

(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2017-536556
(P2017-536556A)

(43) 公表日 平成29年12月7日(2017.12.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	2 G O 4 5
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	4 B O 2 9
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-538919 (P2017-538919)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月8日 (2015.10.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月23日 (2017.5.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/054771
 (87) 国際公開番号 WO2016/057842
 (87) 国際公開日 平成28年4月14日 (2016.4.14)
 (31) 優先権主張番号 62/061,622
 (32) 優先日 平成26年10月8日 (2014.10.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 517124745
 アラトム, エルエルシー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 25, メンロ パーク, アダムス ア
 ベニュー 1600
 (71) 出願人 591163122
 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
 ザ リーランド スタンフォード ジュ
 ニア ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 943
 06, パロ アルト, エル カミノ
 レアル 1705
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織タンパク質の高分解画像化

(57) 【要約】

本発明は、アレイトモグラフィー (AT) および免疫組織化学的検査 (IHC) のための標識方法を提供し、この方法により、何十~何百個のタンパク質の自動化された解析が、組織の劣化を最小限に留め、データの忠実度を増加させ、処理量を実質的に増加させ、コストを低下させる様式で可能になる。また、ATおよびIHCのデータの獲得を自動化するための方法も含む。本明細書は、インタクテナ組織試料を、特定のタンパク質に結合する少なくとも1つの結合性リガンドと接触させるステップであって、前記結合性リガンドが核酸標識に連結している、ステップと、前記核酸標識を検出し、それにより、組織試料中の前記タンパク質の存在を検出するステップとを含む方法を提供する。

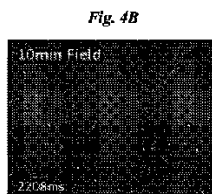
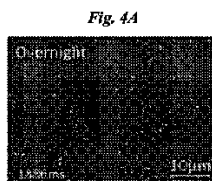


FIG. 4A-4C

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

インタクトな組織試料を、特定のタンパク質に結合する少なくとも1つの結合性リガンドと接触させるステップであって、前記少なくとも1つの結合性リガンドが核酸標識に連結している、ステップと、
前記核酸標識を検出し、それにより、前記インタクトな組織試料中の前記特定のタンパク質の存在を検出するステップと
を含む方法。

【請求項 2】

前記インタクトな組織試料を複数の結合性リガンドと接触させるステップであって、特定のタンパク質に結合するそれぞれの結合性リガンドが固有の核酸標識に連結している、ステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記複数の結合性リガンド中のそれぞれの結合性リガンドが、異なるタンパク質に結合する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記リガンドが、共通のアイソタイプのリガンドである、請求項 2 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記核酸標識が、DNA および RNA のうちの少なくとも1つを含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記方法が、前記インタクトな組織試料を樹脂中に包埋するステップを含み、その結果、前記インタクトな組織試料を、20 から 1000 nm の間の厚さの切片にスライスすることができる、請求項 1 から 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記インタクトな組織試料の脱水を含まない、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記検出するステップが、前記インタクトな組織試料を、それぞれの前記核酸標識に固有である、少なくとも1つの検出用標識に接触させることを含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

それぞれの前記検出用標識が、少なくとも1つの前記核酸標識の配列に相補的である配列を含む少なくとも1つの核酸オリゴマーを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記検出用標識が、少なくとも1つの検出用タグを含む、請求項 8 から 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記検出用標識が、複数の検出用タグを含む、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記少なくとも1つの検出用タグが、前記少なくとも1つの核酸オリゴマーにつながっている、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記つながっていることが、切断性リンカーによる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記複数の検出用タグが、前記少なくとも1つの核酸オリゴマーに、相互に7 から 30 の核酸塩基の間だけ離してつながっている、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

前記複数の検出用タグが、2 から 10 個の間の検出用タグを含む、請求項 14 に記載の

50

方法。

【請求項 16】

それぞれの前記検出用タグが、蛍光タグを含む、請求項 10 から 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記蛍光タグが、量子ドットである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記蛍光タグが、少なくとも 1 つの蛍光色素である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記少なくとも 1 つの蛍光色素が、クマリン、ローダミン、キサンテン、フルオレセインおよびシアニンのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 20】

二次の結合性リガンドの検出を含まない、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

検出するステップが、各前記核酸標識の配列を決定することを含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

各前記核酸標識の前記配列が、合成による配列決定により決定される、請求項 21 に記載の方法。

20

【請求項 23】

各前記核酸標識の前記配列が、ハイブリダイゼーションによる配列決定によって決定される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

マイクロ流体チャンバーの使用を含む、請求項 1 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記少なくとも 1 つの結合性リガンドが、組織に架橋結合している、請求項 1 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

完全に自動化される、請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記インタクテナ組織試料のタンパク質組成を同定するのに有用である、請求項 1 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記インタクテナ組織試料を前記リガンドと接触させるステップが、電場の適用を含む、請求項 1 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記インタクテナ組織試料を前記少なくとも 1 つの検出用標識と接触させるステップが、電場の適用を含む、請求項 8 から 19 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 30】

検出するステップが、空間分解的である、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記少なくとも 1 つの結合性リガンドが抗体である、請求項 1 から 30 のいずれかに記載の方法。

【請求項 32】

インタクテナ組織のタンパク質組成を同定するためのシステムであって、
インタクテナ組織試料；

前記インタクテナ組織試料中の特定のタンパク質に結合する少なくとも 1 つの結合性リガ

50

ンドであって、固有の核酸標識に連結している結合性リガンド；
前記核酸標識の検出のための検出器
を含む、システム。

【請求項 33】

前記インタクトな組織試料が、樹脂中に包埋される、請求項 32 に記載のシステム。

【請求項 34】

前記インタクトな組織試料が、脱水されない、請求項 32 に記載のシステム。

【請求項 35】

複数の結合性リガンドを含み、特異的なタンパク質に結合するそれぞれのリガンドが、固有の核酸標識に連結している、請求項 32 から 34 に記載のシステム。

10

【請求項 36】

前記検出が、前記インタクトな組織試料を、それぞれの核酸標識に固有の検出用標識に曝露させることを含む、請求項 32 から 35 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 37】

それぞれの検出用標識が、少なくとも 1 つの核酸標識の配列に相補的な配列を含む少なくとも 1 つの核酸オリゴマーを含む、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 38】

前記検出用標識が、少なくとも 1 つの検出用タグを含む、請求項 36 から 37 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 39】

各前記少なくとも 1 つの検出用タグが、蛍光タグを含む、請求項 38 に記載のシステム。

20

【請求項 40】

前記検出が、各核酸標識の配列を決定することを含む、請求項 32 に記載のシステム。

【請求項 41】

各核酸標識の前記配列が、合成による配列決定、またはハイブリダイゼーションによる配列決定により決定される、請求項 40 に記載のシステム。

【請求項 42】

前記検出が、空間分解的である、請求項 32 から 41 のいずれか一項に記載のシステム。

30

【請求項 43】

前記少なくとも 1 つの結合性リガンドと前記インタクトな組織との接触の間の電場の適用のための電場発生器をさらに含む、請求項 32 から 42 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 44】

マイクロ流体チャンパーを含む、請求項 32 から 43 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 45】

前記少なくとも 1 つの結合性リガンドが、抗体である、請求項 32 から 44 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 46】

前記少なくとも 1 つの結合性リガンドが、アンキリンリピートタンパク質、アンチカリン、システインノッチ骨格、環状ペプチド、フィノマー、アフィチン、ssod、フィブロネクチン、アフィポディ、および Gp2 タンパク質またはその断片から選択される、請求項 32 から 44 のいずれかに記載のシステム。

40

【請求項 47】

請求項 32 から 46 のいずれか一項に記載のシステムにおける使用のためのキットであって、特定のタンパク質に結合する少なくとも 1 つの結合性リガンドであって、固有の核酸標識に連結している結合性リガンド；前記少なくとも 1 つの結合性リガンドを、前記組織試料と接触させる場合に使用するための第 1 のセットの試薬；および

50

前記核酸標識の検出において使用するための第2のセットの試薬を含むキット。

【請求項48】

結合性リガンドのライブラリーを含み、特異的なタンパク質に結合するそれぞれの結合性リガンドが固有の核酸標識に連結している、請求項47に記載のキット。

【請求項49】

前記検出が、空間分解的である、請求項47に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法119(e)の下、2014年10月8日に出願された米国仮特許出願第62/061,622号の利益を請求し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

