

(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2014-520275

(P2014-520275A)

(43) 公表日 平成26年8月21日(2014.8.21)

| (51) Int. Cl.           | F I             | テーマコード (参考) |
|-------------------------|-----------------|-------------|
| GO 1 N 33/483 (2006.01) | GO 1 N 33/483 C | 2GO43       |
| GO 1 N 21/64 (2006.01)  | GO 1 N 21/64 E  | 2GO45       |
| GO 1 N 33/533 (2006.01) | GO 1 N 21/64 F  |             |
|                         | GO 1 N 33/533   |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2014-516889 (P2014-516889)  
 (86) (22) 出願日 平成24年4月23日 (2012. 4. 23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年2月7日 (2014. 2. 7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2012/003126  
 (87) 国際公開番号 W02012/176977  
 (87) 国際公開日 平成24年12月27日 (2012. 12. 27)  
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0061410  
 (32) 優先日 平成23年6月23日 (2011. 6. 23)  
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)  
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0042318  
 (32) 優先日 平成24年4月23日 (2012. 4. 23)  
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 513322578  
 コリア リサーチ インスティテュート  
 オブ バイオサイエンス アンド バイオ  
 テクノロジー  
 大韓民国 305-806 タエジョン  
 ユソク グアハクロ 125 (エオエ  
 ウンドン)  
 (74) 代理人 100115738  
 弁理士 鷲頭 光宏  
 (74) 代理人 100121681  
 弁理士 緒方 和文  
 (74) 代理人 100130982  
 弁理士 黒瀬 泰之  
 (74) 代理人 100127199  
 弁理士 三谷 拓也

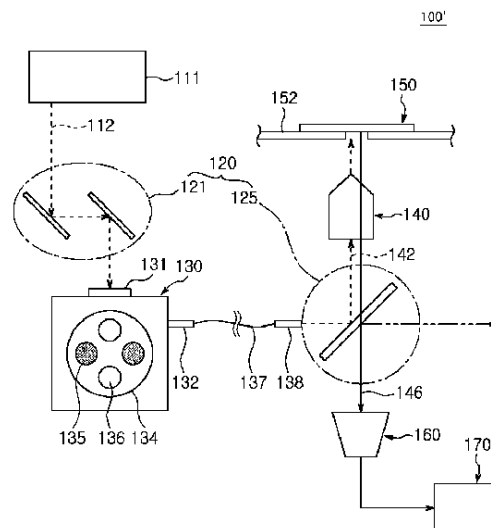
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 i F R E T用探針を利用してタンパク質を検出又はイメージ化する顕微鏡装置及びこれを利用したタンパク質の検出又はイメージング方法

(57) 【要約】

本発明による固有の蛍光共鳴エネルギー転移 ( i F R E T ) 用探針を利用した標的タンパク質検出又はイメージ化顕微鏡装置は、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光及び i F R E T用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を照射する光照射部、前記光照射部で照射される光を i F R E T用探針が導入した試料上に入射するようにする対物レンズ、及び標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光を試料上に照射して i F R E T用探針で生成される第1発光信号と、 i F R E T用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を照射して i F R E T用探針で生成される第2発光信号を検出する認識部を含み、ここで i F R E T用探針は、標的タンパク質に特異的な結合部位 ( b i n d i n g s i t e ) 又は前記結合部位を有する分子、及び標的タンパク質の固有蛍光 ( i n t r i n s i c f l u o r e s c e n c e ) に対するアクセプター ( a c c e p t o r ) 機能を有する蛍光分子が直接又はリンカーを介して結合されたものである。

【選択図】 図2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

固有の蛍光共鳴エネルギー転移 ( i F R E T ; i n t r i n s i c F l u o r e s c e n c e R e s o n a n c e E n e r g y T r a n s f e r ) 用探針を利用した標的タンパク質検出又はイメージ化顕微鏡装置であって、

前記 i F R E T 用探針が、標的タンパク質に特異的な結合部位 ( b i n d i n g s i t e ) 又は前記結合部位を有する分子、及び標的タンパク質の固有蛍光 ( i n t r i n s i c f l u o r e s c e n c e ) に対するアクセプター ( a c c e p t o r ) 機能を有する蛍光分子が直接又はリンカーを介して結合されたもので、

標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光及び i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を照射する光照射部と、前記光照射部で照射される光を i F R E T 用探針が導入された試料上に入射するようにする対物レンズ、及び標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光を試料上に照射して i F R E T 用探針で生成される第1発光信号と、 i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を照射して i F R E T 用探針で生成される第2発光信号を検出する認識部とを含む、顕微鏡装置。

10

## 【請求項2】

標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光を試料上に照射して i F R E T 用探針で生成される第1発光信号値と、 i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を照射して i F R E T 用探針で生成される第2発光信号値とを分析して、第1発光信号値と第2発光信号値のレシオメトリック法 ( r a t i o m e t r i c m e a s u r e m e n t ) によって第3発光信号値を算出するレシオメトリックモジュール ( r a t i o m e t r i c m e a s u r e m e n t m o d u l e ) をさらに備えることを特徴とする、請求項1に記載の顕微鏡装置。

20

## 【請求項3】

第1発光信号値、第2発光信号値、及び第3発光信号値は、試料の2次元の各地点に対応する2次元的な映像値であることを特徴とする、請求項2に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項4】

第1光の波長範囲は260nm~300nmであり、第2光の波長範囲は300nm~400nmであることを特徴とする、請求項1に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項5】

標的タンパク質の固有蛍光を発揮するアミノ酸はトリプトファン ( T r y p t o p h a n ) 、チロシン ( T y r o s i n e ) 、フェニルアラニン ( P h e n y l a l a n i n e ) 又はこれらの組合であることを特徴とする、請求項1に記載の顕微鏡装置。

30

## 【請求項6】

前記光照射部が、光源、及び前記光源からの標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光と i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を選択的にフィルタリングする励起フィルタモジュール ( e x c i t a t i o n f i l t e r m o d u l e ) を備えることを特徴とする、請求項1に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項7】

前記光源からの光の一部を反射によって励起フィルタモジュールに案内する一つ以上の第1平行光ミラー ( c o l l i m a t e m i r r o r ) をさらに備え、

第1平行光ミラーが、第1特定波長値よりは長波長帯の光は透過させ、前記第1特定波長値より短波長帯の光は反射させることにより、前記第1特定波長値が、 i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光より長波長帯であることを特徴とする、請求項6に記載の顕微鏡装置。

40

## 【請求項8】

前記対物レンズが、前記試料の前端に配置される第1対物レンズ及び前記試料の後端に配置される第2対物レンズを含み、前記第1対物レンズは石英 ( Q u a r t z ) 又は反射 ( r e f l e c t i n g ) 対物レンズであることができ、

前記第2対物レンズは f u s e d s i l i c a 対物レンズであることを特徴とする、

50

請求項 6 に記載の顕微鏡装置。

【請求項 9】

光照射部から対物レンズを連結する光経路上に第 2 平行光ミラー (collimate mirror) が設置され、第 2 平行光ミラーが、第 2 特定波長値よりは長波長帯の光は透過させ、前記第 2 特定波長値より短波長帯の光は反射させることにより、前記第 2 特定波長値が、i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光より長波長帯で、検出しようとする i F R E T 用探針で生成される発光の波長帯よりは短波長であることを特徴とする、請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

【請求項 10】

第 2 平行光ミラーが、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光、i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光、又は両方を反射させて対物レンズを介して第 1 光又は第 2 光を試料に入射させ、試料に照射された第 1 光から来由する i F R E T 用探針で生成される第 1 発光、又は、試料に照射された第 2 光から来由する i F R E T 用探針で生成される第 2 発光が、第 2 平行光ミラーを透過して認識部に入射されて、それぞれ第 1 発光信号又は第 2 発光信号として検出されることを特徴とする、請求項 9 に記載の顕微鏡装置。

10

【請求項 11】

光照射部が、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光及び i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を一定の時間間隔で交互に照射するものであり、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光を試料上に照射して i F R E T 用探針で生成される第 1 発光信号値と、i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を照射して i F R E T 用探針で生成される第 2 発光信号値からレシオメトリック法によって第 3 発光信号値がレシオメトリックモジュールで一定の時間間隔で算出されて蓄積され、時間に伴う標的タンパク質の位置、量又は両方の変化を確認することができることを特徴とする、請求項 2 に記載の顕微鏡装置。

