(19)日本国特許庁(JP)

# (12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7622016号
(P7622016)

(45)発行日　令和7年1月27日(2025.1.27)

(24)登録日　令和7年1月17日(2025.1.17)

| (51)国際特許分類 | | FI | | |
|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｑ* | *1/6844(2018.01)* | Ｃ１２Ｑ | 1/6844 | Ｚ ＺＮＡ |
| *Ｃ１２Ｑ* | *1/34 (2006.01)* | Ｃ１２Ｑ | 1/34 | |
| *Ｃ１２Ｍ* | *1/34 (2006.01)* | Ｃ１２Ｍ | 1/34 | Ｚ |
| *Ｇ０１Ｎ* | *33/543(2006.01)* | Ｃ１２Ｍ | 1/34 | Ｂ |
| | | Ｇ０１Ｎ | 33/543 | ５２１ |

請求項の数　91　外国語出願　（全199頁）

(21)出願番号　特願2022-162025(P2022-162025)
(22)出願日　令和4年10月7日(2022.10.7)
(62)分割の表示　特願2019-531062(P2019-531062)の分割
原出願日　平成29年12月8日(2017.12.8)
(65)公開番号　特開2023-11606(P2023-11606A)
(43)公開日　令和5年1月24日(2023.1.24)
審査請求日　令和4年11月4日(2022.11.4)
(31)優先権主張番号　62/471,930
(32)優先日　平成29年3月15日(2017.3.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)
(31)優先権主張番号　62/432,553
(32)優先日　平成28年12月9日(2016.12.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
最終頁に続く

(73)特許権者　515236259
ザ・ブロード・インスティテュート・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・メイン・ストリート・４１５
(73)特許権者　596060697
マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９ケンブリッジ，マサチューセッツ・アヴェニュー・７７
(73)特許権者　505028576
プレジデント アンド フェロウズ オヴ ハーヴァード カレッジ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムベースの診断法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

標的核酸分子のリボヌクレオチド配列にハイブリダイズするように設計されたガイドＲＮＡと複合体を形成し、前記複合体による前記リボヌクレオチド配列の認識により、ＲＮＡベースのマスキング構築物の非標的リボヌクレオチド配列を切断するエフェクタータンパク質の非配列特異的コラテラルＲＮａｓｅ活性を引き起こし、検出可能なシグナルを生成するか又はマスキングすることが可能な、ＣＲＩＳＰＲ　ＶＩ型ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質、又はその機能変異体と；

対応する標的核酸分子のリボヌクレオチド配列にハイブリダイズするように設計されたガイドＲＮＡと；

非標的リボヌクレオチド配列を含むＲＮＡベースのマスキング構築物と；

標的核酸分子の増幅試薬と

を含み、

前記試薬は、

ＲＮＡポリメラーゼと、

ＲＮＡポリメラーゼプロモーターのヌクレオチド配列と、標的核酸分子のリボヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができる相補的ヌクレオチド配列とを含むプライマーとを含み、

前記試薬の存在下での標的核酸の増幅は、ＤＮＡ鋳型のＲＮＡポリメラーゼプロモーター媒介性転写により、対応する標的ＲＮＡ分子に転写されるＤＮＡ鋳型を生成する、核酸

検出システム。
【請求項２】
前記標的核酸分子が、標的ＲＮＡ分子のリボヌクレオチド配列又は標的ＤＮＡ分子の相補的リボヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載のシステム。
【請求項３】
前記ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質が１つ以上のＨＥＰＮドメインを含む、請求項１に記載のシステム。
【請求項４】
前記１つ以上のＨＥＰＮドメインがＲｘｘｘｘＨモチーフ配列を含む、請求項３に記載のシステム。
【請求項５】
前記Ｒｘｘｘ$\underline{x}$ＨモチーフがＲ｛Ｎ／Ｈ／Ｋ］$X_1X_2X_3$Ｈ配列を含む、請求項４に記載のシステム。
【請求項６】
$X_1$がＲ、Ｓ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｇ、又はＹであり、及び$X_2$が独立にＩ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、又はＬであり、及び$X_3$が独立にＬ、Ｆ、Ｎ、Ｙ、Ｖ、Ｉ、Ｓ、Ｄ、Ｅ、又はＡである、請求項５に記載のシステム。
【請求項７】
前記ＣＲＩＳＰＲ　ＶＩ型ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質がＣ２ｃ２である、請求項１および３～６のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８】
前記Ｃ２ｃ２がＣａｓ　１遺伝子の２０ｋｂ以内にある、請求項７に記載のシステム。
【請求項９】
前記Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質が、レプトトリキア属（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ）、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、コリネバクター属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ）、ステレラ属（Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ）、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）、トレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）、フィリファクター属（Ｆｉｌｉｆａｃｔｏｒ）、ユーバクテリウム属（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、バクテロイデス属（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）、フラビイボラ属（Ｆｌａｖｉｉｖｏｌａ）、フラボバクテリウム属（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、スフェロヘータ属（Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ）、アゾスピリラム属（Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）、グルコンアセトバクター属（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、ナイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）、ロゼブリア属（Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ）、パルビバクラム属（Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、ニトラチフラクター属（Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）、及びラクノスピラ属（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａ）からなる群から選択される属の生物由来である、請求項７に記載のシステム。
【請求項１０】
前記Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質が、レプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｓｈａｈｉｉ）；レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）（Ｌｗ２）；リステリア・ゼーリゲリ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｓｅｅｌｉｇｅｒｉ）；ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＭＡ２０２０；ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＮＫ４Ａ１７９；［クロストリジウム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）］アミノフィルム（ａｍｉｎｏｐｈｉｌｕｍ）ＤＳＭ　１０７１０；カルノバクテリウム・ガリナルム（Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）ＤＳＭ　４８４７；カルノバクテリウム・ガリナルム（Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）ＤＳＭ　４８４７（第２のＣＲＩＳＰＲ遺伝子座）；パルディバクター・プロピオニシゲネス（Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ　ｐｒｏｐｉｏｎｉ

ｃｉｇｅｎｅｓ）ＷＢ４；リステリア・ウェイヘンステファネンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｗｅｉｈｅｎｓｔｅｐｈａｎｅｎｓｉｓ）ＦＳＬ Ｒ９－０３１７；リステリア科（Ｌｉｓｔｅｒｉａｃｅａｅ）細菌ＦＳＬ Ｍ６－０６３５；レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ）Ｆ０２７９；ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）ＳＢ １００３；ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）Ｒ１２１；ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）ＤＥ４４２；レプトトリキア・ブッカリス（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｂｕｃｃａｌｉｓ）Ｃ－１０１３－ｂ；ハービニクス・ヘミセルロシリティカ（Ｈｅｒｂｉｎｉｘ ｈｅｍｉｃｅｌｌｕｌｏｓｉｌｙｔｉｃａ）；［ユーバクテリウム（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）］レクタレ（ｒｅｃｔａｌｅ）；ユーバクテリウム科（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）細菌ＣＨＫＣＩ００４；ブラウティア属種（Ｂｌａｕｔｉａ ｓｐ．）Ｍａｒｓｅｉｌｌｅ－Ｐ２３９８；レプトトリキア属種（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｐ．）口腔細菌分類群８７９株Ｆ０５５７；ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＮＫ４Ａ１４４；クロロフレクサス・アグレガンス（Ｃｈｌｏｒｏｆｌｅｘｕｓ ａｇｇｒｅｇａｎｓ）；デメクイナ・アウランティアカ（Ｄｅｍｅｑｕｉｎａ ａｕｒａｎｔｉａｃａ）；タラソスピラ属種（Ｔｈａｌａｓｓｏｓｐｉｒａ ｓｐ．）ＴＳＬ５－１；シュードブチリビブリオ属種（Ｐｓｅｕｄｏｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｓｐ．）ＯＲ３７；ブチリビブリオ属種（Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｓｐ．）ＹＡＢ３００１；ブラウティア属種（Ｂｌａｕｔｉａ ｓｐ．）Ｍａｒｓｅｉｌｌｅ－Ｐ２３９８；レプトトリキア属種（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｐ．）Ｍａｒｓｅｉｌｌｅ－Ｐ３００７；バクテロイデス・イフエ（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ ｉｈｕａｅ）；ポルフィロモナス科（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｄａｃｅａｅ）細菌ＫＨ３ＣＰ３ＲＡ；リステリア・リパリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｒｉｐａｒｉａ）；及びインソリティスピリルム・ペレグリヌム（Ｉｎｓｏｌｉｔｉｓｐｉｒｉｌｌｕｍ ｐｅｒｅｇｒｉｎｕｍ）からなる群から選択される生物由来である、請求項９に記載のシステム。

【請求項１１】

前記Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質がＬ．ウエイデイ（Ｌ．ｗａｄｅｉ）Ｆ０２７９（Ｌｗ２）Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質又はレプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ）Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質である、請求項１０に記載のシステム。

【請求項１２】

前記ＲＮＡベースのマスキング構築物が前記検出可能なシグナルの生成を抑制する、請求項１～１１のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項１３】

前記ＲＮＡベースのマスキング構築物が、検出可能な正のシグナルをマスキングすることによるか、又は検出可能な負のシグナルを生成することにより前記検出可能なシグナルの生成を抑制する、請求項１２に記載のシステム。

【請求項１４】

前記ＲＮＡベースのマスキング構築物が、レポーティング構築物によってコードされる遺伝子産物であって、発現すると検出可能な正のシグナルを生成する遺伝子産物の生成を抑制するサイレンシングＲＮＡを含む、請求項１２に記載のシステム。

【請求項１５】

前記ＲＮＡベースのマスキング構築物が、検出可能な負のシグナルを生成するリボザイムであり、前記リボザイムが不活性化されると検出可能な正のシグナルが生成される、請求項１３に記載のシステム。

【請求項１６】

前記リボザイムが基質を第１の色に変え、前記基質が、前記リボザイムが不活性化されると第２の色に変わる、請求項１５に記載のシステム。

【請求項１７】

前記ＲＮＡベースのマスキング剤がＲＮＡアプタマーであり、及び／又はＲＮＡが繋留された阻害薬を含む、請求項１２に記載のシステム。
【請求項１８】
前記アプタマー又はＲＮＡが繋留された阻害薬が酵素を隔離し、前記酵素が、前記アプタマー又はＲＮＡが繋留された阻害薬から放出されると基質に作用することにより前記検出可能なシグナルを発生する、請求項１７に記載のシステム。
【請求項１９】
前記アプタマーが、酵素を阻害する、且つ前記酵素が基質からの前記検出可能なシグナルの生成を触媒することを妨げる阻害性アプタマーであり、又は前記ＲＮＡが繋留された阻害薬が酵素を阻害し、且つ前記酵素が基質からの前記検出可能なシグナルの生成を触媒することを妨げる、請求項１７に記載のシステム。
【請求項２０】
前記酵素が、トロンビン、プロテインＣ、好中球エラスターゼ、サブチリシン、西洋ワサビペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、又は仔ウシアルカリホスファターゼである、請求項１９に記載のシステム。
【請求項２１】
前記酵素がトロンビンであり、前記基質が、トロンビンのペプチド基質に共有結合的に連結したパラニトロアニリドであるか、又はトロンビンのペプチド基質に共有結合的に連結した７－アミノ－４－メチルクマリンである、請求項２０に記載のシステム。
【請求項２２】
前記アプタマーが、前記アプタマーから放出されると組み合わさって検出可能シグナルを生成する一対の薬剤を隔離する、請求項１７に記載のシステム。
【請求項２３】
前記ＲＮＡベースのマスキング構築物が、検出可能リガンド及びマスキング成分が結び付いているＲＮＡオリゴヌクレオチドを含む、請求項１２に記載のシステム。
【請求項２４】
前記ＲＮＡベースのマスキング構築物が、架橋分子によって凝集体として保持されているナノ粒子を含み、前記架橋分子の少なくとも一部分がＲＮＡを含み、前記ナノ粒子が溶液中に分散すると前記溶液が色のシフトを起こす、請求項１２に記載のシステム。
【請求項２５】
前記ナノ粒子がコロイド金属である、請求項２４に記載のシステム。
【請求項２６】
前記コロイド金属がコロイド金である、請求項２５に記載のシステム。
【請求項２７】
前記ＲＮＡベースのマスキング構築物が、連結分子によって１つ以上の消光分子に連結した量子ドットを含み、前記連結分子の少なくとも一部分がＲＮＡを含む、請求項１２に記載のシステム。
【請求項２８】
前記ＲＮＡベースのマスキング構築物が、挿入剤と複合体化したＲＮＡを含み、前記ＲＮＡの切断時に前記挿入剤が吸光度を変化させる、請求項１２に記載のシステム。
【請求項２９】
前記挿入剤がピロニンＹ又はメチレンブルーである、請求項２８に記載のシステム。
【請求項３０】
前記検出可能リガンドがフルオロフォアであり、前記マスキング成分が消光分子である、請求項２３に記載のシステム。
【請求項３１】
前記ガイドＲＮＡが、ミスマッチを含む対応する標的核酸分子にハイブリダイズするように設計されている、請求項１～３０のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項３２】
前記ミスマッチが、前記標的核酸分子におけるＳＮＰ又は他の単一ヌクレオチド変異の

上流又は下流にある、請求項３１に記載のシステム。
【請求項３３】
前記ガイドＲＮＡが標的ＲＮＡ分子又はＤＮＡ分子の一塩基変異多型、又はＲＮＡ転写物のスプライス変異を検出するように設計される、請求項１～３２のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項３４】
前記ガイドＲＮＡが、疾患状態の診断指標となる対応する標的ＲＮＡ分子にハイブリダイズするように設計される、請求項１～３３のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項３５】
前記疾患状態が癌である、請求項３４に記載のシステム。
【請求項３６】
前記疾患状態が自己免疫疾患である、請求項３４に記載のシステム。
【請求項３７】
前記疾患状態が感染症である、請求項３４に記載のシステム。
【請求項３８】
前記感染症が、ウイルス、細菌、真菌、原虫、又は寄生虫によって引き起こされる、請求項３７に記載のシステム。
【請求項３９】
前記感染症がウイルス感染症である、請求項３８に記載のシステム。
【請求項４０】
前記ウイルス感染症がＤＮＡウイルスによって引き起こされる、請求項３９に記載のシステム。
【請求項４１】
前記ＤＮＡウイルスが、マイオウイルス科（Ｍｙｏｖｉｒｉｄａｅ）、ポドウイルス科（Ｐｏｄｏｖｉｒｉｄａｅ）、サイフォウイルス科（Ｓｉｐｈｏｖｉｒｉｄａｅ）、アロヘルペスウイルス科（Ａｌｌｏｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）、ヘルペスウイルス科（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）（ヒトヘルペスウイルス、及び水痘帯状疱疹ウイルスを含む）、マラコヘルペスウイルス科（Ｍａｌｏｃｏｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）、リポスリクスウイルス科（Ｌｉｐｏｔｈｒｉｘｖｉｒｉｄａｅ）、ルディウイルス科（Ｒｕｄｉｖｉｒｉｄａｅ）、アデノウイルス科（Ａｄｅｎｏｖｉｒｉｄａｅ）、アンプラウイルス科（Ａｍｐｕｌｌａｖｉｒｉｄａｅ）、アスコウイルス科（Ａｓｃｏｖｉｒｉｄａｅ）、アスファウイルス科（Ａｓｆａｒｖｉｒｉｄａｅ）（アフリカブタコレラウイルスを含む）、バキュロウィルス科（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｉｄａｅ）、シカウダウイルス科（Ｃｉｃａｕｄａｖｉｒｉｄａｅ）、クラバウイルス科（Ｃｌａｖａｖｉｒｉｄａｅ）、コルチコウイルス科（Ｃｏｒｔｉｃｏｖｉｒｉｄａｅ）、フセロウイルス科（Ｆｕｓｅｌｌｏｖｉｒｉｄａｅ）、グロブロウイルス科（Ｇｌｏｂｕｌｏｖｉｒｉｄａｅ）、グッタウイルス科（Ｇｕｔｔａｖｉｒｉｄａｅ）、ヒトロサウイルス科（Ｈｙｔｒｏｓａｖｉｒｉｄａｅ）、イリドウイルス科（Ｉｒｉｄｏｖｉｒｉｄａｅ）、マルセイユウイルス科（Ｍａｓｅｉｌｌｅｖｉｒｉｄａｅ）、ミミウイルス科（Ｍｉｍｉｖｉｒｉｄａｅ）、ヌディウイルス科（Ｎｕｄｉｖｉｒｉｄａｅ）、ニマウイルス科（Ｎｉｍａｖｉｒｉｄａｅ）、パンドラウイルス科（Ｐａｎｄｏｒａｖｉｒｉｄａｅ）、パピローマウイルス科（Ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｉｄａｅ）、フィコドナウイルス科（Ｐｈｙｃｏｄｎａｖｉｒｉｄａｅ）、プラズマウイルス科（Ｐｌａｓｍａｖｉｒｉｄａｅ）、ポリドナウイルス、ポリオーマウイルス科（Ｐｏｌｙｏｍａｖｉｒｉｄａｅ）（シミアンウイルス４０、ＪＣウイルス、ＢＫウイルスを含む）、ポックスウイルス科（Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅ）（牛痘及び天然痘を含む）、スファエロリポウイルス科（Ｓｐｈａｅｒｏｌｉｐｏｖｉｒｉｄａｅ）、テクティウイルス科（Ｔｅｃｔｉｖｉｒｉｄａｅ）、若しくはトゥリウイルス科（Ｔｕｒｒｉｖｉｒｉｄａｅ）のウイルス、ディノドナウイルス（Ｄｉｎｏｄｎａｖｉｒｕｓ）、サルタープロウイルス（Ｓａｌｔｅｒｐｒｏｖｉｒｕｓ）、又はリジドウイルス（Ｒｈｉｚｉｄｏｖｉｒｕｓ）である、請求項４０に記載のシステム。

【請求項４２】
前記ウイルス感染症が、二本鎖ＲＮＡウイルス、プラス鎖ＲＮＡウイルス、マイナス鎖ＲＮＡウイルス、レトロウイルス、又はこれらの組み合わせによって引き起こされる、請求項３９に記載のシステム。
【請求項４３】
前記ウイルス感染症が、コロナウイルス科（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、ピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、カリシウイルス科（Ｃａｌｉｃｉｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、フラビウイルス科（Ｆｌａｖｉｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、トガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、ボルナウイルス科（Ｂｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）、フィロウイルス科（Ｆｉｌｏｖｉｒｉｄａｅ）、パラミクソウイルス科（Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）、ニューモウイルス科（Ｐｎｅｕｍｏｖｉｒｉｄａｅ）、ラブドウイルス科（Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅ）、アレナウイルス科（Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ）、ブニヤウイルス科（Ｂｕｎｙａｖｉｒｉｄａｅ）、オルトミクソウイルス科（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）、又はデルタウイルス属（Ｄｅｌｔａｖｉｒｕｓ）によって引き起こされる、請求項４２に記載のシステム。
【請求項４４】
前記ウイルス感染症が、コロナウイルス、ＳＡＲＳ、ポリオウイルス、ライノウイルス、Ａ型肝炎、ノーウォークウイルス、黄熱病ウイルス、ウエストナイルウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルス、風疹ウイルス、ロスリバーウイルス、シンドビスウイルス、チクングニアウイルス、ボルナ病ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ニパウイルス、ヘンドラウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス、狂犬病ウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、クリミア－コンゴ出血熱ウイルス、インフルエンザ、又はＤ型肝炎ウイルスによって引き起こされる、請求項４３に記載のシステム。
【請求項４５】
前記感染症が細菌感染である、請求項３８に記載のシステム。
【請求項４６】
前記細菌感染を引き起こす前記細菌が、アシネトバクター属（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）種、アクチノバチルス属（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ）種、放線菌種（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｓ）、アクチノミセス属（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ）種、アエロコッカス属（Ａｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）種、アエロモナス属（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ）種、アナプラズマ属（Ａｎａｐｌａｓｍａ）種、アルカリゲネス属（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）種、バチルス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）種、バクテロイデス属（Ｂａｃｔｅｒｉｏｄｅｓ）種、バルトネラ属（Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ）種、ビフィドバクテリウム属（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）種、ボルデテラ属（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ）種、ボレリア属（Ｂｏｒｒｅｌｉａ）種、ブルセラ属（Ｂｒｕｃｅｌｌａ）種、バークホルデリア属（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ）種、カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）種、キャプノサイトファーガ属（Ｃａｐｎｏｃｙｔｏｐｈａｇａ）種、クラミジア属（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ）種、シトロバクター属（Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ）種、コクシエラ属（Ｃｏｘｉｅｌｌａ）種、コリネバクテリウム属（Ｃｏｒｙｎｂａｃｔｅｒｉｕｍ）種、クロストリジウム属（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）種、エイケネラ属（Ｅｉｋｅｎｅｌｌａ）種、エンテロバクター属（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）種、大腸菌属（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）種、エンテロコッカス属（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）種、エーリキア属（Ｅｈｌｉｃｈｉａ）種、エピデルモフィトン属（Ｅｐｉｄｅｒｍｏｐｈｙｔｏｎ）種、エリシペロスリクス属（Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ）種、ユーバクテリウム属（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）種、フランシセラ属（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ）種、フゾバクテリウム属（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）種、ガードネレラ属（Ｇａｒｄｎｅｒｅｌｌａ）種、ゲメラ属（Ｇｅｍｅｌｌａ）種、ヘモフィルス属（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ）種、ヘリコバクター属（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ）種、キンゲラ属（Ｋｉｎｇｅｌｌａ）種、クレブシエラ属（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）種、ラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）種、ラクト

コッカス属（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ）種、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）種、レプトスピラ属（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ）種、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）種、レプトスピラ属（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ）種、ロイコノストック属（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ）種、マンヘミア属（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ）種、ミクロスポルム属（Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｕｍ）種、ミクロコッカス属（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ）種、モラクセラ属（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ）種、モルガネラ属（Ｍｏｒｇａｎｅｌｌ）種、モビルンカス属（Ｍｏｂｉｌｕｎｃｕｓ）種、ミクロコッカス属（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ）種、マイコバクテリウム属（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）種、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍ）種、ノカルジア属（Ｎｏｃａｒｄｉａ）種、ナイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）種、パスツレラ属（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌａａ）種、ペディオコッカス属（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ）種、ペプトストレプトコッカス属（Ｐｅｐｔｏｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）種、ピチロスポルム属（Ｐｉｔｙｒｏｓｐｏｒｕｍ）種、プレジオモナス属（Ｐｌｅｓｉｏｍｏｎａｓ）種、プレボテラ属（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ）種、ポルフィロモナス属（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ）種、プロテウス属（Ｐｒｏｔｅｕｓ）種、プロビデンシア属（Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ）種、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種、プロピオニバクテリウム属（Ｐｒｏｐｉｏｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍｓ）種、ロドコッカス属（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ）種、リケッチア属（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ）種、ロドコッカス属（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ）種、セラチア属（Ｓｅｒｒａｔｉａ）種、ステノトロホモナス属（Ｓｔｅｎｏｔｒｏｐｈｏｍｏｎａｓ）種、サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）種、セラチア属（Ｓｅｒｒａｔｉａ）種、赤痢菌属（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）種、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）種、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）種、スピリルム属（Ｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）種、ストレプトバチルス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）種、トレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）種、トロフェリマ属（Ｔｒｏｐｈｅｒｙｍａ）種、白癬菌属（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ）種、ウレアプラズマ属（Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ）種、ベイロネラ属（Ｖｅｉｌｌｏｎｅｌｌａ）種、ビブリオ属（Ｖｉｂｒｉｏ）種、エルシニア属（Ｙｅｒｓｉｎｉａ）種、若しくはキサントモナス属（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ）種、又はこれらの組み合わせである、請求項４５に記載のシステム。

【請求項４７】

前記感染症が真菌によって引き起こされる、請求項３８に記載のシステム。

【請求項４８】

前記真菌が、アスペルギルス属（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、ブラストミセス属（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ）、カンジダ症、コクシジオイデス症（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｄｏｍｙｃｏｓｉｓ）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、クリプトコッカス・ガッティ（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｇａｔｔｉ）、ｓｐ．ヒストプラズマ属種（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ ｓｐ．）（ヒストプラズマ・カプスラーツム（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｓｕｌａｔｕｍ）など）、ニューモシスチス属種（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｓｐ．）（ニューモシスチス・イロベチ（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｊｉｒｏｖｅｃｉｉ）など）、スタキボトリス属（Ｓｔａｃｈｙｂｏｔｒｙｓ）（スタキボトリス・チャータラム（Ｓｔａｃｈｙｂｏｔｒｙｓ ｃｈａｒｔａｒｕｍ）など）、ムコール症（Ｍｕｃｒｏｙｍｃｏｓｉｓ）、スポロトリクス属（Ｓｐｏｒｏｔｈｒｉｘ）、真菌性眼感染症、白癬、エクセロヒルム属（Ｅｘｓｅｒｏｈｉｌｕｍ）、クラドスポリウム属（Ｃｌａｄｏｓｐｏｒｉｕｍ）、ゲオトリクム属（Ｇｅｏｔｒｉｃｈｕｍ）、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、ハンゼヌラ属（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）種、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）種、クルイベロミセス属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）種、デバリオミセス属（Ｄｅｂａｒｙｏｍｙｃｅｓ）種、ピキア属（Ｐｉｃｈｉａ）種、ペニシリウム属（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）種、クラドスポリウム属（Ｃｌａｄｏｓｐｏｒｉｕｍ）種、若しくはバイソクラミス属（Ｂｙｓｓｏｃｈｌａｍｙｓ）種又はこれらの組み合わせである、請求項４７に記載のシステム。

【請求項４９】

前記感染症が原虫によって引き起こされる、請求項３８に記載のシステム。
【請求項５０】
前記原虫が、ユーグレノゾア門（Ｅｕｇｌｅｎｏｚｏａ）、ヘテロロボサ綱（Ｈｅｔｅｒｏｌｏｂｏｓｅａ）、ディプロモナス目（Ｄｉｐｌｏｍｏｎａｄｉｄａ）、アメーバ動物門（Ａｍｏｅｂｏｚｏａ）、ブラストシスチス属（Ｂｌａｓｔｏｃｙｓｔｉｃ）、若しくはアピコンプレックス門（Ａｐｉｃｏｍｐｌｅｘａ）、又はこれらの組み合わせである、請求項４９に記載のシステム。
【請求項５１】
前記感染症が寄生虫によって引き起こされる、請求項３８に記載のシステム。
【請求項５２】
前記寄生虫が、クルーズトリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ）（シャーガス病）、ガンビアトリパノソーマ（Ｔ．ｂｒｕｃｅｉ ｇａｍｂｉｅｎｓｅ）、ローデシアトリパノソーマ（Ｔ．ｂｒｕｃｅｉ ｒｈｏｄｅｓｉｅｎｓｅ）、ブラジルリーシュマニア（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｂｒａｚｉｌｉｅｎｓｉｓ）、小児リーシュマニア（Ｌ．ｉｎｆａｎｔｕｍ）、メキシコリーシュマニア（Ｌ．ｍｅｘｉｃａｎａ）、大形リーシュマニア（Ｌ．ｍａｊｏｒ）、熱帯リーシュマニア（Ｌ．ｔｒｏｐｉｃａ）、ドノバンリーシュマニア（Ｌ．ｄｏｎｏｖａｎｉ）、フォーラーネグレリア（Ｎａｅｇｌｅｒｉａ ｆｏｗｌｅｒｉ）、ランブル鞭毛虫（Ｇｉａｒｄｉａ ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌｉｓ）（ランブル鞭毛虫（Ｇ．ｌａｍｂｌｉａ）、ランブル鞭毛虫（Ｇ．ｄｕｏｄｅｎａｌｉｓ））、カステラーニアメーバ（ｃａｎｔｈａｍｏｅｂａ ｃａｓｔｅｌｌａｎｉｉ）、バラムチア・マンドリルリス（Ｂａｌａｍｕｔｈｉａ ｍａｄｒｉｌｌａｒｉｓ）、赤痢アメーバ（Ｅｎｔａｍｏｅｂａ ｈｉｓｔｏｌｙｔｉｃａ）、ヒトブラストシスチス（Ｂｌａｓｔｏｃｙｓｔｉｃ ｈｏｍｉｎｉｓ）、ネズミバベシア（Ｂａｂｅｓｉａ ｍｉｃｒｏｔｉ）、小形クリプトスポリジウム（Ｃｒｙｐｔｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ ｐａｒｖｕｍ）、シクロスポラ・カイエタネンシス（Ｃｙｃｌｏｓｐｏｒａ ｃａｙｅｔａｎｅｎｓｉｓ）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐ．ｖｉｖａｘ）、卵形マラリア原虫（Ｐ．ｏｖａｌｅ）、四日熱マラリア原虫（Ｐ．ｍａｌａｒｉａｅ）、若しくはトキソプラズマ原虫（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉ）、又はこれらの組み合わせである、請求項５１に記載のシステム。
【請求項５３】
前記増幅試薬が、核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）、ループ媒介性等温増幅（ＬＡＭＰ）、ストランド置換増幅（ＳＤＡ）、ヘリカーゼ依存性増幅（ＨＤＡ）、ニッキング酵素増幅反応（ＮＥＡＲ）、ＰＣＲ、多置換増幅（ＭＤＡ）、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、又は分岐増幅方法（ＲＡＭ）を行うための試薬である、請求項１～５２のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項５４】
集積ＣＲＩＳＰＲシステムを更に含む、請求項１～５３のいずれか一項に記載のシステムであって、前記集積ＣＲＩＳＰＲシステムが、前記ＣＲＩＳＰＲ ＶＩ型ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質と前記ガイドＲＮＡとを含む検出ＣＲＩＳＰＲシステムによる検出前に前記対応する標的ＲＮＡ分子と結合するように設計される、システム。
【請求項５５】
前記集積ＣＲＩＳＰＲシステムが、触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質を含む、請求項５４に記載のシステム。
【請求項５６】
触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質が、触媒的に不活性なＣ２ｃ２である、請求項５５に記載のシステム。
【請求項５７】
前記集積ＣＲＩＳＰＲシステムがタグを更に含み、前記タグが、前記集積ＣＲＩＳＰＲシステムのプルダウン、又は固体基材への前記集積ＣＲＩＳＰＲシステムの結合に使用さ

れる、請求項５４～５６のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項５８】
前記固体基材がフローセルである、請求項５７に記載のシステム。
【請求項５９】
１つ以上の個別独立分離容積を含む診断装置であって、各個別独立分離容積が、請求項１～５８のいずれか一項に記載の核酸検出システムを含む、診断装置。
【請求項６０】
各個別独立分離容積が、マスキングされたＲＮＡポリメラーゼプロモーター結合部位又はマスキングされたプライマー結合部位を含む１つ以上の検出アプタマーを更に含む、請求項５９に記載の診断装置。
【請求項６１】
前記個別独立分離容積が液滴である、請求項５９～６０のいずれか一項に記載の診断装置。
【請求項６２】
前記個別独立分離容積が固体基材上に画成される、請求項５９～６１のいずれか一項に記載の診断装置。
【請求項６３】
前記個別独立分離容積がマイクロウェルである、請求項６２に記載の診断装置。
【請求項６４】
前記個別独立分離容積が基材上に画成されたスポットである、請求項５９～６１のいずれか一項に記載の診断装置。
【請求項６５】
前記基材が可撓性材料基材である、請求項６４に記載の診断装置。
【請求項６６】
前記可撓性材料基材が紙基材又は可撓性ポリマーベースの基材である、請求項６５に記載の診断装置。
【請求項６７】
試料中の標的核酸分子の検出方法であって、
試料又は試料セットを１つ以上の個別独立分離容積に分配することであって、前記個別独立分離容積が、請求項１、３、及び４～５７のいずれか一項に記載の核酸検出システムを含むこと；
標的核酸分子のリボヌクレオチド配列へのガイドＲＮＡのハイブリダイゼーションのために十分な条件下で前記試料又は試料セットをインキュベートすることであって、ＣＲＩＳＰＲ　ＶＩ型ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質と、標的核酸分子のリボヌクレオチド配列にハイブリダイズしたガイドＲＮＡとの複合体形成は、ＲＮＡベースのマスキング構築物の非標的リボヌクレオチド配列を切断するエフェクタータンパク質の非配列特異的コラテラルＲＮａｓｅ活性を引き起こし、検出シグナルを生成すること；及び
前記シグナルを検出することであって、前記シグナルの検出が、前記試料中における標的核酸分子の存在を指し示すこと；
を含み、
前記方法は、前記試料中の標的核酸分子を増幅し、前記プライマーのＲＮＡポリメラーゼプライマーを含む標的ＤＮＡ鋳型を生成することと、ＲＮＡポリメラーゼの存在下で標的ＤＮＡ鋳型を転写し、対応する標的ＲＮＡ分子を生成することを更に含む、方法。
【請求項６８】
前記標的核酸分子が、標的ＲＮＡ分子のリボヌクレオチド配列又は標的ＤＮＡ分子の相補的リボヌクレオチド配列を含む、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
標的ＲＮＡ分子を増幅することが、ＮＡＳＢＡによる増幅を含む、請求項６７又は６８に記載の方法。
【請求項７０】

標的ＲＮＡ分子を増幅することが、ＲＰＡによる増幅を含む、請求項６７又は６８に記載の方法。
【請求項７１】
前記試料が生体試料又は環境試料である、請求項６７～７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２】
前記生体試料が、血液、血漿、血清、尿、便、喀痰、粘液、リンパ液、滑液、胆汁、腹水、胸水、漿液、唾液、脳脊髄液、房水又は硝子体液、又は任意の生体分泌物、漏出液、滲出液（例えば、膿瘍又は任意の他の感染部位又は炎症から入手される流体）、又は関節（例えば、正常関節、又は関節リウマチ、骨関節炎、痛風若しくは敗血症性関節炎などの疾患に罹っている関節）から入手される流体、又は皮膚若しくは粘膜表面のスワブである、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
前記環境試料が、食品試料、紙表面、布、金属表面、木材表面、プラスチック表面、土壌試料、淡水試料、廃水試料、若しくは生理食塩水試料、又はこれらの組み合わせから入手される、請求項７１に記載の方法。
【請求項７４】
前記ガイドＲＮＡが、前記標的ＲＮＡ分子又はＤＮＡ分子における一塩基変異多型、又はＲＮＡ転写物のスプライス変異を検出するように設計される、請求項６７～７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５】
前記ガイドＲＮＡが、疾患状態の診断指標となる標的核酸分子にハイブリダイズするように設計される、請求項６７～７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６】
前記ガイドＲＮＡが細胞遊離核酸にハイブリダイズするように設計される、請求項７４又は７５に記載の方法。
【請求項７７】
前記疾患状態が、感染症、臓器疾患、血液疾患、免疫系疾患、癌、脳及び神経系疾患、内分泌疾患、妊娠又は分娩関連疾患、遺伝性疾患、又は環境的に獲得された疾患である、請求項７５に記載の方法。
【請求項７８】
前記疾患状態が、好ましくは病原体又は細胞における抗生物質又は薬剤耐性又は感受性遺伝子又は転写物又はポリペプチドの存在又は非存在によって特徴付けられる、請求項３４に記載のシステム。
【請求項７９】
前記標的分子が抗生物質耐性遺伝子又は転写物、抗生物質感受性遺伝子又は転写物、薬剤耐性遺伝子又は転写物、あるいは薬剤感受性遺伝子又は転写物である、請求項３４に記載のシステム。
【請求項８０】
前記ガイドＲＮＡにおける前記ミスマッチが、前記スペーサーの位置３、４、５、又は６、好ましくは位置３にある、請求項３１又は３２に記載のシステム。
【請求項８１】
前記ガイドＲＮＡにおける前記ミスマッチが、スペーサーの位置１、２、３、４、５、６、７、８、又は９、好ましくは位置５にある、請求項３１又は３２に記載のシステム。
【請求項８２】
前記ミスマッチが、前記ガイドＲＮＡにおける前記ＳＮＰ又は他の単一ヌクレオチド変異の１、２、３、４、又は５ヌクレオチド上流又は下流、好ましくは２ヌクレオチド、好ましくは下流にある、請求項３２に記載のシステム。
【請求項８３】
前記ガイドＲＮＡが、野生型スペーサーと比べてトランケートされているスペーサーを

含む、請求項１～５８又は７８～８２のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８４】
前記ガイドＲＮＡが、２８ヌクレオチド未満、好ましくは２０ヌクレオチド以上２７ヌクレオチド以下のスペーサーを含む、請求項１～５８又は７８～８３のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８５】
前記ガイドＲＮＡが、２０～２５ヌクレオチド又は２０～２３ヌクレオチド、例えば好ましくは２０又は２３ヌクレオチドからなるスペーサーを含む、請求項１～５８又は７８～８３のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８６】
前記マスキング構築物が、Ｇ四重鎖形成配列に結合するように設計されたＲＮＡオリゴヌクレオチドを含み、前記マスキング構築物の切断時に前記Ｇ四重鎖形成配列によってＧ四重鎖構造が形成され、及び前記Ｇ四重鎖構造が検出可能な正のシグナルを生成する、請求項１～５８又は７８～８５のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８７】
前記検出可能なシグナルを（合成）標準シグナルと比較することを更に含む、請求項６７～７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８】
試料中の標的核酸の検出方法であって、
試料を請求項１～５８のいずれか一項に記載の核酸検出システムと接触させること；及び
前記接触させた試料をラテラルフローイムノクロマトグラフィーアッセイに適用することを含む方法。
【請求項８９】
前記核酸検出システムが、第１及び第２の分子を含むＲＮＡベースのマスキング構築物を含み、及び前記ラテラルフローイムノクロマトグラフィーアッセイが、前記第１及び第２の分子を、好ましくはラテラルフローストリップ上の個別の検出部位で検出することを含む、請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
前記第１の分子及び前記第２の分子が、前記第１又は第２の分子を認識し、結合した分子を検出する抗体への結合、好ましくはサンドイッチ抗体を伴う結合によって検出される、請求項８９に記載の方法。
【請求項９１】
前記ラテラルフローストリップが、前記第１の分子に対する上流の第１の抗体と、前記第２の分子に対する下流の第２の抗体とを含み、及び前記試料中に前記標的核酸が存在しない場合、切断されていないＲＮＡベースのマスキング構築物に前記第１の抗体が結合し、及び前記試料中に前記標的核酸が存在する場合、切断されたＲＮＡベースのマスキング構築物に前記第１の抗体及び前記第２の抗体の両方が結合する、請求項８９又は９０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
連邦政府支援研究に関する記載事項
本発明は、国立衛生研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ）によって付与された助成金第ＭＨ１００７０６号及び第ＭＨ１１００４９号、及び国防脅威削減局（Ｄｅｆｅｎｓｅ Ｔｈｒｅａｔ Ｒｅｄｕｃｔｉｏｎ Ａｇｅｎｃｙ）によって付与された助成金第ＨＤＴＲＡ１－１４－１－０００６号に基づく連邦政府の支援を受けて行われた。連邦政府は本発明に一定の権利を有する。
【０００２】
本明細書に開示される主題は、概して、ＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムの使用に関連する迅速診断法に関する。

【背景技術】
【０００３】
核酸は、生物学的情報の普遍的なシグネチャである。携帯型プラットフォームで核酸を高感度且つ一塩基特異性で迅速に検出可能であれば、多くの疾患の診断及びモニタリングに革命がもたらされ、有益な疫学的情報が提供され、及び一般化可能な科学的ツールとして役立つ可能性がある。核酸を検出する方法は数多く開発されているが（Ｄｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７；Ｇｒｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｋｕｍａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｐａｒｄｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｐａｒｄｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６；Ｕｒｄｅａ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）、それらは否応なく感度、特異性、単純さ、及び速さの間でトレードオフ状態に陥る。例えば、ｑＰＣＲ手法は高感度だが費用がかかり、且つ複雑な器具類に頼るため、使用できるのは実験室セッティングで高度な訓練を受けた操作者に限られる。他の手法は、例えば等温核酸増幅法を携帯型プラットフォームと組み合わせる新規方法など（Ｄｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７；Ｐａｒｄｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）、ポイント・オブ・ケア（ＰＯＣ）セッティングで高い検出特異性を提供するが、感度が低いため、利用は幾分限定的である。核酸診断法が種々の医療適用にとって意味を増しつつあることに伴い、低コストで高い特異性及び感度を提供する検出技術があれば、臨床及び基礎研究のいずれのセッティングにおいても極めて有用となり得る。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】
一態様において、本発明は、エフェクタータンパク質及び対応する標的分子に結合するように設計された１つ以上のガイドＲＮＡを含むＣＲＩＳＰＲシステムと；ＲＮＡベースのマスキング構築物と；任意選択で、試料中の標的ＲＮＡ分子を増幅する核酸増幅試薬とを含む核酸検出システムを提供する。別の態様において、実施形態は、エフェクタータンパク質及びトリガーＲＮＡと結合するように設計された１つ以上のガイドＲＮＡを含むＣＲＩＳＰＲシステムと、ＲＮＡベースのマスキング構築物と；マスキングされたＲＮＡポリメラーゼプロモーター結合部位又はマスキングされたプライマー結合部位を含む１つ以上の検出アプタマーとを含むポリペプチド検出システムを提供する。
【０００５】
更なる実施形態において、本システムは核酸増幅試薬を更に含み得る。核酸増幅試薬は、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含むプライマーを含み得る。特定の実施形態では、試料核酸を増幅することによりＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含むＤＮＡ鋳型が得られ、それにより標的ＲＮＡ分子が転写によって作成されてもよい。核酸はＤＮＡであってもよく、本明細書に記載される任意の方法によって増幅される。核酸はＲＮＡであってもよく、本明細書に記載されるとおりの逆転写方法によって増幅される。プライマー結合部位がアンマスキングされるとアプタマー配列が増幅されてもよく、それにより増幅ＤＮＡ産物からトリガーＲＮＡが転写される。標的分子は標的ＤＮＡであってもよく、及び本システムが、標的ＤＮＡと結合する、且つＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含むプライマーを更に含んでもよい。
【０００６】
一例示的実施形態において、ＣＲＩＳＰＲシステムエフェクタータンパク質はＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質である。例示的ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質としては、Ｃａｓ１３ｂ及びＣ２ｃ２（現在はＣａｓ１３ａとして知られる）が挙げられる。用語「Ｃ２ｃ２」は、本明細書では「Ｃａｓ１３ａ」と同義的に使用されることは理解されるであろう。別の例示的実施形態において、ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質はＣ２ｃ２である。他の実施形態において、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質は、レプトトリキア属（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ）、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、コリネバクター属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ）、ステレラ属（Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ）、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）、トレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）、フィリファクター属（Ｆｉｌｉｆａｃｔｏｒ）、ユーバクテリウム属（Ｅｕｂ

ａｃｔｅｒｉｕｍ）、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、バクテロイデス属（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）、フラビイボラ属（Ｆｌａｖｉｉｖｏｌａ）、フラボバクテリウム属（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、スフェロヘータ属（Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ）、アゾスピリラム属（Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）、グルコンアセトバクター属（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、ナイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）、ロゼブリア属（Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ）、パルビバクラム属（Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、ニトラチフラクター属（Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）、及びラクノスピラ属（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａ）からなる群から選択される属の生物由来であり、又はＣ２ｃ２エフェクタータンパク質は、レプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ）、レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ）、リステリア・ゼーリゲリ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｓｅｅｌｉｇｅｒｉ）、クロストリジウム・アミノフィルム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ａｍｉｎｏｐｈｉｌｕｍ）、カルノバクテリウム・ガリナルム（Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）、パルディバクター・プロピオニシゲネス（Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ ｐｒｏｐｉｏｎｉｃｉｇｅｎｅｓ）、リステリア・ウェイヘンステファネンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｗｅｉｈｅｎｓｔｅｐｈａｎｅｎｓｉｓ）からなる群から選択される生物であり、又はＣ２ｃ２エフェクタータンパク質はＬ．ウエイデイ（Ｌ．ｗａｄｅｉ）Ｆ０２７９又はＬ．ウエイデイ（Ｌ．ｗａｄｅｉ）Ｆ０２７９（Ｌｗ２）Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質である。別の実施形態において、１つ以上のガイドＲＮＡは、標的ＲＮＡ又はＤＮＡにおける一塩基変異多型、転写物のスプライス変異体、又はフレームシフト突然変異を検出するように設計される。

【０００７】

他の実施形態において、１つ以上のガイドＲＮＡは、疾患状態の診断指標となる１つ以上の標的分子に結合するように設計される。更に別の実施形態において、疾患状態は、感染症、臓器疾患、血液疾患、免疫系疾患、癌、脳及び神経系疾患、内分泌疾患、妊娠又は分娩関連疾患、遺伝性疾患、又は環境的に獲得された疾患である。更に別の実施形態において、疾患状態は癌又は自己免疫疾患又は感染症である。

【０００８】

更なる実施形態において、１つ以上のガイドＲＮＡは、癌特異的体細胞突然変異を含む１つ以上の標的分子に結合するように設計される。癌特異的突然変異は薬剤耐性を付与し得る。薬剤耐性突然変異は、イブルチニブ、エルロチニブ、イマチニブ、ゲフィチニブ、クリゾチニブ、トラスツズマブ、ベムラフェニブ、ＲＡＦ／ＭＥＫ、チェックポイント遮断療法、又は抗エストロゲン療法による治療によって誘発され得る。癌特異的突然変異は、プログラム死リガンド１（ＰＤ－Ｌ１）、アンドロゲン受容体（ＡＲ）、ブルトンチロシンキナーゼ（ＢＴＫ）、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、ＢＣＲ－Ａｂｌ、ｃ－ｋｉｔ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＨＥＲ２、ＥＭＬ４－ＡＬＫ、ＫＲＡＳ、ＡＬＫ、ＲＯＳ１、ＡＫＴ１、ＢＲＡＦ、ＭＥＫ１、ＭＥＫ２、ＮＲＡＳ、ＲＡＣ１、及びＥＳＲ１からなる群から選択されるタンパク質をコードする１つ以上の遺伝子に存在し得る。癌特異的突然変異は、ＣＡＳＰ８、Ｂ２Ｍ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＳＭＣ１Ａ、ＡＲＩＤ５Ｂ、ＴＥＴ２、ＡＬＰＫ２、ＣＯＬ５Ａ１、ＴＰ５３、ＤＮＥＲ、ＮＣＯＲ１、ＭＯＲＣ４、ＣＩＣ、ＩＲＦ６、ＭＹＯＣＤ、ＡＮＫＬＥ１、ＣＮＫＳＲ１、ＮＦ１、ＳＯＳ１、ＡＲＩＤ２、ＣＵＬ４Ｂ、ＤＤＸ３Ｘ、ＦＵＢＰ１、ＴＣＰ１１Ｌ２、ＨＬＡ－Ａ、Ｂ又はＣ、ＣＳＮＫ２Ａ１、ＭＥＴ、ＡＳＸＬ１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＩＤＯ１、ＩＤＯ２、ＡＬＯＸ１２Ｂ及びＡＬＯＸ１５Ｂからなる群から選択される遺伝子の突然変異、又は全染色体イベントを除く、以下の染色体バンド：６ｑ１６．１－ｑ２１、６ｑ２２．３１－ｑ２４．１、６ｑ２５．１－ｑ２６、７ｐ１１．２－ｑ１１．１、８ｐ２３．１、８ｐ１１．２３－ｐ１１．２１（ＩＤＯ１、ＩＤＯ２を含む）、９ｐ２４．２－ｐ２３（ＰＤＬ１、ＰＤＬ２を含

む）、１０ｐ１５．３、１０ｐ１５．１－ｐ１３、１１ｐ１４．１、１２ｐ１３．３２－ｐ１３．２、１７ｐ１３．１（ＡＬＯＸ１２Ｂ、ＡＬＯＸ１５Ｂを含む）、及び２２ｑ１１．１－ｑ１１．２１のいずれかに影響するコピー数の増加であってもよい。

【０００９】

更なる実施形態において、１つ以上のガイドＲＮＡは、ヘテロ接合性の消失（ＬＯＨ）マーカーを含む１つ以上の標的分子に結合するように設計されてもよい。

【００１０】

更なる実施形態において、１つ以上のガイドＲＮＡは、一塩基変異多型（ＳＮＰ）を含む１つ以上の標的分子に結合するように設計されてもよい。疾患は心疾患であってもよく、及び標的分子はＶＫＯＲＣ１、ＣＹＰ２Ｃ９、及びＣＹＰ２Ｃ１９であってもよい。

【００１１】

更なる実施形態において、疾患状態は妊娠若しくは分娩関連疾患又は遺伝性疾患であってもよい。試料は血液試料又は粘液試料であってもよい。疾患は、１３トリソミー、１６トリソミー、１８トリソミー、クラインフェルター症候群（４７，ＸＸＹ）、（４７，ＸＹＹ）及び（４７，ＸＸＸ）、ターナー症候群、ダウン症候群（２１トリソミー）、嚢胞性線維症、ハンチントン病、βサラセミア、筋強直性ジストロフィー、鎌状赤血球貧血、ポルフィリン症、脆弱Ｘ症候群、ロバートソン転座、アンジェルマン症候群、ディジョージ症候群及びウォルフ・ヒルシュホーン症候群からなる群から選択されてもよい。

【００１２】

更なる実施形態において、感染症は、ウイルス、細菌、又は真菌によって引き起こされ、又は感染症はウイルス感染症である。具体的な実施形態において、ウイルス感染症は、二本鎖ＲＮＡウイルス、プラス鎖ＲＮＡウイルス、マイナス鎖ＲＮＡウイルス、レトロウイルス、又はこれらの組み合わせによって引き起こされ、又はウイルス感染症は、コロナウイルス科（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、ピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、カリシウイルス科（Ｃａｌｉｃｉｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、フラビウイルス科（Ｆｌａｖｉｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、トガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、ボルナウイルス科（Ｂｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）、フィロウイルス科（Ｆｉｌｏｖｉｒｉｄａｅ）、パラミクソウイルス科（Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）、ニューモウイルス科（Ｐｎｅｕｍｏｖｉｒｉｄａｅ）、ラブドウイルス科（Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅ）、アレナウイルス科（Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ）、ブニヤウイルス科（Ｂｕｎｙａｖｉｒｉｄａｅ）、オルトミクソウイルス科（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）、又はデルタウイルス属（Ｄｅｌｔａｖｉｒｕｓ）によって引き起こされ、又はウイルス感染症は、コロナウイルス、ＳＡＲＳ、ポリオウイルス、ライノウイルス、Ａ型肝炎、ノーウォークウイルス、黄熱病ウイルス、ウエストナイルウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルス、風疹ウイルス、ロスリバーウイルス、シンドビスウイルス、チクングニアウイルス、ボルナ病ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ニパウイルス、ヘンドラウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス、狂犬病ウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、クリミア－コンゴ出血熱ウイルス、インフルエンザ、又はＤ型肝炎ウイルスによって引き起こされる。

【００１３】

本発明の他の実施形態において、ＲＮＡベースのマスキング構築物は検出可能な正のシグナルの生成を抑制し、又はＲＮＡベースのマスキング構築物は、検出可能な正のシグナルをマスキングすることによるか、又は代わりに検出可能な負のシグナルを生成することにより検出可能な正のシグナルの生成を抑制し、又はＲＮＡベースのマスキング構築物は、レポーティング構築物によってコードされる遺伝子産物であって、発現すると検出可能な正のシグナルを生成する遺伝子産物の生成を抑制するサイレンシングＲＮＡを含む。

【００１４】

更なる実施形態において、ＲＮＡベースのマスキング構築物は、負の検出可能シグナルを生成するリボザイムであり、ここではリボザイムが不活性化されると正の検出可能シグ

ナルが生成され、又はリボザイムは基質を第１の色に変え、ここで基質はリボザイムが不活性化されると第２の色に変わる。

【００１５】

他の実施形態において、ＲＮＡベースのマスキング剤はＲＮＡアプタマーであり、又はアプタマーは酵素を隔離し、ここで酵素はアプタマーから放出されると基質に作用することにより検出可能シグナルを生成し、又はアプタマーは、アプタマーから放出されると組み合わさって検出可能シグナルを生成する一対の薬剤を隔離する。

【００１６】

別の実施形態において、ＲＮＡベースのマスキング構築物は、検出可能リガンドとマスキング成分とが結合したＲＮＡオリゴヌクレオチドを含む。別の実施形態において、検出可能リガンドはフルオロフォアであり、マスキング成分は消光分子、又は限定はされないがＮＡＳＢＡ若しくはＲＰＡ試薬など、標的ＲＮＡ分子を増幅する試薬である。

【００１７】

別の態様において、本発明は、１つ以上の個別独立分離容積を含む診断装置を提供し、各個別独立分離容積は、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質と、対応する標的分子に結合するように設計された１つ以上のガイドＲＮＡと、ＲＮＡベースのマスキング構築物とを含み、任意選択で核酸増幅試薬を更に含む。

【００１８】

別の態様において、本発明は、１つ以上の個別独立分離容積を含む診断装置を提供し、各個別独立分離容積は、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質と、トリガーＲＮＡに結合するように設計された１つ以上のガイドＲＮＡと、マスキングされたＲＮＡポリメラーゼプロモーター結合部位又はマスキングされたプライマー結合部位を含む１つ以上の検出アプタマーとを含み、任意選択で核酸増幅試薬を更に含む。

【００１９】

一部の実施形態では、個別独立分離容積は液滴であるか、又は個別独立分離容積は固体基材上に画成されるか、又は個別独立分離容積はマイクロウェルであるか、又は個別独立分離容積は紙基材などの基材上に画成されたスポットである。

【００２０】

一実施形態において、ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質はＣ２ｃ２又はＣａｓ１３ｂなどのＣＲＩＳＰＲ　ＶＩ型ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質である。特定の例示的実施形態では、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質は、レプトトリキア属（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ）、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、コリネバクター属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ）、ステレラ属（Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ）、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）、トレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）、フィリファクター属（Ｆｉｌｉｆａｃｔｏｒ）、ユーバクテリウム属（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、バクテロイデス属（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）、フラビイボラ属（Ｆｌａｖｉｉｖｏｌａ）、フラボバクテリウム属（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、スフェロヘータ属（Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ）、アゾスピリラム属（Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）、グルコンアセトバクター属（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、ナイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）、ロゼブリア属（Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ）、パルビバクラム属（Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、ニトラチフラクター属（Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）及びカンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）からなる群から選択される生物由来であり、又はＣ２ｃ２エフェクタータンパク質は、レプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ）、Ｌ．ウエイデイ（Ｌ．ｗａｄｅｉ）、リステリア・ゼーリゲリ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｓｅｅｌｉｇｅｒｉ）、ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌、クロストリジウム・アミノフィルム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ａｍｉｎｏｐｈｉｌｕｍ）、カルノバクテリウム・ガリナルム（Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇａｌ

ｌｉｎａｒｕｍ）、パルディバクター・プロピオニシゲネス（Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ ｐｒｏｐｉｏｎｉｃｉｇｅｎｅｓ）、リステリア・ウェイヘンステファネンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｗｅｉｈｅｎｓｔｅｐｈａｎｅｎｓｉｓ）、リステリア科（Ｌｉｓｔｅｒｉａｃｅａｅ）細菌、及びロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）からなる群から選択され、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質はＬ．ウエイデイ（Ｌ．ｗａｄｅｉ）Ｆ０２７９又はＬ．ウエイデイ（Ｌ．ｗａｄｅｉ）Ｆ０２７９（Ｌｗ２）Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質である。別の実施形態において、１つ以上のガイドＲＮＡは、疾患状態の診断指標となる１つ以上の標的ＲＮＡ配列に結合するように設計される。

【００２１】

特定の例示的実施形態では、ＲＮＡベースのマスキング構築物は検出可能な正のシグナルの生成を抑制し、又はＲＮＡベースのマスキング構築物は、検出可能な正のシグナルをマスキングすることによるか、又は代わりに検出可能な負のシグナルを生成することにより検出可能な正のシグナルの生成を抑制し、又はＲＮＡベースのマスキング構築物は、レポーティング構築物によってコードされる遺伝子産物であって、発現すると検出可能な正のシグナルを生成する遺伝子産物の生成を抑制するサイレンシングＲＮＡを含む。

【００２２】

別の例示的実施形態では、ＲＮＡベースのマスキング構築物は、負の検出可能シグナルを生成するリボザイムであり、ここではリボザイムが不活性化されると正の検出可能シグナルが生成される。一例示的実施形態において、リボザイムは基質を第１の色に変え、ここで基質はリボザイムが不活性化されると第２の色に変わる。別の例示的実施形態では、ＲＮＡベースのマスキング剤は、酵素を隔離するアプタマーであり、ここで酵素はアプタマーから放出されると基質に作用することにより検出可能シグナルを生成し、又はアプタマーは、アプタマーから放出されると組み合わさって検出可能シグナルを生成する一対の薬剤を隔離する。

【００２３】

別の例示的実施形態では、ＲＮＡベースのマスキング構築物は、検出可能リガンドオリゴヌクレオチドとマスキング成分とが結合したＲＮＡオリゴヌクレオチドを含む。特定の例示的実施形態では、検出可能リガンドはフルオロフォアであり、マスキング成分は消光分子である。

【００２４】

別の態様において、本発明は、試料中の標的ＲＮＡの検出方法を提供し、この方法は、試料又は試料セットを１つ以上の個別独立分離容積に分配することであって、個別独立分離容積が、エフェクタータンパク質と、１つ以上のガイドＲＮＡと、ＲＮＡベースのマスキング構築物とを含むＣＲＩＳＰＲシステムを含むこと；１つ以上のガイドＲＮＡを１つ以上の標的分子に結合させるのに十分な条件下で試料又は試料セットをインキュベートすること；１つ以上のガイドＲＮＡによる１つ以上の標的分子への結合によってＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質を活性化させることであって、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質が活性化すると、ＲＮＡベースのマスキング構築物が改変されて検出可能な正のシグナルが生成されること；及び検出可能な正のシグナルを検出することであって、検出可能な正のシグナルの検出が、試料中における１つ以上の標的分子の存在を指し示すことを含む。

【００２５】

別の態様において、本発明は、試料中のペプチドの検出方法を提供し、この方法は、試料又は試料セットを個別独立分離容積セットに分配することであって、個別独立分離容積が、ペプチド検出アプタマーと、エフェクタータンパク質、１つ以上のガイドＲＮＡを含むＣＲＩＳＰＲシステムと、ＲＮＡベースのマスキング構築物とを含み、ペプチド検出アプタマーが、マスキングされたＲＮＡポリメラーゼ部位を含み、且つ１つ以上の標的分子と結合するように構成されること；ペプチド検出アプタマーを１つ以上の標的分子に結合させるのに十分な条件下で試料又は試料セットをインキュベートすることであって、アプ

タマーが対応する標的分子に結合するとＲＮＡポリメラーゼ結合部位が露出し、トリガーＲＮＡのＲＮＡ合成が起こること；１つ以上のガイドＲＮＡによるトリガーＲＮＡへの結合によってＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質を活性化させることであって、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質が活性化すると、ＲＮＡベースのマスキング構築物が改変されて検出可能な正のシグナルが生成されること；及び検出可能な正のシグナルを検出することであって、検出可能な正のシグナルの検出が、試料中における１つ以上の標的分子の存在を指し示すことを含む。

【００２６】

特定の例示的実施形態では、かかる方法は、試料ＲＮＡ又はトリガーＲＮＡを増幅することを更に含む。他の実施形態において、ＲＮＡを増幅することは、ＮＡＳＢＡ又はＲＰＡによる増幅を含む。

【００２７】

特定の例示的実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質はＣ２ｃ２又はＣａｓ１３ｂなどのＣＲＩＳＰＲ　ＶＩ型ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質である。他の例示的実施形態において、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質は、レプトトリキア属（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ）、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、コリネバクター属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ）、ステレラ属（Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ）、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）、トレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）、フィリファクター属（Ｆｉｌｉｆａｃｔｏｒ）、ユーバクテリウム属（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、バクテロイデス属（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）、フラビイボラ属（Ｆｌａｖｉｉｖｏｌａ）、フラボバクテリウム属（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、スフェロヘータ属（Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ）、アゾスピリラム属（Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）、グルコンアセトバクター属（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、ナイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）、ロゼブリア属（Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ）、パルビバクラム属（Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、ニトラチフラクター属（Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）及びカンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）からなる群から選択される生物由来であり、又はＣ２ｃ２エフェクタータンパク質は、レプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ）、Ｌ．ウエイデイ（Ｌ．ｗａｄｅｉ）、リステリア・ゼーリゲリ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｓｅｅｌｉｇｅｒｉ）、ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌、クロストリジウム・アミノフィルム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ａｍｉｎｏｐｈｉｌｕｍ）、カルノバクテリウム・ガリナルム（Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）、パルディバクター・プロピオニシゲネス（Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ ｐｒｏｐｉｏｎｉｃｉｇｅｎｅｓ）、リステリア・ウェイヘンステファネンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｗｅｉｈｅｎｓｔｅｐｈａｎｅｎｓｉｓ）、リステリア科（Ｌｉｓｔｅｒｉａｃｅａｅ）細菌、及びロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）からなる群から選択される。具体的な実施形態において、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質はＬ．ウエイデイ（Ｌ．ｗａｄｅｉ）Ｆ０２７９又はＬ．ウエイデイ（Ｌ．ｗａｄｅｉ）Ｆ０２７９（Ｌｗ２）Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質である。

【００２８】

特定の例示的実施形態では、１つ以上のガイドＲＮＡは、疾患状態の診断指標となる１つ以上の標的分子に結合するように設計される。特定の他の例示的実施形態において、疾患状態は、感染症、臓器疾患、血液疾患、免疫系疾患、癌、脳及び神経系疾患、内分泌疾患、妊娠又は分娩関連疾患、遺伝性疾患、又は環境的に獲得された疾患、癌、又は真菌感染症、細菌感染症、寄生虫感染症、又はウイルス感染症である。

【００２９】

特定の例示的実施形態では、ＲＮＡベースのマスキング構築物は検出可能な正のシグナルの生成を抑制し、又はＲＮＡベースのマスキング構築物は、検出可能な正のシグナルを

マスキングすることによるか、又は代わりに検出可能な負のシグナルを生成することにより検出可能な正のシグナルの生成を抑制し、又はＲＮＡベースのマスキング構築物は、レポーティング構築物によってコードされる遺伝子産物であって、発現すると検出可能な正のシグナルを生成する遺伝子産物の生成を抑制するサイレンシングＲＮＡを含み、又はＲＮＡベースのマスキング構築物は、負の検出可能シグナルを生成するリボザイムであり、ここではリボザイムが不活性化されると正の検出可能シグナルが生成される。他の例示的実施形態において、リボザイムは基質を第１の状態に変え、基質はリボザイムが不活性化されると第２の状態に変わり、又はＲＮＡベースのマスキング剤はアプタマーであり、又はアプタマーは酵素を隔離し、ここで酵素はアプタマーから放出されると基質に作用することにより検出可能シグナルを生成し、又はアプタマーは、アプタマーから放出されると組み合わさって検出可能シグナルを生成する一対の薬剤を隔離する。更に別の実施形態において、ＲＮＡベースのマスキング構築物は、ＲＮＡオリゴヌクレオチドの第１の端部に検出可能リガンドを有し且つＲＮＡオリゴヌクレオチドの第２の端部にマスキング成分を有するＲＮＡオリゴヌクレオチドを含み、又は検出可能リガンドがフルオロフォアであり、マスキング成分が消光分子である。

【００３０】

当業者には、以下に示される例示的実施形態の詳細な説明を考察することにより、例示的実施形態のこれら及び他の態様、目的、特徴、及び利点が明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００３１】

【図１】例示的Ｃ２ｃ２ベースのＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムの概略図である。

【００３２】

【図２】（Ａ）レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）のＣＲＩＳＰＲ／Ｃ２ｃ２遺伝子座の概略図を提供する。ＬｗＣ２ｃ２及びＬｓｈＣ２ｃ２システムからの代表的なｃｒＲＮＡ構造が示される（配列番号１４２及び１４３）。（Ｂ）Ｃ２ｃ２活性のインビボ細菌アッセイの概略図を提供する。アンピシリン耐性プラスミド中、β－ラクタマーゼ遺伝子の上流にプロトスペーサーをクローニングし、Ｃ２ｃ２を発現する大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）にターゲティング又はノンターゲティングスペーサーのいずれかと併せてこの構築物を形質転換する。成功した形質転換体をカウントして活性を定量化する。（Ｃ）ＬｗＣ２ｃ２及びＬｓｈＣ２ｃ２インビボ活性の定量化（ｎ＝２バイオロジカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）（Ｄ）ＬｗＣ２ｃ２の最終サイズ排除ゲルろ過。（Ｅ）ＬｗＣ２ｃ２段階的精製のクーマシーブルー染色アクリルアミドゲル。（Ｆ）種々のＰＦＳ標的に対するＬｗＣ２ｃ２の活性。スペーサーに様々な３’ＰＦＳが隣接する蛍光ＲＮＡに対してＬｗＣ２ｃ２を標的化し、反応産物を変性ゲル上に可視化した。ＬｗＣ２ｃ２はＧ　ＰＦＳに対してやや優先性を示す。

【００３３】

【図３】図３～６は、２プールのｃｒＲＮＡ、ｃｒＲＮＡなし条件、テクニカルデュプリケートで（９６＋４８）×２＝２８８反応において３時間にわたって５分間隔で測定した、４つの異なる量のタンパク質／ｃｒＲＮＡ（１：４、１：１６、１：３２、１：６４）の、１μｇ、１００ｎｇ、１０ｎｇ、及び１ｎｇの標的を使用した種々の希釈の例示的マスキング構築物の検出を示す。

【図４】図３～６は、２プールのｃｒＲＮＡ、ｃｒＲＮＡなし条件、テクニカルデュプリケートで（９６＋４８）×２＝２８８反応において３時間にわたって５分間隔で測定した、４つの異なる量のタンパク質／ｃｒＲＮＡ（１：４、１：１６、１：３２、１：６４）の、１μｇ、１００ｎｇ、１０ｎｇ、及び１ｎｇの標的を使用した種々の希釈の例示的マスキング構築物の検出を示す。

【図５】図３～６は、２プールのｃｒＲＮＡ、ｃｒＲＮＡなし条件、テクニカルデュプリケートで（９６＋４８）×２＝２８８反応において３時間にわたって５分間隔で測定した、４つの異なる量のタンパク質／ｃｒＲＮＡ（１：４、１：１６、１：３２、１：６４）の、１μｇ、１００ｎｇ、１０ｎｇ、及び１ｎｇの標的を使用した種々の希釈の例示的マ

スキング構築物の検出を示す。
【図６】図３～６は、２プールのｃｒＲＮＡ、ｃｒＲＮＡなし条件、テクニカルデュプリケートで（９６＋４８）×２＝２８８反応において３時間にわたって５分間隔で測定した、４つの異なる量のタンパク質／ｃｒＲＮＡ（１：４、１：１６、１：３２、１：６４）の、１μｇ、１００ｎｇ、１０ｎｇ、及び１ｎｇの標的を使用した種々の希釈の例示的マスキング構築物の検出を示す。
【００３４】
【図７】特定の例示的実施形態における、マスキング構築物及びＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質を使用した例示的検出スキームの概略図を提供する。
【００３５】
【図８】種々のガイドＲＮＡプールを使用して標的を検出したときの時間の経過に伴う蛍光の変化を示す一組のグラフを提供する。
【００３６】
【図９】様々なＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質濃度において種々の標的ＲＮＡ希釈で検出された正規化蛍光を示すグラフを提供する。
【００３７】
【図１０】ＮＡＳＢＡ増幅反応の一般的なステップを示す概略図である。
【００３８】
【図１１】３つの異なるプライマーセットでＮＡＳＢＡによって増幅し、次に消光された蛍光プローブを使用したＣ２ｃ２コラテラル検出に供した核酸標的ｓｓＲＮＡ　１の検出を示すグラフを提供する（ｎ＝２テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。
【００３９】
【図１２】レンチウイルス標的ＲＮＡの存在の検出にコラテラル効果を使用し得ることを示すグラフを提供する。
【００４０】
【図１３】コラテラル効果及びＮＡＳＢＡがａＭ濃度の種を検出できることを実証するグラフを提供する。
【００４１】
【図１４】コラテラル効果及びＮＡＳＢＡが低濃度試料を迅速に判別することを実証するグラフを提供する。
【００４２】
【図１５】特定の時点における正規化蛍光が試料入力濃度の予測となることを示す。増幅のないＣａｓ１３ａ検出からの蛍光測定値は入力ＲＮＡ濃度と相関する（ｎ＝２バイオロジカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。
【００４３】
【図１６】反応に関与する成分を示す、ＲＰＡ反応の概略図を提供する。
【００４４】
【図１７】ＳＨＥＲＬＯＣＫの概略図；対応するＲＰＡ又はＲＴ－ＲＰＡステップの取り込みを介したＤＮＡ又はＲＮＡの両方の標的の検出を示す概略図を提供する。標的ＲＮＡの認識を受け、コラテラル効果によってＣ２ｃ２による切断レポーターの切断が起こり、蛍光が生成される。単一分子量のＲＮＡ又はＤＮＡをリコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）によってＤＮＡに増幅し、転写してＲＮＡを作製することができ、次にはこれがＣ２ｃ２によって検出される。
【００４５】
【図１８】Ｃ２ｃ２コラテラル検出によって検出されるｓｓＲＮＡ標的の概略図を提供する（配列番号１４４及び１４５）。
【００４６】
【図１９】ＲＰＡを使用した（即ち１５分以内のＣ２ｃ２添加）単一分子ＤＮＡ検出を実証する一組のグラフを提供する。

【００４７】
【図２０】Ｔ７ポリメラーゼをＲＰＡ反応に混ぜるとＤＮＡ検出に実に悪影響が及ぶことを実証する一組のグラフを提供する。
【００４８】
【図２１】ポリメラーゼをＲＰＡ反応に混ぜてもＤＮＡ検出に悪影響が及ばないことを実証する一組のグラフを提供する。
【００４９】
【図２２】ＲＰＡ、Ｔ７転写、及びＣ２ｃ２検出反応は適合性があり、同時にインキュベートしたとき単一分子検出を実現することを実証するグラフを提供する（ｎ＝２テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。
【００５０】
【図２３】迅速ＲＰＡ－ＲＮＡ時間インキュベーションの有効性を実証する一組のグラフを提供する。
【００５１】
【図２４】Ｔ７ポリメラーゼ量が増加するとＲＰＡ－ＲＮＡの感度がブーストされることを実証する一組のグラフを提供する。
【００５２】
【図２５】１．５×酵素を含むワンポット反応を用いたＲＰＡ－ＤＮＡ検出アッセイの結果を示す一組のグラフを提供する。早くも３０分で単一分子（２ａＭ）検出が実現した。
【００５３】
【図２６】ＲＰＡ－ＤＮＡワンポット反応が入力濃度に対する蛍光の定量的な低下を実証することを実証する一組のグラフを提供する。フィッティングした曲線から、標的入力濃度と出力蛍光との間の関係が明らかになる。
【００５４】
【図２７】以下を実証する一組のグラフを提供する（Ａ）増幅のないＲＮＡのＣ２ｃ２検出は、５０ｆＭに至るまでの低い濃度のｓｓＲＮＡ標的を検出できること（ｎ＝２テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）、及び（Ｂ）ＲＰＡ－Ｃ２ｃ２反応は単一分子ＤＮＡ検出が可能であること（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。
【００５５】
【図２８】特定の例示的実施形態において生成されたＣ２ｃ２シグナルが紙基材上の２０ｐＭ標的を検出できることを実証する一組のグラフを提供する。
【００５６】
【図２９】特異的ＲＮＡｓｅ阻害薬が紙上のバックグラウンドシグナルを除去可能であることを示すグラフを提供する。
【００５７】
【図３０】ガラス繊維基材上での特定の例示的実施形態に係るシステムを使用した検出を示す一組のグラフである。
【００５８】
【図３１】以下を提供する一組のグラフを提供する（Ａ）特定の例示的実施形態に係るジカＲＮＡ検出の概略図。Ｃ２ｃ２コラテラル検出の標的となるジカＲＮＡ又は相同なデングＲＮＡ断片をレンチウイルスにパッケージングした。４８時間後に培地を回収し、熱溶解、ＲＴ－ＲＰＡ、及びＣ２ｃ２検出に供する。（Ｂ）ＲＴ－ＲＡＰ－Ｃ２ｃ２検出はジカレンチウイルス粒子の極めて高感度の検出が可能である（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）（Ｃ）特定の例示的実施形態に係る、紙上でのフリーズドライＣ２ｃ２を使用したジカＲＮＡ検出の概略図。（Ｄ）紙ベースのアッセイはジカレンチウイルス粒子の極めて高感度の検出が可能である（ｎ－４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；＊＊、ｐ＜０．０１、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【００５９】
【図３２】以下を実証する一組のグラフを提供する（Ａ）ヒト血清から単離されたジカＲＮＡのＣ２ｃ２検出の概略図。血清中のジカＲＮＡを逆転写、ＲＮＡのＲＮａｓｅ　Ｈ分解、ｃＤＮＡのＲＰＡ、及びＣ２ｃ２検出に供する。（Ｂ）Ｃ２ｃ２はヒトジカ血清試料の極めて高感度の検出が可能である。示されるジカＲＮＡの濃度はｑＰＣＲによって確認した（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。
【００６０】
【図３３】以下を実証する一組のグラフを提供する（Ａ）フリーズドライＣ２ｃ２は低いフェムトモル濃度範囲のｓｓＲＮＡ　１の高感度検出が可能である。Ｃ２ｃ２は液体形態の（Ｂ）又はフリーズドライした（Ｃ）紙上の２００ｐＭ　ｓｓＲＮＡ　１標的の迅速検出が可能である。この反応は、溶液中の（Ｄ）（ｎ＝３）及びフリーズドライ形態の（Ｅ）（ｎ＝３）合成ジカＲＮＡ断片の高感度検出が可能である。（Ｆ）入力濃度と検出された蛍光との間の有意な相関を示すヒトジカｃＤＮＡ検出の定量曲線。（Ｇ）様々な量のヒト血清の存在下で実施したｓｓＲＮＡ　１のＣ２ｃ２検出（ｎ＝２テクニカルレプリケート、特に注記されない限り；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。
【００６１】
【図３４】（Ａ）ユニバーサルＶ３　ＲＰＡプライマーセットを使用した細菌ゲノムからの１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子のＣ２ｃ２検出の概略図、及び（Ｂ）特定の例示的実施形態に従い行われるアッセイを用いて大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）又は緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ｇＤＮＡの高感度且つ特異的な検出を実現する能力を提供する（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。Ｅｃ、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）；Ｋｐ、肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）；Ｐａ、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）；Ｍｔ、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）；Ｓａ、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）。
【００６２】
【図３５】以下を実証する一組のグラフを提供する（Ａ）肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）の４つの異なる臨床分離株からの２つの異なるカルバペネム耐性遺伝子（ＫＰＣ及びＮＤＭ－１）の検出、及び（Ｂ）カルバペネム耐性遺伝子の検出（パートＡ）をＫＰＣ及びＮＤＭ－１　ｃｒＲＮＡアッセイ間のシグナル比として正規化する（ｎ＝２テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。
【００６３】
【図３６】以下を実証する一組のグラフを提供する（Ａ）Ｃ２ｃ２は単一ミスマッチに感受性がないが、追加的なミスマッチを有するｃｒＲＮＡをロードすると、標的の単一ヌクレオチドの違いを区別することができる。ｓｓＲＮＡ標的１～３を１１個のｃｒＲＮＡで検出し、１０個のスペーサーがｃｒＲＮＡの様々な位置に合成ミスマッチを含んだ。ミスマッチを有するスペーサーは標的１の切断低下を示さなかったが、ミスマッチ標的２及び３の切断阻害を示した（配列番号１４６～１５９）。（Ｂ）合成ミスマッチを含む一塩基特異的スペーサーの合理的設計過程を示す概略図。合成ミスマッチはＳＮＰ又は目的の塩基に近接して置かれる（配列番号１６０～１６４）。（Ｃ）株ＳＮＰの高度に特異的な検出により、トランケート型（２３ヌクレオチド）ｃｒＲＮＡでのＣ２ｃ２検出を使用して１ヌクレオチドのみ異なるジカアフリカＲＮＡ標的とアメリカＲＮＡ標的との区別が可能になる（ｎ＝２テクニカルレプリケート、片側スチューデントｔ検定；＊、ｐ＜０．０５；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。
【００６４】
【図３７】以下を実証する一組のグラフを提供する：（Ａ）検出に使用したジカ株標的領域及びｃｒＲＮＡ配列の概略図（配列番号１６５～１７０）。標的中のＳＮＰは赤色又は

青色で強調表示し、ガイド配列中の合成ミスマッチには赤色を付す。（Ｂ）株ＳＮＰの高度に特異的な検出により、ＳＨＥＲＬＯＣＫを用いたジカアフリカＲＮＡ標的とアメリカＲＮＡ標的との区別が可能になる（ｎ＝２テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）（配列番号１７１～１７６）。（Ｃ）検出に使用したデング株標的領域及びｃｒＲＮＡ配列の概略図。標的中のＳＮＰは赤色又は青色で強調表示し、ガイド配列中の合成ミスマッチには赤色を付す。（Ｄ）株ＳＮＰの高度に特異的な検出により、ＳＨＥＲＬＯＣＫを用いたデング株１ＲＮＡ標的と株３ＲＮＡ標的との区別が可能になる（ｎ＝２テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【００６５】

【図３８】以下を示す一組のグラフを提供する（Ａ）Ｃ２ｃ２で検出されたヒトＳＮＰの位置を示すｃｉｒｃｏｓプロット。（Ｂ）特定の例示的実施形態に従い実施したアッセイはヒトＳＮＰ間を区別することができる。ＳＨＥＲＬＯＣＫは、ヒトゲノムにおける４つの異なるＳＮＰ部位で４つの異なる個体を正しく遺伝子タイピングすることができる。各個体の遺伝子型及びアレルセンシングｃｒＲＮＡの同定を各プロットの下にアノテートする（ｎ＝４テクニカルレプリケート；両側スチューデントｔ検定；＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊、ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｃ）特定の例示的実施形態に係るｃｆＤＮＡの検出過程（癌突然変異の無細胞ＤＮＡ検出など）の概略図。（Ｄ）ＥＧＦＲ　Ｌ８５８Ｒ及びＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅを検出するための例示的ｃｒＲＮＡ配列（配列番号１７７～１８２）。無細胞ＤＮＡで癌突然変異に関してアッセイした２つのゲノム遺伝子座の配列。標的ゲノム配列を示し、ここでＳＮＰは青色で強調表示し、合成ミスマッチを含む突然変異体／野生型センシングｃｒＲＮＡ配列には赤色を付す。

【００６６】

【図３９】Ｃ２ｃ２がＥＧＦＲ　Ｌ８５８Ｒ（Ｃ）又はＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅ（Ｂ）マイナーアレルからのモック無細胞ＤＮＡ試料中の突然変異体マイナーアレルを検出できることを実証する一組のグラフを提供する。（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１、＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１；バーは±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）

【００６７】

【図４０】以下を実証する一組のグラフを提供する（Ａ）アッセイがｒｓ５０８２における遺伝子型間を区別できること（ｎ＝４テクニカルレプリケート；＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊、ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｂ）アッセイが遠心、変性、及び煮沸した唾液から直接、ｇＤＮＡのｒｓ６０１３３８における遺伝子型間を区別できること（ｎ＝３テクニカルレプリケート；＊、ｐ＜０．０５；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【００６８】

【図４１】以下を提供する（Ａ）ｓｓＤＮＡ　１と単一ミスマッチのみ異なる標的のバックグラウンドでｓｓＤＮＡ　１に対して実施した例示的実施形態の概略図。（Ｂ）アッセイは、ミスマッチバックグラウンド（ｓｓＤＮＡと単一ミスマッチのみ異なる標的）の存在下でｓｓＤＮＡ　１の単一ヌクレオチド特異性検出を実現する。様々な濃度の標的ＤＮＡと１ミスマッチを含むバックグラウンド過剰のＤＮＡを組み合わせ、アッセイによって検出した。

【００６９】

【図４２】異なる色素Ｃｙ５を含むマスキング構築物もまた有効な検出が可能であることを示すグラフである。

【００７０】

【図４３】金ナノ粒子比色法ベースのアッセイの概略図である。ＤＮＡリンカーとＲＮＡ架橋との組み合わせを用いてＡｕＮＰを凝集させる。ＲＮａｓｅ活性を加えると、ｓｓＲ

ＮＡ架橋が切断され、ＡｕＮＰが放出されるため、赤色の方へと特徴的な色のシフトが起こる。

【００７１】

【図４４】５２０ｎｍで分散ナノ粒子の色のシフトを検出する能力を示すグラフでる。ナノ粒子は図４３に示される例示的実施形態をベースとし、様々な濃度のＲＮａｓｅ　Ａの添加を用いて分散させた。

【００７２】

【図４５】ＲＮａｓｅ比色試験が定量的であることを示すグラフである。

【００７３】

【図４６】分散ナノ粒子の色のシフトが視覚的に検出可能であることを示すマイクロウェルプレートの写真である。

【００７４】

【図４７】比色シフトが紙基材上で見えることを実証する写真である。試験はガラス繊維９３４－ＡＨ上において３７℃で１０分間実施した。

【００７５】

【図４８】タンパク質又は小分子の検出用の特定の例示的実施形態に係るコンホメーションスイッチングアプタマーの概略図である。ＲＮＡターゲティングエフェクター（これはライゲートされていない入力産物を検出することができない）の完全な標的としてライゲート産物（Ｂ）を使用する（配列番号２０２及び４２４）。

【００７６】

【図４９】アプタマーベースのライゲーションがＲＰＡ検出可能な基質を作り出すことができることを示すゲルの画像である。アプタマーを様々なレベルのトロンビンとインキュベートし、次にプローブとライゲートした。このライゲート構築物を３分間のＲＰＡ反応の鋳型として使用した。５００ｎＭトロンビンはバックグラウンドと比べて有意に高いレベルの増幅標的を有する。

【００７７】

【図５０】選択のＣ２ｃ２オルソログのＨＥＰＮドメインのアミノ酸配列を示す（配列番号２０４～２３３）。

【００７８】

【図５１】ＲＰＡ増幅を伴うＲＮＡのＣａｓ１３ａ検出（ＳＨＥＲＬＯＣＫ）は、約２ａＭに至るまでの低い濃度のｓｓＲＮＡ標的を検出することができ、Ｃａｓ１３ａ単独よりも感度が高い（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【００７９】

【図５２】Ｃａｓ１３ａ検出を用いてウイルス性及び細菌性病原体を検知することができる。（Ａ）ヒト臨床試料から単離されたＺＩＫＶ　ＲＮＡのＳＨＥＲＬＯＣＫ検出の概略図。（Ｂ）ＳＨＥＲＬＯＣＫは、ＺＩＫＶ陽性血清（Ｓ）又は尿（Ｕ）試料の極めて高感度の検出が可能である。示されるＺＩＫＶ　ＲＮＡの近似濃度はｑＰＣＲによって決定した。（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す；ｎ．ｄ．、検出せず）。

【００８０】

【図５３】（図１１の）プライマーセット２でのＮＡＳＢＡ及びＳＨＥＲＬＯＣＫによるｓｓＲＮＡ　１の検出の比較（ｎ＝２テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）