アレイトモグラフィー(AT)は、三次元組織構造の状況における、タンパク質発現の定量的分子解析のための画像化法である。詳細な組織の構造(architecture)の再構築が、(約20~1000nmの)薄い組織スライスの切片を作製し、免疫蛍光標識し、回折限界またはその付近で画像化し、インシリコで三次元データを集めることによって達成される。三次元のプロテオミクスのデータセットを蓄積するために、抗体が除去され、染色および画像化のサイクルを多数回繰り返すことができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明の目的は、アレイトモグラフィーを、インタクトな組織試料に対して実施して、組織中の複数のタンパク質の空間分解的な同定を促進する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本明細書は、インタクトな組織試料を、特定のタンパク質に結合する少なくとも1つの結合性リガンドと接触させるステップであって、前記結合性リガンドが核酸標識に連結している、ステップと、前記核酸標識を検出し、それにより、組織試料中の前記タンパク質の存在を検出するステップとを含む方法を提供する。ある態様では、方法は、インタクトな組織を複数の結合性リガンドと接触させるステップであって、特異的なタンパク質に結合するそれぞれのリガンドが固有の核酸標識に連結しているステップを含むことができる。場合によっては、複数の結合性リガンド中のそれぞれの結合性リガンドが、異なるタンパク質に結合することができる。

【0005】

本明細書は、インタクトな組織試料を、特定のタンパク質に結合する抗体である少なくとも1つの結合性リガンドと接触させるステップであって、前記抗体が核酸標識に連結している、ステップと、前記核酸標識を検出し、それにより、組織試料中の前記タンパク質の存在を検出するステップとを含む方法を提供する。ある態様では、方法は、インタクトな組織を、複数の抗体と接触させるステップであって、特異的なタンパク質に結合するそれぞれの抗体が固有の核酸標識に連結している、ステップを含むことができる。場合によっては、複数の抗体中のそれぞれの抗体が、異なるタンパク質に結合することができる。抗体は、同じまたは異なるアイソタイプの抗体であり得、核酸標識は、DNAおよび/またはRNAを含むことができる。

【0006】

本明細書に記載する一部の方法では、少なくとも1つの結合性リガンドが、ペプチドまたは核酸の親和性試薬である。本明細書に記載する方法において使用する親和性試薬とし

10

20

30

40

50

て、例えば、設計されたアンキリンリピートタンパク質(20kD)およびアンチカリン(20kD)が挙げられ、これらは、特定のタンパク質に結合し、かつ安定性を維持するように進化させてある。本明細書に記載する方法において使用する追加の親和性試薬として、例えば、システインノッチ骨格(20~50個のアミノ酸)、環状ペプチド(17個のアミノ酸)、フィノマー(fynomer)(63個のアミノ酸)、アフィチン(affitin)(65個のアミノ酸)、ssod(63個のアミノ酸)、およびフィブロネクチン(94個のアミノ酸)が挙げられ、これらは、特定のタンパク質に結合するように設計される。場合によっては、少なくとも1つの結合性リガンドが、アフィポディであり、これは、特定のタンパク質に結合するように設計されている。また、T7ファージ遺伝子2タンパク質(Gp2)の45個のアミノ酸のストレッチまたはその断片も、本明細書に記載する一部の方法において、結合性リガンドとして使用することができる。

10

【0007】

本明細書に記載する方法の一部では、インタクトな組織を樹脂中に包埋することができ、したがって、組織を、20から1000nmの間の厚さの切片にスライスすることができる。場合によっては、方法は、インタクトな組織の脱水および樹脂中への包埋を含まない場合がある。

【0008】

本明細書に記載する方法の一部では、検出が、組織を、それぞれの核酸標識に固有の検出用標識に曝露させることを含む。それぞれの検出用標識が、少なくとも1つの核酸標識の配列に相補的な配列を含む少なくとも1つの核酸オリゴマーを含むことができる。場合によっては、検出用標識が、少なくとも1つの検出用タグを含む。また、検出用標識が、複数の検出用タグを含むこともできる。場合によっては、検出用タグの1つまたは複数は、オリゴマーにつながっていてもよい。検出用タグは、切断性または非切断性のリンカーにより、オリゴマーにつながっていてもよい。場合によっては、複数の検出用タグは、相互に7から30塩基の間だけ離してオリゴマーにつながっている。場合によっては、複数の検出用タグが、2から10個の間の検出用タグを含むことができる。

20

【0009】

本明細書に記載する方法の一部では、それぞれの検出用タグが、蛍光タグを含むことができる。場合によっては、蛍光タグは、量子ドット(QD)であり得る。場合によっては、蛍光タグは、少なくとも1つの蛍光染料であり得る。一部の例示的な事例では、蛍光染料は、クマリン、ローダミン、キサントゲン、フルオレセインおよびシアニンのうちの少なくとも1つを含むことができる。

30

【0010】

本明細書に記載する方法の一部は、二次抗体の検出を含まない場合がある。

【0011】

場合によっては、本明細書に記載する方法は、各核酸標識の配列を決定することを含む検出ステップを含むことができる。場合によっては、各核酸標識の配列を、合成による配列決定(sequencing by synthesis)により決定することができる。場合によっては、各核酸標識の配列を、ハイブリダイゼーションによる配列決定によって決定することができる。ハイブリダイゼーションによる配列決定には、本明細書に記載する、タグハイブリダイゼーションの方法を使用する場合がある。

40

【0012】

本明細書に記載する一部の方法は、マイクロ流体チャンバーの使用を含む。一部の方法は、完全に自動化することができる。

【0013】

一部の方法では、少なくとも1つの結合性リガンドを組織に架橋結合させることができる。

【0014】

本明細書に記載する一部の方法を使用して、組織試料のタンパク質組成を同定することができる。

50

【0015】

本明細書に記載する方法は、インタクトな組織試料を複数の結合性リガンドと接触させるステップであって、特異的なタンパク質に結合する結合性リガンドのそれぞれのタイプが固有の核酸標識に連結している、ステップを含むことができる。場合によっては、結合性リガンドは、上記に記載したように、抗体、または特異的なタンパク質に結合するように設計されたペプチドもしくは核酸の親和性試薬である。

【0016】

本明細書に記載する方法では、核酸標識の検出は、空間分解的であり得る。

【0017】

本明細書に記載する方法の一部では、組織を、結合性リガンドと接触させるステップが、電場の適用を含むことができる。また、オリゴマーのハイブリダイゼーションを含む方法においては、電場を、そのようなハイブリダイゼーションの間に適用することもできる。

10

【0018】

本明細書は、インタクトな組織のタンパク質組成を同定するためのシステムであって、インタクトな組織試料；特定のタンパク質に結合する少なくとも1つの結合性リガンドであって、固有の核酸標識に連結している結合性リガンド；および前記核酸標識の検出のための検出器を含む、システムを提供する。一部のシステムでは、インタクトな組織を樹脂中に包埋する。一部のシステムでは、インタクトな組織を脱水しない場合がある。本明細書に記載するシステムは、複数の結合性リガンドを含むことができ、特異的なタンパク質に結合するそれぞれの結合性リガンドが固有の核酸標識に連結している。一部のシステムでは、検出は、組織を、それぞれの核酸標識に固有の検出用標識に曝露させることを含むことができる。ある特定のシステムでは、それぞれの検出用標識が、少なくとも1つの核酸標識の配列に相補的な配列を含む少なくとも1つの核酸オリゴマーを含むことができる。場合によっては、結合性リガンドは、上記に記載したように、抗体、または特異的なタンパク質に結合するように設計されたペプチドもしくは核酸の親和性試薬である。

20

【0019】

本明細書に記載する一部のシステムでは、検出用標識は、少なくとも1つの検出用タグを含むことができる。一部の検出用タグは、蛍光タグを含むことができる。一部のシステムでは、検出は、各核酸標識の配列を決定することを含むことができる。核酸標識の配列を、当業者に公知の方法のうちのいずれかにより決定することができる。一部のシステムでは、各核酸標識の配列を、合成による配列決定、またはハイブリダイゼーションによる配列決定により決定する。