20

【請求項 12】

時間に伴う標的タンパク質の変化が、動画として算出されることを特徴とする、請求項 11 に記載の顕微鏡装置。

【請求項 13】

試料が、標的タンパク質自体、溶液、細胞、血液、尿、水、土壌、空気、食品、廃棄物、動植物組織又は生物体自体であることを特徴とする、請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

30

【請求項 14】

請求項 1 ~ 請求項 13 のうちの一つの項に記載された顕微鏡装置を利用した標的タンパク質検出又はイメージ化の方法であって、前記 i F R E T 用探針を標的タンパク質を含有する試料内に導入する第 1 ステップと、

標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光及び i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を交互に第 1 ステップで製造された試料に照射する第 2 ステップ、及び

標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光を試料上に照射して i F R E T 用探針で生成される第 1 発光信号値と、i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を照射して i F R E T 用探針で生成される第 2 発光信号値を分析して、第 1 発光信号値と第 2 発光信号値のレシオメトリック法によって第 3 発光信号値を算出する第 3 ステップとを含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 15】

標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光及び i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を一定の時間間隔で交互に照射し、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光を試料上に照射して i F R E T 用探針で生成される第 1 発光信号値と、i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を照射して i F R E T 用探針で生成される第 2 発光信号値からレシオメトリック法によって第 3 発光信号値が一定の時間間隔で算出されて蓄積され、時間に伴う標的タンパク質の変化を確認すること

50

ができることを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

時間に伴う標的タンパク質の変化が動画として算出されることを特徴とする、請求項15に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光共鳴エネルギー転移 (iFRET ; intrinsic Fluorescence Resonance Energy Transfer) 用探針を利用したタンパク質検出又はイメージ化顕微鏡装置、及びこれを利用したタンパク質検出又はイメージング方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

誘電体チップ等のバイオチップの蛍光分析をはじめとする様々な生体医学分野において、蛍光を利用した微細試料の詳細観察のために、光学装備である蛍光 (fluorescence) 顕微鏡が広く使用されている。蛍光顕微鏡は、マイクロ対象物である試料に光を照射し、照射された光によって試料で励起 (excitation) 及び蛍光放出の過程を経て放出される蛍光を捕捉して、マイクロ対象物のイメージ等の情報を観測する装置である。通常、蛍光顕微鏡利用の際に測定を可能にするためには、測定される試料上に多様な探針子又はレポーターが挿入される。一方、生命科学に関連する多くの分野で、様々な物質が生体内又は体外で生体物質を分析するための探針子又はレポーターとして活用されている。このような探針子又はレポーターシステムは、特定の基質自体、又は基質が酵素反応によって分解又は変形して現われる着色、発色、発光を測定する方法と、蛍光や着色能を有する物質自体を観察するものとに大別することができる。

20

【0003】

前者の各方法は、目的とするタンパク質に融合された形態でタンパク質の発現量、プロモーターの強さの測定、組換え菌体の選別等の細胞内の観察だけではなく、ウエスタン/ノーザンブロッティング、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 等の細胞外観察にも活用されており、代表的な例としては、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase)、ペルオキシダーゼ (peroxidase)、キサントニンオキシダーゼ (xanthine oxidase) 等の酵素と、基質としてルミノール (luminol)、ルシゲニン (lucigenin)、アクリジニウムエステル (acridinium ester)、ビオチン (biotin)、フルオレセイン (fluorescein)、ジオキシゼニン (dioxigenin) 等の化合物が利用されている。

30

【0004】

しかし、これらが細胞内で発現される場合、生体内代謝経路を攪乱させて成長を阻害したり、細胞死滅を誘導する等の危険性があるという欠点を持つ。また、前記酵素らの触媒特性に起因する問題だけでなく、使用される基質の低い安定性は、実験誤差の主な原因となり、これらの大部分が生物素材ではない化学合成物であるため細胞に有害となる可能性があり、生体内で持続的な観察が難しいという欠点も常在する。したがって、前述した探針子又はレポーターの大部分は、生体内よりは生体外の探針に主に利用されている。

40

【0005】

したがって、前記の問題点を改善するために、タンパク質自体が探針子として作用するレポーターに関する研究が活発に進められてきた。タンパク質自体が探針子である代表的な例としては、特定波長の光を受けて吸収し、活性化された蛍光団が低いエネルギーを有する定常状態に戻る過程で放出されるエネルギーが光の形態で現われる特性を持つ蛍光タンパク質を挙げることができる。代表的な例としては、クラゲ (jellyfish) の *Aequorea victoria* から由来した緑色蛍光を発する GFP (green fluorescent protein) と、*Discocosoma* 種から由来し

50

たDsRed(Discosoma red fluorescent protein)が挙げられる。

【0006】

前記蛍光タンパク質は、基質や補助因子なしにタンパク質自体が蛍光を発するので、前者の場合のように代謝攪乱及び細胞生理学的因子に対する干渉が少なく、前者の酵素が活用される多くの探針分野とそれ以外の分野、すなわち、酵素及び基質が有する短所によって適用しにくい分野でも活用が可能である。特に、タンパク質が特定波長の光によって生成する固有の波長を持つ蛍光を介して、細胞や生物体を破壊することなく正常な生理機能を維持する、生きている状態で特定タンパク質の移動と活性経路、細胞分裂及び分化過程等のように、細胞内部で起きる複雑な変化を直接モニタリングするにおいて、現存するい

10

【0007】

また、タンパク質工学技術を活用して、野生型蛍光タンパク質と異なる波長の光を放出するように改良された赤色蛍光タンパク質(RFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、青緑色蛍光タンパク質(CFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)等を組み合わせて活用する場合には、複数の現象を同時に観察することができ、異なる波長の光を放出する蛍光タンパク質が隣接したり融合された形態で発現したときに起きるFRET現象を活用して、試料内の特定物質の存在有無の探索、タンパク質間の相互作用の観察等の研究目的に多様に活用され得る長所を持つ。

【0008】

一方、蛍光共鳴エネルギー転移とは、短波長の蛍光タンパク質(shorter wavelength dye)であるエネルギー供与体(donor)が外部からエネルギーを吸収すると、供与体の励起エネルギーが光エネルギーとして放出される代わりに、所定の距離の中に位置した(<10nm)長波長の蛍光タンパク質(longer wavelength excitation dye)であるエネルギー受容体(acceptor)に無発光で(radiationless)伝達され、受容体の長波長の蛍光のみが放出される現象をいう。(非特許文献1)は、FRETの原理を利用してカルモジュリン(calmodulin)とカルモジュリン結合ペプチド(calmodulin-binding peptide)間の相互作用を分析しながら、新しい概念のタンパク質相互作用分析システムを開発した。蛍光タンパク質は、互いに異なる固有の波長領域の光を吸収して励起(excitation)され、そのエネルギーが光又は熱として発散されると、基底状態に回復しながら蛍光タンパク質毎に独特の波長帯の光を発散(emission)する。蛍光共鳴エネルギー転移の原理は、互いに異なる2つの蛍光タンパク質が10~100内にある場合、短波長の蛍光タンパク質が励起した後に放出する光が長波長の蛍光タンパク質の励起を誘導し、蛍光を発散する現象である。すなわち、相互作用を調べようとする2つのタンパク質の後に互いに異なる2つの蛍光タンパク質をそれぞれ付着させた後、タンパク質の相互作用によって2つの蛍光タンパク質が10~100以内に近づいたときに起きる蛍光共鳴エネルギー転移現象による蛍光を探知することにより、タンパク質の相互作用を分析することができるのである。

20

30

【0009】

例えば、488nm波長の光で励起する蛍光タンパク質は、520nm波長帯の蛍光を発散し、これはまた対をなした他の蛍光タンパク質を刺激する波長として作用するようになり、630nm波長帯の蛍光を発散する。したがって、488nmで励起させて630nm波長帯の蛍光を探知することで、2つのタンパク質の相互作用を分析することができる。このシステムは、生きている細胞内でタンパク質の動的な相互作用の分析が可能であるという長所があるが、2つの蛍光タンパク質の距離が非常に近い場合にのみ探知が可能であり、微妙な蛍光波長の変化を感知するためにはタンパク質の過剰発現が必要とされる場合がある。