【００８１】

【図５４－１】ＲＰＡによる核酸増幅及び単一反応ＳＨＥＲＬＯＣＫ。（Ａ）図１Ｃにおいて使用した希釈液のｓｓＲＮＡ　１のデジタルドロップレットＰＣＲ定量化。ｄｄＰＣＲ結果に基づく希釈液の調整後濃度を棒グラフの上に示す。（Ｂ）図１Ｄにおいて使用した希釈液のｓｓＤＮＡ　１のデジタルドロップレットＰＣＲ定量化。ｄｄＰＣＲ結果に基づく希釈液の調整後濃度を棒グラフの上に示す。（Ｃ）ＲＰＡ、Ｔ７転写、及びＣａｓ１３ａ検出反応は適合性があり、同時にインキュベートしたときＤＮＡ２の単一分子検出を

実現する（ｎ＝３テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；ｎ．ｓ．、有意差なし；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【図５４－２】ＲＰＡによる核酸増幅及び単一反応ＳＨＥＲＬＯＣＫ。（Ａ）図１Ｃにおいて使用した希釈液のｓｓＲＮＡ　１のデジタルドロップレットＰＣＲ定量化。ｄｄＰＣＲ結果に基づく希釈液の調整後濃度を棒グラフの上に示す。（Ｂ）図１Ｄにおいて使用した希釈液のｓｓＤＮＡ　１のデジタルドロップレットＰＣＲ定量化。ｄｄＰＣＲ結果に基づく希釈液の調整後濃度を棒グラフの上に示す。（Ｃ）ＲＰＡ、Ｔ７転写、及びＣａｓ１３ａ検出反応は適合性があり、同時にインキュベートしたときＤＮＡ２の単一分子検出を実現する（ｎ＝３テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；ｎ．ｓ．、有意差なし；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【００８２】

【図５５－１】ＳＨＥＲＬＯＣＫと他の高感度核酸検出ツールの比較。（Ａ）デジタルドロップレットＰＣＲによるｓｓＤＮＡ　１希釈系列の検出分析（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；ｎ．ｓ．、有意差なし；＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。コピー実測値／μＬが$10^{-1}$を下回る試料は図示せず）。（Ｂ）定量的ＰＣＲによるｓｓＤＮＡ１希釈系列の検出分析（ｎ＝１６テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；ｎ．ｓ．、有意差なし；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。相対シグナルが$10^{-10}$を下回る試料は図示せず）。（Ｃ）ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＩＩを用いたＲＰＡによるｓｓＤＮＡ１希釈系列の検出分析（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。相対シグナルが$10^{0}$を下回る試料は図示せず）。（Ｄ）ＳＨＥＲＬＯＣＫによるｓｓＤＮＡ１希釈系列の検出分析（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。相対シグナルが$10^{0}$を下回る試料は図示せず）。（Ｅ）４種類の検出方法についてのｓｓＤＮＡ　１希釈系列のパーセント変動係数。（Ｆ）４種類の検出方法についての６ｅ２、６ｅ１、６ｅ０、及び６ｅ－１　ｓｓＤＮＡ　１希釈のパーセント変動係数平均値（バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【図５５－２】ＳＨＥＲＬＯＣＫと他の高感度核酸検出ツールの比較。（Ａ）デジタルドロップレットＰＣＲによるｓｓＤＮＡ　１希釈系列の検出分析（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；ｎ．ｓ．、有意差なし；＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。コピー実測値／μＬが$10^{-1}$を下回る試料は図示せず）。（Ｂ）定量的ＰＣＲによるｓｓＤＮＡ１希釈系列の検出分析（ｎ＝１６テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；ｎ．ｓ．、有意差なし；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。相対シグナルが$10^{-10}$を下回る試料は図示せず）。（Ｃ）ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＩＩを用いたＲＰＡによるｓｓＤＮＡ１希釈系列の検出分析（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。相対シグナルが$10^{0}$を下回る試料は図示せず）。（Ｄ）ＳＨＥＲＬＯＣＫによるｓｓＤＮＡ１希釈系列の検出分析（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。相対シグナルが$10^{0}$を下回る試料は図示せず）。（Ｅ）４種類の検出方法についてのｓｓＤＮＡ　１希釈系列のパーセント変動係数。（Ｆ）４種類の検出方法についての６ｅ２、６ｅ１、６ｅ０、及び６ｅ－１　ｓｓＤＮＡ　１希釈のパーセント変動係数平均値（バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．

を表す）。
【図５５－３】ＳＨＥＲＬＯＣＫと他の高感度核酸検出ツールの比較。（Ａ）デジタルドロップレットＰＣＲによるｓｓＤＮＡ　１希釈系列の検出分析（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；ｎ．ｓ．、有意差なし；＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。コピー実測値／μＬが$10^{-1}$を下回る試料は図示せず）。（Ｂ）定量的ＰＣＲによるｓｓＤＮＡ１希釈系列の検出分析（ｎ＝１６テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；ｎ．ｓ．、有意差なし；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。相対シグナルが$10^{-10}$を下回る試料は図示せず）。（Ｃ）ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＩＩを用いたＲＰＡによるｓｓＤＮＡ１希釈系列の検出分析（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。相対シグナルが$10^{0}$を下回る試料は図示せず）。（Ｄ）ＳＨＥＲＬＯＣＫによるｓｓＤＮＡ１希釈系列の検出分析（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；赤色の線は平均値を表し、バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す。相対シグナルが$10^{0}$を下回る試料は図示せず）。（Ｅ）４種類の検出方法についてのｓｓＤＮＡ　１希釈系列のパーセント変動係数。（Ｆ）４種類の検出方法についての６ｅ２、６ｅ１、６ｅ０、及び６ｅ－１　ｓｓＤＮＡ　１希釈のパーセント変動係数平均値（バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。
【００８３】
【図５６】臨床細菌分離株におけるカルバペネム（ｃａｒｂａｐａｎｅｍ）耐性の検出。肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）の５つの臨床分離株及び大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）対照からの２つの異なるカルバペネム耐性遺伝子（ＫＰＣ及びＮＤＭ－１）の検出（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す；ｎ．ｄ．、検出せず）。
【００８４】
【図５７－１】トランケート型スペーサー及び標的配列中の単一ミスマッチに対するＬｗＣａｓ１３ａ感度の特徴付け。（Ａ）（Ｂ）～（Ｇ）で使用したトランケート型スペーサーｃｒＲＮＡの配列（配列番号４２５～４３６）。赤色で強調表示した一塩基対の違いを有するｓｓＲＮＡ　１及び２の配列もまた示す。合成ミスマッチを含むｃｒＲＮＡは、ミスマッチ位置に赤色を付して表示する。（Ｂ）位置１～７に合成ミスマッチを有する２８ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｃ）（Ｂ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｄ）位置１～７に合成ミスマッチを有する２３ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｅ）（Ｄ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｆ）位置１～７に合成ミスマッチを有する２０ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｇ）（Ｆ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。
【図５７－２】トランケート型スペーサー及び標的配列中の単一ミスマッチに対するＬｗＣａｓ１３ａ感度の特徴付け。（Ａ）（Ｂ）～（Ｇ）で使用したトランケート型スペーサ

ーｃｒＲＮＡの配列（配列番号４２５～４３６）。赤色で強調表示した一塩基対の違いを有するｓｓＲＮＡ　１及び２の配列もまた示す。合成ミスマッチを含むｃｒＲＮＡは、ミスマッチ位置に赤色を付して表示する。（Ｂ）位置１～７に合成ミスマッチを有する２８ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｃ）（Ｂ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｄ）位置１～７に合成ミスマッチを有する２３ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｅ）（Ｄ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｆ）位置１～７に合成ミスマッチを有する２０ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｇ）（Ｆ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【図５７－３】トランケート型スペーサー及び標的配列中の単一ミスマッチに対するＬｗＣａｓ１３ａ感度の特徴付け。（Ａ）（Ｂ）～（Ｇ）で使用したトランケート型スペーサーｃｒＲＮＡの配列（配列番号４２５～４３６）。赤色で強調表示した一塩基対の違いを有するｓｓＲＮＡ　１及び２の配列もまた示す。合成ミスマッチを含むｃｒＲＮＡは、ミスマッチ位置に赤色を付して表示する。（Ｂ）位置１～７に合成ミスマッチを有する２８ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｃ）（Ｂ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｄ）位置１～７に合成ミスマッチを有する２３ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｅ）（Ｄ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｆ）位置１～７に合成ミスマッチを有する２０ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｇ）（Ｆ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【図５７－４】トランケート型スペーサー及び標的配列中の単一ミスマッチに対するＬｗＣａｓ１３ａ感度の特徴付け。（Ａ）（Ｂ）～（Ｇ）で使用したトランケート型スペーサーｃｒＲＮＡの配列（配列番号４２５～４３６）。赤色で強調表示した一塩基対の違いを有するｓｓＲＮＡ　１及び２の配列もまた示す。合成ミスマッチを含むｃｒＲＮＡは、ミスマッチ位置に赤色を付して表示する。（Ｂ）位置１～７に合成ミスマッチを有する２８ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｃ）（Ｂ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｄ）

位置１～７に合成ミスマッチを有する２３ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｅ）（Ｄ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｆ）位置１～７に合成ミスマッチを有する２０ｎｔスペーサーｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｇ）（Ｆ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【００８５】

【図５８－１】標的配列中の突然変異に対する理想的合成ミスマッチ位置の同定。（Ａ）ｓｓＲＮＡ　１とｓｓＲＮＡとの間の突然変異を検出するのに理想的な合成ミスマッチ位置を評価するための配列（配列番号４３７～４６２）。標的の各々に対し、色を付した（赤色）位置に合成ミスマッチを含むｃｒＲＮＡを試験した。各一組の合成ミスマッチｃｒＲＮＡは、突然変異部位がスペーサーの配列に対して位置上シフトするように設計される。スペーサーは、スペーサー内の位置３、４、５、及び６で突然変異が評価されるように設計される。（Ｂ）様々な位置に合成ミスマッチを有するｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性。スペーサー：標的二重鎖領域内の位置３、４、５、又は６のいずれかに突然変異を有する４組のｃｒＲＮＡがある（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｃ）（Ｂ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【図５８－２】標的配列中の突然変異に対する理想的合成ミスマッチ位置の同定。（Ａ）ｓｓＲＮＡ　１とｓｓＲＮＡとの間の突然変異を検出するのに理想的な合成ミスマッチ位置を評価するための配列（配列番号４３７～４６２）。標的の各々に対し、色を付した（赤色）位置に合成ミスマッチを含むｃｒＲＮＡを試験した。各一組の合成ミスマッチｃｒＲＮＡは、突然変異部位がスペーサーの配列に対して位置上シフトするように設計される。スペーサーは、スペーサー内の位置３、４、５、及び６で突然変異が評価されるように設計される。（Ｂ）様々な位置に合成ミスマッチを有するｃｒＲＮＡのｓｓＲＮＡ　１及び２に対するコラテラル切断活性。スペーサー：標的二重鎖領域内の位置３、４、５、又は６のいずれかに突然変異を有する４組のｃｒＲＮＡがある（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｃ）（Ｂ）で試験したｃｒＲＮＡの特異性比。特異性比は、オフターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　２）コラテラル切断に対するオンターゲットＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ　１）コラテラル切断の比として計算する（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【００８６】

【図５９】追加的な遺伝子座におけるＳＨＥＲＬＯＣＫによる遺伝子タイピング及び煮沸した唾液からの直接の遺伝子タイピング。ＳＨＥＲＬＯＣＫは、遠心、変性、及び煮沸した唾液から直接、ゲノムＤＮＡのｒｓ６０１３３８　ＳＮＰ部位における遺伝子型間を区別することができる（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊＊、ｐ＜０．００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【００８７】

【図６０－１】ヒトＳＮＰを正確に遺伝子タイピングするための合成遺伝子タイピング標準の開発。（Ａ）ＰＣＲ増幅遺伝子型標準と比較した４人の個体の各々についてのｒｓ６０１３３８　ＳＮＰ部位におけるＳＨＥＲＬＯＣＫによる遺伝子タイピング（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｂ）ＰＣＲ増幅遺伝子型標準と比較した４人の個体の各々についてのｒｓ４３６３６５７　ＳＮＰ部位におけるＳ

ＨＥＲＬＯＣＫによる遺伝子タイピング（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｃ）ｒｓ６０１３３８　ＳＮＰ部位における各個体及び合成標準についてのＳＨＥＲＬＯＣＫ結果間の計算ｐ値のヒートマップ。アレルセンシングｃｒＲＮＡの各々についてヒートマップが示される。ヒートマップカラーマップは、有意差なし（ｐ＞０．０５）が赤色で、有意差あり（ｐ＜０．０５）が青色となるようにスケールをとっている（ｎ＝４テクニカルレプリケート、一元配置ＡＮＯＶＡ）。（Ｄ）ｒｓ４３６３６５７　ＳＮＰ部位における各個体及び合成標準についてのＳＨＥＲＬＯＣＫ結果間の計算ｐ値のヒートマップ。アレルセンシングｃｒＲＮＡの各々についてヒートマップが示される。ヒートマップカラーマップは、有意差なし（ｐ＞０．０５）が赤色で、有意差あり（ｐ＜０．０５）が青色となるようにスケールをとっている（ｎ＝４テクニカルレプリケート、一元配置ＡＮＯＶＡ）。（Ｅ）ＳＨＥＲＬＯＣＫ遺伝子タイピングのｐ値ヒートマップ結果を理解するためのガイド。遺伝子タイピングは、個体とアレル合成標準との間のｐ値＞０．０５に対応するアレルを選択することにより容易にコールすることができる。赤色のブロックは合成標準と個体のＳＨＥＲＬＯＣＫ結果との間の有意でない差、従って遺伝子型陽性結果に対応する。青色のブロックは合成標準と個体のＳＨＥＲＬＯＣＫ結果との間の有意な差、従って遺伝子型陰性結果に対応する。

【図６０－２】ヒトＳＮＰを正確に遺伝子タイピングするための合成遺伝子タイピング標準の開発。（Ａ）ＰＣＲ増幅遺伝子型標準と比較した４人の個体の各々についてのｒｓ６０１３３８　ＳＮＰ部位におけるＳＨＥＲＬＯＣＫによる遺伝子タイピング（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｂ）ＰＣＲ増幅遺伝子型標準と比較した４人の個体の各々についてのｒｓ４３６３６５７　ＳＮＰ部位におけるＳＨＥＲＬＯＣＫによる遺伝子タイピング（ｎ＝４テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。（Ｃ）ｒｓ６０１３３８　ＳＮＰ部位における各個体及び合成標準についてのＳＨＥＲＬＯＣＫ結果間の計算ｐ値のヒートマップ。アレルセンシングｃｒＲＮＡの各々についてヒートマップが示される。ヒートマップカラーマップは、有意差なし（ｐ＞０．０５）が赤色で、有意差あり（ｐ＜０．０５）が青色となるようにスケールをとっている（ｎ＝４テクニカルレプリケート、一元配置ＡＮＯＶＡ）。（Ｄ）ｒｓ４３６３６５７　ＳＮＰ部位における各個体及び合成標準についてのＳＨＥＲＬＯＣＫ結果間の計算ｐ値のヒートマップ。アレルセンシングｃｒＲＮＡの各々についてヒートマップが示される。ヒートマップカラーマップは、有意差なし（ｐ＞０．０５）が赤色で、有意差あり（ｐ＜０．０５）が青色となるようにスケールをとっている（ｎ＝４テクニカルレプリケート、一元配置ＡＮＯＶＡ）。（Ｅ）ＳＨＥＲＬＯＣＫ遺伝子タイピングのｐ値ヒートマップ結果を理解するためのガイド。遺伝子タイピングは、個体とアレル合成標準との間のｐ値＞０．０５に対応するアレルを選択することにより容易にコールすることができる。赤色のブロックは合成標準と個体のＳＨＥＲＬＯＣＫ結果との間の有意でない差、従って遺伝子型陽性結果に対応する。青色のブロックは合成標準と個体のＳＨＥＲＬＯＣＫ結果との間の有意な差、従って遺伝子型陰性結果に対応する。

【００８８】

【図６１】ミスマッチを有するバックグラウンド標的の僅かな一部としてのｓｓＤＮＡ１の検出。ヒトゲノムＤＮＡのバックグラウンドでのｓｓＤＮＡ　１希釈系列のＳＨＥＲＬＯＣＫ検出。検出されるｓｓＤＮＡ　１標的とバックグラウンドゲノムＤＮＡとの間に配列類似性があってはならないことに留意されたい（ｎ＝２テクニカルレプリケート；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【００８９】

【図６２】ジカウイルスを有する患者からの尿（Ａ）又は血清（Ｂ）試料を９５℃（尿）又は６５℃（血清）で５分間熱不活性化させた。１マイクロリットルの不活性化した尿又は血清を、例示的実施形態に係る２時間のＲＰＡ反応と、続く３時間のＣ２ｃ２／Ｃａｓ１３ａ検出反応の入力として使用した。エラーバーは検出反応についてのｎ＝４テクニカルレプリケートに基づく１ＳＤを示す。

【００９０】

【図６３】ジカウイルスを有する患者からの尿試料を９５℃で５分間熱不活性化した。１マイクロリットルの不活性化した尿を、例示的実施形態に係る３０分間のＲＰＡ反応と、続く３時間（Ａ）又は１時間（Ｂ）のＣ２ｃ２／Ｃａｓ１３検出反応の入力として使用した。エラーバーは検出反応についてのｎ＝４テクニカルレプリケートに基づく１ＳＤを示す。

【００９１】

【図６４】ジカウイルスを有する患者からの尿試料を９５℃で５分間熱不活性化した。１マイクロリットルの不活性化した尿を、２０分間のＲＰＡ反応と、続く１時間のＣ２ｃ２／Ｃａｓ１３ａ検出反応の入力として使用した。健常なヒトの尿を陰性対照として使用した。エラーバーは検出反応についてのｎ＝４テクニカルレプリケートに基づく１ＳＤを示す。

【００９２】

【図６５】ジカウイルスを有する患者からの尿試料を９５℃で５分間熱不活性化した。１マイクロリットルの不活性化した尿を、２０分間のＲＰＡ反応と、続く１時間のガイドＲＮＡの存在下又は非存在下におけるＣ２ｃ２／Ｃａｓ１３ａ検出反応の入力として使用した。データは、ガイドを含む検出反応からガイドなし検出反応の平均蛍光値を差し引くことにより正規化する。健常なヒトの尿を陰性対照として使用した。エラーバーは検出反応についてのｎ＝４テクニカルレプリケートに基づく１ＳＤを示す。

【００９３】

【図６６】例示的実施形態に係る、４つの異なるガイドＲＮＡ設計による２つのマラリア特異的標的の検出を示す（配列番号４６３～４７４）。

【００９４】

【図６７－１】種々のＣａｓ１３ｂオルソログの編集優先性を示すグラフを提供する。凡例については表３を参照のこと。

【図６７－２】種々のＣａｓ１３ｂオルソログの編集優先性を示すグラフを提供する。凡例については表３を参照のこと。

【００９５】

【図６８】Ａ）種々の編集優先性を有する種々のＣａｓ１３ｂオルソログを使用した多重アッセイの概略図、及びＢ）Ｃａｓ１３ｂ１０及びＣａｓ１３ｂ５を使用したかかるアッセイの実現可能性を実証するデータを提供する。

【００９６】

【図６９】Ｃａｓ１３ｂ５（プレボテラ属種（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｓｐ．）ＭＡ２１０６）及びＣａｓ１３ｂ９（プレボテラ・インターメディア（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａ））オルソログでのデュアル多重化を示すグラフを提供する。エフェクタータンパク質及びガイド配列の両方が同じ反応に含まれたことにより、異なる蛍光リードアウト（ポリＵ　５３０ｎｍ及びポリＡ　４８５ｎｍ）を使用した同じ反応におけるデュアル多重化が可能となった。

【００９７】

【図７０】図６９と同じものを提供するが、この場合、Ｃａｓ１３ａ（レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）ＬｗａＣａｓ１３ａ）オルソログ及びＣａｓ１３ｂオルソログ（プレボテラ属種（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｓｐ．）ＭＡ２０１６、Ｃａｓ１３ｂ５）を使用した。

【００９８】

【図７１】特定の例示的実施形態に係る、ターゲティングのロバスト性を決定するため標的配列に複数のガイド配列をタイリングする方法を提供する（配列番号４７５及び４７６）。

【００９９】

【図７２】Ｃａｓ１３エフェクタータンパク質を使用してイニシエーター、例えば本明細書に記載されるとおりのマスキング構築物に取り込まれたイニシエーターをアンロックすることにより、ハイブリダイゼーション連鎖反応を活性化させ得ることを示すハイブリッ

ド連鎖反応（ＨＣＲ）ゲルを提供する。
【０１００】
【図７３】複合ライセート中の緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）を検出する能力を示すデータを提供する。
【０１０１】
【図７４】特定の例示的実施形態に係る特定のＣａｓ１３オルソログのイオン優先性を示すデータを提供する。標的濃度はいずれも２０ｎＭ入力で、（１ｍＭ及び１０ｍＭ）のイオン濃度であった。
【０１０２】
【図７５】Ｃａｓ１３ｂ１２が切断に関して１ｍＭ硫酸亜鉛優先性を有することを示すデータを提供する。
【０１０３】
【図７６】緩衝液最適化がポリＡレポーターに関するＣａｓ１３ｂ５の信号対雑音をブーストし得ることを示すデータを提供する。古い緩衝液は、４０ｍＭトリス－ＨＣＬ、６０ｍＭ　ＮａＣｌ、６ｍＭ　ＭｇＣｌ２、ｐＨ７．３を含む。新しい緩衝液は、２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ６．８、６ｍＭ　ＭｇＣｌ２及び６０ｍＭ　ＮａＣｌを含む。
【０１０４】
【図７７】ＶＩ－Ａ／Ｃ型Ｃｒｉｓｐｒシステム及びＶＩ－Ｂ１及びＢ２型システムの概略図並びに代表的なＣａｓ１３ｂオルソログの系統樹を提供する。
【０１０５】
【図７８】様々なＣａｓ１３ｂオルソログの異なるヌクレオチドにおける及びＬｗＣａｓ１３ａと比べた相対切断活性を提供する。
【０１０６】
【図７９】様々な例示的Ｃａｓ１３オルソログの相対感度を示すグラフを提供する。
【０１０７】
【図８０】例示的実施形態を使用してゼプトモル濃度（ｚＭ）レベルの検出を実現する能力を示すグラフを提供する。
【０１０８】
【図８１】異なる編集優先性を有するＣａｓ１３オルソログ及びポリＮベースのマスキング構築物を使用した多重アッセイの概略図を提供する。
【０１０９】
【図８２－１】プライマー最適化実験及びある範囲の条件にわたるシュードモナスの検出の結果を示すデータを提供する。
【図８２－２】プライマー最適化実験及びある範囲の条件にわたるシュードモナスの検出の結果を示すデータを提供する。
【０１１０】
【図８３－１】ＲＮＡガイド下ＲＮＡターゲティング酵素のＣａｓ１３ｂファミリーの生化学的特徴付け並びに増加した感度及び定量的ＳＨＥＲＬＯＣＫを示す。Ａ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３遺伝子座及びｃｒＲＮＡ構造の概略図。Ｂ）Ａ、Ｃ、Ｇ、又はＵ塩基の六量体ホモポリマーからなるセンサープローブでｓｓＲＮＡ　１を標的とする１５個のＣａｓ１３ｂオルソログの塩基優先性のヒートマップ。Ｃ）切断モチーフ優先性発見スクリーニングの概略図並びにＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂの優先的２塩基モチーフ。ヒートマップに表される値は、あらゆる枯渇モチーフにわたる各２塩基のカウントである。モチーフは、$-\log_2$（標的あり／標的なし）値がＬｗａＣａｓ１３ａ条件で１．０又はＰｓｍＣａｓ１３ｂ条件で０．５を上回る場合に枯渇していると見なされる。$-\log_2$（標的あり／標的なし）値において、標的あり及び標的なしは、それぞれ標的あり条件及び標的なし条件でのモチーフの頻度を意味する。Ｄ）$U_6$又は$A_6$のいずれかのセンサープローブでｓｓＲＮＡ　１を標的とするＰｓｍＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａの直交性の塩基優先性。Ｅ）デングｓｓＲＮＡ標的を標的とするＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂによる単一分子ＳＨＥＲＬＯＣＫ検出。Ｆ）ｓｓＲＮＡ標的１を

標的とする感度増加のための大反応容積におけるＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂによる単一分子ＳＨＥＲＬＯＣＫ検出。Ｇ）様々なＲＰＡプライマー濃度における緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）合成ＤＮＡの定量化。Ｈ）緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）合成ＤＮＡ濃度と検出された蛍光との相関。

【図８３－２】ＲＮＡガイド下ＲＮＡターゲティング酵素のＣａｓ１３ｂファミリーの生化学的特徴付け並びに増加した感度及び定量的ＳＨＥＲＬＯＣＫを示す。Ａ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３遺伝子座及びｃｒＲＮＡ構造の概略図。Ｂ）Ａ、Ｃ、Ｇ、又はＵ塩基の六量体ホモポリマーからなるセンサープローブでｓｓＲＮＡ　１を標的とする１５個のＣａｓ１３ｂオルソログの塩基優先性のヒートマップ。Ｃ）切断モチーフ優先性発見スクリーニングの概略図並びにＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂの優先的２塩基モチーフ。ヒートマップに表される値は、あらゆる枯渇モチーフにわたる各２塩基のカウントである。モチーフは、$-\log_2$（標的あり／標的なし）値がＬｗａＣａｓ１３ａ条件で１．０又はＰｓｍＣａｓ１３ｂ条件で０．５を上回る場合に枯渇していると見なされる。$-\log_2$（標的あり／標的なし）値において、標的あり及び標的なしは、それぞれ標的あり条件及び標的なし条件でのモチーフの頻度を意味する。Ｄ）$U_6$又は$A_6$のいずれかのセンサープローブでｓｓＲＮＡ　１を標的とするＰｓｍＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａの直交性の塩基優先性。Ｅ）デングｓｓＲＮＡ標的を標的とするＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂによる単一分子ＳＨＥＲＬＯＣＫ検出。Ｆ）ｓｓＲＮＡ標的１を標的とする感度増加のための大反応容積におけるＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂによる単一分子ＳＨＥＲＬＯＣＫ検出。Ｇ）様々なＲＰＡプライマー濃度における緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）合成ＤＮＡの定量化。Ｈ）緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）合成ＤＮＡ濃度と検出された蛍光との相関。

【０１１１】

【図８４】直交性Ｃａｓ１３酵素による試料内多重化ＳＨＥＲＬＯＣＫを示す。Ａ）直交性Ｃａｓ１３酵素を使用した試料内多重化の概略図。Ｂ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂコラテラル活性による２０ｎＭジカ及びデング合成ＲＮＡの試料内多重化検出。Ｃ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂによる漸減濃度の黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）サーモヌクレアーゼ及び緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）アシルトランスフェラーゼ合成標的の試料内多重化ＲＰＡ及びコラテラル検出。Ｄ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＣｃａＣａｓ１３ｂによるｒｓ６０１３３８におけるヒト試料での多重化遺伝子タイピング。Ｅ）疾患アレル検出、ＲＥＰＡＩＲによる修正、及びＲＥＰＡＩＲ修正の評価についてのセラノスティックタイムラインの概略図。Ｆ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂによる健常及び疾患模擬試料からのＡＰＣアレルの試料内多重化検出。Ｇ）標的化したＡＰＣ突然変異におけるＲＥＰＡＩＲ編集効率の定量化。Ｈ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂによるＲＥＰＡＩＲターゲティング及びノンターゲティング試料からのＡＰＣアレルの試料内多重化検出。

【０１１２】

【図８５】精製して、且つインビトロコラテラル活性に関して評価した１５個のＣａｓ１３ｂオルソログのツリーを提供する。Ｃａｓ１３ｂ遺伝子（青色）、Ｃｓｘ２７／Ｃｓｘ２８遺伝子（赤色／黄色）、及びＣＲＩＳＰＲアレイ（灰色）を示す。

【０１１３】

【図８６】Ｃａｓ１３オルソログのタンパク質精製を示す。Ａ）本研究に使用したＣａｓ１３ｂ、ＬｗＣａｓ１３ａ及びＬｂａＣａｓ１３ａのサイズ排除クロマトグラフィーのクロマトグラム。溶出容積（ｍｌ）に対するＵＶ吸光度測定値（ｍＡＵ）を示す。Ｂ）精製Ｃａｓ１３ｂオルソログのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。１４個のＣａｓ１３ｂオルソログを左から右にロードする。タンパク質ラダーは左に示される。Ｃ）ＬｂａＣａｓ１３ａ希釈液（右）及びＢＳＡ標準タイトレーション（左）の最終的なＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。ＢＳＡの５つ及びＬｂａＣａｓ１３の２つの希釈液を示す。

【０１１４】

【図８７】Ｃａｓ１３ｂオルソログコラテラル切断の塩基優先性を示すグラフを示す。Ａ

）ホモポリマーアデニンセンサー６ヌクレオチド長を使用してｓｓＲＮＡ　１を標的とする１４個のＣａｓ１３ｂオルソログの切断活性。Ｂ）ホモポリマーウリジンセンサー６ヌクレオチド長を使用してｓｓＲＮＡ　１を標的とする１４個のＣａｓ１３ｂオルソログの切断活性。Ｃ）ホモポリマーグアニンセンサー６ヌクレオチド長を使用してｓｓＲＮＡ　１を標的とする１４個のＣａｓ１３ｂオルソログの切断活性。Ｄ）ホモポリマーシチジンセンサー６ヌクレオチド長を使用してｓｓＲＮＡ　１を標的とする１４個のＣａｓ１３ｂオルソログの切断活性。

【０１１５】

【図８８】Ｃａｓ１３コラテラル切断後のランダムモチーフライブラリのサイズ分析を示す。ＬｗａＣａｓ１３ａ処理、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ処理、ＣｃａＣａｓ１３ｂ処理、及びＲＮａｓｅ　Ａ処理したライブラリ試料のバイオアナライザートレース、ＲＮａｓｅ活性後のライブラリサイズの変化が示される。Ｃａｓ１３オルソログはデングｓｓＲＮＡを標的とし、コラテラル切断に起因してランダムモチーフライブラリを切断する。マーカー標準は最初のレーンに示す。

【０１１６】

【図８９】ＲＮａｓｅによる切断後の様々なモチーフの表現を示す。Ａ）５分及び６０分の時点におけるＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ、ＣｃａＣａｓ１３ｂ、及びＲＮａｓｅ　Ａの標的あり対標的なし比のモチーフ分布を示す箱ひげ図。ＲＮａｓｅ　Ａ比を３つのＣａｓ１３標的なし条件の平均と比較した。比はまた、２つの切断反応レプリケートの平均でもある。Ｂ）６０分の時点におけるＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ、ＣｃａＣａｓ１３ｂ、及びＲＮａｓｅ　Ａのエンリッチされたモチーフの数。エンリッチモチーフは、１（ＬｗａＣａｓ１３ａ、ＣｃａＣａｓ１３ｂ、及びＲＮａｓｅ　Ａ）又は０．５（ＰｓｍＣａｓ１３ｂ）のいずれかの－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）閾値を上回るモチーフとして計算した。１の閾値は少なくとも５０％の枯渇に対応し、一方、０．５の閾値は少なくとも３０％の枯渇に対応する。Ｃ）ＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ、及びＣｃａＣａｓ１３ｂのエンリッチされたモチーフから生成された配列ロゴ。ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＣｃａＣａｓ１３ｂは、予想し得るとおり強力なＵ優先性を示し、一方、ＰｓｍＣａｓ１３ｂは全モチーフにわたってＡ塩基にユニークな優先性を示し、これはホモポリマーコラテラル活性優先性と一致する。Ｄ）ＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ、及びＣｃａＣａｓ１３ｂの直交性のモチーフ優先性を示すヒートマップ。ヒートマップに表される値は、示される各モチーフの－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値である。－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値において、標的あり及び標的なしは、それぞれ標的あり条件及び標的なし条件でのモチーフの頻度を意味する。

【０１１７】

【図９０】ランダムモチーフライブラリスクリーニングによって決定されるＲＮａｓｅの一塩基及び二塩基優先性を示す。Ａ）ランダムモチーフライブラリ切断スクリーニングによって決定されるとおりの６０分の時点におけるＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ、ＣｃａＣａｓ１３ｂ、及びＲＮａｓｅ　Ａの一塩基優先性を示すヒートマップ。ヒートマップに表される値は、全ての枯渇モチーフにわたる各塩基のカウントである。モチーフは、－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値がＬｗａＣａｓ１３ａ、ＣｃａＣａｓ１３ｂ、及びＲＮａｓｅ　Ａ条件で１．０又はＰｓｍＣａｓ１３ｂ条件で０．５を上回る場合に枯渇していると見なされる。－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値において、標的あり及び標的なしは、それぞれ標的あり条件及び標的なし条件でのモチーフの頻度を意味する。Ｂ）ランダムモチーフライブラリ切断スクリーニングによって決定されるとおりのＣｃａＣａｓ１３ｂの２塩基優先性を示すヒートマップ。ヒートマップに表される値は、全ての枯渇モチーフにわたる各２塩基のカウントである。モチーフは、－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値がＬｗａＣａｓ１３ａ、ＣｃａＣａｓ１３ｂ、及びＲＮａｓｅ　Ａ条件で１．０又はＰｓｍＣａｓ１３ｂ条件で０．５を上回る場合に枯渇していると見なされる。－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値において、標的あり及び標的なしは、それぞれ標的あり条件及び標的なし条件でのモチーフの頻度を意味する。Ｃ）ランダムモチーフライブラ

リ切断スクリーニングによって決定されるとおりのＲＮａｓｅ　Ａの２塩基優先性を示すヒートマップ。ヒートマップに表される値は、全ての枯渇モチーフにわたる各２塩基のカウントである。モチーフは、－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値がＬｗａＣａｓ１３ａ、ＣｃａＣａｓ１３ｂ、及びＲＮａｓｅ　Ａ条件で１．０又はＰｓｍＣａｓ１３ｂ条件で０．５を上回る場合に枯渇していると見なされる。－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値において、標的あり及び標的なしは、それぞれ標的あり条件及び標的なし条件でのモチーフの頻度を意味する。

【０１１８】

【図９１】ランダムモチーフライブラリスクリーニングによって決定されるＲＮａｓｅの３塩基優先性を示す。ヒートマップは、ランダムモチーフライブラリ切断スクリーニングによって決定されるとおりの６０分の時点におけるＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ、ＣｃａＣａｓ１３ｂ、及びＲＮａｓｅ　Ａの３塩基優先性を示す。ヒートマップに表される値は、全ての枯渇モチーフにわたる各３塩基のカウントである。モチーフは、－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値がＬｗａＣａｓ１３ａ、ＣｃａＣａｓ１３ｂ、及びＲＮａｓｅ　Ａ条件で１．０又はＰｓｍＣａｓ１３ｂ条件で０．５を上回る場合に枯渇していると見なされる。－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値において、標的あり及び標的なしは、それぞれ標的あり条件及び標的なし条件でのモチーフの頻度を意味する。

【０１１９】

【図９２】ランダムモチーフライブラリスクリーニングによって決定されるＲＮａｓｅの４塩基優先性を示す。ヒートマップは、ランダムモチーフライブラリ切断スクリーニングによって決定されるとおりの６０分の時点におけるＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ、ＣｃａＣａｓ１３ｂ、及びＲＮａｓｅ　Ａの４塩基優先性を示す。ヒートマップに表される値は、全ての枯渇モチーフにわたる各４塩基のカウントである。モチーフは、－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値がＬｗａＣａｓ１３ａ、ＣｃａＣａｓ１３ｂ、及びＲＮａｓｅ　Ａ条件で１．０又はＰｓｍＣａｓ１３ｂ条件で０．５を上回る場合に枯渇していると見なされる。－ｌｏｇ$_2$（標的あり／標的なし）値において、標的あり及び標的なしは、それぞれ標的あり条件及び標的なし条件でのモチーフの頻度を意味する。

【０１２０】

【図９３】ポリＸ基質のインビトロ切断によるＣａｓ１３オルソログの塩基切断優先性の試験結果を示す。Ａ）ｃｒＲＮＡと共に及び無しでインキュベートしたＬｗａＣａｓ１３ａによるポリＵ、Ｃ、Ｇ、及びＡ標的のインビトロ切断。Ｂ）ｃｒＲＮＡと共に及び無しでインキュベートしたＣｃａＣａｓ１３ｂによるポリＵ、Ｃ、Ｇ、及びＡ標的のインビトロ切断。Ｃ）ｃｒＲＮＡと共に及び無しでインキュベートしたＰｓｍＣａｓ１３ｂによるポリＵ、Ｃ、Ｇ、及びＡ標的のインビトロ切断。

【０１２１】

【図９４】ＰｓｍＣａｓ１３ｂ切断活性の緩衝液最適化の結果を示す。Ａ）種々の緩衝液について、ｓｓＲＮＡ　１のターゲティング後のＰｓｍＣａｓ１３ｂコラテラル活性に及ぼすその効果を試験する。Ｂ）最適化した緩衝液を種々のＰｓｍＣａｓ１３ｂ－ｃｒＲＮＡ複合体濃度で元の緩衝液と比較する。

【０１２２】

【図９５】コラテラル切断に関するＣａｓ１３オルソログのイオン優先性を示す。Ａ）二価カチオンＣａ、Ｃｏ、Ｃｕ、Ｍｇ、Ｍｎ、Ｎｉ、及びＺｎに対する蛍光ポリＵセンサーを伴うＰｓｍＣａｓ１３ｂの切断活性。合成デングｓｓＲＮＡを標的とするｃｒＲＮＡと共にＰｓｍＣａｓ１３ｂをインキュベートする。Ｂ）二価カチオンＣａ、Ｃｏ、Ｃｕ、Ｍｇ、Ｍｎ、Ｎｉ、及びＺｎに対する蛍光ポリＡセンサーを伴うＰｓｍＣａｓ１３ｂの切断活性。合成デングｓｓＲＮＡを標的とするｃｒＲＮＡと共にＰｓｍＣａｓ１３ｂをインキュベートする。Ｃ）二価カチオンＣａ、Ｃｏ、Ｃｕ、Ｍｇ、Ｍｎ、Ｎｉ、及びＺｎに対する蛍光ポリＵセンサーを伴うＰｉｎ２Ｃａｓ１３ｂの切断活性。合成デングｓｓＲＮＡを標的とするｃｒＲＮＡと共にＰｉｎ２Ｃａｓ１３ｂをインキュベートする。Ｄ）二価カチオンＣａ、Ｃｏ、Ｃｕ、Ｍｇ、Ｍｎ、Ｎｉ、及びＺｎに対する蛍光ポリＡセンサーを伴う

Ｐｉｎ２Ｃａｓ１３ｂの切断活性。合成デングｓｓＲＮＡを標的とするｃｒＲＮＡと共にＰｉｎ２Ｃａｓ１３ｂをインキュベートする。Ｅ）二価カチオンＣａ、Ｃｏ、Ｃｕ、Ｍｇ、Ｍｎ、Ｎｉ、及びＺｎに対する蛍光ポリＵセンサーを伴うＣｃａＣａｓ１３ｂの切断活性。合成デングｓｓＲＮＡを標的とするｃｒＲＮＡと共にＣｃａＣａｓ１３ｂをインキュベートする。Ｆ）二価カチオンＣａ、Ｃｏ、Ｃｕ、Ｍｇ、Ｍｎ、Ｎｉ、及びＺｎに対する蛍光ポリＡセンサーを伴うＣｃａＣａｓ１３ｂの切断活性。合成デングｓｓＲＮＡを標的とするｃｒＲＮＡと共にＣｃａＣａｓ１３ｂをインキュベートする。

【０１２３】

【図９６】アデニン切断優先性を有するＣａｓ１３オルソログの切断活性の比較を示す。Ａ）種々の濃度の合成ジカ標的を標的とするそれぞれのｃｒＲＮＡと共にインキュベートしたＰｓｍＣａｓ１３ｂ及びＬｂａＣａｓ１３ａの切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；ｎ．ｓ．、有意差なし；＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊、ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。Ｂ）種々の濃度の合成デング標的を標的とするそれぞれのｃｒＲＮＡと共にインキュベートしたＰｓｍＣａｓ１３ｂ及びＬｂａＣａｓ１３ａの切断活性（ｎ＝４テクニカルレプリケート、両側スチューデントｔ検定；ｎ．ｓ．、有意差なし；＊、ｐ＜０．０５；＊＊、ｐ＜０．０１；＊＊＊、ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１；バーは平均値±ｓ．ｅ．ｍ．を表す）。

【０１２４】

【図９７】ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂを用いたＳＨＥＲＬＯＣＫによるジカｓｓＲＮＡ標的４のアトモル濃度検出を示す。Ａ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びポリＵセンサーによる種々の濃度のジカｓｓＲＮＡのＳＨＥＲＬＯＣＫ検出。Ｂ）ＰｓｍＣａｓ１３ｂ及びポリＡセンサーによる種々の濃度のジカｓｓＲＮＡのＳＨＥＲＬＯＣＫ検出。

【０１２５】

【図９８】ＣｃａＣａｓ１３ｂの種々の濃度におけるＳＨＥＲＬＯＣＫによるデングｓｓＲＮＡのアトモル濃度検出を示す。

【０１２６】

【図９９】ｃｒＲＮＡをタイリングするｓｓＲＮＡ　１によるＣａｓ１３オルソログ再プログラム化可能性を試験する。Ａ）ｓｓＲＮＡ１にわたってタイリングされたｃｒＲＮＡを伴うＬｗａＣａｓ１３ａ及びＣｃａＣａｓ１３ｂの切断活性。Ｂ）ｓｓＲＮＡ１にわたってタイリングされたｃｒＲＮＡをを伴うＰｓｍＣａｓ１３ｂの切断活性。

【０１２７】

【図１００】ｃｒＲＮＡスペーサー長さがＣａｓ１３オルソログ切断に及ぼす効果を示す。Ａ）様々なスペーサー長さのｓｓＲＮＡ１ターゲティングｃｒＲＮＡを伴うＰｓｍＣａｓ１３ｂの切断活性。Ｂ）様々なスペーサー長さのｓｓＲＮＡ１ターゲティングｃｒＲＮＡを伴うＣｃａＣａｓ１３ｂの切断活性。

【０１２８】

【図１０１】定量的ＳＨＥＲＬＯＣＫに向けたプライマー濃度の最適化を示す。Ａ）種々の濃度のジカＲＮＡ標的及び４８０ｎＭのＲＰＡプライマー濃度の相補的ｃｒＲＮＡと共にインキュベートしたＬｗａＣａｓ１３ａのＳＨＥＲＬＯＣＫ動態曲線。Ｂ）種々の濃度のジカＲＮＡ標的及び２４０ｎＭのＲＰＡプライマー濃度の相補的ｃｒＲＮＡと共にインキュベートしたＬｗａＣａｓ１３ａのＳＨＥＲＬＯＣＫ動態曲線。Ｃ）種々の濃度のジカＲＮＡ標的及び１２０ｎＭのＲＰＡプライマー濃度の相補的ｃｒＲＮＡと共にインキュベートしたＬｗａＣａｓ１３ａのＳＨＥＲＬＯＣＫ動態曲線。Ｄ）種々の濃度のジカＲＮＡ標的及び２４ｎＭのＲＰＡプライマー濃度の相補的ｃｒＲＮＡと共にインキュベートしたＬｗａＣａｓ１３ａのＳＨＥＲＬＯＣＫ動態曲線。Ｅ）４つの異なるＲＰＡプライマー濃度：４８０ｎＭ、２４０ｎＭ、１２０ｎＭ、６０ｎＭ、及び２４ｎＭでの種々の濃度のジカＲＮＡのＳＨＥＲＬＯＣＫ検出。Ｆ）種々のＲＰＡプライマー濃度でのバックグラウンド差し引き後のＳＨＥＲＬＯＣＫ蛍光とジカ標的ＲＮＡ濃度との間の平均$R^2$相関。Ｇ）１０倍希釈系列（黒色の点）及び２倍希釈系列（赤色の点）における種々の濃度のジカＲ

ＮＡ標的の定量的ＳＨＥＲＬＯＣＫ検出。１２０ｎＭのＲＰＡプライマー濃度を使用した。
【０１２９】
【図１０２】ジカ及びデング標的の多重化検出を示す。Ａ）ジカｓｓＲＮＡ標的を標的とするＬｗａＣａｓ１３ａ及びデングｓｓＲＮＡ標的を標的とするＰｓｍＣａｓ１３ｂを使用した多重化二色検出。両方の標的とも２０ｎＭ入力である。示される全てのデータが反応の１８０分時点を表す。Ｂ）ジカｓｓＲＮＡ標的を標的とするＬｗａＣａｓ１３ａ及びデングｓｓＲＮＡ標的を標的とするＰｓｍＣａｓ１３ｂを使用した多重化二色検出。両方の標的とも２００ｐＭ入力である。Ｃ）ＣｃａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂコラテラル活性による２０ｐＭジカ及びデング合成ＲＮＡの試料内多重化検出。
【０１３０】
【図１０３】ジカ及びデングｓｓＲＮＡの試料内多重化ＲＮＡ検出を示す。ＰｓｍＣａｓ１３ｂ及びＣｃａＣａｓ１３ｂによる漸減濃度のジカ及びデング合成標的での試料内多重化ＲＰＡ及びコラテラル検出。
【０１３１】
【図１０４】突然変異及びＲＥＰＡＩＲ編集の非多重化セラノスティック検出を示す。Ａ）ＬｗａＣａｓ１３ａによる健常模擬及び疾患模擬試料からのＡＰＣアレルの検出。Ｂ）ＲＥＰＡＩＲターゲティング及びノンターゲティング試料からのＡＰＣアレルにおける編集修正のＬｗａＣａｓ１３ａによる検出。
【０１３２】
【図１０５】金ナノ粒子凝集によるＲＮａｓｅ活性の比色検出を示す。Ａ）ＲＮａｓｅ活性に関する金ナノ粒子ベースの比色リードアウトの概略図。ＲＮａｓｅ活性の非存在下では、ＲＮＡリンカーが金ナノ粒子を凝集させるため、赤色の消失につながる。ＲＮＡリンカーが切断されるとナノ粒子が放出され、赤色の変色が起こる。Ｂ）様々なＲＮａｓｅ　Ａ単位における１２０分のＲＮａｓｅ消化後の比色レポーターの画像。Ｃ）様々なＲＮａｓｅ　Ａ単位濃度における消化に伴うＡｕＮＰ比色レポーターの５２０ｎｍ吸光度における動態。Ｄ）様々なＲＮａｓｅ　Ａ単位濃度における１２０分の消化後のＡｕＮＰ比色レポーターの５２０ｎｍ吸光度。Ｅ）様々なＲＮａｓｅ　Ａ単位濃度における消化に伴うＡｕＮＰ比色レポーターの$A_{520}$最大値が半減するまでの時間。
【０１３３】
【図１０６】ダイズゲノムＤＮＡからのＣＰ４－ＥＰＳＰＳ遺伝子の定量的検出を示す。Ａ）種々の検出時点におけるバックグラウンド差し引き後のＳＨＥＲＬＯＣＫ蛍光とＣＰ４－ＥＰＳＰＳマメパーセンテージとの平均相関$R^2$。マメパーセンテージは、ラウンドアップレディマメと野生型マメとの混合物中におけるラウンドアップレディマメの量を表す。ＣＰ４－ＥＰＳＰＳ遺伝子はラウンドアップレディマメにのみ存在する。Ｂ）３０分のインキュベーション時点におけるＳＨＥＲＬＯＣＫ検出の定量的性質を示す種々のマメパーセンテージにおけるＣＰ４－ＥＰＳＰＳ耐性遺伝子のＳＨＥＲＬＯＣＫ検出。Ｃ）種々のマメパーセンテージにおけるレクチン遺伝子のＳＨＥＲＬＯＣＫ検出。マメパーセンテージは、ラウンドアップレディマメと野生型マメとの混合物中におけるラウンドアップレディマメの量を表す。レクチン遺伝子は両方の種類のマメに存在し、従ってラウンドアップレディマメのパーセンテージとの相関を示さない。
【発明を実施するための形態】
【０１３４】
一般的定義
特に定義されない限り、本明細書で使用される科学技術用語は、本開示が関係する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。分子生物学における一般用語及び技術の定義については、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ，ａｎｄ　Ｍａｎｉａｔｉｓ）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，４ｔｈ　ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１２）（Ｇｒｅｅｎ　ａｎｄ　Ｓａｍｂｒｏｏｋ）；Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ

Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９８７）（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ． ｅｄｓ．）；ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）：ＰＣＲ ２：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（１９９５）（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ，ａｎｄ Ｇ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ ｅｄｓ．）：Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８８）（Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ｅｄｓ．）：Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ ２０１３（Ｅ．Ａ．Ｇｒｅｅｎｆｉｅｌｄ ｅｄ．）；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（１９８７）（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．）；Ｂｅｎｊａｍｉｎ Ｌｅｗｉｎ，Ｇｅｎｅｓ ＩＸ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ Ｊｏｎｅｓ ａｎｄ Ｂａｒｔｌｅｔ，２００８（ＩＳＢＮ ０７６３７５２２２３）；Ｋｅｎｄｒｅｗ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｔｈｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｌｔｄ．，１９９４（ＩＳＢＮ ０６３２０２１８２９）；Ｒｏｂｅｒｔ Ａ．Ｍｅｙｅｒｓ（ｅｄ．），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，１９９５（ＩＳＢＮ ９７８０４７１１８５７１０）；Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２ｎｄ ｅｄ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１９９４），Ｍａｒｃｈ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ４ｔｈ ｅｄ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１９９２）；及びＭａｒｔｅｎ Ｈ．Ｈｏｆｋｅｒ ａｎｄ Ｊａｎ ｖａｎ Ｄｅｕｒｓｅｎ，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｍｏｕｓｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１１）を参照することができる。

【０１３５】

本明細書で使用されるとき、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈上特に明確に指示されない限り、単数及び複数の両方の指示対象を含む。

【０１３６】

用語「任意選択の」又は「任意選択で」は、後続の記載されるイベント、状況又は置換基が起こることも、又は起こらないこともあり、その記載にイベント又は状況が起こる場合とそれが起こらない場合とが含まれることを意味する。

【０１３７】

端点による数値の範囲の記載には、それぞれの範囲内に含まれる全ての数字及び一部分、並びに記載される端点が含まれる。

【０１３８】

用語「約」又は「近似的に」は、パラメータ、量、時間的持続期間など、本明細書で計測可能な値を参照する場合に使用されるとき、開示される本発明の実施にかかる変動が適切である限りにおいて、指定される値の及びそれからの±１０％以下、±５％以下、±１％以下、及び±０．１％以下の変動など、指定される値の及びそれからの変動を包含することが意図される。修飾句「約」又は「近似的に」が参照する値は、それ自体もまた具体的に、及び好ましくは開示されることが理解されるべきである。

【０１３９】

本明細書全体を通じて「一実施形態」、「実施形態」、「例示的実施形態」への言及は、その実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造又は特性が本発明の少なくとも１つの実施形態に含まれることを意味する。従って、本明細書全体を通じて様々な箇所に語句「一実施形態において」、「ある実施形態において」、又は「例示的実施形態」が出現するが、必ずしもその全てが同じ実施形態を指しているとは限らず、しかしそうであることもある。更には、当業者には本開示から明らかであろうとおり、１つ以上の実施形態において特定の特徴、構造又は特性を任意の好適な方法で組み合わせてもよい。更に、本明

細書に記載される一部の実施形態は他の実施形態に含まれる一部の特徴を含み、しかし他の特徴を含まないが、異なる実施形態の特徴の組み合わせは本発明の範囲内にあることが意図される。例えば、添付の特許請求の範囲において、特許請求される実施形態のいずれかを任意の組み合わせで使用することができる。

【０１４０】

「Ｃ２ｃ２」は、現在は「Ｃａｓ１３ａ」と称され、特に指示がない限りこれらの用語は本明細書では同義的に使用される。

【０１４１】

本明細書に引用される全ての刊行物、公開特許文献、及び特許出願は、各個別の刊行物、公開特許文献、又は特許出願が参照によって援用されることが具体的且つ個別的に指示されたのと同じ程度に本明細書によって参照により援用される。

【０１４２】

概要

微生物のクラスター化した規則的な配置の短い回文配列リピート（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔｓ：ＣＲＩＳＰＲ）及びＣＲＩＳＰＲ関連（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ）適応免疫系は、Ｃａｓ９及びＣｐｆ１など、プログラム可能なエンドヌクレアーゼを含む（Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，２０１７；Ｚｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．，２０１５）。Ｃａｓ９及びＣｐｆ１は両方ともにＤＮＡを標的とするが、最近になって、Ｃ２ｃ２を含め、単一エフェクターＲＮＡガイド下ＲＮａｓｅが発見され（Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，２０１５）、特徴付けられており（Ａｂｕｄａｙｙｅｈ ｅｔ ａｌ．，２０１６；Ｓｍａｒｇｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０１７）、特異的ＲＮＡセンシング用のプラットフォームを提供している。ＲＮＡガイド下ＲＮａｓｅは、標的ＲＮＡを切断するようにＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を使用して容易に且つ好都合に再プログラム化することができる。そのＤＮＡ標的のみを切断するＤＮＡエンドヌクレアーゼのＣａｓ９及びＣｐｆ１と異なり、Ｃ２ｃ２などのＲＮＡガイド下ＲＮａｓｅはそのＲＮＡ標的の切断後も活性なままであるため、近接した標的でないＲＮＡの「コラテラル」切断をもたらす（Ａｂｕｄａｙｙｅｈ ｅｔ ａｌ．，２０１６）。このｃｒＲＮＡプログラム化コラテラルＲＮＡ切断活性が、リードアウトとして働き得るインビボプログラム細胞死又はインビトロ非特異的ＲＮＡ分解を惹起することにより、ＲＮＡガイド下ＲＮａｓｅを使用した特異的ＲＮＡの存在を検出する機会を提供する（Ａｂｕｄａｙｙｅｈ ｅｔ ａｌ．，２０１６；Ｅａｓｔ－Ｓｅｌｅｔｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，２０１６）。

【０１４３】

本明細書に開示される実施形態は、ＲＮＡターゲティングエフェクターを利用してアトモル濃度感度によるロバストなＣＲＩＳＰＲベースの診断法を提供する。本明細書に開示される実施形態は、ブロスＤＮＡ及びＲＮＡを同等の感度レベルで検出することができ、一塩基対の差に基づき標的を非標的と区別することができる。更に、本明細書に開示される実施形態は、好都合な流通及びポイント・オブ・ケア（ＰＯＣ）適用向けにフリーズドライの体裁で調製することができる。かかる実施形態は、例えば、ウイルス検出、細菌株タイピング、高感度遺伝子タイピング、及び疾患関連無細胞ＤＮＡの検出を含め、ヒトの健康における複数のシナリオで有用である。参照し易いように、本明細書に開示される実施形態はまた、ＳＨＥＲＬＯＣＫ（Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｈｉｇｈ－ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ Ｅｎｚｙｍａｔｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｅｒ ｕｎＬＯＣＫｉｎｇ：特異的高感度酵素レポーターアンロッキング）とも称され得る。

【０１４４】

一態様において、本明細書に開示される実施形態は、ＣＲＩＳＰＲシステムと、対応する標的分子に結合するように設計された１つ以上のガイドＲＮＡと、マスキング構築物と、試料中の標的核酸分子を増幅させる任意選択の増幅試薬とを含む核酸検出システムに関する。特定の例示的実施形態では、本システムは１つ以上の検出アプタマーを更に含み得る。１つ以上の検出アプタマーはＲＮＡポリメラーゼ部位又はプライマー結合部位を含み

得る。１つ以上の検出アプタマーは１つ以上の標的ポリペプチドに特異的に結合し、検出アプタマーが標的ペプチドに結合したときのみＲＮＡポリメラーゼ部位又はプライマー結合部位が露出するように構成される。ＲＮＡポリメラーゼ部位が露出すると、アプタマー配列を鋳型として使用したトリガーＲＮＡオリゴヌクレオチドの生成が促進される。従って、かかる実施形態において、１つ以上のガイドＲＮＡはトリガーＲＮＡに結合するように構成される。

【０１４５】

別の態様において、本明細書に開示される実施形態は、複数の個別独立分離容積を含む診断装置に関する。各個別独立分離容積は、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質と、対応する標的分子に結合するように設計された１つ以上のガイドＲＮＡと、マスキング構築物とを含む。特定の例示的実施形態では、ＲＮＡ増幅試薬が個別独立分離容積に予めロードされてもよく、又は各個別独立分離容積に試料を加えるのと同時に又はその後に個別独立分離容積に加えられてもよい。装置は、マイクロ流体力学ベースの装置、装着型装置、又は個別独立分離容積が画成される可撓性材料基材を含む装置であってもよい。

【０１４６】

別の態様において、本明細書に開示される実施形態は、試料中の標的核酸の検出方法に関し、この方法は、試料又は試料セットを個別独立分離容積セットに分配することを含み、各個別独立分離容積は、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質と、１つの標的オリゴヌクレオチドに結合するように設計された１つ以上のガイドＲＮＡと、マスキング構築物とを含む。次に試料セットが、１つ以上のガイドＲＮＡを１つ以上の標的分子に結合させるのに十分な条件下に維持される。１つ以上のガイドＲＮＡが標的核酸に結合すると、ひいてはＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質が活性化される。活性化されると、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は次に、例えばマスキング構築物を切断して検出可能な正のシグナルをアンマスキングし、放出させ、又は生成することによりマスキング構築物を不活性化する。個別独立分離容積における正の検出可能シグナルの検出が、標的分子の存在を指し示す。

【０１４７】

更に別の態様において、本明細書に開示される実施形態は、ポリペプチドの検出方法に関する。このポリペプチドの検出方法は、上記に記載される標的核酸の検出方法と同様である。しかしながら、ペプチド検出アプタマーもまた含まれる。ペプチド検出アプタマーは上記に記載したとおり機能し、標的ポリペプチドへの結合時のトリガーオリゴヌクレオチドの生成を促進する。ガイドＲＮＡはトリガーオリゴヌクレオチドを認識し、それによりＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質を活性化するように設計される。活性化されたＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質によってマスキング構築物が不活性化されると、検出可能な正のシグナルのアンマスキング、放出、又は生成につながる。

【０１４８】

ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質

一般に、国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書）などの本明細書及び文献で用いられているとおりのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ又はＣＲＩＳＰＲ系は、Ｃａｓ遺伝子をコードする配列、ｔｒａｃｒ（トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ）配列（例えばｔｒａｃｒＲＮＡ又は活性部分的ｔｒａｃｒＲＮＡ）、ｔｒａｃｒメイト配列（内因性ＣＲＩＳＰＲ系の文脈では「ダイレクトリピート」及びｔｒａｃｒＲＮＡによってプロセシングされる部分的ダイレクトリピートを包含する）、ガイド配列（内因性ＣＲＩＳＰＲ系の文脈では「スペーサー」とも称される）、又はこの用語が本明細書において使用されるとおりの「ＲＮＡ」（例えば、Ｃａｓ９などのＣａｓをガイドするＲＮＡ、例えばＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ及びトランス活性化（ｔｒａｃｒ）ＲＮＡ又はシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）（キメラＲＮＡ））又はＣＲＩＳＰＲ遺伝子座からの他の配列及び転写物を含めた、ＣＲＩＳＰＲ関連（「Ｃａｓ」）遺伝子の発現に関与し又はその活性を導く転写物及び他のエレメントをまとめて指す。一般に、ＣＲＩＳＰＲ系は、標的配列（内因性ＣＲＩＳＰＲ系の文脈ではプロトスペーサーとも称される

）の部位においてＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進するエレメントによって特徴付けられる。ＣＲＩＳＰＲタンパク質がＣ２ｃ２タンパク質である場合、ｔｒａｃｒＲＮＡは不要である。Ｃ２ｃ２については、Ａｂｕｄａｙｙｅｈ ｅｔ ａｌ．（２０１６）「Ｃ２ｃ２は単一成分プログラム可能ＲＮＡガイド下ＲＮＡターゲティングＣＲＩＳＰＲエフェクターである（Ｃ２ｃ２ ｉｓ ａ ｓｉｎｇｌｅ－ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ＲＮＡ－ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ ｅｆｆｅｃｔｏｒ）」；Ｓｃｉｅｎｃｅ；ＤＯＩ：１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．ａａｆ５５７３；及びＳｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．（２０１５）「多様なクラス２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの発見及び機能の特徴付け（Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ａｎｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｄｉｖｅｒｓｅ Ｃｌａｓｓ ２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ Ｓｙｓｔｅｍｓ）」，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ，ＤＯＩ：ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ｍｏｌｃｅｌ．２０１５．１０．００８；（これらは参照により全体として本明細書に援用される）に記載されている。Ｃａｓ１３ｂについては、Ｓｍａｒｇｏｎ ｅｔ ａｌ．（２０１７）「Ｃａｓ１３ｂは、アクセサリータンパク質Ｃｓｘ２７及びＣｓｘ２８によって異なる形で調節されるＶＩ－Ｂ型ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド下ＲＮａｓｅである（Ｃａｓ１３ｂ Ｉｓ ａ Ｔｙｐｅ ＶＩ－Ｂ ＣＲＩＳＰＲ－Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ＲＮＡ－Ｇｕｉｄｅｄ ＲＮａｓｅｓ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌｌｙ Ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｂｙ Ａｃｃｅｓｓｏｒｙ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ｃｓｘ２７ ａｎｄ Ｃｓｘ２８）」，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ．６５，１－１３；ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ｍｏｌｃｅｌ．２０１６．１２．０２３．（これはその全体が参照により本明細書に援用される）に記載されている。

【０１４９】

特定の実施形態では、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）又はＰＡＭ様モチーフが、本明細書に開示されるとおりのエフェクタータンパク質複合体による目的の標的遺伝子座への結合を誘導する。一部の実施形態では、ＰＡＭは５’ＰＡＭであってもよい（即ち、プロトスペーサーの５’末端の上流に位置してもよい）。他の実施形態において、ＰＡＭは３’ＰＡＭであってもよい（即ち、プロトスペーサーの５’末端の下流に位置してもよい）。用語「ＰＡＭ」は、用語「ＰＦＳ」又は「プロトスペーサーフランキング部位」又は「プロトスペーサーフランキング配列」と同義的に用いられ得る。

【０１５０】

好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は３’ＰＡＭを認識し得る。特定の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、５’Ｈ［式中、ＨはＡ、Ｃ又はＵである］である３’ＰＡＭを認識し得る。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質はレプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ）Ｃ２ｃ２ｐ、より好ましくはレプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ）ＤＳＭ １９７５７ Ｃ２ｃ２であってもよく、及び３’ＰＡＭは５’Ｈである。

【０１５１】

ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成の文脈では、「標的配列」とは、ガイド配列がそれに対して相補性を有するように設計される配列を指し、ここでは標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する。標的配列はＲＮＡポリヌクレオチドを含み得る。用語「標的ＲＮＡ」は、標的配列である又はそれを含むＲＮＡポリヌクレオチドを指す。換言すれば、標的ＲＮＡは、ｇＲＮＡ、即ちガイド配列の一部がそれと相補性を有するように設計される、且つＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質とｇＲＮＡとを含む複合体によって媒介されるエフェクター機能がそれに仕向けられることになるＲＮＡポリヌクレオチド又はＲＮＡポリヌクレオチドの一部であってもよい。一部の実施形態では、標的配列は細胞の核又は細胞質に位置する。

【０１５２】

ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質、詳細にはＣ２ｃ２をコードする核酸分子は、有利にはコドン最適化されたＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質である。コドン最適化さ

れた配列の例は、この場合、真核生物、例えばヒトでの発現に最適化されるか（即ちヒトでの発現に最適化されている）、又は本明細書で考察されるとおりの別の真核生物、動物若しくは哺乳動物に最適化された配列である；例えば、国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書）のＳａＣａｓ９ヒトコドン最適化配列を参照のこと。これが好ましいが、他の例が可能であることが理解され、ヒト以外の宿主種に対するコドン最適化、又は特定の器官に対するコドン最適化が公知である。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質をコードする酵素コード配列が、特定の細胞、例えば真核細胞での発現にコドン最適化される。真核細胞は、特定の生物、例えば、限定はされないが植物又はヒトを含めた哺乳動物、又は本明細書で考察されるとおりの非ヒト真核生物又は動物又は哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、家畜、又は非ヒト哺乳動物又は霊長類のものであるか、又はそれに由来し得る。一部の実施形態において、ヒト又は動物に対するいかなる実質的な医学的利益もなくそれらに苦痛を生じさせる可能性のあるヒトの生殖細胞系列遺伝子アイデンティティの改変方法及び／又は動物の遺伝子アイデンティティの改変方法、更にかかる方法から得られる動物は除外され得る。一般に、コドン最適化とは、天然配列の少なくとも１つのコドン（例えば、約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０個以上、又はそれより多いコドン）を、天然のアミノ酸配列を維持しつつ、当該の宿主細胞の遺伝子においてより高頻度で又は最も高頻度で使用されるコドンに置き換えることにより、目的の宿主細胞における発現を増強するための核酸配列の改変方法を指す。様々な種が、特定のアミノ酸のある種のコドンについて特定のバイアスを呈する。コドンバイアス（生物間でのコドン使用の違い）は、多くの場合にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳効率と相関し、次にはそれが、数ある中でも特に、翻訳されるコドンの特性及び特定のトランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）分子の利用可能性に依存すると考えられている。細胞において選択のｔＲＮＡが優勢であることは、概して、ペプチド合成で最も高頻度に使用されるコドンを反映するものである。従って、コドン最適化に基づき所与の生物における最適な遺伝子発現に合わせて遺伝子を調整することができる。コドン使用表が、例えば、ｋａｚｕｓａ．ｏｒｊｐ／ｃｏｄｏｎ／で利用可能な「コドン使用データベース（Ｃｏｄｏｎ　Ｕｓａｇｅ　Ｄａｔａｂａｓｅ）」で容易に利用可能であり、これらの表を幾つもの方法で適合させることができる。Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．「国際的ＤＮＡ配列データベースから表にしたコドン使用：２０００年の状況（Ｃｏｄｏｎ　ｕｓａｇｅ　ｔａｂｕｌａｔｅｄ　ｆｒｏｍ　ｔｈｅ　ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　ＤＮＡ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｄａｔａｂａｓｅｓ：ｓｔａｔｕｓ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｙｅａｒ　２０００）」Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２８：２９２（２０００）を参照のこと。特定の配列を特定の宿主細胞における発現にコドン最適化するためのコンピュータアルゴリズムもまた利用可能であり、Ｇｅｎｅ　Ｆｏｒｇｅ（Ａｐｔａｇｅｎ；Ｊａｃｏｂｕｓ，ＰＡ）などもまた利用可能である。一部の実施形態において、Ｃａｓをコードする配列中の１つ以上のコドン（例えば、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０以上、又は全てのコドン）が、特定のアミノ酸について最も高頻度に使用されるコドンに対応する。

【０１５３】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの方法は、１つ以上の目的の遺伝子のプロモーターを含む調節エレメントと細胞内で作動可能に接続した１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸が提供又は導入されるＣａｓトランスジェニック細胞、詳細にはＣ２ｃ２トランスジェニック細胞を提供することを含み得る。本明細書で使用されるとき、用語「Ｃａｓトランスジェニック細胞」は、Ｃａｓ遺伝子がゲノム的に組み込まれている真核細胞などの細胞を指す。細胞の性質、タイプ、又は起源は、本発明によれば特に限定されない。また、Ｃａｓトランス遺伝子を細胞に導入する方法も様々であってよく、当該技術分野において公知のとおりの任意の方法であり得る。特定の実施形態において、Ｃａｓトランスジェニック細胞は、単離細胞にＣａｓトランス遺伝子を導入することによって得られる。特定の他の実施形態において、Ｃａｓトランスジェニック細胞は、Ｃａｓトランスジェニック生物から細胞を単離することによって得られる。例として

、及び限定なしに、本明細書において言及されるとおりのＣａｓトランスジェニック細胞は、Ｃａｓノックイン真核生物など、Ｃａｓトランスジェニック真核生物に由来してもよい。国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ１３／７４６６７号明細書）（参照により本明細書に援用される）が参照される。Ｒｏｓａ遺伝子座のターゲティングに関するＳａｎｇａｍｏ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願公開第２０１２００１７２９０号明細書及び同第２０１１０２６５１９８号明細書の方法を、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系を利用するように改変し得る。Ｒｏｓａ遺伝子座の標的化に関するＣｅｌｌｅｃｔｉｓに譲渡された米国特許出願公開第２０１３０２３６９４６号明細書の方法もまた、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系を利用するように改変し得る。更なる例として、Ｃａｓ９ノックインマウスについて記載しているＰｌａｔｔ　ｅｔ．ａｌ．（Ｃｅｌｌ；１５９（２）：４４０－４５５（２０１４））（参照により本明細書に援用される）が参照される。Ｃａｓトランス遺伝子はＬｏｘ－Ｓｔｏｐ－ポリＡ－Ｌｏｘ（ＬＳＬ）カセットを更に含んでもよく、それによりＣａｓ発現をＣｒｅリコンビナーゼによって誘導可能なものにすることができる。或いは、Ｃａｓトランスジェニック細胞は、単離細胞にＣａｓトランス遺伝子を導入することによって得てもよい。トランス遺伝子の送達系は当該技術分野において周知である。例として、Ｃａｓトランス遺伝子は、同様に本明細書の他の部分に記載されるとおり、例えば真核細胞においてベクター（例えば、ＡＡＶ、アデノウイルス、レンチウイルス）及び／又は粒子及び／又はナノ粒子送達を用いて送達し得る。

【０１５４】

当業者は、本明細書において参照されるとおりのＣａｓトランスジェニック細胞などの細胞が、組み込まれたＣａｓ遺伝子を有することに加えて更なるゲノム変化を含み、又はＣａｓを標的遺伝子座にガイドすることが可能なＲＮＡと複合体を形成したときＣａｓの配列特異的作用によって生じる突然変異を含み得ることを理解するであろう。

【０１５５】

特定の態様において、本発明は、例えばＣａｓ及び／又はＣａｓを標的遺伝子座に案内する能力を有するＲＮＡ（即ちガイドＲＮＡ）を細胞に送達又は導入するための、またこれらの成分を（例えば原核細胞において）増殖させるための、ベクターに関する。本明細書で使用されるとき、「ベクター」は、ある実体を一つの環境から別の環境に移すことを可能にする又は促進するツールである。これは、別のＤＮＡセグメントが挿入されて挿入セグメントの複製をもたらし得るレプリコン、例えば、プラスミド、ファージ、又はコスミドである。概して、ベクターは適切な制御エレメントと会合しているとき複製能を有する。一般に、用語「ベクター」は、それに連結されている別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指す。ベクターとしては、限定はされないが、一本鎖、二本鎖、又は部分的二本鎖の核酸分子；１つ以上の遊離末端を含む、遊離末端のない（例えば環状の）核酸分子；ＤＮＡ、ＲＮＡ、又は両方を含む核酸分子；及び当該技術分野において公知の他の各種ポリヌクレオチドが挙げられる。ある種のベクターは「プラスミド」であり、これは、標準的な分子クローニング技術によるなどして追加のＤＮＡセグメントを挿入することができる環状二本鎖ＤＮＡループを指す。別の種類のベクターはウイルスベクターであり、ここでベクターには、ウイルス（例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ））へのパッケージングのためのウイルス由来ＤＮＡ又はＲＮＡ配列が存在する。ウイルスベクターはまた、宿主細胞へのトランスフェクションのためのウイルスが担持するポリヌクレオチドも含む。特定のベクターは、それが導入される宿主細胞での自己複製能を有する（例えば、細菌性複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば非エピソーム哺乳類ベクター）は宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより宿主ゲノムと共に複製される。更に、特定のベクターは、それが作動可能に連結された遺伝子の発現を導くことが可能である。かかるベクターは、本明細書では「発現ベクター」と称される。組換えＤＮＡ技法において有用な一般的な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。

【０１５６】
組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に好適な形態で本発明の核酸を含むことができ、これはつまり、組換え発現ベクターが、発現させる核酸配列に作動可能に連結された１つ以上の調節エレメント（これは、発現に用いられる宿主細胞に基づき選択されてもよい）を含むことを意味する。組換え発現ベクターの範囲内において、「作動可能に連結された」は、ヌクレオチド配列の（例えば、インビトロ転写／翻訳系における、又はベクターが宿主細胞に導入される場合に宿主細胞における）発現が可能となる形で目的のヌクレオチド配列が１つ又は複数の調節エレメントに連結されていることを意味するように意図される。組換え及びクローニング方法に関しては、２００４年９月２日に米国特許出願公開第２００４－０１７１１５６　Ａ１号明細書として公開された米国特許出願第１０／８１５，７３０号明細書（この内容は、本明細書において全体として参照により援用される）が挙げられる。従って、本明細書に開示される実施形態はまた、ＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムを含むトランスジェニック細胞も含み得る。特定の例示的実施形態では、トランスジェニック細胞は個別独立分離容積として機能し得る。換言すれば、マスキング構築物を含む試料が例えば好適な送達ベシクルで細胞に送達されてもよく、標的が送達ベシクル中に存在する場合、ＣＲＩＳＰＲエフェクターが活性化され、検出可能シグナルが生成される。
【０１５７】
１つ又は複数のベクターが、１つ又は複数の調節エレメント、例えば１つ又は複数のプロモーターを含み得る。１つ又は複数のベクターはＣａｓコード配列、及び／又は単一の、しかし少なくとも３又は８又は１６又は３２又は４８又は５０個を含み得る可能性もあるガイドＲＮＡ（例えばｓｇＲＮＡ）コード配列、例えば、１～２、１～３、１～４　１～５、３～６、３～７、３～８、３～９、３～１０、３～８、３～１６、３～３０、３～３２、３～４８、３～５０個のＲＮＡ（例えばｓｇＲＮＡ）を含み得る。単一のベクターには、有利には約１６個以下のＲＮＡがある場合、各ＲＮＡ（例えばｓｇＲＮＡ）にプロモーターがあってもよく；及び、単一のベクターが１６個より多いＲＮＡを提供する場合、１つ以上のプロモーターがそれらのＲＮＡのうちの２個以上の発現をドライブしてもよく、例えば、３２個のＲＮＡがある場合、各プロモーターが２個のＲＮＡの発現をドライブしてもよく、及び４８個のＲＮＡがある場合、各プロモーターが３個のＲＮＡの発現をドライブしてもよい。単純な算術的な十分に確立されたクローニングプロトコル及び本開示の教示により、当業者は、例えばＡＡＶなどの好適な例示的ベクターに対するＲＮＡ、及びＵ６プロモーターなどの好適なプロモーターに関して本発明を容易に実施することができる。例えば、ＡＡＶのパッケージング限界は約４．７ｋｂである。単一のＵ６－ｇＲＮＡ（＋クローニング用の制限部位）の長さは３６１ｂｐである。従って、当業者は、単一のベクターに約１２～１６個、例えば１３個のＵ６－ｇＲＮＡカセットを容易に収めることができる。これは、ＴＡＬＥアセンブリに用いられるゴールデンゲート戦略（ｇｅｎｏｍｅ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．ｏｒｇ／ｔａｌｅｆｆｅｃｔｏｒｓ／）など、任意の好適な手段によってアセンブルすることができる。当業者はまた、Ｕ６－ｇＲＮＡの数を約１．５倍増加させるため、例えば、１２～１６、例えば１３から約１８～２４、例えば約１９個のＵ６－ｇＲＮＡに増加させるため、タンデムガイド戦略も用いることができる。従って、当業者は、単一のベクター、例えばＡＡＶベクター中に約１８～２４個、例えば約１９個のプロモーター－ＲＮＡ、例えばＵ６－ｇＲＮＡに容易に至ることができる。ベクター中のプロモーター及びＲＮＡの数を増加させる更なる手段は、単一のプロモーター（例えばＵ６）を使用して、切断可能な配列によって分離されたＲＮＡのアレイを発現させることである。及びベクター中のプロモーター－ＲＮＡの数を増加させる更に別の手段は、コード配列又は遺伝子のイントロンにおいて切断可能な配列によって分離されたプロモーター－ＲＮＡのアレイを発現させることである；及び、この場合、ポリメラーゼＩＩプロモーターを使用することが有利であり、それにより発現が増加し、組織特異的様式での長いＲＮＡの転写が可能となり得る（例えば、ｎａｒ．ｏｘｆｏｒｄｊｏｕｒｎａｌｓ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／３４／７／ｅ５３．ｓｈｏｒｔ、及びｎａｔｕｒｅ．ｃｏ

ｍ／ｍｔ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｖ１６／ｎ９／ａｂｓ／ｍｔ２００８１４４ａ．ｈｔｍｌを参照）。有利な実施形態において、ＡＡＶは、最大約５０遺伝子を標的とするＵ６タンデムｇＲＮＡをパッケージングし得る。従って、当該技術分野における知識及び本開示の教示から、当業者は、１つ以上のプロモーターの制御下にあるか、又はそれに作動可能に若しくは機能的に連結された複数のＲＮＡ又はガイドを発現する１つ又は複数のベクター、例えばシングルベクターを（特に本明細書で考察されるＲＮＡ又はガイドの数に関して）いかなる過度の実験もなく容易に作製及び使用することができる。

【０１５８】

１つ又は複数のガイドＲＮＡのコード配列及び／又はＣａｓコード配列は１つ又は複数の調節エレメントに機能的に又は作動可能に連結されてもよく、従って１つ又は複数の調節エレメントが発現をドライブする。１つ又は複数のプロモーターは構成的プロモーター及び／又は条件的プロモーター及び／又は誘導性プロモーター及び／又は組織特異的プロモーターであってもよい。プロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼ、ｐｏｌ　Ｉ、ｐｏｌ　ＩＩ、ｐｏｌ　ＩＩＩ、Ｔ７、Ｕ６、Ｈ１、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、β－アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、及びＥＦ１αプロモーターからなる群から選択されてもよい。有利なプロモーターは、プロモーターはＵ６である。

【０１５９】

一部の実施形態では、核酸ターゲティングシステムの１つ以上のエレメントが、内因性ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡターゲティングシステムを含む特定の生物に由来する。特定の例示的実施形態では、エフェクタータンパク質ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡターゲティングシステムは、限定はされないが、本明細書に記載されるＨＥＰＮドメイン、当該技術分野において公知のＨＥＰＮドメイン、及びコンセンサス配列モチーフとの比較によってＨＥＰＮドメインであると認識されるドメインを含め、少なくとも１つのＨＥＰＮドメインを含む。幾つかのかかるドメインが本明細書に提供される。一つの非限定的な例において、コンセンサス配列は、本明細書に提供されるＣ２ｃ２又はＣａｓ１３ｂオルソログの配列に由来し得る。特定の例示的実施形態では、エフェクタータンパク質は単一のＨＥＰＮドメインを含む。特定の他の例示的実施形態において、エフェクタータンパク質は２つのＨＥＰＮドメインを含む。

【０１６０】

一例示的実施形態において、エフェクタータンパク質は、ＲｘｘｘｘＨモチーフ配列を含む１つ以上のＨＥＰＮドメインを含む。ＲｘｘｘｘＨモチーフ配列は、限定なしに、本明細書に記載されるＨＥＰＮドメイン又は当該技術分野において公知のＨＥＰＮドメインからのものであってもよい。ＲｘｘｘｘＨモチーフ配列は、２つ以上のＨＥＰＮドメインの一部分を組み合わせることにより作り出されるモチーフ配列を更に含む。指摘したとおり、コンセンサス配列は、２０１７年３月１５日に出願された「Ｎｏｖｅｌ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｅｎｚｙｍｅｓ　ａｎｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ」と題される米国仮特許出願第６２／４３２，２４０号明細書、「Ｎｏｖｅｌ　Ｔｙｐｅ　ＶＩ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｏｒｔｈｏｌｏｇｓ　ａｎｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ」と題される米国仮特許出願第６２／４７１，７１０号明細書、及び代理人整理番号４７６２７－０５－２１３３として分類される２０１７年４月１２日に出願された「Ｎｏｖｅｌ　Ｔｙｐｅ　ＶＩ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｏｒｔｈｏｌｏｇｓ　ａｎｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ」と題される米国仮特許出願に開示されるオルソログの配列に由来し得る。

【０１６１】

本発明のある実施形態において、ＨＥＰＮドメインは、Ｒ｛Ｎ／Ｈ／Ｋ｝Ｘ１Ｘ２Ｘ３Ｈの配列を含む少なくとも１つのＲｘｘｘｘＨモチーフを含む。本発明のある実施形態において、ＨＥＰＮドメインは、Ｒ｛Ｎ／Ｈ｝Ｘ１Ｘ２Ｘ３Ｈの配列を含むＲｘｘｘｘＨモチーフを含む。本発明のある実施形態において、ＨＥＰＮドメインはＲ｛Ｎ／Ｋ｝Ｘ１Ｘ２Ｘ３Ｈの配列を含む。特定の実施形態において、Ｘ１はＲ、Ｓ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｇ、Ｙ、又はＨである。特定の実施形態において、Ｘ２はＩ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、又はＬである。特

定の実施形態において、Ｘ３はＬ、Ｆ、Ｎ、Ｙ、Ｖ、Ｉ、Ｓ、Ｄ、Ｅ、又はＡである。

【０１６２】

本発明に係る使用のための更なるエフェクターは、例えば限定はされないがｃａｓ１遺伝子の始端から領域２０ｋｂ且つｃａｓ１遺伝子の終端から２０ｋｂ以内など、そのｃａｓ１遺伝子への近接性によって同定することができる。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、少なくとも１つのＨＥＰＮドメイン及び少なくとも５００アミノ酸を含み、ここでＣ２ｃ２エフェクタータンパク質は、天然では、原核生物ゲノムにおいてＣａｓ遺伝子又はＣＲＩＳＰＲアレイの上流又は下流２０ｋｂ以内に存在する。Ｃａｓタンパク質の非限定的な例としては、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１及びＣｓｘ１２としても知られる）、Ｃａｓ１０、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、そのホモログ、又はその改変バージョンが挙げられる。特定の例示的実施形態では、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質は、天然では、原核生物ゲノムにおいてＣａｓ１遺伝子の上流又は下流２０ｋｂ以内に存在する。用語「オルソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇｕｅ）」（本明細書では「オルソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）」とも称される）及び「ホモログ（ｈｏｍｏｌｏｇｕｅ）」（本明細書では「ホモログ（ｈｏｍｏｌｏｇ）」とも称される）は、当該技術分野において周知である。更なる指針として、本明細書で使用されるとおりのタンパク質の「ホモログ」は、それがそのホモログであるところのタンパク質と同じ又は同様の機能を果たす同じ種のタンパク質である。しかしホモログタンパク質は構造上関係がなくてもよく、又は構造上部分的にのみ関係している。本明細書で使用されるとおりのタンパク質の「オルソログ」は、それがそのオルソログであるところのタンパク質と同じ又は同様の機能を果たす異なる種のタンパク質である。しかしオルソログタンパク質は構造上関係がなくてもよく、又は構造上部分的にのみ関係している。

