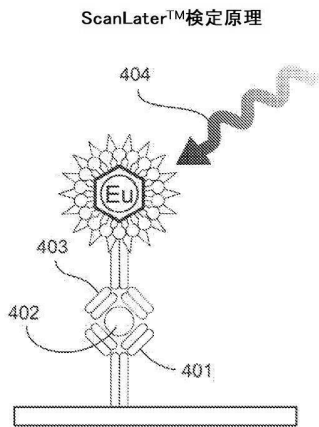


FIG. 4A

【図 4 B】

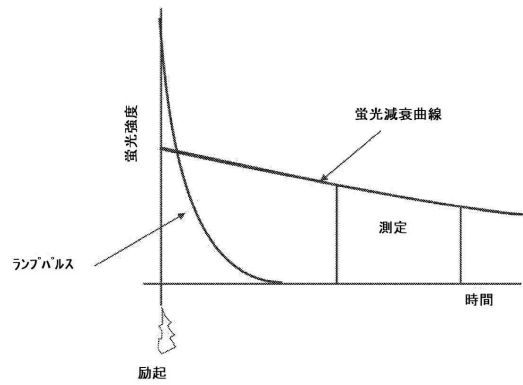


FIG. 4B

10

20

30

40

50

【 図 5 A 】

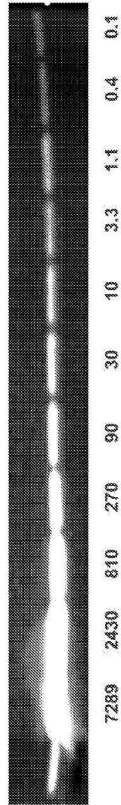


FIG. 5A

【 図 5 B 】

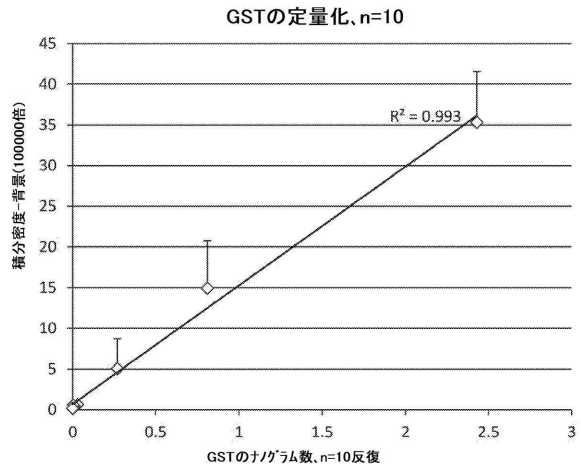


FIG. 5B

【 図 6 】

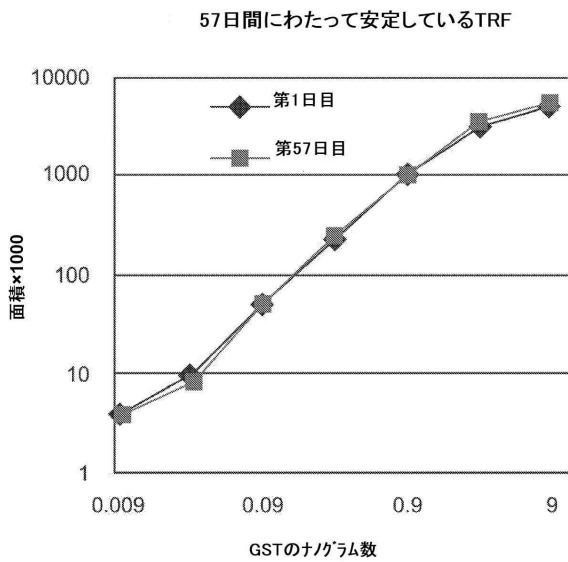


FIG. 6

【 図 7 】

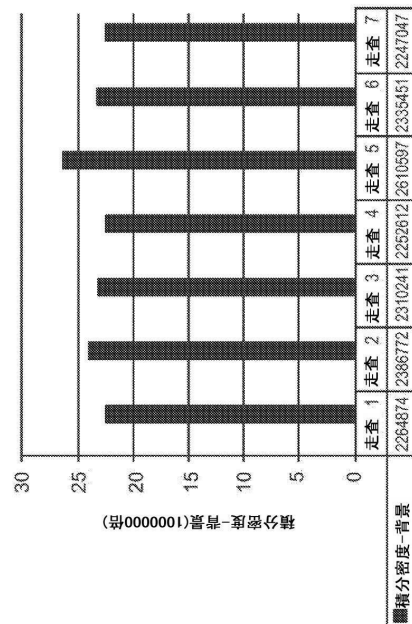


FIG. 7

10

20

30

40

50

【 図 8 】

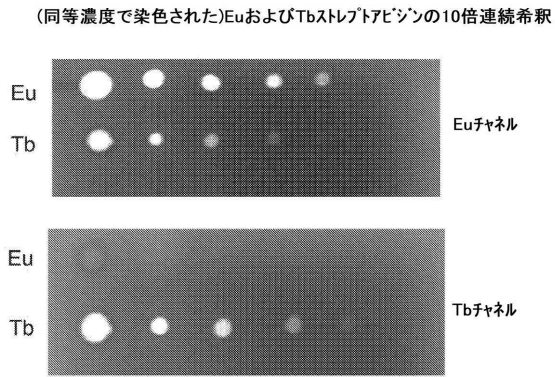


FIG. 8

【 図 9 】

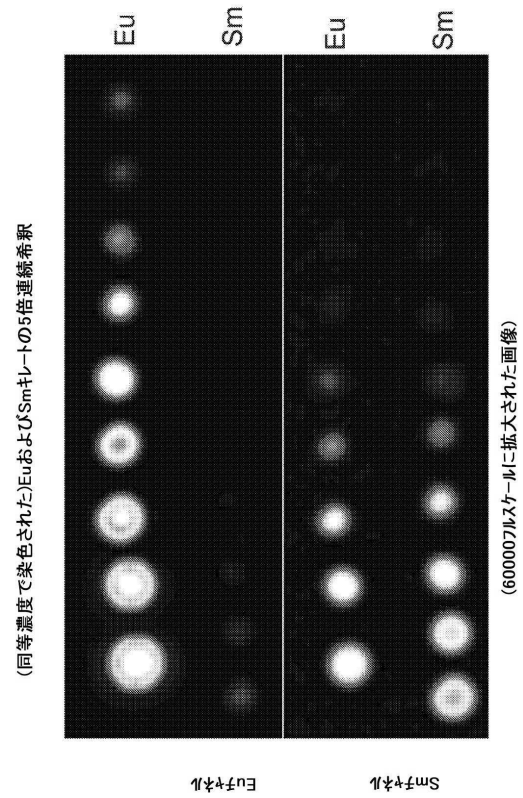


FIG. 9

10

20

【 図 10 】

EuおよびRu標識抗体で精査されたウエスタンブロット上のGST希釈系列

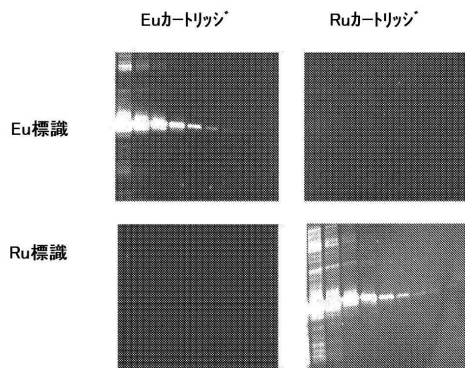
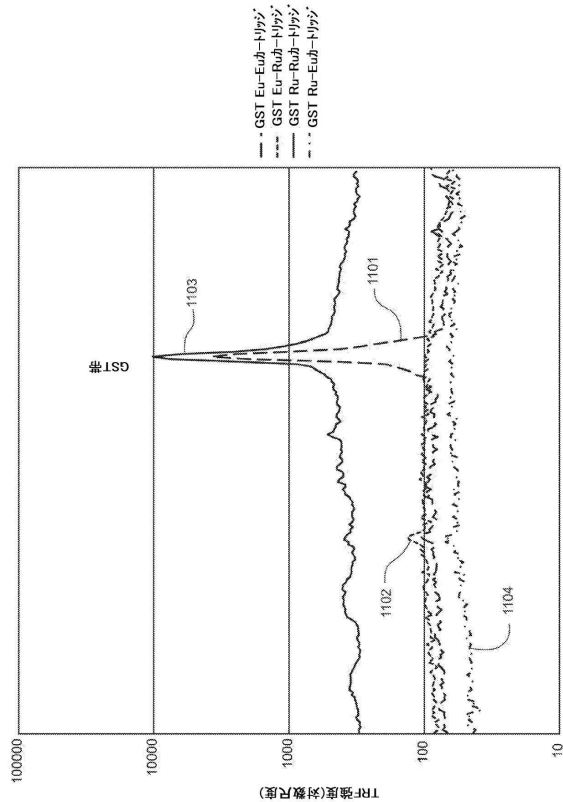


FIG. 10

【 図 11 】



30

40

50

## フロントページの続き

- 62, レッドウッド シティ, ベネット ロード 36
- (72)発明者 バニタ トゥラシラマン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 95135, サン ノゼ, ボウケイ パーク レーン 4007
- (72)発明者 アンネグレート シュラム  
ドイツ国 デー 83451 ピディング, シュトイスベルグシュトラッセ 46
- 審査官 吉田 将志
- (56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0159510(US, A1)  
特開2006-349574(JP, A)  
米国特許出願公開第2004/0043502(US, A1)  
特開2003-177096(JP, A)  
特表2005-524051(JP, A)  
米国特許出願公開第2014/0336061(US, A1)  
特開2010-046071(JP, A)  
特表2008-517280(JP, A)  
米国特許出願公開第2013/0260372(US, A1)  
特開2010-072933(JP, A)  
特表2012-525883(JP, A)  
米国特許出願公開第2013/0190192(US, A1)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
G01N 21/62 - G01N 21/74