40

【0010】

前述の問題点を解決するために、最近、タンパク質固有の蛍光を利用しようとする研究

50

が進められており、アミノ酸の中の一つであるトリプトファンを FRET に応用できることが報告され（非特許文献 2）、トリプトファン結合ドメイン及びこれを検出することができる蛍光部分を利用して FRET を測定する多重結合トリプトファンバイオセンサー技術が知られている（特許文献 1）。

【0011】

しかし、現在まで知られているタンパク質固有の蛍光を利用した FRET 技術に用いられる探針は、タンパク質自体と蛍光分子の発光波長が互いに重畳し、不必要な信号が測定され、これにより測定結果の敏感度と特異性が阻害されるという欠点がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0012】

【特許文献 1】米国公開特許公報 第2008 / 0311047号

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献 1】Miyawaki et al., Nature, 1997, 388:882-887

【非特許文献 2】Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 4562-4588

【非特許文献 3】Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd ed., New York:Plenum Press, 1999

【非特許文献 4】Patterson et al., Anal. Biochem. 284: 438, 2000

【非特許文献 5】Patterson et al., J. of Cell Sci. 114: 837, 2001

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

そこで、本発明者らは、従来広範囲に活用されている探針システムが有する根本的な問題を解決しようと持続的な研究を重ねた結果、タンパク質固有の蛍光を利用する新しい蛍光分子を確認し、これらを標的タンパク質の結合部位と結合した探針システムを開発し、iFRET用探針を利用したタンパク質検出又はイメージ化顕微鏡装置及びこれを利用したタンパク質検出又はイメージング方法を開発し、本発明を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0015】

30

本発明の目的は、固有の蛍光共鳴エネルギー転移（iFRET）用探針を利用した標的タンパク質検出又はイメージ化顕微鏡装置、及び本発明による顕微鏡装置を利用した標的タンパク質検出又はイメージ化の方法を提供することにある。

【0016】

前記目的を達成するため、本発明は、固有の蛍光共鳴エネルギー転移（iFRET）用探針を利用した標的タンパク質検出又はイメージ化顕微鏡装置であって、前記 iFRET 用探針は、標的タンパク質に特異的な結合部位（binding site）又は前記結合部位を有する分子と、標的タンパク質の固有蛍光（intrinsic fluorescence）に対するアクセプター（acceptor）機能を有する蛍光分子が直接又はリンカーを介して結合されたもので、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光及び iFRET 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を照射する光照射部と、前記光照射部で照射される光を iFRET 用探針が導入された試料上に入射するようにする対物レンズ、及び標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光を試料上に照射して iFRET 用探針で生成される第 1 発光信号と、iFRET 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を照射して iFRET 用探針で生成される第 2 発光信号を検出する認識部とを含む、顕微鏡装置を提供する。

40

【0017】

前記顕微鏡装置は、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光を試料上に照射して iFRET 用探針で生成される第 1 発光信号値と、iFRET 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を照射して iFRET 用探針で生成される第 2 発光信号値を分

50

析し、第1発光信号値と第2発光信号値のレシオメトリック法によって第3発光信号値を算出するレシオメトリックモジュール ( r a t i o m e t r i c m e a s u r e m e n t m o d u l e ) をさらに備えることが好ましい。

【0018】

また、本発明は、本発明による顕微鏡装置を利用した標的タンパク質検出又はイメージ化の方法であって、前記 i F R E T 用探針を標的タンパク質を含有する試料内に導入する第1ステップ、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光及び i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を交互に第1ステップで製造された試料に照射する第2ステップ、及び標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光を試料上に照射して i F R E T 用探針で生成される第1発光信号値と、 i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を照射して i F R E T 用探針で生成される第2発光信号値を分析して、第1発光信号値と第2発光信号値のレシオメトリック法によって第3発光信号値を算出する第3ステップとを含むことを特徴とする方法を提供する。

10

【発明の効果】

【0019】

本発明に従って i F R E T 用探針を使用すれば、従来の F R E T 方法と異なりタンパク質内のアミノ酸を蛍光供与体として使用するので、標的タンパク質に人為的な標識 ( 蛍光タンパク質等 ) が不要であるだけでなく、一つの蛍光物質のみを使用してもよく、 i F R E T 用探針はタンパク質固有の蛍光と分離した発光波長を有するので高い特異性と感度を有し、様々なタンパク質の量、活性及び機作等をより容易かつ正確に分析することができ、前記標的タンパク質に関連する疾病の診断及び治療剤の開発に利用できる。

20

【0020】

したがって、本発明による顕微鏡装置を使用すれば、 i F R E T 用探針が結合された標的タンパク質検出又はイメージ化の方法を容易に行うことができ、本発明による標的タンパク質の検出又はイメージ化の方法によって、標的タンパク質の量、標的タンパク質の活性、標的タンパク質の作用機序若しくは移動経路を確認又は追跡することができる。

【0021】

また、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光及び i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を標的タンパク質含有試料に照射して、正確な標的タンパク質の定量分析が可能で、また一定間隔で第1光及び第2光を交互に試料に照射すれば、標的タンパク質の挙動を動画でも観察することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】本発明の第1実施例で固有の蛍光共鳴エネルギー転移 ( i F R E T ) 用探針を利用した標的タンパク質検出又はイメージ化顕微鏡装置についての構成図である。

【図2】本発明の第2実施例での顕微鏡装置についての構成図である。

【図3】本発明の第3実施例での顕微鏡装置についての構成図である。

【図4】本発明に使用される試料上に内在する i F R E T 用探針を介した光の励起及び発散過程を示した図面である。

【図5】本発明の顕微鏡装置を利用した標的タンパク質検出又はイメージング過程を時系列的に示した順序図である。

40

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明の前記目的、特徴及び他の長所は、添付図面を参照して本発明の好ましい実施例を詳細に説明することでさらに明らかになるであろう。記述される実施例は、発明の説明のために例示的に提供されるものであり、本発明の技術的範囲を限定するものではない。

【0024】

本発明に、 i F R E T 用探針を利用したタンパク質検出又はイメージ化顕微鏡装置をなす各構成要素は、必要に応じて一体型で製造されたり、それぞれ分離して製造してもよい。また、使用形態に応じて一部の構成要素を省略して使用可能である。

50

本発明で使用される用語「FRET」とは、互いに異なる発光波長帯の2つの蛍光物質との間で発生する非放射性(non-radiative)エネルギー転移現象であって、励起(excitation)した状態の蛍光供与体の励起準位エネルギーが蛍光アクセプターに伝達されて蛍光受容体から発光(emission)が観察されたり、蛍光供与体の蛍光減少(quenching)が観察される現象を意味する(非特許文献3)。

【0025】

FRETは、一般に蛍光供与体から放出される波長が蛍光受容体の吸光スペクトラムと重なり、光子(photon)の出現なしに発生するため、共鳴エネルギー転移といわれ、これは蛍光供与体と蛍光受容体との間の長距離双極子の相互作用による結果である。FRETのエネルギー転移の効率は、蛍光供与体の発光スペクトラムと蛍光受容体の吸光スペクトラムが重なる範囲と、蛍光供与体の量子効率、蛍光供与体と蛍光受容体の転移双極子(transition dipoles)の相対的方向(relative orientation)、そして蛍光供与体と蛍光受容体との間の距離によって変わってくる。したがって、FRETのエネルギー転移効率は、蛍光供与体と蛍光受容体の距離と相対的方向によって異なって現われるが、Forssterの数式によれば次の通り表現される。

10

【0026】

$$E = R_0^{-6} / (R^6 + R_0^{-6}) \quad (\text{数式1})$$

【0027】

前記式中、EはFRET効率を示し、Rは蛍光供与体と蛍光受容体との間の距離であり、蛍光物質によって差はあるが、通常2-9nmと定義される。また、R<sub>0</sub>はFRET効率が50%になる蛍光供与体と蛍光受容体との間の距離をいい、一般にフォルスター距離(Forsster distance)又はフォルスター半径(Forsster radius)と呼ばれる。R<sub>0</sub>は次の数式2で表現される。

20

【0028】

$$R_0 = 0.211 [k^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)]^{1/6} \quad (\text{数式2})$$