【０１６３】

詳細な実施形態において、ＶＩ型ＲＮＡターゲティングＣａｓ酵素はＣ２ｃ２である。他の例示的実施形態において、ＶＩ型ＲＮＡターゲティングＣａｓ酵素はＣａｓ１３ｂである。詳細な実施形態において、Ｃ２ｃ２などのＶＩ型タンパク質のホモログ又はオルソログは、本明細書において参照されるとき、Ｃ２ｃ２などのＶＩ型タンパク質と（例えば、レプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ）Ｃ２ｃ２、ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＭＡ２０２０ Ｃ２ｃ２、ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＮＫ４Ａ１７９ Ｃ２ｃ２、クロストリジウム・アミノフィルム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ａｍｉｎｏｐｈｉｌｕｍ）（ＤＳＭ １０７１０）Ｃ２ｃ２、カルノバクテリウム・ガリナルム（Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）（ＤＳＭ ４８４７）Ｃ２ｃ２、パルディバクター・プロピオニシゲネス（Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ ｐｒｏｐｉｏｎｉｃｉｇｅｎｅｓ）（ＷＢ４）Ｃ２ｃ２、リステリア・ウェイヘンステファネンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｗｅｉｈｅｎｓｔｅｐｈａｎｅｎｓｉｓ）（ＦＳＬ Ｒ９－０３１７）Ｃ２ｃ２、リステリア科（Ｌｉｓｔｅｒｉａｃｅａｅ）細菌（ＦＳＬ Ｍ６－０６３５）Ｃ２ｃ２、リステリア・ニューヨーケンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｎｅｗｙｏｒｋｅｎｓｉｓ）（ＦＳＬ Ｍ６－０６３５）Ｃ２ｃ２、レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ）（Ｆ０２７９）Ｃ２ｃ２、ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）（ＳＢ １００３）Ｃ２ｃ２、ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）（Ｒ１２１）Ｃ２ｃ２、ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）（ＤＥ４４２）Ｃ２ｃ２、レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ）（Ｌｗ２）Ｃ２ｃ２、又はリステリア・ゼーリゲリ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｓｅｅｌｉｇｅｒｉ）

Ｃ２ｃ２のいずれかの野生型配列を基準として）少なくとも３０％、又は少なくとも４０％、又は少なくとも５０％、又は少なくとも６０％、又は少なくとも７０％、又は少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、例えば少なくとも９５％などの配列相同性又は同一性を有する。更なる実施形態において、Ｃ２ｃ２などのＶＩ型タンパク質のホモログ又はオルソログは、本明細書において参照されるとき、野生型Ｃ２ｃ２と（例えば、レプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ）Ｃ２ｃ２、ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＭＡ２０２０ Ｃ２ｃ２、ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＮＫ４Ａ１７９ Ｃ２ｃ２、クロストリジウム・アミノフィルム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ａｍｉｎｏｐｈｉｌｕｍ）（ＤＳＭ １０７１０）Ｃ２ｃ２、カルノバクテリウム・ガリナルム（Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）（ＤＳＭ ４８４７）Ｃ２ｃ２、パルディバクター・プロピオニシゲネス（Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ ｐｒｏｐｉｏｎｉｃｉｇｅｎｅｓ）（ＷＢ４）Ｃ２ｃ２、リステリア・ウェイヘンステファネンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｗｅｉｈｅｎｓｔｅｐｈａｎｅｎｓｉｓ）（ＦＳＬ Ｒ９－０３１７）Ｃ２ｃ２、リステリア科（Ｌｉｓｔｅｒｉａｃｅａｅ）細菌（ＦＳＬ Ｍ６－０６３５）Ｃ２ｃ２、リステリア・ニューヨーケンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｎｅｗｙｏｒｋｅｎｓｉｓ）（ＦＳＬ Ｍ６－０６３５）Ｃ２ｃ２、レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ）（Ｆ０２７９）Ｃ２ｃ２、ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）（ＳＢ １００３）Ｃ２ｃ２、ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）（Ｒ１２１）Ｃ２ｃ２、ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）（ＤＥ４４２）Ｃ２ｃ２、レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ）（Ｌｗ２）Ｃ２ｃ２、又はリステリア・ゼーリゲリ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｓｅｅｌｉｇｅｒｉ）Ｃ２ｃ２のいずれかの野生型配列を基準として）少なくとも３０％、又は少なくとも４０％、又は少なくとも５０％、又は少なくとも６０％、又は少なくとも７０％、又は少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、更により好ましくは少なくとも９０％、例えば少なくとも９５％などの配列同一性を有する。

【０１６４】

特定の他の例示的実施形態において、ＣＲＩＳＰＲシステムエフェクタータンパク質はＣ２ｃ２ヌクレアーゼである。Ｃ２ｃ２の活性は２つのＨＥＰＮドメインの存在に依存し得る。これらは、ＲＮａｓｅドメイン、即ちＲＮＡを切断するヌクレアーゼ（詳細にはエンドヌクレアーゼ）であることが示されている。Ｃ２ｃ２ ＨＥＰＮはまたＤＮＡも標的とし、又は潜在的にＤＮＡ及び／又はＲＮＡを標的とし得る。Ｃ２ｃ２のＨＥＰＮドメインが少なくともＲＮＡへの結合能を有し、且つその野生型形態ではＲＮＡの切断能を有することに基づけば、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質がＲＮａｓｅ機能を有することが好ましい。Ｃ２ｃ２ ＣＲＩＳＰＲシステムに関しては、２０１６年６月１７日に出願された米国仮特許出願第６２／３５１，６６２号明細書及び２０１６年８月１７日に出願された米国仮特許出願第６２／３７６，３７７号明細書が参照される。また、２０１６年６月１７日に出願された米国仮特許出願第６２／３５１，８０３号明細書も参照される。Ｂｒｏａｄ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ第１００３５．ＰＡ４号及び代理人整理番号４７６２７．０３．２１３３を有する２０１６年１２月８日に出願された「Ｎｏｖｅｌ Ｃｒｉｓｐｒ Ｅｎｚｙｍｅｓ ａｎｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ」と題される米国仮特許出願が参照される。更に、Ｅａｓｔ－Ｓｅｌｅｔｓｋｙ ｅｔ ａｌ.「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃ２ｃ２の２つの異なるＲＮａｓｅ活性によりガイドＲＮＡプロセシング及びＲＮＡ検出が可能となる（Ｔｗｏ ｄｉｓｔｉｎｃｔ ＲＮａｓｅ ａｃｔｉｖｉｔｉｅｓ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃ２ｃ２ ｅｎａｂｌｅ ｇｕｉｄｅ－ＲＮＡ ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ ａｎｄ ＲＮＡ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ）」 Ｎａｔｕｒｅ ｄｏｉ：１０／１０３８／ｎａｔｕｒｅ１９８０２ ａｎｄ Ａｂｕｄａｙｙｅｈ ｅｔ ａｌ.「Ｃ２ｃ２は単一成分プログラム可能ＲＮＡガイド下ＲＮＡターゲティングＣＲＩＳＰＲエフェクターである（Ｃ２ｃ２ ｉｓ ａ ｓｉｎｇｌｅ－ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ＲＮＡ ｔａｒ

ｇｅｔｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ ｅｆｆｅｃｔｏｒ）」 ｂｉｏＲｘｉｖ ｄｏｉ：１０．１１０１／０５４７４２が参照される。

【０１６５】

ＣＲＩＳＰＲシステムのＲＮａｓｅ機能は公知であり、例えば特定のＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓシステムについてｍＲＮＡターゲティングが報告されており（Ｈａｌｅ ｅｔ ａｌ．，２０１４，Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ，ｖｏｌ． ２８，２４３２－２４４３；Ｈａｌｅ ｅｔ ａｌ．，２００９，Ｃｅｌｌ，ｖｏｌ．１３９，９４５－９５６；Ｐｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１５，Ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ ｒｅｓｅａｒｃｈ，ｖｏｌ．４３，４０６－４１７）、顕著な利点を提供する。表皮ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐｉｄｅｒｍｉｓ）ＩＩＩ－Ａ型システムでは、標的間にわたる転写により、Ｃａｓ１０－Ｃｓｍリボ核タンパク質エフェクタータンパク質複合体内の独立した活性部位によって媒介される標的ＤＮＡ及びその転写物の切断が生じる（Ｓａｍａｉ ｅｔ ａｌ．，２０１５，Ｃｅｌｌ，ｖｏｌ．１５１，１１６４－１１７４を参照のこと）。従って、本エフェクタータンパク質を用いてＲＮＡを標的とするＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム、組成物又は方法が提供される。

【０１６６】

ある実施形態において、Ｃａｓタンパク質は、限定はされないが、レプトトリキア属（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ）、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、コリネバクター属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ）、ステレラ属（Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ）、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）、トレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）、フィリファクター属（Ｆｉｌｉｆａｃｔｏｒ）、ユーバクテリウム属（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、バクテロイデス属（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）、フラビイボラ属（Ｆｌａｖｉｉｖｏｌａ）、フラボバクテリウム属（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、スフェロヘータ属（Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ）、アゾスピリラム属（Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）、グルコンアセトバクター属（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、ナイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）、ロゼブリア属（Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ）、パルビバクラム属（Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、ニトラチフラクター属（Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）及びカンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）を含む属の生物のＣ２ｃ２オルソログであってもよい。かかる属の生物種は、本明細書において他に考察されるとおりであり得る。

【０１６７】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系酵素のオルソログを同定する幾つかの方法は、目的のゲノムのｔｒａｃｒ配列を同定するステップを含み得る。ｔｒａｃｒ配列の同定は、以下のステップに関し得る：データベースでダイレクトリピート又はｔｒａｃｒメイト配列を検索して、ＣＲＩＳＰＲ酵素を含むＣＲＩＳＰＲ領域を同定するステップ。センス方向及びアンチセンス方向の両方にＣＲＩＳＰＲ酵素に隣接するＣＲＩＳＰＲ領域中の相同配列を検索するステップ。転写ターミネーター及び二次構造を調べるステップ。ダイレクトリピート又はｔｒａｃｒメイト配列ではないが、ダイレクトリピート又はｔｒａｃｒメイト配列と５０％より高い同一性を有する任意の配列を潜在的ｔｒａｃｒ配列として同定するステップ。その潜在的ｔｒａｃｒ配列を取り、それと会合している転写終結配列に関して分析するステップ。

【０１６８】

本明細書に記載される機能のいずれも、複数のオルソログ由来の断片を含むキメラ酵素を含め、他のオルソログ由来のＣＲＩＳＰＲ酵素にエンジニアリングし得ることが理解されるであろう。かかるオルソログの例は、本明細書の他の部分に記載される。従って、キメラ酵素は、限定はされないが、レプトトリキア属（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ）、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、コリネバクター属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ）、ステレラ属（Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ）、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）、トレポネー

マ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）、フィリファクター属（Ｆｉｌｉｆａｃｔｏｒ）、ユーバクテリウム属（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、バクテロイデス属（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）、フラビイボラ属（Ｆｌａｖｉｉｖｏｌａ）、フラボバクテリウム属（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、スフェロヘータ属（Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ）、アゾスピリラム属（Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）、グルコンアセトバクター属（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、ナイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）、ロゼブリア属（Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ）、パルビバクラム属（Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、ニトラチフラクター属（Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）及びカンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）を含む生物のＣＲＩＳＰＲ酵素オルソログの断片を含み得る。キメラ酵素は第１の断片と第２の断片とを含むことができ、これらの断片（ｆｒａｇｒｍｅｎｔ）は、本明細書に挙げられる属又は本明細書に挙げられる種の生物のＣＲＩＳＰＲ酵素オルソログのものであり得る；有利には断片は、異なる種のＣＲＩＳＰＲ酵素オルソログ由来である。

【０１６９】

実施形態において、本明細書において言及されるとおりのＣ２ｃ２タンパク質にはまた、Ｃ２ｃ２又はそのホモログ若しくはオルソログの機能変異体も包含される。タンパク質の「機能変異体」は、本明細書で使用されるとき、当該のタンパク質の活性を少なくとも部分的に保持しているかかるタンパク質の変異体を指す。機能変異体には、多型等を含め、突然変異体（これは挿入、欠失、又は置換突然変異体であり得る）が含まれ得る。また、機能変異体の範囲内には、かかるタンパク質と、別の、通常は無関係の核酸、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドとの融合産物も含まれる。機能変異体は天然に存在するものであってもよく、又は人工のものであってもよい。有利な実施形態は、エンジニアリングされた又は天然に存在しないＶＩ型ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質を含み得る。

【０１７０】

ある実施形態において、Ｃ２ｃ２又はそのオルソログ若しくはホモログをコードする１つ又は複数の核酸分子は、真核細胞での発現にコドン最適化され得る。真核生物は、本明細書に考察されるとおりのものであってもよい。１つ又は複数の核酸分子は、エンジニアリングされたもの又は天然に存在しないものであってもよい。

【０１７１】

ある実施形態において、Ｃ２ｃ２又はそのオルソログ若しくはホモログは１つ以上の突然変異を含み得る（ひいてはそれをコードする１つ又は複数の核酸分子が１つ又は複数の突然変異を有し得る）。突然変異は人工的に導入された突然変異であってもよく、限定はされないが、触媒ドメインにおける１つ以上の突然変異が含まれ得る。Ｃａｓ９酵素に関連する触媒ドメインの例としては、限定はされないが、ＲｕｖＣ　Ｉ、ＲｕｖＣ　ＩＩ、ＲｕｖＣ　ＩＩＩ及びＨＮＨドメインを挙げることができる。

【０１７２】

ある実施形態において、Ｃ２ｃ２又はそのオルソログ若しくはホモログは１つ以上の突然変異を含み得る。突然変異は人工的に導入された突然変異であってもよく、限定はされないが、触媒ドメインにおける１つ以上の突然変異を挙げることができる。Ｃａｓ酵素に関連する触媒ドメインの例としては、限定はされないがＨＥＰＮドメインを挙げることができる。

【０１７３】

ある実施形態において、Ｃ２ｃ２又はそのオルソログ若しくはホモログは、機能ドメインと融合した又はそれに作動可能に連結された汎用核酸結合タンパク質として用いられ得る。例示的機能ドメインとしては、限定はされないが、翻訳開始因子、翻訳活性化因子、翻訳抑制因子、ヌクレアーゼ、詳細にはリボヌクレアーゼ、スプライソソーム、ビーズ、光誘導性／制御性ドメイン又は化学物質誘導性／制御性ドメインを挙げることができる。

【０１７４】
特定の例示的実施形態では、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質は、レプトトリキア属（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ）、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、コリネバクター属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ）、ステレラ属（Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ）、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）、トレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）、フィリファクター属（Ｆｉｌｉｆａｃｔｏｒ）、ユーバクテリウム属（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、バクテロイデス属（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）、フラビイボラ属（Ｆｌａｖｉｉｖｏｌａ）、フラボバクテリウム属（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、スフェロヘータ属（Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ）、アゾスピリラム属（Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）、グルコンアセトバクター属（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、ナイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）、ロゼブリア属（Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ）、パルビバクラム属（Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、ニトラチフラクター属（Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、及びカンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）からなる群から選択される生物由来であってもよい。
【０１７５】
特定の実施形態において、エフェクタータンパク質はリステリア属種（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｓｐ．）Ｃ２ｃ２ｐ、好ましくはリステリア・ゼーリゲリ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｓｅｅｌｉｇｅｒｉａ）Ｃ２ｃ２ｐ、より好ましくはリステリア・ゼーリゲリ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｓｅｅｌｉｇｅｒｉａ）血清型１／２ｂ株ＳＬＣＣ３９５４　Ｃ２ｃ２ｐであってもよく、及びｃｒＲＮＡ配列は４４～４７ヌクレオチド長で、５’２９ｎｔダイレクトリピート（ＤＲ）及び１５ｎｔ～１８ｎｔスペーサーを有してもよい。
【０１７６】
特定の実施形態において、エフェクタータンパク質はレプトトリキア属種（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｓｐ．）Ｃ２ｃ２ｐ、好ましくはレプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｓｈａｈｉｉ）Ｃ２ｃ２ｐ、より好ましくはレプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｓｈａｈｉｉ）ＤＳＭ　１９７５７　Ｃ２ｃ２ｐであってもよく、及びｃｒＲＮＡ配列は４２～５８ヌクレオチド長で、少なくとも２４ｎｔの５’ダイレクトリピート、例えば５’２４～２８ｎｔダイレクトリピート（ＤＲ）及び少なくとも１４ｎｔのスペーサー、例えば１４ｎｔ～２８ｎｔスペーサー、又は少なくとも１８ｎｔ、例えば１９、２０、２１、２２ｎｔ、又はそれ以上、例えば１８～２８、１９～２８、２０～２８、２１～２８、又は２２～２８ｎｔのスペーサーを有してもよい。
【０１７７】
特定の例示的実施形態において、エフェクタータンパク質はレプトトリキア属種（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｓｐ．）、レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）Ｆ０２７９、又はリステリア属種（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｓｐ．）、好ましくはリステリア・ニューヨーケンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｎｅｗｙｏｒｋｅｎｓｉｓ）ＦＳＬ　Ｍ６－０６３５であってもよい。
【０１７８】
特定の例示的実施形態において、本発明のＣ２ｃ２エフェクタータンパク質には、限定なしに、以下の２１のオルソログ種（複数のＣＲＩＳＰＲ遺伝子座を含む：レプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｓｈａｈｉｉ）；レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）（Ｌｗ２）；リステリア・ゼーリゲリ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｓｅｅｌｉｇｅｒｉ）；ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＭＡ２０２０；ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＮＫ４Ａ１７９；［クロストリジウム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）］アミノフィルム（ａｍｉｎｏｐｈｉｌｕｍ）ＤＳＭ　１０７１０；カルノバクテリウム・ガリナルム（Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）ＤＳＭ　４８４７；カルノバクテリウム・ガリナルム（Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）ＤＳＭ　４８４７（

第２のＣＲＩＳＰＲ遺伝子座）；パルディバクター・プロピオニシゲネス（Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ ｐｒｏｐｉｏｎｉｃｉｇｅｎｅｓ）ＷＢ４；リステリア・ウェイヘンステファネンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｗｅｉｈｅｎｓｔｅｐｈａｎｅｎｓｉｓ）ＦＳＬ Ｒ９－０３１７；リステリア科（Ｌｉｓｔｅｒｉａｃｅａｅ）細菌ＦＳＬ Ｍ６－０６３５；レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ）Ｆ０２７９；ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）ＳＢ １００３；ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）Ｒ１２１；ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）ＤＥ４４２；レプトトリキア・ブッカリス（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｂｕｃｃａｌｉｓ）Ｃ－１０１３－ｂ；ハービニクス・ヘミセルロシリティカ（Ｈｅｒｂｉｎｉｘ ｈｅｍｉｃｅｌｌｕｌｏｓｉｌｙｔｉｃａ）；［ユーバクテリウム（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）］レクタレ（ｒｅｃｔａｌｅ）；ユーバクテリウム科（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）細菌ＣＨＫＣＩ００４；ブラウティア属種（Ｂｌａｕｔｉａ ｓｐ．）Ｍａｒｓｅｉｌｌｅ－Ｐ２３９８；及びレプトトリキア属種（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｐ．）口腔細菌分類群８７９株Ｆ０５５７が含まれる。１２の更なる非限定的な例は、ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＮＫ４Ａ１４４；クロロフレクサス・アグレガンス（Ｃｈｌｏｒｏｆｌｅｘｕｓ ａｇｇｒｅｇａｎｓ）；デメクイナ・アウランティアカ（Ｄｅｍｅｑｕｉｎａ ａｕｒａｎｔｉａｃａ）；タラソスピラ属種（Ｔｈａｌａｓｓｏｓｐｉｒａ ｓｐ．）ＴＳＬ５－１；シュードブチリビブリオ属種（Ｐｓｅｕｄｏｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｓｐ．）ＯＲ３７；ブチリビブリオ属種（Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｓｐ．）ＹＡＢ３００１；ブラウティア属種（Ｂｌａｕｔｉａ ｓｐ．）Ｍａｒｓｅｉｌｌｅ－Ｐ２３９８；レプトトリキア属種（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｐ．）Ｍａｒｓｅｉｌｌｅ－Ｐ３００７；バクテロイデス・イフエ（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ ｉｈｕａｅ）；ポルフィロモナス科（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｄａｃｅａｅ）細菌ＫＨ３ＣＰ３ＲＡ；リステリア・リパリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｒｉｐａｒｉａ）；及びインソリティスピリルム・ペレグリヌム（Ｉｎｓｏｌｉｔｉｓｐｉｒｉｌｌｕｍ ｐｅｒｅｇｒｉｎｕｍ）である。

【０１７９】

特定の実施形態において、本発明に係るＣ２ｃ２タンパク質は、本明細書の他の部分に定義するとおりのデッドＣ２ｃ２、スプリットＣ２ｃ２、不安定化Ｃ２ｃ２等を含め、異種／機能ドメインとの融合を有しても又は有しなくてもよい、以下の表に記載されるとおりのオルソログのうちの１つであるか、又はそれに由来し、又は以下の表に記載されるとおりのオルソログのうちの２つ以上のキメラタンパク質であるか、又は以下の表に記載されるとおりのオルソログのうちの１つの突然変異体若しくは変異体（又はキメラ突然変異体又は変異体）である。

【０１８０】

特定の例示的実施形態において、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質は以下の表１から選択される。

**表 1**

| **C2c2 オルソログ** | **コード** | **マルチレター** |
|---|---|---|
| *レプトトリキア・シャーイイ(Leptotrichia shahii)* | C2-2 | Lsh |
| *L. ウエイデイ(L. wadei)* F0279 (Lw2) | C2-3 | Lw2 |
| *リステリア・ゼーリゲリ(Listeria seeligeri)* | C2-4 | Lse |
| *ラクノスピラ科(Lachnospiraceae)*細菌 MA2020 | C2-5 | LbM |
| *ラクノスピラ科(Lachnospiraceae)*細菌 NK4A179 | C2-6 | LbNK179 |
| *クロストリジウム・アミノフィルム(Clostridium aminophilum)* DSM 10710 | C2-7 | Ca |
| *カルノバクテリウム・ガリナルム(Carnobacterium gallinarum)* DSM 4847 | C2-8 | Cg |
| *カルノバクテリウム・ガリナルム(Carnobacterium gallinarum)* DSM 4847 | C2-9 | Cg2 |
| *パルディバクター・プロピオニシゲネス(Paludibacter propionicigenes)* WB4 | C2-10 | Pp |
| *リステリア・ウェイヘンステファネンシス(Listeria weihenstephanensis)* FSL R9-0317 | C2-11 | Lwei |
| *リステリア科(Listeriaceae)*細菌 FSL M6-0635 | C2-12 | LbFSL |
| *レプトトリキア・ウエイデイ(Leptotrichia wadei)* F0279 | C2-13 | Lw |

| | | |
|---|---|---|
| *ロドバクター・カプスラータス(Rhodobacter capsulatus)* SB 1003 | C2-14 | Rc |
| *ロドバクター・カプスラータス(Rhodobacter capsulatus)* R121 | C2-15 | Rc |
| *ロドバクター・カプスラータス(Rhodobacter capsulatus)* DE442 | C2-16 | Rc |
| *レプトトリキア・ブッカリス(Leptotrichia buccalis)* C-1013-b | C2-17 | LbuC2c2 |
| *ハービニクス・ヘミセルロシリティクス(Herbinix hemicellulosilytics)* | C2-18 | HheC2c2 |
| *ユーバクテリウム・レクターレ(Eubacterium rectale)* | C2-19 | EreC2c2 |
| *ユーバクテリウム科(Eubacteriaceae)*細菌 CHKC1004 | C2-20 | EbaC2c2 |
| *ブラウティア属種(Blautia sp.)* Marseille-P2398 | C2-21 | BsmC2c2 |
| *レプトトリキア属種(Leptotrichia sp.)*口腔細菌分類群 879 株 F0557 | C2-22 | LspC2c2 |
| *ラクノスピラ科(Lachnospiraceae)*細菌 NK4a144 | | |
| クロロフレクサス・アグレガンス(Chloroflexus aggregans) | | |
| デメクイナ・アウランティアカ(Demequina aurantiaca) | | |
| タラソスピラ属種(Thalassospira sp.) TSL5-1 | | |
| シュードブチリビブリオ属種(Pseudobutyrivibrio sp.) OR37 | | |
| ブチリビブリオ属種(Butyrivibrio sp.) YAB3001 | | |
| ブラウティア属種(Blautia sp.) Marseille-P2398 | | |
| レプトトリキア属種(Leptotrichia sp.) Marseille-P300 | | |
| バクテロイデス・イフエ(Bacteroides ihuae) | | |
| ポルフィロモナス科(Porphyromonadaceae)細菌 KH3CP3RA | | |
| リステリア・リパリア(Listeria riparia) | | |
| インソリティスピリルム・ペレグリヌム(Insolitispirillum peregrinum) | | |

【０１８１】

上記の種の野生型タンパク質配列を以下の表２に掲載する。特定の実施形態において、Ｃ２ｃ２タンパク質をコードする核酸配列が提供される。

表 2

| | | |
|---|---|---|
| C2c2-2 | | *L. シャーイイ(L. shahii)* |
| C2c2-2 | | *L. シャーイイ(L. shahii)* |
| c2c2-3 | | *L. ウエイデイ(L. wadei)* (Lw2) |
| c2c2-4 | | *リステリア・ゼーリゲリ(Listeria seeligeri)* (配列番号 3) |
| c2c2-5 | 1 | *ラクノスピラ科(Lachnospiraceae)*細菌 MA2020 (配列番号 4) |
| c2c2-6 | 2 | *ラクノスピラ科(Lachnospiraceae)*細菌 NK4A179 |
| c2c2-7 | 3 | *クロストリジウム・アミノフィルム(Clostridium aminophilum)* DSM 10710 |
| c2c2-8 | 5 | *カルノバクテリウム・ガリナルム(Carnobacterium gallinarum)* DSM 4847 |
| c2c2-9 | 6 | *カルノバクテリウム・ガリナルム(Carnobacterium gallinarum)* DSM 4847 (配列番号 8) |
| c2c2-10 | 7 | *パルディバクター・プロピオニシゲネス(Paludibacter propionicigenes)* WB4 (配列番号 9) |
| c2c2-11 | 9 | *リステリア・ウェイヘンステファネンシス(Listeria weihenstephanensis)* FSL R9-0317 |
| c2c2-12 | 10 | *リステリア科(Listeriaceae)*細菌 FSL M6-0635 = *リステリア・ニューヨーケンシス(Listeria newyorkensis)* FSL M6-0635 (配列番号 11) |
| c2c2-13 | 12 | *レプトトリキア・ウエイデイ(Leptotrichia wadei)* F0279 (配列番号 12) |
| c2c2-14 | 15 | *ロドバクター・カプスラータス(Rhodobacter capsulatus)* SB 1003 (配列番号 13) |
| c2c2-15 | 16 | *ロドバクター・カプスラータス(Rhodobacter capsulatus)* R121 (配列番号 14) |
| c2c2-16 | 17 | *ロドバクター・カプスラータス(Rhodobacter capsulatus)* DE442 (配列番号 15) |

| | | |
|---|---|---|
| LbuC2c2 (C2-17) | | レプトトリキア・ブッカリス(Leptorichia buccalis) C-1013-b (配列番号 309) |
| HheC2c2 (C2-18) | | ハービニクス・ヘミセルロシリティカ(Herbinix hemicellulosilytica) (配列番号 310) |
| EreC2c2 (C2-19) | | ユーバクテリウム・レクターレ(Eubacterium rectale) (配列番号 311) |
| EbaC2C2 (C2-20) | | ユーバクテリウム科(Eubacteriaceae)細菌 CHKCI004 (配列番号 312) |
| C2c2 (C2-21) | | ブラウティア属種(Blautia sp.) Marseille-P2398 (配列番号 319 |
| C2c2 (C2-22) | | レプトトリキア属種(Leptotrichia sp.)口腔細菌分類群 879 株 F0557 (配列番号 579) |
| C2c2 NK4A144 (C2-23) | | ラクノスピラ科(Lachnospiraceae)細菌 NK4A144 (配列番号 313) |
| C2c2 Chloro_agg (C2-24) | | RNA 結合タンパク質 S1 クロロフレクサス・アグレガンス (Chloroflexus aggregans) (配列番号 314) |
| C2c2 Dem_Aur (C2-25) | | デメクイナ・アウランティアカ(Demequina aurantiaca) (配列番号 315) |
| C2c2 Thal_Sp_TSL5 (C2-26) | | タラソスピラ属種(Thalassospira sp.) TSL5-1 (配列番号 316) |
| C2c2 Pseudo_sp (C2-27) | | シュードブチリビブリオ属種(Pseudobutyrivibrio sp.) OR37 (配列番号 317) |
| C2c2_Buty_sp (C2-28) | | ブチリビブリオ属種(Butyrivibrio sp.) YAB3001 (配列番号 318) |

| | | |
|---|---|---|
| C2c2_Blautia_sp (C2-29) | | ブラウティア属種(Blautia sp.) Marseille-P2398(配列番号478) |
| C2c2_Lepto_sp_Marseille (C2-30) | | レプトトリキア属種(Leptotrichia sp.) Marseille-P3007 (配列番号320) |
| C2c2_Bacteroides_ihuae (C2-31) | | バクテロイデス・イフエ(Bacteroides ihuae) (配列番号321) |
| C2c2_Porph_bacterium (C2-32) | | ポルフィロモナス科(Porphyromonadaceae)細菌 KH3CP3RA(配列番号322) |
| C2c2_Listeria_riparia (C2-33) | | リステリア・リパリア(Listeria riparia) (配列番号323) |
| C2c2_insolitis_peregrinum (C2-34) | | インソリティスピリルム・ペレダリヌム(Insolitispirillum peregrinum) (配列番号324) |

【０１８２】
本発明のある実施形態において、レプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ）Ｃ２ｃ２、ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＭＡ２０２０ Ｃ２ｃ２、ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌ＮＫ４Ａ１７９ Ｃ２ｃ２、クロストリジウム・アミノフィルム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ａｍｉｎｏｐｈｉｌｕｍ）（ＤＳＭ １０７１０）Ｃ２ｃ２、カルノバクテリウム・ガリナルム（Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）（ＤＳＭ ４８４７）Ｃ２ｃ２、パルディバクター・プロピオニシゲネス（Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ ｐｒｏｐｉｏｎｉｃｉｇｅｎｅｓ）（ＷＢ４）Ｃ２ｃ２、リステリア・ウェイヘンステファネンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｗｅｉｈｅｎｓｔｅｐｈａｎｅｎｓｉｓ）（ＦＳＬ Ｒ９－０３１７）Ｃ２ｃ２、リステリア科（Ｌｉｓｔｅｒｉａｃｅａｅ）細菌（ＦＳＬ Ｍ６－０６３５）Ｃ２ｃ２、リステリア・ニューヨーケンシス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｎｅｗｙｏｒｋｅｎｓｉｓ）（ＦＳＬ Ｍ６－０６３５）Ｃ２ｃ２、レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ）（Ｆ０２７９）Ｃ２ｃ２、ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）（ＳＢ １００３）Ｃ２ｃ２、ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）（Ｒ１２１）Ｃ２ｃ２、ロドバクター・カプスラータス（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ）（ＤＥ４４２）Ｃ２ｃ２、レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ）（Ｌｗ２）Ｃ２ｃ２、又はリステリア・ゼーリゲリ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｓｅｅｌｉｇｅｒｉ）Ｃ２ｃ２のいずれかの野生型配列と少なくとも８０％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むエフェクタータンパク質が提供される。
【０１８３】
本発明のある実施形態において、エフェクタータンパク質は、限定はされないが本明細書に記載されるコンセンサス配列を含むＶＩ型エフェクタータンパク質コンセンサス配列と少なくとも８０％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含む。
【０１８４】
本発明によれば、複数のＣ２ｃ２オルソログからコンセンサス配列を生成することができ、これは、限定はされないがＣ２ｃ２機能を媒介するＣ２ｃ２オルソログの触媒残基及

びＨＥＰＮモチーフを含め、保存アミノ酸残基、及びモチーフの位置を突き止める助けとなり得る。Ｇｅｎｅｉｏｕｓアラインメントを用いて上述の３３個のオルソログから生成された一つのかかるコンセンサス配列は以下である：

【化１】

MKISKVXXXVXKKXXXGKLXKXVNERNRXAKRLSNXLBKYIXXIDKIXKKEXXKK
FXAXEEITLKLNQXXXBXLXKAXXDLRKDNXYSXJKKILHNEDINXEEXELLINDXL
EKLXKIESXKYSYQKXXXNYXMSVQEHSKKSIXRIXESAKRNKEALDKFLKEYAXL
DPRMEXLAKLRKLLELYFYFKNDXIXXEEEXNVXXHKXLKENHPDFVEXXXNKEN
AELNXYAIEXKKJLKYYFPXKXAKNSNDKIFEKQELKKXWIHQJENAVERILLXXGK
VXYKLQXGYLAELWKIRINEIFIKYIXVGKAVAXFALRNXXKBENDILGGKIXKKLN
GITSFXYEKIKAEEILQREXAVEVAFAANXLYAXDLXXIRXSILQFFGGASNWDXFLF
FHFATSXISDKKWNAELIXXKKJGLVIREKLYSNNVAMFYSKDDLEKLLNXLXXFXL
RASQVPSFKKVYVRXBFPQNLLKKFNDEKDDEAYSAXYYLLKEIYYNXFLPYFSAN
NXFFFXVKNLVLKANKDKFXXAFXDIREMNXGSPIEYLXXTQXNXXNEGRKKEEKE
XDFIKFLLQIFXKGFDDYLKNNXXFILKFIPEPTEXIEIXXELQAWYIVGKFLNARKXN
LLGXFXSYLKLLDDIELRALRNENIKYQSSNXEKEVLEXCLELIGLLSLDLNDYFBDE
XDFAXYJGKXLDFEKKXMKDLAELXPYDQNDGENPIVNRNIXLAKKYGTLNLLEKJ
XDKVSEKEIKEYYELKKEIEEYXXKGEELHEEWXQXKNRVEXRDILEYXEELXGQII
NYNXLXNKVLLYFQLGLHYLLLDILGRLVGYTGIWERDAXLYQIAAMYXNGLPEYI
XXKKNDKYKDGQIVGXKINXFKXDKKXLYNAGLELFENXNEHKNIXIRNYIAHFNY
LSKAESSLLXYSENLRXLFSYDRKLKNAVXKSLINILLRHGMVLKFKFGTDKKSVXIR
SXKKIXHLKSIAKKLYYPEVXVSKEYCKLVKXLLKYK (配列番号325)

【０１８５】

別の非限定的な例において、コンセンサス配列の生成及び保存残基の同定を補助する配列アラインメントツールはＭＵＳＣＬＥアラインメントツール（ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｍｓａ／ｍｕｓｃｌｅ／）である。例えば、ＭＵＳＣＬＥを使用すると、Ｃ２ｃ２オルソログ間で保存されている以下のアミノ酸位置をレプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）Ｃ２ｃ２において同定することができる：Ｋ２；Ｋ５；Ｖ６；Ｅ３０１；Ｌ３３１；Ｉ３３５；Ｎ３４１；Ｇ３５１；Ｋ３５２；Ｅ３７５；Ｌ３９２；Ｌ３９６；Ｄ４０３；Ｆ４４６；Ｉ４６６；Ｉ４７０；Ｒ４７４（ＨＥＰＮ）；Ｈ４７５；Ｈ４７９（ＨＥＰＮ）、Ｅ５０８；Ｐ５５６；Ｌ５６１；Ｉ５９５；Ｙ５９６；Ｆ６００；Ｙ６６９；Ｉ６７３；Ｆ６８１；Ｌ６８５；Ｙ７６１；Ｌ６７６；Ｌ７７９；Ｙ７８２；Ｌ８３６；Ｄ８４７；Ｙ８６３；Ｌ８６９；Ｉ８７２；Ｋ８７９；Ｉ９３３；Ｌ９５４；Ｉ９５８；Ｒ９６１；Ｙ９６５；Ｅ９７０；Ｒ９７１；Ｄ９７２；Ｒ１０４６（ＨＥＰＮ）、Ｈ１０５１（ＨＥＰＮ）、Ｙ１０７５；Ｄ１０７６；Ｋ１０７８；Ｋ１０８０；Ｉ１０８３；Ｉ１０９０。

【０１８６】

高度に保存された残基を示すＨＥＰＮドメインの例示的配列アラインメントを図５０に示す。

【０１８７】

特定の例示的実施形態において、ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ１３ｂ及びグループ２９又はグループ３０タンパク質などのＶＩ－Ｂ型エフェクター

タンパク質である。特定の例示的実施形態では、ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質は１つ以上のＨＥＰＮドメインを含む。特定の例示的実施形態では、ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質は、Ｃ末端ＨＥＰＮドメイン、Ｎ末端ＨＥＰＮドメイン、又は両方を含む。本発明のコンテクストで使用し得る例示的ＶＩ－Ｂ型エフェクタータンパク質に関しては、「Ｎｏｖｅｌ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｅｎｚｙｍｅｓ　ａｎｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ」と題される２０１６年１０月２１日に出願された米国特許出願第１５／３３１，７９２号明細書、「Ｎｏｖｅｌ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｅｎｚｙｍｅｓ　ａｎｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ」と題される２０１６年１０月２１日に出願された国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０５８３０２号明細書、及びＳｍａｒｇｏｎ　ｅｔ　ａｌ．「Ｃａｓ１３ｂはアクセサリータンパク質Ｃｓｘ２７及びＣｓｘ２８によって異なる形で調節されるＶＩ－Ｂ型ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド下ＲＮａｓｅである（Ｃａｓ１３ｂ　ｉｓ　ａ　Ｔｙｐｅ　ＶＩ－Ｂ　ＣＲＩＳＰＲ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ＲＮＡ－Ｇｕｉｄｅｄ　ＲＮａｓｅ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌｌｙ　ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ｂｙ　ａｃｃｅｓｓｏｒｙ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　Ｃｓｘ２７　ａｎｄ　Ｃｓｘ２８）」Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ，６５，１－１３（２０１７）；ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ｍｏｌｃｅｌ．２０１６．１２．０２３、及び「Ｎｏｖｅｌ　Ｃａｓ１３ｂ　Ｏｒｔｈｏｌｏｇｕｅｓ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｅｎｚｙｍｅｓ　ａｎｄ　Ｓｙｓｔｅｍ」と題される２０１７年３月１５日に出願された譲渡予定の米国仮特許出願が参照される。詳細な実施形態において、Ｃａｓ１３ｂ酵素はバージイエラ・ズーヘルカム（Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ　ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ）に由来する。特定の他の例示的実施形態において、エフェクタータンパク質は、表３に掲載される配列のいずれかと少なくとも８０％の配列相同性を有するアミノ酸配列であるか、又はそれを含む。

表３

| | |
|---|---|
| B-01 | バージイエラ・ズーヘルカム(Bergeyella zoohelcum) |
| B-02 | プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) |
| B-03 | プレボテラ・ブッカエ(Prevotella buccae) |
| B-04 | アリスティペス属種(Alistipes sp.) ZOR0009 |
| B-05 | プレボテラ属種(Prevotella sp.) MA2016 |
| B-06 | リエメレラ・アナティペステイファー(Riemerella anatipestifer) |
| B-07 | プレボテラ・アウランティアカ(Prevotella aurantiaca) |
| B-08 | プレボテラ・サッカロリティカ(Prevotella saccharolytica) |
| B-09 | プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) |
| B-10 | キャプノサイトファーガ・カニモルサス(Capnocytophaga canimorsus) |
| B-11 | ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae) |
| B-12 | プレボテラ属種(Prevotella sp.) P5-125 |
| B-13 | フラボバクテリウム・ブランキオフィルム(Flavobacterium branchiophilum) |
| B-14 | ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) |
| B-15 | プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) |

【０１８８】

特定の例示的実施形態において、Ｃａｓ１３ｂオルソログの野生型配列は、以下の表４ａ又は表４ｂが参照される。

表 4a

| | |
|---|---|
| バージイエラ・ズーヘルカム(Bergeyella zoohelcum) (配列番号 326) | 1 |
| プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) (配列番号 327) | 2 |
| プレボテラ・ブッカエ(Prevotella buccae) (配列番号 328) | 3 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 329) | 4 |
| バクテロイデス・ピオゲネス(Bacteroides pyogenes) (配列番号 330) | 5 |
| アリスティペス属種(Alistipes sp.) ZOR0009 (配列番号 331) | 6 |
| プレボテラ属種(Prevotella sp.) MA2016 (配列番号 332) | 7a |
| プレボテラ属種(Prevotella sp.) MA2016 (配列番号 333) | 7b |
| リエメレラ・アナティペスティファー(Riemerella anatipestifer) (配列番号 334) | 8 |
| プレボテラ・アウランティアカ(Prevotella aurantiaca) (配列番号 335) | 9 |
| プレボテラ・サッカロリティカ(Prevotella saccharolytica) (配列番号 336) | 10 |
| HMPREF9712_03108 [ミロイデス・オドラティミマス(Myroides odoratimimus) CCUG 10230] (配列番号 337) | 11 |
| プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) (配列番号 338) | 12 |
| キャプノサイトファーガ・カニモルサス(Capnocytophaga canimorsus) (配列番号 339) | 13 |
| ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae) (配列番号 340) | 14 |
| プレボテラ属種(Prevotella sp.) P5-125 (配列番号 341) | 15 |
| フラボバクテリウム・ブランキオフィルム(Flavobacterium branchiophilum) (配列番号 342) | 16 |
| ミロイデス・オドラティミマス(Myroides odoratimimus) (配列番号 343) | 17 |
| フラボバクテリウム・コルムナレ(Flavobacterium columnare) (配列番号 344) | 18 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 345) | 19 |
| ポルフィロモナス属種(Porphyromonas sp.) COT-052 OH4946 (配列番号 346) | 20 |
| プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) (配列番号 347) | 21 |
| PIN17_0200 [プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) 17] (配列番号 348) | AFJ07523 |
| プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) (配列番号 349) | BAU18623 |
| HMPREF6485_0083 [プレボテラ・ブッカエ(Prevotella buccae) ATCC 33574] (配列番号 350) | EFU31981 |
| HMPREF9144_1146 [プレボテラ・パレンス(Prevotella pallens) ATCC 700821] (配列番号 351) | EGQ18444 |
| HMPREF9714_02132 [ミロイデス・オドラティミマス(Myroides odoratimimus) CCUG 12901] (配列番号 352) | EHO08761 |
| HMPREF9711_00870 [ミロイデス・オドラティミマス(Myroides odoratimimus) CCUG 3837] (配列番号 353) | EKB06014 |
| HMPREF9699_02005 [バージイエラ・ズーヘルカム(Bergeyella zoohelcum) ATCC 43767] (配列番号 354) | EKB54193 |
| HMPREF9151_01387 [プレボテラ・サッカロリティカ(Prevotella saccharolytica) F0055] (配列番号 355) | EKY00089 |
| A343_1752 [ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) JCVI SC001] (配列番号 356) | EOA10535 |
| HMPREF1981_03090 [バクテロイデス・ピオゲネス(Bacteroides pyogenes) F0041] (配列番号 357) | ERI81700 |
| HMPREF1553_02065 [ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) F0568] (配列番号 358) | ERJ65637 |
| HMPREF1988_01768 [ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) F0185] (配列番号 359) | ERJ81987 |
| HMPREF1990_01800 [ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) W4087] (配列番号 360) | ERJ87335 |
| M573_117042 [プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) ZT] (配列番号 361) | KJJ86756 |
| A2033_10205 [バクテロイデス門(Bacteroidetes)細菌 GWA2_31_9] (配列番号 362) | OFX18020.1 |
| SAMN05421542_0666 [クリセオバクテリウム・ジェジュエンス (Chryseobacterium jejuense)] (配列番号 363) | SDI27289.1 |
| SAMN05444360_11366 [クリセオバクテリウム・カルニプロラム (Chryseobacterium carnipullorum)] (配列番号 364) | SHM52812.1 |
| SAMN05421786_1011119 [クリセオバクテリウム・ウレイリチカム (Chryseobacterium ureilyticum)] (配列番号 365) | SIS70481.1 |
| プレボテラ・ブッカエ(Prevotella buccae) (配列番号 366) | WP_004343581 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 367) | WP_005873511 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 368) | WP_005874195 |
| プレボテラ・パレンス(Prevotella pallens) (配列番号 369) | WP_006044833 |
| ミロイデス・オドラティミマス(Myroides odoratimimus) (配列番号 370) | WP_006261414 |
| ミロイデス・オドラティミマス(Myroides odoratimimus) (配列番号 371) | WP_006265509 |
| プレボテラ属種(Prevotella sp.) MSX73 (配列番号 372) | WP_007412163 |

| | |
|---|---|
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 373) | WP_012458414 |
| パルディバクター・プロピオニシゲネス(Paludibacter propionicigenes) (配列番号 374) | WP_013446107 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 375) | WP_013816155 |
| フラボバクテリウム・コルムナレ(Flavobacterium columnare) (配列番号 376) | WP_014165541 |
| サイクロフレクサス・トークイス(Psychroflexus torquis) (配列番号 377) | WP_015024765 |
| リエメレラ・アナティペステイファー(Riemerella anatipestifer) (配列番号 378) | WP_015345620 |
| プレボテラ・プリューリティディス(Prevotella pleuritidis) (配列番号 379) | WP_021584635 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 380) | WP_021663197 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 381) | WP_021665475 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 382) | WP_021677657 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 383) | WP_021680012 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 384) | WP_023846767 |
| プレボテラ・ファルセニイ(Prevotella falsenii) (配列番号 385) | WP_036884929 |
| プレボテラ・プリューリティディス(Prevotella pleuritidis) (配列番号 386) | WP_036931485 |
| [ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 387) | WP_039417390 |
| ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae) (配列番号 388) | WP_039418912 |
| ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae) (配列番号 389) | WP_039419792 |
| ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae) (配列番号 390) | WP_039426176 |
| ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae) (配列番号 391) | WP_039431778 |
| ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae) (配列番号 392) | WP_039437199 |
| ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae) (配列番号 393) | WP_039442171 |
| ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae) (配列番号 394) | WP_039445055 |
| キャプノサイトファーガ・シノデグミ(Capnocytophaga cynodegmi) (配列番号 395) | WP_041989581 |
| プレボテラ属種(Prevotella sp.) P5-119 (配列番号 396) | WP_042518169 |
| プレボテラ属種(Prevotella sp.) P4-76 (配列番号 397) | WP_044072147 |
| プレボテラ属種(Prevotella sp.) P5-60 (配列番号 398) | WP_044074780 |
| フェオダクチリバクター・キシアメネンシス(Phaeodactylibacter xiamenensis) (配列番号 399) | WP_044218239 |
| フラボバクテリウム属(Flavobacterium) sp. 316 (配列番号 400) | WP_045968377 |
| ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae) (配列番号 401) | WP_046201018 |
| WP_047431796 (配列番号 402) | クリセオバクテリウム属種 (Chryseobacterium sp.) YR477 |
| リエメレラ・アナティペステイファー(Riemerella anatipestifer) (配列番号 403) | WP_049354263 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 404) | WP_052912312 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 405) | WP_058019250 |
| フラボバクテリウム・コルムナレ(Flavobacterium columnare) (配列番号 406) | WP_060381855 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 407) | WP_061156470 |
| ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) (配列番号 408) | WP_061156637 |
| リエメレラ・アナティペステイファー(Riemerella anatipestifer) (配列番号 409) | WP_061710138 |
| フラボバクテリウム・コルムナレ(Flavobacterium columnare) (配列番号 410) | WP_063744070 |
| リエメレラ・アナティペステイファー(Riemerella anatipestifer) (配列番号 411) | WP_064970887 |
| シノミクロビウム・オセアニ(Sinomicrobium oceani) (配列番号 412) | WP_072319476.1 |
| レイケンバキエラ・アガリペルフォランス(Reichenbachiella agariperforans) (配列番号 413) | WP_073124441.1 |

**表 4b**

| 名称又は受託番号 |
|---|
| WP_015345620 (配列番号 479) |
| WP_049354263 (配列番号 480) |
| WP_061710138 (配列番号 481) |
| 6 (配列番号 482) アリスティペス属種(Alistipes sp.) ZOR0009 |
| SIS70481.1 |
| 15 プレボテラ属種(Prevotella sp.) (配列番号 484) |
| WP_042518169 (配列番号 485) |
| WP_044072147 (配列番号 486) |
| WP_044074780 (配列番号 487) |
| 8_(修飾) (配列番号 488) |
| WP_064970887 (配列番号 489) |
| 5 (配列番号 490) |
| ERI81700 (配列番号 491) |
| WP_036931485 (配列番号 492) |
| 19 (配列番号 493) |
| WP_012458414 (配列番号 494) |
| WP_013816155 (配列番号 495) |
| WP_039417390 (配列番号 496) |
| WP_039419792 (配列番号 497) |
| WP_039426176 (配列番号 498) |
| WP_039437199 (配列番号 499) |
| WP_061156470 (配列番号 500) |
| 12 (配列番号 501) |
| 9 (配列番号 502) |
| EGQ18444 (配列番号 503) |
| KJJ86756 (配列番号 504) |
| WP_006044833 (配列番号 505) |
| 2 (配列番号 506) |
| 3 (配列番号 507) |
| EFU31981 (配列番号 508) |
| WP_004343581 (配列番号 509) |
| WP_007412163 (配列番号 510) |
| WP_044218239 (配列番号 511) |
| 21 (配列番号 512) |
| BAU18623 (配列番号 513) |
| WP_036884929 (配列番号 514) |
| WP_073124441.1 (配列番号 515) |
| AFJ07523 (配列番号 516) |
| 4 (配列番号 517) |
| ERJ65637 (配列番号 518) |

| |
|---|
| ERJ81987 (配列番号 519) |
| ERJ87335 (配列番号 520) |
| WP_005873511 (配列番号 521) |
| WP_021663197 (配列番号 522) |
| WP_021665475 (配列番号 523) |
| WP_021677657 (配列番号 524) |
| WP_021680012 (配列番号 525) |
| WP_023846767 (配列番号 526) |
| WP_039445055 (配列番号 527) |
| WP_061156637 (配列番号 528) |
| WP_021584635 (配列番号 529) |
| WP_015024765 (配列番号 530) |
| WP_047431796 (配列番号 531) |
| WP_072319476.1 (配列番号 532) |
| 16 (配列番号 533) |
| EKY00089 (配列番号 534) |
| 10 (配列番号 535) |
| WP_013446107 (配列番号 536) |
| WP_045968377 (配列番号 537) |
| SHM52812.1 (配列番号 538) |
| EHO08761 (配列番号 539) |
| EKB06014 (配列番号 540) |
| WP_006261414 (配列番号 541) |
| WP_006265509 (配列番号 542) |
| 11 (配列番号 543) |
| 17 (配列番号 544) |
| OFX18020.1 (配列番号 545) |
| SDI27289.1 (配列番号 546) |
| WP_039442171 (配列番号 547) |
| 14 (配列番号 548) |
| 20 (配列番号 549) |
| EOA10535 (配列番号 550) |
| WP_005874195 (配列番号 551) |
| WP_039418912 (配列番号 552) |
| WP_039431778 (配列番号 553) |
| WP_046201018 (配列番号 554) |
| WP_052912312 (配列番号 555) |
| WP_058019250 (配列番号 556) |
| WP_014165541 (配列番号 557) |
| 13 (配列番号 558) |
| WP_060381855 (配列番号 559) |
| WP_063744070 (配列番号 560) |
| 18 (配列番号 561) |
| WP_041989581 (配列番号 562) |
| 1 (配列番号 563) |
| EKB54193 (配列番号 564) |
| 7_(修飾) (配列番号 565) |
| 7_(修飾)_-_残基_のみ (配列番号 566) |

【０１８９】

特定の例示的実施形態において、ＲＮＡターゲティングエフェクタータンパク質は、２０１７年６月２６日に出願された米国仮特許出願第６２／５２５，１６５号明細書、及び２０１７年８月１６日に出願されたＰＣＴ出願の米国特許出願公開第２０１７／０４７１９３号明細書に開示されるとおりのＣａｓ１３ｃエフェクタータンパク質である。Ｃａｓ１３ｃの例示的野生型オルソログ配列を以下の表５に提供する。

表５

| 名称 |
|---|
| EHO19081 (配列番号 567) |
| WP_094899336 (配列番号 568) |
| WP_040490876 (配列番号 569) |
| WP_047396607 (配列番号 570) |
| WP_035935671 (配列番号 571) |
| WP_035906563 (配列番号 572) |
| WP_042678931 (配列番号 573) |
| WP_062627846 (配列番号 574) |
| WP_005959231 (配列番号 575) |
| WP_027128616 (配列番号 576) |
| WP_062624740 (配列番号 577) |
| WP_096402050 (配列番号 578) |

【０１９０】

特定の例示的実施形態において、Ｃａｓ１３タンパク質は、以下のいずれかから選択され得る。

表 6

| ID | 種 | 配列番号 |
|---|---|---|
| Cas13a1 | レプトトリキア・シャーイイ(Leptotrichia shahii) | 580 |
| Cas13a2 | レプトトリキア・ウエイデイ(Leptotrichia wadei) (Lw2) | 581 |
| Cas13a3 | リステリア・ゼーリゲリ(Listeria seeligeri) | 582 |
| Cas13a4 | ラクノスピラ科(Lachnospiraceae)細菌 MA2020 | 583 |
| Cas13a5 | ラクノスピラ科(Lachnospiraceae)細菌 NK4A179 | 584 |
| Cas13a6 | [クロストリジウム(Clostridium)]アミノフィルム (aminophilum) DSM 10710 | 585 |
| Cas13a7 | カルノバクテリウム・ガリナルム(Carnobacterium gallinarum) DSM 4847 | 586 |
| Cas13a8 | カルノバクテリウム・ガリナルム(Carnobacterium gallinarum) DSM 4847 | 587 |
| Cas13a9 | パルディバクター・プロピオニシゲネス(Paludibacter propionicigenes) WB4 | 588 |
| Cas13a10 | リステリア・ウェイヘンステファネンシス(Listeria weihenstephanensis) FSL R9-0317 | 589 |
| Cas13a11 | リステリア科(Listeriaceae)細菌 FSL M6-0635 | 590 |
| Cas13a12 | レプトトリキア・ウエイデイ(Leptotrichia wadei) F0279 | 591 |
| Cas13a13 | ロドバクター・カプスラータス(Rhodobacter capsulatus) SB 1003 | 592 |
| Cas13a14 | ロドバクター・カプスラータス(Rhodobacter capsulatus) R121 | 593 |
| Cas13a15 | ロドバクター・カプスラータス(Rhodobacter capsulatus) DE442 | 594 |
| Cas13a16 | レプトトリキア・ブッカリス(Leptotrichia buccalis) C-1013-b | 595 |
| Cas13a17 | ハービニクス・ヘミセルロシリティカ(Herbinix hemicellulosilytica) | 596 |
| Cas13a18 | [ユーバクテリウム(Eubacterium)]レクタレ(rectale) | 597 |

| | | |
|---|---|---|
| Cas13a19 | ユーバクテリウム科(Eubacteriaceae)細菌 CHKCI004 | 598 |
| Cas13a20 | ブラウティア属種(Blautia sp.) Marseille-P2398 | 599 |
| Cas13a21 | レプトトリキア属種(Leptotrichia sp.)口腔細菌分類群 879 株 F0557 | 600 |
| Cas13b1 | バージイエラ・ズーヘルカム(Bergeyella zoohelcum) | 601 |
| Cas13b2 | プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) | 602 |
| Cas13b3 | プレボテラ・ブッカエ(Prevotella buccae) | 603 |
| Cas13b4 | アリスティペス属種(Alistipes sp.) ZOR0009 | 604 |
| Cas13b5 | プレボテラ属種(Prevotella sp.) MA2016 | 605 |
| Cas13b6 | リエメレラ・アナティペステイファー(Riemerella anatipestifer) | 606 |
| Cas13b7 | プレボテラ・アウランティアカ(Prevotella aurantiaca) | 607 |
| Cas13b8 | プレボテラ・サッカロリティカ(Prevotella saccharolytica) | 608 |
| Cas13b9 | プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) | 609 |
| Cas13b10 | キャプノサイトファーガ・カニモルサス(Capnocytophaga canimorsus) | 610 |
| Cas13b11 | ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae) | 611 |
| Cas13b12 | プレボテラ属種(Prevotella sp.) P5-125 | 612 |
| Cas13b13 | フラボバクテリウム・ブランキオフィルム(Flavobacterium branchiophilum) | 613 |
| Cas13b14 | ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis) | 614 |
| Cas13b15 | プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) | 615 |
| Cas13c1 | フソバクテリウム・ネクロホラム亜種ファンデュリフォルメ(Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme) ATCC 51357 コンティグ 00003 | 616 |
| Cas13c2 | フソバクテリウム・ネクロホラム(Fusobacterium necrophorum) DJ-2 コンティグ 0065, 全ゲノムショットガン配列 | 617 |
| Cas13c3 | フソバクテリウム・ネクロホラム(Fusobacterium necrophorum) BFTR-1 コンティグ 0068 | 618 |
| Ca13c4 | フソバクテリウム・ネクロホラム亜種ファンデュリフォルメ(Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme) 1_1_36S コンティグ 1.14 | 619 |
| Cas13c5 | フゾバクテリウム・パーフォエテンス(Fusobacterium perfoetens) ATCC 29250 T364DRAFT_スキャフォールド 00009.9_C | 620 |
| Cas13c6 | フゾバクテリウム・ウルセランス(Fusobacterium ulcerans) ATCC 49185 コンティグ 2.38 | 621 |
| Cas13c7 | アネロサリバクター属種(Anaerosalibacter sp.) ND1 ゲノムアセンブリ アネロサリバクター・マッシリエンシス(Anaerosalibacter massiliensis) ND1 | 622 |

【０１９１】

ガイド配列

本明細書で使用されるとき、用語「ガイド配列」、「ｃｒＲＮＡ」、「ガイドＲＮＡ」、又は「シングルガイドＲＮＡ」、又は「ｇＲＮＡ」は、標的核酸配列とハイブリダイズして、ガイド配列とＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質とを含むＲＮＡターゲティング複合体による標的核酸配列への配列特異的結合を誘導するのに十分な標的核酸配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを指す。一部の例示的実施形態において、相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントしたとき、約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％

、９７．５％、９９％以上であるか、又はそれより高い。最適アラインメントは、配列のアラインメントに好適な任意のアルゴリズムを用いて決定することができ、その非限定的な例としては、スミス－ウォーターマンアルゴリズム、ニードルマン－ブンシュアルゴリズム、バローズ・ホイーラー変換に基づくアルゴリズム（例えばバローズ－ホイーラーアライナー）、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｘ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；ｗｗｗ．ｎｏｖｏｃｒａｆｔ．ｃｏｍにおいて利用可能）、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎにおいて利用可能）、及びＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔにおいて利用可能）が挙げられる。（核酸ターゲティングガイドＲＮＡ中の）ガイド配列が標的核酸配列への核酸ターゲティング複合体の配列特異的結合を導く能力は、任意の好適なアッセイによって評価し得る。例えば、核酸ターゲティング複合体を形成するのに十分な核酸ターゲティングＣＲＩＳＰＲ系の構成成分が、試験しようとするガイド配列を含め、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞へと、核酸ターゲティング複合体の構成成分をコードするベクターのトランスフェクションによるなどして提供されてもよく、続いて本明細書に記載されるとおりのＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイなどにより、標的核酸配列内における優先的なターゲティング（例えば、切断）を評価し得る。同様に、標的核酸配列の切断は、標的核酸配列、試験しようとするガイド配列を含めた核酸ターゲティング複合体の構成成分、及び供試ガイド配列と異なる対照ガイド配列を提供して、それらの供試ガイド配列と対照ガイド配列との反応間で標的配列における結合又は切断速度を比較することにより、試験管内で判定することができる。他のアッセイも可能であり、当業者には想起されるであろう。ガイド配列、ひいては核酸ターゲティングガイドは、任意の標的核酸配列を標的とするように選択され得る。標的配列はＤＮＡであってもよい。標的配列は任意のＲＮＡ配列であってもよい。一部の実施形態において、標的配列は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、プレｍＲＮＡ、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、長鎖非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）、及び細胞質低分子ＲＮＡ（ｓｃＲＮＡ）からなる群から選択されるＲＮＡ分子内の配列であってもよい。一部の好ましい実施形態において、標的配列は、ｍＲＮＡ、プレｍＲＮＡ、及びｒＲＮＡからなる群から選択されるＲＮＡ分子内の配列であってもよい。一部の好ましい実施形態において、標的配列は、ｎｃＲＮＡ、及びｌｎｃＲＮＡからなる群から選択されるＲＮＡ分子内の配列であってもよい。一部のより好ましい実施形態において、標的配列はｍＲＮＡ分子又はプレｍＲＮＡ分子内の配列であってもよい。

【０１９２】

一部の実施形態では、核酸ターゲティングガイドは、核酸ターゲティングガイド内の二次構造度を低減するように選択される。一部の実施形態において、最適に折り畳まれたとき、核酸ターゲティングガイドのヌクレオチドのうち自己相補的塩基対合に関与するのは、約７５％、５０％、４０％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、１％未満であるか、又はそれより少ない。最適な折り畳みは、任意の好適なポリヌクレオチド折り畳みアルゴリズムによって決定し得る。一部のプログラムは、最小ギブズ自由エネルギーの計算に基づく。別の例示的な折り畳みアルゴリズムは、ウィーン大学（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｖｉｅｎｎａ）のＩｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙにおいて開発された、セントロイド構造予測アルゴリズムを用いるオンラインウェブサーバーＲＮＡｆｏｌｄである（例えば、Ａ．Ｒ．Ｇｒｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｃｅｌｌ １０６（１）：２３－２４；及びＰＡ Ｃａｒｒ ａｎｄ ＧＭ Ｃｈｕｒｃｈ，２００９，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２７（１２）：１１５１－６２を参照）。

【０１９３】

特定の実施形態において、ガイドＲＮＡ又はｃｒＲＮＡは、ダイレクトリピート（ＤＲ

）配列及びガイド配列又はスペーサー配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡ又はｃｒＲＮＡは、ガイド配列又はスペーサー配列に融合又は連結したダイレクトリピート配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。特定の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、ガイド配列又はスペーサー配列より上流（即ち、５’側）に位置し得る。他の実施形態において、ダイレクトリピート配列はガイド配列又はスペーサー配列より下流（即ち、３’側）に位置し得る。

【０１９４】

特定の実施形態において、ｃｒＲＮＡはステムループ、好ましくは単一のステムループを含む。特定の実施形態において、ダイレクトリピート配列はステムループ、好ましくは単一のステムループを形成する。

【０１９５】

特定の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー長さは１５～３５ｎｔである。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー長さは少なくとも１５ヌクレオチドである。特定の実施形態において、スペーサー長さは１５～１７ｎｔ、例えば、１５、１６、又は１７ｎｔ、１７～２０ｎｔ、例えば、１７、１８、１９、又は２０ｎｔ、２０～２４ｎｔ、例えば、２０、２１、２２、２３、又は２４ｎｔ、２３～２５ｎｔ、例えば、２３、２４、又は２５ｎｔ、２４～２７ｎｔ、例えば、２４、２５、２６、又は２７ｎｔ、２７～３０ｎｔ、例えば、２７、２８、２９、又は３０ｎｔ、３０～３５ｎｔ、例えば、３０、３１、３２、３３、３４、又は３５ｎｔ、又は３５ｎｔ以上である。

【０１９６】

一般に、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９又はＣＲＩＳＰＲシステムは、国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書）などの前述の文献において用いられるとおりであってもよく、まとめて、Ｃａｓ遺伝子、特にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９の場合にＣａｓ９遺伝子をコードする配列、ｔｒａｃｒ（トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ）配列（例えばｔｒａｃｒＲＮＡ又は活性部分的ｔｒａｃｒＲＮＡ）、ｔｒａｃｒメイト配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムのコンテクストでは「ダイレクトリピート」及びｔｒａｃｒＲＮＡによってプロセシングされる部分的ダイレクトリピートを含む）、ガイド配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムのコンテクストでは「スペーサー」とも称される）、又はこの用語が本明細書において使用されるとおりの「ＲＮＡ」（例えば、Ｃａｓ９をガイドするＲＮＡ、例えばＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ及びトランス活性化（ｔｒａｃｒ）ＲＮＡ又はシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）（キメラＲＮＡ））又はＣＲＩＳＰＲ遺伝子座からの他の配列及び転写物を含めた、ＣＲＩＳＰＲ関連（「Ｃａｓ」）遺伝子の発現に関与し又はその活性を導く転写物及び他のエレメントを指す。一般に、ＣＲＩＳＰＲシステムは、標的配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムのコンテクストではプロトスペーサーとも称される）の部位においてＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進するエレメントによって特徴付けられる。ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成のコンテクストでは、「標的配列」とは、ガイド配列がそれに対して相補性を有するように設計される配列を指し、ここでは標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する。ガイド配列のうち切断活性にとって重要な標的配列との相補性を与えるセクションは、本明細書ではシード配列と称される。標的配列は、ＤＮＡ又はＲＮＡポリヌクレオチドなど、任意のポリヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、標的配列は細胞の核又は細胞質に位置し、ミトコンドリア、細胞小器官、小胞、リポソーム又は細胞内に存在する粒子内にある又はそれに由来する核酸を含み得る。一部の実施形態において、特に非核用途には、ＮＬＳは好ましくない。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲシステムは１つ以上の核外移行シグナル（ＮＥＳ）を含む。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲシステムは１つ以上のＮＬＳ及び１つ以上のＮＥＳを含む。一部の実施形態において、ダイレクトリピートは、以下の基準の一部又は全部を満たす繰り返しモチーフを検索することによりインシリコで同定されてもよい：１．ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座に隣接する２Ｋｂウィンドウのゲノム配列に存在する；２．２０～５０ｂ

ｐにわたる；及び３．２０～５０ｂｐだけ間が空いている。一部の実施形態では、これらの基準のうち２つ、例えば１及び２、２及び３、又は１及び３が用いられてもよい。一部の実施形態では、３つ全ての基準が用いられてもよい。

【０１９７】

本発明の実施形態において、用語のガイド配列及びガイドＲＮＡ、即ち、Ｃａｓを標的ゲノム遺伝子座にガイドする能力を有するＲＮＡは、国際公開第２０１４／０９３６２２号パンフレット（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書）などの前述の引用文献にあるとおり同義的に使用される。一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズして標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を導くのに十分な標的ポリヌクレオチド配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。一部の実施形態において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントしたとき、約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％以上であるか、又はそれより高い。最適アラインメントは、配列のアラインメントに好適な任意のアルゴリズムを用いて決定することができ、その非限定的な例としては、スミス・ウォーターマンアルゴリズム、ニードルマン・ブンシュアルゴリズム、バローズ・ホイーラー変換に基づくアルゴリズム（例えば、バローズ・ホイーラーアライナー）、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｘ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；ｗｗｗ．ｎｏｖｏｃｒａｆｔ．ｃｏｍにおいて利用可能）、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎにおいて利用可能）、及びＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔにおいて利用可能）が挙げられる。一部の実施形態において、ガイド配列は、約５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、７５ヌクレオチド長以上であるか、又はそれより長い。一部の実施形態において、ガイド配列は、約７５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１２ヌクレオチド長未満か、又はそれより短い。好ましくはガイド配列は１０　３０ヌクレオチド長である。ガイド配列が標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を導く能力は、任意の好適なアッセイによって評価し得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体を形成するのに十分なＣＲＩＳＰＲシステムの構成成分が、試験しようとするガイド配列を含め、ＣＲＩＳＰＲ配列の構成成分をコードするベクターのトランスフェクションなどにより対応する標的配列を有する宿主細胞に提供されてもよく、続いて本明細書に記載されるとおりのＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイなどにより、標的配列内における優先的な切断を評価し得る。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、標的配列、試験しようとするガイド配列を含めたＣＲＩＳＰＲ複合体の構成成分、及び供試ガイド配列と異なる対照ガイド配列を提供して、供試ガイド配列と対照ガイド配列との反応間の標的配列における結合又は切断速度を比較することにより試験管内で判定することができる。他のアッセイも可能であり、当業者には想起されるであろう。

【０１９８】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの一部の実施形態において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、又は１００％以上であってもよく；ガイド又はＲＮＡ又はｓｇＲＮＡは、約５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、７５ヌクレオチド長以上であるか、又はそれより長くてもよく；又はガイド又はＲＮＡ又はｓｇＲＮＡは約７５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１２ヌクレオチド長未満であるか、又はそれより短くてもよく；及び有利にはｔｒａｃｒＲＮＡは３０又は５０ヌクレオチド長である。しかしながら、本発明のある態様は、オフターゲット相互作用を低下させること、例えば、ガイドが相補性の低い標的配列と相互作用するのを低下させることである。実際、例において、８０％～約９５％超の相補性、例えば、８３％～８４％又は８８～８９％又は９４～９５％の相補性を有する標的配列と

オフターゲット配列との間を区別する（例えば、１８ヌクレオチドを有する標的を、１、２又は３個のミスマッチを有する１８ヌクレオチドのオフターゲットと区別する）ことが可能なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムをもたらす突然変異が本発明に含まれることが示される。従って、本発明との関連において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、９４．５％又は９５％又は９５．５％又は９６％又は９６．５％又は９７％又は９７．５％又は９８％又は９８．５％又は９９％又は９９．５％又は９９．９％超、又は１００％である。オフターゲットはその配列とガイドとの間で１００％又は９９．９％又は９９．５％又は９９％又は９９％又は９８．５％又は９８％又は９７．５％又は９７％又は９６．５％又は９６％又は９５．５％又は９５％又は９４．５％又は９４％又は９３％又は９２％又は９１％又は９０％又は８９％又は８８％又は８７％又は８６％又は８５％又は８４％又は８３％又は８２％又は８１％又は８０％未満の相補性であり、有利には、オフターゲットはその配列とガイドとの間で１００％又は９９．９％又は９９．５％又は９９％又は９９％又は９８．５％又は９８％又は９７．５％又は９７％又は９６．５％又は９６％又は９５．５％又は９５％又は９４．５％の相補性である。

【０１９９】

ガイド改変

特定の実施形態において、本発明のガイドは、天然に存在しない核酸及び／又は天然に存在しないヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体、及び／又は化学的改変を含む。天然に存在しない核酸には、例えば、天然に存在するヌクレオチドと天然に存在しないヌクレオチドとの混合物が含まれ得る。天然に存在しないヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体は、リボース、リン酸、及び／又は塩基部分が改変されていてもよい。本発明のある実施形態において、ガイド核酸はリボヌクレオチド及び非リボヌクレオチドを含む。一つのかかる実施形態において、ガイドは１つ以上のリボヌクレオチド及び１つ以上のデオキシリボヌクレオチドを含む。本発明のある実施形態において、ガイドは、ホスホロチオエート結合、ボラノホスフェート結合を有するヌクレオチド、リボース環の２’及び４’炭素間にメチレン架橋を含むロックド核酸（ＬＮＡ）ヌクレオチド、又は架橋核酸（ＢＮＡ）など、１つ以上の天然に存在しないヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を含む。改変ヌクレオチドの他の例には、２’－Ｏ－メチル類似体、２’－デオキシ類似体、２－チオウリジン類似体、Ｎ６－メチルアデノシン類似体、又は２’－フルオロ類似体が含まれる。改変塩基の更なる例としては、限定はされないが、２－アミノプリン、５－ブロモ－ウリジン、プソイドウリジン（Ψ）、Ｎ１－メチルプソイドウリジン（ｍｅ１Ψ）、５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）、イノシン、７－メチルグアノシンが挙げられる。ガイドＲＮＡの化学的改変の例としては、限定なしに、１つ以上の末端ヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル（Ｍ）、２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホロチオエート（ＭＳ）、ホスホロチオエート（ＰＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、又は２’－Ｏ－メチル－３’－チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）の取込みが挙げられる。かかる化学的に改変されたガイドは、改変されていないガイドと比較したとき高い安定性及び高い活性を含むことができ、しかしながらオンターゲット対オフターゲット特異性は予測不可能である（Ｈｅｎｄｅｌ，２０１５，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３３（９）：９８５－９，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３２９０，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ ２９ Ｊｕｎｅ ２０１５；Ｒａｇｄａｒｍ ｅｔ ａｌ．，０２１５，ＰＮＡＳ，Ｅ７１１０－Ｅ７１１１；Ａｌｌｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２００５，４８：９０１－９０４；Ｂｒａｍｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ．Ｇｅｎｅｔ．，２０１２，３：１５４；Ｄｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，２０１５，１１２：１１８７０－１１８７５；Ｓｈａｒｍａ ｅｔ ａｌ．，ＭｅｄＣｈｅｍＣｏｍｍ．，２０１４，５：１４５４－１４７１；Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１５）３３（９）：９８５－９８９；Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１，００６６ ＤＯＩ：１０．１０３８／ｓ４１５５１－０１７－００６６を参照）。一部の実施形態において、ガイドＲＮＡの５’及び／又は３’末端は、蛍光色素、ポリエチレングリコール、コレステロール、タンパク質、又は検出タグを含めた種々の機能性部分によっ

て改変される（Ｋｅｌｌｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６，Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２３３：７４－８３を参照）。特定の実施形態において、ガイドは標的ＤＮＡに結合する領域にリボヌクレオチドを含み、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、又はＣ２ｃ１に結合する領域に１つ以上のデオキシリボヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体を含む。本発明のある実施形態において、デオキシリボヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体は、限定なしに、５’及び／又は３’末端、ステム－ループ領域、及びシード領域など、エンジニアリングされたガイド構造に組み込まれる。特定の実施形態において、改変はステム－ループ領域の５’－ハンドルにはない。ガイドのステム－ループ領域の５’－ハンドルにおける化学的改変は、その機能を無効にし得る（Ｌｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１：００６６を参照）。特定の実施形態において、ガイドの少なくとも１、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、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５ヌクレオチドが化学的に改変される。一部の実施形態において、ガイドの３’末端又は５’末端のいずれかの３～５ヌクレオチドが化学的に改変される。一部の実施形態において、２’－Ｆ改変など、軽微な改変のみがシード領域に導入される。一部の実施形態において、２’－Ｆ改変はガイドの３’末端に導入される。特定の実施形態において、ガイドの５’及び／又は３’末端の３～５ヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）、２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホロチオエート（ＭＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、又は２’－Ｏ－メチル－３’－チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）で化学的に改変される。かかる改変はゲノム編集効率を増強し得る（Ｈｅｎｄｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１５）３３（９）：９８５－９８９を参照）。特定の実施形態において、遺伝子破壊レベルを増強するため、ガイドの全てのリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート（ＰＳ）に置換される。特定の実施形態において、ガイドの５’及び／又は３’末端の５ヌクレオチド超が２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｆ又はＳ－拘束エチル（ｃＥｔ）で化学的に改変される。かかる化学的に改変されたガイドは、増強されたレベルの遺伝子破壊を媒介することができる（Ｒａｇｄａｒｍ　ｅｔ　ａｌ．，０２１５，ＰＮＡＳ，Ｅ７１１０－Ｅ７１１１を参照）。本発明のある実施形態において、ガイドは、その３’及び／又は５’末端に化学的部分を含むように改変される。かかる部分としては、限定はされないが、アミン、アジド、アルキン、チオ、ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）、又はローダミンが挙げられる。特定の実施形態において、化学的部分はアルキル鎖などのリンカーによってガイドにコンジュゲートされる。特定の実施形態において、改変されたガイドの化学的部分は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、又はナノ粒子などの別の分子にガイドを取り付けるために使用することができる。かかる化学的に改変されたガイドは、ＣＲＩＳＰＲシステムによって遺伝子編集された細胞の同定又は集積に使用することができる（Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，ｅＬｉｆｅ，２０１７，６：ｅ２５３１２，ＤＯＩ：１０．７５５４を参照）。

【０２００】

特定の実施形態において、本明細書に提供されるとおりのＣＲＩＳＰＲシステムは、ｃｒＲＮＡ又はガイド配列を含む同様のポリヌクレオチドを利用することができ、ここでポリヌクレオチドは、ＲＮＡ、ＤＮＡ又はＲＮＡとＤＮＡとの混合物であり、及び／又はポリヌクレオチドは１つ以上のヌクレオチド類似体を含む。この配列は、限定はされないが、バルジ、ヘアピン又はステムループ構造など、天然ｃｒＲＮＡの構造を含め、任意の構造を含み得る。特定の実施形態において、ガイド配列を含むポリヌクレオチドは、ＲＮＡ又はＤＮＡ配列であってよい第２のポリヌクレオチド配列と二重鎖を形成する。

【０２０１】

特定の実施形態において、化学的に改変されたガイドＲＮＡが利用される。ガイドＲＮＡの化学的改変の例としては、限定なしに、１つ以上の末端ヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル（Ｍ）、２’－Ｏ－メチル３’ホスホロチオエート（ＭＳ）、又は２’－Ｏ－メチル３’チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）の取り込みが挙げられる。かかる化学的に改変されたガイドＲＮＡは、改変されていないガイドＲＮＡと比較したとき高い安定性及び高い活性を含むこ

とができ、しかしながらオンターゲット対オフターゲット特異性は予測不可能である（Ｈｅｎｄｅｌ，２０１５，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３３（９）：９８５－９，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３２９０，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ ２９ Ｊｕｎｅ ２０１５を参照）。化学的に改変されたガイドＲＮＡには、限定なしに、ホスホロチオエート結合を有するＲＮＡ及びリボース環の２’及び４’炭素間にメチレン架橋を含むロックド核酸（ＬＮＡ）ヌクレオチドが更に含まれる。

【０２０２】

一部の実施形態において、ガイド配列は、約５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、７５ヌクレオチド長以上であるか、又はそれより長い。一部の実施形態において、ガイド配列は、約７５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１２ヌクレオチド長未満か、又はそれより短い。好ましくはガイド配列は１０～３０ヌクレオチド長である。ガイド配列が標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を導く能力は、任意の好適なアッセイによって評価し得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体を形成するのに十分なＣＲＩＳＰＲシステムの構成成分が、試験しようとするガイド配列を含め、ＣＲＩＳＰＲ配列の構成成分をコードするベクターのトランスフェクションなどにより対応する標的配列を有する宿主細胞に提供されてもよく、続いてＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイなどにより、標的配列内における優先的な切断を評価し得る。同様に、標的ＲＮＡの切断は、標的配列、試験しようとするガイド配列を含めたＣＲＩＳＰＲ複合体の構成成分、及び供試ガイド配列と異なる対照ガイド配列を提供して、供試ガイド配列と対照ガイド配列との反応間の標的配列における結合又は切断速度を比較することにより試験管内で判定することができる。他のアッセイも可能であり、当業者には想起されるであろう。

【０２０３】

一部の実施形態において、ガイドの改変は化学的改変、挿入、欠失又は分割である。一部の実施形態において、化学的改変には、限定はされないが、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）類似体、２’－デオキシ類似体、２－チオウリジン類似体、Ｎ６－メチルアデノシン類似体、２’－フルオロ類似体、２－アミノプリン、５－ブロモ－ウリジン、プソイドウリジン（Ψ）、$N^1$－メチルプソイドウリジン（$me^1\Psi$）、５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）、イノシン、７－メチルグアノシン、２’－Ｏ－メチル－３’－ホスホロチオエート（ＭＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、ホスホロチオエート（ＰＳ）、又は２’－Ｏ－メチル－３’－チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）の取り込みが含まれる。一部の実施形態において、ガイドはホスホロチオエート改変のうちの１つ以上を含む。特定の実施形態において、ガイドの少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、又は２５ヌクレオチドが化学的に改変される。特定の実施形態において、シード領域の１ヌクレオチド以上が化学的に改変される。特定の実施形態において、３’末端の１ヌクレオチド以上が化学的に改変される。特定の実施形態において、５’－ハンドルのいかなるヌクレオチドも化学的に改変されない。一部の実施形態において、シード領域の化学的改変は、２’－フルオロ類似体の取り込みなど、軽微な改変である。具体的な実施形態において、シード領域の１ヌクレオチドが２’－フルオロ類似体に置き換えられる。一部の実施形態において、３’末端の５又は１０ヌクレオチドが化学的に改変される。Ｃｐｆ１ ＣｒＲＮＡの３’末端のかかる化学的改変は、遺伝子切断効率を向上させる（Ｌｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１：００６６を参照）。具体的な実施形態において、３’末端の５ヌクレオチドが２’－フルオロ類似体に置き換えられる。具体的な実施形態において、３’末端の１０ヌクレオチドが２’－フルオロ類似体に置き換えられる。具体的な実施形態において、３’末端の５ヌクレオチドが２’－Ｏ－メチル（Ｍ）類似体に置き換えられる。

【０２０４】

一部の実施形態において、ガイドの５’－ハンドルのループが改変される。一部の実施形態において、ガイドの５’－ハンドルのループが、欠失、挿入、分割、又は化学的改変を有

するように改変される。特定の実施形態において、ループは３、４、又は５ヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、ループは、ＵＣＵＵ、ＵＵＵＵ、ＵＡＵＵ、又はＵＧＵＵの配列を含む。

【０２０５】

ガイド配列、ひいては核酸ターゲティングガイドＲＮＡは、任意の標的核酸配列を標的化するように選択し得る。ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成のコンテクストでは、「標的配列」とは、ガイド配列がそれに対して相補性を有するように設計される配列を指し、ここでは標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する。標的配列はＲＮＡポリヌクレオチドを含み得る。用語「標的ＲＮＡ」は、標的配列である又はそれを含むＲＮＡポリヌクレオチドを指す。換言すれば、標的ＲＮＡは、ｇＲＮＡ、即ちガイド配列の一部がそれと相補性を有するように設計される、且つＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質とｇＲＮＡとを含む複合体によって媒介されるエフェクター機能がそれに仕向けられることになるＲＮＡポリヌクレオチド又はＲＮＡポリヌクレオチドの一部であってもよい。一部の実施形態において、標的配列は細胞の核又は細胞質に位置する。標的配列はＤＮＡであってもよい。標的配列は任意のＲＮＡ配列であってもよい。一部の実施形態において、標的配列は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、プレｍＲＮＡ、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、長鎖非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）、及び細胞質低分子ＲＮＡ（ｓｃＲＮＡ）からなる群から選択されるＲＮＡ分子内の配列であってもよい。一部の好ましい実施形態において、標的配列は、ｍＲＮＡ、プレｍＲＮＡ、及びｒＲＮＡからなる群から選択されるＲＮＡ分子内の配列であってもよい。一部の好ましい実施形態において、標的配列は、ｎｃＲＮＡ、及びｌｎｃＲＮＡからなる群から選択されるＲＮＡ分子内の配列であってもよい。一部のより好ましい実施形態において、標的配列はｍＲＮＡ分子又はプレｍＲＮＡ分子内の配列であってもよい。

【０２０６】

特定の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー長さは２８ヌクレオチド未満である。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー長さは１８ヌクレオチド以上２８ヌクレオチド未満である。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー長さは１９～２８ヌクレオチドである。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー長さは１９～２５ヌクレオチドである。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー長さは２０ヌクレオチドである。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー長さは２３ヌクレオチドである。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー長さは２５ヌクレオチドである。

【０２０７】

特定の実施形態では、スペーサー配列と標的配列との間にミスマッチ、例えば１つ又は２つのミスマッチなど１つ以上のミスマッチを導入することにより、スペーサー／標的に沿ったミスマッチの位置を含め、切断効率の調節を利用することができる。例えばダブルミスマッチが中央寄りであるほど（即ち３’寄り又は５’寄りでない）、切断効率がより大きい影響を受ける。従って、スペーサーに沿ってミスマッチ位置を選択することにより、切断効率を調節することができる。例として、標的の１００％未満の切断が（例えばある細胞集団において）所望される場合、スペーサー配列にスペーサーと標的配列との間の１つ以上、例えば好ましくは２つのミスマッチが導入されてもよい。スペーサーに沿ってミスマッチ位置が中央寄りであるほど、切断割合が低くなる。