30

【0020】

本明細書に記載するシステムの一部では、核酸標識の検出が、空間分解的である。一部のシステムは、電場の適用を行って、少なくとも1つの結合性リガンドを、インタクトな組織と接触させるための電場発生器を含むことができる。一部のシステムは、マイクロ流体チャンバーを含むことができる。

【0021】

本明細書に記載するシステムは、本明細書に記載する方法において使用することができる。

40

【0022】

本明細書は、本明細書に記載するシステムおよび/または方法において使用することができるキットであって、特定のタンパク質に結合する少なくとも1つの結合性リガンドであって、固有の核酸標識に連結している結合性リガンド；少なくとも1つの結合性リガンドを、組織試料と接触させる場合に使用するための第1のセットの試薬；および核酸標識の検出において使用するための第2のセットの試薬を含むキットを提供する。場合によっては、結合性リガンドは、上記に記載したように、抗体、または特異的なタンパク質に結合するように設計されたペプチドもしくは核酸の親和性試薬である。

【0023】

50

一部のキットは、結合性リガンドのライブラリーを含むことができ、特異的なタンパク質に結合するそれぞれの結合性リガンドが固有の核酸標識に連結している。一部のキットは、検出が空間分解的である場合に使用するための構成成分を含むことができる。

【0024】

以下の詳細な説明から、本開示のさらなる態様および利点が、当業者に容易に明らかになるであろう；詳細な説明は、本開示の例示的な実施形態を示し、記載するに過ぎない。本開示から、その他のおよび異なる実施形態が可能になり、本開示のいくつかの詳細な箇所は、多様な明らかな点における改変が可能であり、それらは全て、本開示から逸脱しないことが理解されるであろう。したがって、図面および説明は本来、例証とみなすべきであり、本発明を制限するものではない。

参照による組込み

【0025】

本明細書で言及する刊行物、特許および特許出願は全て、あたかも個々の刊行物、特許または特許出願がそれぞれ参照により組み込まれていることを具体的かつ個々に示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれている。

【0026】

添付の特許請求の範囲において、本発明の新規の特徴が具体的に記載されている。本発明の原理を利用する例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、および付随する図面または図 (figures) (本明細書では、「図 (FIG.)」および「図 (FIGS.)」ともいう) を参照することにより、本発明の特徴および利点がより良好に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1A~1Hは、DNAコンジュゲート抗体および検出用標識と接触させて、マウスの一次体性感覚皮質および線条体領域から得られた皮質白質の追跡結果を含む組織試料中のタンパク質を可視化した図である。図1A~1Dは、白質の軸索追跡結果が、チューブリンについて濃密に染色されているが、シナプスはほとんどないことを示す。図1E~1Fは、線条体領域は、シナプシンの密度が増加しており、シナプスが極めて濃密であることを示す。図1Aは、ウサギ抗アルファチューブリン一次抗体に、ストレプトアビジンの架橋を介してつながっているセンスオリゴマーに対して、蛍光標識アンチセンスオリゴマーを使用した、単一切片中のアルファチューブリンの染色を示す。図1Bは、DNA二本鎖を、オリゴマー内に設計した制限部位によって切断した結果を示す。図1Cは、図1Bに示した、制限消化による蛍光DNAの除去の後に、一次ウサギ抗体の場所を明らかにする、蛍光抗ウサギ二次抗体を示す。図1Dは、アルファ-チューブリンに対する、直接コンジュゲートさせたフルオロフォアのバージョンのウサギ一次抗体を使用した、同じ組織切片の再染色を示す。図1Eは、ウサギ抗シナプシンに直接コンジュゲートしているオリゴマーに相補的な蛍光標識DNAオリゴマーが明らかにする、同じ切片上でのシナプシンの染色を示す。図1Fは、図1Eで認めた蛍光が、制限エンドヌクレアーゼを用いる消化の後では除去されていることを示す。図1Gは、一次抗体が、DNAが除去された後に留まることを明らかにする、蛍光標識二次抗体を示す。図1Hは、量子ドットにコンジュゲートしている二次抗ウサギにより可視化される抗シナプシンを使用した、同じ切片の再染色を示す。

【0028】

【図2】図2は、組織を、アルファ-チューブリンおよびシナプシンに結合する抗体それぞれと接触させ、続いて、それらをそれぞれ画像化することによって形成した画像化された組織領域中のアルファ-チューブリンとシナプシンとを複合投影し、それにより、白質中の軸索の管およびシナプスが濃密な線条体組織を明らかにした図である。

【0029】

【図3】図3は、DNAの配列決定において使用されるリンカーを示す図であり、これらのリンカーは、化学的に切断されて、フルオロフォアを遊離させることができる。

10

20

30

40

50

【0030】

【図4】図4A～4Cは、マウス皮質の試料の3つの異なる場から得られた画像を示す図である。上部の画像、図4Aは、試料を抗SV2と共に一晚インキュベートした後に、1.9秒かけて獲得し、中央の画像、図4Bは、試料を抗SV2と共に電場の存在下で10分間インキュベートした後に、2.2秒かけて獲得し、下部の画像、図4Cは、試料を抗SV2と共に電場なしで10分間インキュベートした後に、4.4秒かけて獲得した。

【0031】

【図5】図5は、プロセスを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明の多様な実施形態を、本明細書で示し、記載してきたが、そのような実施形態は、例としてのみ提供されていることが当業者に明らかであろう。当業者であれば、本発明から逸脱することなく、多数の変更形態、変化形態および置換形態を思いつくことができる。本明細書に記載する本発明の実施形態の多様な代替形態を用いることができることを理解すべきである。本発明の異なる態様を、個々に、まとめて、または相互に組み合わせることで認識することができることを理解されたい。

【0033】

本開示の目的は、アレイトモグラフィーを、インタクテナ組織に対して実施して、組織中の複数のタンパク質の空間分解的な同定を促進するための方法、システムおよびキットを提供することである。

【0034】

本明細書は、インタクテナ組織試料を、特定のタンパク質に結合する少なくとも1つの結合性リガンドと接触させるステップであって、前記結合性リガンドが核酸標識に連結している、ステップと、前記核酸標識を検出し、それにより、組織試料中の前記タンパク質の存在を検出するステップとを含む方法を提供する。場合によっては、結合性リガンドは、上記で記載したように、抗体、または特異的なタンパク質に結合するように設計されたペプチドもしくは核酸の親和性試薬である。

【0035】

本明細書は、インタクテナ組織のタンパク質組成を同定するためのシステムであって、インタクテナ組織試料；特定のタンパク質に結合する少なくとも1つの結合性リガンドであって、固有の核酸標識に連結している結合性リガンド；および前記核酸標識の検出のための検出器を含む、システムを提供する。

【0036】

本明細書は、本明細書に記載するシステムおよび/または方法において使用することができるキットであって、特定のタンパク質に結合する少なくとも1つの結合性リガンドであって、固有の核酸標識に連結している結合性リガンド；少なくとも1つの結合性リガンドを、組織試料と接触させる場合に使用するための第1のセットの試薬；および核酸標識の検出において使用するための第2のセットの試薬を含む、キットを提供する。場合によっては、結合性リガンドは、上記で記載したように、抗体、または特異的なタンパク質に結合するように設計されたペプチドもしくは核酸の親和性試薬である。

【0037】

現時点で実行されているものに従う、ATプロセスの1つのバージョンは、電子顕微鏡法のために使用される組織処理に類似する組織処理を含むことに注目することができ、この処理は、化学的固定、脱水および樹脂中への包埋を含む。組織ブロックを、ウルトラミクロトーム上で、ダイヤモンドナイフを使用して切断する。ブロックの側面に適用したコンタクトセメントにより、連続切片がくっついて、長いリボンを形成するのを確実にする。これらを、コートしたカバーガラス上に収集し、コーティングは、包埋組織切片にしっかり付着して、確実なオートフォーカスのために、それらを平らに保持し、複数回の染色サイクルの間ずっと、それらを留保するように操作されている。アレイを、結合性リガンド、レクチンまたはその他の試薬を使用して染色し、自動化された蛍光顕微鏡法により、

10

20

30

40

50

しばしば回折限界で検出する。所与の組織体積から高次元のデータセットを蓄積するために、結合性リガンド、例えば、抗体を除去し、染色および画像化を複数回繰り返すことができる。また、アレイを、重金属を用いて染色し、電界放出型走査型電子顕微鏡法 (SEM) により画像化することもできる。画像を、つなぎ合わせ (stitch)、整列させ、各光 (および SEM) のサイクルを、全てのチャンネルを含む 3D 体積に統合させる。体積を解析して、例えば、多様なマーカー間の空間関係を評価し、目的のシナプス、細胞型およびその他の特徴の同定および特徴付けを提供することができる。