【0029】

前記式中、k<sup>2</sup>は方向係数(orientation factor)で通常2/3で計算し、蛍光供与体発光と蛍光受容体吸光の相対的方向に応じて0~4の範囲の値を有する。nは媒質の屈折率であって、通常25℃の水は約1.334であり、Q<sub>n</sub>は蛍光供与体の量子効率である。J(λ)は蛍光供与体の発光と蛍光受容体の吸光スペクトラム像の重複(overlap)程度であって、M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>nm<sup>4</sup>の単位値を有する(非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5)。

30

【0030】

本発明で使用される用語「蛍光供与体」とは、タンパク質の固有蛍光を発揮に關与するアミノ酸である。大部分のタンパク質は、固有蛍光(intrinsic fluorescence)を発揮するが、この際、芳香族環構造を有するアミノ酸が關与するものと知られている。その例としては、トリプトファン(Tryptophan)、チロシン(Tyrosine)、及びフェニルアラニン(Phenylalanine)等が挙げられる。このようなトリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンは、260~300nm波長の光によって励起して290~400nmの波長の光を発光し、その光が440nm波長まで影響を及ぼすものと知られている。

40

【0031】

本発明で使用される用語「蛍光アクセプター」及び「蛍光受容体」は混用され、タンパク質の固有蛍光によって励起して発光する蛍光分子を意味する。

【0032】

本発明によるiFRET用探針155は、標的タンパク質に特異的な結合部位又は前記結合部位を有する分子(以下「結合分子」と略称する)156とiFRETアクセプター機能を有する蛍光分子158を含み、前記結合分子と蛍光分子が直接又はリンカーを介して結合されている。前記結合分子部位は、iFRET用探針が標的タンパク質に特異的な

50

結合をするように誘導する（図3参照）。

【0033】

本発明によるタンパク質の固有蛍光に対するアクセプター機能を有する蛍光分子158は、前記タンパク質の固有蛍光を現わすアミノ酸であるトリプトファン、チロシン及び/又はフェニルアラニンの発光波長である300~400nmの光によって励起することが好ましく、タンパク質固有の蛍光と分離される波長である450nm以上の発光波長を有することがさらに好ましい。

【0034】

iFRET用探針が発光する光を確認又は追跡時、iFRET用探針が発光する全ての領域の波長帯を測定することができるが、iFRET用探針が放出する光のうち450nm又はそれ以上の長波長の光を測定するのが好ましい。細胞あるいは組織(tissue)には、260~400nmの光によって蛍光を出す細胞自家蛍光(cellular autofluorescence)物質である核酸、NAD(P)Hやコラーゲン、あるいは細胞タンパク質等が存在し、これらが生成する蛍光の発光波長が主に300~450nmにわたって存在する。よって、本発明のiFRET用探針は、細胞イメージングに使用されたり細胞抽出物あるいは組織染色(tissue staining)に使用される場合、これらの干渉を避けるために、本発明のiFRET用探針は発光領域が450nm以上であることが好ましい。

10

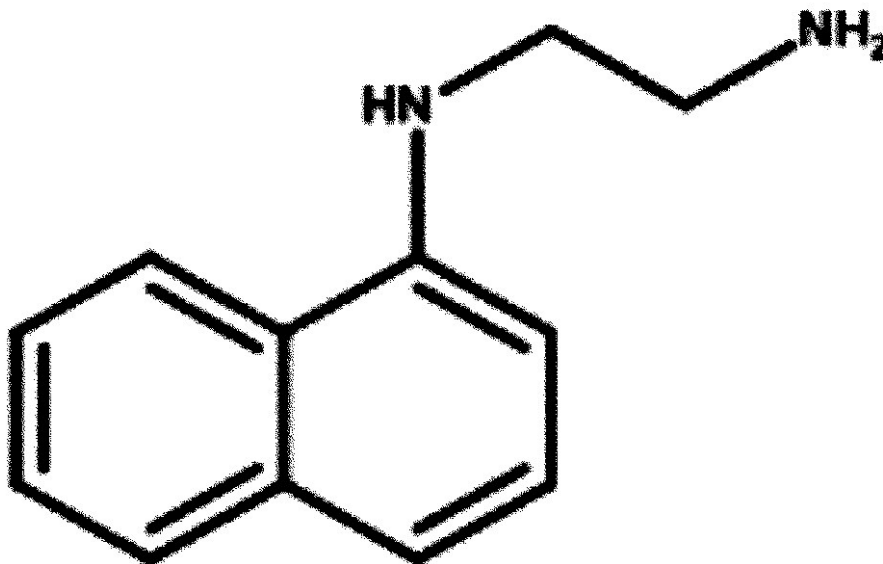
【0035】

一例として、本発明で使用されるiFRET用探針で、タンパク質の固有蛍光に対するアクセプター機能を有する蛍光分子158として下記化学式Iの1-ナフチルジアミン(1-naphthyl diamine)を使用する場合、LED(light-emitting diode)に効果的に検出可能で蛍光探針子で使用することができ、励起波長が340nm~380nmで、発光波長が400nm~600nmであるため公知の蛍光体と比べて発光(emission)波長帯が高く細胞の自家蛍光と分離して測定することができる。

20

【0036】

【化1】



30

40

【0037】

一方、本発明で使用される用語「試料」とは、標的タンパク質を含有するか含有していると推定されて分析が行われる観察対象物を意味し、標的タンパク質自体、細胞、血液、尿、水、土壌、空気、食品、廃棄物、動植物組織及び生物体自体のうちいずれか一つ以上から収集されたものであることができるが、これに限定されるものではない。

【0038】

50

標的タンパク質に本発明による i F R E T 用探針を処理する場合、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する光を照射して発光する i F R E T 用探針を確認するために、通常の蛍光物質処理条件を利用することができ、好ましくは水、緩衝溶液、炭素数 1 ~ 6 の低級アルコール及びこれらの混合物で構成された群から選択された媒質内、あるいはバイオチップや（極）微細粒子相、あるいは細胞や組織（t i s s u e）を対象に行われることができる。

【0039】

以下、添付された図面を参照して本発明の実施例による標的タンパク質検出又はイメージ化顕微鏡装置及びこれを利用した標的タンパク質検出又はイメージ化の方法を詳細に説明することにする。

【0040】

標的タンパク質検出又はイメージ化顕微鏡装置 100 の全体的な構成の説明

まず、図 1 を参照して、本発明の一実施例による顕微鏡装置 100 は、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光及び i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を照射する光照射部 110、前記光照射部 110 で照射される光を i F R E T 用探針が導入された試料 150 上に入射するようにする対物レンズ 140、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光を試料上に照射して i F R E T 用探針 155 で生成される第 1 発光信号と、i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を照射して i F R E T 用探針 155 で生成される第 2 発光信号を検出する認識部 160 を含む。試料 150 が置かれる試料ステージ 152 は、x、y、z の 3 方向に運動をすることにより試料 150 の 3 次元駆動を可能にする。

【0041】

本発明の顕微鏡装置は、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光を試料上に照射して i F R E T 用探針で生成される第 1 発光信号値と、i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を照射して i F R E T 用探針で生成される第 2 発光信号値を分析して、第 1 発光信号値と第 2 発光信号値のレシオメトリック法によって第 3 発光信号値を算出するレシオメトリックモジュール 170 ( r a t i o m e t r i c m e a s u r e m e n t m o d u l e ) をさらに備えるのが好ましい。レシオメトリックモジュール 170 は、モジュール駆動及び計算用プログラムを備えることができる。

【0042】

光照射部 110 から生成された標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光 142 及び i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光 142 は、対物レンズ 140 で集光されて試料 150 に伝達され、試料 150 内で標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光を試料上に照射して i F R E T 用探針 155 で生成される第 1 発光 146 と、i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を照射して i F R E T 用探針 155 で生成される第 2 発光 146 とは、認識部 160 で認識される。

【0043】

試料 150 には、一般に標的タンパク質 154 及び前記標的タンパク質に結合された i F R E T 用探針 155 が含まれ得る。i F R E T 用探針 155 は、標的タンパク質に特異的な結合分子 156 と i F R E T アクセプター機能を有する蛍光分子 158 が直接又はリンカーを介して結合されたもので、前記結合分子部位は、i F R E T 用探針が標的タンパク質に特異的に結合されるように誘導して、i F R E T を介して標的タンパク質の定量を可能にするだけでなく、i F R E T 用探針が標的タンパク質と共に移動するようにして標的タンパク質の挙動を確認できるようにする。