【０２０８】

特定の例示的実施形態では、切断効率を利用して、一塩基変異多型（ＳＮＰ）、変異、又は（点）突然変異など、単一ヌクレオチドだけ異なる２つ以上の標的を区別することができるシングルガイドを設計し得る。ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、ＳＮＰ（又は他の単一ヌクレオチド変異）に対する感度が低下していて、あるレベルの効率でＳＮＰ標的を切

断し続けることもある。従って、２つの標的、又は標的のセットについては、ガイドＲＮＡは、標的のうちの１つ、即ちオンターゲットＳＮＰに相補的なヌクレオチド配列で設計されてもよい。ガイドＲＮＡは更に、合成ミスマッチを有するように設計される。本明細書で使用されるとき「合成ミスマッチ」は、高々５ヌクレオチド上流又は下流、例えば４、３、２、又は１ヌクレオチド上流又は下流、好ましくは高々３ヌクレオチド上流又は下流、より好ましくは高々２ヌクレオチド上流又は下流、最も好ましくは１ヌクレオチド上流又は下流（即ちＳＮＰに隣接して）など、天然に存在するＳＮＰの上流又は下流に導入される天然に存在しないミスマッチを指す。ＣＲＩＳＰＲエフェクターがオンターゲットＳＮＰに結合すると、合成ミスマッチで単一ミスマッチのみが形成されることになり、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは引き続き活性化され、検出可能シグナルが生じることになる。ガイドＲＮＡがオフターゲットＳＮＰにハイブリダイズすると、２つのミスマッチ、ＳＮＰからのミスマッチと合成ミスマッチとが形成されることになり、検出可能シグナルは生成されない。従って、本明細書に開示されるシステムは、集団内のＳＮＰを区別するように設計され得る。例えばこのシステムを使用して、単一のＳＮＰだけ異なる病原性株を区別し、又は限定なしに癌関連ＳＮＰなど、限定はされないが、疾患関連ＳＮＰなどの特定の疾患に特異的なＳＮＰを検出し得る。

【０２０９】

特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ＳＮＰがスペーサー配列の（５’末端を始端として）位置１、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、又は３０に位置するように設計される。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ＳＮＰがスペーサー配列の（５’末端を始端として）位置１、２、３、４、５、６、７、８、又は９に位置するように設計される。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ＳＮＰがスペーサー配列の（５’末端を始端として）位置２、３、４、５、６、又は７に位置するように設計される。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ＳＮＰがスペーサー配列の（５’末端を始端として）位置３、４、５、又は６に位置するように設計される。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ＳＮＰがスペーサー配列の（５’末端を始端として）位置３に位置するように設計される。

【０２１０】

特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ミスマッチ（例えば合成ミスマッチ、即ちＳＮＰに加えた更なる突然変異）がスペーサー配列の（５’末端を始端として）位置１、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、又は３０に位置するように設計される。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ミスマッチがスペーサー配列の（５’末端を始端として）位置１、２、３、４、５、６、７、８、又は９に位置するように設計される。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ミスマッチがスペーサー配列の（５’末端を始端として）位置４、５、６、又は７に位置するように設計される。特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ミスマッチがスペーサー配列の（５’末端を始端として）位置５に位置するように設計される。

【０２１１】

特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ミスマッチがＳＮＰの２ヌクレオチド上流に位置する（即ち１つの介在ヌクレオチド）ように設計される。

【０２１２】

特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ミスマッチがＳＮＰの２ヌクレオチド下流に位置する（即ち１つの介在ヌクレオチド）ように設計される。

【０２１３】

特定の実施形態において、ガイドＲＮＡは、ミスマッチがスペーサー配列の（５’末端を始端として）位置５に位置し、且つＳＮＰがスペーサー配列の（５’末端を始端として）位置３に位置するように設計される。

【０２１４】

本明細書に記載される実施形態は、本明細書に考察されるとおりのベクターを細胞に送達することを含む、本明細書に考察されるとおりの真核細胞において（インビトロで、即ち単離された真核細胞において）１つ以上のヌクレオチド改変を誘導することを包含する。この１つ又は複数の突然変異には、１つ又は複数のガイド１つ又は複数のＲＮＡを介した１つ又は複数の細胞の各標的配列における１つ以上のヌクレオチドの導入、欠失、又は置換が含まれ得る。この突然変異には、１つ又は複数のガイド１つ又は複数のＲＮＡを介した１つ又は複数の前記細胞の各標的配列における１～７５ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換が含まれ得る。この突然変異には、１つ又は複数のガイド１つ又は複数のＲＮＡを介した１つ又は複数の前記細胞の各標的配列における１、５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換が含まれ得る。この突然変異には、１つ又は複数のガイド１つ又は複数のＲＮＡを介した１つ又は複数の前記細胞の各標的配列における５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換が含まれ得る。この突然変異には、１つ又は複数のガイド１つ又は複数のＲＮＡを介した１つ又は複数の前記細胞の各標的配列における１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換が含まれ得る。この突然変異には、１つ又は複数のガイド１つ又は複数のＲＮＡを介した１つ又は複数の前記細胞の各標的配列における２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、又は７５ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換が含まれ得る。この突然変異には、１つ又は複数のガイド１つ又は複数のＲＮＡを介した１つ又は複数の前記細胞の各標的配列における４０、４５、５０、７５、１００、２００、３００、４００又は５００ヌクレオチドの導入、欠失、又は置換が含まれ得る。

【０２１５】

典型的には、内因性ＣＲＩＳＰＲシステムの文脈では、ＣＲＩＳＰＲ複合体（標的配列にハイブリダイズし、且つ１つ以上のＣａｓタンパク質と複合体を形成したガイド配列を含む）が形成されると、標的配列又はその近傍（例えば標的配列から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０塩基対、又はそれ以上の範囲内）に切断が生じるが、特にＲＮＡ標的の場合には、例えば二次構造に依存し得る。

【０２１６】

ＲＮＡベースのマスキング構築物

本明細書で使用されるとき、「マスキング構築物」は、本明細書に記載される活性化ＣＲＩＳＰＲ系エフェクタータンパク質によって切断されるか、又は他の方法で不活性化されることのできる分子を指す。用語「マスキング構築物」はまた、別様には「検出構築物」も指し得る。特定の例示的実施形態では、マスキング構築物はＲＮＡベースのマスキング構築物である。ＲＮＡベースのマスキング構築物は、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質によって切断可能なＲＮＡエレメントを含む。ＲＮＡエレメントが切断されると、薬剤が放出され、又は検出可能シグナルを生じさせるコンホメーション変化が生じる。どのようにＲＮＡエレメントを使用して検出可能シグナルの生成を防止又は遮蔽し得るかを実証する例示的な構築物を以下に記載し、本発明の実施形態はその変形例を含む。切断前、又はマスキング構築物が「有効な」状態にあるとき、マスキング構築物は正の検出可能シグナルの生成又は検出を遮断する。特定の例示的実施形態において、活性なＲＮＡマスキング構築物の存在下で最小限のバックグラウンドシグナルが生じ得ることは理解されるであろう。正の検出可能シグナルは、当該技術分野において公知の光学、蛍光、化学発光、電気化学又は他の検出方法を用いて検出し得る任意のシグナルであってもよい。マスキング構築物は、マスキング構築物が除去されるか、又は他の方法でサイレンシングされるまで、検出可能な正のシグナルの生成を防ぎ、又はその存在をマスキングし得る。用語「正

の検出可能シグナル」は、マスキング構築物の存在下で検出可能であり得る他の検出可能シグナルと区別するために使用される。例えば、特定の実施形態において、マスキング剤が存在するとき第１のシグナルが検出されてもよく（即ち負の検出可能シグナル）、これが次には活性化ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質による標的分子の検出並びにマスキング剤の切断又は不活性化に伴い第２のシグナル（例えば正の検出可能シグナル）に変換される。

【０２１７】

特定の例示的実施形態において、マスキング構築物は遺伝子産物の生成を抑制し得る。遺伝子産物は、試料に加えられるレポーター構築物によってコードされ得る。マスキング構築物は、短ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）又は小干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）など、ＲＮＡ干渉経路に関わる干渉性ＲＮＡであってもよい。マスキング構築物はまたマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）も含み得る。存在する間は、マスキング構築物は遺伝子産物の発現を抑制する。遺伝子産物は、マスキング構築物の存在がなければ本来標識プローブ、アプタマー、又は抗体によって検出可能であろう蛍光タンパク質又は他のＲＮＡ転写物若しくはタンパク質であってもよい。エフェクタータンパク質の活性化に伴いマスキング構築物が切断されるか、又は他の方法でサイレンシングされて、正の検出可能シグナルとしての遺伝子産物の発現及び検出が可能となる。

【０２１８】

特定の例示的実施形態において、マスキング構築物は、検出可能な正のシグナルを生成するのに必要な１つ以上の試薬を隔離してもよく、従ってマスキング構築物から１つ以上の試薬が放出されると、検出可能な正のシグナルが生成されることになる。１つ以上の試薬を組み合わせて比色シグナル、化学発光シグナル、蛍光シグナル、又は任意の他の検出可能シグナルを生じさせてもよく、かかる目的に好適であることが公知の任意の試薬を含み得る。特定の例示的実施形態において、１つ以上の試薬は、１つ以上の試薬に結合するＲＮＡアプタマーによって隔離される。１つ以上の試薬は、標的分子の検出に伴いエフェクタータンパク質が活性化され、ＲＮＡアプタマーが分解されると放出される。

【０２１９】

特定の例示的実施形態では、マスキング構築物が個々の個別的な容量（以下に更に定義する）で固体基質上に固定化されて、単一の試薬を隔離してもよい。例えば、試薬は、色素を含むビーズであってもよい。固定化された試薬によって隔離されると、個々のビーズが過剰に拡散しているため検出可能シグナルは生成されないが、マスキング構築物から放出されると、例えば凝集によるか、又は単純に溶液濃度の増加により、検出可能シグナルの生成が可能となる。特定の例示的実施形態において、固定化されるマスキング剤は、標的分子の検出に伴い活性化エフェクタータンパク質によって切断されることができるＲＮＡベースのアプタマーである。

【０２２０】

特定の他の例示的実施形態において、マスキング構築物は溶液中の固定化試薬に結合し、それにより溶液中に遊離している別個の標識結合パートナーに結合する試薬の能力を遮断する。従って、試料に洗浄ステップを適用すると、標的分子が存在しない場合、標識結合パートナーを試料から洗い流すことができる。しかしながら、エフェクタータンパク質が活性化された場合、マスキング構築物は、マスキング構築物が試薬に結合する能力に干渉するのに十分な程度に切断され、それにより標識結合パートナーによる固定化試薬への結合が可能となる。従って、標識結合パートナーは洗浄ステップの後も残り、試料中の標的分子の存在を指示する。特定の態様において、固定化試薬に結合するマスキング構築物はＲＮＡアプタマーである。固定化試薬はタンパク質であってもよく、標識結合パートナー（ｍｉｎｄｉｎｇ　ｐａｒｔｎｅｒ）は標識抗体であってもよい。或いは、固定化試薬はストレプトアビジンであってもよく、標識結合パートナーは標識ビオチンであってもよい。上記の実施形態において使用される結合パートナーの標識は、当該技術分野において公知の任意の検出可能標識であってよい。加えて、本明細書に記載される全体的な設計に従い他の公知の結合パートナーが使用されてもよい。

【０２２１】
特定の例示的実施形態において、マスキング構築物はリボザイムを含んでもよい。リボザイムは、触媒特性を有するＲＮＡ分子である。リボザイムは、天然のものもエンジニアリングされたものも、両方ともにＲＮＡを含む、又はそれからなるため、これは本明細書に開示されるエフェクタータンパク質の標的となり得る。リボザイムは、負の検出可能シグナルを生成するか、又は正の対照シグナルの生成を妨げるかのいずれかの反応を触媒するように選択又はエンジニアリングされてもよい。活性化エフェクタータンパク質によりリボザイムが失活すると、負の対照シグナルを生成するか、又は正の検出可能シグナルの生成を妨げる反応が取り除かれ、それにより正の検出可能シグナルを生成することが可能となる。一例示的実施形態において、リボザイムは比色反応を触媒して、溶液を第１の色として見えさせる。リボザイムが失活すると、次に溶液が第２の色に変わり、この第２の色が検出可能な正のシグナルである。どのようにリボザイムを比色反応の触媒に使用し得るかの例が、Ｚｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．「リボザイムｇｌｍＳに基づくグルコサミン－６－リン酸のシグナル増幅（Ｓｉｇｎａｌ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｅ－６－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ　ｂａｓｅｄ　ｏｎ　ｒｉｂｏｚｙｍｅ　ｇｌｍＳ）」，Ｂｉｏｓｅｎｓ　Ｂｉｏｅｌｅｃｔｒｏｎ．２０１４；１６：３３７－４２に記載され、どのようにかかるシステムを本明細書に開示される実施形態のコンテクストで機能するように改変し得るかの例を提供する。或いは、リボザイムは、存在する場合、例えばＲＮＡ転写物の切断産物を生成することができる。従って、正の検出可能シグナルの検出は、リボザイムの非存在下に限り生成される非切断ＲＮＡ転写物の検出を含み得る。
【０２２２】
特定の例示的実施形態では、１つ以上の試薬は、検出可能シグナル、例えば比色、化学発光、又は蛍光シグナルなどの生成を促進可能な酵素などのタンパク質であり、これは、１つ以上のＲＮＡアプタマーをタンパク質に結合させることによってタンパク質が検出可能シグナルを生成できないように阻害又は隔離されている。本明細書に開示されるエフェクタータンパク質が活性化すると、タンパク質が検出可能シグナルを生成する能力をもはや阻害しない程度までＲＮＡアプタマーが切断又は分解される。特定の例示的実施形態では、アプタマーはトロンビン阻害薬アプタマーである。特定の例示的実施形態では、トロンビン阻害薬アプタマーはＧＧＧＡＡＣＡＡＡＧＣＵＧＡＡＧＵＡＣＵＵＡＣＣＣ（配列番号４１４）の配列を有する。このアプタマーが切断されるとトロンビンが活性になり、ペプチド比色基質又は蛍光基質を切断することになる。特定の例示的実施形態では、比色基質のパラニトロアニリド（ｐＮＡ）が、トロンビンのペプチド基質に共有結合的に連結される。トロンビンによって切断されると、ｐＮＡが放出されて色が黄色に変わり、肉眼で容易に見ることができる。特定の例示的実施形態では、蛍光基質は、蛍光検出器を使用して検出することのできる青色フルオロフォア、７－アミノ－４－メチルクマリンである。阻害アプタマーはまた、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、β－ガラクトシダーゼ、又は仔ウシアルカリホスファターゼ（ＣＡＰ）に対しても、上記に説明される一般的原理の範囲内で使用し得る。
【０２２３】
特定の実施形態において、酵素阻害アプタマーの切断を経てＲＮａｓｅ活性が比色測定で検出される。ＲＮａｓｅ活性を比色シグナルに変換する１つの可能な方法は、ＲＮＡアプタマーの切断を、比色測定上の出力を生じることが可能な酵素の再活性化と結び付けることである。ＲＮＡ切断がない場合、インタクトなアプタマーが酵素標的に結合してその活性を阻害することになり得る。このリードアウトシステムの利点は、酵素が更なる増幅ステップを提供することである：コラテラル活性（例えばＣａｓ１３ａコラテラル活性）を経てアプタマーから遊離すると、比色酵素は比色産物を生じ続けるため、シグナルの多重化につながる。
【０２２４】
特定の実施形態において、比色リードアウトを伴う酵素を阻害する既存のアプタマーが使用される。トロンビン、プロテインＣ、好中球エラスターゼ、及びサブチリシンなど、

比色リードアウトを伴う幾つかのアプタマー／酵素対が存在する。これらのプロテアーゼは、ｐＮＡに基づく比色基質を有し、市販されている。特定の実施形態において、共通の比色酵素を標的とする新規アプタマーが使用される。β－ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、又は仔ウシ腸アルカリホスファターゼなどの共通のロバストな酵素であれば、ＳＥＬＥＸなどの選択戦略により設計されたエンジニアリングアプタマーによって標的とし得る。かかる戦略は、ナノモル濃度の結合効率でのアプタマーの迅速な選択を可能にし、比色リードアウト用の更なる酵素／アプタマー対の開発に使用し得る可能性がある。

【０２２５】

特定の実施形態において、ＲＮａｓｅ活性は、ＲＮＡ繋留阻害薬の切断によって比色測定で検出される。多くの共通の比色酵素が、競合的で可逆的な阻害薬を有する：例えば、β－ガラクトシダーゼはガラクトースによって阻害され得る。これらの阻害薬の多くは弱いが、局所濃度を増加させることによりその効果を増加させることができる。阻害薬の局所濃度をＲＮａｓｅ活性に関連付けることにより、比色酵素と阻害薬との対をＲＮａｓｅセンサーとなるようにエンジニアリングすることができる。低分子阻害薬をベースとする比色ＲＮａｓｅセンサーは、３つの成分：比色酵素と、阻害薬と、阻害薬及び酵素の両方に共有結合的に連結されている、阻害薬を酵素に繋留する架橋ＲＮＡとを含む。切断されていない構成では、酵素は小分子の局所濃度の増加によって阻害される；ＲＮＡが（例えばＣａｓ１３ａコラテラル切断によって）切断されると、阻害薬が放出されることになり、比色酵素が活性化されることになる。

【０２２６】

特定の実施形態において、ＲＮａｓｅ活性は、Ｇ四重鎖の形成及び／又は活性化によって比色測定で検出される。ＤＮＡのＧ四重鎖はヘム（鉄（ＩＩＩ）－プロトポルフィリンＩＸ）と錯体化して、ペルオキシダーゼ活性を有するＤＮＡザイムを形成し得る。ペルオキシダーゼ基質（例えばＡＢＴＳ：（２，２’－アジノビス［３－エチルベンゾチアゾリン－６－スルホン酸］－ジアンモニウム塩））が供給されると、過酸化水素の存在下のＧ四重鎖－ヘム錯体は基質の酸化を引き起こし、次にはこれが溶液中で緑色を発色する。ＤＮＡ配列を形成する例示的なＧ四重鎖はＧＧＧＴＡＧＧＧＣＧＧＧＴＴＧＧＧＡ（配列番号４１５）である。ＲＮＡ配列をこのＤＮＡアプタマーにハイブリダイズすることにより、Ｇ四重鎖構造の形成が制限されることになる。ＲＮａｓｅコラテラル活性化（例えばＣ２ｃ２複合体コラテラル活性化）を受けると、ＲＮＡステープルが切断されることになり、Ｇ四重鎖の形成及びヘムの結合が可能になる。この戦略は、発色が酵素的であるため、つまりＲＮａｓｅ活性化を越えた更なる増幅があるため、特に魅力的である。

【０２２７】

特定の例示的実施形態では、マスキング構築物が固体基材上で個別独立分離容積（以下に更に定義する）に固定化されてもよく、単一の試薬を隔離する。例えば、試薬は、色素を含むビーズであってもよい。固定化された試薬によって隔離されているとき、個々のビーズは過剰に拡散しているため検出可能シグナルは生成されないが、マスキング構築物から放出されると、例えば凝集によるか、又は単純に溶液濃度の増加により、検出可能シグナルの生成が可能となる。特定の例示的実施形態では、固定化されるマスキング剤は、標的分子の検出時に活性化エフェクタータンパク質によって切断されることができるＲＮＡベースのアプタマーである。

【０２２８】

一例示的実施形態において、マスキング構築物は、検出剤が溶液中で凝集しているか、それとも分散しているかに応じて色を変える検出剤を含む。例えば、コロイド金などの特定のナノ粒子は、凝集体から分散粒子へと移るに従い、目に見える紫色から赤色への色シフトを起こす。従って、特定の例示的実施形態では、かかる検出剤が１つ以上の架橋分子によって凝集体として保持され得る。図４３を参照されたい。架橋分子の少なくとも一部分はＲＮＡを含む。本明細書に開示されるエフェクタータンパク質が活性化されると、架橋分子のＲＮＡ部分が切断されて検出剤が分散することが可能となり、対応する色の変化

が起こる。図４６を参照されたい。特定の例示的実施形態において、架橋分子はＲＮＡ分子である。特定の例示的実施形態において、検出剤はコロイド金属である。コロイド金属材料としては、液体、ヒドロゾル、又は金属ゾルに分散した水不溶性金属粒子又は金属化合物を挙げることができる。コロイド金属は、周期表のＩＡ、ＩＢ、ＩＩＢ及びＩＩＩＢ族の金属、並びに遷移金属、特にＶＩＩＩ族のものから選択され得る。好ましい金属には、金、銀、アルミニウム、ルテニウム、亜鉛、鉄、ニッケル及びカルシウムが含まれる。他の好適な金属にはまた、そのあらゆる様々な酸化状態の以下：リチウム、ナトリウム、マグネシウム、カリウム、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、コバルト、銅、ガリウム、ストロンチウム、ニオブ、モリブデン、パラジウム、インジウム、スズ、タングステン、レニウム、白金、及びガドリニウムも含まれる。金属は、好ましくは適切な金属化合物に由来するイオン形態、例えば$Al^{3+}$、$Ru^{3+}$、$Zn^{2+}$、$Fe^{3+}$、$Ni^{2+}$及び$Ca^{2+}$イオンで提供される。

【０２２９】

活性化したＣＲＩＳＰＲエフェクターによってＲＮＡ架橋が切断されると、前述の色のシフトが観察される。特定の例示的実施形態では、粒子はコロイド金属である。特定の他の例示的実施形態において、コロイド金属はコロイド金である。特定の例示的実施形態では、コロイドナノ粒子は１５ｎｍ金ナノ粒子（ＡｕＮＰ）である。コロイド金ナノ粒子のユニークな表面特性に起因して、溶液中に完全に分散したとき最大吸光度は５２０ｎｍで観察され、肉眼には赤色に見える。ＡｕＮＰが凝集すると、最大吸光度が赤色シフトを呈し、色が濃くなるように見え、最終的には溶液から暗紫色の凝集物として沈殿する。特定の例示的実施形態では、ナノ粒子は、ナノ粒子の表面から伸長するＤＮＡリンカーを含むように改変される。個別の粒子は、ＲＮＡの各末端上でＤＮＡリンカーの少なくとも一部分にハイブリダイズする一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）架橋によって一体に連結される。従って、ナノ粒子は粒子及び凝集物の連結網を形成することになり、暗色の沈殿物として見える。本明細書に開示されるＣＲＩＳＰＲエフェクターが活性化すると、ｓｓＲＮＡ架橋が切断され、連結網の網目からＡＵ　ＮＰが放出され、目に見える赤色が生じることになる。例示的なＤＮＡリンカー及びＲＮＡ架橋配列を以下に挙げる。ＤＮＡリンカーの末端にあるチオールリンカーは、ＡｕＮＰとの表面コンジュゲーションに用いられ得る。他の形態のコンジュゲーションが用いられてもよい。特定の例示的実施形態では、各ＤＮＡリンカーに１つずつ、２つのＡｕＮＰ集団が生成されてもよい。これは、適切な向きでのｓｓＲＮＡ架橋の適切な結合を促進する助けとなるであろう。特定の例示的実施形態では、第１のＤＮＡリンカーが３’末端にコンジュゲートされ、一方、第２のＤＮＡリンカーが５’末端にコンジュゲートされる。

| | |
|---|---|
| C2c2 比色 DNA1 | TTATAACTATTCCTAAAAAAAAAAA/3ThioMC3-D/<br>(配列番号 183) |
| C2c2 比色 DNA2 | /5ThioMC6-D/AAAAAAAAAACTCCCCTAATAACAAT<br>(配列番号 184) |
| C2c2 比色架橋 | GGGUAGGAAUAGUUAUAAUUUCCCUUUCCCAUUGUUAUUAGGGAG (配列番号 185) |

【０２３０】

特定の他の例示的実施形態において、マスキング構築物は、検出可能標識及び当該の検出可能標識のマスキング剤が付加されたＲＮＡオリゴヌクレオチドを含み得る。かかる検出可能標識／マスキング剤の組み合わせの例は、フルオロフォア及びフルオロフォアの消

光剤である。フルオロフォアの消光は、フルオロフォアと別のフルオロフォア又は非蛍光性分子との間で非蛍光性複合体が形成される結果として起こり得る。この機構は、基底状態複合体形成、静的消光、又は接触消光として知られる。従って、ＲＮＡオリゴヌクレオチドは、接触消光が起こるのにフルオロフォアと消光剤とが十分に近接しているように設計され得る。フルオロフォア及びそのコグネイト消光剤は当該技術分野において公知であり、この目的で当業者が選択することができる。本発明の文脈において詳細なフルオロフォア／消光剤の組み合わせは重要でなく、フルオロフォア／消光剤の組み合わせの選択がフルオロフォアのマスキングを確実にすることだけである。本明細書に開示されるエフェクタータンパク質が活性化すると、ＲＮＡオリゴヌクレオチドが切断されて、それにより接触消光効果を維持するのに必要なフルオロフォアと消光剤との間の近接性が断たれる。従って、フルオロフォアの検出を用いて試料中の標的分子の存在を決定し得る。

【０２３１】

特定の他の例示的実施形態において、マスキング構築物は、１つ以上の金属ナノ粒子、例えば金ナノ粒子が結合する１つ以上のＲＮＡオリゴヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、マスキング構築物は、複数のＲＮＡオリゴヌクレオチドによって架橋されて閉じたループを形成する複数の金属ナノ粒子を含む。一実施形態において、マスキング構築物は、３つのＲＮＡオリゴヌクレオチドによって架橋されて閉じたループを形成する３つの金ナノ粒子を含む。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質によってＲＮＡオリゴヌクレオチドが切断されると、金属ナノ粒子によって検出可能シグナルが生じることになる。

【０２３２】

特定の他の例示的実施形態において、マスキング構築物は、１つ以上の量子ドットが結合する１つ以上のＲＮＡオリゴヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質によってＲＮＡオリゴヌクレオチドが切断されると、量子ドットによって検出可能シグナルが生じることになる。

【０２３３】

一例示的実施形態において、マスキング構築物は量子ドットを含んでもよい。量子ドットは、表面に付加された複数のリンカー分子を有し得る。リンカー分子の少なくとも一部分はＲＮＡを含む。リンカー分子は一端で量子ドットに付加され、及びその長さに沿って、又はリンカーの終端で１つ以上の消光剤に付加され、そのため消光剤は量子ドットの消光が起こるのに十分に近接して維持される。リンカーは分枝状であってもよい。上記のとおり、量子ドット／消光剤の組み合わせは重要でなく、量子ドット／消光剤の組み合わせの選択がフルオロフォアのマスキングを確実にすることだけである。量子ドット及びそのコグネイト消光剤は当該技術分野において公知であり、この目的で当業者が選択することができる。本明細書に開示されるエフェクタータンパク質が活性化すると、リンカー分子のＲＮＡ部分が切断されて、それにより消光効果を維持するのに必要な量子ドットと１つ以上の消光剤との間の近接性がなくなる。一例示的実施形態において、量子ドットは、コンジュゲートされたストレプトアビジンである。ＲＮＡはビオチンリンカーを介して付加され、消光分子を動員し、配列／５Ｂｉｏｓｇ／ＵＣＵＣＧＵＡＣＧＵＵＣ／３ＩＡｂＲＱＳｐ／（配列番号４１６）又は／５Ｂｉｏｓｇ／ＵＣＵＣＧＵＡＣＧＵＵＣＵＣＵＣＧＵＡＣＧＵＵＣ／３ＩＡｂＲＱＳｐ／（配列番号４１７）［式中、／５Ｂｉｏｓｇ／はビオチンタグであり、／３ＩＡｂＲＱＳｐ／はアイオワブラック消光剤である］である。切断に伴い本明細書に記載の活性化エフェクターにより、量子ドットが目に見える蛍光を発することになる。

【０２３４】

同様に、蛍光エネルギー移動（ＦＲＥＴ）を用いて検出可能な正のシグナルを生成し得る。ＦＲＥＴは、エネルギー的に励起されたフルオロフォア（即ち「ドナーフルオロフォア」）からの光子によって別の分子（即ち「アクセプター」）の電子のエネルギー状態が上がり、より高い励起した一重項状態の振動準位になる無放射過程である。ドナーフルオロフォアは基底状態に戻り、当該のフルオロフォアに特有の蛍光を発しなくなる。アクセ

プターは別のフルオロフォア又は非蛍光性分子であり得る。アクセプターがフルオロフォアである場合、移動したエネルギーは当該のフルオロフォアに特有の蛍光として放たれる。アクセプターが非蛍光性分子である場合、吸収されたエネルギーが熱として失われる。従って、本明細書に開示される実施形態のコンテクストでは、フルオロフォア／消光剤の組み合わせは、オリゴヌクレオチド分子に付加されたドナーフルオロフォア／アクセプターの組み合わせに置き換えられる。インタクトな場合、マスキング構築物は、アクセプターが発する蛍光又は熱によって検出されるとおりの第１のシグナル（負の検出可能シグナル）を生成する。本明細書に開示されるエフェクタータンパク質が活性化すると、ＲＮＡオリゴヌクレオチドが切断されてＦＲＥＴが破綻するため、ここでドナーフルオロフォアの蛍光が検出される（正の検出可能シグナル）。

【０２３５】

特定の例示的実施形態では、マスキング構築物は、長いＲＮＡが短いヌクレオチドに切断されると、それに応じてその吸光度が変化するインターカレート色素の使用を含む。かかる色素は幾つか存在する。例えば、ピロニンＹはＲＮＡと複合体化して、５７２ｎｍの吸光度を有する複合体を形成することになる。ＲＮＡが切断されると吸光度が失われ、色が変化する。メチレンブルーも同じように使用することができ、ＲＮＡ切断時に６８８ｎｍの吸光度が変化する。従って、特定の例示的実施形態では、マスキング構築物は、本明細書に開示されるエフェクタータンパク質によるＲＮＡの切断時に吸光度が変化するＲＮＡとインターカレート色素との複合体を含む。

【０２３６】

特定の例示的実施形態では、マスキング構築物はＨＣＲ反応のイニシエーターを含み得る。例えば、Ｄｉｒｋｓ ａｎｄ Ｐｉｅｒｃｅ．ＰＮＡＳ １０１，１５２７５－１５７２８（２００４）を参照のこと。ＨＣＲ反応は、２つのヘアピン種のポテンシャルエネルギーを利用する。ヘアピンの一方にある対応する領域と相補的な部分を有する一本鎖イニシエーターがそれまで安定していた混合物中に放出されると、それが一方の種のヘアピンを開く。このプロセスにより、次には、他方の種のヘアピンを開く一本鎖領域が露出する。このプロセスにより、次には、元のイニシエーターと同一の一本鎖領域が露出する。結果として生じる連鎖反応がニック入りの二重らせんの形成につながることができ、これはヘアピンの供給が使い果たされるまで成長する。得られた産物の検出は、ゲル上で、又は比色測定により行われ得る。例示的な比色検出法としては、例えば、Ｌｕ ｅｔ ａｌ．「ハイブリダイゼーション連鎖反応によって惹起される酵素カスケード増幅に基づく超高感度比色アッセイシステム（Ｕｌｔｒａ－ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ ｃｏｌｏｒｉｍｅｔｒｉｃ ａｓｓａｙ ｓｙｓｔｅｍ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｔｈｅ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ－ｔｒｉｇｇｅｒｅｄ ｅｎｚｙｍｅ ｃａｓｃａｄｅ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）」 ＡＣＳ Ａｐｐｌ Ｍａｔｅｒ Ｉｎｔｅｒｆａｃｅｓ，２０１７，９（１）：１６７－１７５、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．「ハイブリダイゼーション連鎖反応増幅及びスプリットアプタマーを使用した酵素フリー比色アッセイ（Ａｎ ｅｎｚｙｍｅ－ｆｒｅｅ ｃｏｌｏｒｉｍｅｔｒｉｃ ａｓｓａｙ ｕｓｉｎｇ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ ｓｐｌｉｔ ａｐｔａｍｅｒｓ）」 Ａｎａｌｙｓｔ ２０１５，１５０，７６５７－７６６２、及びＳｏｎｇ ｅｔ ａｌ．「高感度ＤＮＡ検出のためのハイブリダイゼーション連鎖反応と併せたヘアピンＤＮＡプローブの非共有結合性蛍光標識（Ｎｏｎ ｃｏｖａｌｅｎｔ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ｌａｂｅｌｉｎｇ ｏｆ ｈａｉｒｐｉｎ ＤＮＡ ｐｒｏｂｅ ｃｏｕｐｌｅｄ ｗｉｔｈ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ ｆｏｒ ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ ＤＮＡ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ）」 Ａｐｐｌｉｅｄ Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ，７０（４）：６８６－６９４（２０１６）に開示されるものが挙げられる。

【０２３７】

特定の例示的実施形態では、マスキング構築物は、ＨＣＲイニシエーター配列と、ループ又はヘアピンなど、イニシエーターがＨＣＲ反応を開始させるのを防ぐ切断可能な構造

エレメントとを含み得る。活性化したＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質によって構造エレメントが切断されると、次にイニシエーターが放出されてＨＣＲ反応が惹起され、その検出が、試料中における１つ以上の標的の存在を指し示す。特定の例示的実施形態では、マスキング構築物は、ＲＮＡループを有するヘアピンを含む。活性化したＣＲＩＳＲＰエフェクタータンパク質がＲＮＡループを切断すると、イニシエーターが放出されてＨＣＲ反応が惹起され得る。

【０２３８】

標的の増幅

特定の例示的実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質の活性化前に標的ＲＮＡ及び／又はＤＮＡが増幅されてもよい。任意の好適なＲＮＡ又はＤＮＡ増幅技法を用いることができる。特定の例示的実施形態では、ＲＮＡ又はＤＮＡ増幅は等温増幅である。特定の例示的実施形態では、等温増幅は、核酸配列決定ベースの増幅（ＮＡＳＢＡ）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）、ループ媒介性等温増幅（ＬＡＭＰ）、ストランド置換増幅（ＳＤＡ）、ヘリカーゼ依存性増幅（ＨＤＡ）、又はニッキング酵素増幅反応（ＮＥＡＲ）であってもよい。特定の例示的実施形態では、限定はされないが、ＰＣＲ、多置換増幅（ＭＤＡ）、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、又はラミフィケーション増幅方法（ＲＡＭ）を含めた非等温増幅方法が用いられてもよい。

【０２３９】

特定の例示的実施形態では、ＲＮＡ又はＤＮＡ増幅はＮＡＳＢＡであり、これはＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖を切断する配列特異的リバースプライマーによる標的ＲＮＡの逆転写から始まる。次にＲＮａｓｅ　Ｈを使用してＲＮＡ鋳型を分解すると、Ｔ７プロモーターなどのプロモーターを含むフォワードプライマーが結合して相補鎖の伸長を開始することが可能になり、二本鎖ＤＮＡ産物が生成される。次にＤＮＡ鋳型のＲＮＡポリメラーゼプロモーター媒介性転写によって標的ＲＮＡ配列のコピーが作り出される。重要なことに、新しい標的ＲＮＡの各々はガイドＲＮＡによって検出することができ、従ってアッセイの感度が更に増強される。次に標的ＲＮＡにガイドＲＮＡが結合すると、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質の活性化につながり、上記に概説したとおり本方法が進む。ＮＡＳＢＡ反応には、中程度の等温条件下、例えば約４１℃で進むことが可能であるという更なる利点があり、実地での臨床検査室から遠く離れた早期直接検出用に展開されるシステム及び装置に好適となる。

【０２４０】

特定の他の例示的実施形態では、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）反応を用いて標的核酸が増幅されてもよい。ＲＰＡ反応は、配列特異的プライマーを二重鎖ＤＮＡの相同配列と対合させることが可能なリコンビナーゼを利用する。標的ＤＮＡが存在する場合、ＤＮＡ増幅が始まり、熱サイクリング又は化学的融解などの他の試料操作は不要である。ＲＰＡ増幅システム全体は乾燥製剤として安定しており、冷蔵することなく安全に輸送することができる。ＲＰＡ反応はまた、３７～４２℃の最適反応温度で等温で実施してもよい。配列特異的プライマーは、検出しようとする標的核酸配列を含む配列を増幅するように設計される。特定の例示的実施形態では、プライマーのうちの１つにＴ７プロモーターなどのＲＮＡポリメラーゼプロモーターが加えられる。これにより、標的配列とＲＮＡポリメラーゼプロモーターとを含む増幅された二本鎖ＤＮＡ産物が生じる。ＲＰＡ反応の後、又はその間にＲＮＡポリメラーゼが加えられ、これが二本鎖ＤＮＡ鋳型からＲＮＡを産生することになる。ひいては増幅された標的ＲＮＡを次にＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムによって検出することができる。このようにして本明細書に開示される実施形態を用いて標的ＤＮＡを検出することができる。ＲＰＡ反応はまた、標的ＲＮＡの増幅にも使用することができる。初めに標的ＲＮＡが逆転写酵素を使用してｃＤＮＡに変換され、続いて第２鎖がＤＮＡ合成された時点で上記に概説したとおりＲＰＡ反応が進む。

【０２４１】

従って、特定の例示的実施形態では、本明細書に開示されるシステムは増幅試薬を含み

得る。核酸の増幅に有用な種々の成分又は試薬が本明細書に記載される。例えば、本明細書に記載されるとおりの増幅試薬には、トリス緩衝液などの緩衝液が含まれ得る。トリス緩衝液は、例えば限定はされないが、１ｍＭ、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、６ｍＭ、７ｍＭ、８ｍＭ、９ｍＭ、１０ｍＭ、１１ｍＭ、１２ｍＭ、１３ｍＭ、１４ｍＭ、１５ｍＭ、２５ｍＭ、５０ｍＭ、７５ｍＭ、１Ｍの濃度など、所望の適用又は用途に適切な任意の濃度で使用することができる。当業者は、本発明で使用されるトリスなどの緩衝液の適切な濃度を決定することができるであろう。

【０２４２】

ＰＣＲなどの増幅反応には、核酸断片の増幅を向上させるため、塩化マグネシウム（$MgCl_2$）、塩化カリウム（ＫＣｌ）、又は塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）などの塩が含まれてもよい。塩濃度は特定の反応及び適用に依存することになるが、一部の実施形態では、特定のサイズの核酸断片が特定の塩濃度で最適な結果を生じ得る。産物が大きいほど、所望の結果を生じさせるために塩濃度を変える必要、典型的には塩を減らす必要があり、一方、小さい産物の増幅ほど、より高い塩濃度でより良好な結果が生じ得る。当業者は、塩の存在及び／又は濃度が、塩濃度の変化と共に、生物学的又は化学的反応のストリンジェンシーを変化させ、従って本発明及び本明細書に記載されるとおりの反応に適切な条件を提供する任意の塩を使用し得ることを理解するであろう。

【０２４３】

生物学的又は化学的反応の他の成分には、そこに含まれる材料の分析のため細胞をこじ開け又は溶解させるための細胞溶解成分が含まれ得る。細胞溶解成分としては、限定はされないが、界面活性剤、上記に記載したとおりの塩、例えば、ＮａＣｌ、ＫＣｌ、硫酸アンモニウム［$(NH_4)_2SO_4$］などを挙げることができる。本発明に適切であり得る界面活性剤としては、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、ＣＨＡＰＳ（３－［（３－コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ］－１－プロパンスルホネート）、エチルトリメチルアンモニウムブロミド、ノニルフェノキシポリエトキシルエタノール（ＮＰ－４０）を挙げることができる。界面活性剤の濃度は、詳細な適用に依存してもよく、場合によっては反応に特異的であり得る。増幅反応は、限定はされないが、１００ｎＭ、１５０ｎＭ、２００ｎＭ、２５０ｎＭ、３００ｎＭ、３５０ｎＭ、４００ｎＭ、４５０ｎＭ、５００ｎＭ、５５０ｎＭ、６００ｎＭ、６５０ｎＭ、７００ｎＭ、７５０ｎＭ、８００ｎＭ、８５０ｎＭ、９００ｎＭ、９５０ｎＭ、１ｍＭ、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、６ｍＭ、７ｍＭ、８ｍＭ、９ｍＭ、１０ｍＭ、２０ｍＭ、３０ｍＭ、４０ｍＭ、５０ｍＭ、６０ｍＭ、７０ｍＭ、８０ｍＭ、９０ｍＭ、１００ｍＭ、１５０ｍＭ、２００ｍＭ、２５０ｍＭ、３００ｍＭ、３５０ｍＭ、４００ｍＭ、４５０ｍＭ、５００ｍＭなどの濃度を含め、本発明に適切な任意の濃度で使用されるｄＮＴＰ及び核酸プライマーを含み得る。同様に、本発明において有用なポリメラーゼは、Ｔａｑポリメラーゼ、Ｑ５ポリメラーゼなどを含め、当該技術分野において公知の、及び本発明に有用な、任意の特異的な又は一般的なポリメラーゼであってよい。

【０２４４】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるとおりの増幅試薬は、ホットスタート増幅における使用に適切であり得る。ホットスタート増幅は、一部の実施形態においてアダプター分子又はオリゴの二量化を低減し又は除去するのに、又はその他、望ましくない増幅産物又はアーチファクトを防いで所望の産物の最適な増幅を達成するのに有益であり得る。増幅に用いられる本明細書に記載される成分の多くはまた、ホットスタート増幅においても使用し得る。一部の実施形態では、ホットスタート増幅での使用に適切な試薬又は成分を、適宜、組成成分のうちの１つ以上の代わりに使用することができる。例えば、特定の温度又は他の反応条件で所望の活性を呈するポリメラーゼ又は他の試薬を使用し得る。一部の実施形態では、ホットスタート増幅における使用向けに設計又は最適化される試薬を使用してもよく、例えば、転移後、又は特定の温度に達した後にポリメラーゼが活性化されてもよい。かかるポリメラーゼは抗体ベース又はアプタマーベースであり得る。本明細書に記載されるとおりのポリメラーゼは当該技術分野において公知である。かかる試薬

の例としては、限定はされないが、ホットスタートポリメラーゼ、ホットスタートｄＮＴＰ、及びフォトケージドｄＮＴＰを挙げることができる。かかる試薬は当該技術分野において公知で、利用可能である。当業者は、個別の試薬に適切なとおりの最適な温度を決定することができるであろう。

【０２４５】

核酸の増幅は特異的な熱サイクル機械又は機器を使用して実施されてもよく、単一の反応で、又はバルクで、任意の所望の回数の反応が同時に実施され得るように実施されてもよい。一部の実施形態では、増幅はマイクロ流体装置又はロボット装置を使用して実施されてもよく、又は所望の増幅が実現するように手動の温度変更を用いて実施されてもよい。一部の実施形態では、特定の適用又は材料に最適な反応条件が達成されるように最適化が実施されてもよい。当業者は、十分な増幅を達成するための反応条件を理解し、それを最適化することができるであろう。

【０２４６】

特定の実施形態において、本発明の方法又はシステムによるＤＮＡの検出は、検出前に（増幅された）ＤＮＡをＲＮＡに転写する必要がある。

【０２４７】

標的ＲＮＡ／ＤＮＡ集積

特定の例示的実施形態では、標的ＲＮＡ又はＤＮＡは、標的ＲＮＡ又はＤＮＡの検出又は増幅前に初めに集積されてもよい。特定の例示的実施形態では、この集積は、ＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムによって標的核酸を結合することにより実現し得る。

【０２４８】

現行の標的特異的集積プロトコルでは、プローブとのハイブリダイゼーション前に一本鎖核酸が必要である。様々な利点の中でも特に、本実施形態はこのステップを省くことができ、二本鎖ＤＮＡ（部分的二本鎖又は完全な二本鎖のいずれも）への直接的なターゲティングが可能である。加えて、本明細書に開示される実施形態は、等温集積を可能にするより速い反応速度及びより簡易なワークフローを提供する酵素駆動によるターゲティング方法である。特定の例示的実施形態では、集積は２０～３７℃もの低い温度で行われ得る。特定の例示的実施形態では、単一のアッセイで種々の標的核酸に対する一組のガイドＲＮＡが使用され、複数の標的及び／又は単一の標的の複数の変異体の検出が可能である。

【０２４９】

特定の例示的実施形態では、デッドＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質が溶液中の標的核酸に結合し、次に続いて前記溶液から単離され得る。例えば、標的核酸に結合したデッドＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、デッドＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質に特異的に結合する抗体又は他の分子、例えばアプタマーを使用して溶液から単離され得る。

【０２５０】

他の例示的実施形態において、デッドＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は固体基材に結合されてもよい。固定的基材とは、ポリペプチド又はポリヌクレオチドの結合に適切な、又は適切となるように改良することができる任意の材料を指し得る。可能な基材としては、限定はされないが、ガラス及び修飾されて機能化されたガラス、プラスチック（アクリル、ポリスチレン及びスチレンと他の材料との共重合体、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン類、Ｔｅｆｌｏｎ（商標）等を含む）、多糖類、ナイロン又はニトロセルロース、セラミック、樹脂、シリカ又はケイ素及び修飾ケイ素を含むシリカ系材料、炭素、金属、無機ガラス、プラスチック、光ファイバー束、及び種々の他のポリマーが挙げられる。一部の実施形態では、固体支持体は、分子を規則正しいパターンで固定化するのに好適なパターン化された表面を含む。特定の実施形態において、パターン化された表面は、固体支持体の露出した層内又は層上に種々の領域が配置されたものを指す。一部の実施形態では、固体支持体は、表面におけるウェル又は陥凹部のアレイを含む。固体支持体の組成及び幾何学的側面は、その用途に伴い変わり得る。一部の実施形態では、固体支持体は、スライド、チップ、マイクロチップ及び／又はアレイなどの平面

的な構造である。従って、基材の表面は平面的な層の形態であってもよい。一部の実施形態では、固体支持体は、フローセルの１つ以上の表面を含む。用語「フローセル」は、本明細書で使用されるとき、その全面にわたって１つ以上の流体試薬を流し得る固体表面を含むチャンバを指す。本開示の方法で容易に使用し得る例示的なフローセル並びに関連する流体システム及び検出プラットフォームが、例えば、Ｂｅｎｔｌｅｙ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４５６：５３－５９（２００８）、国際公開第０４／０９１８４９７号パンフレット、米国特許第７，０５７，０２６号明細書；国際公開第９１／０６６７８号パンフレット；国際公開第０７／１２３７４４号パンフレット；米国特許第７，３２９，４９２号明細書；米国特許第７，２１１，４１４号明細書；米国特許第７，３１５，０１９号明細書；米国特許第７，４０５，２８１号明細書、及び米国特許出願公開第２００８／０１０８０８２号明細書に記載されている。一部の実施形態では、固体支持体又はその表面は、チューブ又はベッセルの内表面又は外表面など、平面状でない。一部の実施形態では、固体支持体はマイクロスフェア又はビーズを含む。「マイクロスフェア」、「ビーズ」、「粒子」は、固体基材の文脈内では、限定はされないが、プラスチック、セラミック、ガラス、及びポリスチレン（ｐｌｙｓｔｙｒｅｎｅ）を含めた様々な材料で作られた小さい個別の粒子を意味することが意図される。特定の実施形態において、マイクロスフェアは磁性マイクロスフェア又はビーズである。それに代えて又は加えて、ビーズは多孔質であってもよい。ビーズ粒径は数ナノメートル、例えば１００ｎｍから数ミリメートル、例えば１ｍｍに及ぶ。

【０２５１】

次に、標的核酸を含有する、又は含有する疑いがある試料を基材に曝露して、結合したデッドＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質に標的核酸を結合させ得る。次に非標的分子が洗い流され得る。特定の例示的実施形態では、次に本明細書に開示される方法を使用した更なる検出のため、標的核酸をＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質／ガイドＲＮＡ複合体から放出させてもよい。特定の例示的実施形態では、標的核酸は初めに本明細書に記載されるとおり増幅されてもよい。

【０２５２】

特定の例示的実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは結合タグで標識されてもよい。特定の例示的実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは化学的にタグ付加されてもよい。例えば、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは化学的にビオチン化されてもよい。別の例示的実施形態では、融合物をコードする追加的な配列をＣＲＩＳＰＲエフェクターに付加することにより融合物が作られてもよい。かかる融合物の一例はＡｖｉＴａｇ（商標）であり、これは、ユニークな１５アミノ酸ペプチドタグ上の単一ビオチンの高度に標的化された酵素的コンジュゲーションを利用するものである。特定の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲエフェクターは、限定はされないが、ＧＳＴ、Ｍｙｃ、ヘマグルチニン（ＨＡ）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ｆｌａｇ、Ｈｉｓタグ、ＴＡＰタグ、及びＦｃタグなどのキャプチャータグで標識されてもよい。融合物であれ、化学的タグであれ、又はキャプチャータグであれ、結合タグは、それが標的核酸に結合した後はＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムのプルダウンに使用されるか、又はＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムを固体基材に固定するために使用されるかのいずれかであり得る。

【０２５３】

特定の例示的実施形態では、ガイドＲＮＡが結合タグで標識されてもよい。特定の例示的実施形態では、ビオチン化ウラシルなどの１つ以上のビオチン化ヌクレオチドを取り込むインビトロ転写（ＩＶＴ）を使用して、ガイドＲＮＡ全体が標識されてもよい。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡの３’末端への１つ以上のビオチン基の付加など、ガイドＲＮＡにビオチンを化学的又は酵素的に付加することができる。結合タグは、結合が起こった後には、例えばストレプトアビジンでコートされた固体基材にガイドＲＮＡ／標的核酸を曝露することによるガイドＲＮＡ／標的核酸複合体のプルダウンに使用されてもよい。

【０２５４】

従って、特定の例示的実施形態では、エンジニアリングされた又は天然に存在しないＣ

ＲＩＳＰＲエフェクターが集積目的で用いられ得る。ある実施形態において、改変は、エフェクタータンパク質の１つ以上のアミノ酸残基の突然変異を含み得る。１つ以上の突然変異は、エフェクタータンパク質の１つ以上の触媒活性ドメインにあってもよい。このエフェクタータンパク質は、前記１つ以上の突然変異を欠くエフェクタータンパク質と比較してヌクレアーゼ活性が低下し又は消失していてもよい。エフェクタータンパク質は目的の標的遺伝子座におけるＲＮＡ鎖の切断を誘導しないものであり得る。好ましい実施形態において、１つ以上の突然変異は２つの突然変異を含み得る。好ましい実施形態において、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質、例えば、エンジニアリングされた又は天然に存在しないエフェクタータンパク質又はＣ２ｃ２において１つ以上のアミノ酸残基が改変される。詳細な実施形態において、１つ以上の改変された又は突然変異したアミノ酸残基は、突然変異Ｒ５９７Ａ、Ｈ６０２Ａ、Ｒ１２７８Ａ及びＨ１２８３Ａなど、Ｃ２ｃ２におけるＲ５９７、Ｈ６０２、Ｒ１２７８及びＨ１２８３（Ｌｓｈ　Ｃ２ｃ２アミノ酸を基準とする）に対応するもののうちの１つ以上、又はＬｓｈ　Ｃ２ｃ２オルソログにおける対応するアミノ酸残基である。

【０２５５】

詳細な実施形態において、１つ以上の改変された又は突然変異したアミノ酸残基は、Ｃ２ｃ２コンセンサス付番に基づいて、Ｃ２ｃ２におけるＫ２、Ｋ３９、Ｖ４０、Ｅ４７９、Ｌ５１４、Ｖ５１８、Ｎ５２４、Ｇ５３４、Ｋ５３５、Ｅ５８０、Ｌ５９７、Ｖ６０２、Ｄ６３０、Ｆ６７６、Ｌ７０９、Ｉ７１３、Ｒ７１７（ＨＥＰＮ）、Ｎ７１８、Ｈ７２２（ＨＥＰＮ）、Ｅ７７３、Ｐ８２３、Ｖ８２８、Ｉ８７９、Ｙ８８０、Ｆ８８４、Ｙ９９７、Ｌ１００１、Ｆ１００９、Ｌ１０１３、Ｙ１０９３、Ｌ１０９９、Ｌ１１１１、Ｙ１１１４、Ｌ１２０３、Ｄ１２２２、Ｙ１２４４、Ｌ１２５０、Ｌ１２５３、Ｋ１２６１、Ｉ１３３４、Ｌ１３５５、Ｌ１３５９、Ｒ１３６２、Ｙ１３６６、Ｅ１３７１、Ｒ１３７２、Ｄ１３７３、Ｒ１５０９（ＨＥＰＮ）、Ｈ１５１４（ＨＥＰＮ）、Ｙ１５４３、Ｄ１５４４、Ｋ１５４６、Ｋ１５４８、Ｖ１５５１、Ｉ１５５８に対応するもののうちの１つ以上である。特定の実施形態において、１つ以上の改変された又は突然変異したアミノ酸残基は、Ｃ２ｃ２におけるＲ７１７及びＲ１５０９に対応するもののうちの１つ以上である。特定の実施形態において、１つ以上の改変された又は突然変異したアミノ酸残基は、Ｃ２ｃ２におけるＫ２、Ｋ３９、Ｋ５３５、Ｋ１２６１、Ｒ１３６２、Ｒ１３７２、Ｋ１５４６及びＫ１５４８に対応するもののうちの１つ以上である。特定の実施形態において、前記突然変異は、活性が変化した又は改変されたタンパク質を生じさせる。特定の実施形態において、前記突然変異は、特異性が低下するなど、活性が低下したタンパク質を生じさせる。特定の実施形態において、前記突然変異は、触媒活性を有しないタンパク質（即ち「デッド」Ｃ２ｃ２）を生じさせる。ある実施形態において、前記アミノ酸残基は、Ｌｓｈ　Ｃ２ｃ２アミノ酸残基、又は別の種のＣ２ｃ２タンパク質の対応するアミノ酸残基に対応する。これらのステップを促進することのできる装置。一部の実施形態では、Ｃａｓ１３ｂエフェクターと１つ以上の機能ドメインとの融合タンパク質のサイズを低減するため、そのＲＮＡ結合機能はなお維持しながらも、Ｃａｓ１３ｂエフェクターの Ｃ末端をトランケートすることができる。例えば、Ｃａｓ１３ｂエフェクターの Ｃ末端で少なくとも２０アミノ酸、少なくとも５０アミノ酸、少なくとも８０アミノ酸、又は少なくとも１００アミノ酸、又は少なくとも１５０アミノ酸、又は少なくとも２００アミノ酸、又は少なくとも２５０アミノ酸、又は少なくとも３００アミノ酸、又は少なくとも３５０アミノ酸、又は最大１２０アミノ酸、又は最大１４０アミノ酸、又は最大１６０アミノ酸、又は最大１８０アミノ酸、又は最大２００アミノ酸、又は最大２５０アミノ酸、又は最大３００アミノ酸、又は最大３５０アミノ酸、又は最大４００アミノ酸をトランケートしてもよい。Ｃａｓ１３ｂのトランケーションの具体的な例としては、Ｃ末端Δ９８４～１０９０、Ｃ末端Δ１０２６～１０９０、及びＣ末端Δ１０５３～１０９０、Ｃ末端Δ９３４～１０９０、Ｃ末端Δ８８４～１０９０、Ｃ末端Δ８３４～１０９０、Ｃ末端Δ７８４～１０９０、及びＣ末端Δ７３４～１０９０が挙げられ、ここでアミノ酸位置はプレボテラ属種（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｓｐ．）Ｐ５－１２５　Ｃａｓ１３ｂタンパク質のアミノ酸

位置に対応する。

【０２５６】

上記の集積システムはまた、特定の核酸の試料を枯渇させるためにも使用し得る。例えば、ガイドＲＮＡが、非標的ＲＮＡに結合して試料から非標的ＲＮＡを除去するように設計されてもよい。一例示的実施形態では、ガイドＲＮＡが、特定の核酸変異を実に保有する核酸に結合するように設計されてもよい。例えば、所与の試料において、非変異核酸のコピー数がより高いと予想され得る。従って、本明細書に開示される実施形態を使用して試料から非変異核酸を除去してもよく、それによってＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムが所与の試料中において標的変異配列を検出することができる検出の効率が増加し得る。

【０２５７】

検出可能な正のシグナルの増幅及び／又は増強

特定の例示的実施形態では、検出可能な正のシグナルを更に増幅する更なる改変が導入され得る。例えば、活性化ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質コラテラル活性化を用いて二次標的又は追加のガイド配列、又は両方を生成し得る。一例示的実施形態において、反応液は、高濃度でスパイクされる二次標的を含有し得る。二次標的は一次標的（即ちアッセイがそれを検出するように設計される標的）と異なってもよく、特定の例では全ての反応容積に共通していてもよい。二次標的用の二次ガイド配列は、例えばＲＮＡループを有し且つ第２の標的又はＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質に結合することができないヘアピンなどの二次構造的特徴によって保護されていてもよい。活性化したＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質による（即ち、溶液中の１つ又は複数の一次標的との複合体形成による活性化後の）保護基の切断、溶液中の遊離ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質との複合体の形成、二次標的におけるスパイクされたからの活性化。特定の他の例示的実施形態において、同様の概念が二次標的配列に対する第２のガイド配列で用いられる。二次標的配列は構造的特徴又は二次標的上の保護基によって保護されていてもよい。保護基が切断されて二次標的が離れると、次には追加のＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質／二次ガイド配列／二次標的複合体の形成が可能となる。更に別の例示的実施形態では、１つ又は複数の一次標的によるＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質の活性化を用いて、保護された又は環状化したプライマーを切断してもよく、次にはそれが放出されて、二次ガイド配列、二次標的配列、又は両方をコードする鋳型に対して本明細書に開示されるものなどの等温増幅反応が実施される。この増幅された鋳型が続いて転写されれば、より多くの二次ガイド配列及び／又は二次標的配列が生じ、続いて追加のＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質コラテラル活性化が生じ得る。

【０２５８】

タンパク質の検出

本明細書に開示されるシステム、装置、及び方法はまた、核酸の検出に加えて、特異的に構成されたポリペプチド検出アプタマーの取り込みにより、ポリペプチド（又は他の分子）の検出にも適合させることができる。ポリペプチド検出アプタマーは、上記で考察されるマスキング構築物アプタマーとは異なる。第一に、このアプタマーは１つ以上の標的分子に特異的に結合するように設計される。一例示的実施形態において、標的分子は標的ポリペプチドである。別の例示的実施形態では、標的分子は標的治療用分子などの標的化学的化合物である。ＳＥＬＥＸなど、所与の標的に対して特異性を有するアプタマーを設計及び選択する方法は、当該技術分野において公知である。所与の標的に対する特異性に加えて、アプタマーは更に、ＲＮＡポリメラーゼプロモーター結合部位を取り込むように設計される。特定の例示的実施形態では、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターはＴ７プロモーターである。標的に結合するアプタマー（ａｐａｔａｍｅｒ）と結合する前は、ＲＮＡポリメラーゼ部位は到達不可能であり、又は他の形でＲＮＡポリメラーゼにとって認識不可能である。しかしながら、アプタマーは、標的の結合時にアプタマーの構造がコンホメーション変化を受けて、次にはＲＮＡポリメラーゼプロモーターが露出するように構成される。ＲＮＡポリメラーゼプロモーターの下流のアプタマー配列が、ＲＮＡポリメラーゼによるトリガーＲＮＡオリゴヌクレオチドの生成用の鋳型として働く。従って、アプタマ

ーの鋳型部分は、所与のアプタマー及びその標的を同定するバーコード又は他の同定用配列を更に取り込み得る。次には上記に記載したとおりのガイドＲＮＡが、こうした特異的トリガーオリゴヌクレオチド配列を認識するように設計されてもよい。ガイドＲＮＡがトリガーオリゴヌクレオチドに結合するとＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質が活性化され、それに続いて先述のとおりマスキング構築物が不活性化され、正の検出可能シグナルが生成される。

【０２５９】

従って、特定の例示的実施形態では、本明細書に開示される方法は、個別独立分離容積セットであって、ペプチド検出アプタマー、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質、１つ以上のガイドＲＮＡ、マスキング構築物を各々が含む個別独立分離容積に試料又は試料セットを分配するステップ、及び検出アプタマーを１つ以上の標的分子に結合させるのに十分な条件下で試料又は試料セットをインキュベートするステップという追加的なステップを含み、ここでアプタマーが対応する標的に結合するとＲＮＡポリメラーゼプロモーター結合部位が露出し、ＲＮＡポリメラーゼがＲＮＡポリメラーゼプロモーター結合部位に結合することによりトリガーＲＮＡの合成が始まる。

【０２６０】

別の例示的実施形態では、アプタマーが標的ポリペプチドに結合すると、アプタマーの結合によってプライマー結合部位が露出し得る。例えば、アプタマーはＲＰＡプライマー結合部位を露出させ得る。従って、次には上記に概説したＲＰＡ反応などの増幅反応にプライマーの付加又は包含が提供されることになる。

【０２６１】

特定の例示的実施形態では、アプタマーはコンホメーションスイッチングアプタマーであってもよく、これは目的の標的への結合時に二次構造が変化し、一本鎖ＤＮＡの新しい領域が露出し得る。特定の例示的実施形態では、一本鎖ＤＮＡのこれらの新しい領域は、ライゲーション、アプタマーの伸長及び本明細書に開示される実施形態を用いて特異的に検出することのできるより長いｓｓＤＮＡ分子の作成の基質として用いられ得る。アプタマー設計は、グルコースなどの低エピトープ標的の検出用の三重複合体と更に組み合わせることができる（Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．２０１５：ｈｔｔｐ：／／ｐｕｂｓ．ａｃｓ．ｏｒｇ／ｄｏｉ／ａｂｓ／１０．１０２１／ａｃｓ．ａｎａｌｃｈｅｍ．５ｂ０１６３４）。例示的なコンホメーションシフトアプタマー及び対応するガイドＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を以下に示す。

| | |
|---|---|
| トロンビンアプタマー | (配列番号 186) |
| トロンビンライゲーションプローブ | (配列番号 187) |
| トロンビン RPA フォワード 1 プライマー | (配列番号 188) |
| トロンビン RPA フォワード 2 プライマー | (配列番号 189) |
| トロンビン RPA リバース 1 プライマー | (配列番号 190) |
| トロンビン crRNA1 | (配列番号 191) |
| トロンビン crRNA2 | (配列番号 192) |
| トロンビン crRNA3 | (配列番号 193) |
| PTK7 完全長アンプリコン対照 | (配列番号 194) |
| PTK7 アプタマー | (配列番号 195) |
| PTK7 ライゲーションプローブ | (配列番号 196) |
| PTK7RPA フォワード 1 プライマー | (配列番号 197) |
| PTK7RPA リバース 1 プライマー | (配列番号 198) |
| PTK7 crRNA 1 | (配列番号 199) |
| PTK7 crRNA 2 | (配列番号 200) |
| PTK7 crRNA 3 | (配列番号 201) |

【０２６２】

装置

本明細書に記載されるシステムは、診断装置上で具体化することができる。幾つもの基材及び構成が用いられ得る。装置は、装置内に複数の個別独立分離容積を画成可能なものであってよい。本明細書で使用されるとき、「個別独立分離容積」とは、容器、入れ物、又はその他の、標的分子の移動を防ぐ及び／又は阻むという特性によって定義することのできる画成された容積又は空間、例えば、不透過性又は半透過性であり得る壁、例えばウェル、チューブの壁、又は液滴の表面など、物理的特性によって画成されるか、又は化学、拡散律速、電磁気、又は光照射、又はこれらの任意の組み合わせなどの他の手段によって画成されるとおりの、画成された空間内に試料を入れることができる容積又は空間など、独立分離空間を指す。個別独立分離容積は、核酸バーコードなどの分子タグによって同定されてもよい。「拡散律速的」（例えば拡散によって定義される容積）とは、拡散が一方の層流から他方の層流への標的分子の移動を制限し得る２つの平行な層流の場合のように、拡散上の制約が空間又は容積を有効に画成するため特定の分子又は反応のみが到達可能な空間を意味する。「化学的」に画成される容積又は空間とは、その化学的特性又はサイズなどの分子特性に起因して特定の標的分子のみが存在することのできる空間を意味し、例えばゲルビーズは、ビーズの表面電荷、マトリックスサイズ又はその他の、ビーズの内部に入り得る種の選択を可能にし得る物理的特性などにより、特定の種がビーズに入るのを排除し得るが、他の種が入るのは排除しない。「電磁気的に」画成された容積又は空間とは、電荷又は磁気特性など、標的分子又はその支持体の電磁気的特性を用いて、磁場内の捕捉用磁性粒子など空間内に、又は磁石上に直接、特定の領域を画成することのできる空間を意味する。「光学的に」画成される容積とは、画成された空間又は容積内にある標的分子のみが標識され得るようにそれを可視、紫外、赤外、又は他の波長の光で照射す

ることにより画成され得る空間の任意の領域を意味する。壁のない、又は半透過性の独立分離容積を使用する一つの利点は、標的分子などの他の材料は独立分離容積又は空間内に維持されつつも、緩衝液、化学的アクチベーター、又は他の薬剤などの一部の試薬は独立分離容積を通過させ得ることである。典型的には、独立分離容積は、標識付加が可能な条件下でインデックス化可能な核酸識別子によって標的分子を標識するのに好適な流動媒体（例えば、水溶液、油、緩衝液、及び／又は細胞成長を支持可能な培地）を含むことになる。本開示の方法において有用な例示的独立分離容積又は空間としては、とりわけ、液滴（例えば、マイクロ流体力学的液滴及び／又はエマルション液滴）、ヒドロゲルビーズ又は他のポリマー構造（例えばポリエチレングリコールジアクリレートビーズ又はアガロースビーズ）、組織スライド（例えば、化学的、光学的、又は物理的手段によって画成された特定の領域、容積、又は空間を有する固定化ホルマリンパラフィン包埋組織スライド）、規則正しく並んだアレイ又はランダムパターンで試薬を堆積させることにより画成される領域を有する顕微鏡スライド、チューブ（遠心管、微量遠心管、試験管、キュベット、コニカルチューブなど）、ボトル（ガラスボトル、プラスチックボトル、セラミックボトル、三角フラスコ、シンチレーションバイアルなど）、ウェル（プレート内のウェルなど）、プレート、ピペット、又はピペットチップが挙げられる。特定の実施形態において、区画は油中水型エマルション中の水性液滴である。具体的な実施形態において、正確又は均一な容積が要求される本明細書に記載される任意の適用、方法、又はシステムでは、音響液体ディスペンサーの使用が利用されてもよい。

【０２６３】

特定の例示的実施形態では、本装置は、幾つものスポットがその上に画成され得る可撓性材料基材を含む。診断及びバイオセンシングにおける使用に好適な可撓性材料基材は当該技術分野内において公知である。可撓性材料基材はセルロース系繊維などの植物由来の繊維で作られてもよく、又は可撓性ポリエステルフィルムなどの可撓性ポリマー及び他のポリマータイプで作られてもよい。画成される各スポットの範囲内で、本明細書に記載されるシステムの試薬が個別のスポットに適用される。各スポットには、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡのセットが異なること、又は適用可能な場合には、複数の標的を同時にスクリーニングするための検出アプタマーが異なることを除いて同じ試薬が含まれ得る。従って、本明細書におけるシステム及び装置は、複数の供給源からの試料（例えば異なる個体からの複数の臨床試料）を同じ標的、又は限られた数の標的の存在に関してスクリーニングすること、又は単一の試料のアリコート（又は同じ供給源からの複数の試料）を試料中の複数の異なる標的の存在に関してスクリーニングすることが可能であり得る。特定の例示的実施形態では、本明細書に記載されるシステムの要素は紙又は布の基材上にフリーズドライされる。特定の例示的装置で用いられ得る例示的可撓性材料ベースの基材が、Ｐａｒｄｅｅ ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ．２０１６，１６５（５）：１２５５－６６及びＰａｒｄｅｅ ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ．２０１４，１５９（４）：９５０－５４に開示されている。血液を含めた生体液を伴う使用に好適な可撓性材料ベースの基材が、Ｓｈｅｖｋｏｐｌｙａｓ ｅｔ ａｌ．に対する「Ｐａｐｅｒ ｂａｓｅｄ ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ ｔｅｓｔ」と題される国際公開第２０１３／０７１３０１号パンフレット、Ｓｉｅｇｅｌ ｅｔ ａｌ．に対する「Ｐａｐｅｒ－ｂａｓｅｄ ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ ｓｙｓｔｅｍｓ」と題される米国特許出願公開第２０１１／０１１１５１７号明細書、及びＳｈａｆｉｅｅ ｅｔ ａｌ．「複数の生物学的標的を検出するバイオセンシングプラットフォーム用材料としての紙及び可撓性基材（Ｐａｐｅｒ ａｎｄ Ｆｌｅｘｉｂｌｅ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅｓ ａｓ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｓｅｎｓｉｎｇ Ｐｌａｔｆｏｒｍｓ ｔｏ Ｄｅｔｅｃｔ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｂｉｏｔａｒｇｅｔｓ）」Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ ５：８７１９（２０１５）に開示されている。更なる可撓性ベースの材料が、装着型診断装置における使用に好適なものを含め、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．「ポイント・オブ・ケア診断用の可撓性基材ベースの装置（Ｆｌｅｘｉｂｌｅ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ－Ｂａｓｅｄ Ｄｅｖｉｃｅｓ ｆｏｒ Ｐｏｉｎｔ－ｏｆ－Ｃａｒｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）」Ｃｅｌｌ ３４（１１）：９０９－２１（２０１６）に開示されている。更なる

可撓性ベースの材料としては、ニトロセルロース、ポリカーボネート、メチルエチルセルロース、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）、ポリスチレン、又はガラスを挙げることができる（例えば、米国特許出願公開第２０１２０２３８００８号明細書を参照）。特定の実施形態において、独立分離容積は、限定はされないが、ワックス、フォトレジスト、又は固体インクなどの疎水性表面によって分けられる。

【０２６４】

一部の実施形態では、着用者が特定の微生物又は他の薬剤への曝露に関して通知を受けるようなセンサー又はインジケーターとして働くドシメーター又はバッジが提供されてもよい。例えば、本明細書に記載されるシステムを使用して特定の病原体が検出されてもよい。同様に、上記に開示されるアプタマーベースの実施形態を使用して、特異的アプタマーが結合し得るポリペプチド並びに他の薬剤、例えば化学薬剤の両方が検出されてもよい。かかる装置は、例えば生物学的又は化学的兵器剤の検出用に、潜在的に危険な薬剤への曝露に関する情報を可能な限り早く提供するための兵士又は他の軍事要員、並びに臨床医、研究者、病院職員などの監視に有用であり得る。他の実施形態において、かかる監視バッジは、患者、化学療法を受けている患者、小児、又は高齢者個体における危険な微生物又は病原体への曝露の防止に用いられ得る。

【０２６５】

本明細書に記載されるシステム及び装置を使用して分析され得る試料供給源には、対象の生体試料又は環境試料が含まれる。環境試料は表面又は流体を含み得る。生体試料としては、限定はされないが、唾液、血液、血漿、血清、便、尿、喀痰、粘液、リンパ液、滑液、髄液、脳脊髄液、皮膚若しくは粘膜からのスワブ、又はこれらの組み合わせを挙げることができる。例示的実施形態において、環境試料は、食品又は他の敏感な組成物及び材料の調製に使用される表面など、固体表面から採取される。

【０２６６】

他の例示的実施形態において、本明細書に記載されるシステムの要素は、表面の拭き取り又は流体のサンプリングに使用されるスワブ又は布などの使い捨て基材上に置かれ得る。例えば、本システムを使用して、果実又は野菜などの食品製品の表面を拭き取ることにより、食品上の病原体の存在に関して試験し得る可能性がある。同様に、本使い捨て基材を使用して、セキュリティーチェックにおける使用など、特定の微生物又は媒介物の検出のため他の表面を拭き取ってもよい。本使い捨て基材はまた、科学捜査にも適用があってよく、ここではＣＲＩＳＰＲシステムが、容疑者の特定に使用し得るＤＮＡ　ＳＮＰ、又は試料中に存在する生物学的物質の種類を決定するための特定の組織若しくは細胞マーカーを検出、例えば同定するように設計される。同様に、本使い捨て基材を使用して、患者から試料－口からの唾液試料など－又は皮膚のスワブを収集し得る可能性がある。他の実施形態において、試料又はスワブは、肉製品上又は肉製品内の汚染の有無を検出するため肉製品から取られてもよい。

【０２６７】

食品、臨床、工業、及び他の環境セッティングに準リアルタイム微生物診断が必要とされている（例えば、Ｌｕ　ＴＫ，Ｂｏｗｅｒｓ　Ｊ，ａｎｄ　Ｋｏｅｒｉｓ　ＭＳ．，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１３　Ｊｕｎ；３１（６）：３２５－７を参照）。特定の実施形態において、本発明は、病原体（例えば、カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）、ウェルシュ菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、サルモネラ属種（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｓｐｐ．）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、セレウス菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｅｒｅｕｓ）、リステリア菌（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、赤痢菌属種（Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｓｐｐ．）、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）、ブドウ球菌性腸炎、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、コレラ菌（Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａｅ）、腸炎ビブリオ（Ｖｉｂｒｉｏ　ｐａｒａｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）、ビブリオ・バルニフィカス（Ｖｉｂｒｉｏ　ｖｕｌｎｉｆｉｃｕｓ）、腸炎エルシニア（Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｅｎｔｅｒｏｃｏｌｉｔｉｃａ）及び偽結

核菌（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｓｅｕｄｏｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ブルセラ属種（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ｓｐｐ．）、コリネバクテリウム・ウルセランス（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｕｌｃｅｒａｎｓ）、Ｑ熱コクシエラ（Ｃｏｘｉｅｌｌａ ｂｕｒｎｅｔｉｉ）、又はプレジオモナス・シゲロイデス（Ｐｌｅｓｉｏｍｏｎａｓ ｓｈｉｇｅｌｌｏｉｄｅｓ））に特異的なガイドＲＮＡを使用した食品媒介病原体の迅速検出に使用される。

【０２６８】

特定の実施形態において、本装置はフローストリップであるか、又はそれを含む。例えば、ラテラルフローストリップは、色によるＲＮａｓｅ（例えばＣ２ｃ２）検出が可能である。ＲＮＡレポーターが、５’末端に結合した第１の分子（例えばＦＩＴＣなど）と３’末端に結合した第２の分子（例えばビオチンなど）と（又はその逆）を有するように改変される。ラテラルフローストリップは、抗第１の分子（例えば抗ＦＩＴＣ）抗体が第１のラインにハイブリダイズし、且つ抗第２の分子（例えば抗ビオチン）抗体が第２の下流ラインにハイブリダイズした、２つの捕捉ラインを有するように設計される。反応液の流れがストリップを下るにつれ、切断されていないレポーターは第１の捕捉ラインで抗第１の分子抗体に結合することになり、一方、切断されたレポーターは第２の分子を遊離させて第２の捕捉ラインで第２の分子を結合することになる。例えば金ナノ粒子などのナノ粒子にコンジュゲートした第２の分子のサンドイッチ抗体は、第１又は第２のラインで任意の第２の分子を結合することになり、強力なリードアウト／シグナル（例えば色）が生じる。より多くのレポーターが切断されるにつれ、第２の捕捉ラインにより多くのシグナルが蓄積することになり、第１のラインに見えるシグナルが少なくなることになる。特定の態様において、本発明は、本明細書に記載されるとおりのフローストリップ（ｆｏｌｌｏｗｓｔｒｉｐ）を使用した核酸又はポリペプチドの検出に関する。特定の態様において、本発明は、本明細書に定義するとおりのフローストリップによる核酸又はポリペプチドの検出方法、例えば（ラテラル）フローテスト又は（ラテラル）フローイムノクロマトグラフィーアッセイに関する。

【０２６９】

特定の例示的実施形態では、本装置は、異なる液滴（即ち個別独立分離容積）を生成する及び／又は交ぜ合わせるマイクロ流体デバイスである。例えば、スクリーニングしようとする試料を含有する第１の液滴セットが形成され、及び本明細書に記載されるシステムの要素を含有する第２の液滴セットが形成されてもよい。次に第１及び第２の液滴セットが交ぜ合わされ、次に交ぜ合わされた液滴セットに対して本明細書に記載されるとおりの診断方法が実行される。本明細書に開示されるマイクロ流体デバイスはシリコーンベースのチップであってもよく、限定はされないが、熱エンボス加工、エラストマー成形、射出成形、ＬＩＧＡ、ソフトリソグラフィー、シリコン製造及び関連する薄膜加工技法を含め、種々の技法を用いて製造され得る。マイクロ流体デバイスの製造に好適な材料はとしては、限定はされないが、環状オレフィンコポリマー（ＣＯＣ）、ポリカーボネート、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）、及びポリ（アクリル酸メチル）（ＰＭＭＡ）が挙げられる。一実施形態では、ＰＤＭＳにおけるソフトリソグラフィーを使用してマイクロ流体デバイスが調製されてもよい。例えば、基材内にフローチャネル、弁、及びフィルタの位置を画成するフォトリソグラフィーを用いてモールドが作製されてもよい。基材材料をモールドに注入して固まらせると、型押し物が作り出される。次にこの型押し物を、限定はされないがガラスなどの固体支持体に封じ付ける。一部のタンパク質を吸収して特定の生物学的過程を阻害し得るＰＤＭＳなどの一部のポリマーの疎水性の性質に起因して、パッシベーション剤が必要となり得る（Ｓｃｈｏｆｆｎｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９６，２４：３７５－３７９）。好適なパッシベーション剤は当該技術分野において公知であり、限定はされないが、シラン、パリレン、ｎ－ドデシル－ｂ－Ｄ－マルトシド（ｍａｔｏｓｉｄｅ）（ＤＤＭ）、プルロニック、ツイーン－２０、他の類似の界面活性剤、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、アルブミン、コラーゲン、並びに他の同様のタンパク質及びペプチドが挙げられる。

【０２７０】

特定の例示的実施形態では、本システム及び／又は装置は、単一の実験での何百万もの細胞の高感度定量的測定の全てにおいてフローサイトメトリーのリードアウトへの変換に適合され、又はそれを可能にし、及びＰｒｉｍｅＦｌｏｗアッセイなどの既存のフローベースの方法を改良し得る。特定の例示的実施形態では、細胞は、非重合ゲルモノマーを含有する液滴中にキャストされてもよく、次にはこれをフローサイトメトリーによる分析に好適な単一細胞液滴にキャストすることができる。蛍光検出可能標識を含む検出構築物が、非重合ゲルモノマーを含む液滴にキャストされてもよい。ゲルモノマーが重合すると液滴内にビーズが形成される。ゲル重合はフリーラジカルの形成によるため、蛍光レポーターがゲルに共有結合的に結合するようになる。検出構築物は、アミンなどのリンカーを含むように更に改変されてもよい。ゲル形成後に消光剤が加えられてもよく、リンカーを介してレポーター構築物に結合することになる。従って、消光剤はゲルに結合せず、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質によってレポーターが切断されると遊離して拡散する。液滴中のシグナルの増幅は、検出構築物をハイブリダイゼーション連鎖反応（ＨＣＲイニシエーター）増幅と組み合わせることにより実現し得る。ゲルには、ＲＮａｓｅ感受性ドメインを有するヘアピンループを含み得るＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドヘアピンが取り込まれてもよい。ＲＮａｓｅ感受性ドメインを有するヘアピンループ内の鎖置換足場（ｔｏｅｈｏｌｄ）を保護することにより、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質によるヘアピンループの切断後にＨＣＲイニシエーターを選択的に脱保護し得る。足場媒介性鎖置換によるＨＣＲイニシエーターの脱保護後、蛍光ＨＣＲモノマーが洗浄されてゲルに入ることにより、イニシエーターが脱保護される場合にシグナル増幅が可能となり得る。

【０２７１】

本発明との関連において用いられ得るマイクロ流体デバイスの例が、Ｈｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．「慣性マイクロフルイディクスを用いた菌血症の直接検出及び薬物耐性プロファイリング（Ｄｉｒｅｃｔ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｄｒｕｇ－ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ　ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ　ｏｆ　ｂａｃｔｅｒｅｍｉａｓ　ｕｓｉｎｇ　ｉｎｅｒｔｉａｌ　ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ）」Ｌａｐ　Ｃｈｉｐ．１５（１０）：２２９７－２３０７（２０１６）に記載されている。

【０２７２】

本明細書に記載されるシステムにおいては、臨床セッティング外で対象の生体液などの生体試料を評価し、且つ医療専門家がアクセス可能なセントラルサーバーにアッセイ結果を遠隔で報告する装着型医療装置に更に取り込まれてもよい。この装置は、Ｐｅｅｔｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．に対する「Ｎｅｅｄｌｅ－ｆｒｅｅ　Ｂｌｏｏｄ　Ｄｒａｗ」と題される米国特許出願公開第２０１５／０３４２５０９号明細書、Ａｎｄｒｅｗ　Ｃｏｎｒａｄに対する「Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｐｈｏｒｅｓｉｓ」と題される米国特許出願公開第２０１５／００６５８２１号明細書に開示される装置など、血液を自己採取する能力を含み得る。

【０２７３】

特定の例示的実施形態では、本装置は、マイクロプレートウェルなどの個別ウェルを含み得る。マイクロプレートウェルのサイズは、標準的な６、２４、９６、３８４、１５３６、３４５６、又は９６００サイズウェルのサイズであってもよい。特定の例示的実施形態では、本明細書に記載されるシステムの要素はフリーズドライされ、分配及び使用前にウェルの表面に適用されてもよい。

【０２７４】

本明細書に開示される装置は入口及び出口ポート、又は開口を更に含んでもよく、次にはそれが、装置への及び装置からの流体の導入及び抽出用の弁、チューブ、チャネル、チャンバ、及びシリンジ及び／又はポンプに接続していてもよい。本装置は、マイクロ流体デバイス内での流体の方向性のある移動を可能にする流体フローアクチュエータに接続していてもよい。例示的アクチュエータとしては、限定はされないが、シリンジポンプ、機械作動式再循環ポンプ、電気浸透ポンプ、電球、ベローズ、ダイアフラム、又は流体を強制的に移動させることを意図した泡が挙げられる。特定の例示的実施形態では、本装置は

、一緒になって働くことにより本装置を通じて流体を移動させるプログラム可能な弁を備えた制御器に接続される。特定の例示的実施形態では、本装置は、以下で更に詳細に考察する制御器に接続される。本装置は、装置上の入口ポートに差し込むための金属ピンで終端されたチュービングによってアクチュエータ、制御器、及び試料ローディング装置に接続されてもよい。

【０２７５】

本明細書に示されるとおり、本システムの要素はフリーズドライ時に安定しており、従って支持装置が不要な実施形態もまた企図され、即ち本システムは、本明細書に開示される反応を支持する任意の表面又は流体に適用され、当該の表面又は溶液からの正の検出可能シグナルの検出を可能にすることができる。フリーズドライに加えて、本システムはまたペレット化形態で安定に保存され、利用されてもよい。好適なペレット化形態の形成において有用なポリマーは当該技術分野において公知である。