【0038】

現在のプロセスの2つの態様には、制約があり、すなわち、1) 単回の運転で4つの抗原を画像化するためには、一次抗体が4つの明確に異なるアイソタイプにより生成されることが必要であり、このことは一般に、明確に異なる種、例えば、ウサギ、マウス、モルモットおよびニワトリを意味し、2) 組織切片に対して、除去および再染色を行うのに必要な処理は、労働集約的であり、時間がかかり、極めて失敗になりやすい。

10

【0039】

第1の問題は、一次抗体を、フルオロフォアを用いて直接標識することによって克服し得る。このアプローチは一般的でなく、わずかに数個の直接標識された抗体しか市販されていない。閉鎖チャンバマイクロ流体システムは、第2の問題に解決策を提供し得、実際に、このシステムは、本明細書に記載する方法およびシステムにおいて説明されている。しかし、現在のプロトコールは複雑であり、染色プロトコールは、一晚のインキュベーションを含めて、およそ10個のステップで構成され、溶出プロトコールは、カバーガラスを焼くことを含み、このことにより、自動化染色チャンバの価値が限定的なものになる。

20

【0040】

さらに、試料の手作業による操作の間に生じる可能性がある物理的な損傷とは別に、除去用溶液が、組織に化学的な損傷も引き起こす。このことは、SEMの超微細構造において明らかになる。本明細書に記載する方法およびシステムは、一次抗体を除去する必要性を排除する。さらに、本発明は、妥当性が確認された試薬も提供し、これらの試薬は、完全に自動化することができるプロセスにおいて、数十から数百を組み合わせて使用することができる。

【0041】

別段の定義がない限り、本明細書で使用する全ての科学技術用語は、請求する主題が属する技術分野の当業者が通常理解する意味と同じ意味を有する。本明細書の用語に対して、複数の定義がある場合には、本セクションの定義が優先する。URLまたはその他のそのような識別子もしくはアドレスを参照する場合、そのような識別子は変更される場合があり、インターネット上の特定の情報は、出現したり、抹消されたりし得るが、インターネットを検索することによって、同等の情報を見出す場合があることが理解される。それらを参照することによって、そうした情報が利用可能であり、公衆に向けて伝達されていることが証明される。

30

【0042】

上記の一般的な説明および以下の詳細な説明は、例示および説明のためのものに過ぎず、それらにより、請求するいずれの主題も制限されないことを理解されたい。本出願においては、そうでないことが具体的に言及されない限り、単数形の使用は、複数形を含む。

40

【0043】

本明細書では、別段の記載がない限り、任意の濃度範囲、パーセント範囲、割合範囲または整数範囲が、記載される範囲内の任意の整数の値、ならびに適切であれば、それらの分数 (例として、ある整数の $1/10$ および $1/100$) を含むことを理解されたい。本明細書で使用する場合、別段の記載がない限り、「約」は、表示する範囲、値、配列または構造の $\pm 10\%$ を意味する。用語「ある (a)」および「ある (an)」は、本明細書で使用する場合、別段の記載がない限りまたは文脈から明らかでない限り、挙げられている構成成分の「1つまたは複数」を指すことを理解すべきである。選択肢 (例えば、「ま

50

たは (o r) 」) の使用により、選択肢のうちの、1つ、両方またはそれらの任意の組合せのいずれかを意味することを理解すべきである。本明細書で使用する場合、用語「含む (i n c l u d e) 」および「含む (c o m p r i s e) 」は、同義的に使用する。

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用するセクションの見出しは、構成のためのものに過ぎず、記載する主題を制限するものであると解釈してはならない。これらに限定されないが、特許、特許出願、記事、書籍、マニュアルおよび論文を含めた、本出願に引用する全ての文献または文献の一部は、それらの全体が、あらゆる目的で、本明細書に参照により明示的に組み込まれている。

【 0 0 4 5 】

本明細書に記載する方法および組成物は、本明細書に記載する特定の方法論、プロトコール、方法および試薬に限定されず、そのようなものが変化し得ることを理解されたい。また、本明細書で使用する専門用語は、特定の実施形態を記載するためのものに過ぎず、本明細書に記載する方法および組成物の範囲を制限することを意図するものではないことも理解されたい、そうした範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ制限される。

【 0 0 4 6 】

本明細書で言及する刊行物および特許は全て、それらの全体が本明細書に参照により組み込まれており、これは、本明細書に記載する方法、組成物および化合物に関連して使用することができるであろう、例えば、刊行物に記載されている構築物および方法論を記載し、開示するためである。本明細書で論じる刊行物を提供するの単に、それらが本出願の出願日の前に開示されているからである。本明細書のいかなる箇所も、先行発明であるというまたは任意のその他の理由で、本明細書に記載する発明者らにはそのような開示に先行する権利が与えられていないことを認めていると解釈してはならない。

【 0 0 4 7 】

インタクトな組織：

【 0 0 4 8 】

本明細書に記載する方法およびシステムを使用して、アレイトモグラフィーを、インタクトな組織試料に対して実施することができる。インタクトな組織は、本明細書に記載する場合、一次元で切片化され、その他の2つの次元に隣接する組織を含む。これらの組織は、最低限の解離により特徴付けられる。インタクトな組織試料は、切片作製の後に、試料が、組織全体に通常見出される組織の構造およびその他の細胞を留保する組織試料である。本明細書に記載する方法およびシステムのための、インタクトな組織を固定する例示的な方法を、下記の実施例1に提供する。当業者に公知の、インタクトな組織試料を単離し、固定するさらなる方法も、本明細書に記載する方法およびシステムのために用いることができる。一部の明細書に記載する方法では、インタクトな組織を樹脂中に包埋することができる。その結果、組織を、20から1000nmの間の厚さの切片にスライスすることができる。一部の方法では、切片の厚さは、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950または1000nmであり得る。一部の方法では、切片の厚さは、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約600、約700、約800、約900または約1000nmであり得る。場合によっては、方法は、インタクトな組織の脱水を含まない場合がある。場合によっては、組織を脱水せず、樹脂中に包埋する。場合によっては、切片収集器を利用して、自動的に、ウルトラマイクローム上で生成したリボンを集集し、それらを、顕微鏡スライドからマイクロタイタープレートまでの範囲に及ぶサイズの、コートした精密カバーガラスの所定の領域上に配置する。この方法により試験することができるインタクトな組織試料は、例えば、1つまたは複数の状態を検出するための生検組織を含むことができる。生理学的状態または疾患を、本明細書が提供する方法により、インタクトな組織試料中のそのような状態または疾患と関連があるタンパク質を同定することによって診断することができる。これ

10

20

30

40

50

らとして、例えば、腎臓疾患、例として、半月体形成性糸球体腎炎、生検リンパ節組織を試験することによって診断することができる感染性疾患、アミロイドーシスを含めた、代謝疾患、および精巢の生検から検出することができる場合の受精能のレベルの検出が挙げられる。本明細書に記載する方法を、生検したインタクトな腫瘍組織に適用することによって、前癌性および癌性の状態を同定することができる。本明細書に記載する方法およびシステムにより、一般に生検により試験されるその他の組織、例えば、骨髄、胃腸管、肺、肝臓、前立腺、神経系、泌尿生殖器系、乳房、筋肉および皮膚を解析することができる。