【0044】

したがって、第 1 発光信号値、第 2 発光信号値、及び第 3 発光信号値は、試料の 2 次元の各地点に対応する 2 次元的な映像値であり得る。

一方、本発明は、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光 142 a (図 4) 及び i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光 142 b (図 4) を、標的タンパク質及びこれに結合した i F R E T 用探針が含有された試料 150 に交互に照射するこ

10

20

30

40

50

とを特徴とする。

【0045】

i F R E T用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光142bは、標的タンパク質内のアミノ酸を励起せずにi F R E T用探針の蛍光分子を直接励起させる光である。

【0046】

モジュール170 ( r a t i o m e t r i c m e a s u r e m e n t m o d u l e ) は、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光を試料上に照射してi F R E T用探針で生成される第1発光信号値と、i F R E T用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を照射してi F R E T用探針で生成される第2発光信号値を分析して、第1発光信号値と第2発光信号値のレシオメトリック法によって第3発光信号値を算出することができる。

10

【0047】

第3発光信号値は、測定試料(例:細胞、検液等)に存在するi F R E T用探針(第2発光信号値)の量に対する標的タンパク質に結合したi F R E T用探針の量(第1発光信号値)の比であって、測定の時間的・空間的变化に関係なく常に基準値(第2発光信号値)が提供され、標的タンパク質とi F R E T用探針の結合を定量化を可能にする。また、レシオメトリック法を用いれば、試料に照射される光の量が変わっても補正可能である。

【0048】

第3発光信号値は、次のような式によって算出できる。

【0049】

第3発光信号値 = 第1発光信号値 ÷ 第2発光信号値 (数式3)

20

【0050】

レシオメトリック法によって、第2発光信号値を基準値( r e f e r e n c e )として使用して第1発光信号値の強さを第3発光信号値に換算することにより、i F R E T用探針の偏在化( l o c a l i z a t i o n )による測定誤差を最小化し、鮮明なイメージが得られ、標的タンパク質の量と質に対する薬物結合の定量的測定、標的タンパク質の空間的移動追跡等が可能である。

【0051】

第3発光信号値は、従来のレシオメトリック法ソフトウェアを使用して算出できる。

【0052】

光照射部110で、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光の波長範囲は260nm~300nmであり、i F R E T用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光の波長範囲は300nm~400nmであることが好ましい。

30

【0053】

光照射部110は、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光とi F R E T用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を交互に照射することができるレーザー電源調節装置であることができる。

【0054】

図2を参照して本発明の第2実施例による顕微鏡装置100'を説明すれば次のとおりである。下記では第1実施例100と比較して異なった部分についてのみ説明し、同一部分については省略する。

40

【0055】

光照射部110は、図2に示されるように、光源111、及び前記光源からの標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光とi F R E T用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を選択的にフィルタリングする励起フィルタモジュール130( e x i t a t i o n f i l t e r m o d u l e )を備えることができる。

【0056】

前記光源は、X e / H g (キセノン/水銀)ランプであってもよい。水銀蒸気にキセノンガスを利用する方式のメタルハライドランプは、発光効率を高めることができ消費電力を20%以下に減少させることができる。

50

光照射部 110 は、前記光源からの光の一部を反射によって励起フィルタモジュールに案内する一つ以上の第 1 平行光ミラー 121 (collimate mirror) をさらに備えることができる。

【0057】

第 1 平行光ミラー 121 は、第 1 特定波長値 ( $> 600 \text{ nm}$ ) より長波長帯の光は透過させ、前記第 1 特定波長値より短波長帯の光は反射させることにより、光源からフィルタへの過度な熱伝達を遮断することによりフィルタの損傷を防止し、赤外線吸収フィルタ等で代替も可能である。前記第 1 特定波長値は、iFRET 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光より長波長帯であるものである。第 1 平行光ミラー 121 は、光源 111 で生成される広範囲な波長の光のうち本発明には適用する必要のない波長領域を 1 次的に除去する。すなわち、 $600 \text{ nm}$  以下の波長帯域の光を励起フィルタモジュール 130 に送るようにする。

10

【0058】

励起フィルタモジュール 130 は、複数の光ウィンドウ 135、136 が設置された光分離板 134、第 1 平行光ミラー 121 からの反射光を受信する光流入部 131、及び光を出す光排出部 132 を含む。

【0059】

励起フィルタモジュール 130 は、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光 142a (図 4) と、iFRET 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光 142b (図 4) を選択的に透過させることができるが、これは光分離板 134 を周期的に回転駆動する過程によって標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光を透過する第 1 光ウィンドウ 135 及び iFRET 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を透過する第 2 光ウィンドウ 136 が、光流入部 131 と光排出部 132 を連結する光路上に配置されることができる。光排出部 132 から出る光成分は、光連結ライン 137 を介して光ノズル 138 に吐出されることができる。光連結ライン 137 は、フレキシブルな材質で構成されることにより、光ノズル 138 の自由な位置選定を可能にする。あるいは、適切な方法で光排出部 132 と第 2 平行光ミラーを水平配列することも可能である。

20

【0060】

対物レンズ 140 は、試料 150 から放出される光を集光して像を形成するようにする。対物レンズ 140 は、例えば、石英又は石英ガラス (fused silica) で製造することができる。

30

【0061】

図 2 に示されるように、光照射部 110 から対物レンズ 140 を連結する光経路上に第 2 平行光ミラー (collimate mirror) 125 を設置することができる。この時、第 2 平行光ミラー 125 は、第 2 特定波長値よりは長波長帯の光は透過させて、前記第 2 特定波長値より短波長帯の光は反射させ、前記第 2 特定波長値は、iFRET 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光より長波長であり、検出しようとする iFRET 用探針で生成される発光の波長帯よりは短波長のものである。第 2 特定波長値は  $400 \text{ nm}$  であることが好ましく、これはタンパク質の吸収波長が  $260 \sim 300 \text{ nm}$ 、iFRET 用探針の吸収波長が  $300 \sim 400 \text{ nm}$  で、iFRET 用探針の最終発光波長が  $400 \text{ nm}$  以上であるためである。第 2 平行光ミラー 125 は、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光、iFRET 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光、又は両方を反射させて対物レンズ 140 を介して第 1 光又は第 2 光を試料に入射させることができる。一方、試料に照射された第 1 光に由来する iFRET 用探針で生成される第 1 発光、又は、試料に照射された第 2 光に由来する iFRET 用探針で生成される第 2 発光は、第 2 平行光ミラー 140 を透過して認識部 160 に入射され、それぞれ第 1 発光信号又は第 2 発光信号として検出され得る。

40

【0062】

一方、光照射部が標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光及び iFRET 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を一定の時間間隔で交互に照射する場合、

50

標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第1光を試料上に照射してiFRET用探針で生成される第1発光信号値(A1、A2、A3、...)と、iFRET用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第2光を照射してiFRET用探針で生成される第2発光信号値(B1、B2、B3、...)から、レシオメトリック法によって第3発光信号値(C1、C2、C3、...)がレシオメトリックモジュールで一定の時間間隔で算出され蓄積されるため、時間に伴う標的タンパク質の位置、量又は両方の変化を確認することができる。したがって、時間に伴う標的タンパク質の変化が動画としても算出され得る。これにより、時間に伴う標的タンパク質の細胞内の位置と空間的移動、量的変化、活性変化、薬物の結合程度、又は上記した全ての変化を確認することができる。

【0063】

それ以外には、通常の蛍光測定法に用いられる技術、例えばフィルタ方式及びモノクロム方式の蛍光分光器に使用される技術を適用することができる。

【0064】

図3を参照して本発明の第3実施例による顕微鏡装置100''を説明すれば次のとおりである。下記では第2実施例100'と比べて異なる部分についてのみ説明し、同一部分については説明を省略する。

【0065】

本実施例では、光源111からの光の一部を反射によって励起フィルタモジュール130に案内する第1波長選択ミラー(dichroic mirror)126を備えることができる。前記第1波長選択ミラー126は、第1平行光ミラー121と同様に第1特定波長値(600nm)よりは長波長帯の光は透過させ、前記第1特定波長値より短波長帯の光は反射させることにより、広範囲な波長の光のうち本発明には適用する必要のない波長領域を1次的に除去する。

【0066】

励起フィルタモジュール130の光排出部132を介して出る光成分は、リレーレンズシステム(relay lens system)144、第2波長選択ミラー146、対物レンズ140'、及び第3波長選択ミラー148を経て認識部160で検出される。