【０２７６】

特定の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は装置の各独立分離容積に結合される。各独立分離容積は、異なる標的分子に特異的な異なるガイドＲＮＡを含み得る。特定の実施形態において、標的分子に特異的なガイドＲＮＡを各々含む２つ以上の独立分離容積を含む固体基材に試料が曝露される。理論によって拘束されないが、各ガイドＲＮＡが試料からその標的分子を捕捉することになり、試料を別々のアッセイに分割する必要はない。従って、貴重な試料を温存し得る。エフェクタータンパク質は、アフィニティータグを含む融合タンパク質であってもよい。アフィニティータグは当該技術分野において周知である（例えば、ＨＡタグ、Ｍｙｃタグ、Ｆｌａｇタグ、Ｈｉｓタグ、ビオチン）。エフェクタータンパク質がビオチン分子に連結されてもよく、独立分離容積がストレプトアビジンを含んでもよい。他の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質に、エフェクタータンパク質に特異的な抗体が結合する。ＣＲＩＳＰＲ酵素の結合方法については以前記載がある（例えば、米国特許出願公開第２０１４０３５６８６７Ａ１号明細書を参照のこと）。

【０２７７】

本明細書に開示される装置はまた、他の方法による試料の分析に関して当該技術分野で公知のポイント・オブ・ケア（ＰＯＣ）装置の要素も含み得る。例えば、Ｓｔ Ｊｏｈｎ ａｎｄ Ｐｒｉｃｅ，「既存及び振興のポイント・オブ・ケア検査技術（Ｅｘｉｓｔｉｎｇ ａｎｄ Ｅｍｅｒｇｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｏｉｎｔ－ｏｆ－Ｃａｒｅ Ｔｅｓｔｉｎｇ）」（Ｃｌｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｒｅｖ．２０１４ Ａｕｇ；３５（３）：１５５－１６７）を参照のこと。

【０２７８】

本発明は、無線ラボ・オン・チップ（ＬＯＣ）診断センサーシステムで使用されてもよい（例えば、米国特許第９，４７０，６９９号明細書「Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ ｒａｄｉｏ ｆｒｅｑｕｅｎｃｙ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｓｅｎｓｏｒｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｔｈｅｒｅｏ」を参照）。特定の実施形態において、本発明は、無線装置（例えば、携帯電話、携帯情報端末（ＰＤＡ）、タブレット）によって制御されたＬＯＣで実施され、結果は前記装置に報告される。

【０２７９】

無線自動識別（ＲＦＩＤ）タグシステムは、ＲＦＩＤリーダー（質問器とも称される）によって受信されるデータを送信するＲＦＩＤタグを含む。典型的なＲＦＩＤシステムでは、個別の物体（例えば、店の商品）に、応答器を備えた比較的小型のタグが装着される。応答器は、ユニークな電子的製品コードが付与されたメモリチップを有する。ＲＦＩＤリーダーは、通信プロトコルを用いてタグ内の応答器を作動させる信号を発する。従って、ＲＦＩＤリーダーは、データを読み出してタグに書き込むことが可能である。加えて、ＲＦＩＤタグリーダーは、ＲＦＩＤタグシステム適用に応じてデータを処理する。現在、パッシブ型及びアクティブ型ＲＦＩＤタグがある。パッシブ型ＲＦＩＤタグは内部電源を内蔵せず、しかしＲＦＩＤリーダーから受け取る無線周波信号によって通電する。或いは

、アクティブ型ＲＦＩＤタグは内部電源を内蔵し、それによりアクティブ型ＲＦＩＤタグはより大きい伝送距離及びメモリ容量を持つことが可能になる。パッシブタグを使用するかアクティブタグを使用するかは、詳細な適用に依存する。

【０２８０】

ラボ・オン・チップ技術については科学文献に十分な記載があり、複数のマイクロ流体チャネル、入力又は化学的ウェルからなる。ＲＦＩＤ電子チップからの導電リード線を検査ウェルの各々に直接連結することができるため、ウェル内での反応は無線自動識別（ＲＦＩＤ）タグ技術を用いて測定することができる。電子チップの別の層に、又は装置の背面に直接、アンテナがプリントされるか、又はマウントされてもよい。更に、リード線、アンテナ及び電子チップがＬＯＣチップに埋め込まれてもよく、それにより電極又はエレクトロニクスの短絡が防止される。ＬＯＣは複合的な試料の分離及び分析が可能なため、この技術によりＬＯＣ検査を複雑な又は高価なリーダーと無関係に行うことが可能になる。むしろ携帯電話又はＰＤＡなどの単純な無線装置を使用することができる。一実施形態において、無線装置はまた、より複雑なＬＯＣ分析用にマイクロ流体チャネルの分離及び制御も制御する。一実施形態において、ＬＯＣ－ＲＦＩＤチップには、ＬＥＤ及び他の電子的測定又は検知装置が含まれる。理論によって拘束されないが、この技術はディスポーザブルであり、分離及び混合が必要な複雑な検査を検査室外で実施することが可能となる。

【０２８１】

好ましい実施形態において、ＬＯＣはマイクロ流体デバイスであってもよい。ＬＯＣはパッシブチップであってもよく、ここでチップは無線装置によって通電及び制御される。特定の実施形態において、ＬＯＣは、試薬を保持するためのマイクロ流体チャネルと試料を導入するためのチャネルとを含む。特定の実施形態において、無線装置からの信号がＬＯＣにパワーを送り、試料とアッセイ試薬との混合を作動させる。具体的には、本発明の場合、本システムは、マスキング剤と、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質と、標的分子に特異的なガイドＲＮＡとを含み得る。ＬＯＣが作動すると、マイクロ流体デバイスは試料とアッセイ試薬とを混合し得る。混合を受けてセンサーが信号を検出し、結果を無線装置に送信する。特定の実施形態において、アンマスキング剤は導電性ＲＮＡ分子である。導電性ＲＮＡ分子は導電性材料に結合し得る。導電性分子は、導電性のタンパク質又はラテックス又は他のビーズに結合する導電性ナノ粒子、導電性タンパク質、金属粒子であってもよい。特定の実施形態において、ＤＮＡ又はＲＮＡが使用される場合、次には導電性分子は対応するＤＮＡ又はＲＮＡ鎖に直接結合する。センサーにわたる導電性分子の放出が検出されてもよい。アッセイは一段階プロセスであってもよい。

【０２８２】

表面積の導電率は正確に測定することができるため、ディスポーザブル無線ＲＦＩＤ電子アッセイで定量的結果が可能である。更に、検査面積は極めて小さくてよいため、所与の面積でより多くの検査を行うことが可能になり、従ってコストの削減になる。特定の実施形態において、センサーに固定化された異なるＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質及びガイドＲＮＡに各々関連付けられた別個のセンサーを使用して、複数の標的分子が検出される。理論によって拘束されないが、異なるセンサーの作動は無線装置によって区別され得る。

【０２８３】

本明細書に記載される導電性の方法に加えて、ディスポーザブルＲＦＩＤアッセイの基本的な低コスト通信及びパワープラットフォームとしてＲＦＩＤ又はＢｌｕｅｔｏｏｔｈに頼る他の方法が用いられてもよい。例えば、光学的手段を用いて所与の標的分子の存在及びレベルを評価してもよい。特定の実施形態において、光学センサーが蛍光マスキング剤のアンマスキングを検出する。

【０２８４】

特定の実施形態において、本発明の装置は、アッセイの診断読み取りのための手持ち式携帯装置を含み得る（例えば、Ｖａｓｈｉｓｔ　ｅｔ　ａｌ．，「個別化された医療モニタリング及び管理のための市販のスマートフォンベースの装置及びスマートアプリケーショ

ン（Ｃｏｍｍｅｒｃｉａｌ Ｓｍａｒｔｐｈｏｎｅ－Ｂａｓｅｄ Ｄｅｖｉｃｅｓ ａｎｄ Ｓｍａｒｔ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ Ｐｅｒｓｏｎａｌｉｚｅｄ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｍｏｎｉｔｏｒｉｎｇ ａｎｄ Ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ）」，Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ ２０１４，４（３），１０４－１２８；Ｍｏｂｉｌｅ ＡｓｓａｙからのｍＲｅａｄｅｒ；及びＨｏｌｏｍｉｃ迅速診断検査リーダーを参照のこと）。

【０２８５】

本明細書で指摘するとおり、特定の実施形態は比色変化による検出を可能にし、これは、信号を読み取るためのより複雑な検出機器へのアクセスが限られていることもあるＰＯＣ状況で及び／又はリソースが不足している環境で実施形態が利用されるとき、特定の付随する利益がある。しかしながら、本明細書に開示される携帯型の実施形態はまた、可視域外の信号の検出を可能にする手持ち式分光光度計と組み合わされてもよい。本発明と組み合わせて使用し得る手持ち式分光光度装置の例が、Ｄａｓ ｅｔ ａｌ．「果実成熟度の迅速非破壊検査のための超携帯型無線スマートフォン分光光度計（Ｕｌｔｒａ－ｐｏｒｔａｂｌｅ，ｗｉｒｅｌｅｓｓ ｓｍａｒｔｐｈｏｎｅ ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒ ｆｏｒ ｒａｐｉｄ，ｎｏｎ－ｄｅｓｔｒｕｃｔｉｖｅ ｔｅｓｔｉｎｇ ｏｆ ｆｒｕｉｔ ｒｉｐｅｎｅｓｓ）」．Ｎａｔｕｒｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ．２０１６，６：３２５０４，ＤＯＩ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ３２５０４に記載されている。最後に、量子ドットベースのマスキング構築物を利用する特定の実施形態において、手持ち式紫外光、又は他の好適な装置の使用は、量子ドットによって提供されるほぼ完全な量子収量のおかげで信号の検出に成功裏に用いられ得る。

【０２８６】

例示的方法及びアッセイ

このアッセイプラットフォームのコストの低さ及び適合性は、（ｉ）一般的なＲＮＡ／ＤＮＡ／タンパク質定量化、（ｉｉ）迅速な多重化ＲＮＡ／ＤＮＡ及びタンパク質発現検出、及び（ｉｉｉ）臨床試料及び環境試料の両方での標的核酸、ペプチド、及びタンパク質の高感度検出を含めた幾つもの応用に適している。加えて、本明細書に開示されるシステムは、細胞など、生物学的セッティングの範囲内での転写物の検出に適合させることができる。本明細書に記載されるＣＲＩＳＰＲエフェクターの高度に特異的な性質を所与とすれば、生細胞における転写物のアレル特異的発現又は疾患関連突然変異を追跡することが可能であり得る。

【０２８７】

特定の例示的実施形態では、単一の標的に特異的なシングルガイド配列が別個の容積に置かれる。次に各容積が異なる試料又は同じ試料のアリコートを受け取り得る。特定の例示的実施形態では、複数の標的を異なるウェルでスクリーニングし得るように、各々別個の標的に対する複数のガイド配列が単一のウェルに置かれてもよい。単一の容積にある複数のガイドＲＮＡを検出するため、特定の例示的実施形態では、異なる特異性を有する複数のエフェクタータンパク質が用いられ得る。例えば、異なる配列特異性の異なるオルソログが用いられてもよい。例えば、あるオルソログはＡを優先的に切断し、一方、他のオルソログはＣ、Ｇ、Ｕ／Ｔを優先的に切断し得る。従って、単一ヌクレオチドを完全に含む、又はその実質的な部分で構成されるマスキング構築物が生成されてもよく、各々が異なる波長で検出することのできる異なるフルオロフォアを有し得る。このようにして最大４つの異なる標的を単一の個別独立分離容積においてスクリーニングし得る。特定の例示的実施形態では、２つのＣａｓ１３ａオルソログ、２つのＣａｓ１３ｂオルソログ、又は２つのＣａｓ１３ｃオルソログなど、同じクラスのＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質からの異なるオルソログが使用されてもよい。様々なＣａｓ１３タンパク質のヌクレオチド優先性を図６７に示す。特定の他の例示的実施形態において、Ｃａｓ１３ａ及びＣａｓ１３ｂオルソログ、又はＣａｓ１３ａ及びＣａｓ１３ｃオルソログ、又はＣａｓ１３ｂオルソログ及びＣａｓ１３ｃオルソログ等、異なるヌクレオチド編集優先性を有する異なるオルソログが使用されてもよい。特定の例示的実施形態では、ポリＵ優先性を有するＣａｓ１３タンパク質及びポリＡ優先性を有するＣａｓ１３タンパク質が使用される。特定の

例示的実施形態では、ポリU優先性を有するＣａｓ１３タンパク質はプレボテラ・インターメディア（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａ）Ｃａｓ１３ｂであり、及びポリA優先性を有するＣａｓ１３タンパク質はプレボテラ属種（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｓｐ．）ＭＡ２１０６　Ｃａｓ１３ｂタンパク質（ＰｓｍＣａｓ１３ｂ）である。特定の例示的実施形態では、ポリU優先性を有するＣａｓ１３タンパク質はレプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）Ｃａｓ１３ａ（ＬｗａＣａｓ１３ａ）タンパク質であり、及びポリA優先性を有するＣａｓ１３タンパク質はプレボテラ属種（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｓｐ．）ＭＡ２１０６　Ｃａｓ１３ｂタンパク質である。特定の例示的実施形態では、ポリU優先性を有するＣａｓ１３タンパク質はキャプノサイトファーガ・カニモルサス（Ｃａｐｎｏｃｙｔｏｐｈａｇａ　ｃａｎｉｍｏｒｓｕｓ）Ｃａｓ１３ｂタンパク質（ＣｃａＣａｓ１３ｂ）である。

【０２８８】

一塩基編集優先性に加えて、Ｃａｓ１３オルソログ（ｏｒｔｈｏｌｇ）の他のモチーフ切断優先性に基づき更なる検出構築物を設計することができる。例えば、Ｃａｓ１３オルソログは、ジヌクレオチド配列、トリヌクレオチド配列又は４、５、６、７、８、９、若しくは１０ヌクレオチド（ｎｕｌｅｏｔｉｄｅ）モチーフを含むより複雑なモチーフを優先的に切断し得る。従って本明細書に開示される実施形態を用いた多重アッセイの上限は、主に区別可能な検出可能標識の数によって制限される。かかるモチーフの例示的同定方法は、以下の実施例に更に開示する。

【０２８９】

本明細書において実証されるとおり、ＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムは、アトモル濃度に至るまでの標的分子を検出することが可能である。例えば、図１３、図１４、図１９、図２２及び以下に記載する実施例を参照のこと。前記システムの感度に起因して、迅速な高感度の検出が要求される幾つもの適用が本明細書に開示される実施形態から利益を受けることができ、本発明の範囲内で企図される。例示的アッセイ及び適用を以下に更に詳細に記載する。

【０２９０】

微生物適用

特定の例示的実施形態において、本明細書に開示されるシステム、装置、及び方法は、対象から入手した生体試料など、試料中の１つ以上の微生物媒介物の存在を検出することに関する。特定の例示的実施形態では、微生物は、細菌、真菌、酵母、原虫、寄生虫、又はウイルスであってもよい。従って、本明細書に開示される方法は、微生物種の迅速同定、微生物タンパク質（抗原）、抗体、抗体遺伝子の存在のモニタリング、特定の表現型の検出（例えば菌耐性）、疾患の進行及び／又はアウトブレイクのモニタリング、及び抗生物質スクリーニングが必要な他の方法における（又は他の方法との組み合わせでの）使用に適合させることができる。ここに開示される実施形態の迅速で高感度の診断能力、単一ヌクレオチドの差異に至るまでの微生物種タイプの検出、及びＰＯＣ装置としての展開可能性に起因して、本明細書に開示される実施形態は、適切な抗生物質又は抗ウイルス薬の選択など、ガイド治療レジメンに使用し得る。本明細書に開示される実施形態はまた、微生物汚染の存在に関する環境試料（空気、水、表面、食品等）のスクリーニングにも使用し得る。

【０２９１】

細菌、ウイルス、真菌、酵母、又は寄生虫種など、微生物種を同定する方法が開示される。本明細書に開示される詳細な実施形態は、単一試料内の、又は複数の試料にわたる微生物種を同定し、区別して、多くの異なる微生物の認識を可能にする方法及びシステムを記載する。本方法は、試料中の標的核酸配列の存在を検出することによる生物学的試料又は環境試料中の病原体の検出、並びに１つ以上の生物、例えば、細菌、ウイルス、酵母、原虫、及び真菌又はこれらの組み合わせの２つ以上の種間の区別が可能である。試料から得られた正のシグナルが微生物の存在を指し示す。２つ以上のエフェクタータンパク質の使用を用いることにより、本発明の方法及びシステムを用いて複数の微生物を同時に同定

することができ、ここで各エフェクタータンパク質は特異的な微生物標的配列を標的とする。このように、特定の対象に関して幾つもの微生物を同時に検出することができるマルチレベル分析を実施することができる。一部の実施形態では、１つ以上の微生物種を同定することができるプローブセットを使用して複数の微生物の同時検出が実施され得る。

【０２９２】

試料の多重分析によって試料の大規模検出が可能となり、分析の時間及びコストが削減される。しかしながら、多重分析は生体試料の利用可能性によって制限されることが多い。しかしながら本発明においては、単一の試料に複数のエフェクタータンパク質を加えることができ、且つ各マスキング構築物が別々のクエンチャー色素と組み合わされ得るような、多重分析に代わる方法を実施し得る。この場合、単一試料で複数を検出するため、正のシグナルは各クエンチャー色素から別々に得られ得る。

【０２９３】

本明細書には、試料中の１つ以上の生物の２つ以上の種間を区別する方法が開示される。本方法はまた、試料中の１つ以上の生物の１つ以上の種の検出にも適している。

【０２９４】

微生物検出

一部の実施形態では、試料中の微生物の検出方法が提供され、この方法は、試料又は試料セットを１つ以上の個別独立分離容積に分配することであって、個別独立分離容積が本明細書に記載されるとおりのＣＲＩＳＰＲシステムを含むこと；１つ以上のガイドＲＮＡを１つ以上の微生物特異的標的に結合させるのに十分な条件下で試料又は試料セットをインキュベートすること；１つ以上のガイドＲＮＡによる１つ以上の標的分子への結合によってＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質を活性化させることであって、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質が活性化すると、ＲＮＡベースのマスキング構築物が改変されて検出可能な正のシグナルが生成されること；及び検出可能な正のシグナルを検出することであって、検出可能な正のシグナルの検出が、試料中における１つ以上の標的分子の存在を指し示すことを含む。１つ以上の標的分子は、２つ以上の微生物種／株を互いに区別するために用いられ得る標的ヌクレオチド配列を含むｍＲＮＡ、ｇＤＮＡ（コード又は非コード）、ｔｒＲＮＡ、又はｒＲＮＡであってもよい。ガイドＲＮＡは、標的配列を検出するように設計されてもよい。本明細書に開示される実施形態はまた、ガイドＲＮＡと標的ＲＮＡ配列との間のハイブリダイゼーションを向上させる特定のステップも利用し得る。リボ核酸ハイブリダイゼーションの増強方法については、「Ｅｎｈａｎｃｅｄ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｏｆ　Ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ」と題される国際公開第２０１５／０８５１９４号パンフレット（参照により本明細書に援用される）に開示されている。微生物特異的標的はＲＮＡ又はＤＮＡ又はタンパク質であってもよい。ＤＮＡの場合、方法は、本明細書に記載されるとおりのＲＮＡポリメラーゼプロモーターを導入するＤＮＡプライマーの使用を更に含み得る。標的がタンパク質である場合、本方法は本明細書に記載されるタンパク質検出に特異的なアプタマー及びステップを利用することになる。

【０２９５】

単一ヌクレオチド変異体の検出

一部の実施形態では、１つ以上の同定された標的配列は、本明細書に記載されるとおりの標的配列に特異的な且つそれに結合するガイドＲＮＡを使用して検出し得る。本発明のシステム及び方法は、異なる微生物種の中に存在する一塩基変異多型間であっても区別することができ、従って、本発明における複数のガイドＲＮＡの使用は、種間の区別に使用し得る標的配列の数を更に拡大又は改良し得る。例えば、一部の実施形態では、１つ以上のガイドＲＮＡは微生物間を種、属、科、目、綱、門、界、又は表現型、又はこれらの組み合わせで区別し得る。

【０２９６】

ｒＲＮＡ配列に基づく検出

特定の例示的実施形態では、本明細書に開示される装置、システム、及び方法を使用し

て試料中の複数の微生物種を区別し得る。特定の例示的実施形態では、同定は、１６Ｓ、２３Ｓ、及び５Ｓサブユニットを含め、リボソームＲＮＡ配列に基づき得る。関連性のあるｒＲＮＡ配列の同定方法が米国特許出願公開第２０１７／００２９８７２号明細書に開示されている。特定の例示的実施形態では、ガイドＲＮＡのセットが各種又は株にユニークな可変領域によって各種を区別するように設計されてもよい。ガイドＲＮＡはまた、微生物を属、科、目、綱、門、界レベル、又はこれらの組み合わせで区別するＲＮＡ遺伝子を標的とするように設計されてもよい。増幅が用いられる特定の例示的実施形態では、増幅プライマーのセットが、リボソームＲＮＡ配列の定常領域と、可変内部領域によって各種を区別するように設計されたガイドＲＮＡとに隣接するように設計されてもよい。特定の例示的実施形態では、プライマー及びガイドＲＮＡは、１６Ｓサブユニットのそれぞれ保存された領域及び可変領域に対して設計されてもよい。種間で、又はＲｅｃＡ遺伝子ファミリー、ＲＮＡポリメラーゼβサブユニットなどの種のサブセット間でユニークに可変的な他の遺伝子又はゲノム領域も同様に使用し得る。他の好適な系統発生マーカー、及びその同定方法については、例えばＷｕ　ｅｔ　ａｌ．ａｒＸｉｖ：１３０７．８６９０［ｑ－ｂｉｏ．ＧＮ］において考察されている。

【０２９７】

特定の例示的実施形態では、方法又は診断法は、微生物を複数の系統発生レベル及び／又は表現型レベルにわたって同時にスクリーニングするように設計される。例えば、本方法又は診断法は、異なるガイドＲＮＡを有する複数のＣＲＩＳＰＲシステムの使用を含み得る。第１のガイドＲＮＡセットが、例えば、マイコバクテリア、グラム陽性菌、及びグラム陰性菌の間を区別し得る。これらの一般的クラスは更に細分されることもある。例えば、ガイドＲＮＡは、グラム陰性菌内で腸内及び非腸内を区別する方法又は診断法において設計及び使用される可能性がある。第２のガイドＲＮＡセットは、微生物を属又は種レベルで区別するように設計されることができる。従って、全てのマイコバクテリア、グラム陽性、グラム陰性（更に腸内及び非腸内に分けられる）と、それらのクラスのうちの１つに含まれる所与の試料中に同定される細菌の種の各属とを同定する行列が作成されてもよい。上記は例示目的に過ぎない。他の微生物タイプを分類する他の手段もまた企図され、それは上記に記載される一般構造に従うものであり得る。

【０２９８】

薬剤耐性スクリーニング

特定の例示的実施形態では、本明細書に開示される装置、システム及び方法を使用して、目的の微生物遺伝子、例えば抗生物質及び／又は抗ウイルス薬耐性遺伝子がスクリーニングされ得る。ガイドＲＮＡが、公知の目的遺伝子間を区別するように設計され得る。次に、かかる遺伝子の検出のため、本明細書に開示される実施形態を用いて臨床試料を含めた試料がスクリーニングされ得る。ＰＯＣで薬剤耐性をスクリーニング可能であれば、適切な治療レジームの選択において多大な利益となり得る。特定の例示的実施形態では、抗生物質耐性遺伝子は、ＫＰＣ、ＮＤＭ１、ＣＴＸ－Ｍ１５、ＯＸＡ－４８を含め、カルバペネマーゼである。他の抗生物質耐性遺伝子が公知であり、例えば総合抗生物質耐性データベース（Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ　Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ　Ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ　Ｄａｔａｂａｓｅ）を参照し得る（Ｊｉａ　ｅｔ　ａｌ．「ＣＡＲＤ　２０１７：総合抗生物質耐性データベースの拡張及びモデル中心のキュレーション（ＣＡＲＤ　２０１７：ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ａｎｄ　ｍｏｄｅｌ－ｃｅｎｔｒｉｃ　ｃｕｒａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ　Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ　Ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ　Ｄａｔａｂａｓｅ）」Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，４５，Ｄ５６６－５７３）。

【０２９９】

リバビリンは、幾つものＲＮＡウイルスに効く有効な抗ウイルス薬である。幾つかの臨床的に重要なウイルスが、口蹄疫ウイルス、ｄｏｉ：１０．１１２８／ＪＶＩ．０３５９４－１３；ポリオウイルス（Ｐｆｅｉｆｅｒ　ａｎｄ　Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ．ＰＮＡＳ，１００（１２）：７２８９－７２９４，２００３）；及びＣ型肝炎ウイルス（Ｐｆｅｉｆｅｒ　ａｎｄ　Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７９（４）：２３４６－２３５

５，２００５）を含め、リバビリン耐性を進化させている。肝炎及びＨＩＶなど、幾つもの他の持続性ＲＮＡウイルスが、既存の抗ウイルス薬に対する耐性を進化させている：Ｂ型肝炎ウイルス（ラミブジン、テノホビル、エンテカビル）ｄｏｉ：１０／１００２／ｈｅｐ２２９００；Ｃ型肝炎ウイルス（テラプレビル、ＢＩＬＮ２０６１、ＩＴＭＮ－１９１、ＳＣｈ６、ボセプレビル、ＡＧ－０２１５４１、ＡＣＨ－８０６）ｄｏｉ：１０．１００２／ｈｅｐ．２２５４９；及びＨＩＶ（多くの薬剤耐性突然変異）ｈｉｖｂ．ｓｔａｎｄｆｏｒｄ．ｅｄｕ。本明細書に開示される実施形態を使用して、とりわけかかる変異体を検出し得る。

【０３００】

薬剤耐性の他にも、持続性対急性ＬＣＭＶ感染症（ｄｏｉ：１０．１０７３／ｐｎａｓ．１０１９３０４１０８）、及び増加したエボラ感染力（Ｄｉｅｈｌ ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ．２０１６，１６７（４）：１０８８－１０９８）など、本明細書に開示される実施形態で検出される可能性がある幾つもの臨床的に関連性のある突然変異がある。

【０３０１】

本明細書において他の部分に記載されるとおり、近縁の微生物種（例えば所与の標的配列において単一ヌクレオチドの差異のみを有する）は、ｇＲＮＡに合成ミスマッチを導入することにより区別し得る。

【０３０２】

セットカバー手法

詳細な実施形態において、例えば、定義付けられた微生物セットの範囲内のあらゆる微生物種を同定することができるガイドＲＮＡセットが設計される。特定の例示的実施形態では、本明細書に記載されるとおりのガイドＲＮＡの生成方法が、国際公開第２０１７／０４０３１６号パンフレット（参照により本明細書に援用される）に開示される方法と比較されてもよい。国際公開第２０１７０４０３１６号パンフレットに記載されるとおり、セットカバー解法は、標的配列又は標的配列セット、例えばゲノム配列セットの全体を網羅するのに必要な標的配列プローブ又はガイドＲＮＡの最小数を同定し得る。セットカバー手法は、以前、典型的には２０～５０塩基対範囲のプライマー及び／又はマイクロアレイプローブの同定に用いられている。例えば、Ｐｅａｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，ｃｓ．ｖｉｒｇｉｎｉａ．ｅｄｕ／～ｒｏｂｉｎｓ／ｐａｐｅｒｓ／ｐｒｉｍｅｒｓ＿ｄａｍ１１＿ｆｉｎａｌ．ｐｄｆ．、Ｊａｂａｄｏ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２００６ ３４（２２）：６６０５－１１、Ｊａｂａｄｏ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２００８，３６（１）：ｅ３ ｄｏｉ１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｍ１１０６、Ｄｕｉｔａｍａ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２００９，３７（８）：２４８３－２４９２、Ｐｈｉｌｌｉｐｐｙ ｅｔ ａｌ．ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ．２００９，１０：２９３ ｄｏｉ：１０．１１８６／１４７１－２１０５－１０－２９３を参照のこと。しかしながら、かかる手法は、概して、各プライマー／プローブをｋ－ｍｅｒとして取り扱い、サフィックスアレイを用いて正確なマッチを検索する又は不正確なマッチを許容することを伴った。加えて、これらの方法は、概して、各入力配列が１つのプライマー又はプローブによって結合されるだけでよく、配列に沿ったこの結合の位置は無関係であるようにプライマー又はプローブを選択することにより、ハイブリダイゼーションの検出にバイナリ手法をとる。代替的方法は、標的ゲノムを予め定義されたウィンドウに分割し、各ウィンドウをバイナリ手法の下で別個の入力配列として有効に取り扱い得る－即ち、これは各ウィンドウ内で所与のプローブ又はガイドＲＮＡが結合するかどうかを決定し、何らかのプローブ又はガイドＲＮＡの状態別に全てのウィンドウが結合される必要がある。有効には、これらの手法は、セットカバー問題における「ユニバース」の各要素を入力配列全体又は入力配列の予め定義されたウィンドウのいずれかであるものとして取り扱い、各要素は、プローブ又はガイドＲＮＡの始点がその要素内で結合している場合に「カバーされている」と見なされる。これらの手法は、所与の標的配列をカバーするのに異なるプローブ又はガイドＲＮＡ設計が許容される流動性を制限する。

【０３０３】
対照的に、本明細書に開示される実施形態は、より長いプローブ又はガイドＲＮＡ長さ、例えばハイブリッド選択シーケンシングに好適な７０ｂｐ～２００ｂｐの範囲の長さを検出することに関する。加えて、国際公開第２０１７／０４０３１６号パンフレットに開示される方法を本明細書において適用して、大規模な及び／又は可変的な標的配列セットであらゆる種及び／又は株の配列を同定し、その検出シーケンシングを促進することのできるプローブ又はガイドＲＮＡセットを定義可能な汎標的配列手法をとり得る。例えば、本明細書に開示される方法を使用して、所与のウイルスの、又は複数の異なるウイルスの全ての変異体を単一のアッセイで同定し得る。更に、本明細書に開示される方法は、セットカバー問題における「ユニバース」の各要素を標的配列のヌクレオチドであるものとして取り扱い、各要素は、プローブ又はガイドＲＮＡがその要素を含む標的ゲノムの一部のセグメントに結合しさえすれば「カバーされている」と見なされる。この種のセットカバー方法を前出の方法のバイナリ手法の代わりに使用してもよく、本明細書に開示される方法は、プローブ又はガイドＲＮＡがどのように標的配列にハイブリダイズし得るかをより良好にモデル化する。所与のガイドＲＮＡ配列が所与のウィンドウに結合するか又は結合しないかを尋ねるのみでなく、かかる手法を使用してハイブリダイゼーションパターンを検出し得る－即ち、所与のプローブ又はガイドＲＮＡが１つ又は複数の標的配列に結合する場合－とともに、次には、それらのハイブリダイゼーションパターンから、試料からの集積及びあらゆる標的配列のシーケンシングの両方を可能にするのに十分な程度まで標的配列セットをカバーするのに必要なプローブ又はガイドＲＮＡの最小数を決定する。これらのハイブリダイゼーションパターンは、機能喪失を最小限に抑える特定のパラメータを定義することにより決定されてもよく、それにより各種についてパラメータの変化を許容して、例えば各種の多様性を反映する形で、並びに以前にプローブ又はガイドＲＮＡ設計のコンテクストで適用されたものなどの、セットカバー解法の真正面から取り組むやり方を用いては実現できない計算的に効率的な方法で最小限のプローブ又はガイドＲＮＡセットの同定が可能となる。

【０３０４】
複数の転写物存在量を検出可能であることにより、特定の表現型の指標となるユニークな微生物シグネチャの生成が実現し得る。様々な機械学習技法を使用して遺伝子シグネチャを導出し得る。従って、ＣＲＩＳＰＲシステムのガイドＲＮＡを使用して、遺伝子シグネチャによって定義されるバイオマーカーの相対レベルを同定及び／又は定量化することにより、特定の表現型を検出し得る。特定の例示的実施形態では、遺伝子シグネチャは、抗生物質に対する感受性、抗生物質に対する耐性、又はこれらの組み合わせを示す。

【０３０５】
本発明の一態様において、方法は、１つ以上の病原体を検出することを含む。このようにして、個別の微生物による対象の感染間の区別を達成し得る。一部の実施形態では、かかる区別により、臨床医による特異的疾患、例えば疾患の異なるバリアントの検出又は診断が可能となり得る。好ましくは病原体配列は病原体のゲノム又はその断片である。本方法は、病原体の進化を決定することを更に含み得る。病原体の進化を決定することは、病原体突然変異、例えばヌクレオチド欠失、ヌクレオチド挿入、ヌクレオチド置換の同定を含み得る。後者の中には、非同義、同義、及び非コード置換がある。突然変異は、アウトブレイクの間に非同義である頻度がより高い。本方法は、上記に記載したとおり分析した２つの病原体配列間の置換率を決定することを更に含み得る。突然変異が有害か、又は更には適応的かどうかは機能分析を必要とし得るが、しかしながら、非同義突然変異率は、このエピデミックが進行し続ければ病原体の適応機会がもたらされ得ることを示唆し、迅速な封じ込めの必要性が強調される。従って、本方法は、ウイルスの適応リスクを評価することを更に含んでもよく、ここでは非同義突然変異の数が決定される（Ｇｉｒｅ，ｅｔａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　３４５，１３６９，２０１４）。

【０３０６】
微生物アウトブレイクのモニタリング

一部の実施形態では、本明細書に記載されるとおりのＣＲＩＳＰＲシステム又はその使用方法を使用して病原体アウトブレイクの進化が決定されてもよい。本方法は、１人以上の対象からの複数の試料から１つ以上の標的配列を検出することを含んでもよく、ここで標的配列は、アウトブレイクを引き起こす微生物の配列である。かかる方法は、病原体伝播パターン、又は病原体によって引き起こされる疾患アウトブレイクに関与する機構を決定することを更に含み得る。

【０３０７】

病原体伝播パターンは、病原体の天然のリザーバからの継続的な新規伝播又は天然のリザーバから一度伝播した後の対象間伝播（例えばヒト間伝播）又は両方の混合を含み得る。一実施形態において、病原体伝播は細菌又はウイルス伝播であってもよく、その場合、標的配列は好ましくは微生物ゲノム又はその断片である。一実施形態において、病原体伝播パターンは初期病原体伝播パターンであり、即ち病原体アウトブレイクが始まったときものである。アウトブレイクが始まったときに病原体伝播パターンを決定すれば、可能な限り早い時期にアウトブレイクを阻止できる可能性が増加し、それにより局地的及び国際的に蔓延する可能性が低くなる。

【０３０８】

病原体伝播パターンを決定することは、本明細書に記載される方法に従い病原体配列を検出することを含み得る。病原体伝播パターンを決定することは、対象間で共有される病原体配列の宿主内変異を検出すること、及び共有される宿主内変異が時間的パターンを示すかどうかを決定することを更に含み得る。観察される宿主内及び宿主間変異のパターンは、伝播及び疫学に関する重要な洞察を提供する（Ｇｉｒｅ，ｅｔ　ａｌ．，２０１４）。

【０３０９】

対象間で共有される、時間的パターンを示す宿主内変異の検出は、複数の供給源からの対象の感染（重感染）、試料コンタミネーション再起突然変異（平衡選択による突然変異の強化を伴うことも又は伴わないこともある）、又は伝播鎖初期の突然変異によって生じた僅かに相違するウイルスの同時伝播によって説明することができるため、対象間（詳細にはヒト間）の伝播関連性の指標である（Ｐａｒｋ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１６１（７）：１５１６－１５２６，２０１５）。対象間で共有される宿主内変異の検出は、共通の一塩基変異多型（ＳＮＰ）位置に位置する宿主内変異体の検出を含み得る。共通の（ＳＮＰ）位置に位置する宿主内変異体の陽性検出は、宿主内変異体についての第一の説明としての重感染及びコンタミネーションの指標となる。重感染及びコンタミネーションは、宿主間変異体として現れるＳＮＰ頻度に基づき分けることができる（Ｐａｒｋ，ｅｔ　ａｌ．，２０１５）。その他に、重感染及びコンタミネーションは除外することができる。この後者の場合、対象間で共有される宿主内変異の検出は、同義及び非同義変異体の頻度を評価すること、並びに同義及び非同義変異体の頻度を互いに比較することを更に含み得る。非同義突然変異は、タンパク質のアミノ酸を変化させて、自然選択に供される微生物に生物学的変化を生じさせる可能性のある突然変異である。同義置換はアミノ酸配列を変化させない。同義及び非同義変異体の等しい頻度は、中立的に進化する宿主内変異体の指標である。同義及び非同義変異体の頻度が相違する場合、宿主内変異体は平衡選択によって維持される可能性がある。同義及び非同義変異体の頻度が低い場合、それは再起突然変異の指標である。同義及び非同義変異体の頻度が高い場合、それは同時伝播の指標である（Ｐａｒｋ，ｅｔ　ａｌ．，２０１５）。

【０３１０】

エボラウイルスと同様に、ラッサウイルス（ＬＡＳＶ）は高い致命率の出血熱を引き起こし得る。Ａｎｄｅｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．は、臨床及びげっ歯類リザーバ試料から約２００のＬＡＳＶ配列のゲノムカタログを作成した（Ａｎｄｅｒｓｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｖｏｌｕｍｅ　１６２，Ｉｓｓｕｅ　４，ｐ　７３８－７５０，１３　Ａｕｇｕｓｔ　２０１５）。Ａｎｄｅｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．は、２０１３～２０１５年のＥＶＤエピデミックがヒト間伝播によって加速される一方、ＬＡＳＶ感染は主にリザーバからヒトへの感染によって生じることを示している。Ａｎｄｅｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．は西アフリカにわた

るＬＡＳＶの広がりを明らかにしたとともに、この移動がＬＡＳＶゲノム存在量、致命率、コドン適応、及び翻訳効率の変化を伴ったことを示している。本方法は、第１の病原体配列を第２の病原体配列と系統発生的に比較すること、及び第１の病原体配列と第２の病原体配列との間に系統発生的関連性があるかどうかを決定することを更に含み得る。第２の病原体配列は初期参照配列であってもよい。系統発生的関連性がある場合、本方法は、第１の病原体配列の系統発生を第２の病原体配列に根付けすることを更に含み得る。従って、第１の病原体配列の系統を樹立することが可能である（Ｐａｒｋ，ｅｔ　ａｌ．，２０１５）。

【０３１１】

本方法は、突然変異が有害か、それとも適応的かを決定することを更に含み得る。有害突然変異は、伝播が損なわれたウイルス及び行き止まり感染の指標であり、従って通常は個別の対象にのみ存在する。１つの個別の対象にユニークな突然変異は系統樹の外枝に存在するものであり、一方、内枝突然変異は複数の試料に（即ち複数の対象に）存在するものである。高い非同義置換率は、系統樹の外枝の特徴である（Ｐａｒｋ，ｅｔ　ａｌ．，２０１５）。

【０３１２】

系統樹の内枝では、選択によって有害突然変異体が除去される機会がより多くあった。内枝は、定義上、複数の子孫系統を作り出してきており、従って適応コストにより突然変異を含む可能性は低い。従って、低い非同義置換率は内枝の指標である（Ｐａｒｋ，ｅｔ　ａｌ．，２０１５）。

【０３１３】

同義突然変異は、適応度に対する影響はより小さいものと思われるが、内枝と外枝とでより同等の頻度で起こった（Ｐａｒｋ，ｅｔ　ａｌ．，２０１５）。

【０３１４】

ウイルスゲノムなど、シーケンシングした標的配列を分析することにより、２０１４年のエボラアウトブレイクの間などに、エピデミックエピソードの重症度に関与する機構を発見することが可能である。例えば、Ｇｉｒｅ　ｅｔ　ａｌ．は、初期アウトブレイクからの全２０のゲノムに対して２０１４年アウトブレイクのゲノムの系統発生的比較を行っており、２０１４年の西アフリカウイルスが過去１０年内に中央アフリカから広がった可能性があることを示唆している。他のエボラウイルスゲノムとの相違を用いて系統発生を根付けすることには問題があった（６、１３）。しかしながら、最も古いアウトブレイク上の樹に根付けすると、試料の日付と根から頂点までの距離との間の強力な相関が明らかになり、場所毎の年間置換率は８×１０－４であった（１３）。これは、３つの最近のアウトブレイクの系統が全て、ほぼ同じ時期、およそ２００４年に共通の祖先から分岐したことを示唆しており、各アウトブレイクが、その天然のリザーバ内の遺伝的に多様な同じウイルス集団からの独立した人畜共通性感染イベントに相当するという仮説を裏付けるものである。Ｇｉｒｅ　ｅｔ　ａｌ．はまた、２０１４年のＥＢＯＶアウトブレイクが天然のリザーバからの１回の伝播によって引き起こされ、続いてアウトブレイク中にヒト間伝播した可能性があることも見出した。彼らの結果からはまた、シエラレオネにおけるエピデミックエピソードが、ほぼ同時期のギニアからの２つの遺伝的に異なるウイルスの導入から起こった可能があることも示唆された（Ｇｉｒｅ，ｅｔ　ａｌ．，２０１４）。

【０３１５】

また、ラッサウイルスがその原点から、詳細にはヒト間伝播のおかげでどのように広がったかを決定し、更にはこの広がった経緯を４００年遡ることも可能になっている（Ａｎｄｅｒｓｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１６２（４）：７３８－５０，２０１５）。

【０３１６】

２０１３～２０１５年のＥＢＯＶアウトブレイクの間に必要であった作業及びアウトブレイクの現場で医療スタッフが直面した困難に関連して、及びより一般的に、本発明の方法により、より少数の選択されたプローブを使用してシーケンシングを行うことが可能になり、シーケンシングを加速させることができ、ひいては試料採取から結果を入手するま

でに必要な時間が短縮される。更に、キット及びシステムは、患者の診断を容易に実施し得るように現場で使用可能な設計とすることができ、試料を国又は世界の別の場所に発送又は輸送しなくて済む。

【０３１７】

上記に記載される任意の方法において、標的配列又はその断片のシーケンシングは、上記に記載されるシーケンスプロセスのいずれを使用してもよい。更に、標的配列又はその断片のシーケンシングは、ほぼリアルタイムのシーケンシングであってもよい。標的配列又はその断片のシーケンシングは、以前記載された方法により行われてもよい（Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ：Ｍａｔｒａｎｇａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；及び　Ｇｉｒｅ，ｅｔ　ａｌ．，２０１４）。標的配列又はその断片のシーケンシングは複数の標的配列の並列シーケンシングを含み得る。標的配列又はその断片のシーケンシングはＩｌｌｕｍｉｎａシーケンシングを含み得る。

【０３１８】

選択のプローブのうちの１つ以上にハイブリダイズする標的配列又はその断片の分析は、同定分析であってもよく、ここでは標的配列又はその断片への選択のプローブのハイブリダイゼーションが、試料中における標的配列の存在を指し示す。

【０３１９】

現在、一次診断は、患者が有する症状に基づく。しかしながら、様々な疾患が同一の症状を共有することもあり、そのため診断は統計に大きく頼る。例えば、マラリアは、インフルエンザ様症状：頭痛、発熱、戦慄、関節痛、嘔吐、溶血性貧血、黄疸、尿中ヘモグロビン、網膜損傷、及び痙攣を引き起こす。これらの症状はまた、敗血症、胃腸炎、及びウイルス性疾患にもよく見られる。後者の中でも、エボラ出血熱は、以下の症状、発熱、咽頭痛、筋肉痛、頭痛、嘔吐、下痢、発疹、肝及び腎機能低下、内出血及び外出血を有する。

【０３２０】

患者が医療ユニットを受診したとき、例えば熱帯アフリカでは、統計的にアフリカの当該地域内ではマラリアが最も可能性の高い疾患であるため、基本的な診断はマラリアと結論付けられることになる。結果的に患者はマラリアに関して治療されるが、患者は実際にはこの疾患に罹っていない可能性もあり、患者は適切に治療されずに終わることになる。このように適切な治療がないために、特に患者が罹っている疾患が急速な進展を呈する場合には生命が脅かされることもあり得る。医療スタッフが患者に与えられている治療が無効であると気付き、適切な診断を下して十分な治療を患者に投与するまでに手遅れとなっている可能性がある。

【０３２１】

本発明の方法は、この状況に対する解決法を提供する。実際、ガイドＲＮＡの数を劇的に減らすことができるため、グループに分けられた選択のプローブを単一のチップ上に提供することが可能になり、各グループは１つの疾患に特異的であり、従って複数の疾患、例えばウイルス感染症を同時に診断することができる。本発明のおかげで、３より多い疾患、好ましくは４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０より多い疾患、好ましくは所与の地理上の区域の集団内で最も一般的に起こる疾患を同時に単一のチップで診断することができる。選択のプローブの各グループは診断される疾患のうちの１つに特異的であるため、より正確な診断を行うことができ、ひいては誤った治療を患者に投与するリスクが低減される。

【０３２２】

他の場合には、ウイルス感染症などの疾患は、いかなる症状も伴わず起こることもあり、又は症状を引き起こしたものの、患者が医療スタッフに受診するまでに消えている。そのような場合、患者がいかなる医療支援も求めないか、又は受診当日に症状がないことに起因して診断が複雑化するかのいずれかである。

【０３２３】

本発明はまた、生の未精製試料中におけるｍＲＮＡなどの核酸の検出に基づき疾患を診断し、病原体を同定し、及び治療を最適化する他の方法と併せて使用されてもよい。

【０３２４】
本発明の方法はまた、この状況に対処する強力なツールも提供する。実際、単一の診断法の中に、各グループが所与の地域の集団内で起こる最も一般的な疾患のうちの１つに特異的な選択のガイドＲＮＡのグループが複数含まれるため、医療スタッフは患者から採取した生体試料をチップに接触させるだけでよい。チップを読み取ることにより、患者が罹っている疾患が明らかとなる。
【０３２５】
ある場合には、患者は特定の症状の診断のため、医療スタッフを受診する。本発明の方法によれば、どの疾患がそれらの症状を引き起こしているかを同定するのみならず、同時に患者が気付いていない別の疾患に罹患しているかどうかを決定することが可能になる。
【０３２６】
この情報は、アウトブレイクの機構を調査するときに最も重要である可能性がある。実際、同一のウイルスを有する患者のグループは時間的パターンも示し、対象間伝播の関連性が示唆される。
【０３２７】
微生物遺伝的摂動のスクリーニング
特定の例示的実施形態では、本明細書に開示されるＣＲＩＳＰＲシステムは微生物遺伝的摂動のスクリーニングに使用されてもよい。かかる方法は、例えば微生物経路及び機能的ネットワークを描き出すのに有用であり得る。微生物細胞は遺伝子改変され、次に異なる実験条件下でスクリーニングされてもよい。上記に記載したとおり、本明細書に開示される実施形態は、単一の試料中の複数の標的分子、又は単一の個別独立分離容積内の単一の標的を多重方式でスクリーニングすることができる。遺伝子改変微生物は、特定の微生物細胞又は微生物細胞集団が保有する特定の遺伝子改変を同定する核酸バーコード配列を含むように改変されてもよい。バーコードは、識別子として使用される短いヌクレオチド配列（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はこれらの組み合わせ）である。核酸バーコードは４～１００ヌクレオチドの長さで、一本鎖又は二本鎖のいずれであってもよい。バーコードによる細胞の同定方法は当該技術分野において公知である。従って、本明細書に記載されるＣＲＩＳＰＲエフェクターシステムのガイドＲＮＡを使用してバーコードを検出してもよい。正の検出可能シグナルの検出が、試料中における特定の遺伝子改変の存在を指し示す。本明細書に開示される方法は、試験した実験条件下での遺伝子改変の効果を示す相補的遺伝子型又は表現型リードアウトを検出するための他の方法と組み合わされてもよい。スクリーニングされる遺伝子改変としては、限定はされないが、遺伝子ノックイン、遺伝子ノックアウト、逆位、転座、転位、又はタンパク質安定性又は検出を変化させるなど、機能的意義のあるエピトープをコードする核酸の１つ以上のヌクレオチド挿入、欠失、置換、突然変異、又は付加を挙げることができる。同じように、本明細書に記載される方法は、合成生物学適用において、遺伝子調節エレメント及び遺伝子発現モジュールの特異的構成の機能をスクリーニングするために使用されてもよい。
【０３２８】
特定の例示的実施形態では、本方法を使用してハイポモルフがスクリーニングされてもよい。２０１６年１１月４日に出願された「微生物株の多重高分解能検出、関連するキット、診断方法及びスクリーニングアッセイ（Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ Ｈｉｇｈ－Ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｉｃｒｏ－ｏｒｇａｎｉｓｍ Ｓｔｒａｉｎｓ，Ｒｅｌａｔｅｄ Ｋｉｔｓ，Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ Ａｓｓａｙｓ）」と題されるＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０６０７３０号明細書（参照により本明細書に援用される）に開示されるとおり、ハイポモルフの作成並びに主要な細菌機能性遺伝子の同定及び新規抗生物質治療薬の同定におけるその使用。
【０３２９】
異なる実験条件とは、異なる化学薬剤への微生物細胞の曝露、化学薬剤の併用、化学薬剤又は化学薬剤の併用の異なる濃度、化学薬剤又は化学薬剤の併用への異なる曝露時間、異なる物理的パラメータ、又は両方を含み得る。特定の例示的実施形態において、化学薬

剤は抗生物質又は抗ウイルス薬である。スクリーニングされる異なる物理的パラメータには、異なる温度、大気圧、異なる大気及び非大気気体濃度、異なるｐＨレベル、異なる培養培地組成、又はこれらの組み合わせが含まれ得る。

【０３３０】

環境試料のスクリーニング

本明細書に開示される方法はまた、標的核酸又はポリペプチドの存在を検出することにより、汚染物質に関する環境試料のスクリーニングに使用されてもよい。例えば、一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるとおりのＣＲＩＳＰＲシステムを試料に曝露すること；１つ以上のガイドＲＮＡを１つ以上の微生物特異的標的ＲＮＡ又は１つ以上のトリガーＲＮＡに結合させることによりＲＮＡエフェクタータンパク質を活性化させて検出可能な正のシグナルを生じさせることを含む、微生物を検出する方法を提供する。正のシグナルは検出することができ、試料中に１つ以上の微生物が存在することの指標である。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムは本明細書に記載されるとおりの基材上にあってもよく、この基材が試料に曝露され得る。他の実施形態において、同じＣＲＩＳＰＲシステム、及び／又は異なるＣＲＩＳＰＲシステムが基材上の複数の個別の位置に適用されてもよい。更なる実施形態において、異なるＣＲＩＳＰＲシステムは、各位置の異なる微生物を検出し得る。上記に更に詳細に記載されるとおり、基材は、例えば限定はされないが、紙基材、布基材、又は可撓性ポリマーベースの基材を含め、可撓性材料基材であってもよい。

【０３３１】

本発明において、基材は、サンプリングする流体に基材を一時的に浸漬することによるか、試験する流体を基材に塗布することによるか、又は試験する表面を基材と接触させることにより、試料に受動的に曝露されてもよい。試料を基材に導入する任意の手段を適宜用い得る。

【０３３２】

本明細書に記載されるとおり、本発明で使用される試料は、食品試料（生果実又は野菜、肉）、飲料試料、紙表面、布表面、金属表面、木材表面、プラスチック表面、土壌試料、淡水試料、廃水試料、生理食塩水試料、大気への曝露又は他のガス試料、又はこれらの組み合わせなど、生物学的試料又は環境試料であってもよい。例えば、限定はされないが、金属、木材、プラスチック、ゴムなどの任意の材料で作られている家庭用／商業上／工業上の表面が拭き取り採取され、汚染物質に関して試験されてもよい。土壌試料は、環境保全目的及び／又はヒト、動物、若しくは植物病害検査の両方のため、病原性細菌又は寄生虫、又は他の微生物の存在に関して試験されてもよい。淡水試料、廃水試料、又は生理食塩水試料などの水試料は、清浄度及び安全性、及び／又は飲用に適しているかに関して評価することができ、例えば、小形クリプトスポリジウム（Ｃｒｙｐｔｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ　ｐａｒｖｕｍ）、ランブル鞭毛虫（Ｇｉａｒｄｉａ　ｌａｍｂｌｉａ）、又は他の微生物汚染の存在を検出してもよい。更なる実施形態において、生体試料は、限定はされないが、組織試料、唾液、血液、血漿、血清、便、尿、喀痰、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、腹水、胸水、漿液、膿、又は皮膚若しくは粘膜表面のスワブを含めた供給源から入手されてもよい。一部の詳細な実施形態において、環境試料又は生体試料は生の試料であってもよく、及び／又は本方法の適用前に１つ以上の標的分子が試料から精製又は増幅されていないものであってもよい。微生物の同定はあらゆる適用に有用で、及び／又は必要とされてもよく、従って本発明においては、当業者によって適切と見なされる任意の供給源からの任意の種類の試料を使用し得る。

【０３３３】

一部の実施形態では、飲食店又は他の食品提供者における大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）などの細菌による食品汚染の検査；食品表面；サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）、又は大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）などの病原体に関する水の検査；また食肉源の純度を決定するための製造業者及び規制機関の食品品質検査；レジオネラなどの病原体による空気汚染の同定；ビールがペディオコッカス属

（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ）及びラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）などの病原体によって汚染されているか又は腐っているかどうかの検査；製造中の細菌又は真菌による低温殺菌又は非低温殺菌チーズの汚染。

【０３３４】

本発明における微生物は、病原性微生物又は食品若しくは食用製品に腐敗を生じさせる微生物であってもよい。病原性微生物は、ヒト、動物、又は植物にとって病原性であるか、又は他の形で望ましくない。ヒト又は動物目的では、微生物は疾患を引き起こし、又は病気を生じさせ得る。本発明の動物又は獣医学適用は、微生物に感染した動物を同定し得る。例えば、本発明の方法及びシステムは、限定はされないが、ケンネルコフ、狂犬病ウイルス、及び犬糸状虫を含め、病原体を有するコンパニオンアニマルを同定し得る。他の実施形態において、本発明の方法及びシステムは、育種目的での血統検査に使用されてもよい。植物微生物は、植物に傷害又は疾患、収穫量の低下をもたらし、又は食品若しくは食用品の汚染目的で色、味、堅さ、匂いなどの形質を変化させることもあり、微生物は食品又は食用製品の味、匂い、色、堅さ又は他の商業的特性に悪影響を及ぼし得る。特定の例示的実施形態では、微生物は細菌種である。細菌は、好冷細菌（ｐｓｙｃｈｏｔｒｏｐｈ）、大腸菌型細菌、乳酸菌、又は芽胞形成細菌であってもよい。特定の例示的実施形態では、細菌は、疾患又は病気を引き起こす、又はその他望ましくない製品又は形質をもたらす任意の細菌種であってもよい。本発明における細菌は、ヒト、動物、又は植物にとって病原性であってもよい。

【０３３５】

試料タイプ

本明細書に開示される方法における使用に適切な試料には、植物、動物、細菌など、生物又はその一部から入手される任意の従来の生体試料が含まれる。詳細な実施形態において、生体試料はヒト対象などの動物対象から入手される。生体試料は、限定なしに、とりわけ細菌、酵母、原虫、及びアメーバなどの単細胞生物、多細胞生物（植物又は動物など、健常な又は見かけ上健常なヒト対象又は病原性細菌若しくはウイルスなどの病原性微生物による感染など、診断又は調査されることになる病態又は疾患に罹っているヒト患者からの試料を含む）を含め、任意の生体から入手される、それによって排出される、又はそれによって分泌される任意の固体又は流体試料である。例えば、生体試料は、例えば、血液、血漿、血清、尿、便、喀痰、粘液、リンパ液、滑液、胆汁、腹水、胸水、漿液、唾液、脳脊髄液、房水又は硝子体液、又は任意の生体分泌物、漏出液、滲出液（例えば、膿瘍又は任意の他の感染部位又は炎症から入手される流体）、又は関節（例えば、正常関節、又は関節リウマチ、骨関節炎、痛風若しくは敗血症性関節炎などの疾患に罹っている関節）から入手される流体、又は皮膚若しくは粘膜表面のスワブから入手される生体液であってもよい。

【０３３６】

試料はまた、任意の器官又は組織（腫瘍生検など、生検又は剖検標本を含む）から入手される試料であってもよく、又は細胞（初代細胞か、それとも培養細胞かに関わらず）又は任意の細胞、組織又は器官によって馴化された培地を含んでもよい。例示的試料としては、限定なしに、細胞、細胞ライセート、血液スメア、細胞遠心調製物、細胞診スメア、体液（例えば、血液、血漿、血清、唾液、喀痰、尿、気管支肺胞洗浄、精液等）、組織生検（例えば、腫瘍生検）、細針吸引物、及び／又は組織切片（例えば、クライオスタット組織切片及び／又はパラフィン包埋組織切片）が挙げられる。他の例では、試料には、循環腫瘍細胞（細胞表面マーカーによって同定することができる）が含まれる。詳細な例では、試料は直接使用される（例えば、新鮮又は凍結）か、又は例えば固定（例えば、ホルマリンを使用）及び／又はワックスへの包埋により（ホルマリン固定パラフィン包埋（ＦＦＰＥ）組織試料など）、使用前に操作されてもよい。対象から組織を入手する任意の方法を利用し得ること、及び使用される方法の選択が、組織のタイプ、対象の年齢、又は実施者に利用可能な手技など、様々な要因に依存し得ることは理解されるであろう。かかる試料を獲得するための標準的な技法は当該技術分野で利用可能である。例えば、Ｓｃｈｌ

ｕｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７６：１３２７－３３（１９９２）；Ｂｉｇｂｙ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｒｅｖ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｄｉｓ．１３３：５１５－１８（１９８６）；Ｋｏｖａｃｓ ｅｔ ａｌ．，ＮＥＪＭ ３１８：５８９－９３（１９８８）；及びＯｇｎｉｂｅｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｒｅｖ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｄｉｓ．１２９：９２９－３２（１９８４）を参照のこと。

【０３３７】

他の実施形態において、試料は、水、土壌、又は工業上若しくは医療上の表面などの表面など、環境試料であってもよい。一部の実施形態では、米国特許出願公開第２０１３／０１９０１９６号明細書に開示されるような方法が、高度な感度及び特異性での生の細胞試料から直接の核酸シグネチャ、具体的にはＲＮＡレベルの検出に適用され得る。目的の病原体の各々に特異的な配列は、目的の病原体からのコード配列を他の生物の全てのコード配列とＢＬＡＳＴソフトウェアによって比較することにより同定又は選択されてもよい。

【０３３８】

本開示の幾つかの実施形態は、臨床血液試料の分画に成功するための当該技術分野において公知の手順及び手法の使用を含む。例えば、Ｈａｎ Ｗｅｉ Ｈｏｕｒ ｅｔ ａｌ．，「血液分画用マイクロ流体デバイス（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ Ｄｅｖｉｃｅｓ ｆｏｒ Ｂｌｏｏｄ Ｆｒａｃｔｉｏｎａｔｉｏｎ）」，Ｍｉｃｒｏｍａｃｈｉｎｅｓ ２０１１，２，３１９－３４３；Ａｌｉ Ａｓｇａｒ Ｓ．Ｂｈａｇａｔ ｅｔ ａｌ．，「血液からの循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）のディーンフロー分画（ＤＦＦ）分離（Ｄｅａｎ Ｆｌｏｗ Ｆｒａｃｔｉｏｎａｔｉｏｎ（ＤＦＦ）Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ Ｔｕｍｏｒ Ｃｅｌｌｓ（ＣＴＣｓ）ｆｒｏｍ Ｂｌｏｏｄ）」，１５ｔｈ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ ｏｎ Ｍｉｎｉａｔｕｒｉｚｅｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ ｆｏｒ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｏｃｔｏｂｅｒ ２－６，２０１１，Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ；及び国際公開第２０１１１０９７６２号パンフレット（この開示は全体として参照により本明細書に援用される）に記載される手順を参照のこと。血液試料は一般に、検査目的で試料サイズを増加させるため培養下で拡大される。本発明の一部の実施形態では、血液又は他の生体試料は、本明細書に記載されるとおりの方法において培養下で拡大する必要なしに使用されてもよい。

【０３３９】

更に、本開示の幾つかの実施形態は、Ｈａｎ Ｗｅｉ Ｈｏｕｒ ｅｔ ａｌ．，「スパイラルマイクロチャネルを使用した全血からの病原体分離（Ｐａｔｈｏｇｅｎ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｆｒｏｍ Ｗｈｏｌｅ Ｂｌｏｏｄ Ｕｓｉｎｇ Ｓｐｉｒａｌ Ｍｉｃｒｏｃｈａｎｎｅｌ）」，Ｃａｓｅ Ｎｏ．１５９９５ＪＲ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、投稿準備中（この開示は全体として参照により本明細書に援用される）に記載されるとおりのスパイラルマイクロチャネルを使用して全血からの病原体の分離に成功するための当該技術分野において公知の手順及び手法の使用を含む。

【０３４０】

本明細書に開示される実施形態は感度が増加しているため、特定の例示的実施形態では、アッセイ及び方法は、生の試料、又は検出しようとする標的分子が試料から更に分画又は精製されない試料で実行されてもよい。

【０３４１】

例示的微生物

本明細書に開示される実施形態は、幾つもの異なる微生物の検出に使用し得る。用語の微生物は、本明細書で使用されるとき、細菌、真菌、原虫、寄生虫及びウイルスを含む。

【０３４２】

細菌

以下は、本明細書に開示される実施形態を使用して検出される可能性のある種類の微生物の例示的なリストを提供する。特定の例示的実施形態では、微生物は細菌である。本開示の方法において検出され得る細菌の例としては、とりわけ、限定なしに、アシネトバク

ター・バウマンニ（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｕｍａｎｉｉ）、アクチノバチルス属種（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｐ．）、放線菌類（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｓ）種、アクチノミセス属種（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．）（アクチノミセス・イスラエリ（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ ｉｓｒａｅｌｉｉ）及びアクチノミセス・ネスルンディ（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ ｎａｅｓｌｕｎｄｉｉ）など）、アエロモナス属種（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ ｓｐ．）（アエロモナス・ヒドロフィラ（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ ｈｙｄｒｏｐｈｉｌａ）、アエロモナス・ベロニイ次亜種ソブリア（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ ｖｅｒｏｎｉｉ ｂｉｏｖａｒ ｓｏｂｒｉａ）（アエロモナス・ソブリア（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ ｓｏｂｒｉａ））、及びアエロモナス・カビアエ（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ ｃａｖｉａｅ）など）、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム（Ａｎａｐｌａｓｍａ ｐｈａｇｏｃｙｔｏｐｈｉｌｕｍ）、アナプラズマ・マージナーレ（Ａｎａｐｌａｓｍａ ｍａｒｇｉｎａｌｅ） アルカリゲネス・キシロソキシダンス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ ｘｙｌｏｓｏｘｉｄａｎｓ）、アシネトバクター・バウマンニ（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｕｍａｎｉｉ）、アクチノバチルス・アクチノミセテムコミタンス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓ）、バチルス属種（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｐ．）（炭疽菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｈｒａｃｉｓ）、セレウス菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ）、バチルス・スブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、バチルス・チューリンギエンシス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓ）、及びバチルス・ステアロサーモフィルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）など）、バクテロイデス属種（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ ｓｐ．）（バクテロイデス・フラギリス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ ｆｒａｇｉｌｉｓ）など）、バルトネラ属種（Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ ｓｐ．）（バルトネラ・バシリフォルミス（Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ ｂａｃｉｌｌｉｆｏｒｍｉｓ）及びバルトネラ・ヘンセラ菌（Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ ｈｅｎｓｅｌａｅ）など、ビフィドバクテリウム属種（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ．）、ボルデテラ属種（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｓｐ．）（百日咳菌（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ）、パラ百日咳菌（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｐａｒａｐｅｒｔｕｓｓｉｓ）、及び気管支敗血症菌（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｂｒｏｎｃｈｉｓｅｐｔｉｃａ）など）、ボレリア属種（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｓｐ．）（回帰熱ボレリア（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｒｅｃｕｒｒｅｎｔｉｓ）、及びボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）など）、ブルセラ属種（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ｓｐ．）（ウシ流産菌（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ａｂｏｒｔｕｓ）、イヌ流産菌（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ｃａｎｉｓ）、ブルセラ・メリテンシス（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ｍｅｌｉｎｔｅｎｓｉｓ）及びブタ流産菌（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ｓｕｉｓ）など）、バークホルデリア属種（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｓｐ．）（類鼻疽菌（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｐｓｅｕｄｏｍａｌｌｅｉ）及びバークホルデリア・セパシア（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｃｅｐａｃｉａ）など）、カンピロバクター属種（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ．）（カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ）、カンピロバクター・コリ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｃｏｌｉ）、カンピロバクター・ラリ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｌａｒｉ）及びカンピロバクター・フィタス（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｆｅｔｕｓ）など）、キャプノサイトファーガ属種（Ｃａｐｎｏｃｙｔｏｐｈａｇａ ｓｐ．）、カーディオバクテリウム・ホミニス（Ｃａｒｄｉｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｈｏｍｉｎｉｓ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、肺炎クラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、オウム病クラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｐｓｉｔｔａｃｉ）、シトロバクター属種（Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ．） Ｑ熱コクシエラ（Ｃｏｘｉｅｌｌａ ｂｕｒｎｅｔｉｉ）、コリネバクテリウム属種（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ．）（ジフテリア菌（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ）、コリネバクテリウム・ジェイケイウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｊｅｉｋｅｕｍ）及びコリネバクテリウム属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）など）、クロストリジウム属種（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｓｐ．）（ウェルシュ菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉ

ｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、クロストリジウム・ディフィシル（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ）、ボツリヌス菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）及び破傷風菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）など）、エイケネラ・コローデンス（Ｅｉｋｅｎｅｌｌａ ｃｏｒｒｏｄｅｎｓ）、エンテロバクター属種（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ．）（エンテロバクター・アエロゲネス（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ａｅｒｏｇｅｎｅｓ）、エンテロバクター・アグロメランス（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ａｇｇｌｏｍｅｒａｎｓ）、エンテロバクター・クロアカ（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｃｌｏａｃａｅ）など及び腸管毒素原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、腸管組織侵入性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、腸管病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、腸管出血性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、腸管凝集性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）及び尿路病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）など、日和見大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）を含めた大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ））　エンテロコッカス属種（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．）（フェカリス菌（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓ）及びフェシウム菌（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃｉｕｍ）など）　エーリキア属種（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｓｐ．）（エーリキア・シャフェンシス（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｃｈａｆｅｅｎｓｉａ）及びエーリキア・カニス（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｃａｎｉｓ）など）、エピデルモフィトン・フロッコーサム（Ｅｐｉｄｅｒｍｏｐｈｙｔｏｎ ｆｌｏｃｃｏｓｕｍ）、ブタ丹毒菌（Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ ｒｈｕｓｉｏｐａｔｈｉａｅ）、ユーバクテリウム属種（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ．）、野兎病菌（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ）、フソバクテリウム・ヌクレアタム（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｕｃｌｅａｔｕｍ）、ガードネレラ・バギナリス（Ｇａｒｄｎｅｒｅｌｌａ ｖａｇｉｎａｌｉｓ）、ゲメラ・モルビロルム（Ｇｅｍｅｌｌａ ｍｏｒｂｉｌｌｏｒｕｍ）、ヘモフィルス属種（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｓｐ．）（インフルエンザ菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、軟性下疳菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｄｕｃｒｅｙｉ）、ヘモフィルス・エジプチウス（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ａｅｇｙｐｔｉｕｓ）、パラインフルエンザ菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｐａｒａｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、ヘモフィルス・ヘモリティカス（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）及びヘモフィルス・パラヘモリティカス（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｐａｒａｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）など、ヘリコバクター属種（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ．）（ヘリコバクター・ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ）、ヘリコバクター・シネディ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｃｉｎａｅｄｉ）及びヘリコバクター・フェネリアエ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｆｅｎｎｅｌｌｉａｅ）など）、キンゲラ・キンギイ（Ｋｉｎｇｅｌｌａ ｋｉｎｇｉｉ）、クレブシエラ属種（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｓｐ．）（肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、クレブシエラ・グラヌロマティス（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｇｒａｎｕｌｏｍａｔｉｓ）及びクレブシエラ・オキシトカ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｏｘｙｔｏｃａ）など）、ラクトバチルス属種（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｐ．）、リステリア菌（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、レプトスピラ・インターロガンス（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎｔｅｒｒｏｇａｎｓ）、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）、レプトスピラ・インターロガンス（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎｔｅｒｒｏｇａｎｓ）、ペプトストレプトコッカス属種（Ｐｅｐｔｏｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．）、ヘモリチカ菌（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｈｅｍｏｌｙｔｉｃａ）、イヌ小胞子菌（Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｕｍ ｃａｎｉｓ）、モラクセラ・カタラーリス（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｃａｔａｒｒｈａｌｉｓ）、モルガネラ属種（Ｍｏｒｇａｎｅｌｌａ ｓｐ．）、モビルンカス属種（Ｍｏｂｉｌｕｎｃｕｓ ｓｐ．）、ミクロコッカス属種（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．）、マイコバクテリウム属種（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ．）（らい菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ）、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ヨーネ菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒａｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒｅ）、マイコバクテリウム・アビウム

（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｖｉｕｍ）、ウシ型結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｂｏｖｉｓ）、及びマイコバクテリウム・マリヌム（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｍａｒｉｎｕｍ）など）、マイコプラズマ属種（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍ ｓｐ．）（肺炎マイコプラズマ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、マイコプラズマ・ホミニス（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｏｍｉｎｉｓ）、及びマイコプラズマ・ゲニタリウム（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ）など）、ノカルジア属種（Ｎｏｃａｒｄｉａ ｓｐ．）（ノカルジア・アステロイデス（Ｎｏｃａｒｄｉａ ａｓｔｅｒｏｉｄｅｓ）、ノカルジア・シリアシゲオルジカ（Ｎｏｃａｒｄｉａ ｃｙｒｉａｃｉｇｅｏｒｇｉｃａ）及びノカルジア・ブラジリエンシス（Ｎｏｃａｒｄｉａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）など）、ナイセリア属種（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｓｐ．）（淋菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）及び髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）など）、パスツレラ・ムルトシダ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ）、ピチロスポルム・オルビクラーレ（Ｐｉｔｙｒｏｓｐｏｒｕｍ ｏｒｂｉｃｕｌａｒｅ）（癜風菌（Ｍａｌａｓｓｅｚｉａ ｆｕｒｆｕｒ））、プレジオモナス・シゲロイデス（Ｐｌｅｓｉｏｍｏｎａｓ ｓｈｉｇｅｌｌｏｉｄｅｓ）、プレボテラ属種（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｓｐ．）、ポルフィロモナス属種（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｓｐ．）、プレボテラ・メラニノゲニカ（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｍｅｌａｎｉｎｏｇｅｎｉｃａ）、プロテウス属種（Ｐｒｏｔｅｕｓ ｓｐ．）（プロテウス・ブルガリス（Ｐｒｏｔｅｕｓ ｖｕｌｇａｒｉｓ）及びプロテウス・ミラビリス（Ｐｒｏｔｅｕｓ ｍｉｒａｂｉｌｉｓ）など）、プロビデンシア属種（Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ｓｐ．）（プロビデンシア・アルカリファシエンス（Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ａｌｃａｌｉｆａｃｉｅｎｓ）、プロビデンシア・レットゲリ（Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ｒｅｔｔｇｅｒｉ）及びプロビデンシア・スチュアルティイ（Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ｓｔｕａｒｔｉｉ）など）、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、
アクネ菌（Ｐｒｏｐｉｏｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｃｎｅｓ）、ロドコッカス・エクイ（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ ｅｑｕｉ）、リケッチア属種（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｓｐ．）（ロッキー山紅斑熱リケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｒｉｃｋｅｔｔｓｉｉ）、痘瘡リケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ａｋａｒｉ）及び発疹チフスリケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｐｒｏｗａｚｅｋｉｉ）など、恙虫病リケッチア（Ｏｒｉｅｎｔｉａ ｔｓｕｔｓｕｇａｍｕｓｈｉ）（旧：恙虫病リケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｔｓｕｔｓｕｇａｍｕｓｈｉ））及び発疹熱リケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｔｙｐｈｉ））、ロドコッカス属種（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．）、セラチア・マルセセンス（Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃｅｎｓ）、ステノトロホモナス・マルトフィリア（Ｓｔｅｎｏｔｒｏｐｈｏｍｏｎａｓ ｍａｌｔｏｐｈｉｌｉａ）、サルモネラ属種（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｓｐ．）（サルモネラ・エンテリカ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ）、サルモネラ・チフィ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ）、パラチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｐａｒａｔｙｐｈｉ）、腸炎菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ）、豚コレラ菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｃｈｏｌｅｒａｓｕｉｓ）及びネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）など）、セラチア属種（Ｓｅｒｒａｔｉａ ｓｐ．）（霊菌（Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓａｎｓ）及びセラチア・リクファシエンス（Ｓｅｒｒａｔｉａ ｌｉｑｕｉｆａｃｉｅｎｓ）など）、赤痢菌属種（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｐ．）（志賀赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ）、シゲラ・フレックスネリ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｆｌｅｘｎｅｒｉ）、シゲラ・ボイディ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｂｏｙｄｉｉ）及びシゲラ・ソネイ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｏｎｎｅｉ）など）、スタフィロコッカス属種（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．）（黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）、表皮ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ）、スタフィロコッカス・ヘモリチカス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｈｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）、スタフィロコッカス・サプロフィチカス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｓａｐｒｏｐｈｙｔｉｃｕｓ）など）、ストレプトコッカス属種（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．）（肺炎レ

ンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）（例えばクロラムフェニコール耐性血清型４型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、スペクチノマイシン耐性血清型６Ｂ型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ストレプトマイシン耐性血清型９Ｖ型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、エリスロマイシン耐性血清型１４型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、オプトヒン耐性血清型１４型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、リファンピシン耐性血清型１８Ｃ型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、テトラサイクリン耐性血清型１９Ｆ型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ペニシリン耐性血清型１９Ｆ型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、及びトリメトプリム耐性血清型２３Ｆ型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、クロラムフェニコール耐性血清型４型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、スペクチノマイシン耐性血清型６Ｂ型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ストレプトマイシン耐性血清型９Ｖ型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、オプトヒン耐性血清型１４型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、リファンピシン耐性血清型１８Ｃ型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ペニシリン耐性血清型１９Ｆ型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、又はトリメトプリム耐性血清型２３Ｆ型肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ））、ストレプトコッカス・アガラクチア（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、ストレプトコッカス・ミュータンス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｍｕｔａｎｓ）、化膿レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、Ａ群レンサ球菌、化膿レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、Ｂ群レンサ球菌、ストレプトコッカス・アガラクチア（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、Ｃ群レンサ球菌、ストレプトコッカス・アンギノサス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｎｇｉｎｏｓｕｓ）、ストレプトコッカス・エキシミリス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｅｑｕｉｓｍｉｌｉｓ）、Ｄ群レンサ球菌、ストレプトコッカス・ボビス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｂｏｖｉｓ）、Ｆ群レンサ球菌、及びストレプトコッカス・アンギノサス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｎｇｉｎｏｓｕｓ）Ｇ群レンサ球菌など）、鼠咬症スピリルム（Ｓｐｉｒｉｌｌｕｍ ｍｉｎｕｓ）、ストレプトバチルス・モニリフォルミス（Ｓｔｒｅｐｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｉ）、トレポネーマ属種（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｓｐ．）（トレポネーマ・カラテウム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｃａｒａｔｅｕｍ）、トレポネーマ・ペルテヌエ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐｅｔｅｎｕｅ）、梅毒トレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ）及びトレポネーマ・エンデミカム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｅｎｄｅｍｉｃｕｍ）など、紅色白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ）、毛瘡白癬菌（Ｔ．ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ）、トロフェリマ・ホウィッペリ（Ｔｒｏｐｈｅｒｙｍａ ｗｈｉｐｐｅｌｉｉ）、ウレアプラズマ・ウレアリチカム（Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｕｒｅａｌｙｔｉｃｕｍ）、ベイロネラ属種（Ｖｅｉｌｌｏｎｅｌｌａ ｓｐ．）、ビブリオ属種（Ｖｉｂｒｉｏ ｓｐ．）（コレラ菌（Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）、ビブリオ・パラヘモリティカス（Ｖｉｂｒｉｏ ｐａｒａｈｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）、ビブリオ・バルニフィカス（Ｖｉｂｒｉｏ ｖｕｌｎｉｆｉｃｕｓ）、腸炎ビブリオ（Ｖｉｂｒｉｏ ｐａｒａｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）、ビブリオ・バルニフィカス（Ｖｉｂｒｉｏ ｖｕｌｎｉｆｉｃｕｓ）、ビブリオ・アルギノリチカス（Ｖｉｂｒｉｏ ａｌｇｉｎｏｌｙｔｉｃｕｓ）、ビブリオ・ミミカス（Ｖｉｂｒｉｏ ｍｉｍｉｃｕｓ）、ビブリオ・ホリザエ（Ｖｉｂｒｉｏ ｈｏｌｌｉｓａｅ）、ビブリオ・フルビアリス（Ｖｉｂｒｉｏ ｆｌｕｖｉａｌｉｓ）、ビブリオ・メチニコフィイ（Ｖｉｂｒｉｏ ｍｅｔｃｈｎｉｋｏｖｉｉ）、ビブリオ・ダムセラ（Ｖｉｂｒｉｏ ｄａｍｓｅｌａ）及びビブリオ・ファーニッシイ（Ｖｉｂｒｉｏ ｆｕｒｎｉｓｉｉ）な

ど）、エルシニア属種（Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｓｐ．）（腸炎エルシニア（Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｅｎｔｅｒｏｃｏｌｉｔｉｃａ）、ペスト菌（Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｐｅｓｔｉｓ）、及び偽結核菌（Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｐｓｅｕｄｏｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）など）及びキサントモナス・マルトフィリア（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ　ｍａｌｔｏｐｈｉｌｉａ）のうちの任意の１つ以上（又はその任意の組み合わせ）が挙げられる。

【０３４３】

真菌

特定の例示的実施形態では、微生物は真菌又は真菌種である。本開示の方法において検出され得る真菌の例としては、限定なしに、アスペルギルス属（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、ブラストミセス属（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ）、カンジダ症、コクシジオイデス症（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｄｏｍｙｃｏｓｉｓ）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、クリプトコッカス・ガッティ（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｇａｔｔｉ）、ｓｐ．ヒストプラズマ属種（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ　ｓｐ．）（ヒストプラズマ・カプスラーツム（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ　ｃａｐｓｕｌａｔｕｍ）など）、ニューモシスチス属種（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ　ｓｐ．）（ニューモシスチス・イロベチ（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ　ｊｉｒｏｖｅｃｉｉ）など）、スタキボトリス属（Ｓｔａｃｈｙｂｏｔｒｙｓ）（スタキボトリス・チャータラム（Ｓｔａｃｈｙｂｏｔｒｙｓ　ｃｈａｒｔａｒｕｍ）など）、ムコール症（Ｍｕｃｒｏｙｍｃｏｓｉｓ）、スポロトリクス属（Ｓｐｏｒｏｔｈｒｉｘ）、真菌性眼感染症、白癬、エクセロヒルム属（Ｅｘｓｅｒｏｈｉｌｕｍ）、クラドスポリウム属（Ｃｌａｄｏｓｐｏｒｉｕｍ）のうちの任意の１つ以上（又はその任意の組み合わせ）が挙げられる。

【０３４４】

特定の例示的実施形態では、真菌は酵母である。開示される方法において検出され得る酵母の例としては、限定なしに、アスペルギルス属（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）種（アスペルギルス・フミガーツス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓ）、黄色コウジ菌（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｌａｖｕｓ）及びアスペルギルス・クラバツス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｃｌａｖａｔｕｓ）など）、クリプトコッカス属種（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．）（クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、クリプトコッカス・ガッティ（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｇａｔｔｉｉ）、クリプトコッカス・ローレンティ（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｕｒｅｎｔｉｉ）及びクリプトコッカス・アルビダス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ａｌｂｉｄｕｓ）など）、ゲオトリクム属（Ｇｅｏｔｒｉｃｈｕｍ）種、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）種、ハンゼヌラ属（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）種、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）種（カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）など）、クルイベロミセス属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）種、デバリオミセス属（Ｄｅｂａｒｙｏｍｙｃｅｓ）種、ピキア属（Ｐｉｃｈｉａ）種、又はこれらの組み合わせのうちの１つ以上（又はその任意の組み合わせ）が挙げられる。特定の例示的実施形態では、真菌はカビである。例示的なカビとしては、限定はされないが、ペニシリウム属（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）種、クラドスポリウム属（Ｃｌａｄｏｓｐｏｒｉｕｍ）種、バイソクラミス属（Ｂｙｓｓｏｃｈｌａｍｙｓ）種、又はこれらの組み合わせが挙げられる。

【０３４５】

原虫

特定の例示的実施形態では、微生物は原虫である。本開示の方法及び装置において検出され得る原虫の例としては、限定なしに、ユーグレノゾア門（Ｅｕｇｌｅｎｏｚｏａ）、ヘテロロボサ綱（Ｈｅｔｅｒｏｌｏｂｏｓｅａ）、ディプロモナス目（Ｄｉｐｌｏｍｏｎａｄｉｄａ）、アメーバ動物門（Ａｍｏｅｂｏｚｏａ）、ブラストシスチス属（Ｂｌａｓｔｏｃｙｓｔｉｃ）、及びアピコンプレックス門（Ａｐｉｃｏｍｐｌｅｘａ）のうちの任意の１つ以上（又はその任意の組み合わせ）が挙げられる。例示的なユーグレノゾア門（Ｅｕｇｌｅｎｏｚａ）としては、限定はされないが、クルーズトリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｃｒｕｚｉ）（シャーガス病）、ガンビアトリパノソーマ（Ｔ．ｂｒｕ

ｃｅｉ ｇａｍｂｉｅｎｓｅ）、ローデシアトリパノソーマ（Ｔ．ｂｒｕｃｅｉ ｒｈｏｄｅｓｉｅｎｓｅ）、ブラジルリーシュマニア（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｂｒａｚｉｌｉｅｎｓｉｓ）、小児リーシュマニア（Ｌ．ｉｎｆａｎｔｕｍ）、メキシコリーシュマニア（Ｌ．ｍｅｘｉｃａｎａ）、大形リーシュマニア（Ｌ．ｍａｊｏｒ）、熱帯リーシュマニア（Ｌ．ｔｒｏｐｉｃａ）、及びドノバンリーシュマニア（Ｌ．ｄｏｎｏｖａｎｉ）が挙げられる。例示的なヘテロロボサ綱（Ｈｅｔｅｒｏｌｏｂｏｓｅａ）としては、限定はされないが、フォーラーネグレリア（Ｎａｅｇｌｅｒｉａ ｆｏｗｌｅｒｉ）が挙げられる。例示的なディプロモナス目（Ｄｉｐｌｏｍｏｎａｄｉｄｓ）としては、限定はされないが、ランブル鞭毛虫（Ｇｉａｒｄｉａ ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌｉｓ）（ランブル鞭毛虫（Ｇ．ｌａｍｂｌｉａ）、ランブル鞭毛虫（Ｇ．ｄｕｏｄｅｎａｌｉｓ））が挙げられる。例示的なアメーバ動物門（Ａｍｏｅｂｏｚｏａ）としては、限定はされないが、カステラーニアメーバ（Ａｃａｎｔｈａｍｏｅｂａ ｃａｓｔｅｌｌａｎｉｉ）、バラムチア・マンドリルリス（Ｂａｌａｍｕｔｈｉａ ｍａｄｒｉｌｌａｒｉｓ）、赤痢アメーバ（Ｅｎｔａｍｏｅｂａ ｈｉｓｔｏｌｙｔｉｃａ）が挙げられる。例示的な胚盤胞としては、限定はされないが、ヒトブラストシスチス（Ｂｌａｓｔｏｃｙｓｔｉｃ ｈｏｍｉｎｉｓ）が挙げられる。例示的なアピコンプレックス門（Ａｐｉｃｏｍｐｌｅｘａ）としては、限定はされないが、ネズミバベシア（Ｂａｂｅｓｉａ ｍｉｃｒｏｔｉ）、小形クリプトスポリジウム（Ｃｒｙｐｔｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ ｐａｒｖｕｍ）、シクロスポラ・カイエタネンシス（Ｃｙｃｌｏｓｐｏｒａ ｃａｙｅｔａｎｅｎｓｉｓ）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐ．ｖｉｖａｘ）、卵形マラリア原虫（Ｐ．ｏｖａｌｅ）、四日熱マラリア原虫（Ｐ．ｍａｌａｒｉａｅ）、及びトキソプラズマ原虫（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉ）が挙げられる。