【0049】

インタクトな組織のアレイトモグラフィー：

10

【0050】

本明細書は、インタクトな組織試料を、特定のタンパク質に結合する少なくとも1つの結合性リガンドと接触させるステップであって、前記リガンドが核酸標識に連結している、ステップと、前記核酸標識を検出し、それにより、組織試料中の前記タンパク質の存在を検出するステップとを含む方法を提供する。ある態様では、方法は、インタクトな組織を複数の結合性リガンドと接触させるステップであって、特異的なタンパク質に結合するそれぞれのリガンドが固有の核酸標識に連結している、ステップを含むことができる。場合によっては、複数の結合性リガンド中のそれぞれのリガンドが、異なるタンパク質に結合することができる。場合によっては、それぞれの結合性リガンドは、上記で記載したように、抗体、または特異的なタンパク質に結合するように設計されたペプチドもしくは核酸の親和性試薬である。リガンドは、同じまたは異なるアイソタイプのリガンドであり得、核酸標識は、DNAおよび/またはRNAを含むことができる。場合によっては、異なるタンパク質に結合するリガンドは、同じまたは異なるアイソタイプのリガンドであり得る。一部の方法では、少なくとも1つの結合性リガンドを、組織に架橋結合させることができる。場合によっては、本明細書に記載する方法は、インタクトな組織を複数の結合性リガンドと接触させるステップであって、特異的なタンパク質に結合するそれぞれの結合性リガンドが固有の核酸標識に連結している、ステップを含むことができる。場合によっては、結合性リガンドは、上記で記載したように、抗体、または特異的なタンパク質に結合するように設計されたペプチドもしくは核酸の親和性試薬である。

20

【0051】

本明細書に記載する方法では、複数の結合性リガンドの検出が、空間分解的であり得る。一部の明細書に記載する方法およびシステムは、マイクロ流体チャンバーの使用を含む。一部の方法は、完全に自動化することができる。

30

【0052】

上記で記載したように、本明細書に記載する一部の方法を使用して、組織試料のタンパク質組成を同定し、および/または生理学的状態もしくは疾患を診断することができる。一部の方法を使用して、特定のインタクトな組織の組織クラスを同定することができる。

【0053】

一部の明細書に記載する方法では、組織を、結合性リガンドと接触させるステップが、電場の適用を含むことができる。場合によっては、電場を、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約12、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55または約60秒間適用することができる。場合によっては、電場を、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5または5分の間適用することができる。場合によっては、電場を、最高5、最高10、最高15、最高20、最高25、最高30、最高35、最高40、最高45、最高50、最高55、最高60、最高65、最高70、最高75、最高80、最高85または最高90分間適用することができる。場合によっては、電場を、1から60分間適用することができる。

40

【0054】

また、本明細書に記載する方法を実施するのに適切なシステム、およびそのようなシステムと共に使用するためのキットも提供する。

50

【0055】

検出用標識および検出用タグ：

【0056】

一部の本明細書に記載する方法では、検出が、組織を、それぞれの核酸標識に固有の検出用標識に曝露させることを含む。それぞれの検出用標識が、少なくとも1つの核酸標識の配列に相補的な配列を含む少なくとも1つの核酸オリゴマーを含むことができる。場合によっては、検出用標識が、少なくとも1つの検出用タグを含む。場合によってはまた、検出用標識が、複数の検出用タグを含むこともできる。場合によっては、検出用標識が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19から20個の間の検出用タグを含むことができる。

10

【0057】

場合によっては、検出用タグの1つまたは複数は、オリゴマーにつながっていてもよい。検出用タグは、切断性または非切断性のリンカーにより、オリゴマーにつながっていてもよい。場合によっては、複数の検出用タグがそれぞれ、相互に7から30塩基の間だけ離して間隔を開けてオリゴマーにつながっている。場合によっては、それぞれのタグの間隔が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29から30塩基の間だけ開くように、複数の検出用タグがつながっている。場合によっては、複数の検出用タグが、2から10個の間の検出用タグを含むことができる。場合によっては、複数の検出用タグが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19から20個の間の検出用タグを含むことができる。

20

【0058】

一部の本明細書に記載する方法では、それぞれの検出用タグが、蛍光タグを含むことができる。場合によっては、蛍光タグは、下記の実施例に記載するように、量子ドット(QD)であり得る。場合によっては、蛍光タグは、少なくとも1つの蛍光染料であり得る。一部の例示的な事例では、蛍光染料は、クマリン、ローダミン、キサントン、フルオレセインおよびシアニンのうちの少なくとも1つを含むことができる。一般に、当業者に公知の任意の蛍光染料および/またはQDを、本明細書に記載する方法およびシステムにおいて用いることができる。本明細書に記載する一部の方法およびシステムでは、検出用タグの配置および数を最適化して、検出の空間分解能を増強することができる。

30

【0059】

一部の本明細書に記載する方法では、検出用タグの核酸標識とのハイブリダイゼーションは、電場の適用を含むことができる。場合によっては、電場を、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約12、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55または約60秒間適用することができる。場合によっては、電場を、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5または5分の間適用することができる。場合によっては、電場を、最高5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85または90分間適用することができる。場合によっては、電場を、1から60分間適用することができる。

40

【0060】

一部の本明細書に記載する方法は、二次抗体の検出を含まない場合がある。

【0061】

また、本明細書に記載する方法を実施するのに適切なシステム、およびそのようなシステムと共に使用するためのキットも提供する。

【0062】

配列決定による検出：

【0063】

場合によっては、本明細書に記載する方法は、各核酸標識の配列を決定することを含む

50

検出ステップを含むことができる。一般に、インサイツで実施することができる任意の配列決定法を利用して、本明細書の核酸標識の配列決定を行うことができる。これらとして、例えば、当業者に公知の方法の中でもとりわけ、合成による配列決定、ライゲーションによる配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定が挙げられる。市販されている核酸の配列決定のキットを、本明細書に記載する方法およびシステムと共に使用するために最適化することができる。

【0064】

場合によっては、各核酸標識の配列を、合成による配列決定により決定することができる。場合によっては、各核酸標識の配列を、ハイブリダイゼーションによる配列決定によって決定することができる。ハイブリダイゼーションによる配列決定には、下記の実施例に記載する、タグハイブリダイゼーションの方法を使用する場合がある。

10

【0065】

タグ配列決定は、直接配列決定の変形形態であり、下記の実施例に記載するように、4つの約15マー単位からなる約60塩基対(bp)であるタグを使用する。場合によっては、それぞれのオリゴマーの長さは、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の核酸である。場合によっては、ハイブリダイゼーションによるタグ「配列決定」は、QD標識オリゴマーと共に使用する。QDを使用すると、適度に高速のSTORM様画像化が可能になる。さらに、量子ドットは、光活性化される必要もなく、光退色に対して抵抗性であり、励起に単色を必要とする。場合によっては、タグ配列決定は、切断性蛍光標識と共に使用する。

20

【0066】

また、本明細書に記載する方法を実施するのに適切なシステム、およびそのようなシステムと共に使用するためのキットも提供する。

【0067】

本明細書に記載する実施例および実施形態は、例示のためのものに過ぎず、それらに照らした多様な改変形態または変化形態が当業者に示唆され、それらは本出願および添付の特許請求の範囲の精神および範囲の内に含まれるものとするのが理解される。

【実施例】

【0068】

本明細書に記載する実施例および実施形態は、例示のためのものに過ぎず、それらに照らした多様な改変形態または変化形態が当業者に示唆され、それらは本出願および添付の特許請求の範囲の精神および範囲の内に含まれるものとするのが理解される。

30

【0069】

実施例で用いる試薬は、市販されているか、または当技術分野で公知の市販されている機器装備、方法もしくは試薬を使用して調製することができる。上記の実施例は、本発明の多様な態様、および本発明の方法の実施を例示する。実施例は、本発明の多くの異なる実施形態を網羅的に記載することを意図するものではない。したがって、上記の発明を、明確に理解する目的で、例証および例により、ある程度詳細に記載してきたが、当業者であれば、添付する特許請求の範囲の精神またはその範囲から逸脱することなく、それらに、多くの変化形態および改変形態をもたらすことができることに容易に気づくであろう。

40

(実施例1)

組織の調製:

【0070】

一般に、Micheva, K. D., O'Rourke, N., Busse, B., およびSmith, S. J. (2010年), 「Array Tomography: Rodent Brain Fixation and Embedding」、Cold Spring Harbor Protocols, 2010年(11巻)に概要が述べられている組織の調製方法を、(組織型、および組織を得る生物の差について適応させ、最適化することによって)使用する。

【0071】

マウス脳を、以下に従って解剖し、固定する。

50

【0072】

解剖ツールをセットし、PBSおよび濾過した固定液を調製し、気泡がない状態にして、流す準備を整えた。2%グルタルアルデヒドおよび2%脱重合パラホルムアルデヒドを、0.1Mリン酸緩衝液中に6.8から7.2の間のpHで溶解させた。