【0067】

リレーレンズシステム144は、励起フィルタモジュール130を介してフィルタリングされた光を第2波長選択ミラー146、又は対物レンズ140'に集中させる。第2波長選択ミラー146は、入射される全ての波長の光を反射する。

【0068】

対物レンズ140'は、試料150の前端に配置される第1対物レンズ141及び試料150の後端に配置される第2対物レンズ145を含む。第1対物レンズ141は、石英(Quartz)又は反射(reflecting)対物レンズであることができ、励起作用を容易にするように試料150上に光を集中させる。

【0069】

一方、第2対物レンズ145は、試料150から出る光成分のうち340nm以上の光を透過させると共に、試料150の拡大を可能にする。前記第2対物レンズ145は、fused silicaで製造されることが好ましい。

【0070】

第3波長選択ミラー148は、310nm波長以下の光をフィルタリングして除去する。これによって光源111から供給される過程に於いて残存し得る不必要な光成分を除去することにより認識部160での残像を最小化する。

【0071】

一方、第3波長選択ミラー148を経た光が認識部160に到達する前に別途の排出フィルタ(emission filter)149を備えることができる。

【0072】

顕微鏡装置100を利用した細胞タンパク質イメージング方法の説明

以下、図2、図4及び図5を参照して本発明の実施例による顕微鏡装置を利用した標的

10

20

30

40

50

タンパク質イメージング方法を説明する。

まず、光源 1 1 1 では可視光線又は非可視光線を含む全領域の光を生成する ( S 1 0 ) 。

【 0 0 7 3 】

生成された光は、第 1 平行光ミラー 1 2 1 及び励起フィルタモジュール 1 3 0 を経る過程によって、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光 1 4 2 a ( 図 4 ) 及び i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光 1 4 2 b ( 図 4 ) に分離される ( S 2 0 ) 。

【 0 0 7 4 】

前記 S 2 0 ステップでフィルタリングにより分離選択された波長の光は、対物レンズ 1 4 0 を介して集光される ( S 3 0 ) 。この場合に、多様な倍率調整によって分解能を向上させることができる。

【 0 0 7 5 】

対物レンズ 1 4 0 から試料 1 5 0 上に照射された光成分が、試料 1 5 0 に内在する i F R E T 用探針 1 5 5 を介して励起されて可視光領域の波長で発光する ( S 4 0 ) 。ここで、前記 i F R E T 用探針 1 5 5 を励起させる光は、標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光 1 4 2 a ( 図 4 ) 及び i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光 1 4 2 b ( 図 4 ) が交互に繰り返されるものであってもよい。

【 0 0 7 6 】

認識部 1 6 0 は、i F R E T 用探針 1 5 5 で生成される発光信号を検出する ( S 5 0 ) 。認識部 1 6 0 は、C C D カメラモジュールであり得る。前記 C C D カメラモジュールは、密閉された空間にある集光装置の配列を有し、入射される光子エネルギーのパターンを離散的なアナログ信号に変換するようにする。

【 0 0 7 7 】

標的タンパク質内のアミノ酸を励起する波長帯の第 1 光を試料上に照射して i F R E T 用探針で生成される第 1 発光信号値と、i F R E T 用探針の蛍光分子を励起する波長帯の第 2 光を照射して i F R E T 用探針で生成される第 2 発光信号値は、レシオメトリック法を行って第 3 発光信号値を算出する ( S 6 0 ) 。

【 0 0 7 8 】

本発明によるイメージ化の方法は、自動化ワークステーションによって行われることが好ましい。

【 0 0 7 9 】

i F R E T 用探針に関連し、同日付けで出願された本発明者の韓国出願 ( i F R E T 用探針及びその用途 ) は、本発明の明細書の一部に統合される。

【 0 0 8 0 】

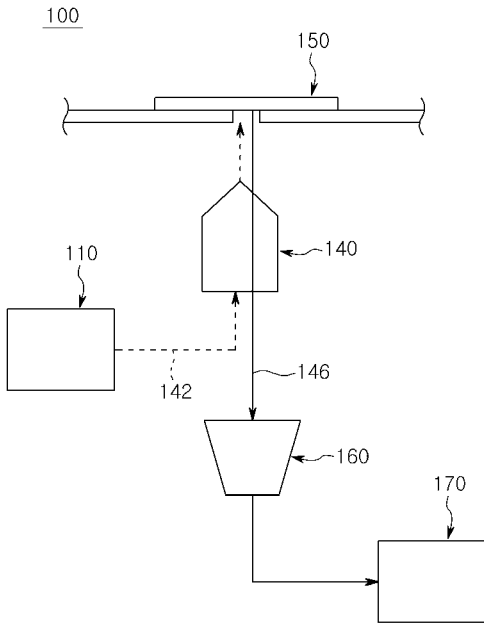
以上で本発明の好ましい実施例について説明したが、本発明は上述した特定の実施例に限定されない。すなわち、本発明が属する技術分野で通常の知識を有する者であれば、添付された特許請求の範囲の思想及び範疇を逸脱することなく本発明についての多数の変更及び修正が可能であり、そのような全ての適切な変更及び修正の均等物も本発明の範囲に属するものとみなすべきものである。