【０３４６】

寄生虫

特定の例示的実施形態では、微生物は寄生虫である。開示される方法において検出され得る寄生虫の例としては、限定なしに、オンコセルカ属（Ｏｎｃｈｏｃｅｒｃａ）種及びプラスモジウム属（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）種のうちの１つ以上（又はその任意の組み合わせ）が挙げられる。

【０３４７】

ウイルス

特定の例示的実施形態では、本明細書に開示されるシステム、装置、及び方法は、試料中のウイルスを検出することに関する。本明細書に開示される実施形態を使用して（例えば対象又は植物の）ウイルス感染症が検出されてもよく、又は一塩基変異多型だけ異なるウイルス株を含め、ウイルス株が決定されてもよい。ウイルスは、ＤＮＡウイルス、ＲＮＡウイルス、又はレトロウイルスであってもよい。本発明に伴い有用なウイルスの非限定的な例としては、限定はされないが、エボラ、麻疹、ＳＡＲＳ、チクングニア熱、肝炎、マールブルグ、黄熱、ＭＥＲＳ、デング熱、ラッサ熱、インフルエンザ、ラブドウイルス又はＨＩＶが挙げられる。肝炎ウイルスには、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、又はＣ型肝炎が含まれ得る。インフルエンザウイルスには、例えば、Ａ型インフルエンザ又はＢ型インフルエンザが含まれ得る。ＨＩＶには、ＨＩＶ１型又はＨＩＶ２型が含まれ得る。特定の例示的実施形態では、ウイルス配列は、ヒト呼吸器合胞体ウイルス、スーダンエボラウイルス、ブンディブギョウイルス、タイフォレストエボラウイルス、レストンエボラウイルス、アチモタ、ヤブカ属（Ａｅｄｅｓ）フラビウイルス、アグアカテ（Ａｇｕａｃａｔｅ）ウイルス、アカバネウイルス、アレチノフィド（Ａｌｅｔｈｉｎｏｐｈｉｄ）レプトアレナウイルス、アルパフアヨ（Ａｌｌｐａｈｕａｙｏ）マンマレナウイルス、アマパリマンマレナウイルス（ｍｍａｒｅｎａｖｉｒｕｓ）、アンデスウイルス、アポイウイルス、アラバンウイルス、アロアウイルス、アルムウォット（Ａｒｕｍｗｏｔ）ウイルス、タイセイヨウサケパラミクソウイルス、オーストラリアコウモリリッサウイルス、トリボルナウイルス、トリメタニューモウイルス、トリパラミクソウイルス、ペンギン又はフォークランド諸島ウイルス、ＢＫポリオーマウイルス、バガザウイルス、バンナウイルス、コウモリヘ

ルペスウイルス、コウモリサポウイルス、ベアカノン（Ｂｅａｒ　Ｃａｎｏｎ）マンマレナウイルス、ベイロン（Ｂｅｉｌｏｎｇ）ウイルス、ベータコロナウイルス、ベータパピローマウイルス１～６型、バーンヤ（Ｂｈａｎｊａ）ウイルス、ボケローコウモリリッサウイルス、ボルナ病ウイルス、ブルボンウイルス、ウシヘパシウイルス、ウシパラインフルエンザウイルス３型、ウシ呼吸器合胞体ウイルス、ブラゾラン（Ｂｒａｚｏｒａｎ）ウイルス、ブニヤンベラウイルス、カリシウイルス科（Ｃａｌｉｃｉｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、カリフォルニア脳炎ウイルス、カンジルーウイルス、イヌジステンパーウイルス、イヌニューモウイルス、ヒマラヤスギウイルス、細胞融合剤ウイルス、クジラモルビリウイルス、チャンディプラウイルス、朝陽ウイルス、チャパレマンマレナウイルス、チクングニアウイルス、コロブスサルパピローマウイルス、コロラドダニ熱ウイルス、牛痘ウイルス、クリミア－コンゴ出血熱ウイルス、イエカ属（Ｃｕｌｅｘ）フラビウイルス、キュピキシ（Ｃｕｐｉｘｉ）マンマレナウイルス、デングウイルス、ドブラバ・ベルグラードウイルス、東港ウイルス、ダグブ（Ｄｕｇｂｅ）ウイルス、ドゥーベンハーゲウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、エンテベコウモリウイルス、エンテロウイルスＡ～Ｄ型、ヨーロッパコウモリリッサウイルス１～２型、アイアッハ（Ｅｙａｃｈ）ウイルス、ネコモルビリウイルス、フェルドランスパラミクソウイルス、フィッツロイリバーウイルス、フラビウイルス科（Ｆｌａｖｉｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、フレキサル（Ｆｌｅｘａｌ）マンマレナウイルス、ＧＢウイルスＣ、ガイロ（Ｇａｉｒｏ）ウイルス、ゲミサーキュラーウイルス、ガチョウパラミクソウイルスＳＦ０２、グレートアイランドウイルス、グアナリトマンマレナウイルス、ハンターンウイルス、ハンタウイルスＺ１０、ハートランドウイルス、ヘンドラウイルス、Ａ／Ｂ／Ｃ／Ｅ型肝炎、Ｄ型肝炎ウイルス、ヒトボカウイルス、ヒトコロナウイルス、ヒト内因性レトロウイルスＫ、ヒト腸内コロナウイルス、ヒト生殖器関連環状ＤＮＡウイルス－１、ヒトヘルペスウイルス１～８型、ヒト免疫不全ウイルス１／２型、ヒトマストアデノウイルスＡ～Ｇ型、ヒトパピローマウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス１～４型、ヒトパレコウイルス（ｐａｒａｅｃｈｏｖｉｒｕｓ）、ヒトピコルナウイルス、ヒトスマコウイルス（ｓｍａｃｏｖｉｒｕｓ）、イコマリッサウイルス、イルヘウスウイルス、Ａ～Ｃ型インフルエンザ、イッピー（Ｉｐｐｙ）マンマレナウイルス、イルクーツウイルス、Ｊ－ウイルス、ＪＣポリオーマウイルス、日本脳炎ウイルス、フニンマンマレナウイルス、ＫＩポリオーマウイルス、カディピロウイルス、カミティリバー（Ｋａｍｉｔｉ　Ｒｉｖｅｒ）ウイルス、ケドゥグ（Ｋｅｄｏｕｇｏｕ）ウイルス、ホジェンド（Ｋｈｕｊａｎｄ）ウイルス、ココベラ（Ｋｏｋｏｂｅｒａ）ウイルス、キャサヌール森林病ウイルス、ラゴスコウモリウイルス、ランガットウイルス、ラッサマンマレナウイルス、ラテン（Ｌａｔｉｎｏ）マンマレナウイルス、レオパーズヒルウイルス、遼寧ウイルス、ユンガン（Ｌｊｕｎｇａｎ）ウイルス、ルロビウウイルス、跳躍病ウイルス、ルジョウイルスマンマレナウイルス、ルナ（Ｌｕｎａ）マンマレナウイルス、ルンク（Ｌｕｎｋ）ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎マンマレナウイルス、リッサウイルス属（Ｌｙｓｓａｖｉｒｕｓ）オゼルノエ（Ｏｚｅｒｎｏｅ）、ＭＳＳＩ２＼．２２５ウイルス、マチュポマンマレナウイルス、ママストロウイルス１型、マンサニーリャ（Ｍａｎｚａｎｉｌｌａ）ウイルス、マプエラウイルス、マールブルグウイルス、マヤロウイルス、麻疹ウイルス、メナングルウイルス、メルカデオ（Ｍｅｒｃａｄｅｏ）ウイルス、メルケル細胞ポリオーマウイルス、中東呼吸器症候群コロナウイルス、モバラマンマレナウイルス、モドックウイルス、モイヤング（Ｍｏｉｊａｎｇ）ウイルス、モコロ（Ｍｏｋｏｌｏ）ウイルス、サル痘ウイルス、モンタナホオヒゲコウモリ白質脳炎（ｌｅｕｋｏｅｎｃｈａｌｉｔｉｓ）ウイルス、モペイアラッサウイルスリアソータント２９、モペイアマンマレナウイルス、モロゴロウイルス、モスマンウイルス、ムンプスウイルス、マウス肺炎ウイルス、マレー渓谷脳炎ウイルス、ナリバ（Ｎａｒｉｖａ）ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ニパウイルス、ノーウォークウイルス、ドブネズミヘパシウイルス、ウンタヤウイルス、オニョンニョンウイルス、オリベロス（Ｏｌｉｖｅｒｏｓ）マンマレナウイルス、オムスク出血熱ウイルス、オロプーシェウイルス、パラインフルエンザウイルス５型、パラナマンマレナウイルス、パラマッタリバーウイルス、小反芻獣疫ウイルス、ピ

カンデ（Ｐｉｃｈａｎｄｅ）マンマレナウイルス、ピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、ピリタルマンマレナウイルス、ピシヘペウイルスＡ型、ブタパラインフルエンザウイルス１型、ブタルブラウイルス、ポワッサンウイルス、霊長類Ｔリンパ球向性ウイルス１～２型、霊長類エリスロパルボウイルス１型、プンタ・トロウイルス、プーマラウイルス、クアンビン（Ｑｕａｎｇ　Ｂｉｎｈ）ウイルス、狂犬病ウイルス、ラズダン（Ｒａｚｄａｎ）ウイルス、爬虫類ボルナウイルス１型、ライノウイルスＡ～Ｂ型、リフトバレー熱ウイルス、牛疫ウイルス、リオブラボーウイルス、げっ歯類トルクテノウイルス、げっ歯類ヘパシウイルス、ロスリバーウイルス、ロタウイルスＡ～Ｉ型、ロイヤルファーム（Ｒｏｙａｌ　Ｆａｒｍ）ウイルス、風疹ウイルス、サビアマンマレナウイルス、サーレム（Ｓａｌｅｍ）ウイルス、ナポリ型サシチョウバエ熱ウイルス、シシリア型サシチョウバエ熱ウイルス、サッポロウイルス、サシュペリウイルス、アザラシアネロウイルス、セムリキ森林ウイルス、センダイウイルス、ソウルウイルス、セピック（Ｓｅｐｉｋ）ウイルス、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス、重症熱性血小板減少症候群ウイルス、シャモンダウイルス、シモニ（Ｓｈｉｍｏｎｉ）コウモリウイルス、シュニ（Ｓｈｕｎｉ）ウイルス、シンブウイルス、サルトルクテノウイルス、シミアンウイルス４０－４１、シンノンブレウイルス、シンドビスウイルス、スモールアネロウイルス、ソスガウイルス、スペインヤギ脳炎ウイルス、スポンドウェニウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、サンシャインウイルス、ＴＴＶ様ミニウイルス、タカリベマンマレナウイルス、タイラ（Ｔａｉｌａ）ウイルス、タマナコウモリウイルス、タミアミマンマレナウイルス、テンブスウイルス、トゴトウイルス、ソタパラヤン（Ｔｈｏｔｔａｐａｌａｙａｍ）ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、チオマンウイルス、トガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、トルクテノイヌウイルス、トルクテノヨザルウイルス、トルクテノネコウイルス、トルクテノミディウイルス、トルクテノサスウイルス、トルクテノタマリンウイルス、トルクテノウイルス、トルクテノアシカウイルス、ツホコ（Ｔｕｈｏｋｏ）ウイルス、ツラ（Ｔｕｌａ）ウイルス、ツパイパラミクソウイルス、ウスツウイルス、ウークニエミウイルス、ワクシニアウイルス、痘瘡ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、水疱性口内炎インディアナウイルス、ＷＵポリオーマウイルス、ヴェッセルスブロンウイルス、西ユーカサスコウモリウイルス、ウエストナイルウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、ホワイトウォーター・アロヨマンマレナウイルス、黄熱病ウイルス、ヨコセウイルス、ユグ・ボグダノビッチ（Ｙｕｇ　Ｂｏｇｄａｎｏｖａｃ）ウイルス、ザイールエボラウイルス、ジカウイルス、又はザイゴサッカロミセス・バイリイ（Ｚｙｇｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｂａｉｌｉｉ）ウイルスＺウイルス配列であってもよい。検出され得るＲＮＡウイルスの例としては、コロナウイルス科（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、ピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、カリシウイルス科（Ｃａｌｉｃｉｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、フラビウイルス科（Ｆｌａｖｉｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、トガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）ウイルス、ボルナウイルス科（Ｂｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）、フィロウイルス科（Ｆｉｌｏｖｉｒｉｄａｅ）、パラミクソウイルス科（Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）、ニューモウイルス科（Ｐｎｅｕｍｏｖｉｒｉｄａｅ）、ラブドウイルス科（Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅ）、アレナウイルス科（Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ）、ブニヤウイルス科（Ｂｕｎｙａｖｉｒｉｄａｅ）、オルトミクソウイルス科（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）、又はデルタウイルス属（Ｄｅｌｔａｖｉｒｕｓ）のうちの１つ以上（又はその任意の組み合わせ）が挙げられる。特定の例示的実施形態では、ウイルスは、コロナウイルス、ＳＡＲＳ、ポリオウイルス、ライノウイルス、Ａ型肝炎、ノーウォークウイルス、黄熱病ウイルス、ウエストナイルウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルス、風疹ウイルス、ロスリバーウイルス、シンドビスウイルス、チクングニアウイルス、ボルナ病ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ニパウイルス、ヘンドラウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス、狂犬病ウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、クリミア－コンゴ出血熱ウイルス、インフルエンザ、又はＤ型肝炎ウイルスである。

【０３４８】
特定の例示的実施形態では、ウイルスは、タバコモザイクウイルス（ＴＭＶ）、トマト黄化えそウイルス（ＴＳＷＶ）、キュウリモザイクウィルス（ＣＭＶ）、ジャガイモウイルスＹ（ＰＶＹ）、ＲＴウイルスカリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）、プラムポックスウイルス（ＰＰＶ）、ブロムモザイクウイルス（ＢＭＶ）、ジャガイモウイルスＸ（ＰＶＸ）、カンキツトリステザウイルス（ＣＴＶ）、オオムギ黄化萎縮ウイルス（ＢＹＤＶ）、ジャガイモ葉巻ウイルス（ＰＬＲＶ）、トマトブッシースタントウイルス（ＴＢＳＶ）、イネツングロスフェリカルウイルス（ＲＴＳＶ）、イネ黄斑病ウイルス（ＲＹＭＶ）、イネオーハブランカウイルス（ＲＨＢＶ）、トウモロコシラヤドフィノウイルス（ＭＲＦＶ）、トウモロコシモザイク病ウイルス（ＭＤＭＶ）、サトウキビモザイクウイルス（ＳＣＭＶ）、サツマイモ斑紋モザイクウイルス（ＳＰＦＭＶ）、サツマイモサンクンベイン（ｓｕｎｋｅｎ　ｖｅｉｎ）クロステロウイルス（ＳＰＳＶＶ）、ブドウファンリーフウイルス（ＧＦＬＶ）、ブドウＡウイルス（ＧＶＡ）、ブドウＢウイルス（ＧＶＢ）、ブドウフレックウイルス（ＧＦｋＶ）、ブドウ葉巻随伴ウイルス－１型、－２型、及び－３型（ＧＬＲａＶ－１、－２、及び－３）、アラビスモザイクウイルス（ＡｒＭＶ）、又はブドウステムピッティング随伴ウイルス（ＲＳＰａＶ）を含む群から選択される植物ウイルスであってもよい。好ましい実施形態において、標的ＲＮＡ分子は前記病原体の一部であるか、又は前記病原体のＤＮＡ分子から転写される。例えば、標的配列は、ＲＮＡウイルスのゲノムに含まれてもよい。更に、前記病原体が前記植物に感染する又は感染している場合、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は前記植物中の前記病原体の前記標的ＲＮＡ分子とハイブリダイズすることが好ましい。従って、ＣＲＩＳＰＲシステムは、ＣＲＩＳＰＲシステム（又はその完了に必要な一部）が治療的に適用されたとき、即ち感染が起こった後、又は予防的に、即ち感染が起こる前の両方で植物病原体から標的ＲＮＡ分子を切断する能力を有することが好ましい。

【０３４９】
特定の例示的実施形態では、ウイルスはレトロウイルスであってもよい。本明細書に開示される実施形態を使用して検出し得る例示的なレトロウイルスとしては、アルファレトロウイルス属（Ａｌｐｈａｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）、ベータレトロウイルス属（Ｂｅｔａｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）、ガンマレトロウイルス属（Ｇａｍｍａｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）、デルタレトロウイルス属（Ｄｅｌｔａｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）、イプシロンレトロウイルス属（Ｅｐｓｉｌｏｎｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）、レンチウイルス属（Ｌｅｎｔｉｖｉｒｕｓ）、スプーマウイルス属（Ｓｐｕｍａｖｉｒｕｓ）、又はメタウイルス科（Ｍｅｔａｖｉｒｉｄａｅ）、シュウドウイルス科（Ｐｓｅｕｄｏｖｉｒｉｄａｅ）、及びレトロウイルス科（Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）（ＨＩＶを含む）、ヘパドナウイルス科（Ｈｅｐａｄｎａｖｉｒｉｄａｅ）（Ｂ型肝炎ウイルスを含む）、及びカリモウイルス科（Ｃａｕｌｉｍｏｖｉｒｉｄａｅ）（カリフラワーモザイクウイルスを含む）のウイルスのうちの１つ以上又は任意の組み合わせが挙げられる。

【０３５０】
特定の例示的実施形態では、ウイルスはＤＮＡウイルスである。本明細書に開示される実施形態を使用して検出し得る例示的なＤＮＡウイルスとしては、とりわけ、マイオウイルス科（Ｍｙｏｖｉｒｉｄａｅ）、ポドウイルス科（Ｐｏｄｏｖｉｒｉｄａｅ）、サイフォウイルス科（Ｓｉｐｈｏｖｉｒｉｄａｅ）、アロヘルペスウイルス科（Ａｌｌｏｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）、ヘルペスウイルス科（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）（ヒトヘルペスウイルス、及び水痘・帯状疱疹ウイルス（Ｖａｒｉｃｅｌｌａ　Ｚｏｚｔｅｒ　ｖｉｒｕｓ）を含む）、マラコヘルペスウイルス科（Ｍａｌｏｃｏｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）、リポスリクスウイルス科（Ｌｉｐｏｔｈｒｉｘｖｉｒｉｄａｅ）、ルディウイルス科（Ｒｕｄｉｖｉｒｉｄａｅ）、アデノウイルス科（Ａｄｅｎｏｖｉｒｉｄａｅ）、アンプラウイルス科（Ａｍｐｕｌｌａｖｉｒｉｄａｅ）、アスコウイルス科（Ａｓｃｏｖｉｒｉｄａｅ）、アスファウイルス科（Ａｓｆａｒｖｉｒｉｄａｅ）（アフリカブタコレラウイルスを含む）、バキュロウィルス科（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｉｄａｅ）、シカウダウイル

ス科（Ｃｉｃａｕｄａｖｉｒｉｄａｅ）、クラバウイルス科（Ｃｌａｖａｖｉｒｉｄａｅ）、コルチコウイルス科（Ｃｏｒｔｉｃｏｖｉｒｉｄａｅ）、フセロウイルス科（Ｆｕｓｅｌｌｏｖｉｒｉｄａｅ）、グロブロウイルス科（Ｇｌｏｂｕｌｏｖｉｒｉｄａｅ）、グッタウイルス科（Ｇｕｔｔａｖｉｒｉｄａｅ）、ヒトロサウイルス科（Ｈｙｔｒｏｓａｖｉｒｉｄａｅ）、イリドウイルス科（Ｉｒｉｄｏｖｉｒｉｄａｅ）、マルセイユウイルス科（Ｍａｓｅｉｌｌｅｖｉｒｉｄａｅ）、ミミウイルス科（Ｍｉｍｉｖｉｒｉｄａｅ）、ヌディウイルス科（Ｎｕｄｉｖｉｒｉｄａｅ）、ニマウイルス科（Ｎｉｍａｖｉｒｉｄａｅ）、パンドラウイルス科（Ｐａｎｄｏｒａｖｉｒｉｄａｅ）、パピローマウイルス科（Ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｉｄａｅ）、フィコドナウイルス科（Ｐｈｙｃｏｄｎａｖｉｒｉｄａｅ）、プラズマウイルス科（Ｐｌａｓｍａｖｉｒｉｄａｅ）、ポリドナウイルス、ポリオーマウイルス科（Ｐｏｌｙｏｍａｖｉｒｉｄａｅ）（シミアンウイルス４０、ＪＣウイルス、ＢＫウイルスを含む）、ポックスウイルス科（Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅ）（牛痘及び天然痘を含む）、スファエロリポウイルス科（Ｓｐｈａｅｒｏｌｉｐｏｖｉｒｉｄａｅ）、テクティウイルス科（Ｔｅｃｔｉｖｉｒｉｄａｅ）、トゥリウイルス科（Ｔｕｒｒｉｖｉｒｉｄａｅ）、ディノドナウイルス（Ｄｉｎｏｄｎａｖｉｒｕｓ）、サルタープロウイルス（Ｓａｌｔｅｒｐｒｏｖｉｒｕｓ）、リジドウイルス（Ｒｈｉｚｉｄｏｖｉｒｕｓ）からのウイルスのうちの１つ以上（又は任意の組み合わせ）が挙げられる。一部の実施形態では、細菌感染を有する疑いがある対象の種特異的細菌感染を診断する方法が、対象から細菌リボソームリボ核酸を含む試料を入手すること；記載されるプローブのうちの１つ以上と試料を接触させること、及び試料中に存在する細菌リボソームリボ核酸配列とプローブとの間のハイブリダイゼーションを検出することとして記載され、ここではハイブリダイゼーションの検出が、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）、アシネトバクター・バウマンニ（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｕｍａｎｎｉｉ）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）、エンテロバクター・クロアカ（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｃｌｏａｃａｅ）、フェカリス菌（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓ）、フェシウム菌（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃｉｕｍ）、プロテウス・ミラビリス（Ｐｒｏｔｅｕｓ ｍｉｒａｂｉｌｉｓ）、スタフィロコッカス・アガラクティアエ（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、又はスタフィロコッカス・マルトフィリア（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｍａｌｔｏｐｈｉｌｉａ）又はこれらの組み合わせへの対象の感染を示す。

【０３５１】

マラリア検出及びモニタリング

マラリアは、プラスモジウム属（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）の寄生虫によって引き起こされる蚊媒介性病変である。寄生虫は、感染雌ハマダラカ属（Ａｎｏｐｈｅｌｅｓ）蚊の刺咬を通じて人に広がる。５つのプラスモジウム属（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）種：熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、及びサルマラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｋｎｏｗｌｅｓｉ）がヒトにマラリアを引き起こす。これらの中でも、世界保健機関（Ｗｏｒｌｄ Ｈｅａｌｔｈ Ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ：ＷＨＯ）によれば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）及び三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）が、最大の脅威の原因である。熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）はアフリカ大陸で最も多く見られるマラリア寄生虫であり、世界の多くのマラリア関連死の原因である。三日熱マラリア原虫（Ｐ．ｖｉｖａｘ）は、サハラ以南アフリカ以外の多くの国で優勢なマラリア寄生虫である。

【０３５２】

２０１５年、９１の国及び地域が進行中のマラリア伝播を有した。ＷＨＯの最新の推計

によれば、２０１５年のマラリア症例は２億１２００万件であり、４２万９千人が死亡した。マラリア伝播率の高い地域では、５歳未満の小児に特に感染、疾患及び死亡が起こり易い；全マラリア死亡例の３分の２（７０％）超がこの年齢層に起こる。全世界では、２０１０～２０１５年の間に５歳未満のマラリア死亡率は２９％低下した。しかしながらマラリアは依然として５歳未満の小児の重大な死因であり、２分に１人の小児の命を奪っている。

【０３５３】

ＷＨＯにより記載されるとおり、マラリアは急性発熱性疾患である。非免疫個体では、症状は感染症の蚊の刺咬後７日以降に現れる。初発症状－発熱、頭痛、悪寒及び嘔吐－は軽度で、マラリアと認識するのは困難であり得るが、しかしながら２４時間以内に治療しなければ、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）マラリアは進行して重症疾患となり、多くの場合に死亡につながり得る。

【０３５４】

重症マラリアの小児は、高頻度で以下の症状：重症貧血、代謝性アシドーシスに関連する呼吸窮迫、又は脳性マラリアのうちの１つ以上を発症する。成人では、多臓器病変もまた高頻度である。マラリア流行地域では、人に部分免疫が発生し得るため、無症候性感染が起こる可能性がある。

【０３５５】

迅速且つ効率的な診断検査の開発には、公衆衛生上大きい意味がある。実際、マラリアの早期診断及び治療は疾患を低減して死亡を予防するのみならず、マラリア伝播の低減にもまた寄与する。ＷＨＯの勧告によれば、疑わしいマラリア症例は全てが、治療の投与前に寄生虫ベースの診断検査を用いて（特に迅速診断法検査を用いて）確定されるべきである（「ＷＨＯマラリア治療ガイドライン（ＷＨＯ Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｍａｌａｒｉａ）」，ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｉｎ Ａｐｒｉｌ ２０１５を参照）。

【０３５６】

抗マラリア治療薬に対する耐性は、治療ストラテジーを極端に減じる重大な健康問題に相当する。実際、ＷＨＯウェブサイトに報告されているとおり、１９５０年代及び１９６０年代にクロロキン及びスルファドキシン／ピリメタミン（ＳＰ）などの旧世代の医薬に対する熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）の耐性が広まったため、マラリア防除努力が弱体化し、小児の生存増加が逆転した。従って、ＷＨＯは抗マラリア薬剤耐性の日常的モニタリングを提言している。実際、正確な診断により不適切な治療が回避され、抗マラリア医薬に対する耐性の拡大が制限され得る。

【０３５７】

これに関連して、ＷＨＯの世界マラリア技術戦略（Ｇｌｏｂａｌ Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ Ｓｔｒａｔｅｇｙ ｆｏｒ Ｍａｌａｒｉａ）２０１６～２０３０年－２０１５年５月に世界保健総会（Ｗｏｒｌｄ Ｈｅａｌｔｈ Ａｓｓｅｍｂｌｙ）によって採択された－は全てのマラリア流行国に向けた技術的フレームワークを提供している。これは、マラリア防除及び撲滅に向けて取り組む際の指針を示し、地域及び国家プログラムを支援することを意図するものである。この戦略は、以下を含む意欲的だが達成可能な世界的目標を定めている：

・２０３０年までにマラリア症例発生率を少なくとも９０％削減する。
・２０３０年までにマラリア死亡率を少なくとも９０％削減する。
・２０３０年までに少なくとも３５の国でマラリアを撲滅する。
・マラリアがない全ての国でマラリアの再流行を予防する。

【０３５８】

この戦略は、２年に及ぶ、且つ７０の加盟国からの４００人を超える技術専門家の参加を伴った広範な協議プロセスの結果であった。これは３つの主要な軸に基づく：

・マラリア予防、診断及び治療を誰もが利用できることを確実にする；
・撲滅及びマラリアのない状態の達成に向けた努力を加速させる；及び

・マラリア監視を中核となる介入に変える。

【０３５９】

プラスモジウム属（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）に対する治療には、キニーネ又はキニーネ誘導体、例えば、クロロキン、アモジアキン、メフロキン、ピペラキン、ルメファントリン、プリマキンなどのアリール－アミノアルコール類；アトバコンなどの親油性ヒドロキシナフトキノン類似体；サルファ剤スルファドキシン、ダプソーン及びピリメタミンなどの抗葉酸薬；プログアニル；アトバコン／プログアニルの併用；アルテミシニン薬（ａｔｅｍｉｓｉｎｓ　ｄｒｕｇｓ）；及びこれらの組み合わせが含まれる。

【０３６０】

蚊媒介性病原体の存在に関して診断される標的配列には、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｖａｘ）、卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）、及びサルマラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｋｎｏｗｌｅｓｉ）など、そのゲノムからの配列を含め、ヒトを冒すプラスモジウム属（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）、特にマラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉａ）種の存在に関して診断される配列が含まれる。

【０３６１】

熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｖａｘ）、卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）、及びサルマラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｋｎｏｗｌｅｓｉ）など、ヒトを冒すプラスモジウム属（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）、特にマラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉａ）種に対する治療に対する薬剤耐性をモニタするための診断的な標的配列。

【０３６２】

更なる標的配列には、プラスモジウム属（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）の寄生虫にとって必須の生物学的過程に関与するタンパク質、及び特に輸送タンパク質、例えば、薬物／代謝産物トランスポーターファミリーからのタンパク質、基質移行に関与するＡＴＰ結合カセット（ＡＢＣ）タンパク質、例えば、ＡＢＣトランスポーターＣサブファミリー又はＮａ$^{+}$／Ｈ$^{+}$エクスチェンジャー、膜グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ；葉酸経路に関与するタンパク質、例えば、ジヒドロプテロイン酸合成酵素、ジヒドロ葉酸レダクターゼ活性又はジヒドロ葉酸レダクターゼ－チミジル酸シンターゼ；及びミトコンドリア内膜及び特にシトクロムｂ複合体を越えるプロトンの移行に関与するタンパク質をコードする標的分子／核酸分子を含む配列が含まれる。更なる標的は、ヘムポリメラーゼをコードする１つ又は複数の遺伝子もまた含み得る。

【０３６３】

更なる標的配列には、必須の生物学的過程に関与するタンパク質をコードする標的分子／核酸分子が含まれ、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）クロロキン耐性トランスポーター遺伝子（ｐｆｃｒｔ）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）多剤耐性トランスポーター１（ｐｆｍｄｒ１）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）多剤耐性関連タンパク質遺伝子（Ｐｆｍｒｐ）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）Ｎａ＋／Ｈ＋エクスチェンジャー遺伝子（ｐｆｎｈｅ）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）輸送後タンパク質１をコードする遺伝子、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）Ｃａ２＋輸送ＡＴＰアーゼ６（ｐｆａｔｐ６）；熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）ジヒドロプテロイン酸合成酵素（ｐｆｄｈｐｓ）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ活性（ｐｆｄｈｐｒ）及びジヒドロ葉酸レダクターゼ－チミジル酸シンターゼ（ｐｆｄｈｆｒ）遺伝子、シトクロムｂ遺伝子、ＧＴＰシクロヒドロラーゼ及びＫｅｌｃｈ１３（Ｋ１３）遺伝子並びに他のプラスモジウム属（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）種におけるこれらの機能性異種遺伝子から選択され得る。

【０３６４】

現行の治療の標的である、且つ特異的耐性表現型に関連する幾つもの突然変異、特に単

一点突然変異が、タンパク質において同定されている。従って、本発明は、プラスモジウム属（ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）などの蚊媒介性寄生虫の様々な耐性表現型の検出が可能である。

【０３６５】

本発明は、標的核酸／分子における１つ以上の突然変異及び特に１つ以上の一塩基変異多型の検出が可能である。従って以下の突然変異のいずれか１つ、又はそのそれらの組み合わせを薬剤耐性マーカーとして使用することができ、本発明により検出することができる。

【０３６６】

熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）Ｋ１３における単一点突然変異には、位置２５２、４４１、４４６、４４９、４５８、４９３、５３９、５４３、５５３、５６１、５６８、５７４、５７８、５８０、６７５、４７６、４６９、４８１、５２２、５３７、５３８、５７９、５８４及び７１９における以下の単一点突然変異及び特に突然変異Ｅ２５２Ｑ、Ｐ４４１Ｌ、Ｆ４４６Ｉ、Ｇ４４９Ａ、Ｎ４５８Ｙ、Ｙ４９３Ｈ、Ｒ５３９Ｔ、Ｉ５４３Ｔ、Ｐ５５３Ｌ、Ｒ５６１Ｈ、Ｖ５６８Ｇ、Ｐ５７４Ｌ、Ａ５７８Ｓ、Ｃ５８０Ｙ、Ａ６７５Ｖ、Ｍ４７６Ｉ；Ｃ４６９Ｙ；Ａ４８１Ｖ；Ｓ５２２Ｃ；Ｎ５３７Ｉ；Ｎ５３７Ｄ；Ｇ５３８Ｖ；Ｍ５７９Ｉ；Ｄ５８４Ｖ；及びＨ７１９Ｎが含まれる。これらの突然変異は、概してアルテミシニン薬（ａｒｔｅｍｉｓｉｎｓ　ｄｒｕｇｓ）耐性表現型に関連する（アルテミシニン及びアルテミシニンベースの併用療法耐性（Ａｒｔｅｍｉｓｉｎｉｎ　ａｎｄ　ａｒｔｅｍｉｓｉｎｉｎ－ｂａｓｅｄ　ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ　ｔｈｅｒａｐｙ　ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ）、２０１６年４月ＷＨＯ／ＨＴＭ／ＧＭＰ／２０１６．５）。

【０３６７】

熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）（ＰｆＤＨＦＲ－ＴＳ、ＰＦＤ０８３０ｗ）では、重要な多型として、位置１０８、５１、５９及び１６４における突然変異、特に、ピリメタミン耐性を調節する１０８Ｄ、１６４Ｌ、５１Ｉ及び５９Ｒが挙げられる。他の多型としては、スルファドキシン耐性に関連する４３７Ｇ、５８１Ｇ、５４０Ｅ、４３６Ａ及び６１３Ｓもまた挙げられる。更なる観察される突然変異としては、Ｓｅｒ１０８Ａｓｎ、Ａｓｎ５１Ｉｌｅ、Ｃｙｓ５９Ａｒｇ、Ｉｌｅ１６４Ｌｅｕ、Ｃｙｓ５０Ａｒｇ、Ｉｌｅ１６４Ｌｅｕ、Ａｓｎ１８８Ｌｙｓ、Ｓｅｒ１８９Ａｒｇ及びＶａｌ２１３Ａｌａ、Ｓｅｒ１０８Ｔｈｒ及びＡｌａ１６Ｖａｌが挙げられる。突然変異Ｓｅｒ１０８Ａｓｎ、Ａｓｎ５１Ｉｌｅ、Ｃｙｓ５９Ａｒｇ、Ｉｌｅ１６４Ｌｅｕ、Ｃｙｓ５０Ａｒｇ、Ｉｌｅ１６４Ｌｅｕは、特にピリメタミンベースの療法及び／又はクロログアニン－ダプソーン併用療法に対する耐性に関連する。シクログアニル耐性は、二重突然変異Ｓｅｒ１０８Ｔｈｒ及びＡｌａ１６Ｖａｌに関連するように見える。ｄｈｆｒの増幅もまた、治療耐性、特にピリメタミン耐性と高い関連性があり得る。

【０３６８】

熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）ジヒドロプテロイン酸合成酵素（ＤＨＰＳ）（ＰｆＤＨＰＳ、ＰＦ０８＿００９５）では、重要な多型として、位置４３６、４３７、５８１及び６１３における突然変異Ｓｅｒ４３６Ａｌａ／Ｐｈｅ、Ａｌａ４３７Ｇｌｙ、Ｌｙｓ５４０Ｇｌｕ、Ａｌａ５８１Ｇｌｙ及びＡｌａ６１３Ｔｈｒ／Ｓｅｒが挙げられる。位置５８１及び／又は６１３における多型はまた、スルファドキシン－ピリメタミン塩基療法に対する耐性とも関連付けられている。

【０３６９】

熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）クロロキン耐性トランスポーター（ＰｆＣＲＴ）では、位置７６における多型、特に突然変異Ｌｙｓ７６Ｔｈｒが、クロロキンに対する耐性に関連する。更なる多型としては、Ｃｙｓ７２Ｓｅｒ、Ｍｅｔ７４Ｉｌｅ、Ａｓｎ７５Ｇｌｕ、Ａｌａ２２０Ｓｅｒ、Ｇｌｎ２７１Ｇｌｕ、Ａｓｎ３２６Ｓｅｒ、Ｉｌｅ３５６Ｔｈｒ及びＡｒｇ３７１Ｉｌｅが挙げられ、これらはクロロキン耐性に関連

し得る。ＰｆＣＲＴはまた、残基Ｓ３３、Ｓ４１１及びＴ４１６でリン酸化もされ、これはタンパク質の輸送活性又は特異性を調節し得る。

【０３７０】

熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）多剤耐性トランスポーター１（ＰｆＭＤＲ１）（ＰＦＥ１１５０ｗ）では、位置８６、１８４、１０３４、１０４２における多型、特に、Ａｓｎ８６Ｔｙｒ、Ｔｙｒ１８４－Ｐｈｅ、Ｓｅｒ１０３４Ｃｙｓ、Ａｓｎ１０４２Ａｓｐ及びＡｓｐ１２４６Ｔｙｒが、ルメファントリン、アルテミシニン、キニーネ、メフロキン、ハロファントリン及びクロロキンに対する感受性に影響を与えることが同定及び報告されており、それに影響を与えることが報告されている。加えて、ＰｆＭＤＲ１の増幅は、ルメファントリン、アルテミシニン、キニーネ、メフロキン、及びハロファントリンに対する感受性の低下に関連し、ＰｆＭＤＲ１の脱増幅はクロロキン耐性の増加につながる。ｐｆｍｄｒ１の増幅もまた検出され得る。ＰｆＭＤＲ１のリン酸化状態もまた高度に関連性がある。

【０３７１】

熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）多剤耐性関連タンパク質（ＰｆＭＲＰ）（遺伝子リファレンスＰＦＡ０５９０ｗ）では、Ｙ１９１Ｈ及びＡ４３７Ｓなど、位置１９１及び／又は４３７における多型が同定され、クロロキン耐性表現型と関連付けられている。

【０３７２】

熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）ＮＡ＋／Ｈ＋エクスチェンジャー（ｅｎｃｈａｎｇｅｒ）（ＰｆＮＨＥ）（リファレンスＰＦ１３＿００１９）では、マイクロサテライトｍｓ４６７０におけるＤＮＮＤの反復の増加がキニーネ耐性のマーカーとなり得る。

【０３７３】

シトクロムｂｅ遺伝子（ｃｙｔｂ、ｍａｌ＿ｍｉｔｏ＿３）によってコードされるシトクロムｂタンパク質のユビキノール結合部位を変化させる突然変異はアトバコン耐性に関連する。位置２６、２６８、２７６、１３３及び２８０における突然変異及び特にＴｙｒ２６Ａｓｎ、Ｔｙｒ２６８Ｓｅｒ、Ｍ１３３１及びＧ２８０Ｄが、アトバコン耐性に関連し得る。

【０３７４】

例えば三日熱マラリア原虫（Ｐ　Ｖｉｖａｘ）では、ＰｖＭＤＲ１における突然変異、Ｐｆ　ＭＤＲ１のホモログ、特に突然変異Ｙ９７６Ｆなどの位置９７６における多型が、クロロキン耐性と関連付けられている。

【０３７５】

上記の突然変異はタンパク質配列に関して定義される。しかしながら、当業者は、ＳＮＰを含めた対応する突然変異を、核酸標的配列として同定されるように決定することができる。

【０３７６】

他の同定される薬物耐性マーカーは当該技術分野において公知であり、例えば「熱帯熱マラリア原虫の抗マラリア薬に対する感受性（１９９６～２００４年）（Ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ　ｏｆ　Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ　ｔｏ　ａｎｔｉｍａｌａｒｉａｌ　ｄｒｕｇｓ（１９９６－２００４））」；ＷＨＯ；アルテミシニン及びアルテミシニンベースの併用療法耐性（Ａｒｔｅｍｉｓｉｎｉｎ　ａｎｄ　ａｒｔｅｍｉｓｉｎｉｎ－ｂａｓｅｄ　ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ　ｔｈｅｒａｐｙ　ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ）（２０１６年４月ＷＨＯ／ＨＴＭ／ＧＭＰ／２０１６．５）；「薬物耐性マラリア：分子機構及び公衆衛生に対する影響（Ｄｒｕｇ－ｒｅｓｉｓｔａｎｔ　ｍａｌａｒｉａ：ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ　ａｎｄ　ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｆｏｒ　ｐｕｂｌｉｃ　ｈｅａｌｔｈ）」ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．２０１１　Ｊｕｎ　６；５８５（１１）：１５５１－６２．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｆｅｂｓｌｅｔ．２０１１．０４．０４２．Ｅｐｕｂ　２０１１　Ａｐｒ　２３．Ｒｅｖｉｅｗ．ＰｕｂＭｅｄ　ＰＭＩＤ：

２１５３０５１０（これらの内容は本明細書によって参照により援用される）に記載されるとおりである。

【０３７７】

本発明において検出され得るポリペプチドに関して、本明細書において言及される全ての遺伝子の遺伝子産物を標的として使用し得る。対応して、かかるポリペプチドを種の同定、タイピング及び／又は薬剤耐性の検出に使用し得ることが企図される。

【０３７８】

特定の例示的実施形態では、本明細書に開示されるシステム、装置、及び方法は、対象から入手された生体試料などの試料中の１つ以上の蚊媒介性寄生虫の存在を検出することに関する。特定の例示的実施形態では、寄生虫は、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）又はサルマラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｋｎｏｗｌｅｓｉ）の種から選択され得る。従って、本明細書に開示される方法は、寄生虫種の迅速同定、寄生虫の存在及び寄生虫型のモニタリング（例えば、赤血球外サイクル、赤血球サイクル、胞子形成サイクルなど、感染及び寄生虫ライフサイクルの様々な段階に対応する；寄生虫型は、メロゾイト、スポロゾイト、シゾント、ガメトサイトを含む）；特定の表現型の検出（例えば病原体薬剤耐性）、疾患の進行及び／又はアウトブレイクのモニタリング、及び治療（薬物）スクリーニングが必要な他の方法における（又は他の方法との組み合わせでの）使用に適合させることができる。更に、マラリアの場合、感染性刺咬後に長時間が経過することもあり、即ち潜伏期間が長く、その間、患者は症状を示さない。同様に、予防的治療が症状の出現を遅らせることもあり、再発までに長い無症候期間も認められ得る。かかる遅れは誤診又は診断の遅れを容易に引き起こし得るため、従って治療の有効性が損なわれ得る。

【０３７９】

ここに開示される実施形態の迅速で高感度の診断能力、単一ヌクレオチドの差異に至るまでの寄生虫タイプの検出、及びＰＯＣ装置としての展開が可能であることに起因して、本明細書に開示される実施形態は、適切な治療コースの選択など、ガイド治療レジメンに使用し得る。本明細書に開示される実施形態はまた、寄生虫の存在及びタイピングに関する環境試料（蚊の集団等）のスクリーニングにも使用し得る。実施形態はまた、蚊媒介性寄生虫及び他の蚊媒介性病原体を同時に検出するように改変されてもよい。一部の例では、マラリア及び他の蚊媒介性病原体は当初は同様の症状を呈し得る。従って、感染のタイプを迅速に区別することが可能であれば、重要な治療判断の指針となり得る。マラリアと併せて検出され得る他の蚊媒介性病原体には、デング、ウエストナイルウイルス、チクングニア、黄熱、フィラリア症、日本脳炎、セントルイス脳炎、西部ウマ脳炎、東部ウマ脳炎、ベネズエラウマ脳炎、ラクロス脳炎、及びジカが含まれる。

【０３８０】

特定の例示的実施形態では、本明細書に開示される装置、システム、及び方法を使用して、試料中の複数の蚊媒介性寄生虫種が区別されてもよい。特定の例示的実施形態では、同定は、１８Ｓ、１６Ｓ、２３Ｓ、及び５Ｓサブユニットを含め、リボソームＲＮＡ配列に基づき得る。特定の例示的実施形態では、同定は、ＣＹＴＢのようなミトコンドリア遺伝子など、ゲノム中に複数のコピーで存在する遺伝子の配列に基づき得る。特定の例示的実施形態では、同定は、ＧＡＰＤＨ、ヒストンＨ２Ｂ、エノラーゼ、又はＬＤＨなど、高発現の及び／又は高度に保存された遺伝子の配列に基づき得る。関連性のあるｒＲＮＡ配列の同定方法が米国特許出願公開第２０１７／００２９８７２号明細書に開示されている。特定の例示的実施形態では、ガイドＲＮＡのセットが各種又は株にユニークな可変領域によって各種を区別するように設計されてもよい。ガイドＲＮＡはまた、微生物を属、科、目、綱、門、界レベル、又はこれらの組み合わせで区別するＲＮＡ遺伝子を標的とするように設計されてもよい。増幅が用いられる特定の例示的実施形態では、増幅プライマーのセットが、リボソームＲＮＡ配列の定常領域と、可変内部領域によって各種を区別する

ように設計されたガイドＲＮＡとに隣接するように設計されてもよい。特定の例示的実施形態では、プライマー及びガイドＲＮＡは、１６Ｓサブユニットのそれぞれ保存された領域及び可変領域に対して設計されてもよい。種間で、又はＲｅｃＡ遺伝子ファミリー、ＲＮＡポリメラーゼβサブユニットなどの種のサブセット間でユニークに可変的な他の遺伝子又はゲノム領域も同様に使用し得る。他の好適な系統発生マーカー、及びその同定方法については、例えばＷｕ　ｅｔ　ａｌ．ａｒＸｉｖ：１３０７．８６９０［ｑ－ｂｉｏ．ＧＮ］において考察されている。

【０３８１】

特定の例示的実施形態では、種の同定は、ＣＹＴＢのようなミトコンドリア遺伝子など、ゲノム中に複数のコピーで存在する遺伝子に基づき実施することができる。特定の例示的実施形態では、種の同定は、ＧＡＰＤＨ、ヒストンＨ２Ｂ、エノラーゼ、又はＬＤＨなど、高発現の及び／又は高度に保存された遺伝子に基づき実施することができる。

【０３８２】

特定の例示的実施形態では、方法又は診断法は、蚊媒介性寄生虫を複数の系統発生レベル及び／又は表現型レベルにわたって同時にスクリーニングするように設計される。例えば、本方法又は診断法は、異なるガイドＲＮＡを有する複数のＣＲＩＳＰＲシステムの使用を含み得る。第１のガイドＲＮＡセットが、例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）又は三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｖａｘ）の間を区別し得る。これらの一般的クラスは更に細分されることもある。例えば、ガイドＲＮＡは、一般に、又は特定の薬物又は薬物の組み合わせに関して薬物耐性株を区別する方法又は診断法において設計及び使用される可能性がある。第２のガイドＲＮＡセットは、微生物を種レベルで区別するように設計されることができる。従って、薬剤耐性に従い更に分けられる、全ての蚊媒介性寄生虫の種又は亜種を同定する行列が作成されてもよい。上記は例示目的に過ぎない。他の蚊媒介性寄生虫タイプを分類する他の手段もまた企図され、それは上記に記載される一般構造に従うものであり得る。

【０３８３】

特定の例示的実施形態では、本明細書に開示される装置、システム及び方法を使用して、目的の蚊媒介性寄生虫遺伝子、例えば薬剤耐性遺伝子がスクリーニングされ得る。ガイドＲＮＡが、公知の目的遺伝子間を区別するように設計され得る。次に、１つ以上のかかる遺伝子の検出のため、本明細書に開示される実施形態を用いて臨床試料を含めた試料がスクリーニングされ得る。ＰＯＣで薬剤耐性をスクリーニング可能であれば、適切な治療レジームの選択において多大な利益となり得る。特定の例示的実施形態では、薬剤耐性遺伝子は、輸送タンパク質、例えば薬物／代謝産物トランスポーターファミリーからのタンパク質、基質移行に関与するＡＴＰ結合カセット（ＡＢＣ）タンパク質、例えばＡＢＣトランスポーターＣサブファミリー又は$Na^+$／$H^+$エクスチェンジャー；葉酸経路に関与するタンパク質、例えばジヒドロプテロイン酸合成酵素、ジヒドロ葉酸レダクターゼ活性又はジヒドロ葉酸レダクターゼ－チミジル酸シンターゼ；及びミトコンドリア内膜及び特にシトクロムｂ複合体を越えるプロトンの移行に関与するタンパク質などのタンパク質をコードする遺伝子である。更なる標的としてはまた、ヘムポリメラーゼをコードする１つ又は複数の遺伝子も挙げることができる。特定の例示的実施形態では、薬剤耐性遺伝子は、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）クロロキン耐性トランスポーター遺伝子（ｐｆｃｒｔ）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）多剤耐性トランスポーター１（ｐｆｍｄｒ１）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）多剤耐性関連タンパク質遺伝子（Ｐｆｍｒｐ）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）Ｎａ＋／Ｈ＋エクスチェンジャー遺伝子（ｐｆｎｈｅ）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）Ｃａ２＋輸送ＡＴＰａｓｅ　６（ｐｆａｔｐ６）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）ジヒドロプテロイン酸合成酵素（ｐｆｄｈｐｓ）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ活性（ｐｆｄｈｐｒ）及びジヒドロ葉酸レダクターゼ－チミジル酸シンターゼ（ｐｆｄｈｆｒ）遺伝子、シトクロムｂ遺伝子、ＧＴＰシクロヒドロラーゼ及びＫｅｌｃｈ１３（Ｋ１３）遺伝子並びに他のプラスモジウム属（Ｐｌａｓｍｏｄ

ｉｕｍ）種におけるこれらの機能性異種遺伝子から選択される。他の同定される薬物耐性マーカーは当該技術分野において公知であり、例えば「熱帯熱マラリア原虫の抗マラリア薬に対する感受性（１９９６～２００４年）（Ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ ｏｆ Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ ｔｏ ａｎｔｉｍａｌａｒｉａｌ ｄｒｕｇｓ（１９９６－２００４））」；ＷＨＯ；アルテミシニン及びアルテミシニンベースの併用療法耐性（Ａｒｔｅｍｉｓｉｎｉｎ ａｎｄ ａｒｔｅｍｉｓｉｎｉｎ－ｂａｓｅｄ ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ ｔｈｅｒａｐｙ ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ）（２０１６年４月ＷＨＯ／ＨＴＭ／ＧＭＰ／２０１６．５）；「薬物耐性マラリア：分子機構及び公衆衛生に対する影響（Ｄｒｕｇ－ｒｅｓｉｓｔａｎｔ ｍａｌａｒｉａ：ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｐｕｂｌｉｃ ｈｅａｌｔｈ）」ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．２０１１ Ｊｕｎ ６；５８５（１１）：１５５１－６２．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｆｅｂｓｌｅｔ．２０１１．０４．０４２．Ｅｐｕｂ ２０１１ Ａｐｒ ２３．Ｒｅｖｉｅｗ．ＰｕｂＭｅｄ ＰＭＩＤ：２１５３０５１０（これらの内容は本明細書によって参照により援用される）に記載されるとおりである。

【０３８４】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるとおりのＣＲＩＳＰＲシステム、検出システム又はその使用方法を使用して、蚊媒介性寄生虫アウトブレイクの進化が決定されてもよい。本方法は、１人以上の対象からの複数の試料から１つ以上の標的配列を検出することを含んでもよく、ここで標的配列は、アウトブレイクを広める又は引き起こす蚊媒介性寄生虫からの配列である。かかる方法は、蚊媒介性寄生虫伝播パターン、又は蚊媒介性寄生虫によって引き起こされる疾患アウトブレイクに関与する機構を決定することを更に含み得る。試料は１人以上のヒトに由来してもよく、及び／又は１匹以上の蚊に由来してもよい。

【０３８５】

病原体伝播パターンは、天然の蚊媒介性寄生虫リザーバからの継続的な新規伝播、又は天然のリザーバから一度伝播した後の他の伝播（例えば蚊間での）、又は両方の混合を含み得る。一実施形態において、標的配列は、好ましくは蚊媒介性寄生虫ゲノム内の配列又はその断片である。一実施形態において、蚊媒介性寄生虫伝播パターンは初期蚊媒介性寄生虫伝播パターンであり、即ち蚊媒介性寄生虫アウトブレイクが始まったときものである。アウトブレイクが始まったときに蚊媒介性寄生虫伝播パターンを決定すれば、可能な限り早い時期にアウトブレイクを阻止できる可能性が増加し、それにより局地的及び国際的に蔓延する可能性が低くなる。

【０３８６】

蚊媒介性寄生虫伝播パターンの決定は、本明細書に記載される方法により蚊媒介性寄生虫配列を検出することを含み得る。病原体伝播パターンの決定は、対象間で共有される蚊媒介性寄生虫配列の宿主内変異を検出すること、及び共有される宿主内変異が時間的パターンを示すかどうかを決定することを更に含み得る。観察される宿主内及び宿主間変異のパターンは、伝播及び疫学に関する重要な洞察を提供する（Ｇｉｒｅ，ｅｔ ａｌ．，２０１４）。

【０３８７】

本明細書に開示される他の試料タイプに加えて、試料は、１匹以上の蚊に由来してもよく、例えば試料は蚊の唾液を含んでもよい。

【０３８８】

バイオマーカー検出

特定の例示的実施形態では、本明細書に開示されるシステム、装置、及び方法は、バイオマーカー検出に用いられ得る。例えば、本明細書に開示されるシステム、装置及び方法は、ＳＮＰ検出及び／又は遺伝子タイピングに用いられ得る。本明細書に開示されるシステム、装置及び方法はまた、異常な遺伝子発現によって特徴付けられる任意の疾患状態又は障害の検出にも用いられ得る。異常な遺伝子発現は、発現する遺伝子、発現場所及び発現レベルの異常を含む。数ある疾患の中でも特に、心血管障害、免疫障害、及び癌に関連

する複数の転写物又はタンパク質マーカーが検出されてもよい。特定の例示的実施形態では、本明細書に開示される実施形態は、肝線維症及び拘束性／閉塞性肺疾患など、溶解を含む疾患の無細胞ＤＮＡ検出に用いられ得る。特定の例示的実施形態では、実施形態は、無細胞ＤＮＡの出生前検査により高速の且つより携帯性のある検出を利用できる可能性がある。本明細書に開示される実施形態は、とりわけ、心血管の健康、脂質／代謝シグネチャ、民族性の同定、父子関係照合、ヒトＩＤ（例えば容疑者とＳＮＰシグネチャの犯罪者データベースとの照合）に関連する種々のＳＮＰのスクリーニングパネルに用いられ得る。本明細書に開示される実施形態はまた、癌腫瘍に関連する且つそれから放出される突然変異の無細胞ＤＮＡ検出に用いられてもよい。本明細書に開示される実施形態はまた、例えば所与の肉製品における種々の動物供給源の迅速検出を提供することにより、肉品質の検出に用いられてもよい。本明細書に開示される実施形態はまた、ＤＮＡに関するＧＭＯ又は遺伝子編集の検出にも使用され得る。本明細書において他の部分に記載されるとおり、近縁の遺伝子型／アレル又はバイオマーカー（例えば所与の標的配列において単一ヌクレオチドの差異のみを有する）は、ｇＲＮＡに合成ミスマッチを導入することにより区別し得る。

【０３８９】

ある態様において、本発明は、試料中の標的核酸の検出方法に関し、この方法は、

ａ．試料又は試料セットを１つ以上の個別独立分離容積に分配することであって、個別独立分離容積が本明細書に記載されるとおりの本発明に係るＣＲＩＳＰＲシステムを含むこと；

ｂ．１つ以上のガイドＲＮＡを１つ以上の標的分子に結合させるのに十分な条件下で試料又は試料セットをインキュベートすること；

ｃ．１つ以上のガイドＲＮＡによる１つ以上の標的分子への結合によってＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質を活性化させることであって、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質が活性化すると、ＲＮＡベースのマスキング構築物が改変されて検出可能な正のシグナルが生成されること；及び

ｄ．検出可能な正のシグナルを検出することであって、検出可能な正のシグナルの検出が、試料中における１つ以上の標的分子の存在を指し示すこと

を含む。

【０３９０】

バイオマーカー試料タイプ

本明細書に記載されるアッセイの感度は、標的核酸がそこに希釈されるか又は試料材料がそれに関して制限される試料タイプを含め、多種多様な生体試料タイプの標的核酸の検出に十分に適している。バイオマーカースクリーニングは、限定はされないが、唾液、尿、血液、糞便、喀痰、及び脳脊髄液を含めた幾つもの試料タイプに対して行われ得る。本明細書に開示される実施形態はまた、遺伝子の上方調節及び／又は下方調節の検出に使用されてもよい。例えば、過剰発現する遺伝子のみがアッセイの検出限界閾値を上回ったまま留まるように、ある試料が段階希釈されてもよい。

【０３９１】

特定の実施形態において、本発明は、生体液（例えば、尿、血漿又は血清、喀痰、脳脊髄液）の試料を入手するステップ、及びＤＮＡを抽出するステップを提供する。検出しようとする突然変異体ヌクレオチド配列は、より大きい分子の画分であってもよく、又は当初個別の分子として存在することができる。

【０３９２】

特定の実施形態において、ＤＮＡは癌患者の血漿／血清から単離される。比較のため、非新生物組織及び第２の試料から単離されるＤＮＡ試料を同じ患者の非新生物組織（対照）、例えばリンパ球から単離してもよい。非新生物組織は新生物組織と同じタイプであってもよく、又は異なる器官供給源からであってもよい。特定の実施形態において、血液試料は採取され、直ちに遠心によって血漿が血球細胞と分離される。血清がろ過され、ＤＮＡ抽出まで凍結保存されてもよい。

【０３９３】
特定の例示的実施形態では、標的核酸は、血液、血清、唾液、脳脊髄液、喀痰、又は尿など、生の試料又は未処理試料から直接検出される。特定の例示的実施形態では、標的核酸は無細胞ＤＮＡである。
【０３９４】
循環腫瘍細胞
一実施形態において、本発明で循環細胞（例えば循環腫瘍細胞（ＣＴＣ））をアッセイすることができる。本明細書に記載される方法のいずれかで使用するため、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）の単離が実施されてもよい。本発明において使用し得る循環細胞の特異的高感度検出及び捕捉を実現する例示的技法については記載されている（Ｍｏｓｔｅｒｔ Ｂ，ｅｔ ａｌ．，「循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）：検出方法及び乳癌におけるその臨床的関連性（Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ ｔｕｍｏｒ ｃｅｌｌｓ（ＣＴＣｓ）：ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｒｅｌｅｖａｎｃｅ ｉｎ ｂｒｅａｓｔ ｃａｎｃｅｒ）」．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｒｅａｔ Ｒｅｖ．２００９；３５：４６３－４７４；及びＴａｌａｓａｚ ＡＨ，ｅｔ ａｌ．，「磁気的スイーパー装置を使用した血液からの循環上皮細胞及び他のまれな細胞の高度に集積された集団の単離（Ｉｓｏｌａｔｉｎｇ ｈｉｇｈｌｙ ｅｎｒｉｃｈｅｄ ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎｓ ｏｆ ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ ａｎｄ ｏｔｈｅｒ ｒａｒｅ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ ｂｌｏｏｄ ｕｓｉｎｇ ａ ｍａｇｎｅｔｉｃ ｓｗｅｅｐｅｒ ｄｅｖｉｃｅ）」．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００９；１０６：３９７０－３９７５）。$10^5$～$10^6$個の末梢血単核球のバックグラウンド中に僅か１個のＣＴＣが見出され得る（Ｒｏｓｓ Ａ Ａ，ｅｔ ａｌ．，「免疫細胞化学的及びクローン原性アッセイ技法を使用した乳癌患者からの末梢血幹細胞採取物中の腫瘍細胞の検出及び実行可能性（Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｖｉａｂｉｌｉｔｙ ｏｆ ｔｕｍｏｒ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ ｂｌｏｏｄ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎｓ ｆｒｏｍ ｂｒｅａｓｔ ｃａｎｃｅｒ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｕｓｉｎｇ ｉｍｍｕｎｏｃｙｔｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ ｃｌｏｎｏｇｅｎｉｃ ａｓｓａｙ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ）」．Ｂｌｏｏｄ．１９９３，８２：２６０５－２６１０）。ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（登録商標）プラットフォームは、上皮細胞接着分子（ＥｐＣＡＭ）に対する抗体でコートされた免疫磁気ビーズを使用してＥＰＣＡＭ発現上皮細胞を集積し、続いて免疫染色によりサイトケラチン染色の存在及び白血球マーカーＣＤ４５の非存在を確認して、捕捉された細胞が上皮性腫瘍細胞であることを確認する（Ｍｏｍｂｕｒｇ Ｆ，ｅｔ ａｌ．，「正常及び悪性組織におけるＭｒ ３４，０００ヒト上皮特異的表面糖タンパク質の発現の免疫組織化学的研究（Ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｃａｌ ｓｔｕｄｙ ｏｆ ｔｈｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ａ Ｍｒ ３４，０００ ｈｕｍａｎ ｅｐｉｔｈｅｌｉｕｍ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｓｕｒｆａｃｅ ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎ ｉｎ ｎｏｒｍａｌ ａｎｄ ｍａｌｉｇｎａｎｔ ｔｉｓｓｕｅｓ）」．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１９８７；４７：２８８３－２８９１；及びＡｌｌａｒｄ ＷＪ，ｅｔ ａｌ．，「腫瘍細胞はあらゆる主要な癌の末梢血中を循環するが、健常対象又は非悪性疾患患者では循環しない（Ｔｕｍｏｒ ｃｅｌｌｓ ｃｉｒｃｕｌａｔｅ ｉｎ ｔｈｅ ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ ｂｌｏｏｄ ｏｆ ａｌｌ ｍａｊｏｒ ｃａｒｃｉｎｏｍａｓ ｂｕｔ ｎｏｔ ｉｎ ｈｅａｌｔｈｙ ｓｕｂｊｅｃｔｓ ｏｒ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｎｏｎｍａｌｉｇｎａｎｔ ｄｉｓｅａｓｅｓ）」．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００４；１０：６８９７－６９０４）。捕捉された細胞の数が、進行疾患を有する乳癌、結腸直腸癌及び前立腺癌患者にとって予後的意義を有することが前向きに実証されている（Ｃｏｈｅｎ ＳＪ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２００８；２６：３２１３－３２２１；Ｃｒｉｓｔｏｆａｎｉｌｌｉ Ｍ，ｅｔ ａｌ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ．２００４；３５１：７８１－７９１；Ｃｒｉｓｔｏｆａｎｉｌｌｉ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２００５；２３：１４２０－１４３０；及びｄｅ Ｂｏｎｏ ＪＳ，ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００８；１４：６３０２－６３０９）。

【０３９５】
本発明はまた、ＣＴＣ－Ｃｈｉｐ技術によるＣＴＣの単離も提供する。ＣＴＣ－Ｃｈｉｐはマイクロ流体力学に基づくＣＴＣ捕捉装置であり、ＣＴＣが結合する抗ＥｐＣＡＭ抗体でコーティングされた何千ものマイクロポストが入ったチャンバを通って血液が流れる（Ｎａｇｒａｔｈ Ｓ，ｅｔ ａｌ．「マイクロチップ技術による癌患者のまれな循環腫瘍細胞の単離（Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｒａｒｅ ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ ｔｕｍｏｒ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｃａｎｃｅｒ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｂｙ ｍｉｃｒｏｃｈｉｐ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）」．Ｎａｔｕｒｅ．２００７；４５０：１２３５－１２３９）。ＣＴＣ－Ｃｈｉｐは、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（登録商標）システムと比較してＣＴＣカウント及び純度の大幅な増加をもたらし（Ｍａｈｅｓｗａｒａｎ Ｓ，ｅｔ ａｌ．「循環肺癌細胞におけるＥＧＦＲの突然変異の検出（Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ ＥＧＦＲ ｉｎ ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ ｌｕｎｇ－ｃａｎｃｅｒ ｃｅｌｌｓ）」，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ．２００８；３５９：３６６－３７７）、両方のプラットフォームとも下流分子解析に用いられ得る。

【０３９６】
無細胞クロマチン
特定の実施形態において、本発明により無細胞クロマチン断片が単離され、分析される。健常個体並びに疾患状態を患っている個体の血清中にはヌクレオソームを検出することができる（Ｓｔｒｏｕｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ９０６：１６１－１６８（２０００））。更に、癌及び自己免疫疾患などの良性及び悪性疾患に罹患している患者では、ヌクレオソームの血清濃度が著しく高い（Ｈｏｌｄｅｎｒｉｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ（２００１）Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ９５，１ １４－１２０，Ｔｒｅｊｏ－Ｂｅｃｅｒｒｉｌ ｅｔ ａｌ（２００３）Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ １０４，６６３－６６８；Ｋｕｒｏｉ ｅｔ ａｌ １９９９ Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ ６，３６１－３６４；Ｋｕｒｏｉ ｅｔ ａｌ（２００１）Ｉｎｔ ｊ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ １９，１４３－１４８；Ａｍｏｕｒａ ｅｔ ａｌ（１９９７）Ａｒｔｈ Ｒｈｅｕｍ ４０，２２１７－２２２５；Ｗｉｌｌｉａｍｓ ｅｔ ａｌ（２００１）Ｊ Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ ２８，８１－９４）。理論によって拘束されないが、腫瘍担持患者における高濃度のヌクレオソームは、増殖性腫瘍で自発的に起こるアポトーシスに由来する。血中に循環するヌクレオソームは、ユニークに改変されたヒストンを含む。例えば、米国特許出願公開第２００５／００６９９３１号明細書（２００５年５月３１日）は、疾患の診断指標としての特異的ヒストンＮ末端改変に対する抗体の使用に関し、これは、かかるヒストン特異抗体を利用して患者の血液又は血清試料からヌクレオソームを単離することにより、診断／スクリーニング目的で付随するＤＮＡの精製及び分析を促進するものである。従って、本発明は、クロマチン結合ＤＮＡを使用して、例えば腫瘍突然変異を検出及びモニタし得る。改変されたヒストンと会合したＤＮＡの同定は、疾患及び先天性欠損の診断マーカーとして働き得る。

【０３９７】
従って、別の実施形態において、単離クロマチン断片は、循環クロマチン、好ましくは循環モノ及びオリゴヌクレオソームに由来する。単離クロマチン断片は生体試料に由来してもよい。生体試料は、それを必要としている対象又は患者からのものであってもよい。生体試料は、血清、血漿、リンパ液、血液、血液画分、尿、滑液、髄液、唾液、循環腫瘍細胞又は粘液であってもよい。

【０３９８】
無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）
特定の実施形態では、本発明を使用して無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）が検出されてもよい。血漿又は血清中の無細胞ＤＮＡは、非侵襲性の診断ツールとして使用し得る。例えば、無細胞胎児ＤＮＡは、ＲｈＤ因子適合性検査、Ｘ連鎖遺伝障害の性決定、単一遺伝子病の試験、子癇前症の同定に研究され、最適化されている。例えば、母体血漿中のｃｆＤＮＡの胎児細胞画分のシーケンシングは、胎児染色体異数性に伴うコピー数変化の検出に信

頼性のある手法である。別の例として、癌患者から単離されたｃｆＤＮＡを使用して、治療判断上有意味な主要遺伝子の突然変異が検出されている。

【０３９９】

特定の例示的実施形態において、本開示は、患者試料からｃｆＤＮＡを直接検出することを提供する。特定の他の例示的実施形態において、本開示は、上記に開示される集積の実施形態を使用して標的ｃｆＤＮＡの検出前にｃｆＤＮＡを集積することを提供する。

【０４００】

エキソソーム

一実施形態において、本発明でエキソソームをアッセイすることができる。エキソソームは小さい細胞外小胞であり、ＲＮＡを含むことが示されている。超遠心法、ろ過、化学的沈殿、サイズ排除クロマトグラフィー、及びマイクロフルイディクスによるエキソソームの単離は当該技術分野において公知である。一実施形態において、エキソソームはエキソソームバイオマーカーを使用して精製される。生体試料からのエキソソームの単離及び精製は任意の公知の方法によって実施し得る（例えば、国際公開第２０１６１７２５９８Ａ１号パンフレットを参照）。

【０４０１】

ＳＮＰ検出及び遺伝子タイピング

特定の実施形態では、本発明を使用して生体試料中の一塩基変異多型（ＳＮＰ）の存在が検出されてもよい。ＳＮＰは妊婦検査（例えば、性決定、胎児欠陥）に関係し得る。ＳＮＰは犯罪捜査に関係し得る。一実施形態では、犯罪捜査における容疑者が本発明によって特定され得る。理論によって拘束されないが、核酸ベースの法医学的証拠では検査試料が限られていることもあるため、容疑者又は被害者の遺伝子材料の検出に利用可能な最も高感度のアッセイが要求され得る。

【０４０２】

他の実施形態において、疾患に関連するＳＮＰが本発明に包含される。疾患に関連するＳＮＰは当該技術分野において周知であり、当業者は好適なガイドＲＮＡの設計に本発明の方法を適用することができる（例えば、ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｃｌｉｎｖａｒ？ｔｅｒｍ＝ｈｕｍａｎ％５Ｂｏｒｇｎ％５Ｄを参照のこと）。

【０４０３】

ある態様において、本発明は、ＳＮＰ遺伝子タイピングなどの遺伝子タイピング方法に関し、この方法は、

ａ）試料又は試料セットを１つ以上の個別独立分離容積に分配することであって、個別独立分離容積が本明細書に記載されるとおりの本発明に係るＣＲＩＳＰＲシステムを含むこと；

ｂ）１つ以上のガイドＲＮＡを１つ以上の標的分子に結合させるのに十分な条件下で試料又は試料セットをインキュベートすること；

ｃ）１つ以上のガイドＲＮＡによる１つ以上の標的分子への結合によってＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質を活性化させることであって、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質が活性化すると、ＲＮＡベースのマスキング構築物が改変されて検出可能な正のシグナルが生成されること；及び

ｄ）検出可能な正のシグナルを検出することであって、検出可能な正のシグナルの検出が、試料中における特定の遺伝子型を特徴とする１つ以上の標的分子の存在を指し示すことを含む。

【０４０４】

特定の実施形態において、検出可能シグナルが１つ以上の標準シグナル、好ましくは合成の標準シグナル、例えば図６０の例示的実施形態に示されるものなどと（例えばシグナル強度の比較によって）比較される。特定の実施形態において、標準は特定の遺伝子型であるか、又はそれに対応する。特定の実施形態において、標準は特定のＳＮＰ又は他の（単一）ヌクレオチド変異を含む。特定の実施形態において、標準は（ＰＣＲ増幅された）遺伝子型標準である。特定の実施形態において、標準はＤＮＡであるか、又はそれを含む

。特定の実施形態において、標準はＲＮＡであるか、又はそれを含む。特定の実施形態において、標準は、ＤＮＡから転写されるＲＮＡであるか、又はそれを含んだ。特定の実施形態において、標準は、ＲＮＡから逆転写されるＤＮＡであるか、又はそれを含む。特定の実施形態では、検出可能シグナルが１つ以上の標準と比較され、標準の各々が、ＳＮＰ又は他の（単一）ヌクレオチド変異など、公知の遺伝子型に対応する。特定の実施形態において、検出可能シグナルは１つ以上の標準シグナルと比較され、この比較は、特定の実施形態では一元又は二元配置ＡＮＯＶＡによる等、パラメトリック又はノンパラメトリック統計的分析によるなど、統計的分析を含み、検出可能シグナルが１つ以上の標準シグナルと比較され、検出可能シグナルが標準と（統計的に）有意に偏差を示さない場合、遺伝子型は前記標準に対応する遺伝子型と決定される。

【０４０５】

他の実施形態において、本発明によれば、救急ファーマコゲノミクスのための迅速遺伝子タイピングが可能である。一実施形態において、単一のポイント・オブ・ケアアッセイを使用して、緊急治療室に運び込まれた患者の遺伝子タイピングが行われてもよい。患者は血栓を有する疑いがあってもよく、救急医は投与すべき血液希釈剤の投薬量を決定する必要がある。例示的実施形態において、本発明は、ＶＫＯＲＣ１、ＣＹＰ２Ｃ９、及びＣＹＰ２Ｃ１９などのマーカーの遺伝子タイピングに基づき、心筋梗塞又は脳卒中治療中に血液希釈剤の投与に関して指針を提供し得る。一実施形態において、血液希釈剤は抗凝固薬ワルファリンである（Ｈｏｌｆｏｒｄ，ＮＨ（Ｄｅｃｅｍｂｅｒ　１９８６）．「用量効果関係を理解するワルファリンの臨床薬物動態学及び薬力学（Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ　ａｎｄ　Ｐｈａｒｍａｃｏｄｙｎａｍｉｃｓ　ｏｆ　Ｗａｒｆａｒｉｎ　Ｕｎｄｅｒｓｔａｎｄｉｎｇ　ｔｈｅ　Ｄｏｓｅ－Ｅｆｆｅｃｔ　Ｒｅｌａｔｉｏｎｓｈｉｐ）」．Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ．１１（６）：４８３－５０４）。血液凝固に関連する遺伝子は当該技術分野において公知である（例えば、米国特許出願公開第２００６０１６６２３９Ａ１号明細書；Ｌｉｔｉｎ　ＳＣ，Ｇａｓｔｉｎｅａｕ　ＤＡ（１９９５）「抗凝固薬療法における最新概念（Ｃｕｒｒｅｎｔ　ｃｏｎｃｅｐｔｓ　ｉｎ　ａｎｔｉｃｏａｇｕｌａｎｔ　ｔｈｅｒａｐｙ）」．Ｍａｙｏ　Ｃｌｉｎ．Ｐｒｏｃ．７０（３）：２６６－７２；及びＲｕｓｄｉａｎａ　ｅｔ　ａｌ．，「インドネシア人集団におけるＶＫＯＲＣ１、ＣＹＰ２Ｃ９、ＣＹＰ２Ｃ１９、及びＣＹＰ４Ｆ２の遺伝的変異に関連する低用量ワルファリンに対する反応性（Ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅｎｅｓｓ　ｔｏ　ｌｏｗ－ｄｏｓｅ　ｗａｒｆａｒｉｎ　ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｗｉｔｈ　ｇｅｎｅｔｉｃ　ｖａｒｉａｎｔｓ　ｏｆ　ＶＫＯＲＣ１，ＣＹＰ２Ｃ９，ＣＹＰ２Ｃ１９，ａｎｄ　ＣＹＰ４Ｆ２　ｉｎ　ａｎ　Ｉｎｄｏｎｅｓｉａｎ　ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ）」．Ｅｕｒ　Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２０１３　Ｍａｒ；６９（３）：３９５－４０５を参照のこと）。具体的には、ＶＫＯＲＣ１　１６３９（又は３６７３）一塩基多型では、共通の（「野生型」）ＧアレルがＡアレルに置き換えられる。Ａアレル（又は「Ａハプロタイプ」）を有する人は、Ｇアレル（又は「非Ａハプロタイプ」）を有する人と比べてＶＫＯＲＣ１の産生が少ない。これらの変異体の有病率はまた人種によって異なり、３７％の白人及び１４％のアフリカ人がＡアレルを保因する。最終的な結果は、凝固因子数の減少、従って凝血形成能の低下である。

【０４０６】

特定の例示的実施形態では、患者においてＳＮＰの検出に遺伝子材料がどれだけ利用可能かにより、ＤＮＡ又はＲＮＡ試料の増幅なしにＳＮＰを検出することが可能になる。遺伝子タイピングの場合、検査する生体試料は容易に入手される。特定の例示的実施形態では、本発明のインキュベーション時間が短縮されてもよい。アッセイは酵素反応が起こるのに必要な期間で実施されてもよい。当業者は、生化学反応を５分で実施することができる（例えば、５分のライゲーション）。本発明は、自動化されたＤＮＡ抽出装置を使用して血液からＤＮＡを入手し得る。次に、エフェクタータンパク質に対する標的分子を生成する反応にＤＮＡを加えることができる。標的分子が生成次第直ちにマスキング剤が切断

され、シグナルを検出することができる。例示的実施形態において、本発明により、薬物（例えば、血液希釈剤）の投与前に遺伝子型を決定するためのＰＯＣ迅速診断が可能になる。増幅ステップが用いられる場合、全ての反応が同じ反応で一段階プロセスで行われる。好ましい実施形態において、ＰＯＣアッセイは、１時間未満、好ましくは１０分、２０分、３０分、４０分、又は５０分で実施されてもよい。

【０４０７】

特定の実施形態において、本明細書に開示されるシステム、装置、及び方法は、長鎖非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）の存在又は発現レベルの検出に用いられ得る。特定のｌｎｃＲＮＡの発現は疾患状態及び／又は薬剤耐性に関連する。詳細には、特定のｌｎｃＲＮＡ（例えば、ＴＣＯＮＳ＿０００１１２５２、ＮＲ＿０３４０７８、ＴＣＯＮＳ＿０００１０５０６、ＴＣＯＮＳ＿０００２６３４４、ＴＣＯＮＳ＿０００１５９４０、ＴＣＯＮＳ＿０００２８２９８、ＴＣＯＮＳ＿０００２６３８０、ＴＣＯＮＳ＿０００９８６１、ＴＣＯＮＳ＿０００２６５２１、ＴＣＯＮＳ＿０００１６１２７、ＮＲ＿１２５９３９、ＮＲ＿０３３８３４、ＴＣＯＮＳ＿０００２１０２６、ＴＣＯＮＳ＿０００００６５７９、ＮＲ＿１０９８９０、及びＮＲ＿０２６８７３）は、黒色腫（例えば、結節型黒色腫、悪性黒子、悪性黒子型黒色腫、末端性黒子性黒色腫、表在拡大型黒色腫、粘膜黒色腫、ポリープ様黒色腫、線維形成性黒色腫、無色素性黒色腫、及び軟部組織黒色腫）の治療用の１つ以上のＢＲＡＦ阻害薬（例えば、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、ソラフェニブ、ＧＤＣ－０８７９、ＰＬＸ－４７２０、及びＬＧＸ８１８）に対する耐性など、癌治療に対する耐性に関連する。本明細書に記載される様々な実施形態を使用したｌｎｃＲＮＡの検出は、疾患診断及び／又は治療オプションの選択を促進することができる。

【０４０８】

一実施形態において、本発明は、特に治療成果にとって迅速な療法投与が重要なセッティングで、ＤＮＡ又はＲＮＡターゲット療法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥ、ジンクフィンガータンパク質、ＲＮＡｉ）をガイドすることができる。

【０４０９】

ＬＯＨ検出

癌細胞は、正常細胞と比較したとき遺伝子材料（ＤＮＡ）の消失を被る。全てではないにしろ、ほぼ全ての癌が被るこの遺伝子材料の消失は、「ヘテロ接合性の消失」（ＬＯＨ）と称される。ヘテロ接合性の消失（ＬＯＨ）は、遺伝子全体及び周囲染色体領域の消失を生じさせる大規模な染色体イベントである。ヘテロ接合性の消失は癌で頻発し、ここで消失は、消失した領域の機能性腫瘍抑制遺伝子が存在しないことを示す。しかしながら、染色体対の他方の染色体上に１つの機能性遺伝子がなおも残っているため、消失はサイレントであり得る。腫瘍抑制遺伝子の残りのコピーは点突然変異によって不活性化させることができ、腫瘍抑制遺伝子の消失につながる。癌細胞からの遺伝子材料の消失は、染色体上の特定の遺伝子座における細胞生存度又は細胞成長に不可欠な遺伝子の２つ以上のアレルの一方の選択的な消失をもたらし得る。

【０４１０】

「ＬＯＨマーカー」は、正常細胞と比較したとき癌又は他の疾患に関連するマイクロサテライト遺伝子座、欠失、変化、又は増幅からのＤＮＡである。ＬＯＨマーカーは、多くの場合に腫瘍抑制遺伝子又は別の、通常は腫瘍に関連する遺伝子の消失に関連する。

【０４１１】

用語「マイクロサテライト」は、ヒトゲノムに広く分布したＤＮＡの短い反復配列を指す。マイクロサテライトは、２～５ヌクレオチドの長さ範囲の、典型的には５～５０回繰り返された、一区画のタンデムリピートで並んだ（即ち隣接した）ＤＮＡモチーフである。例えば、配列ＴＡＴＡＴＡＴＡ（配列番号４１８）はジヌクレオチドマイクロサテライトであり、ＧＴＣＧＴＣＧＴＣＧＴＣ（配列番号４１９）はトリヌクレオチドマイクロサテライトである（Ａはアデニン、Ｇはグアニン、Ｃはシトシン、及びＴはチミンである）。かかるマイクロサテライトのリピート長さの体細胞変化は、腫瘍に特有の特徴に相当することが示されている。ガイドＲＮＡは、かかるマイクロサテライトを検出す

るように設計されてもよい。更には、本発明を使用して、検出可能シグナルの定量化に基づきリピート長さの変化、並びに増幅及び欠失が検出されてもよい。特定のマイクロサテライトは、遺伝子の調節性フランキング又はイントロン領域に位置するか、又は遺伝子のコドンに直接位置する。そのような場合、マイクロサテライト突然変異は、表現型の変化及び疾患、特に脆弱Ｘ症候群及びハンチントン病などのトリプレット伸長疾患につながり得る。

【０４１２】

特異的染色体領域上での高頻度のヘテロ接合性の消失（ＬＯＨ）が、多くの種類の悪性腫瘍で報告されている。特異的染色体領域上のアレルの消失は、種々の悪性腫瘍で観察される最も一般的な遺伝的変化であり、従ってマイクロサテライト分析は、肺癌について喀痰及び膀胱癌について尿など、体液からの標本における癌細胞のＤＮＡの検出に適用されている。（Ｒｏｕｌｅａｕ，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　３６３，５１５－５２１（１９９３）；及びＬａｔｉｆ，ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６０，１３１７－１３２０（１９９３））。更に、癌及び他の何らかの疾患を有する個体の血漿中に可溶性ＤＮＡ濃度の著しい増加が存在することが確立されており、マイクロサテライト異常を有する癌ＤＮＡの検出に無細胞血清又は血漿を使用し得ることが指摘される（Ｋａｍｐ，ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６４，４３６－４４０（１９９４）；及びＳｔｅｃｋ，ｅｔ　ａｌ．ＮａｔＧｅｎｅｔ．１５（４），３５６－３６２（１９９７））。２つのグループが、限られた数の小細胞肺癌又は頭頸部癌患者の血漿又は血清中のマイクロサテライト変化を報告している（Ｈａｈｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７１，３５０－３５３（１９９６）；及びＭｉｏｚｚｏ，ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６，２２８５－２２８８（１９９６））。黒色腫患者の腫瘍及び血清におけるヘテロ接合性の消失の検出もまた、以前示されている（例えば、米国特許第６４６５１７７Ｂ１号明細書を参照のこと）。