【0073】

げっ歯類を屠殺せずに、麻酔を施し、心臓を曝露させ、右心房を切断し、カニューレを左心室内に挿入した。約1cmに短縮させた、平滑な、約20Gの針を使用した。場合によっては、大動脈が脆弱でなく、容易に破壊されない生物の場合、大動脈をカニューレ処置するのが最適である。次いで、固定液を、約10分間自然落下により流した；または場合によっては、灌流ポンプを使用する。次いで、これを、最大5mlのPBSを用いて灌流した。

10

【0074】

次いで、血液をフラッシュするのを支援するために、約5ccのヘパリン処置生理食塩水をチューブ中に加えた。固定液を用いる灌流を、10分間実施した。固定から20分以内に脳を取り出した。冷蔵庫内で、全脳を同じ固定液中で一晩灌流後固定(postfix)した。組織を、0.1Mリン酸緩衝液中で2回濯いだ後、4℃で最長1週間保存した。

【0075】

ある特定の事例では、樹脂中に包埋した組織の場合、厚い組織切片は、およそ200nm - 1 μmで解析する。厚い切片は、単位時間当たり、より大きな体積を画像化するのが可能にすることが注目される。画像化を、高い倍率で実施しても、または比較的低い倍率、10~20xの対物を用いて実施してもよい。例えば、生検組織、例として、腫瘍の解析においては、厚い切片をより低い倍率で解析するのが好ましい場合がある。より低い倍率により、組織の大きな視野を、細胞以下の分解能で解析することが可能になる。

20

【0076】

場合によっては、組織を脱水せず、樹脂中に包埋するが、むしろ、下記に記載する標識方法を、固定した水和組織の染色について妥当性を確認してある結合性リガンドに適用する。

【0077】

場合によっては、切片収集器を利用して、自動的に、ウルトラマイクローム上で生成したリボンを収集し、それらを、顕微鏡スライドからマイクロタイタープレートまでの範囲に及ぶサイズの、コートした精密カバーガラスの所定の領域上に配置する。

30

(実施例2)

インタクトな組織試料を、核酸オリゴマーを含む検出用標識に結合する核酸標識に連結している抗体と接触させることによるタンパク質検出：

【0078】

下記に、マウスから得られたアレイトモグラフィー(AT)のインタクトな組織試料中のタンパク質であるチューブリンおよびシナプシンの検出のための本明細書に記載する方法の使用を記載し、これは、核酸標識に相補的な核酸オリゴマーを含む検出用標識に結合する核酸標識に連結している抗体と接触させることによって行う。オリゴマーを、1つまたは複数のフルオロフォアまたは量子ドット(QD)につないで、検出を促進する。

40

【0079】

組織試料を、実施例1に記載した方法により調製した。

【0080】

ストレプトアビジン架橋によりつながった核酸標識を用いる、抗体の標識化：

【0081】

ウサギ抗アルファチューブリン抗体(一次抗体)を、組織試料に導入し、次いで、これを、ストレプトアビジンと、続いて、ビオチン化核酸標識と、次いで、蛍光標識アンチセンスオリゴマーと接触させた；アンチセンスオリゴマーは、一次抗体につながっているセンスオリゴマーに相補的である。図1Aに見られるように、こうして、組織試料中のチュ

50

ープリンの良好な染色が得られた。

【0082】

1つの例では、制限酵素 (Sma I) についての認識部位を用いて、一次抗体上の核酸標識を設計した。この場合、相補的な核酸オリゴマーを含む検出用標識を核酸標識とハイブリダイズさせ、画像化した後で、相補的なオリゴマーのハイブリダイゼーションにより形成された dsDNA を、制限酵素により切断して、蛍光標識を、dsDNA の短い小片と併せて放出させた。図1Bに見られるように、このことから、AT組織はDNAハイブリダイゼーション反応を許容し、反応は特異的であることが実証された。

【0083】

次いで、組織を、一次抗チューブリン抗体に結合する、蛍光標識された二次抗体に曝露させた。図1Cは、一次ウサギチューブリン抗体の位置を明らかにする、蛍光抗ウサギ二次抗体を示す。

【0084】

ストレプトアビジン架橋を使用せずにつながった核酸標識を用いる、抗体の標識化：

【0085】

別の例では、上記の実験のために使用した組織切片を、センスオリゴマーを含む核酸標識に直接コンジュゲートしているウサギ抗シナプシン抗体に曝露させ、続いて、蛍光標識された、相補的なDNAアンチセンスオリゴマーに曝露させた。図1Eは、ウサギ抗シナプシンに直接コンジュゲートしているオリゴマーに相補的な蛍光標識DNAオリゴマーが明らかにする、同じ切片上でのシナプシンの染色を示す。図1Fに見られるように、得られた dsDNA を、制限エンドヌクレアーゼの使用により消化すると、蛍光が除去された。続いて、蛍光標識二次抗体の導入により、二次抗体の、抗シナプシン一次抗体への結合が生じた。図1Gは、一次ウサギシナプシン抗体の位置を明らかにする、蛍光抗ウサギ二次抗体を示す。図1Hは、量子ドット (QD) にコンジュゲートさせた二次抗ウサギにより可視化した抗シナプシンを使用する、組織切片の染色を実証する。QDの発光スペクトルは、典型的な染料の蛍光よりも狭く、このことにより、運転1回当たりの検出チャネルの数を、4つから、6つまたはそれ以上に増加させることが可能になることが注目される。これにより、大きなデータセットの場合には、全体的な画像化時間が低下する。

【0086】

核酸標識は、抗シナプシン抗体に、SolulinkのAll-in-one-antibody-oligonucleotide-conjugationキットおよびInnova BiosciencesのThunder-link oligo conjugationシステムを使用して別々にコンジュゲートさせた。

【0087】

画像化は、63x、1.4NAで実施した。露光時間は、およそ1秒であった。検出用オリゴは、IDTから購入した。

【0088】

一部の組織構造、例として、シナプス前終末においては、込み入った構造により、結合することができる結合性リガンドの数が制限される。これらの事例では、それぞれのタンパク質の検出と関連があるシグナルを、同定することができるタンパク質の数の対応する増加と引き換えに低下させることが許容され、それらの相対量の定量化が改善される。

【0089】

場合によっては、複数のフルオロフォアを用いて標識された相補的なオリゴマーを含む検出用標識を使用する。連続するフルオロフォアから増加した明るさを得るためには、フルオロフォアは平均して、8~10塩基だけ離して間隔を開ける。場合によっては、最適化された検出用オリゴマーは、約3~6つのフルオロフォアを有する。場合によっては、検出用標識は、相補的な核酸配列に連結している1つまたは複数の量子ドット (QD) を含むことが注目される。これらの標識において使用するQDは、無機ナノ結晶半導体であり、これらは、フルオロフォアとして際立って良好な挙動を示す。カドミウムを含有しないQDが利用される場合もあれば、QDがCdSeのコアを有する場合もある。CdSe

10

20

30

40

50

のコアを有する Q D は、Z n S のシェルを有する場合があります、かつ / またはヒドロゲル中に封入する場合があります。Q D の発光スペクトルは、典型的な蛍光染料よりも比較的狭く、ほとんどの組織型に関して、単回の画像化運転で、約 6 つの明確に異なる Q D 標識結合性リガンドを検出するのを可能にする。

(実施例 3)

インタクトな組織試料を、核酸標識に連結している抗体と接触させ、続いて、核酸標識を配列決定することによるタンパク質の検出：

【0090】

下記に、マウスから得られたアレイトモグラフィー (A T) のインタクトな組織試料中のタンパク質であるシナプシンの検出のための本明細書に記載する方法の使用を記載し、これは、核酸標識に連結している抗体と接触させ、次いで、核酸標識を配列決定により検出することによって行う。

10

【0091】

組織試料を、実施例 1 に記載した方法により調製する。次いで、組織試料を、核酸標識に直接コンジュゲートしているウサギ抗シナプシン抗体に曝露させた。次いで、核酸標識を、配列決定により同定する。

【0092】

複数のタンパク質を検出する場合、配列決定の使用には、いくつかの固有の利点がある。例えば、組織試料中の 100 個のタンパク質の検出は、実施例 2 に記載した方法を使用して、一度に 4 つを読み取る場合には、25 回の画像化運転が必要になり；一方、結合性リガンドの固有の核酸標識の直接配列決定は、約 4 回の読取りを必要とするに過ぎないであろう。塩基の順番が分かっているので、4 つの塩基は、 $4^4 = 256$ 個の組合せを提示し、同じ塩基が連続して存在し得ないという制約を適用しても、4 マーについて可能な配列の数は、 $4 \times 3 \times 3 \times 3 = 108$ 個である。