10

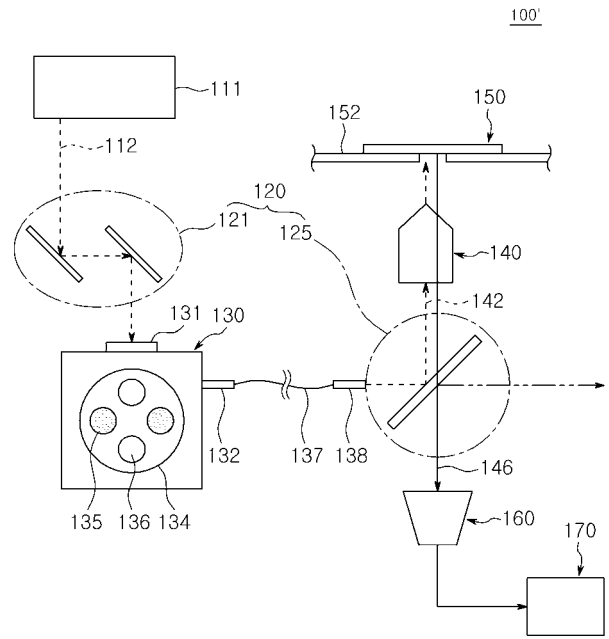
20

30

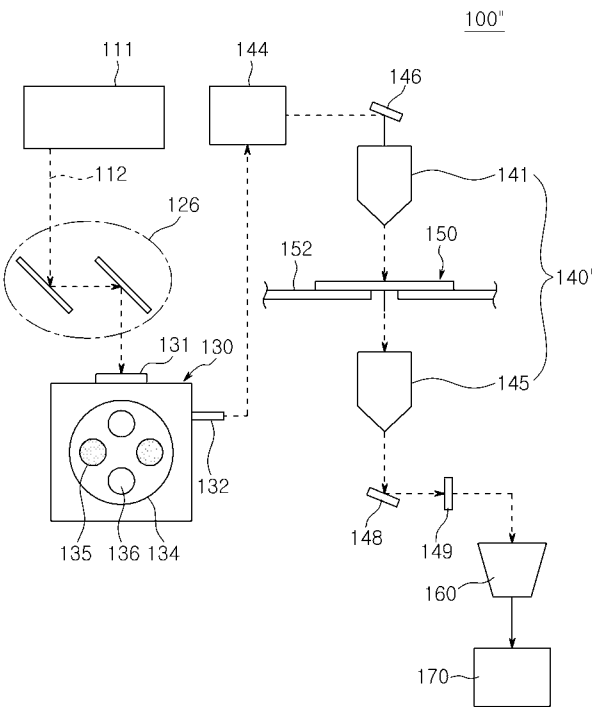
【 図 1 】



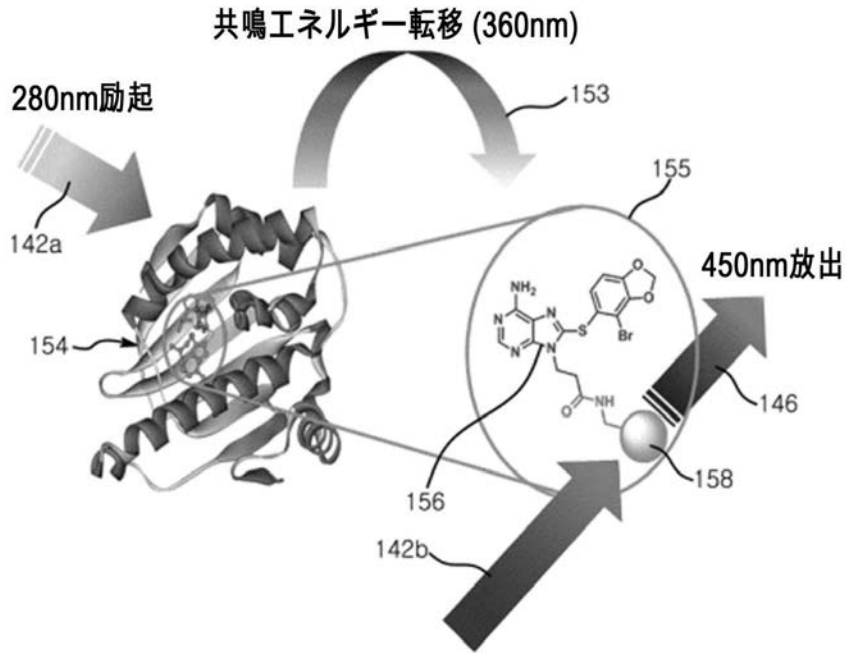
【 図 2 】



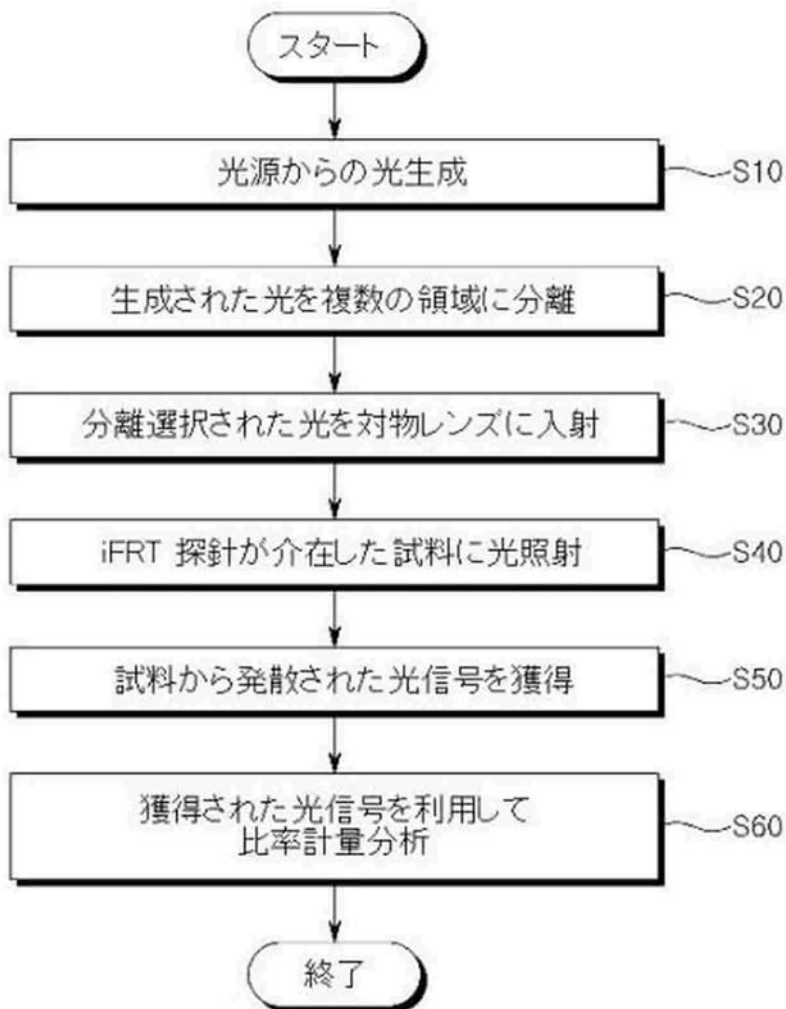
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】




## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2012/003126**

|  |   |  |
|--|---|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><i>G01N 33/483(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i</i><br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>G01N 33/483; G02B 21/00; G01N 21/64; G02B 27/00; G01N 33/58; C12Q 1/68; G01N 21/39; C12M 1/34<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above<br>Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: iFRET(iFRET), wavelength(wavelength), excitation(excitation), target, specimen, protein   |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| A  | JP 2006-030178 A (CARL ZEISS JENA GMBH) 02 February 2006<br>See abstract; paragraphs 1-14; figure 1; claim 1.   | 1-16   |
| A  | KR 20-2011-0005025 U (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 19 May 2011<br>See abstract; paragraphs 18-23; figures 1-2; claims 1-5. | 1-16   |
| A  | US 06166385 A (WATT W. WEBB et al.) 26 December 2000<br>See abstract; column 4, line 15 - column 6, line 9; figure 1; claims 1, 7.                      | 1-16   |
| A  | JP 2008-504517 A (CIS BIO INTERNATIONAL) 14 February 2008<br>See abstract; paragraphs 2-15; claim 1.  | 1-16   |
| A  | US 2004-0146913 A1 (MASAHIKO HIRANO et al.) 29 July 2004<br>See abstract; paragraphs 26-45; figure 1; claim 1.  | 1-16   |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.   |   |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br><b>27 NOVEMBER 2012 (27.11.2012)</b>  |   | Date of mailing of the international search report<br><b>28 NOVEMBER 2012 (28.11.2012)</b> |
| Name and mailing address of the ISA/KR<br> Korean Intellectual Property Office<br>Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,<br>Republic of Korea<br>Facsimile No. 82-42-472-7140  |   | Authorized officer<br><br>Telephone No.  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2012/003126**

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member | Publication date |
|--|------------------|----------------------|------------------|
| JP 2006-030178 A                       | 02.02.2006       | DE 102004034962 A1   | 16.02.2006       |
|  |                  | EP 1617259 A1        | 18.01.2006       |
|  |                  | EP 1617260 A1        | 18.01.2006       |
|  |                  | GB 0512343 D0        | 27.07.2005       |
|  |                  | GB 2416445 A         | 25.01.2006       |
|  |                  | GB 2416446 A         | 25.01.2006       |
|  |                  | JP 04934772 B2       | 02.03.2012       |
|  |                  | JP 2006-030989 A     | 02.02.2006       |
|  |                  | US 2006-0012869 A1   | 19.01.2006       |
|  |                  | US 2006-0012875 A1   | 19.01.2006       |
|  |                  | US 2007-0171519 A1   | 26.07.2007       |
|  |                  | US 7468834 B2        | 23.12.2008       |
|  |                  | KR 20-2011-0005025 U | 19.05.2011       |
| US 06166385 A                          | 26.12.2000       | AU 1996-69724 B2     | 07.01.1999       |
|  |                  | CA 2231222 A1        | 27.03.1997       |
|  |                  | CA 2231222 C         | 11.12.2001       |
|  |                  | EP 0852716 A1        | 31.08.2005       |
|  |                  | EP 0852716 B1        | 30.11.2005       |
|  |                  | JP 10-512959 A       | 08.12.1998       |
|  |                  | JP 2002-139436 A     | 17.05.2002       |
|  |                  | JP 2006-106004 A     | 20.04.2006       |
|  |                  | WO 97-11355 A1       | 27.03.1997       |
|  |                  | JP 2008-504517 A     | 14.02.2008       |
| FR 2872287 A1                          | 30.12.2005       |                      |                  |
| FR 2872287 B1                          | 16.03.2007       |                      |                  |
| JP 04777981 B2                         | 21.09.2011       |                      |                  |
| US 2009-0294691 A1                     | 03.12.2009       |                      |                  |
| US 7872243 B2                          | 18.01.2011       |                      |                  |
| WO 2006-010839 A2                      | 02.02.2006       |                      |                  |
| WO 2006-010839 A3                      | 22.06.2006       |                      |                  |
| WO 2006-010839 B1                      | 17.08.2006       |                      |                  |
| US 2004-0146913 A1                     | 29.07.2004       | EP 1441219 A2        | 28.07.2004       |
|  |                  | EP 1441219 A3        | 24.11.2004       |
|  |                  | EP 1441219 B1        | 09.05.2012       |
|  |                  | JP 03686898 B2       | 24.08.2005       |
|  |                  | JP 2004-219104 A     | 05.08.2004       |
|  |                  | US 7449151 B2        | 11.11.2008       |