【０４１３】

従って、癌に罹患している又はそのリスクがある対象においてＬＯＨマーカーを検出することが有利である。本発明を使用して腫瘍細胞のＬＯＨが検出されてもよい。一実施形態において、循環腫瘍細胞が生体試料として使用されてもよい。好ましい実施形態において、血清又は血漿から入手された無細胞ＤＮＡを使用して、ＬＯＨが非侵襲的に検出及び／又はモニタされる。他の実施形態において、生体試料は、本明細書に記載される任意の試料（例えば、膀胱癌について尿試料）であり得る。理論によって拘束されないが、本発明を使用して、任意の先行方法と比較して向上した感度でＬＯＨマーカーが検出されてもよく、従って変異イベントの早期発見がもたらされる。一実施形態において、ＬＯＨは生体液中で検出され、ここではＬＯＨの存在が癌の発生と関連付けられる。本明細書に記載される方法及びシステムは、癌に関連する特異的アレルのＬＯＨを検出するための非侵襲性の迅速且つ正確な方法を提供することにより、ＰＣＲ又は組織生検などの先行技術に優る大幅な進歩となる。従って、本発明は、ハイリスク群をスクリーニングし、且つ化学的予防、化学療法、免疫療法又は他の治療を受けるハイリスク患者をモニタするために使用することができる方法及びシステムを提供する。

【０４１４】

本発明の方法は血液などの体液からのＤＮＡ抽出しか必要としないため、単一の患者に対していつでも繰り返し実施することができる。手術の前又はその後；化学療法、放射線療法、遺伝子療法又は免疫療法などの治療の前、その最中、及びその後；又は疾患の進行、安定性、又は再発に関する治療後のフォローアップ検査の最中に血液が採取され、ＬＯＨに関してモニタされる。理論によって拘束されないが、ＬＯＨマーカーは個別患の腫瘍に特異的であるため、本発明の方法を使用してまた、当該の患者に特異的なＬＯＨマーカーを有する準臨床疾患の存在又は再発が検出されてもよい。本方法はまた、腫瘍特異的ＬＯＨマーカーを使用して、複数の転移が存在し得るかどうかも検出することができる。

【０４１５】

エピジェネティックな改変の検出

本発明においては、癌又は癌進行の指標であるヒストン変異体、ＤＮＡ改変、及びヒス

トン改変が使用されてもよい。例えば、米国特許出願公開第２０１４０２０６０１４号明細書は、癌試料が健常対象と比較したときヌクレオソームＨ２ＡＺ、マクロＨ２Ａ１．１、５－メチルシトシン、Ｐ－Ｈ２ＡＸ（Ｓｅｒ１３９）レベルの上昇を有したことを記載している。個体に癌細胞が存在すると、癌細胞のアポトーシスが増加する結果として血中に高レベルの無細胞ヌクレオソームが生じ得る。一実施形態において、Ｈ２Ｂ　Ｓｅｒ　１４（Ｐ）など、アポトーシスに関連するマーカーに対する抗体を使用して、アポトーシス新生細胞から放出された単一ヌクレオソームが同定されてもよい。従って、腫瘍細胞から生じたＤＮＡが、有利には本発明により高感度及び高精度で分析されてもよい。

【０４１６】

出生前スクリーニング

特定の実施形態において、本発明の方法及びシステムは出生前スクリーニングに使用されてもよい。特定の実施形態において、出生前スクリーニング方法では無細胞ＤＮＡが使用される。特定の実施形態では、単一のヌクレオソーム又はオリゴヌクレオソームに関連するＤＮＡが本発明で検出されてもよい。好ましい実施形態では、出生前スクリーニングにおいて単一のヌクレオソーム又はオリゴヌクレオソームに関連するＤＮＡの検出が使用される。特定の実施形態では、出生前スクリーニング方法において無細胞クロマチン断片が使用される。

【０４１７】

出生前診断又は出生前スクリーニングとは、胎児又は胚において、それが生まれる前に疾患又は病態に関して検査することを指す。目的は、神経管閉鎖不全、ダウン症候群、染色体異常、遺伝的障害及び他の病態、例えば、脊椎披裂、口蓋裂、テイ・サックス病、鎌状赤血球貧血、サラセミア、嚢胞性線維症、筋ジストロフィー、及び脆弱Ｘ症候群などの先天性異常を検出することである。スクリーニングはまた、出生前性判別にも使用することができる。一般的な検査手順には、羊水穿刺、項部浮腫超音波を含む超音波検査法、血清マーカー検査、又は遺伝子スクリーニングが含まれる。ある場合には、検査が投与され、胎児が中絶されることになるかどうかが決定されるが、医師及び患者はまた、乳児が適切なケアを受けることのできる三日熱のケア病院で分娩を予定することができるように、ハイリスク妊娠の早期診断にその有用性を見出す。

【０４１８】

母親の血中に存在する胎児細胞があること、及びそれらの細胞が出生前ＤＮＡベース診断用の胎児染色体の潜在的な供給源を提供することが認められている。加えて、胎児ＤＮＡは母体血中の総ＤＮＡの約２～１０％の範囲である。現在利用可能な出生前遺伝子検査は、通常侵襲的手技を伴う。例えば、妊娠約１０～１２週の妊婦に対して実施される絨毛採取（ＣＶＳ）及び約１４～１６週で実施される羊水穿刺はいずれも、胎児の染色体異常の検査用試料を入手するために侵襲的手技を含む。これらの試料採取手順で得られた胎児細胞は、通常、細胞遺伝学的な又は蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）分析を用いて染色体異常に関して検査される。無細胞胎児ＤＮＡは、妊娠第６週もの早期に妊婦の血漿及び血清に存在し、妊娠中に濃度が上昇して分娩前にピークとなることが示されている。これらの細胞は妊娠の極めて早い時期に出現するため、正確で非侵襲的な妊娠初期検査の基礎を形成する可能性がある。理論によって拘束されないが、本発明は、少量の胎児ＤＮＡの検出において先例のない感度を提供する。理論によって拘束されないが、概して目的の胎児ＤＮＡと共に豊富な量の母体ＤＮＡが付随して回収され、従って胎児ＤＮＡ定量化及び突然変異検出における感度が低下する。本発明は、アッセイの予想外の高感度によってかかる問題を克服する。

【０４１９】

Ｈ３クラスのヒストンは、４つの異なるタンパク質タイプからなる：主要なタイプ、Ｈ３．１及びＨ３．２；代替的タイプ、Ｈ３．３；及び精巣特異的変異体、Ｈ３ｔ。Ｈ３．１及びＨ３．２は近縁で、唯一の違いはＳｅｒ９６であるが、Ｈ３．１はＨ３．３と少なくとも５アミノ酸位置で異なる。更に、Ｈ３．１は、肝臓、腎臓及び心臓を含めた成人組織におけるその存在と比較して胎児肝で高度に集積されている。成人ヒト組織ではＨ３．

１変異体よりもＨ３．３変異体が豊富にあるが、胎児肝についてはその逆が当てはまる。本発明は、これらの差を用いることにより、胎児細胞及び母親細胞の両方及び／又は胎児核酸を含む母体生体試料中で胎児ヌクレオソーム及び胎児核酸を検出し得る。

【０４２０】

一実施形態において、胎児ヌクレオソームは血液から入手されてもよい。他の実施形態において、胎児ヌクレオソームは頸管粘液試料から入手される。特定の実施形態において、頸管粘液試料は、妊婦から妊娠中期の初期又は妊娠初期の後期にスワブ採取又は洗浄によって入手される。試料をインキュベーターに置いて、粘液中に閉じ込められたＤＮＡを放出させ得る。インキュベーターは３７℃に設定してもよい。試料は約１５～３０分間揺動させてもよい。ＤＮＡを放出させる目的で、粘液をムチナーゼで更に溶解させてもよい。試料はまた、化学的処理など、当該技術分野において周知のとおりの、胎児ヌクレオソームが放出されるようにアポトーシスを誘導する条件に供してもよい。このように、頸管粘液試料は、アポトーシスを誘導する薬剤で処理されてもよく、それにより胎児ヌクレオソームが放出される。循環胎児ＤＮＡの集積に関しては、米国特許出願公開第２００７０２４３５４９号明細書及び同第２０１００２４００５４号明細書が参照される。本発明は、元来ごく僅かなヌクレオソーム又はＤＮＡ画分のみが胎児性であり得る出生前スクリーニングに本方法及びシステムを適用する場合に特に有利である。

【０４２１】

本発明に係る出生前スクリーニングは、限定はされないが、１３トリソミー、１６トリソミー、１８トリソミー、クラインフェルター症候群（４７，ＸＸＹ）、（４７，ＸＹＹ）及び（４７，ＸＸＸ）、ターナー症候群、ダウン症候群（２１トリソミー）、嚢胞性線維症、ハンチントン病、βサラセミア、筋強直性ジストロフィー、鎌状赤血球貧血、ポルフィリン症、脆弱Ｘ症候群、ロバートソン転座、アンジェルマン症候群、ディジョージ症候群及びウォルフ・ヒルシュホーン症候群を含め、疾患に関するものであり得る。

【０４２２】

本発明の幾つかの更なる態様は、国立衛生研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ）のウェブサイトで遺伝的障害のサブセクション項目（ウェブサイトｈｅａｌｔｈ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｔｏｐｉｃ／Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ）に更に記載されている広範囲の遺伝性疾患に関連する欠陥の診断、予後判定及び／又は治療に関する。

【０４２３】

癌及び癌薬剤耐性検出

特定の実施形態において、本発明を使用して、癌に関連する遺伝子及び突然変異が検出されてもよい。特定の実施形態では、耐性に関連する突然変異が検出される。治療中には、腫瘍細胞のクローン集団における耐性腫瘍細胞の増幅又は耐性突然変異の出現が起こり得る（例えば、Ｂｕｒｇｅｒ ＪＡ，ｅｔ ａｌ．，「ＢＴＫ阻害薬に対する耐性を生じる慢性リンパ球性白血病患者におけるクローン進化（Ｃｌｏｎａｌ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｉｎ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｃｈｒｏｎｉｃ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｉｃ ｌｅｕｋａｅｍｉａ ｄｅｖｅｌｏｐｉｎｇ ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ ｔｏ ＢＴＫ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ）」．Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ．２０１６ Ｍａｙ ２０；７：１１５８９；Ｌａｎｄａｕ ＤＡ，ｅｔ ａｌ．，「ＣＬＬをドライブする突然変異並びに進行及び再発におけるその進化（Ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｄｒｉｖｉｎｇ ＣＬＬ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｉｎ ｐｒｏｇｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ ｒｅｌａｐｓｅ）」．Ｎａｔｕｒｅ．２０１５ Ｏｃｔ ２２；５２６（７５７４）：５２５－３０；Ｌａｎｄａｕ ＤＡ，ｅｔ ａｌ．，「血液学的悪性腫瘍におけるクローン進化及び治療との関連（Ｃｌｏｎａｌ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｉｎ ｈｅｍａｔｏｌｏｇｉｃａｌ ｍａｌｉｇｎａｎｃｉｅｓ ａｎｄ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ）」．Ｌｅｕｋｅｍｉａ．２０１４ Ｊａｎ；２８（１）：３４－４３；ａｎｄ Ｌａｎｄａｕ ＤＡ，ｅｔ ａｌ．，「（Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ａｎｄ ｉｍｐａｃｔ ｏｆ ｓｕｂｃｌｏｎａｌ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｃｈｒｏｎｉｃ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｉｃ ｌｅｕｋｅｍｉａ）」．Ｃｅｌ

ｌ．２０１３　Ｆｅｂ　１４；１５２（４）：７１４－２６を参照のこと）。従って、かかる突然変異の検出には極めて高感度のアッセイが必要であり、モニタリングには繰り返しの生検が必要である。繰り返しの生検は不都合で、侵襲的で、且つ高価である。耐性突然変異は、当該技術分野において公知の先行方法を用いて血液試料又は他の非侵襲的に採取された生体試料（例えば、血液、唾液、尿）で検出することは困難であり得る。耐性突然変異とは、化学療法、ターゲット療法、又は免疫療法に対する耐性に関連する突然変異を指し得る。

【０４２４】

特定の実施形態では、個別の癌において、癌の進行の検出に使用し得る突然変異が起こる。一実施形態において、腫瘍に対するＴ細胞溶解活性に関連する突然変異が特徴付けられており、本発明によって検出されてもよい（例えば、Ｒｏｏｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，「局所的免疫細胞溶解活性に関連する腫瘍の分子及び遺伝子特性（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　ｇｅｎｅｔｉｃ　ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ　ｏｆ　ｔｕｍｏｒｓ　ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｗｉｔｈ　ｌｏｃａｌ　ｉｍｍｕｎｅ　ｃｙｔｏｌｙｔｉｃ　ａｃｔｉｖｉｔｙ）」，Ｃｅｌｌ．２０１５　Ｊａｎｕａｒｙ　１５；１６０（１－２）：４８－６１を参照のこと）。これらの突然変異の検出に基づき、患者に個別化された治療法が開発されてもよい（例えば、国際公開第２０１６１００９７５Ａ１号パンフレットを参照のこと）。特定の実施形態において、細胞溶解活性に関連する癌特異的突然変異は、ＣＡＳＰ８、Ｂ２Ｍ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＳＭＣ１Ａ、ＡＲＩＤ５Ｂ、ＴＥＴ２、ＡＬＰＫ２、ＣＯＬ５Ａ１、ＴＰ５３、ＤＮＥＲ、ＮＣＯＲ１、ＭＯＲＣ４、ＣＩＣ、ＩＲＦ６、ＭＹＯＣＤ、ＡＮＫＬＥ１、ＣＮＫＳＲ１、ＮＦ１、ＳＯＳ１、ＡＲＩＤ２、ＣＵＬ４Ｂ、ＤＤＸ３Ｘ、ＦＵＢＰ１、ＴＣＰ１１Ｌ２、ＨＬＡ－Ａ、Ｂ又はＣ、ＣＳＮＫ２Ａ１、ＭＥＴ、ＡＳＸＬ１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＩＤＯ１、ＩＤＯ２、ＡＬＯＸ１２Ｂ及びＡＬＯＸ１５Ｂからなる群から選択される遺伝子の突然変異、又は全染色体イベントを除く、以下の染色体バンド：６ｑ１６．１－ｑ２１、６ｑ２２．３１－ｑ２４．１、６ｑ２５．１－ｑ２６、７ｐ１１．２－ｑ１１．１、８ｐ２３．１、８ｐ１１．２３－ｐ１１．２１（ＩＤＯ１、ＩＤＯ２を含む）、９ｐ２４．２－ｐ２３（ＰＤＬ１、ＰＤＬ２を含む）、１０ｐ１５．３、１０ｐ１５．１－ｐ１３、１１ｐ１４．１、１２ｐ１３．３２－ｐ１３．２、１７ｐ１３．１（ＡＬＯＸ１２Ｂ、ＡＬＯＸ１５Ｂを含む）、及び２２ｑ１１．１－ｑ１１．２１のいずれかに影響するコピー数の増加であってもよい。

【０４２５】

特定の実施形態では、本発明を使用して、治療の経過中及び治療の完了後に癌突然変異（例えば耐性突然変異）が検出される。本発明の感度は、治療中に生じるクローン突然変異の非侵襲的な検出を実現し得るもので、疾患における再発の検出に用いることができる。

【０４２６】

特定の例示的実施形態では、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）及び／又は発現が異なるｍｉＲＮＡのｍｉＲＮＡシグネチャの検出を使用して癌の進行が検出又はモニタリングされ、及び／又は癌療法に対する薬剤耐性が検出されてもよい。例として、Ｎａｄａｌ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｒｅｐｏｒｔｓ、（２０１５）ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ１２４６４）は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の検出に使用し得るｍＲＮＡシグネチャについて記載している。

【０４２７】

特定の例示的実施形態では、細胞のクローン部分集団における耐性突然変異の存在が、治療レジメンの決定において使用されてもよい。他の実施形態では、共通腫瘍突然変異に基づき、患者の治療に個別化された療法が投与されてもよい。特定の実施形態において、共通突然変異は治療に反応して起こり、薬剤耐性につながる。特定の実施形態において、本発明は、細胞の突然変異の獲得又はかかる薬物耐性突然変異を有する細胞の増幅に関する患者のモニタリングに使用されてもよい。

【０４２８】

様々な化学療法剤、特にチロシンキナーゼ阻害薬などのターゲット療法による治療は、

高頻度で標的分子における治療薬の活性に抵抗する新規突然変異につながる。この抵抗性を克服するための複数の戦略が、これらの突然変異の影響を受けない第２世代治療薬の開発、及び耐性突然変異の下流で働く薬剤を含めた複数の薬剤による治療を含め、評価されているところである。例示的実施形態において、ブルトンチロシンキナーゼ（ＢＴＫ）を標的とする、且つＣＬＬ及び特定のリンパ腫に使用される分子であるイブルチニブに対する共通突然変異は、位置４８１（ＢＴＫ／Ｃ４８１Ｓ）におけるシステインからセリンへの変化である。上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）のチロシンキナーゼドメインを標的とするエルロチニブは肺癌の治療においてよく使用され、治療後に常に耐性腫瘍が発生する。耐性クローンに見られる共通突然変異は、位置７９０におけるスレオニンからメチオニンへの突然変異である。

【０４２９】

本発明で検出し得る癌患者集団間で共有される非サイレント突然変異及び共通耐性突然変異は、当該技術分野において公知である（例えば、国際公開第２０１６／１８７５０８号パンフレットを参照のこと）。特定の実施形態において、薬剤耐性突然変異は、イブルチニブ、エルロチニブ、イマチニブ、ゲフィチニブ、クリゾチニブ、トラスツズマブ、ベムラフェニブ、ＲＡＦ／ＭＥＫ、チェックポイント遮断療法、又は抗エストロゲン療法による治療によって誘発され得る。特定の実施形態において、癌特異的突然変異は、プログラム死リガンド１（ＰＤ－Ｌ１）、アンドロゲン受容体（ＡＲ）、ブルトンチロシンキナーゼ（ＢＴＫ）、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、ＢＣＲ－Ａｂｌ、ｃ－ｋｉｔ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＨＥＲ２、ＥＭＬ４－ＡＬＫ、ＫＲＡＳ、ＡＬＫ、ＲＯＳ１、ＡＫＴ１、ＢＲＡＦ、ＭＥＫ１、ＭＥＫ２、ＮＲＡＳ、ＲＡＣ１、及びＥＳＲ１からなる群から選択されるタンパク質をコードする１つ以上の遺伝子に存在する。

【０４３０】

免疫チェックポイントは、免疫反応を減速又は停止させて、免疫細胞の無制御な活性化による過剰な組織損傷を防ぐ阻害経路である。特定の実施形態において、標的となる免疫チェックポイントはプログラム死－１（ＰＤ－１又はＣＤ２７９）遺伝子（ＰＤＣＤ１）である。他の実施形態において、標的となる免疫チェックポイントは細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原（ＣＴＬＡ－４）である。更なる実施形態において、標的となる免疫チェックポイントは、ＢＴＬＡ、ＬＡＧ３、ＩＣＯＳ、ＰＤＬ１又はＫＩＲなど、ＣＤ２８及びＣＴＬＡ４　Ｉｇスーパーファミリーの別のメンバーである。更なる別の実施形態において、標的となる免疫チェックポイントは、ＣＤ４０、ＯＸ４０、ＣＤ１３７、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７又はＴＩＭ－３など、ＴＮＦＲスーパーファミリーのメンバーである。

【０４３１】

近年、腫瘍及びその微小環境における遺伝子発現が単細胞レベルで特徴付けられている（例えば、Ｔｉｒｏｓｈ，ｅｔ　ａｌ．「単細胞ＲＮＡ－ｓｅｑによる転移性黒色腫の多細胞生態系の分析（Ｄｉｓｓｅｃｔｉｎｇ　ｔｈｅ　ｍｕｌｔｉｃｅｌｌｕｌａｒ　ｅｃｏｓｙｓｔｅｍ　ｏｆ　ｍｅｔａｓｔａｔｉｃ　ｍｅｌａｎｏｍａ　ｂｙ　ｓｉｎｇｌｅ　ｃｅｌｌ　ＲＮＡ－ｓｅｑ）」．Ｓｃｉｅｎｃｅ　３５２，１８９－１９６，ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．ａａｄ０５０１（２０１６））；Ｔｉｒｏｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，「単一細胞ＲＮＡ－ｓｅｑはヒト乏突起膠腫の発達上の階層を支援する（Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ　ＲＮＡ－ｓｅｑ　ｓｕｐｐｏｒｔｓ　ａ　ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ　ｈｉｅｒａｒｃｈｙ　ｉｎ　ｈｕｍａｎ　ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｇｌｉｏｍａ）」．Ｎａｔｕｒｅ．２０１６　Ｎｏｖ　１０；５３９（７６２８）：３０９－３１３．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ２０１２３．Ｅｐｕｂ　２０１６　Ｎｏｖ　２；及び国際公開第２０１７００４１５３　Ａ１号パンフレットを参照のこと）。特定の実施形態では、本発明を使用して遺伝子シグネチャが検出されてもよい。一実施形態では、腫瘍微小環境において補体遺伝子がモニタ又は検出される。一実施形態ではＭＩＴＦ及びＡＸＬプログラムがモニタ又は検出される。一実施形態では、腫瘍特異的幹細胞又は前駆細胞シグネチャが検出される。かかるシグネチャは、免疫応答の状態及び腫瘍の状態を示す。特定の実施形態では、増殖、治療耐性及び免疫細胞の存在量の観点での腫瘍の状態が検出されてもよい。

【０４３２】
従って、特定の実施形態において、本発明は、特に疾患再発又は共通耐性突然変異の発生をモニタリングするための、腫瘍ＤＮＡなどの循環ＤＮＡについての低価格で迅速な多重化癌検出パネルを提供する。
【０４３３】
免疫療法適用
本明細書に開示される実施形態はまた、更なる免疫療法コンテクストにも有用であり得る。例えば、一部の実施形態では、対象の免疫応答の診断、予後判定及び／又は病期分類方法が、１つ以上のバイオマーカーの発現、活性及び／又は機能の第１のレベルを検出すること、及び検出されたレベルを対照レベルと比較することを含み、ここで検出されたレベルと対照レベルとの差が、対象における免疫応答の存在を指し示す。
【０４３４】
特定の実施形態では、本発明を使用して、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の機能不全又は活性化が決定されてもよい。ＴＩＬは、公知の方法を用いて腫瘍から単離されてもよい。ＴＩＬは、養子細胞移入療法に使用すべきかどうかを決定するため分析されてもよい。加えて、キメラ抗原受容体Ｔ細胞（ＣＡＲ　Ｔ細胞）が、それを対象に投与する前に、機能不全又は活性化のシグネチャに関して分析されてもよい。機能不全の及び活性化したＴ細胞の例示的シグネチャについては記載されている（例えば、Ｓｉｎｇｅｒ　Ｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ａ「腫瘍浸潤性Ｔ細胞において活性化と分離された機能不全の異なる遺伝子モジュール（Ｄｉｓｔｉｎｃｔ　Ｇｅｎｅ　Ｍｏｄｕｌｅ　ｆｏｒ　Ｄｙｓｆｕｎｃｔｉｏｎ　Ｕｎｃｏｕｐｌｅｄ　ｆｒｏｍ　Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｉｎ　Ｔｕｍｏｒ－Ｉｎｆｉｌｔｒａｔｉｎｇ　Ｔ　Ｃｅｌｌｓ）」．Ｃｅｌｌ．２０１６　Ｓｅｐ　８；１６６（６）：１５００－１５１１．ｅ９．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｃｅｌｌ．２０１６．０８．０５２を参照のこと）。
【０４３５】
一部の実施形態では、Ｃ２ｃ２を使用して、Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋及び／又はＣＤ４＋　Ｔ細胞）などの免疫細胞の状態が評価される。詳細には、Ｔ細胞活性化及び／又は機能不全は、例えば、Ｔ細胞状態のうちの１つ以上に関連する遺伝子又は遺伝子シグネチャに基づき決定することができる。このようにして、ｃ２ｃ２を使用して１つ以上のＴ細胞部分集団の存在を決定することができる。
【０４３６】
一部の実施形態では、Ｃ２ｃ２は診断アッセイで使用することができ、又は患者が免疫療法又は別のタイプの療法の投与に好適かどうかを決定する方法として使用されてもよい。例えば、遺伝子又はバイオマーカーシグネチャの検出をｃ２ｃ２によって実施して、患者が所与の治療に応答しているかどうか、又は、患者が応答していないかどうか、それがＴ細胞機能障害に起因し得るかどうかを決定してもよい。かかる検出は、患者が受けるのに最も適した療法のタイプ、例えば、患者が免疫療法を受けるべきかどうかに関して情報を与えるものである。
【０４３７】
一部の実施形態では、本明細書に開示されるシステム及びアッセイにより、療法（例えば養子細胞移入（ＡＣＴ）療法）に対する患者の応答が細胞機能障害に起因するかどうかを臨床医が同定できるようになり、及びそれに起因する場合、バイオマーカーシグネチャ間での上方制御及び下方制御レベルが問題への対処を可能にするであろう。例えば、ＡＣＴの投与を受けている患者が応答しない場合、ＡＣＴの一部として投与される細胞が本明細書に開示されるアッセイによってアッセイされ、細胞活性化及び／又は機能不全状態との関連が公知のバイオマーカーシグネチャの相対発現レベルが決定されてもよい。ＡＣＴ細胞で特定の抑制性受容体又は分子が上方制御される場合、患者は当該の受容体又は分子の阻害薬で治療されてもよい。ＡＣＴ細胞において特定の刺激性の受容体又は分子が下方制御される場合、患者は当該受容体又は分子の作動薬で治療されてもよい。
【０４３８】

特定の例示的実施形態では、本明細書に記載されるシステム、方法、及び装置を使用して、特定の細胞型、細胞表現型、又は細胞状態を同定する遺伝子シグネチャがスクリーニングされてもよい。同様に、かかる方法を圧縮センシングとして用いて、本明細書に開示される実施形態がトランスクリプトームの検出に使用されてもよい。遺伝子発現データが、一部の遺伝子の発現レベルが他の発現レベルの予測となるように高度に構造化される。遺伝子発現データが高度に構造化されるという知識により、システムの自由度の数が小さいと仮定することが可能になり、それにより相対的遺伝子存在量の計算の基礎が疎であると仮定することが可能になる。幾つかの生物学的に動機付けされた仮定を立てることが可能であり、それにより本出願人らは、アンダーサンプリングでも、どの遺伝子が相互作用する可能性があるかについていかなる特定の知識も有することなく非線形相互作用項を復元することが可能になる。詳細には、遺伝子相互作用が低ランク、スパース、又はこれらの組み合わせであると本出願人らが仮定する場合、次には完全な組み合わせの広がりと比べて真の自由度の数は小さく、それにより本出願人らは、比較的少数の摂動で完全な非線形ランドスケープを推測することが可能になる。これらの仮定に取り組むことにより、行列圧縮及び圧縮センシングの分析理論を用いてアンダーサンプリングされた組み合わせ摂動実験を設計し得る。加えて、組み合わせ摂動の予測的機能を構築することにより、いかなる個別の相互作用係数も直接学習することなくカーネル学習法フレームワークを用いてアンダーサンプリングを利用し得る。圧縮センシングは、包括的な遺伝子発現プロファイルを入手するために検出すべき最小数の標的転写物を同定する方法をもたらす。圧縮センシング方法については、２０１６年１０月２７日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０５９２３０号明細書「Ｓｙｓｔｅｍｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ Ｒｅｌａｔｉｖｅ Ａｂｕｎｄａｎｃｅｓ ｏｆ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ」（これは参照により本明細書に援用される）に開示されている。圧縮センシングのような方法を用いて最小限の転写物標的セットを同定したならば、次には対応するガイドＲＮＡセットが、前記転写物を検出するように設計されてもよい。従って、特定の例示的実施形態では、細胞の遺伝子発現プロファイルを入手する方法は、本明細書に開示される実施形態を用いて、細胞又は細胞集団の遺伝子発現プロファイルを提供する最小限の転写物セットを検出することを含む。

【０４３９】

遺伝子編集及び／又はオフターゲット効果の検出

本明細書に開示される実施形態を他の遺伝子編集ツールと組み合わせて使用して、所望の１つ又は複数の遺伝子編集が成功したことを確認し、及び／又は任意のオフターゲット効果の存在を検出し得る。編集された細胞は、１つ以上のガイドを使用して１つ以上の標的遺伝子座に対してスクリーニングされてもよい。本明細書に開示される実施形態がＣＲＩＳＰＲシステムを利用することに伴い、セラノスティックな適用もまた想定される。例えば、本明細書に開示される遺伝子タイピングの実施形態を使用して適切な標的遺伝子座を選択し、又は標的編集が必要な細胞若しくは細胞集団を同定してもよい。次に同じ又は別個のシステムを使用して編集効率が決定されてもよい。以下の実施例に記載されるとおり、本明細書に開示される実施形態を使用して、僅か１週間で簡素化されたセラノスティックなパイプラインを設計し得る。

【０４４０】

核酸タグ付加アイテムの検出

或いは、本明細書に記載される実施形態を使用して核酸識別子が検出されてもよい。核酸識別子は、特定の物品の識別に用いられ得る非コード核酸である。ＤＮＡウォーターマークなどの例示的な核酸識別子について、Ｈｅｉｄｅｒ ａｎｄ Ｂａｒｎｅｋｏｗ．「ＤＮＡウォーターマーク：概念実証（ＤＮＡ ｗａｔｅｒｍａｒｋｓ：Ａ ｐｒｏｏｆ ｏｆ ｃｏｎｃｅｐｔ）」ＢＭＣ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ９：４０（２００８）に記載されている。核酸識別子はまた、核酸バーコードであってもよい。核酸ベースのバーコードは、標的分子及び／又は標的核酸などの関連する分子の識別子として使用される短いヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はこれらの組み合わせ）配列である。核

酸バーコードは、少なくとも、例えば、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、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、又は１００ヌクレオチドの長さを有することができ、一本鎖又は二本鎖形態であってよい。１つ以上の核酸バーコードは、標的分子及び／又は標的核酸に結合させる、又は「タグ付け」することができる。この結合は、直接であっても（例えば、標的分子へのバーコードの共有結合性又は非共有結合性結合）、又は間接的であってもよい（例えば、追加的な分子、例えば、抗体（又は他のタンパク質）などの特異的結合剤又はバーコード受容アダプター（又は他の核酸分子）を介する）。標的分子及び／又は標的核酸は、核酸バーコードコンカテマーなど、複数の核酸バーコードによってコンビナトリアル方式で標識することができる。典型的には、核酸バーコードを使用して、標的分子及び／又は標的核酸が特定の区画（例えば独立分離容積）からのものである、特定の物理的特性（例えば、親和性、長さ、配列等）を有する、又は特定の治療条件に供されたことがあると同定される。標的分子及び／又は標的核酸に複数の核酸バーコードを関連付けて、それらの特徴の全て（及びそれ以上）に関する情報を提供することができる。核酸バーコードの作成方法は、例えば国際公開第２０１４／０４７５６１号パンフレットに開示されている。

【０４４１】

酵素

本願は、ＲＮＡ切断及び検出の種々の適用に特に好適なものとなるロバストな活性を実証するＣ２ｃ２のオルソログを更に提供する。そうした適用としては、限定はされないが、本明細書に記載されるものが挙げられる。より詳細には、試験した他のものより強力な活性を有することを実証するオルソログは、生物レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）（ＬｗＣ２ｃ２）から同定されるＣ２ｃ２オルソログである。従って本願は、目的の標的遺伝子座の改変方法を提供し、この方法は、Ｃ２ｃ２エフェクタータンパク質、より詳細には本明細書に記載されるとおり活性が増加したＣ２ｃ２エフェクタータンパク質と、１つ以上の核酸成分とを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を前記遺伝子座に送達することを含み、ここで少なくとも１つ以上の核酸成分はエンジニアリングされ、１つ以上の核酸成分が目的の標的との複合体を誘導し、及びエフェクタータンパク質が１つ以上の核酸成分と複合体を形成し、この複合体が目的の標的遺伝子座に結合する。詳細な実施形態において、目的の標的遺伝子座はＲＮＡを含む。本願は、ＲＮＡ配列特異的干渉、ＲＮＡ配列特異的遺伝子調節、ＲＮＡ若しくはＲＮＡ産物又はｌｉｎｃＲＮＡ又は非コードＲＮＡ、又は核ＲＮＡ、又はｍＲＮＡのスクリーニング、突然変異誘発、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション、又は育種における活性が増加したＣｃ２エフェクタータンパク質の使用を更に提供する。

【０４４２】

本発明は以下の実施例に更に記載され、実施例は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【０４４３】

実施例１－一般的プロトコル

ＤＮＡ及びＲＮＡのＣ２ｃ２診断検査を実施する２つの方法を提供する。このプロトコルはまた、検出アプタマーの送達後にタンパク質検出変異体と共に使用することもできる。第１の方法は二段階反応であり、ここでは増幅及びＣ２ｃ２検出が別個に行われる。第２の方法は、全てが１つの反応に組み合わされる場合であり、これは二段階反応と呼ばれる。高濃度試料については増幅は必ずしも必要でなく、そのため増幅が組み込まれていない別個のＣ２ｃ２プロトコルがあれば好ましい点に留意することは重要である。

【０４４４】

**CRISPR エフェクターのみ – 増幅なし:**

| 成分 | 容積 (μL) |
|---|---|
| タンパク質 (44 nM 最終) | 2 |
| crRNA (12 nM 最終) | 1 |
| バックグラウンド標的 (100 ng 合計) | 1 |
| 標的 RNA (可変) | 1 |
| RNA センサープローブ (125 nM) | 4 |
| $MgCl_2$ (6 mM 最終) | 2 |
| 反応緩衝液 10x | 2 |
| RNAse 阻害薬 (NEB からのマウス) | 2 |
| $H_2O$ | 5 |
| | |
| **合計** | **20** |

【０４４５】
反応緩衝液は：４０ｍＭトリス－ＨＣｌ、６０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．３である。
【０４４６】
この反応を３７℃で２０分～３時間実施する。励起：４８５ｎｍ／２０ｎｍ、発光：５２８ｎｍ／２０ｎｍで読み取る。単一分子感度のシグナルは２０分から始めて検出してもよく、しかし当然ながら反応時間が長いほど感度は高くなる。

**二段階反応:**

*RPA 増幅混合物*

| 成分 | 容積 (μL) |
|---|---|
| プライマーA (100 μM) | 0.48 |
| プライマーB (100 μM) | 0.48 |
| RPA 緩衝液 | 59 |
| MgAc | 5 |
| 標的 (可変濃度) | 5 |
| ATP (NEB キットから 100 μM) | 2 |
| GTP (NEB キットから 100 μM) | 2 |
| UTP (NEB キットから 100 μM) | 2 |
| CTP (NEB キットから 100 μM) | 2 |
| T7 ポリメラーゼ (NEB キットから) | 2 |
| $H_2O$ | 25 |
| | |
| **合計** | **104.96** |

【０４４７】
この反応を一緒に混合し、次にフリーズドライした酵素混合物の２～３本のチューブを再懸濁する）。５μＬの２８０ｍＭ　ＭｇＡｃを混合物に加えて反応を開始させる。反応を１０～２０分間実施する。各反応は２０μＬであり、従ってこれは最大５つの反応に十分である。

*C2c2 検出混合物*

| 成分 | 容積 (μL) |
|---|---|
| タンパク質 (44 nM 最終) | 2 |
| crRNA (12 nM 最終) | 1 |
| バックグラウンド標的 (100 ng 合計) | 1 |
| RPA 反応 | 1 |
| RNA センサープローブ (125 nM) | 4 |
| $MgCl_2$ (6 mM 最終) | 2 |
| 反応緩衝液 10x | 2 |
| RNAse 阻害薬 (NEB からのマウス) | 2 |
| $H_2O$ | 5 |
| | |
| **合計** | **20** |

【０４４８】
反応緩衝液は：４０ｍＭトリス－ＨＣｌ、６０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．３である。
【０４４９】
これを２０分～３時間実施する。単一分子感度を見るための最小検出時間は約２０分である。反応をより長く実施するだけで感度がブーストされる。

**ワンポット反応:**

| 成分 | 容積 (μL) |
|---|---|
| プライマーA (100 μM) | 0.48 |
| プライマーB (100 μM) | 0.48 |
| RPA 緩衝液 | 59 |
| MgAc | 5 |
| Lw2C2c2 (44 nM 最終) | 2 |
| crRNA (12 nM 最終) | 2 |
| バックグラウンド RNA (250 ng/μL から) | 2 |
| RNAse alert 基質 (20 μL 中に再懸濁後) | 5 |
| NEB からのマウス RNAse 阻害薬 | 10 |
| 標的 (可変濃度) | 5 |
| ATP (NEB キットから 100 μM) | 2 |
| GTP (NEB キットから 100 μM) | 2 |
| UTP (NEB キットから 100 μM) | 2 |
| CTP (NEB キットから 100 μM) | 2 |
| T7 ポリメラーゼ (NEB キットから) | 2 |
| $H_2O$ | 4 |
| | |
| **合計** | **104.96** |

【０４５０】
参照されるＮＥＢキットは、ＨｉｇｈＳｃｒｉｂｅ　Ｔ７高収率キットである。緩衝液の再懸濁には、１．５×濃度を使用する：５９μＬの緩衝液中、フリーズドライ基材の３本のチューブを再懸濁し、上記の混合物中に使用する。各反応は２０μＬであり、従ってこれは５つの反応相当に十分である。この反応の単一分子感度は、僅か３０～４０分の早さで観察されている。
【０４５１】
実施例２－レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）由来のＣ２ｃ２は極めて高感度で特異的なＤＮＡ及びＲＮＡ検出を媒介する
迅速で安価、且つ高感度の核酸検出は、ポイント・オブ・ケア病原体検出、遺伝子タイ

ピング、及び疾患モニタリングに役立ち得る。ＲＮＡガイド下ＲＮＡターゲティングＣＲＩＳＰＲエフェクターＣａｓ１３ａ（別称Ｃ２ｃ２）は、標的認識時に広域ＲＮａｓｅ活性の「コラテラル効果」を呈する。本出願人はＣａｓ１３ａのコラテラル効果を等温増幅と組み合わせて、アトモル濃度感度及び一塩基ミスマッチ特異性での迅速なＤＮＡ又はＲＮＡ検出を提供するＣＲＩＳＰＲベースの診断法（ＣＲＩＳＰＲ－Ｄｘ）を確立した。本出願人は、ＳＨＥＲＬＯＣＫ（Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｈｉｇｈ Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ Ｅｎｚｙｍａｔｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｅｒ ＵｎＬＯＣＫｉｎｇ：特異的高感度酵素的レポーターアンロッキング）と称されるこのＣａｓ１３ａベースの分子検出プラットフォームを使用して、ジカ及びデングウイルスの特異的株を検出し、病原性細菌を区別し、ヒトＤＮＡを遺伝子タイピングし、及び無細胞腫瘍ＤＮＡ突然変異を同定した。更に、ＳＨＥＲＬＯＣＫ反応試薬は、コールドチェーン非依存性及び長期保存のため凍結乾燥して、実地適用向けに紙上で容易に再構成することができる。

【０４５２】

携帯プラットフォーム上で核酸を高感度且つ一塩基特異性で迅速に検出可能であることは、疾患診断及びモニタリング、疫学、及び一般的な検査室作業において役立ち得る。核酸を検出する方法は存在するが（１～６）、それらは、感度、特異性、単純さ、コスト、及び速さの間でトレードオフを呈する。微生物のクラスター化した規則的な配置の短い回文配列リピート（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔｓ：ＣＲＩＳＰＲ）及びＣＲＩＳＰＲ関連（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ）適応免疫系は、ＣＲＩＳＰＲベースの診断（ＣＲＩＳＰＲ－Ｄｘ）に利用することができるプログラム可能なエンドヌクレアーゼを含む。一部のＣａｓ酵素はＤＮＡを標的とするが（７、８）、単一エフェクターＲＮＡガイド下ＲＮａｓｅ、例えばＣａｓ１３ａ（別称Ｃ２ｃ２）（８）はＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）で再プログラム化することができ（９～１１）、特異的ＲＮＡセンシング用のプラットフォームを提供し得る。そのＲＮＡ標的を認識すると、活性化したＣａｓ１３ａは近傍の標的でないＲＮＡの「コラテラル」切断に関与する（１０）。このｃｒＲＮＡプログラム化コラテラル切断活性により、Ｃａｓ１３ａは、プログラム細胞死の惹起によってインビボで（１０）、又は標識されたＲＮＡの非特異的分解によってインビトロで（１０、１２）、特異的ＲＮＡの存在を検出することが可能になる。ここで本出願人はＳＨＥＲＬＯＣＫ（Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｈｉｇｈ Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ Ｅｎｚｙｍａｔｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｅｒ ＵｎＬＯＣＫｉｎｇ：特異的高感度酵素的レポーターアンロッキング）について記載し、これは、核酸増幅及び市販のレポーターＲＮＡの３つのＣａｓ１３ａ媒介性コラテラル切断に基づくアトモル濃度感度のインビトロ核酸検出プラットフォームであり（１２）、標的のリアルタイム検出を可能にする（図１７）。

【０４５３】

方法

発現のためのＣ２ｃ２遺伝子座及びタンパク質のクローニング

細菌インビボ効率アッセイのため、レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ）Ｆ０２７９及びレプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ）由来のＣ２ｃ２タンパク質を哺乳類発現用のコドン最適化遺伝子として注文し（Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ，Ｊｉａｎｇｓｕ，Ｃｈｉｎａ）、β－ラクタマーゼターゲティング又はノンターゲティングスペーサーのいずれかに隣接する対応するダイレクトリピートと共にｐＡＣＹＣ１８４骨格にクローニングした。スペーサー発現はＪ２３１１９プロモーターによってドライブされた。

【０４５４】

タンパク質精製のため、哺乳類コドン最適化Ｃ２ｃ２タンパク質をタンパク質精製のため細菌発現ベクターにクローニングした（６×Ｈｉｓ／Ｔｗｉｎ Ｓｔｒｅｐ ＳＵＭＯ、Ｉｌｙａ Ｆｉｎｋｅｌｓｔｅｉｎから供与されたｐＥＴベースの発現ベクター）。

【０４５５】

細菌インビボＣ２ｃ２効率アッセイ

ＬｗＣ２ｃ２及びＬｓｈＣ２ｃ２インビボ効率プラスミド及び以前記載があるβ－ラクタマーゼプラスミド（Ａｂｕｄａｙｙｅｈ ２０１６）をＮｏｖａＢｌｕｅ Ｓｉｎｇｌｅｓコンピテント細胞（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）にそれぞれ９０ｎｇ及び２５ｎｇで同時形質転換した。形質転換後、細胞の希釈物をアンピシリン及びクロラムフェニコール（ｃｈｏｒａｍｐｈｉｃｏｌ）ＬＢ寒天平板にプレーティングし、３７℃で一晩インキュベートした。翌日、コロニーをカウントした。

【０４５６】

核酸標的及びｃｒＲＮＡ調製

核酸標的はＫＡＰＡ Ｈｉｆｉ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ（Ｋａｐａ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）でＰＣＲ増幅し、ゲル抽出し、ＭｉｎＥｌｕｔｅゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して精製した。精製したｄｓＤＮＡをＨｉＳｃｒｉｂｅ Ｔ７ Ｑｕｉｃｋ高収率ＲＮＡ合成キット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用してＴ７ポリメラーゼと共に３０℃で一晩インキュベートし、ＭＥＧＡｃｌｅａｒ転写クリーンアップキット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）でＲＮＡを精製した。

【０４５７】

ｃｒＲＮＡの調製については、構築物をＴ７プロモーター配列が付加されたＤＮＡとして注文した（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）。ｃｒＲＮＡ ＤＮＡを短いＴ７プライマーにアニーリングさせて（最終濃度１０ｕＭ）、ＨｉＳｃｒｉｂｅ Ｔ７ Ｑｕｉｃｋ高収率ＲＮＡ合成キット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用してＴ７ポリメラーゼと共に３７℃で一晩インキュベートした。ＲＮＡＸＰクリーンビーズ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を追加的な１．８×のイソプロパノール添加物（Ｓｉｇｍａ）と共に反応容積に対して２倍比のビーズで使用してｃｒＲＮＡを精製した。

【０４５８】

ＮＡＳＢＡ等温増幅

ＮＡＳＢＡ反応の詳細は、［Ｐａｒｄｅｅ ２０１６］に記載されている。２０μＬ総反応容積につき、６．７μＬの反応緩衝液（Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＮＥＣＢ－２４）、３．３μＬのヌクレオチド混合物（Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＮＥＣＮ－２４）、０．５μＬのヌクレアーゼフリー水、０．４μＬの１２．５μＭ ＮＡＳＢＡプライマー、０．１ｕＬのＲＮａｓｅ阻害薬（Ｒｏｃｈｅ、０３３３５４０２００１）及び４μＬのＲＮＡアンプリコン（又は陰性対照については水）を４℃でアセンブルし、６５℃で２分間、次に４１℃で１０分間インキュベートした。各反応に５μＬの酵素混合物（Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＮＥＣ－１－２４）を加え、反応混合物を４１℃で２時間インキュベートした。使用したＮＡＳＢＡプライマーは５’－ＡＡＴＴＣＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＧＡＴＣＣＴＣＴＡＧＡＡＡＴＡＴＧＧＡＴＴ－３’（配列番号１６）及び５’－ＣＴＣＧＴＡＴＧＴＴＧＴＧＴＧＧＡＡＴＴＧＴ－３’（配列番号１７）であった。下線の部分はＴ７プロモーター配列を示す。

【０４５９】

リコンビナーゼポリメラーゼ増幅

ＲＰＡ用のプライマーはＮＣＢＩプライマーｂｌａｓｔ（Ｙｅ ｅｔ ａｌ．，ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｉｃｓ １３，１３４（２０１２）を用いて設計し、これにはアンプリコンサイズ（１００～１４０ｎｔ）、プライマー融解温度（５４℃～６７℃）及びプライマーサイズ（３０～３５ｎｔ）を除いてデフォルトパラメータを使用した。次にプライマーをＤＮＡとして注文した（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）。

【０４６０】

ＲＰＡ及びＲＴ－ＲＰＡ反応ランは、それぞれ、ＴｗｉｓｔＡｍｐ（登録商標）Ｂａｓｉｃ又はＴｗｉｓｔＡｍｐ（登録商標）Ｂａｓｉｃ ＲＴ（ＴｗｉｓｔＤｘ）で指図されるとおりとし、但し入力鋳型の前に２８０ｍＭ ＭｇＡｃを加えた。反応は、特に記載がない限り、１ｕＬの入力で３７℃で２時間実行した。

【０４６１】
ＬｗＣ２ｃ２タンパク質精製
Ｃ２ｃ２細菌発現ベクターをＲｏｓｅｔｔａ（商標）２（ＤＥ３）ｐＬｙｓＳ Ｓｉｎｇｌｅｓコンピテント細胞（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）に形質転換した。１６ｍＬスターター培養物をＴｅｒｒｉｆｉｃ Ｂｒｏｔｈ ４成長培地（１２ｇ／Ｌトリプトン、２４ｇ／Ｌ酵母エキス、９．４ｇ／Ｌ Ｋ２ＨＰＯ、２．２ｇ／Ｌ ＫＨ２ＰＯ４、Ｓｉｇｍａ）（ＴＢ）で成長させて、４ＬのＴＢの接種に使用し、これを３７℃、３００ＲＰＭでＯＤ６００が０．６になるまでインキュベートした。０．６になった時点で、ＩＰＴＧ（Ｓｉｇｍａ）を５００ｕＭの最終濃度となるように添加してタンパク質発現を誘導し、細胞をタンパク質発現のため１８℃に１６時間冷却した。次に細胞を５２００ｇ、１５分、４℃で遠心した。細胞ペレットを回収し、後の精製のため－８０℃で保存した。
【０４６２】
後続のタンパク質精製ステップは全て４℃で実施される。細胞ペレットを粉砕し、プロテアーゼ阻害薬（Ｃｏｍｐｌｅｔｅ Ｕｌｔｒａ ＥＤＴＡ不含錠剤）、リゾチーム、及びベンゾナーゼを添加した溶解緩衝液（２０ｍＭトリス－Ｈｃｌ、５００ｍＭ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＤＴＴ、ｐＨ８．０）に再懸濁し、続いて以下の条件で超音波処理した（Ｓｏｎｉｆｉｅｒ ４５０、Ｂｒａｎｓｏｎ、Ｄａｎｂｕｒｙ、ＣＴ）：１秒オン及び２秒オフにつき１００の振幅、総超音波処理時間１０分。ライセートを４℃、１０，０００ｇで１時間遠心することにより清澄化し、上清をＳｔｅｒｉｃｕｐ ０．２２ミクロンフィルタ（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）でろ過した。ろ過した上清をＳｔｒｅｐＴａｃｔｉｎセファロース（ＧＥ）に加え、回転させながら１時間インキュベートし、続いてタンパク質が結合したＳｔｒｅｐＴａｃｔｉｎ樹脂を溶解緩衝液で３回洗浄した。この樹脂をＳＵＭＯ消化緩衝液（３０ｍＭトリス－ＨＣｌ、５００ｍＭ ＮａＣｌ １ｍＭ ＤＴＴ、０．１５％Ｉｇｅｐａｌ（ＮＰ－４０）、ｐＨ８．０）に２５０単位のＳＵＭＯプロテアーゼ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）と共に再懸濁し、４℃で回転させながら一晩インキュベートした。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びクーマシーブルー（Ｃｏｍｍａｓｓｉｅ Ｂｌｕｅ）染色によって消化を確認し、樹脂をスピンダウンすることによりタンパク質溶出物を単離した。タンパク質をＦＰＬＣ（ＡＫＴＡ ＰＵＲＥ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）による5ｍＬ ＨｉＴｒａｐ ＳＰ ＨＰ陽イオン交換カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）にロードし、溶出緩衝液（２０ｍＭトリス－ＨＣｌ、１ｍＭ ＤＴＴ、５％ グリセロール、ｐＨ８．０）中１３０ｍＭから２ＭのＮａＣｌ塩勾配で溶出させた。得られた画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥによってＬｗＣ２ｃ２の存在に関して試験し、タンパク質を含有する画分をプールし、遠心フィルタユニットでＳ２００緩衝液（１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１Ｍ ＮａＣｌ、５ｍＭ ＭｇＣｌ２、２ｍＭ ＤＴＴ、ｐＨ７．０）中１ｍＬに濃縮した。濃縮されたタンパク質をＦＰＬＣによるゲルろ過カラム（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）２００ Ｉｎｃｒｅａｓｅ １０／３００ ＧＬ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）にロードした。ゲルろ過からの得られた画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析し、ＬｗＣ２ｃ２を含有する画分をプールし、保存緩衝液（６００ｍＭ ＮａＣｌ、５０ｍＭトリス－ＨＣｌ ｐＨ７．５、５％グリセロール、２ｍＭ ＤＴＴ）で緩衝液交換し、保存のため－８０℃で凍結した。
【０４６３】
ＬｗＣ２ｃ２コラテラル検出
ヌクレアーゼアッセイ緩衝液（４０ｍＭトリス－ＨＣｌ、６０ｍＭ ＮａＣｌ、６ｍＭ ＭｇＣｌ２、ｐＨ７．３）中の、特に指示されない限り、４５ｎＭ精製ＬｗＣ２ｃ２、２２．５ｎＭ ｃｒＲＮＡ、１２５ｎＭ基質レポーター（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ＲＮＡｓｅ Ａｌｅｒｔ ｖ２）、２μＬマウスＲＮａｓｅ阻害薬、１００ｎｇのバックグラウンド全ＲＮＡ及び各種量の入力核酸標的で検出アッセイを実施した。入力がＲＰＡ反応からのＴ７プロモーターを含む増幅ＤＮＡであった場合、上記のＣ２ｃ２反応を、１ｍＭ ＡＴＰ、１ｍＭ ＧＴＰ、１ｍＭ ＵＴＰ、１ｍＭ ＣＴＰ及び０．６μＬ Ｔ７ポリメラーゼ混合物（ＮＥＢ）が含まれるように改変した。反応を蛍光プレートリーダー

（ＢｉｏＴｅｋ）上で３７℃で１～３時間（特に指示されない限り）進行させて、蛍光動態を５分毎に測定した。

【０４６４】

上記の反応条件をＲＰＡ増幅混合物と統合することにより、ＲＰＡ－ＤＮＡ増幅、ＤＮＡからＲＮＡへのＴ７ポリメラーゼ変換及びＣ２ｃ２検出を含むワンポット反応を実施した。簡潔に言えば、５０μＬにおいてワンポットアッセイは、０．４８μＭフォワードプライマー、０．４８μＭリバースプライマー、１×ＲＰＡ再水和緩衝液、各種量のＤＮＡ入力、４５ｎＭ ＬｗＣ２ｃ２組換えタンパク質、２２．５ｎＭ ｃｒＲＮＡ、２５０ｎｇバックグラウンド全ＲＮＡ、２００ｎＭ基質レポーター（ＲＮａｓｅ ａｌｅｒｔ ｖ２）、４ｕＬ ＲＮａｓｅ阻害薬、２ｍＭ ＡＴＰ、２ｍＭ ＧＴＰ、２ｍＭ ＵＴＰ、２ｍＭ ＣＴＰ、１μＬ Ｔ７ポリメラーゼ混合物、５ｍＭ ＭｇＣｌ２、及び１４ｍＭ ＭｇＡｃからなった。

【０４６５】

ＴａｑＭａｎプローブによる定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）分析

ＳＨＥＲＬＯＣＫ定量化を他の確立された方法と比較するため、ｓｓＤＮＡ １の希釈系列でｑＰＣＲを実施した。ＴａｑＭａｎプローブ及びプライマーセット（以下の配列）をｓｓＤＮＡ １に対して設計し、ＩＤＴが合成した。アッセイはＴａｑＭａｎ Ｆａｓｔ Ａｄｖａｎｃｅｄマスターミックス（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して実施し、Ｒｏｃｈｅ ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ ４８０で測定した。

qPCR プライマー/プローブ配列の表

| 名称 | 配列 |
|---|---|
| フォワードプライマー | GTG GAA TTG TGA GCG GAT AAA C (配列番号 420) |
| リバースプライマー | AAC AGC AAT CTA CTC GAC CTG (配列番号 421) |
| TaqMan プローブ | /56-FAM/AGGAAACAG/ZEN/CTATGACCATGATTACGCC/3IABkFQ/ (配列番号 422 及び 423) |

【０４６６】

ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ ＩＩによるリアルタイムＲＰＡ

ＳＨＥＲＬＯＣＫ定量化を他の確立された方法と比較するため、本出願人は、ｓｓＤＮＡ １の希釈系列でＲＰＡを実施した。ＤＮＡの蓄積をリアルタイムで定量化するため、本出願人は上記に記載する典型的なＲＰＡ反応混合物に１×ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ ＩＩ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を加えた。これは核酸の量と相関する蛍光シグナルを提供する。反応を蛍光プレートリーダー（ＢｉｏＴｅｋ）上で３７℃で１時間進行させて、蛍光動態を５分毎に測定した。

【０４６７】

レンチウイルス調製及び処理

レンチウイルスの調製及び処理は、以前公知の方法に基づいた。簡潔に言えば、ジカ又はデングＲＮＡ断片を含む１０μｇのｐＳＢ７００誘導体、７．５μｇ ｐｓＰＡＸ２、及び２．５μｇ ｐＭＤ２．ＧをＨｅＢＳ－ＣａＣｌ２法を用いてＨＥＫ２９３ＦＴ細胞（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｒ７００７）にトランスフェクトした。培地交換の２８時間後、１０％ＦＢＳ、１％ペニシリン－ストレプトマイシン及び４ｍＭ ＧｌｕｔａＭＡＸ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を添加したＤＭＥＭ、上清を０．４５μｍシリンジフィルタを使用してろ過した。ＶｉｒａｌＢｉｎｄレンチウイルス精製キット（Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌａｂｓ、ＶＰＫ－１０４）及びＬｅｎｔｉ－Ｘ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、６３１２３１）を使用して上清からレンチウイルスを精製及び調製した。ＱｕｉｃｋＴｉｔｅｒレンチウイルスキット（Ｃｅｌｌ

Ｂｉｏｌａｂｓ、ＶＰＫ－１１２）を使用してウイルス濃度を定量化した。ウイルス試料を７％ヒト血清（Ｓｉｇｍａ、Ｈ４５２２）にスパイクし、９５℃に２分間加熱して、ＲＰＡへの入力として使用した。

【０４６８】

ジカヒト血清試料の単離及びｃＤＮＡ精製

疑わしいジカ陽性ヒト血清又は尿試料をＡＶＬ緩衝液（Ｑｉａｇｅｎ）で不活性化し、ＱＩＡａｍｐウイルスＲＮＡミニキット（Ｑｉａｇｅｎ）でＲＮＡの単離を実現した。ランダムプライマー、ｄＮＴＰ、及び試料ＲＮＡを混合し、続いて７０℃で７分間熱変性させることにより、単離されたＲＮＡをｃＤＮＡに変換した。次に熱変性したＲＮＡをＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と２２～２５℃で１０分、５０℃で４５分、５５℃で１５分、及び８０℃で１０分インキュベートして逆転写した。次にｃＤＮＡをＲＮＡｓｅ　Ｈ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）と３７℃で２０分インキュベートしてＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッド中のＲＮＡを破壊した。

【０４６９】

ヒト唾液からのゲノムＤＮＡ抽出

採取前３０分間は飲食物の摂取を制限されたボランティアから２ｍＬの唾液を採取した。次にＱＩＡａｍｐ（登録商標）ＤＮＡ血液ミニキット（Ｑｉａｇｅｎ）をキットプロトコルの推奨どおり使用して試料を処理した。煮沸した唾液試料について、１００μＬのボランティア唾液に４００μＬのリン酸緩衝生理食塩水（Ｓｉｇｍａ）を加え、１８００ｇで５分間遠心した。上清をデカントし、０．２％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ）を含むリン酸緩衝生理食塩水にペレットを再懸濁した後、９５℃で５分間インキュベートした。ＲＰＡ反応への直接入力として１μＬの試料を使用した。

【０４７０】

フリーズドライ及び紙への堆積

ガラス繊維ろ紙（Ｗｈａｔｍａｎ、１８２７－０２１）を９０分間オートクレーブにかけ（Ｃｏｎｓｏｌｉｄａｔｅｄ　Ｓｔｉｌｌｓ　ａｎｄ　Ｓｔｅｒｉｌｉｚｅｒｓ，ＭＫＩＩ）、５％ヌクレアーゼフリーＢＳＡ（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、１２６６０９－１０ＧＭ）で一晩ブロックした。紙をヌクレアーゼフリー水（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＡＭ９９３２）で１回リンスした後、４％ＲＮＡｓｅｃｕｒｅ（商標）（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＡＭ７００６）と６０℃で２０分間インキュベートし、ヌクレアーゼフリー水で更に３回洗浄した。処理した紙は使用前にホットプレート（Ｃｏｌｅ－Ｐａｒｍｅｒ、ＩＫＡ　Ｃ－Ｍａｇ　ＨＳ７）上で８０℃で２０分間乾燥させた。先に示したとおりの１．８μＬのＣ２ｃ２反応混合物を、黒色の透明底３８４ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、３５４４）に置かれたディスク（２ｍｍ）上に置いた。フリーズドライ試験のため、Ｐａｒｄｅｅ　ｅｔ　ａｌ（２）に記載されるとおり、反応混合物ディスクが入ったプレートを液体窒素で急速凍結し、一晩フリーズドライした。ＲＰＡ試料をヌクレアーゼフリー水で１：１０希釈し、１．８μＬの混合物を紙のディスク上にロードし、プレートリーダー（ＢｉｏＴｅｋ　Ｎｅｏ）を使用して３７℃でインキュベートした。

【０４７１】

細菌ゲノムＤＮＡ抽出

ＣＲＥ検出が関わる実験のため、細菌培養物を溶原性ブロス（ＬＢ）中で対数期中期まで成長させて、次にペレット化し、グラム陰性菌又はグラム陽性菌のいずれかについての製造者のプロトコルを適宜用いてＱｉａｇｅｎ　ＤＮｅａｓｙ血液及び組織キットを使用したｇＤＮＡ抽出及び精製に供した。Ｑｕｂｉｔ蛍光光度計でＱｕａｎｔ－Ｉｔ　ｄｓＤＮＡアッセイによってｇＤＮＡを定量化し、Ｎａｎｏｄｒｏｐ分光光度計で２００～３００ｎｍ吸光度スペクトルによってそのクオリティを評価した。

【０４７２】

大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）と緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）とを判別する実験のため、細菌培養物を固定相初期までルリア・ベルターニ（ＬＢ）ブロス中で成長させた。１．０ｍＬの大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）及び緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の両方を携

帯ＰｕｒｅＬｙｓｅ細菌ｇＤＮＡ抽出キット（Ｃｌａｒｅｍｏｎｔ　ＢｉｏＳｏｌｕｔｉｏｎｓ）を使用して処理した。細菌培養物に１×結合緩衝液を加えた後、電池式溶解カートリッジに３分間通過させた。水中の０．５×結合緩衝液を洗浄溶液として使用した後、１５０μＬの水で溶出した。

【０４７３】

デジタルドロップＰＣＲ定量化

図１Ｃで使用したｓｓＤＮＡ　１及びｓｓＲＮＡ　１標準希釈物の濃度を確認するため、本出願人らはデジタルドロップレットＰＣＲ（ｄｄＰＣＲ）を実施した。ＤＮＡ定量化のため、ｄｄＰＣＲ　Ｓｕｐｅｒｍｉｘ　ｆｏｒ　Ｐｒｏｂｅｓ（ｎｏ　ｄＵＴＰ）をｓｓＤＮＡ　１配列を標的とするように設計されたＰｒｉｍｅＴｉｍｅ　ｑＰＣＲプローブ／プライマーアッセイと共に使用して液滴を作成した。ＲＮＡ定量化のため、プローブ用一段階ＲＴ－ｄｄＰＣＲキットをｓｓＲＮＡ　１配列を標的とするように設計されたＰｒｉｍｅＴｉｍｅ　ｑＰＣＲプローブ／プライマーアッセイと共に使用して液滴を作成した。いずれの場合にも、液滴はＱＸ２００ドロップレットジェネレーター（ＢｉｏＲａｄ）を使用して生成し、ＰＣＲプレートに移した。液滴ベースの増幅は、キットのプロトコルに記載されるとおりサーモサイクラー上で実施し、続いてＱＸ２００ドロップレットリーダーでの測定によって核酸濃度を決定した。

【０４７４】

ヒト遺伝子タイピング用の合成標準

ヒト試料遺伝子型の正確なコール用の標準を作成するため、本出願人はＳＮＰ標的の周りのプライマーを設計して、２つのホモ接合遺伝子型の各々に相当するヒトゲノムＤＮＡから約２００ｂｐ領域を増幅した。次にこれらのホモ接合性標準を１：１比で混合することによりヘテロ接合性標準を作成した。次にこれらの標準を等価なゲノム濃度に希釈し（約０．５６ｆｇ／μＬ）、実際のヒト試料と一緒にＳＨＥＲＬＯＣＫの入力として使用した。

腫瘍変異無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）の検出

実際の患者ｃｆＤＮＡ試料をシミュレートするモックｃｆＤＮＡ標準を市販業者（Ｈｏｒｉｚｏｎ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｇｒｏｕｐ）から購入した。ＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅ及びＥＧＦＲ　Ｌ８５８Ｒ突然変異体の両方について、これらの標準を４つのアレル率（１００％ＷＴ及び０．１％、１％、及び５％突然変異体）として提供した。ＳＨＥＲＬＯＣＫへの入力として、３μＬのこれらの標準を提供した。

【０４７５】

蛍光データの分析

バックグラウンド差し引き後の蛍光データを計算するため、試料の初期蛍光を差し引きして異なる条件間での比較を可能にした。バックグラウンド条件（入力なし又はｃｒＲＮＡなしのいずれかの条件）の蛍光を試料から差し引きして、バックグラウンド差し引き後の蛍光を生成した。

【０４７６】

各ガイドをガイド値の合計で除すことによりＳＮＰ又は株判別のガイド比を計算し、全体的な試料間変動を調整した。ＳＮＰ又は株判別のｃｒＲＮＡ比を計算して、以下のとおり全体的な試料間変動を調整した：

【数１】

$$crRNA\ A_i\ 比 = \frac{(m+n)A_i}{\sum_{i=1}^{m} A_i + \sum_{i=1}^{n} B_i}$$

式中、Ａｉ及びＢｉは、所与の個体に関するそれぞれアレルＡ又はアレルＢを検知するｃｒＲＮＡのテクニカルレプリケートｉのＳＨＥＲＬＯＣＫ強度値を指す。アッセイは典型的には１つのｃｒＲＮＡにつき４つのテクニカルレプリケートを有するため、ｍ及びｎは

４に等しく、分母は、所与のＳＮＰ遺伝子座及び個体のｃｒＲＮＡ　ＳＨＥＲＬＯＣＫ強度値の８つ全ての合計と等しい。２つのｃｒＲＮＡがあるため、ある個体についてｃｒＲＮＡの各々のｃｒＲＮＡ比平均は常に合計２になる。従って、ホモ接合の理想的な場合において、陽性アレルｃｒＲＮＡの平均ｃｒＲＮＡ比は２となり、陰性アレルｃｒＲＮＡの平均ｃｒＲＮＡ比は０となる。ヘテロ接合の理想的な場合において、２つのｃｒＲＮＡの各々の平均ｃｒＲＮＡ比は１となる。

【０４７７】

ＬｗＣａｓ１３ａ切断要件の特徴付け

プロトスペーサー隣接部位（ＰＦＳ）は、Ｃａｓ１３ａによるロバストなリボヌクレアーゼ活性に必要な、標的部位の近傍に存在する特異的モチーフである。ＰＦＳは、標的部位の３’末端に位置し、以前、ＬｓｈＣａｓ１３ａについて本発明者らのグループによってＨ（Ｇでなく）として特徴付けられた（１）。このモチーフは、ＤＮＡターゲティングクラス２システムの配列制限であるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）と似ているが、これは内因性システムにおいてＣＲＩＳＰＲ遺伝子座の自己ターゲティングの防止に関与しないため、機能上異なる。Ｃａｓ１３ａの更なる構造研究により、Ｃａｓ１３ａ：ｃｒＲＮＡ標的複合体形成及び切断活性にとってのＰＦＳの重要性が解明される可能性が高いであろう。

【０４７８】

本出願人は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）から組換えＬｗＣａｓ１３ａタンパク質を精製し（図２Ｄ～図２Ｅ）、可能な各プロトスペーサー隣接部位（ＰＦＳ）ヌクレオチド（Ａ、Ｕ、Ｃ又はＧ）で１７３ｎｔ　ｓｓＲＮＡを切断する能力をアッセイした（図２Ｆ）。ＬｓｈＣａｓ１３ａと同様に、ＬｗＣａｓ１３ａはＡ、Ｕ、又はＣ　ＰＦＳで標的をロバストに切断することができ、Ｇ　ＰＦＳではｓｓＲＮＡに対する活性は低い。Ｇ　ＰＦＳではｓｓＲＮＡ　１に対する活性がより弱いことが観察されたが、本出願人は、Ｇ　ＰＦＳモチーフで２つの標的部位になおもロバストな検出を認めた（表３；ｒｓ６０１３３８　ｃｒＲＮＡ及びジカターゲティングｃｒＲＮＡ　２）。Ｈ　ＰＦＳはいずれの状況下でも不要のように思われ、多くの場合にＧ　ＰＦＳで強力な切断又はコラテラル活性を実現することができる。

【０４７９】

リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）及び他の等温増幅戦略の考察

リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）は、３つの必須酵素：リコンビナーゼ、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）、及び鎖置換ポリメラーゼからなる等温増幅法である。ＲＰＡは、全ての酵素が約３７℃の一定温度で働くため温度調節が不要であることにより、他の増幅戦略、特にポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）に存在する多くの技術的困難を解消する。ＲＰＡでは、二本鎖鋳型の融解及びプライマーアニーリングのための温度サイクリングが、インビボＤＮＡ複製及び修復から着想を得た酵素的手法に置き換えられる。リコンビナーゼ－プライマー複合体が二本鎖ＤＮＡをスキャンし、相補的部位で鎖交換を促進する。鎖交換はＳＳＢによって安定化され、プライマーが結合したままでいることが可能になる。リコンビナーゼの自発的な取外しがそのＡＤＰ結合状態で起こり、鎖置換ポリメラーゼが侵入してプライマーを伸長させることが可能になり、ポイント・オブ・ケア及び実地環境では利用可能でない複雑な器具類がなくても増幅が可能になる。３７～４２℃の穏和な範囲でのこのプロセスのサイクル反復により、指数関数的ＤＮＡ増幅がもたらされる。当初発表された配合は、鎖置換ポリメラーゼとしてバチルス・スブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）Ｐｏｌ　Ｉ（Ｂｓｕ）、リコンビナーゼとしてＴ４ｕｖｓＸ、及び一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質としてＴ４　ｇｐ３２を使用し（２）、しかしながら本研究に使用したＴｗｉｓｔＤｘによって販売されている現在の配合中にどの成分があるのかは不明である。

【０４８０】

加えて、ＲＰＡには幾つもの制限がある：

１）Ｃａｓ１３ａ検出は定量的であるが（図１５）、リアルタイムＲＰＡ定量化は、リコ

ンビナーゼが全ての利用可能なＡＴＰを使用するときのその急速な飽和に起因して困難であり得る。リアルタイムＰＣＲは増幅サイクル能力に起因して定量的であるが、ＲＰＡは、増幅速度を厳密に制御する機構を有しない。利用可能なマグネシウム又はプライマー濃度の減少、反応温度の低下、又は不十分なプライマーの設計など、特定の調整を行って増幅速度を減速させることができる。図３１、図３２、及び図５２などに定量的ＳＨＥＲＬＯＣＫの一部の例が観察されるが、必ずしも該当するわけではなく、鋳型に依存し得る。２）ＲＰＡ効率はプライマー設計に敏感であり得る。製造者は、典型的には、より長いプライマーを設計して平均ＧＣ含量（４０～６０％）での効率的なリコンビナーゼ結合を確実にし、最大１００プライマー対のスクリーニングによって極めて高感度のプライマー対を見つけ出すことを推奨する。本出願人は、ＳＨＥＲＬＯＣＫでは、単一分子感度でアトモル濃度検査を実現するのに僅か２つのプライマー対を設計するだけでよいことを見出した。このロバスト性は、アンプリコン増幅におけるいかなる非効率性も相殺する構成的に活性なＣａｓ１３ａコラテラル活性による更なるシグナル増幅に起因するものと思われる。このクオリティは、図３４における本発明者らの細菌性病原体同定にとって特に重要である。ＲＰＡには融解ステップが含まれないため、細菌ゲノムにおける１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子部位などの高度に構造化された領域を増幅することに伴い問題に直面した。従って、プライマーの二次構造が問題となり、増幅効率、ひいては感度を制限する。本明細書に開示される実施形態は、Ｃａｓ１３ａからの更なるシグナル増幅に起因して、こうしたＲＰＡに特異的な問題にも関わらず成功するものと思われた。

３）効率的なＲＰＡには、増幅配列長さは短くなければならない（１００～２００ｂｐ）。多くの適用には、これは重大な問題ではなく、恐らくは有利とさえ言える（例えば平均断片サイズが１６０ｂｐである場合のｃｆＤＮＡ検出）。時に、細菌検出のためユニバーサルプライマーが所望されるときなど、大きいアンプリコン長さが重要であり、判別用のＳＮＰは大きい範囲に広がる。

【０４８１】

ＳＨＥＲＬＯＣＫのモジュール性により、Ｔ７転写及びＣａｓ１３ａ検出前に、非等温手法であっても、任意の増幅技法を使用することが可能になる。このモジュール性は、単一の反応内でＴ７ステップとＣａｓ１３ａステップとが両立することによって可能となり、Ｔ７プロモーターを有する任意の増幅されたＤＮＡ入力に対して検出を実施することが可能になる。ＲＰＡの使用前に、本発明者らの検出アッセイについて核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ）（３、４）を試みた（図１０）。しかしながらＮＡＳＢＡがＣａｓ１３ａの感度を劇的に向上させることはなかった（図１１及び図５３）。検出前に用いられる可能性のある他の増幅技法としては、ＰＣＲ、ループ媒介性等温増幅（ＬＡＭＰ）（５）、ストランド置換増幅（ＳＤＡ）（６）、ヘリカーゼ依存性増幅（ＨＤＡ）（７）、及びニッキング酵素増幅反応（ＮＥＡＲ）（８）が挙げられる。任意の等温技法を取り換え可能であることにより、ＳＨＥＲＬＯＣＫは、いずれか１つの増幅技法の特異的制限を解消することが可能である。

【０４８２】

エンジニアリングされたミスマッチの設計

本出願人は、標的：ｃｒＲＮＡ二重鎖に２つ以上のミスマッチがあるときＬｓｈＣａｓ１３ａ標的切断が減少したが、単一ミスマッチによる影響は比較的小さかったことを実証し、これはＬｗＣａｓ１３ａコラテラル切断に関して出願人が確認した観察である（図３６Ａ）。本出願人はｃｒＲＮＡスペーサー配列に追加的な突然変異を導入することにより、本出願人は、単一ミスマッチのみの場合に考えられるとおりのオンターゲットコラテラル切断は維持しつつ、更なるミスマッチ（合計２つのミスマッチ）を有する標的に対するコラテラル切断を不安定化させることができると仮定した。特異性の増加をエンジニアリングする可能性を試験するため、本出願人は、ｓｓＲＮＡ　１を標的とする複数のｃｒＲＮＡを設計し、ｃｒＲＮＡの長さにわたってミスマッチを含むことにより（図３６Ａ）、オンターゲットコラテラル切断を最適化し、単一ミスマッチだけ異なる標的のコラテラル切断を最小限に抑えた。本出願人は、これらのミスマッチがｓｓＲＮＡ　１のコラテラル

切断を低下させなかったが、更なるミスマッチを含む標的（ｓｓＲＮＡ　２）についてシグナルが有意に減少したことを観察した。設計されたｃｒＲＮＡでｓｓＲＮＡ　１と２との間を最良に区別したものは、ｓｓＲＮＡ　２ミスマッチの近くに合成ミスマッチを含み、ハイブリダイズしたＲＮＡに事実上「バブル」、又は歪みを作り出した。標的に存在する合成ミスマッチと更なるミスマッチとの協調（即ち、ダブルミスマッチ）によって生じる感度の消失は、連続的な又は近傍のダブルミスマッチに対するＬｓｈＣａｓ１３ａ及びＬｗＣａｓ１３ａの感度と一致し、単一ヌクレオチド区別を可能にするｃｒＲＮＡの合理的設計の基礎を呈する（図３６Ｂ）。

【０４８３】

ＺＩＫＶ及びＤＥＮＶ株のミスマッチ検出のため、本発明者らの完全長ｃｒＲＮＡは２つのミスマッチを含んだ（図３７Ａ、図３７Ｂ）。株間の配列の相違が大きいため、本出願人は、２つのゲノム間に単一ヌクレオチドの違いのみがある２８ｎｔの連続ストレッチを見出すことができなかった。しかしながら、本出願人は、短いｃｒＲＮＡであればなおも機能性であろうと予測し、スペーサー配列に合成ミスマッチを含み且つ標的配列に１つのミスマッチのみを含んだ、２つのＺＩＫＶ株における標的に対するより短い２３ｎｔ　ｃｒＲＮＡを設計した。これらのｃｒＲＮＡであれば、なおもＺＩＫＶのアフリカ株とアメリカ株とを区別し得る可能性がある（図３６Ｃ）。続く２３ｎｔ及び２０ｎｔ　ｃｒＲＮＡを標的とする試験は、スペーサー長さを減らすと活性が低下するが、単一ミスマッチを区別する能力は維持又は増強されることを示す（図５７Ａ～図５７Ｇ）。合成ミスマッチをどのように導入して単一ヌクレオチド突然変異の区別を促進し得るかをより良く理解するため、本出願人は、３つの異なるスペーサー長さ：２８、２３、及び２０ｎｔでスペーサーの最初の７位置にわたって合成ミスマッチをタイリングした（図５７Ａ）。第３の位置に突然変異を有する標的上では、ＬｗＣａｓ１３ａは、合成ミスマッチがスペーサーの位置５に位置するときに最大限の特異性を示し、スペーサー長さが短いほど特異性が向上し、但しオンターゲット活性レベルは下がった（図５７Ｂ～図５７Ｇ）。本出願人はまた、標的突然変異を位置３～６にわたってシフトさせ、スペーサーにおいて突然変異の周りに合成ミスマッチをタイリングした（図５８）。

【０４８４】

合成標準を使用したＳＨＥＲＬＯＣＫによる遺伝子タイピング

ＳＮＰ遺伝子座のＰＣＲ増幅から作成された合成標準を評価することにより、遺伝子型を正確に同定することが可能である（図６０Ａ、図６０Ｂ）。個体の試料と合成標準とのＳＨＥＲＬＯＣＫ結果の全ての比較を計算することにより（ＡＮＯＶＡ）、最も類似したＳＨＥＲＬＯＣＫ検出強度を有する合成標準を見付けることによって各個別の遺伝子型を同定することができる（図６０Ｃ、図６０Ｄ）。このＳＨＥＲＬＯＣＫ遺伝子タイピング手法は、任意のＳＮＰ遺伝子座に一般化することが可能である（図６０Ｅ）。

【０４８５】

ＳＨＥＲＬＯＣＫは手頃な適合性のあるＣＲＩＳＰＲ－Ｄｘプラットフォームである

ＳＨＥＲＬＯＣＫのコスト分析については、ｃｒＲＮＡの合成用のＤＮＡ鋳型、ＲＰＡに使用したプライマー、一般的な緩衝液（ＭｇＣｌ２、トリスＨＣｌ、グリセロール、ＮａＣｌ、ＤＴＴ）、ガラスマイクロファイバーろ紙、及びＲＮＡｓｅｃｕｒｅ試薬を含め、無視できるコストであると決定された試薬を省いた。ＤＮＡ鋳型については、ＩＤＴからのｕｌｔｒａｍｅｒ合成が、４０回分のインビトロ転写反応用の材料（各々が約１０，０００回の反応に十分である）を約７０ドルで提供しており、ｃｒＲＮＡ合成に加えるコストは無視できた。ＲＰＡプライマーについては、３０ｎｔ　ＤＮＡプライマーの２５ｎｍｏｌ　ＩＤＴ合成を約１０ドルで購入することができ、５０００回のＳＨＥＲＬＯＣＫ反応に十分な材料が提供されている。ガラスマイクロファイバー紙は０．５０ドル／枚が利用可能であり、これは数百回のＳＨＥＲＬＯＣＫ反応に十分である。４％ＲＮＡｓｅｃｕｒｅ試薬は７．２０ドル／ｍＬかかり、これは５００回の検査に十分である。

【０４８６】

加えて、紙ベースのアッセイを除く全ての実験について３８４ウェルプレートを使用し

ており（Ｃｏｒｎｉｎｇ　３５４４）、０．０３６ドル／反応がかかった。これは無視できるコストであるため、全体のコスト分析に含めなかった。加えて、ＳＨＥＲＬＯＣＫ－ＰＯＣは紙上で容易に実施し得るため、プラスチックベッセルが不要である。本明細書で用いられるＳＨＥＲＬＯＣＫの読み取り方法は、フィルターセット又はモノクロメーターのいずれかを備えたプレートリーダーであった。設備投資としては、リーダーのコストは、その機器での反応の実行を重ねるにつれコストが急激に低下して無視できるため、計算に含めなかった。ＰＯＣ適用には、手持ち式分光光度計（９）又は携帯型電子リーダー（４）など、より安価で携帯性の高い代替的方法を用い得る可能性があり、それにより機器のコストは２００ドル未満に下がる。これらの携帯性の高い解決法は大型の機器と比較すると速さ及び読み取り易さが劣り得るが、より幅広い使用が可能となる。

【０４８７】

結果

本明細書に記載されるアッセイ及びシステムは、概して、二段階の増幅及び検出プロセスを含み得る。第１の段階では、ＲＮＡ又はＤＮＡのいずれかの核酸試料が、例えば等温増幅によって増幅される。第２の段階では、増幅されたＤＮＡがＲＮＡに転写され、続いてＣ２ｃ２などのＣＲＩＳＰＲエフェクター、及び標的核酸配列の存在を検出するようにプログラムされたｃｒＲＮＡと共にインキュベートされる。検出を可能にするため、消光フルオロフォアで標識されたレポーターＲＮＡが反応に加えられる。レポーターＲＮＡのコラテラル切断によってフルオロフォアの脱消光が起こり、核酸標的のリアルタイム検出が可能となる（図１７Ａ）。

【０４８８】

ロバストなシグナル検出を実現するため、生物レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）（ＬｗＣ２ｃ２）からＣ２ｃ２のオルソログを同定し、評価した。ＬｗＣ２ｃ２タンパク質の活性について、それを大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）で合成ＣＲＩＳＰＲアレイと共に発現させて、それがβ－ラクタマーゼｍＲＮＡ内の標的部位を切断する（これはアンピシリン選択下で細菌の死亡につながる）ようにプログラムすることにより評価した（図２Ｂ）。ＬｓｈＣ２ｃ２遺伝子座と比べてＬｗＣ２ｃ２遺伝子座ではより少ない生存大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）コロニーが観察され、ＬｗＣ２ｃ２オルソログの切断活性の方が高いことが実証された（図２Ｃ）。次にヒトコドン最適化ＬｗＣ２ｃ２タンパク質を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）から精製し（図２Ｄ～図２Ｅ）、１７３ｎｔ　ｓｓＲＮＡを切断するその能力を種々のプロトスペーサー隣接部位（ＰＦＳ）ヌクレオチドでアッセイした（図２Ｆ）。ＬｗＣ２ｃ２は可能な４つのＰＦＳ標的の各々を切断する能力を有し、ｓｓＲＮＡに対する活性はＧ　ＰＦＳで僅かに低かった。

【０４８９】

市販のＲＮＡ蛍光プレートリーダーを使用して、ＬｗＣ２ｃ２　ＲＮａｓｅコラテラル活性のリアルタイム測定を測定した（図１７Ａ）。ＬｗＣ２ｃ２活性のベースライン感度を決定するため、ＬｗＣ２ｃ２をｓｓＲＮＡ標的１（ｓｓＲＮＡ　１）及びｓｓＲＮＡ標的内の部位に相補的なｃｒＲＮＡと共に、ＲＮＡセンサープローブも併せてインキュベートした（図１８）。これにより約５０ｆＭの感度がもたらされた（図２７Ａ）。これは、他の最近の核酸検出技術よりも高感度ではあるが（Ｐａｒｄｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４）、サブフェムトモル濃度の検出パフォーマンスが要求される多くの診断適用に十分な感度ではない（Ｂａｒｌｅｔｔａ　ｅｔ　ａｌ．，２００４；Ｅｍｍａｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１；Ｒｉｓｓｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０；Ｓｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１）。

【０４９０】

感度を増加させるため、ＬｗＣ２ｃ２とのインキュベーション前に等温増幅ステップを加えた。ＬｗＣ２ｃ２媒介性検出を核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ）などの以前から用いられている等温増幅手法と組み合わせることにより（Ｃｏｍｐｔｏｎ，１９９１；Ｐａｒｄｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）、感度がある程度向上した（図１１）。別の等温増幅手法、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）（Ｐｉｅｐｅｎｂｕｒｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）を試験した。これはＤＮＡを２時間未満で指数関数的に増加させるのに用い