20

【0093】

D N A の合成による配列決定：

【0094】

一般に、D N A の合成による配列決定は、Bentley, D. R. ら (2008 年)、*「Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry」*、Nature、456 巻 (7218 号)、53 ~ 59 頁に概要が述べられている方法およびプロトコールにより実施する。

30

【0095】

図 3 は、D N A の配列決定において使用される多様なリンカーを示し、これらのリンカーは、化学的に切断されて、フルオロフォアを遊離させる。蛍光標識は、酵素的または化学的な切断により除去される。多数の化学的切断性リンカーがあり、これらを使用して、フルオロフォアをヌクレオチドにつなぐ。アジドおよびアシル基を含めた、その他の化学物質も同様に使用される。また、光切断性リンカーも実証されている。T r i l i n k から入手可能であるジスルフィドリンカーを有する標識オリゴマーが使用される。T C E P - H C l [トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩] を添加することによって、切断を達成し、この化合物は、最も安定な水溶性アルキルジスルフィドでさえ、広い p H 範囲にわたり、室温において約 5 分で選択的かつ完全に還元する。

40

【0096】

ハイブリダイゼーションによる D N A の配列決定 (タグ「配列決定」) ；

【0097】

場合によっては、ハイブリダイゼーションによるタグの配列決定を用いる。これは、直接配列決定の変形形態であり、4 つの約 15 マー単位からなる約 60 塩基対 (b p) であるタグを使用する。このアプローチを用いると、固有の組合せの数は、 4^n 、または $n = 4$ の場合には、256 個である。例えば、組織試料中の 100 個のタンパク質を検出するためには、100 個の結合性リガンドのそれぞれが、1 つのタグを有し、タグは、それぞれの位置における (A、T、C または G に対応する) 固有の 15 マー 4 つからなり、合計

50

して、16個の固有のオリゴマーが必要になる。「配列決定」は、いずれかの末端から行うことができるであろう。m位を配列決定する場合、必要なのは、m位のタグのオリゴマーに相補的な4つのオリゴマーを導入することだけである。例えば、タグの遠位末端上の4つの固有の配列に相補的なオリゴマーは、それぞれが、区別可能なフルオロフォアを用いて標識されており、これらのオリゴマーを導入し、読取り；次いで、フルオロフォアを放出させるためのリンカーの切断またはdsDNAの酵素的切断のいずれかにより、フルオロフォアを取り除く。後者の方法では、遠位末端からの配列決定が必要となる。このタグ配列決定のスキームにより、各々の蛍光物質を毎回使用することが可能になることから、固有のタグの数を求める式は、 p^n である（上記では、 $p = 4$ と想定した）。QDを使用することによって、pを、4つから、6つまたはそれ以上に増加させることが可能になる。

10

【0098】

ハイブリダイゼーションによるタグの「配列決定」は、QD標識オリゴマーを用いて良好に機能する。 $p = 6$ および $n = 3$ と仮定すると、216個の結合性リガンドを、固有に標識することができ、これには、わずか $6 \times 3 = 18$ 個の固有のオリゴマー、および3回の読取りが使用される。QDを使用すると、適度に高速のSTORM様画像化が可能になる。量子ドットの点滅を活用して、平面において、約15nmの三次元超分解能で画像化を行うことができることが示されている。さらに、量子ドットは、光活性化される必要もなく、光退色に対して抵抗性であり、励起に単色を必要とする。

20

（実施例4）

マイクロ流体チャンバーの使用：

【0099】

場合によっては、上記で記載した検出方法を、マイクロ流体チャンバーを含む自動化された装置中で実行する。「切片収集器」が自動的に、ウルトラマイクローム上で生成したリボンを収集し、それらを、顕微鏡スライドからマイクロタイタープレートまでの範囲に及ぶサイズの、コートした精密カバーガラスの所定の領域上に配置する。チャンバーを、「上部部分」を追加することによって形成し、上部部分は、ポートを有して、ピペット操作ロボットがアクセスするように、または閉鎖マイクロ流体システムが形成されるように、フィッティングに結合するように設計する。

30

【0100】

場合によっては、それぞれの結合性リガンドについて、別個の検出用オリゴマーを使用する方法を処理するマイクロ流体チャンバーは、例えば、100個のタンパク質を検出する間に、100個の試薬をマルチプレックス化するバルブシステム、ならびに切断用溶液および洗浄用溶液を必要とする。これは、チャンバーを、10個のインプット - 1つのアウトプットのバルブに接続し、それぞれのインプットを、同様のバルブに接続することによって達成する。2段階のシステムであれば、100個の別個の溶液を取り扱うことができるであろう。

【0101】

場合によっては、適切な電場の適用を促進するために、チャンバーの上部および底部に透明または半透明の電極を設けて、マイクロ流体チャンバーを構築する。電極に適切な材料は、酸化インジウムスズ（ITO）、炭素および金を含む。

40

（実施例5）

電場の適用：

【0102】

場合によっては、電場を適用して、それぞれの結合性リガンドを、組織試料に接触させるのに必要な時間の長さを短縮する。

【0103】

例えば、図4A～4Cは、マウス皮質の試料の3つの異なる場から得られた画像を示す。図4Aは、試料を抗SV2と共に一晩インキュベートした後に、1.9秒かけて獲得し、図4Bは、試料を抗SV2と共に電場の存在下で10分間インキュベートした後に、2

50

． 2 秒かけて獲得し、図 4 C は、試料を抗 S V 2 と共に電場なしで 1 0 分間インキュベートした後に、4 . 4 秒かけて獲得した。炭素でコートしたカバーガラス上に、試料を配置した。試料のカバーガラス、および約 0 . 5 mm のオフセットで平行に置いた、炭素でコートした別のカバーガラスにより、チャンパーを形成した。対向するカバーガラス間に適用した電圧は、1 5 0 V であった。

【 0 1 0 4 】

上記で記載した一部の実施例で示したようなオリゴマーのハイブリダイゼーションを含む事例では、ハイブリダイゼーションの時間は、電場の適用により、1 5 ~ 3 0 分から、およそ 1 分に短縮する。場合によっては、短い逆方向のパルスをさらに適用して、未結合のオリゴマーを除去することによって、特異性を増加させる。

10

(実施例 6)

R N A 結合性リガンドの局在化 :

【 0 1 0 5 】

上記で記載したように核酸タグ付きのリガンドを使用して、タンパク質を抽出し、続いて、質量分析および / または R N A の配列決定を用いる解析を行う。例えば、R N A 結合性タンパク質に結合する結合性リガンド、および局在化するかまたは特定の細胞コンパートメントもしくは特定のタンパク質複合体に結合するリガンドを、インタクトな組織試料に適用する。D N A 架橋を形成することができる、相補的なオリゴマーを用いて、かつ Q D および電磁ビーズをさらに含むリンカーを用いて、リガンドを標識する。Q D の発光を画像化することによって、リガンド複合体が、細胞中の適当なコンパートメントに局在することが確認される。架橋の形成、および単鎖 D N A s e を用いる処理の後に、リガンドを、組織に固定し、組織を壊し、タンパク質複合体を、電磁ビーズを用いて抽出する。タンパク質複合体を、質量分析または R N A s e q を用いて解析する。

20

【 0 1 0 6 】

場合によっては、一方は T オーバーハングを有し、他方は A オーバーハングを有する二本鎖 D N A を用いてそれぞれ標識されている 2 つのリガンド (A および B) を組織試料に導入する。リガーゼを適用すると、T A クローニングに類似して、2 つのリガンドが十分に近い場合には、T A による塩基対形成により、ライゲーションが可能になる。一方のリガンドは、電磁ビーズにコンジュゲートしており、他方は、ビオチンにコンジュゲートしている。組織を壊し、標識されたタンパク質複合体を、磁気およびストレプトアビジンによる精製の手順で抽出する。こうして、3 つの群の組織 (A のみ、B のみ、および A B) を生成し、さらなる解析を行う。