국제 조사 보고서

국제출원번호  
**PCT/KR2012/003126**

|   |  |        |
|---|--|--------|
| <b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b>   |  |        |
| <i>G01N 33/483(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i</i>  |  |        |
| <b>B. 조사된 분야</b>  |  |        |
| 조사된 최소문헌(국제특허분류 기제)<br>G01N 33/483; G02B 21/00; G01N 21/64; G02B 27/00; G01N 33/58; C12Q 1/68; G01N 21/39; C12M 1/34                      |  |        |
| 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌<br>한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC                   |  |        |
| 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))<br>eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 고유형광공명(FRET), 파장(wavelength), 여기(excitation), 표적, 시료, 단백질 |  |        |
| <b>C. 관련 문헌</b>   |  |        |
| 카테고리*   | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기제   | 관련 청구항 |
| A   | JP 2006-030178 A (CARL ZEISS JENA GMBH) 2006.02.02<br>요약; 단락 1-14; 도면 1; 청구항 1 참조.               | 1-16   |
| A   | KR 20-2011-0005025 U (한국생명공학연구원) 2011.05.19<br>요약; 단락 18-23; 도면 1-2; 청구항 1-5 참조.                 | 1-16   |
| A   | US 06166385 A (WATT W. WEBB 외 1명) 2000.12.26<br>요약; 컬럼 4, 라인 15 - 컬럼 6, 라인 9; 도면 1; 청구항 1, 7 참조. | 1-16   |
| A   | JP 2008-504517 A (CIS BIO INTERNATIONAL) 2008.02.14<br>요약; 단락 2-15; 청구항 1 참조.                    | 1-16   |
| A   | US 2004-0146913 A1 (MASAHIKO HIRANO 외 2명) 2004.07.29<br>요약; 단락 26-45; 도면 1; 청구항 1 참조.            | 1-16   |
| <input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.                                |  |        |
| * 인용된 문헌의 특별 카테고리:  |  |        |
| "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌  | "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌                     |        |
| "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌   | "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.                                    |        |
| "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌  | "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.      |        |
| "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌  | "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌   |        |
| "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌   |  |        |
| 국제조사의 실제 완료일<br>2012년 11월 27일 (27.11.2012)  | 국제조사보고서 발송일<br><b>2012년 11월 28일 (28.11.2012)</b>   |        |
| ISA/KR의 명칭 및 우편주소<br>대한민국 특허청<br>(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,<br>4동 (문산동, 정부대전청사)<br>팩스 번호 82-42-472-7140                                  | 심사관<br>변성철<br>전화번호 82-42-481-8262  |        |



| 국제조사보고서<br>대응특허에 관한 정보 |            | 국제출원번호<br><b>PCT/KR2012/003126</b>   |  |
|------------------------|------------|--|--|
| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌  | 공개일        | 대응특허문헌   | 공개일  |
| JP 2006-030178 A       | 2006.02.02 | DE 102004034962 A1<br>EP 1617259 A1<br>EP 1617260 A1<br>GB 0512343 D0<br>GB 2416445 A<br>GB 2416446 A<br>JP 04934772 B2<br>JP 2006-030989 A<br>US 2006-0012869 A1<br>US 2006-0012875 A1<br>US 2007-0171519 A1<br>US 7468834 B2 | 2006.02.16<br>2006.01.18<br>2006.01.18<br>2005.07.27<br>2006.01.25<br>2006.01.25<br>2012.03.02<br>2006.02.02<br>2006.01.19<br>2006.01.19<br>2007.07.26<br>2008.12.23 |
| KR 20-2011-0005025 U   | 2011.05.19 | 없음   |  |
| US 06166385 A          | 2000.12.26 | AU 1996-69724 B2<br>CA 2231222 A1<br>CA 2231222 C<br>EP 0852716 A1<br>EP 0852716 B1<br>JP 10-512959 A<br>JP 2002-139436 A<br>JP 2006-106004 A<br>WO 97-11355 A1  | 1999.01.07<br>1997.03.27<br>2001.12.11<br>2005.08.31<br>2005.11.30<br>1998.12.08<br>2002.05.17<br>2006.04.20<br>1997.03.27   |
| JP 2008-504517 A       | 2008.02.14 | EP 1766374 A2<br>FR 2872287 A1<br>FR 2872287 B1<br>JP 04777981 B2<br>US 2009-0294691 A1<br>US 7872243 B2<br>WO 2006-010839 A2<br>WO 2006-010839 A3<br>WO 2006-010839 B1  | 2007.03.28<br>2005.12.30<br>2007.03.16<br>2011.09.21<br>2009.12.03<br>2011.01.18<br>2006.02.02<br>2006.06.22<br>2006.08.17   |
| US 2004-0146913 A1     | 2004.07.29 | EP 1441219 A2<br>EP 1441219 A3<br>EP 1441219 B1<br>JP 03686898 B2<br>JP 2004-219104 A<br>US 7449151 B2   | 2004.07.28<br>2004.11.24<br>2012.05.09<br>2005.08.24<br>2004.08.05<br>2008.11.11   |

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2009년 7월)

## フロントページの続き

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

(72)発明者 チャン サン ジェオン

大韓民国 305-806 タエジョン ユソンク エオエウンドン 52

(72)発明者 カン ヒョ ジン

大韓民国 305-806 タエジョン ユソンク エオエウンドン 52

(72)発明者 キム ジュ ホワン

大韓民国 305-806 タエジョン ユソンク エオエウンドン 52

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA02 EA01 FA02 FA03 GA07 GB16 HA01 HA02  
 JA02 KA03 LA01  
 2G045 AA13 AA16 AA24 CA26 CB01 CB03 CB17 CB20 CB30 DA35  
 DA36 FA16 FA29 FB03 FB12 FB15 GB01 GC15 HA09 HA14  
 JA07

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于使用iFRET探针检测或成像蛋白质的显微镜设备和使用其检测或成像蛋白质的方法  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2014520275A</a>   | 公开(公告)日 | 2014-08-21 |
| 申请号            | JP2014516889  | 申请日     | 2012-04-23 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 韩国生命工学研究院   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 韩国研究所生物科学和生物技术  |         |            |
| [标]发明人         | チャンサンジェオン<br>カンヒョジン<br>キムジュホワン  |         |            |
| 发明人            | チャン サン ジェオン<br>カン ヒョ ジン<br>キム ジュ ホワン  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/483 G01N21/64 G01N33/533   |         |            |
| CPC分类号         | G01N21/6428 G01N21/6458 G01N33/542 G01N33/6803 G01N2021/6441  |         |            |
| FI分类号          | G01N33/483.C G01N21/64.E G01N21/64.F G01N33/533   |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/FA02 2G043/FA03 2G043/GA07 2G043/GB16 2G043/HA01 2G043/HA02 2G043/JA02 2G043/KA03 2G043/LA01 2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB17 2G045/CB20 2G045/CB30 2G045/DA35 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GB01 2G045/GC15 2G045/HA09 2G045/HA14 2G045/JA07 |         |            |
| 代理人(译)         | 三谷拓也  |         |            |
| 优先权            | 1020110061410 2011-06-23 KR<br>1020120042318 2012-04-23 KR  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

使用根据本发明的用于固有荧光共振能量转移 ( iFRET ) 的探针的靶蛋白检测或成像显微镜设备是激发靶蛋白中的氨基酸和用于iFRET的探针的荧光分子的波段中的第一光。 照射在激发的波长带中的第二光的光照射单元, 使由光照射单元照射的光入射到由iFRET探针引入的样品上的物镜和靶蛋白中的氨基酸 通过用激发iFRET探针产生的第一光发射信号的波段的第一光照射样品, 以及通过激发iFRET探针的荧光分子的波段的第二光照射。 所述iFRET探针包括识别单元, 所述识别单元检测由所述探针产生的第二发光信号, 其中所述iFRET探针是靶蛋白特异性结合位点 ( 结合位点 ) 或具有该结合位点的分子, 以及靶标。 用于蛋白质的固有荧光与权杖 ( 受体 ) 功能的荧光分子是一个直接或通过接头结合。

[选择图]图2