30

【 0 1 0 7 】

本明細書で使用する専門用語は、特定の実施形態を記載するために使用するものであって、本発明の範囲を制限することを意図するものではないことを理解されたい。本明細書で使用する場合、単数形、すなわち、「 a 」、「 a n 」および「 t h e 」は、そうでないことが文脈から明らかでない限り、複数形への言及を含むことに注目すべきである。さらに、別段の定義がない限り、本明細書で使用する全ての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者が通常理解する意味と同じ意味を有する。

【 0 1 0 8 】

本明細書において、本発明の好ましい実施形態を示し、記載してきたが、そのような実施形態は、例として提供されているに過ぎないことが当業者に明らかであろう。当業者であれば今にも、本発明から逸脱することなく、多数の変更形態、変化形態および置換形態を思いつくであろう。本発明を実行するに際しては、本明細書に記載する本発明の実施形態に対して、多様な代替形態を用いることができることを理解すべきである。以下の特許請求の範囲により、本発明の範囲が定義され、こうした特許請求の範囲に属する方法および構造ならびにそれらの均等物は、特許請求の範囲により保護することを意図するものとする。

40

【 図 1 】

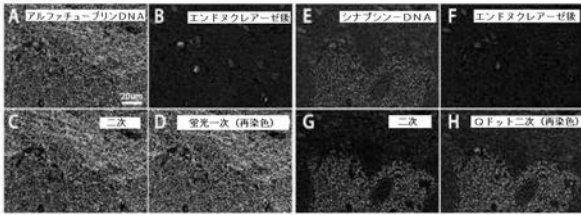


FIG. 1A-1H

【 図 2 】

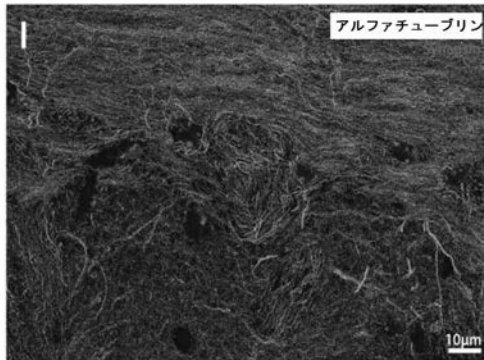


FIG. 2

【 図 3 】

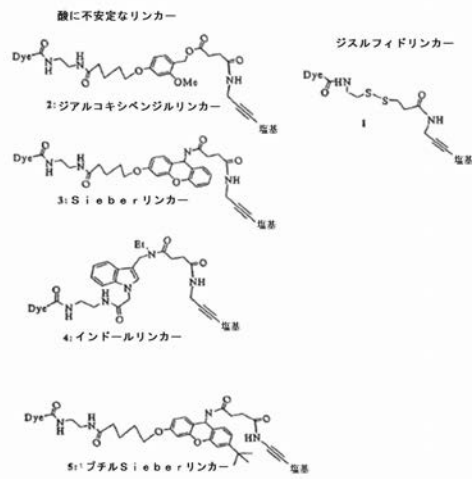


FIG. 3

【 図 4 】

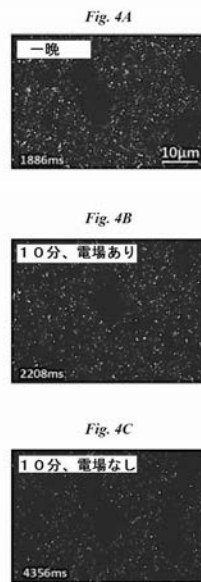


FIG. 4A-4C

【 図 5 】

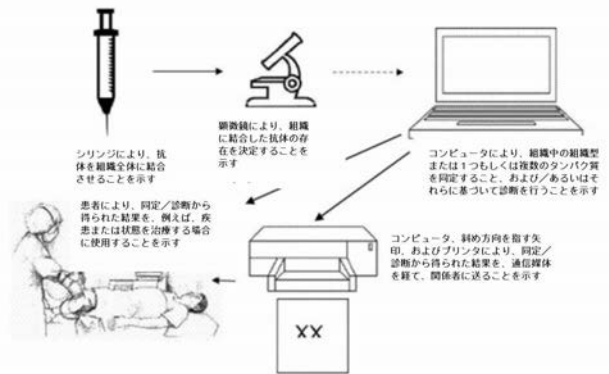


FIG. 5

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/054771
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 1/28(2006.01)i, G01N 35/08(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/53; G01N 33/543; G01N 33/532; G01N 33/58; G01N 1/28; G01N 35/08; C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: Array tomography, tissue, ligand, antibody, tag, quantum dots, IHC, Hybridization, sequence		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AGASTI, SARIT S. et al., 'Photocleavable DNA barcode-antibody conjugates allow sensitive and multiplexed protein analysis in single cells', JACS, 2012, Vol.134, Issue 45, pages 18499-18502 See abstract; pages 18499-18501.	1-4,32-34,40-41
A	NAM, JWA-MIN et al., 'nanoparticle-based bio-barcode for the ultrasensitive detection of proteins', SCIENCE, 2003, Vol.301, page 1884-1886 See page 1884.	1-4,32-34,40-41
A	ZHANG, Ke et al., 'Antibody-linked spherical nucleic acids for cellular targeting', JACS, 2012, Vol.134, Issue 40, pages 16488-16491 See the whole document.	1-4,32-34,40-41
A	KOHL, JOHANNES et al., 'Ultrafast tissue staining with chemical tags', PNAS, 25 August 2014, Vol.111, No.36, pages E3805-E3814 See page E3805; fig. 2.	1-4,32-34,40-41
A	Li, Gang et al., 'Photoaffinity labeling of small-molecule-binding proteins by DNA-templated chemistry', Angewandte International Edition, 2013, Vol.52, Issue 36, pages 9544-9549 See page 9544; Fig. 1.	1-4,32-34,40-41
<input checked="" 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: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"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 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 29 January 2016 (29.01.2016)		Date of mailing of the international search report 29 January 2016 (29.01.2016)
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-8150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2015/054771

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 9,11-15,17-19,22-23,37,39,48-49
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 9, 11-15, 17-19, 22-23, 37, 39 and 48-49 are unclear since they each refer to a multiple dependent claim which does not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. Claims Nos.: 5-8,10,16,20-21,24-31,35-36,38,42-47
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/US2015/054771

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-013139 A (TOYOBO CO. LTD.) 19 January 2001 See abstract.	1-4, 32-34, 40-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2015/054771

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2001-013139 A	19/01/2001	None	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z
			C 1 2 M	1/34	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, 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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ワン, ゴードン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 1 2 4, サンノゼ, サリスバリー ドライブ 1 6 7
5

(72)発明者 トラウトマン, ジェイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 4, ロス アルトス, クレイ ドライブ 1 6 1
4

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BA13 BB24 CB01 CB02 CB17 DA14 DA36 FA16
FA19 FA34 FB02 FB03 FB12 GB01 GC15 JA07
4B029 AA07 BB20 CC01 FA12
4B063 QA01 QA13 QQ79 QR32 QR35 QR56 QS34

专利名称(译)	组织蛋白的高分辨率成像		
公开(公告)号	JP2017536556A	公开(公告)日	2017-12-07
申请号	JP2017538919	申请日	2015-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	斯坦福大学		
申请(专利权)人(译)	在利兰·斯坦福初级大学董事会		
[标]发明人	ワンゴードン トラウトマンジェイ		
发明人	ワン, ゴードン トラウトマン, ジェイ		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/533 G01N33/566 G01N33/53 C12Q1/68 C12M1/34		
CPC分类号	G01N33/6803 C07K19/00 C12Q1/6804 C12Q1/6816 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/5375		
FI分类号	G01N33/48.P G01N33/533 G01N33/566 G01N33/53.D C12Q1/68.A C12Q1/68.Z C12M1/34.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA13 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB17 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA19 2G045/FA34 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GB01 2G045/GC15 2G045/JA07 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR56 4B063/QS34		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	62/061622 2014-10-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于阵列断层扫描 (AT) 和免疫组织化学检查 (IHC) 的标记方法, 通过该方法自动分析数十至数百种蛋白质导致组织降解可以以最小化, 增加数据保真度, 显著增加吞吐量 and 降低成本的方式实现。它还包括自动获取AT和IHC数据的方法。本说明书提供了一种方法, 包括使完整组织样品与至少一种结合特定蛋白质的结合配体接触, 其中结合配体与核酸标记连接; 并检测组织样品中蛋白质的存在。