ることができるものである。ＲＰＡプライマーにＴ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを加えることにより、続くＬｗＣ２ｃ２による検出のため、増幅されたＤＮＡをＲＮＡに変換することができる（図１７）。従って、特定の例示的実施形態では、本アッセイは、ＲＰＡによる増幅と、ＤＮＡからＲＮＡへのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ変換と、続く消光レポーターからの蛍光のＣ２ｃ２アンロッキングによるＲＮＡの検出との組み合わせを含む。

【０４９１】

合成ＤＮＡバージョンのｓｓＲＮＡ　１に対して例示的方法を用いることにより、反応１回当たり１～１０分子の範囲のアトモル濃度感度を実現することが可能であった（図２７Ｂ、左）。検出精度を確かめるため、入力ＤＮＡ濃度をデジタルドロップレットＰＣＲで定性化し、最低検出可能標的濃度（２ａＭ）が１マイクロリットル当たり単一の分子の濃度であることを確認した。ＲＰＡはまた、逆転写ステップを加えて、ＲＮＡをｄｓＤＮＡ形態に増幅することもでき、これによりｓｓＲＮＡ　１に対してアトモル濃度感度を実現することが可能となる（図２７Ｂ、右）。同様に、ＲＮＡ標的の濃度はデジタルドロップレットＰＣＲによって確認した。ＰＯＣ診断検査として機能する例示的方法の実行可能性を評価するため、全ての成分－ＲＰＡ、Ｔ７ポリメラーゼ増幅、及びＬｗＣ２ｃ２検出－が単一の反応で機能することが可能かどうかを試験し、ワンポットバージョンの本アッセイによるアトモル濃度感度を見出した（図２２）。

【０４９２】

本アッセイは液体中又は紙上で高感度ウイルス検出が可能である

次に、高感度が要求される、且つ携帯型診断法の利益を受け得るであろう感染性疾患適用において本アッセイが有効であるかどうかを決定した。モデルシステムの検出を試験するため、ジカウイルスゲノム及び関連するフラビウイルスデング（Ｄｅｊｎｉｒａｔｔｉｓａｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）のＲＮＡ断片を有するレンチウイルスを作製し、ウイルス粒子の数を定量化した（図３１Ａ）。モックウイルスのレベルは２ａＭに至る低さまで検出された。同時に、ジカ及びデングＲＮＡ断片を含むこれらの代理ウイルス間の明確な判別を示すこともまた可能であった（図３１Ｂ）。流通に際してコールドチェーンへの依存がなくなるよう本アッセイがフリーズドライと適合性を有するかどうかを決定するため、反応成分をフリーズドライした。この試料を使用して凍結乾燥成分を再水和させた後、２０ｆＭのｓｓＲＮＡ　１を検出した（図３３Ａ）。資源不足のＰＯＣセッティングでは使い勝手の良さから紙検査が有益となり得るため、ガラス繊維紙上でのＣ２ｃ２検出の活性もまた評価し、紙にスポッティングしたＣ２ｃ２反応液に標的検出能力があることを見出した（図３３Ｂ）。併せて、Ｃ２ｃ２検出反応液をフリーズドライして紙にスポッティングしたところ、ｓｓＲＮＡ　１の高感度検出がもたらされた（図３３Ｃ）。同様のレベルの感度がまた、溶液中のＬｗＣ２ｃ２とフリーズドライしたＬｗＣ２ｃ２との間での合成ジカウイルスＲＮＡ断片の検出についても観察され、フリーズドライしたＳＨＥＲＬＯＣＫのロバスト性及び迅速ＰＯＣジカウイルス診断法の可能性が実証された（図３３Ｄ～図３３Ｅ）。この目的に向けて、ＰＯＣ版の本アッセイの能力を試験して、ジカＲＮＡをデングＲＮＡと判別する能力を決定した（図３１Ｃ）。紙上スポッティング及び凍結乾燥ではリードアウトの絶対シグナルがやや低下したが、デング対照配列を有するモックウイルスの検出と比較して、本アッセイは２０ａＭもの低い濃度のモックジカウイルスをなおも有意に検出した（図３１Ｄ）。

【０４９３】

ヒトにおけるジカウイルスＲＮＡレベルは、患者唾液中で$3\times10^{6}$コピー／ｍＬ（４．９ｆＭ）及び患者血清中で$7.2\times10^{5}$コピー／ｍＬ（１．２ｆＭ）ほどの低さであることが報告されている（Ｂａｒｚｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６；Ｇｏｕｒｉｎａｔ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５；Ｌａｎｃｉｏｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）。入手した患者試料からは、$1.25\times10^{3}$コピー／ｍＬ（２．１ａＭ）もの低い濃度が観察された。本アッセイに低力価臨床分離物のジカウイルス検出能力があるかどうかを評価するため、患者からウイルスＲＮＡを抽出して逆転写し、得られたｃＤＮＡをアッセイの入力として使

用した（図３２Ａ）。ジカヒト血清試料について、１．２５コピー／ｕＬ（２．１ａＭ）に至るまでの低い濃度で有意な検出が観察された（図３２Ｂ）。更に、患者試料からのシグナルにはジカウイルスＲＮＡコピー数の予測性があり、これを使用してウイルス負荷を予測することが可能であった（図３１Ｆ）。核酸精製を利用できない疾患状況に向けた幅広い適用性を試験するため、ヒト血清にスパイクしたｓｓＲＮＡ　１の検出を試験し、本アッセイが２％未満の血清レベルで有効であったことが決定された（図３３Ｇ）。

【０４９４】

細菌性病原体の区別及び遺伝子の区別

本アッセイを細菌性病原体の区別に使用し得るかどうかを決定するため、隣接領域が保存されているため全細菌種でユニバーサルＲＰＡプライマーを使用可能であり、且つ可変内部領域によって種の分別が可能であることに伴い、初期標的として１６Ｓ　Ｖ３領域を選択した。病原株に関して５つの可能なターゲティングｃｒＲＮＡのパネルを設計し、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）及び緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ｇＤＮＡを単離した（図３４Ａ）。本アッセイは大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）又は緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ｇＤＮＡを区別可能であり、他の種のｃｒＲＮＡについて低いバックグラウンドシグナルを示した（図３４Ａ、図３４Ｂ）。

【０４９５】

本アッセイはまた、抗生物質耐性遺伝子など、目的の細菌遺伝子の迅速な検出及び区別にも適合させることができる。カルバペネム耐性腸内細菌（ＣＲＥ）は、新たに浮上しつつある重大な公衆衛生上の課題である（Ｇｕｐｔａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）。本アッセイがカルバペネム耐性遺伝子を検出する能力、及びこの検査が異なるカルバペネム耐性遺伝子間を区別し得たかどうかを評価した。肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）カルバペネマーゼ（ＫＰＣ）又はニューデリーメタロ－β－ラクタマーゼ１（ＮＤＭ－１）耐性遺伝子のいずれかを有する臨床分離物から肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａ）を入手し、これらの遺伝子間を区別するようにｃｒＲＮＡを設計した。全てのＣＲＥが、これらの耐性遺伝子を欠く細菌と比べて有意なシグナルを有し（図３５Ａ）、本発明者らはＫＰＣ耐性株とＮＤＭ－１耐性株とを有意に区別することができた（図３５Ｂ）。

【０４９６】

ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡガイド下ＲＮａｓｅの一塩基ミスマッチ特異性

ＬｓｈＣ２ｃ２などの特定のＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡガイド下ＲＮａｓｅオルソログは、一塩基ミスマッチを容易には区別しないことが示されている（Ａｂｕｄａｙｙｅｈ　ｅｔａｌ．，２０１６）。本明細書において実証されるとおり、ＬｗＣ２ｃ２もまた、この特徴を共有する（図３７Ａ）。ＬｗＣ２ｃ２切断の特異性を増加させるため、ミスマッチに対する総感度を増加させて一塩基ミスマッチ感度を可能にする合成ミスマッチをｃｒＲＮＡ：標的二重鎖に導入するためのシステムを開発した。標的１に対する複数のｃｒＲＮＡを設計し、ｃｒＲＮＡの長さにわたってミスマッチを含めることにより（図３７Ａ）、オンターゲット切断を最適化し、単一ミスマッチだけ異なる標的の切断を最小限に抑えた。これらのミスマッチがｓｓＲＮＡ標的１の切断効率を低下させることはなかったが、追加のミスマッチを含んだ標的に対するシグナルは有意に減少した（ｓｓＲＮＡ標的２）。設計されたｃｒＲＮＡで標的１と標的２との間を最良に区別したものは、標的２ミスマッチの近くに合成ミスマッチを含み、事実上「バブル」を作り出した。標的に存在する合成ミスマッチと更なるミスマッチとの協調（即ち、ダブルミスマッチ）によって生じる感度の消失は、連続的な又は近傍のダブルミスマッチに対するＬｓｈＣ２ｃ２の感度と一致し（Ａｂｕｄａｙｙｅｈ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）、単一ヌクレオチド区別を可能にするｃｒＲＮＡの合理的設計のフォーマットを呈する（図３７Ｂ）。

【０４９７】

一塩基ミスマッチを認識するようにＣ２ｃ２をエンジニアリングし得ることが実証されたが、このエンジニアリングされた特異性を用いて近縁ウイルス性病原体間を区別し得るかどうかを決定した。複数のｃｒＲＮＡを、ジカウイルスのアフリカ株又はアメリカ株の

いずれか（図３７Ａ）及びデングウイルスの株１又は株３のいずれか（図３７Ｃ）を検出するように設計した。これらのｃｒＲＮＡは、合成ミスマッチに起因してオンターゲット株と二重鎖化したときに単一のバブルを形成させる合成ミスマッチをスペーサー配列に含んだ。しかしながら、合成ミスマッチスペーサーがオフターゲット株と二重鎖化すると、合成ミスマッチ及びＳＮＰミスマッチに起因して２つのバブルが形成される。合成ミスマッチｃｒＲＮＡはオフターゲット株よりも有意に高いシグナルでその対応する株を検出し、ロバストな株区別が可能であった（図３７Ｂ、図３７Ｄ）。株間の有意な配列類似性に起因して、これらの２つのゲノム間に単一ヌクレオチドのみが異なる２８ｎｔの連続ストレッチを見付けて真の単一ヌクレオチド株区別を実証することはできなかった。しかしながら、ＬｓｈＣ２ｃ２でもそうであったとおり、より短いｃｒＲＮＡであってもなお機能し得ることが予想され（Ａｂｕｄａｙｙｅｈ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）、従ってこれらの２つのジカ株における標的に対して、スペーサー配列に合成ミスマッチを含み且つ標的配列に１つのミスマッチのみを含むより短い２３ｎｔ　ｃｒＲＮＡを設計した。これらのｃｒＲＮＡはなおもジカのアフリカ株とアメリカ株とを高感度で区別することが可能であった（図３６Ｃ）。

【０４９８】

唾液から精製したＤＮＡを用いた迅速遺伝子タイピング

ヒト唾液からの迅速遺伝子タイピングがあれば、ファーマコゲノミクス的緊急事態状況で、又は在宅診断に有用となり得る。本明細書に開示される実施形態についての遺伝子タイピングに向けた可能性を実証するため、５つの遺伝子座を選択し、ゴールドスタンダードとして２３ａｎｄＭｅ遺伝子タイピングデータを使用したＣ２ｃ２検出のベンチマーク評価を行った（Ｅｒｉｋｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）（図３８Ａ）。５つの遺伝子座は、スタチン類又はアセトアミノフェンなどの薬物に対する感度、ノロウイルス罹患率、及び心疾患リスクを含め、広範囲の機能的関連性にわたる（表７）。

表 7: 検査した SNP 変異体

| ID | 遺伝子 | カテゴリ |
|---|---|---|
| rs5082 | APOA2 | 飽和脂肪消費及び体重増加 |
| rs1467558 | CD44 | アセトアミノフェン代謝 |
| rs2952768 | 準 CREB1 | モルヒネ依存 |
| rs4363657 | SLCO1B1 | スタチン使用者について 4.5 倍増加ミオパチーリスク |
| rs601338 | FUT2 | ノロウイルス耐性 |

【０４９９】

４人のヒト対象から唾液を採取し、単純な市販キットを使用して１時間未満でゲノムＤＮＡを精製した。４人の対象は５つの遺伝子座に多様な一組の遺伝子型を有し、遺伝子タイピングに関して本アッセイをベンチマーク評価するのに十分に広い標本空間を提供した。５つのＳＮＰ遺伝子座の各々について、適切なプライマーによるＲＰＡを用いて対象のゲノムＤＮＡを増幅し、続いてＬｗＣ２ｃ２と、２つの可能なアレルのうちの１つを特異的に検出するように設計された１対のｃｒＲＮＡとで検出した（図３８Ｂ）。本アッセイは、アレルを高い有意性で区別し、且つホモ接合性及びヘテロ接合性の両方の遺伝子型を推測するのに十分に特異的であった。検出前に唾液でＤＮＡ抽出プロトコルを実施したため、本アッセイを試験して、９５℃に５分間加熱した唾液を使用することにより、本アッセイがいかなる更なる抽出もないＰＯＣ遺伝子タイピングに更に一層適したものとなり得るかどうかを決定した。本アッセイは、その唾液を５分間の加熱に供し、続いて増幅及びＣ２ｃ２検出に供しただけで２人の患者を正しく遺伝子タイピングする能力を有した（図４０Ｂ）。

【０５００】
低アレル率でのｃｆＤＮＡにおける癌突然変異の検出
本アッセイは標的の単一ヌクレオチド差に高度に特異的であるため、無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）の癌突然変異を検出するのにアッセイが十分に高感度であるかどうかを決定する検査が考案された。ｃｆＤＮＡ断片は、野生型ｃｆＤＮＡ断片のうちのごく一部（０．１％～５％）である（Ｂｅｔｔｅｇｏｗｄａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｎｅｗｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｏｌｍｅｄｉｌｌａｓ　Ｌｏｐｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６；Ｑｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。血中にバックグラウンドで見られる突然変異していないＤＮＡが高レベルであることを所与とすれば、これらの突然変異は典型的には発見が困難であるため、ｃｆＤＮＡ分野における重要な課題はこれらの突然変異の検出である（Ｂｅｔｔｅｇｏｗｄａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｎｅｗｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｑｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。ＰＯＣ　ｃｆＤＮＡ癌検査はまた、特に寛解にリスクがある患者について、癌の存在に関する定期的スクリーニングにも有用となるであろう。
【０５０１】
ｃｒＲＮＡ標的部位に単一の突然変異を有するｓｓＤＮＡ１のバックグラウンドでｄｓＤＮＡ標的１を希釈することにより、本アッセイが野生型バックグラウンドで突然変異体ＤＮＡを検出する能力を決定した（図４１Ａ～図４１Ｂ）。ＬｗＣ２ｃ２は、ｄｓＤＮＡ１をバックグラウンドｄｓＤＮＡの０．１％もの低いレベルまで、且つｄｓＤＮＡ　１のアトモル濃度の範囲内で検知する能力を有した。この結果は、バックグラウンド突然変異体ｄｓＤＮＡ　１のＬｗＣ２ｃ２切断が０．１％アレル率でのオンターゲットｄｓＤＮＡのロバストな検出を可能にするのに十分に低いことを示している。０．１％未満のレベルでは、バックグラウンド活性が問題になり、正しい標的のそれ以上の有意な検出が妨げられるものと思われる。
【０５０２】
本アッセイは臨床的に有意味な範囲のアレル率を有する合成標的を検知することができたため、本アッセイがｃｆＤＮＡの癌突然変異を検出可能かどうかを評価した。２つの異なる癌突然変異に対するＲＰＡプライマー、ＥＧＦＲ　Ｌ８５８Ｒ及びＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅを設計し、実際に検査するヒトｃｆＤＮＡ試料に類似した５％、１％、及び０．１％のアレル率で市販のｃｆＤＮＡ標準を使用した。突然変異アレルを野生型アレルと区別することのできる１対のｃｒＲＮＡを使用して（図３８Ｃ）、突然変異遺伝子座の両方について０．１％アレル率の検出を実現した（図３９Ａ～図３９Ｂ）。
【０５０３】
考察
Ｃ２ｃ２の天然の特性を等温増幅及び消光蛍光プローブと組み合わせることにより、本明細書に開示されるアッセイ及びシステムが、ＲＮＡ及びＤＮＡを検出する多用途のロバストな方法であり、感染性疾患適用及び迅速遺伝子タイピングを含めた種々の迅速診断法に好適であると実証された。本明細書に開示されるアッセイ及びシステムの主な利点は、０．６ドル／検査もの安さで数日のうちに新規ＰＯＣ検査を設計し直して合成し得ることである。
【０５０４】
多くのヒト疾患適用で単一ミスマッチを検出する能力が要求されるため、ｃｒＲＮＡのスペーサー配列に合成ミスマッチを導入することにより標的配列の単一ミスマッチに高度に特異的となるようにｃｒＲＮＡをエンジニアリングする合理的手法を開発した。ＣＲＩＳＰＲエフェクターで特異性を実現する他の手法は、何十ものガイド設計にわたるスクリーニングベースの方法に頼る（Ｃｈａｖｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。設計されたミスマッチｃｒＲＮＡを使用して、単一ミスマッチだけ異なる部位におけるジカウイルス株とデングウイルス株との判別、ヒト唾液ｇＤＮＡからのＳＮＰの迅速遺伝子タイピング、及びｃｆＤＮＡ試料中の癌突然変異の検出が実証された。
【０５０５】
このアッセイプラットフォームのコストの低さ及び適合性は、（ｉ）Ｔａｑｍａｎなど

の特異的ｑＰＣＲアッセイの代わりとしての一般的なＲＮＡ／ＤＮＡ定量化経験、（ｉｉ）マイクロアレイに似た迅速多重化ＲＮＡ発現検出、及び（ｉｉｉ）食品中の他の供給源からの核酸コンタミネーションの検出など、他の高感度検出適用を含め、更なる適用に適している。加えて、Ｃ２ｃ２は、潜在的に、細胞などの生物学的セッティング内での転写物の検出に使用可能であり、Ｃ２ｃ２検出の高度に特異的な性質を所与とすれば、生細胞で転写物のアレル特異的発現又は疾患関連突然変異を追跡することが可能であり得る。アプタマーの幅広い利用可能性により、アプタマーによるタンパク質の検出を、ＲＰＡの潜在性増幅部位の曝露と、続くＣ２ｃ２検出と組み合わせることにより、タンパク質を検知することもまた可能であり得る。

【０５０６】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａ／Ｃ２ｃ２による核酸検出：アトモル濃度感度及び単一ヌクレオチド特異性

ロバストなシグナル検出を実現するため、本出願人は、レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）からのＣａｓ１３ａのオルソログ（ＬｗＣａｓ１３ａ）を同定した。これはレプトトリキア・シャーイイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｓｈａｈｉｉ）Ｃａｓ１３ａ（ＬｓｈＣａｓ１３ａ）と比べてより高いＲＮＡガイド下ＲＮａｓｅ活性を示す（１０）（図２、上記「ＬｗＣａｓ１３ａ切断要件の特徴付け」もまた参照のこと）。ＬｗＣａｓ１３ａをｓｓＲＮＡ標的１（ｓｓＲＮＡ　１）、ｃｒＲＮＡ、及びレポーター（消光された蛍光ＲＮＡ）（図１８）（１３）とインキュベートすると、約５０ｆＭの検出感度が得られた（図５１、図１５）。これは多くの診断適用に十分な感度ではない（１２、１４～１６）。従って本出願人は、Ｃａｓ１３ａベースの検出を種々の等温増幅ステップと組み合わせることを調査した（図１０、図１１、図５３、図１６）（１７、１８）。調査した方法の中では、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）（１８）が最も高い感度をもたらしており、続くＬｗＣａｓ１３ａによる検出のため、Ｔ７転写と組み合わせて増幅ＤＮＡをＲＮＡに変換し得る（上記「リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）及び他の等温増幅戦略の考察」もまた参照のこと）。本出願人は、ＲＰＡによる増幅と、増幅ＤＮＡからＲＮＡへのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ転写と、Ｃａｓ１３ａコラテラルＲＮＡ切断が介在するレポーターシグナルの放出による標的ＲＮＡの検出とのこの組み合わせをＳＨＥＲＬＯＣＫと称する。

【０５０７】

本出願人は、初めに、ＲＮＡ標的（逆転写と組み合わせたとき）又はＤＮＡ標的の検出に関してＳＨＥＲＬＯＣＫの感度を決定した。本出願人は、デジタルドロップレットＰＣＲ（ｄｄＰＣＲ）によって確かめられるとおり（図２７、図５１、図５４Ａ、図５４Ｂ）、ＲＮＡ及びＤＮＡの両方について単一分子感度を実現した。全てのＳＨＥＲＬＯＣＫ成分を単一の反応に組み合わせたときもアトモル濃度感度が維持され、このプラットフォームのポイント・オブ・ケア（ＰＯＣ）診断法としての実行可能性が実証された（図５４Ｃ）。ＳＨＥＲＬＯＣＫは、２つの確立された高感度核酸検出手法であるｄｄＰＣＲ及び定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）と同様のレベルの感度を有し、一方、ＲＰＡ単独は、低レベルの標的を検出するのに十分な感度を有しなかった（図５５Ａ～図５５Ｄ）。更に、ＳＨＥＲＬＯＣＫは、レプリケートにわたる変動係数によって測定したとき、ｄｄＰＣＲ、ｑＰＣＲ、及びＲＰＡよりも小さい変動を示す（図５５Ｅ～図５５Ｆ）。

【０５０８】

本出願人は、次に、高感度が要求される感染性疾患適用においてＳＨＥＲＬＯＣＫが有効であるかどうかを調べた。本出願人は、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）又は関連フラビウイルスデング（ＤＥＮＶ）のいずれかのゲノム断片を有するレンチウイルスを作製した（１９）（図３１Ａ）。ＳＨＥＲＬＯＣＫは２ａＭに至る低さまでウイルス粒子を検出し、ＺＩＫＶとＤＥＮＶとの間を判別することができた（図３１Ｂ）。ＳＨＥＲＬＯＣＫを実地で使用する可能性を探るため、本出願人は初めに、凍結乾燥し、続いて再水和したＣａｓ１３ａｃｒＲＮＡ複合体（２０）が２０ｆＭの非増幅ｓｓＲＮＡ　１を検出できたこと（図３３Ａ）、及びガラス繊維紙上での標的検出もまた可能であったこと（図３３Ｂ）を実

証した。ＳＨＥＲＬＯＣＫの他の成分もまたフリーズドライに適している：ＲＰＡは凍結乾燥試薬として周囲温度で提供され、本出願人は以前、Ｔ７ポリメラーゼがフリーズドライに耐えることを実証した（２）。併せて、Ｃａｓ１３ａ検出反応物をフリーズドライして紙上にスポッティングすると、水性反応物と同等のレベルのｓｓＲＮＡ　１高感度検出が得られた（図３３Ｃ～図３３Ｅ）。紙上スポッティング及び凍結乾燥では、リードアウトの絶対シグナルがやや低下したが、ＳＨＥＲＬＯＣＫ（図３１Ｃ）は２０ａＭもの低い濃度のモックＺＩＫＶウイルスを容易に検出することができた（図３１Ｄ）。ＳＨＥＲＬＯＣＫはまた、力価が２×１０３コピー／ｍＬ（３．２ａＭ）もの低さであり得る臨床分離物（血清、尿、又は唾液）中のＺＩＫＶを検出することが可能である（２１）。ｑＰＣＲによって確かめられたとおり（図３２Ｆ及び図５２Ｂ）、患者血清又は尿試料から抽出されてｃＤＮＡに逆転写されたＺＩＫＶ　ＲＮＡ（図３２Ｅ及び図５２Ａ）を１．２５×１０３コピー／ｍＬ（２．１ａＭ）に至る低い濃度で検出することができた。更に、患者試料からのシグナルにはＺＩＫＶ　ＲＮＡコピー数の予測性があり、これを使用してウイルス負荷を予測することが可能であった（図３３Ｆ）。核酸精製のない試料検出をシミュレートするため、本出願人はヒト血清にスパイクしたｓｓＲＮＡ　１の検出を測定し、Ｃａｓ１３ａが、２％にも上る血清を含有する反応物中のＲＮＡを検出できたことを見出した（図３３Ｇ）。本明細書に開示される実施形態のもう一つの重要な疫学的適用は、細菌性病原体の同定及び特異的細菌遺伝子の検出である。本出願人は１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子Ｖ３領域を標的とした。ここでは隣接領域が保存されているため全細菌種でユニバーサルＲＰＡプライマーを使用可能であり、且つ可変内部領域によって種の分別が可能である。種々の病原株に関する５つの可能なターゲティングｃｒＲＮＡ及び大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）及び緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）から単離したｇＤＮＡ（図３４Ａ）のパネルにおいて、ＳＨＥＲＬＯＣＫは株を正しく遺伝子タイピングし、低い交差反応性を示した（図３４Ｂ）。加えて、本出願人は、ＳＨＥＲＬＯＣＫを使用して、２つの異なる耐性遺伝子：肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）カルバペネマーゼ（ＫＰＣ）及びニューデリーメタロ－β－ラクタマーゼ１（ＮＤＭ－１）（２２）を有する肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）の臨床分離物間を区別することが可能であった（図５６）。

【０５０９】

ＳＨＥＲＬＯＣＫの特異性を増加させるため、本出願人はｃｒＲＮＡ：標的二重鎖に合成ミスマッチを導入し、これによりＬｗＣａｓ１３ａは一塩基ミスマッチだけ異なる標的間を判別することが可能になった（図３６Ａ、図３６Ｂ；上記「エンジニアリングされたミスマッチの設計」もまた参照のこと）。本出願人は、ＺＩＫＶのアフリカ株又はアメリカ株（図３７Ａ）及びＤＥＮＶの株１又は株３（図３７Ｃ）のいずれかを検出するようにスペーサー配列に合成ミスマッチを有する複数のｃｒＲＮＡを設計した。合成ミスマッチｃｒＲＮＡは、その対応する株をオフターゲット株よりも有意に高いシグナルで検出し（両側スチューデントｔ検定；ｐ＜０．０１）、単一ミスマッチに基づいたロバストな株判別が可能であった（図３７Ｂ、図３７Ｄ、図３６Ｃ）。更なる特徴付けから、突然変異がスペーサーの位置３にあり、合成ミスマッチが位置５にあるとき、Ｃａｓ１３ａ検出がオンターゲット感度を維持しつつ最高の特異性を達成することが明らかになった（図５７及び図５８）。一塩基の差を検出する能力は、ＳＨＥＲＬＯＣＫを迅速ヒト遺伝子タイピングに使用する機会を切り開く。本出願人は、ある範囲の健康関連一塩基多型（ＳＮＰ）にかかる５つの遺伝子座を選択し（表１）、２３ａｎｄＭｅ遺伝子タイピングデータをこれらのＳＮＰにおけるゴールドスタンダードとして使用してＳＨＥＲＬＯＣＫ検出をベンチマーク評価した（２３）（図３８Ａ）。本出願人は、目的の遺伝子座に多様な遺伝子型を有する４人のヒト対象から唾液を採取し、市販のカラム精製又は５分間の直接加熱のいずれかによってゲノムＤＮＡを抽出した（２０）。ＳＨＥＲＬＯＣＫは高い有意性で、且つホモ接合性及びヘテロ接合性の両方の遺伝子型を推測するのに十分な特異性でアレルを区別した（図３８Ｂ、図４０、図５９、図６０；上記「合成標準を使用したＳＨＥＲＬＯＣＫによる遺伝子タイピング」もまた参照のこと）。最後に、本出願人は、ＳＨＥＲＬＯＣ

Ｋが無細胞（ｃｆ）ＤＮＡ断片における低頻度癌突然変異を検出できるかどうかを決定しようとした。これは患者血液中における高レベルの野生型ＤＮＡに起因して難題である（２４～２６）。本出願人は、初めに、ＳＨＥＲＬＯＣＫがゲノムＤＮＡのバックグラウンドに希釈されたアトモル濃度のｓｓＤＮＡ　１を検出できることを見出した（図６１）。次に、本出願人は、ＳＨＥＲＬＯＣＫがまた、臨床的に有意味な範囲内であるバックグラウンドＤＮＡの０．１％もの低いレベルの一塩基変異多型（ＳＮＰ）含有アレルも検出可能であったことを見出した（図４１Ａ、図４１Ｂ）。本出願人は次に、アレル率が０．１％もの低さのモックｃｆＤＮＡ試料においてＳＨＥＲＬＯＣＫが２つの異なる癌突然変異、ＥＧＦＲ　Ｌ８５８Ｒ及びＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅを検出できたことを実証した（図３８、図３９）（２０）。

【０５１０】

ＳＨＥＲＬＯＣＫプラットフォームは、（ｉ）ＴａｑＭａｎなどの特異的ｑＰＣＲアッセイの代わりとしての一般的なＲＮＡ／ＤＮＡ定量化、（ｉｉ）迅速多重化ＲＮＡ発現検出、及び（ｉｉｉ）核酸コンタミネーションの検出など、他の高感度検出適用を含め、更なる適用に役立つ。加えて、Ｃａｓ１３ａは生物学的セッティング内で転写物を潜在的に検出し、且つ生細胞で転写物のアレル特異的発現又は疾患関連突然変異を追跡し得る可能性がある。ＳＨＥＲＬＯＣＫは、感染性疾患適用及び高感度遺伝子タイピングを含め、迅速診断法に好適な、ＲＮＡ及びＤＮＡを検出する多用途のロバストな方法である。ＳＨＥＲＬＯＣＫ紙検査は、検査したほぼ全てのｃｒＲＮＡが高感度及び高特異性をもたらしたとおり、高い信頼性で０．６１ドル／検査もの安さで数日のうちに設計し直して合成し得る（上記「ＳＨＥＲＬＯＣＫは手頃な適合性のあるＣＲＩＳＰＲ－Ｄｘプラットフォームである」もまた参照のこと）。このようなクオリティはＣＲＩＳＰＲ－Ｄｘの強力さを強調するものであり、生体分子の迅速でロバストな高感度検出への新しい道を切り開く。

表 8: 使用した RPA プライマー

| 名称 | 配列 | 最初の図 |
|---|---|---|
| RP0683 - RPA ssDNA/ssRNA 1 F | (配列番号 18) | 図 27B |
| RP0684 - RPA ssDNA/ssRNA 1 R | (配列番号 19) | 図 27B |
| AMPL-25 ジカ 8B ロング-rpa3-f | (配列番号 20) | 図 31B |
| AMPL-26 ジカ 8B ロング-rpa3-r | (配列番号 21) | 図 31B |
| RP819 - ジカ領域 8 F | (配列番号 22) | 図 31C |
| RP821 - ジカ領域 8 R | (配列番号 23) | 図 31C |
| 517 細菌 V3 F | (配列番号 24) | 図 34B |
| RP758 細菌 V3 R | (配列番号 25) | 図 34B |
| wR0074 A2 rs5082 F | (配列番号 26) | 図 38B |
| wR0074 E2 rs5082 R | AA (配列番号 27) | 図 38B |
| wR0074 A4 rs1467558 F | (配列番号 28) | 図 38B |
| wR0074 E4 rs1467558 R | (配列番号 29) | 図 38B |
| wR0074 A5 rs2952768 F | (配列番号 30) | 図 38B |
| wR0074 E5 rs2952768 R | (配列番号 31) | 図 38B |
| wR0074 A9 rs4363657 F | (配列番号 32) | 図 38B |
| wR0074 E9 rs4363657 R | (配列番号 33) | 図 38B |
| wR0074 A11 rs601338 F | (配列番号 34) | 図 38B |
| wR0074 E11 rs601338 R | (配列番号 35) | 図 38B |
| RP824 BRAFV600E cfDNA F | (配列番号 36) | 図 39A |
| RP769 BRAFV600E cfDNA R | (配列番号 37) | 図 39A |
| RP826 EGFR858R cfDNA F | (配列番号 38) | 図 39B |
| RP804 EGFR858R cfDNA R | (配列番号 39) | 図 39B |
| AMPL-31 T1-nasba1-f | (配列番号 40) | 図 11 |
| AMPL-32 T1-nasba1-r | (配列番号 41) | 図 11 |

| | | |
|---|---|---|
| AMPL-33 T1-nasba2-f | (配列番号 42) | 図 11 |
| AMPL-34 T1-nasba2-r | (配列番号 43) | 図 11 |
| AMPL-35 T1-nasba3-f | (配列番号 44) | 図 11 |
| AMPL-36 T1-nasba3-r | (配列番号 45) | 図 11 |
| wR0075 A1 KPC F | (配列番号 46) | 図 35A |
| wR0075 B1 KPC R | (配列番号 47) | 図 35A |
| wR0075 A3 NDM F | (配列番号 48) | 図 35A |
| wR0075 B3 NDM R | (配列番号 49) | 図 35A |

表 9: 使用した crRNA 配列

| 名称 | 完全 crRNA 配列 | スペーサー配列 | 最初の図 | PFS |
|---|---|---|---|---|
| 標的 1 crRNA | (配列番号 50) | (配列番号 51) | 図 2F | C |
| ジカターゲティング crRNA 1 | (配列番号 52) | (配列番号 53) | 図 31A | U |
| ジカターゲティング crRNA 2 | (配列番号 54) | (配列番号 55) | 図 33D | G |
| 大腸菌(E. coli) 検出 crRNA | (配列番号 56) | (配列番号 57) | 図 22B | U |
| 肺炎桿菌(K. pneumoniae)検出 crRNA | (配列番号 58) | (配列番号 59) | 図 34B | U |
| 緑膿菌(P. aeruginosa)検出 crRNA | (配列番号 60) | (配列番号 61) | 図 34B | U |
| 結核菌(M. tuberculosis)検出 crRNA | (配列番号 62) | (配列番号 63) | 図 34B | U |
| 黄色ブドウ球菌(S. aureus)検出 crRNA | (配列番号 64) | (配列番号 65) | 図 34B | G |
| KPC crRNA | (配列番号 66) | (配列番号 67) | 図 35A | U |
| NDM crRNA | (配列番号 68) | (配列番号 69) | 図 35A | C |
| ミスマッチ crRNA 1 | (配列番号 70) | (配列番号 71) | 図 36A | C |
| ミスマッチ crRNA 2 | (配列番号 72) | (配列番号 73) | 図 36A | C |
| ミスマッチ crRNA 3 | (配列番号 74) | (配列番号 75) | 図 36A | C |
| ミスマッチ crRNA 4 | (配列番号 76) | (配列番号 77) | 図 36A | C |
| ミスマッチ crRNA 5 | (配列番号 78) | (配列番号 79) | 図 36A | C |
| ミスマッチ crRNA 6 | (配列番号 80) | (配列番号 81) | 図 36A | C |
| ミスマッチ crRNA 7 | (配列番号 82) | (配列番号 83) | 図 36A | C |
| ミスマッチ crRNA 8 | (配列番号 84) | (配列番号 85) | 図 36A | C |
| ミスマッチ crRNA 9 | (配列番号 86) | (配列番号 87) | 図 36A | C |
| ミスマッチ crRNA 10 | (配列番号 88) | (配列番号 89) | 図 36A | C |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| アフリカ crRNA 1 | (配列番号 90) | (配列番号 91) | 図 38A | C |
| アフリカ crRNA 2 | (配列番号 92) | (配列番号 93) | 図 38A | C |
| アメリカ crRNA 1 | (配列番号 94) | (配列番号 95) | 図 38A | U |
| アメリカ crRNA 2 | (配列番号 96) | (配列番号 97) | 図 38A | U |
| デング株 3 crRNA 1 | (配列番号 98) | (配列番号 99) | 図 38C | A |
| デング株 3 crRNA 2 | (配列番号 100) | (配列番号 101) | 図 38C | A |
| デング株 1 crRNA 1 | (配列番号 102) | (配列番号 103) | 図 38C | A |
| デング株 1 crRNA 2 | (配列番号 104) | (配列番号 105) | 図 38C | A |
| 短いアフリカ crRNA 1 | (配列番号 106) | (配列番号 107) | 図 36C | C |
| 短いアフリカ crRNA 2 | (配列番号 108) | (配列番号 109) | 図 36C | C |
| 短いアメリカ crRNA 1 | (配列番号 110) | (配列番号 111) | 図 36C | U |
| 短いアメリカ crRNA 2 | (配列番号 112) | (配列番号 113) | 図 36C | U |
| rs1467558 crRNA C | (配列番号 114) | (配列番号 115) | 図 38B | C |
| rs1467558 crRNA T | (配列番号 116) | (配列番号 117) | 図 38B | C |
| rs2952768 crRNA C | (配列番号 118) | (配列番号 119) | 図 38B | A |
| rs2952768 crRNA T | (配列番号 120) | (配列番号 121) | 図 38B | A |
| rs4363657 crRNA C | (配列番号 122) | (配列番号 123) | 図 38B | A |
| rs4363657 crRNA T | (配列番号 124) | (配列番号 125) | 図 38B | A |
| rs601338 crRNA A | (配列番号 126) | (配列番号 127) | 図 38B | G |
| rs601338 crRNA G | (配列番号 128) | (配列番号 129) | 図 38B | G |
| rs5082 crRNA G | (配列番号 130) | (配列番号 131) | 図 40A | A |
| rs5082 crRNA A | (配列番号 132) | | | A |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| EGFR L858R<br>野生型 crRNA | (配列番号 134) | (配列番号 135) | 図 38C | C |
| EGFR L858R<br>突然変異 crRNA | (配列番号 136) | (配列番号 137) | 図 38C | C |
| BRAF V600E<br>野生型 crRNA | (配列番号 138) | (配列番号 139) | 図 38C | A |
| BRAF V600E<br>突然変異 crRNA | (配列番号 140) | (配列番号 141) | 図 38C | A |
| 23 nt ミスマッチ<br>crRNA 1 | (配列番号 303) | (配列番号 304) | 図 57D | C |
| 23 nt ミスマッチ<br>crRNA 2 | (配列番号 305) | (配列番号 306) | 図 57D | C |
| 23 nt ミスマッチ<br>crRNA 4 | (配列番号 307) | (配列番号 308) | 図 57D | C |
| 23 nt ミスマッチ<br>crRNA 5 | (配列番号 234) | (配列番号 235) | 図 57D | C |
| 23 nt ミスマッチ<br>crRNA 6 | (配列番号 236) | (配列番号 237) | 図 57D | C |
| 23 nt ミスマッチ<br>crRNA 7 | (配列番号 238) | (配列番号 239) | 図 57D | C |
| 20 nt ミスマッチ<br>crRNA 1 | (配列番号 240) | (配列番号 241) | 図 57F | C |
| 20 nt ミスマッチ<br>crRNA 2 | (配列番号 242) | (配列番号 243) | 図 57F | C |
| 20 nt ミスマッチ<br>crRNA 4 | (配列番号 244) | (配列番号 245) | 図 57F | C |
| 20 nt ミスマッチ<br>crRNA 5 | (配列番号 246) | (配列番号 247) | 図 57F | C |
| 20 nt ミスマッチ<br>crRNA 6 | (配列番号 248) | (配列番号 249) | 図 57F | C |
| 20 nt ミスマッチ<br>crRNA 7 | (配列番号 250) | (配列番号 251) | 図 57F | C |
| 標的ミスマッチ 4<br>ミスマッチ crRNA 1 | (配列番号 252) | (配列番号 253) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 4<br>ミスマッチ crRNA 2 | (配列番号 254) | (配列番号 255) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 4<br>ミスマッチ crRNA 3 | (配列番号 256) | (配列番号 257) | 図 58B | C |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 標的ミスマッチ 4<br>ミスマッチ crRNA 5 | (配列番号 258) | (配列番号 259) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 4<br>ミスマッチ crRNA 6 | 配列番号 260) | (配列番号 261) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 4<br>ミスマッチ crRNA 7 | (配列番号 262) | (配列番号 263) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 5<br>ミスマッチ crRNA 2 | (配列番号 264) | (配列番号 265) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 5<br>ミスマッチ crRNA 3 | (配列番号 266) | (配列番号 267) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 5<br>ミスマッチ crRNA 4 | (配列番号 268) | (配列番号 269) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 5<br>ミスマッチ crRNA 6 | (配列番号 270) | (配列番号 271) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 5<br>ミスマッチ crRNA 7 | (配列番号 272) | (配列番号 273) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 5<br>ミスマッチ crRNA 8 | (配列番号 274) | (配列番号 275) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 6<br>ミスマッチ crRNA 3 | (配列番号 276) | (配列番号 277) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 6<br>ミスマッチ crRNA 4 | (配列番号 278) | (配列番号 279) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 6<br>ミスマッチ crRNA 5 | (配列番号 280) | (配列番号 281) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 6<br>ミスマッチ crRNA 7 | (配列番号 282) | (配列番号 283) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 6<br>ミスマッチ crRNA 8 | (配列番号 284) | (配列番号 285) | 図 58B | C |
| 標的ミスマッチ 6<br>ミスマッチ crRNA 9 | (配列番号 286) | (配列番号 287) | 図 58B | C |

表 10: 本実施例で使用した RNA 及び DNA 標的

| 名称 | 配列 | 最初の図 |
|---|---|---|
| ssRNA 1 (C PFS) | (配列番号 288 | 図 2F |
| ssRNA 1 (G PFS) | (配列番号 289) | 図 2F |
| ssRNA 1 (A PFS) | (配列番号 290) | 図 2F |
| ssRNA 1 (U PFS) | (配列番号 291) | 図 2F |
| ssDNA 1 | (配列番号 292) | 図 27 |
| DNA 2 | (配列番号 293) | 図 54B |
| レンチウイルス中の ZIKV | (配列番号 294) | 図 31B |
| レンチウイルス中の DENV | (配列番号 295) | 図 31B |
| 合成 ZIKV 標的 | (配列番号 296) | 図 33D |
| 合成アフリカ ZIKV 標的 | (配列番号 297) | 図 37A |
| 合成アメリカ ZIKV 標的 | (配列番号 298) | 図 37A |
| 合成デング株 1 標的 | (配列番号 299) | 図 37C |
| 合成デング株 3 標的 | (配列番号 300) | 図 37C |
| ssRNA 2 | (配列番号 301) | 図 36A |
| ssRNA 3 | (配列番号 302) | 図 36A |

表 11: 本実施例で使用したプラスミド

| プラスミド名 | 詳細 | プラスミドマップへのリンク |
|---|---|---|
| pC004 | β-ラクタマーゼスクリーニング標的 | https://benchling.com/s/lPJ1cCwR |
| pC009 | ターゲティングスペーサーと共に LshCas13a遺伝子座を pACYC184中に | https://benchling.com/s/seqylkMuglYmiG4A3VhShZg |
| pC010 | ノンターゲティングスペーサーと共にLshCas13a遺伝子座を pACYC184中に | https://benchling.com/s/seq-2WApFr3zni1GOACyQY8a |
| pC011 | ターゲティングスペーサーと共に LwCas13a遺伝子座を pACYC184中に | https://benchling.com/s/seq-Vyk8qK2fyhzegfNgLJHM |
| pC012 | ノンターゲティングスペーサーと共にLwCas13a遺伝子座を pACYC184中に | https://benchling.com/s/seq-RxZAgPBzBUGQThkxR2Kx |
| pC013 | 細菌発現用のTwinstrep-SUMO-huLwCas13a | https://benchling.com/s/seq-66CfLwu7sLMQMbcXe7Ih |

【０５１１】

実施例３－直交塩基優先性を有するＣａｓ１３ｂオルソログの特徴付け

本出願人は、最近定義されたＲＮＡガイド下ＲＮＡターゲティング酵素のＶＩ型ＣＲＩ

ＳＰＲ－Ｃａｓ１３ｂファミリーの１４個のオルソログを生化学的に特徴付け、ＳＨＥＲＬＯＣＫ検出技術を改善する新規候補を見付けた（図８３Ａ及び図８５）。本出願人は、１４個のＣａｓ１３ｂオルソログを大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）で異種発現させることができ、インビトロＲＮａｓｅ活性アッセイのためタンパク質を精製した（図８６）。異なるＣａｓ１３オルソログは最適な切断活性に対して様々な塩基優先性を有する可能性があるため、本出願人は、５つのＡ、Ｇ、Ｃ、又はＵのいずれかからなる蛍光ＲＮａｓｅホモポリマーセンサーを作成して直交性の切断優先性を評価した。本出願人は、各オルソログを、合成１７３ｎｔ　ｓｓＲＮＡ　１を標的とするそのコグネイトｃｒＲＮＡとインキュベートし、ホモポリマー蛍光センサーを使用してコラテラル切断活性を測定した（図８３Ｂ及び図８７）。

【０５１２】

実施例４－ライブラリによるモチーフ発見スクリーニング

様々なＣａｓ１３ａ及びＣａｓ１３ｂオルソログの切断優先性の多様性について更に調査するため、本出願人は、コラテラル活性に応答したエンドヌクレアーゼ活性に好ましいモチーフを特徴付けるためのライブラリベースの手法を開発した。本出願人は、定常性ＤＮＡハンドルが隣接する変性６ｍｅｒ　ＲＮＡレポーターを使用し、これにより非切断配列の増幅及びリードアウトが可能であった（図８３Ｃ）。このライブラリをコラテラル活性化されたＣａｓ１３酵素とインキュベートすると検出可能な切断が生じ、これは標的ＲＮＡの添加に依存した（図８８）。枯渇モチーフのシーケンシングにより、塩基優先性の指摘となる、消化時間の経過に伴うライブラリの偏りの増加が明らかになり（図８９Ａ）、閾値比を上回る配列を選択すると数がエンリッチされた配列が生じ、これが酵素の切断に対応した（図８９Ｂ）。エンリッチされたモチーフからの配列ロゴにより、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＣｃａＣａｓ１３ｂについて観察されたＵ優先性及びＰｓｍＣａｓ１３ｂのＡ優先性が再現された（図８９Ｃ）。本出願人はまた、１つのオルソログのみを示し、他は示さなかった複数の配列も決定し、独立したリードアウトを可能にした（図８９Ｄ）。

【０５１３】

酵素優先性の特異的サブモチーフを理解するため、本出願人は一塩基優先性について枯渇モチーフを分析し（図９０Ａ）、これは試験したホモポリマーモチーフ並びに２塩基モチーフと一致した（図８３Ｃ及び図９０Ｂ）。これらの２塩基モチーフから、特にＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂについて、ＴＡ、ＧＡ、及びＡＴ二塩基配列を優先する、より複雑な優先性が明らかになる。高次モチーフからもまた、更なる優先性が明らかになった（図９１及び図９２）。

【０５１４】

本出願人は、標的のインビトロ消化でＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ、及びＣｃａＣａｓ１３ｂのコラテラル優先性を確認した（図９３）。ＰｓｍＣａｓ１３ｂの弱い消化を改善するため、本出願人は緩衝液組成及び酵素濃度を最適化した（図９４Ａ、図９４Ｂ）。ＰｓｍＣａｓ１３ｂ及びＣａｓ１３ｂオルソログで試験した他のジカチオンは大きい効果を有しなかった（図９５Ａ～図９５Ｆ）。本出願人はまた、ＰｓｍＣａｓ１３ｂと、２つのＲＮＡ標的に対する先に特徴付けられたＡ優先性Ｃａｓ１３ファミリーメンバーを比較し、同等の又は向上した感度を見出した（図９６Ａ、図９６Ｂ）。これらの結果から、本出願人は、独立したレポーターを含む別個の反応でＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂの動態を比較し、２つのチャネル間の低レベルのクロストークを見出した（図８３Ｄ）。

【０５１５】

実施例５－ＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ、及びＣｃａＣａｓ１３ｂによる単一分子検出

ＳＨＥＲＬＯＣＫ技術の主要な特徴は、ＬｗａＣａｓ１３ａコラテラルＲＮａｓｅ活性により単一分子検出（２ａＭ又は１分子／μＬ）が可能なことである。Ｃａｓ１３ｂ酵素の感度を特徴付けるため、本出願人は、ウリジン優先性を有する別の高活性Ｃａｓ１３ｂ酵素であるＰｓｍＣａｓ１３ｂ及びＣｃａＣａｓ１３ｂでＳＨＥＲＬＯＣＫを実施した（

図８３Ｅ）。本出願人は、ＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ、及びＣｃａＣａｓ１３ｂが、２つの異なるＲＮＡ標的（ｔａｒｇｅｓｔ）、ｓｓＲＮＡ　１及び合成ジカｓｓＲＮＡの２ａＭ検出を実現可能であったことを見出した（図８３Ｅ；図９７、及び図９８）。これらの３つの酵素によるターゲティングのロバスト性を調べるため、本出願人は、ｓｓＲＮＡ　１にわたって均等な間隔で置かれた１１個の異なるｃｒＲＮＡを設計し、ＬｗａＣａｓ１３ａが最も一貫したシグナル検出を実現した一方、ＣｃａＣａｓ１３ｂ及びＰｓｍｃａｓ１３ｂは両方ともに、はるかに高いｃｒＲＮＡ間の検出変動性を示したことを見出した（図９９）。検出に最適なｃｒＲＮＡを同定するため、本出願人はＰｓｍＣａｓ１３ｂ及びＣｃａＣａｓ１３ｂのスペーサー長さを３４～１２ｎｔまで変え、ＰｓｍＣａｓ１３ｂが３０のスペーサー長さでピーク感度を有し、一方、ＣｃａＣａｓ１３ｂは２８ｎｔを上回るスペーサー長さで同等の感度を有したことを見出した（図１００）。本出願人はまた、検出限界を２ａＭを超えて押し上げて、ＳＨＥＲＬＯＣＫへのより大きい試料容積入力を可能にすることができるかについても試験した。増幅前ＲＰＡステップをスケールアップすることにより、本出願人は、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂが両方ともに、２００、２０、及び２ｚＭ入力試料について有意な検出シグナルを与えることができ、２５０μＬ及び５４０μＬの容積入力が可能であったことを見出した。

【０５１６】

実施例６－ＲＰＡによる定量的ＳＨＥＲＬＯＣＫ

　ＳＨＥＲＬＯＣＫは指数関数的増幅に頼るため、核酸の正確な定量化は困難であり得る。本出願人は、ＲＰＡステップの効率を下げれば、入力量とＳＨＥＲＬＯＣＫ反応のシグナルとの間の相関が改善し得ると仮定した。本出願人は、ＳＨＥＲＬＯＣＫ検出の動態がある試料濃度範囲にわたってプライマー濃度に極めて敏感であったことを観察した（図１０１Ａ～図１０１Ｄ）。本出願人はプライマー濃度を希釈し、これによりシグナル及び定量精度の両方が増加した（図８３Ｇ及び図１０１Ｅ）。この観察は、プライマー－二量体形成の減少により、飽和は防ぎながらもより有効な増幅が可能になったことに起因し得る。１２０ｎＭのプライマー濃度はシグナルと入力との間で最も高い相関を呈した（図１０１Ｆ）。この精度は、アトモル濃度範囲に至るまでの広範囲の濃度にわたって持続可能であった（図８３Ｈ及び図１０１Ｇ）。

【０５１７】

実施例７－直交性Ｃａｓ１３オルソログによる２色多重化

　核酸診断の有利な特徴は、複数の試料入力を同時に検出可能なことであり、これにより多重化検出パネル又は試料内対照が可能になる。Ｃａｓ１３酵素の直交性の塩基優先性は、多重化ＳＨＥＲＬＯＣＫを有する機会をもたらす。本出願人は、種々の塩基アイデンティティ及びフルオロフォア色の蛍光ホモポリマーセンサーによって同じ反応で種々のＣａｓ１３酵素のコラテラル活性をアッセイすることができ、複数標的の同時測定が可能である（図８４Ａ）。この概念を実証するため、本出願人は、ジカウイルスｓｓＲＮＡに対するＬｗａＣａｓ１３ａ　ｃｒＲＮＡ及びデングウイルスに対するＰｓｍＣａｓ１３ｂ　ｃｒＲＮＡ　ｓｓＲＮＡを設計した。本出願人は、同じ反応内に両方のＣａｓ１３－ｃｒＲＮＡ複合体セットを含むこのアッセイが、反応中にジカ又はデングＲＮＡ、又は両方が存在するかどうかを同定可能であることを見出した（図８４Ｂ）。本出願人はまた、ＣｃａＣａｓ１３ｂとＰｓｍＣａｓ１３ｂとの優先性が直交性であるため、これらの２つの酵素をまた、ジカ及びデング標的の多重化検出にも利用し得ることも見出した（図１０２）。本出願人は、この概念を、両方の多重化ＲＰＡプライマー及びＣａｓ１３－ｃｒＲＮＡ複合体を含むＳＨＥＲＬＯＣＫ反応全体に拡げることが成功裏に可能であった。本出願人は緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）に対するＬｗａＣａｓ１３ａ　ｃｒＲＮＡ及び黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）に対するＰｓｍＣａｓ１３ｂ　ｃｒＲＮＡを設計し、アトモル濃度範囲に至るまでの両方のＤＮＡ標的を検出することが可能であった（図８４Ｃ）。同様に、ＰｓｍＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａの両方を使用して、本出願人は、ＳＨＥＲＬＯＣＫを用いたジカ及びデングＲＮＡのアトモル濃度多重化検出を実現することが可能であった（図１０３）。

【０５１８】
本出願人は、ＬｗａＣａｓ１３ａによって単一ヌクレオチド変異体検出が可能であったこと、及びこれをヒト唾液からの迅速遺伝子タイピングに適用し得たことを示したが、検出には２つの別個の反応：各アレルセンシングｃｒＲＮＡにつき１つが必要であった。単一反応ＳＨＥＲＬＯＣＫ遺伝子タイピングを可能にするため、本出願人は、ノロウイルス耐性に関連するα（１，２）－フコシルトランスフェラーゼＦＵＴ２遺伝子の変異体であるｒｓ６０１３３８　ＳＮＰのＧアレルに対してＬｗａＣａｓ１３ａ　ｃｒＲＮＡを設計し、Ａアレルに対してＰｓｍＣａｓ１３ｂ　ｃｒＲＮＡを設計した。この単一試料多重化手法を用いて、本出願人は、４人の異なるヒト対象をその唾液を使用して遺伝子タイピングし、及びホモ接合か、それともヘテロ接合かを正確に同定することが成功裏に可能であった。

【０５１９】
Ｃａｓ１３酵素ファミリーの多用途性を更に示すため、本出願人は、コンパニオン診断及び治療それ自体の両方として働くＣａｓ１３が関わる治療手法をシミュレートした。本出願人（Ａｐｐｉｃａｎｔ）は、近年、転写物のプログラム可能なＲＮＡ編集のためのＰｓｐＣａｓ１３ｂを開発しており、これは、プログラム可能なＡからＩへの置換のためのＲＮＡ編集（ＲＮＡ　Ｅｄｉｔｉｎｇ　ｆｏｒ　Ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ　Ａ　ｔｏ　Ｉ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ：ＲＥＰＡＩＲ）と呼ばれるシステムを使用した、遺伝性疾患における突然変異の修正に使用することができるものである。診断は、治療と組み合わせたとき、治療判断の指針付け又は治療結果のモニタリングに極めて有用となり得るため、本出願人は、ＳＨＥＲＬＯＣＫをＲＥＰＡＩＲ治療の指針付けのための遺伝子タイピングに、また療法の編集効率を追跡するための編集されたＲＮＡのリードアウトとしても用いることができると考えた（図８４Ｅ）。本出願人は、大腸及び直腸の癌が関わる遺伝性障害である家族性大腸腺腫症１型におけるＡＰＣ突然変異（ＡＰＣ：ｃ．１２６２Ｇ＞Ａ）を修正するためこのセラノスティックな概念を実証することを選択した。本出願人はＡＰＣ遺伝子の健常及び突然変異ｃＤＮＡを設計し、それらをＨＥＫ２９３ＦＴ細胞にトランスフェクトした。本出願人はこれらの細胞からＤＮＡを回収し、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｍＣａｓ１３ｂで単一試料多重化ＳＨＥＲＬＯＣＫを用いて正しい試料を成功裏に遺伝子タイピングすることが可能であった（図８４Ｆ）。同時に、本出願人は、ＲＥＰＡＩＲシステム用のガイドＲＮＡを設計してクローニングし、疾患遺伝子型を有する細胞をガイドＲＮＡ及びｄＰｓｐＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２ｄｄ（Ｅ４８８Ｑ）ＲＥＰＡＩＲシステムでトランスフェクトした。４８時間後、本出願人はＲＮＡを回収し、これを本出願人は編集結果を検出するためのＳＨＥＲＬＯＣＫへの入力用と、編集率を確認するための次世代シーケンシング（ＮＧＳ）分析用とに分割した。シーケンシングにより、本出願人がＲＥＰＡＩＲシステムで４３％の編集を実現し（図８４Ｇ）、健常センシングｃｒＲＮＡがノンターゲティングガイド対照条件よりも高いシグナルを示し、且つ疾患センシングｃｒＲＮＡがシグナルの低下を示したことに伴い、これはＳＨＥＲＬＯＣＫで検出可能であった（図８４Ｈ及び図１０４）ことが明らかになった。このアッセイ用の試薬の全体的な設計及び合成に３日かかり、遺伝子タイピングに１日かかり、及びＲＥＰＡＩＲによる修正及び編集率のセンシングに３日かかり、僅か７日にわたる全体的セラノスティックパイプラインがもたらされた。

【０５２０】
本出願人（Ａｐｐｌｉｃｎａｔ）は、レプトトリキア・ウエイデイ（Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ）由来のＶＩ型ＲＮＡガイド下ＲＮＡターゲティングＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａオルソログを使用した極めて高い感度及び特異性の核酸検出を実証している。本出願人は更に、Ｃａｓ１３ｂ酵素ファミリーが生化学的に活性でユニークな特性を有し、そのためＳＨＥＲＬＯＣＫによる核酸の多重化検出に適したものであることを示している。Ｃａｓ１３ｂ酵素の直交性の塩基優先性を特徴付けることにより、本出願人は、ＬｗａＣａｓ１３ａが認識しない、ＰｓｍＣａｓ１３ｂによって認識される蛍光ＲＮＡセンサーの特異的配列を見出した。本出願人は、これらの塩基優先性を利用して、可能な２

つの異なる標的の試料内多重化検出を行い、ウイルス株の区別及び個体の遺伝子タイピングへのこの特徴の有用性を示すことが可能であった。加えて、増幅前ステップをエンジニアリングすることにより、ＳＨＥＲＬＯＣＫを定量的なものとすることができ、入力核酸濃度の近似又は定量化が可能になる。本出願人は、加えて、直交性のＰｓｍＣａｓ１３ｂが単一分子検出能力を有すること、及び容積のスケールアップを通じて本出願人が最大約０．５ｍＬの、且つ２ｚＭの濃度の低さに至るまでの試料検出を実施できることを示している。

【０５２１】

ＳＨＥＲＬＯＣＫによる多重化検出は、空間的に複数の反応を実施することにより可能であるが、直交性の塩基優先性による試料内多重化により多くの標的を大きな規模で、より安価に検出することが可能になる。本出願人はここで２入力多重化を示しており、切断モチーフのスクリーニングにより更なる直交性切断センサーを設計することが可能になる（図９０）。ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＣｃａＣａｓ１３ｂは、両方とも同じウリジンホモポリマーを切断し、従ってホモポリマーセンサーによって測定するとき直交性でないが（図８３Ｂ）、モチーフスクリーニングによって極めてユニークな切断優先性を示した（図９０）。更なるＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃオルソログのスクリーニングにより、多くのオルソログについてユニークな６ｍｅｒモチーフ優先性が明らかになるものと思われ、これらは理論上、スペクトル的にユニークな蛍光センサーの数によってのみ制限を受ける高度に多重化したＳＨＥＲＬＯＣＫが可能であり得る。高度に多重化したＳＨＥＲＬＯＣＫは多くの技術的適用、特に複雑な入力センシング及び論理計算が関わる適用を実現する。

【０５２２】

目に見える、より高感度の多重化されたリードアウトに向けたＣａｓ１３ベースの検出のこうした更なる改善は、特に携帯型の、機器類不要の分析が必要なセッティングで、核酸検出の適用性の増加を実現する。迅速多重化遺伝子タイピングによれば、ファーマコゲノミクス上の判断に際して情報を与え、複数の作物形質を現地で試験し、又は同時に発生する病原体の存在を評価することができる。迅速な等温のリードアウトは、例え循環ＤＮＡのようなまれな種についてであっても、動力又は携帯型リーダーを利用できないセッティングに向けたこの検出の利用可能性を高める。ＣＲＩＳＰＲベースの核酸検査の改良により、農業、病原体検出、及び慢性疾患における核酸の存在の理解が容易になる。

【０５２３】

当業者には、本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく、記載される本発明の方法、医薬組成物、及びキットの様々な改良例及び変形例が明らかであろう。本発明は具体的な実施形態に関連して記載されているが、更なる改良が可能であること、及び特許請求されるとおりの本発明がかかる具体的な実施形態に不当に限定されてはならないことは理解されるであろう。実際、当業者には自明の、記載される本発明の実施態様の様々な改良例が、本発明の範囲内にあることが意図される。本願は、一般に本発明の原理に従う、且つ本発明が関係する技術分野内の公知の慣行の範囲内に入る本開示からのかかる逸脱を含む本発明のいかなる変形例、使用、又は適合も包含することが意図され、本明細書で上記に示される本質的な特徴に適用され得る。

【図面】

【図１】

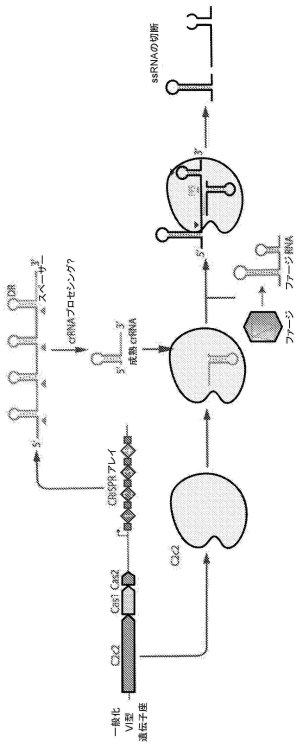



図1

【図２】

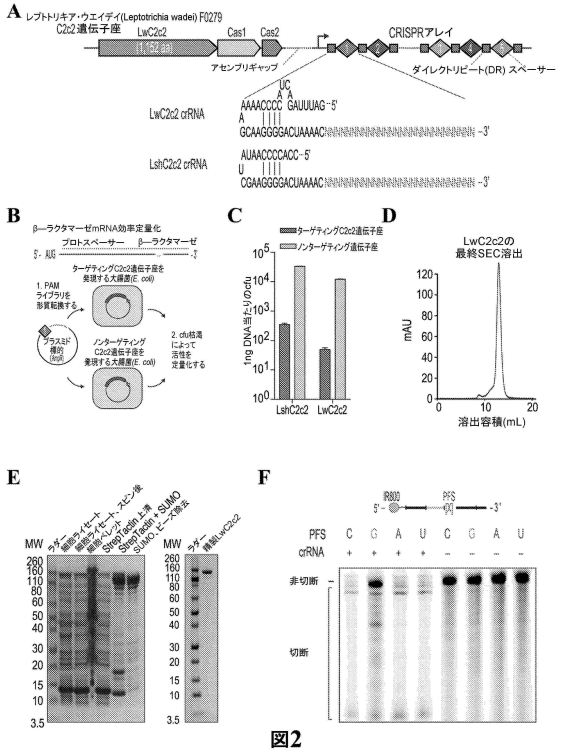



図2

【図３】

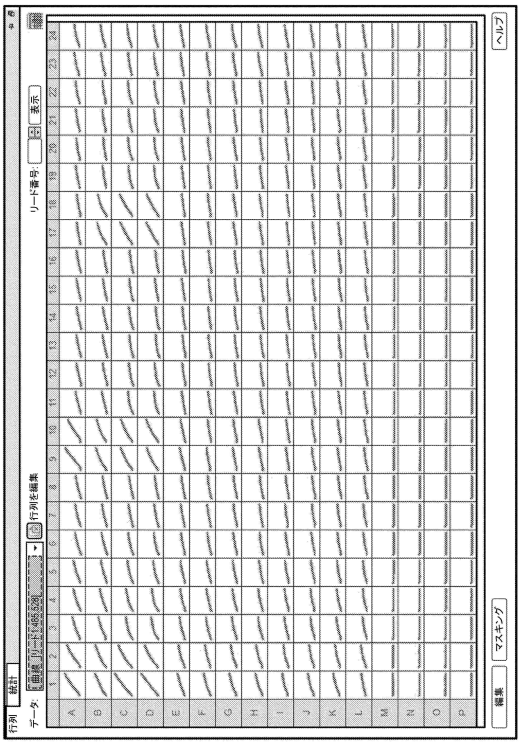


図3

【図４】

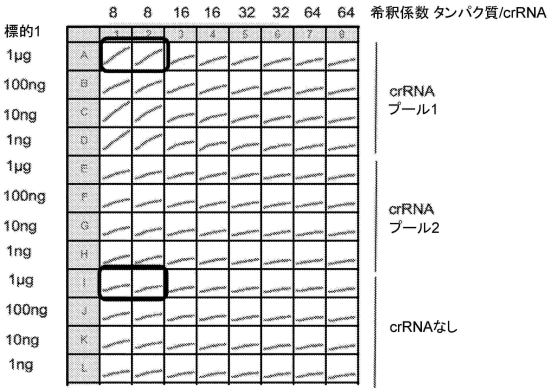



図4

【図５】

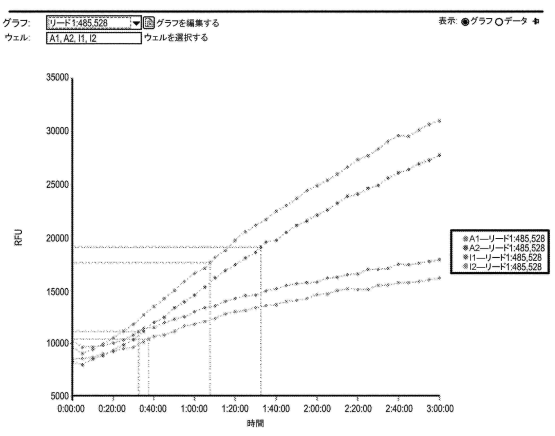



図5

【図６】

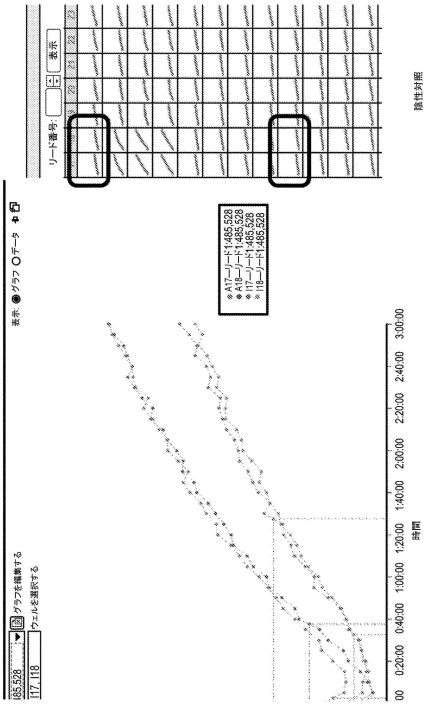



図6

【図７】

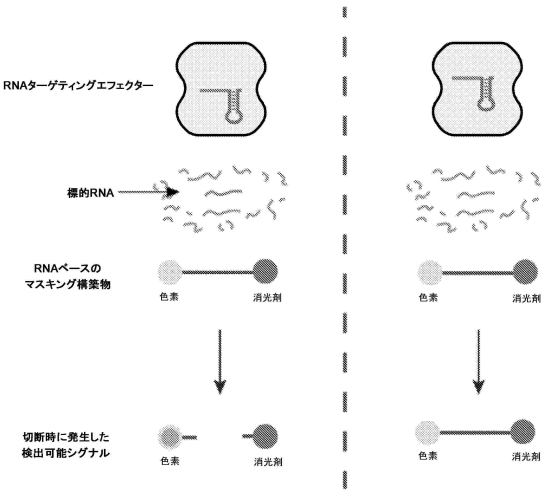



図7

【図８】

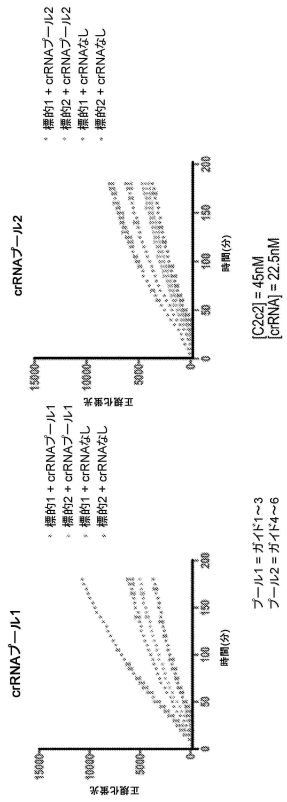



図8

【図９】

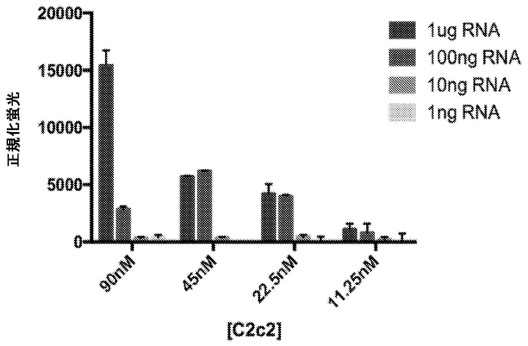



図9

【図１０】

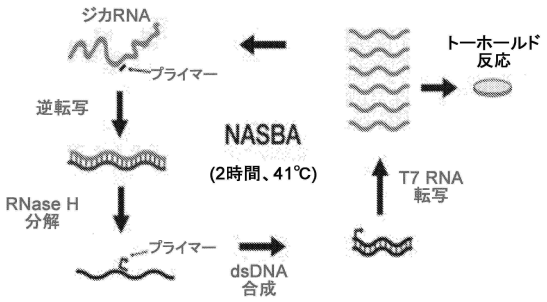



図10

【図１１】

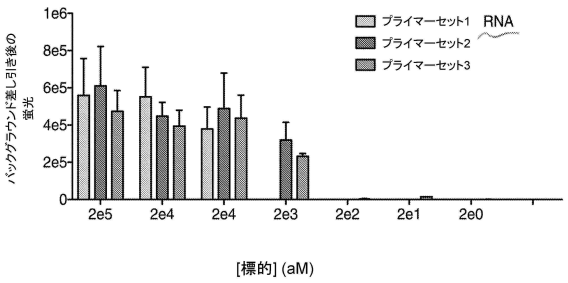



図11

【図１２】

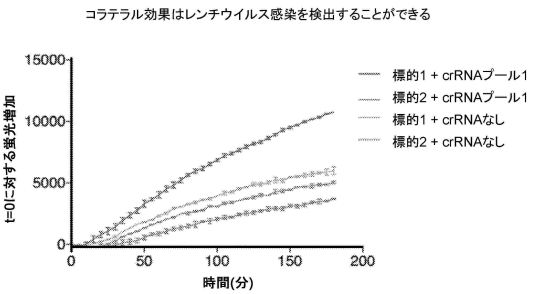



図12

【図１３】

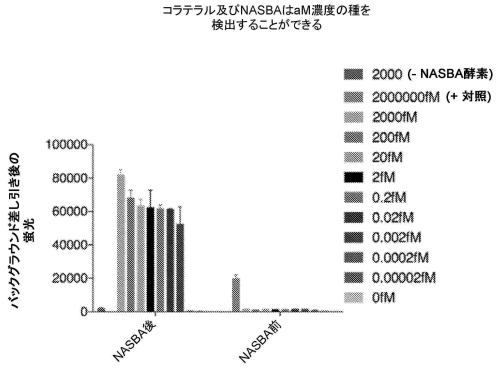



図13

【図１４】

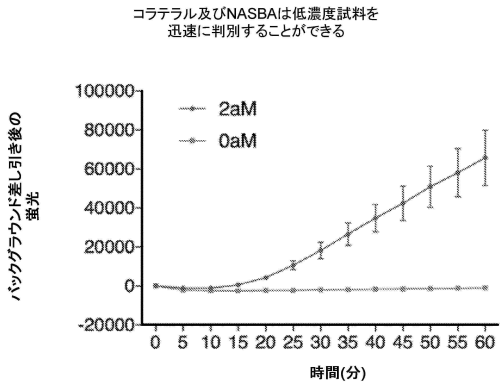



図14

【図１５】

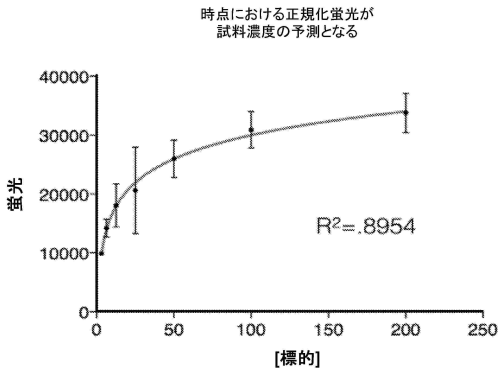



図15

【図１６】

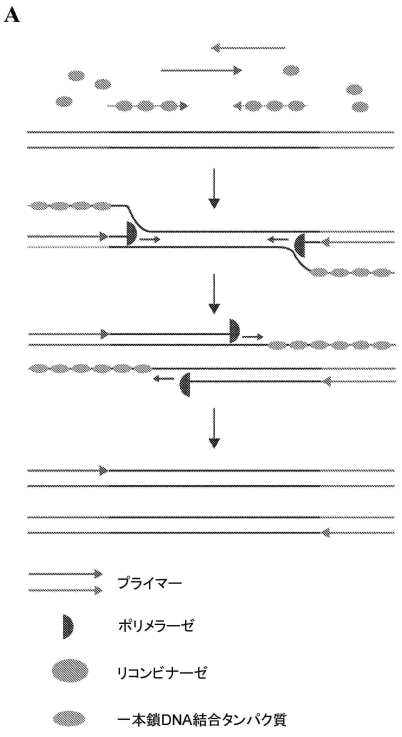



図16

【図１７】

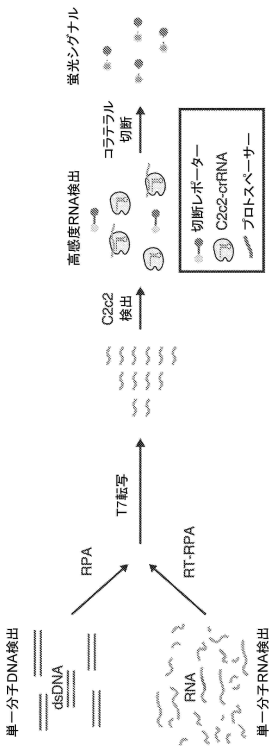



図17

【図１８】

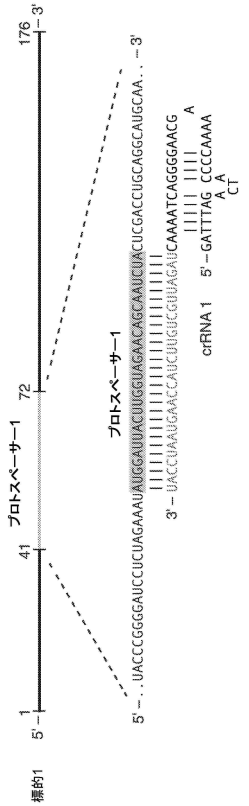



図18

【図１９】

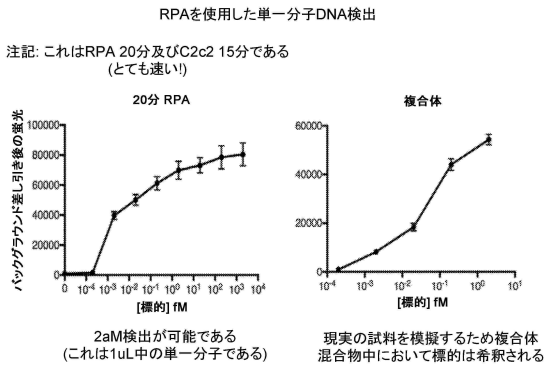
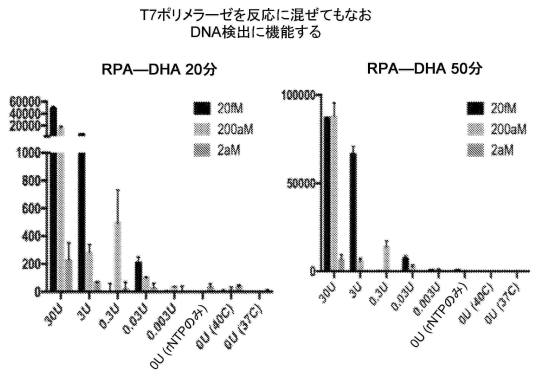



図19

【図２０】




早くも20分のC2c2インキュベーションでDNAの単一分子検出。T7ポリメラーゼが
多いほど良い(x軸はT7単位である)

図20

【図２１】

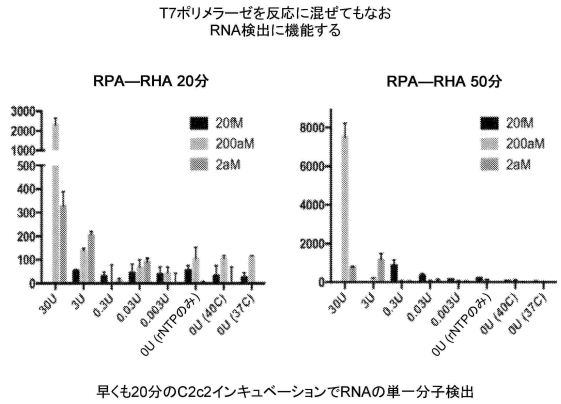



図21

【図２２】

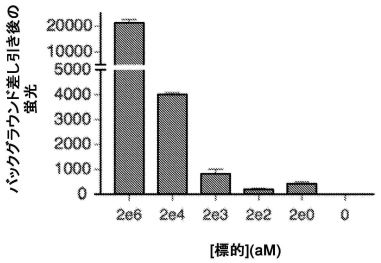



図22

【図２３】

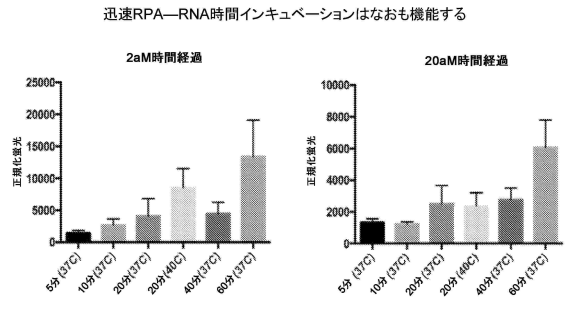



図23

【図２４】

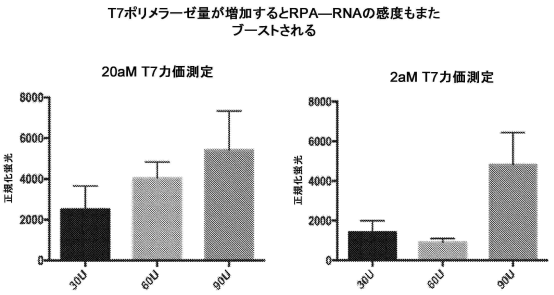



図24

【図２５】

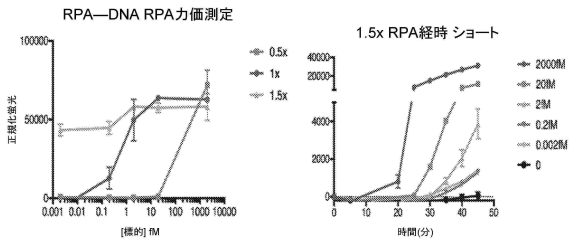



図25

【図２６】

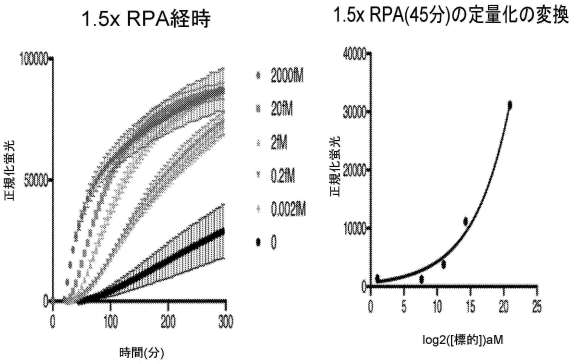



図26

【図２７】

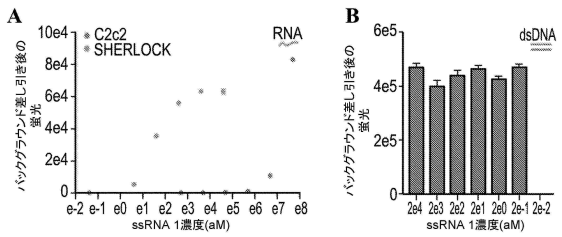
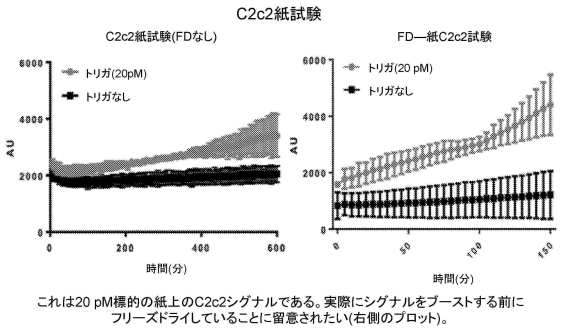



図27

【図２８】




これは20 pM標的の紙上のC2c2シグナルである。実際にシグナルをブーストする前にフリーズドライしていることに留意されたい(右側のプロット)。

図28

【図２９】

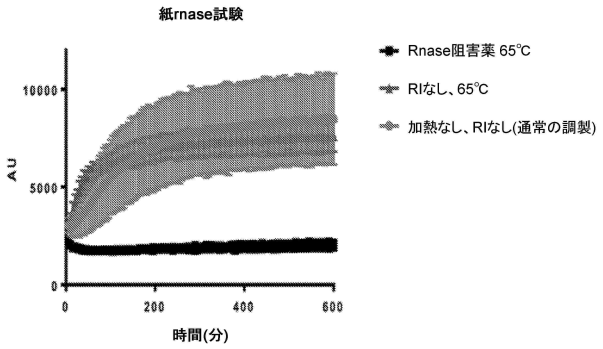



図29

【図３０】

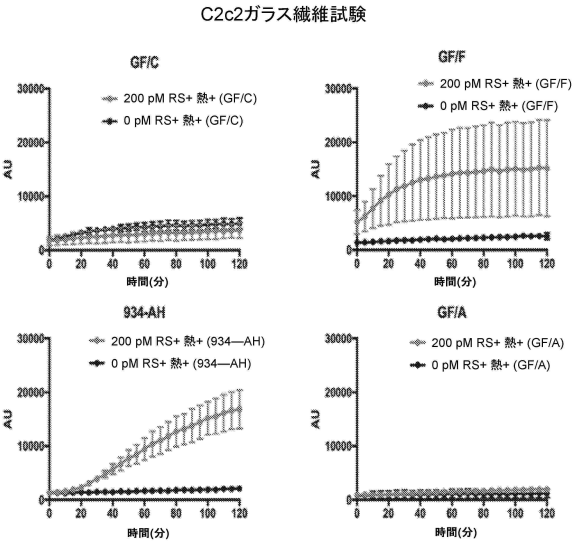



図30

【図３１】

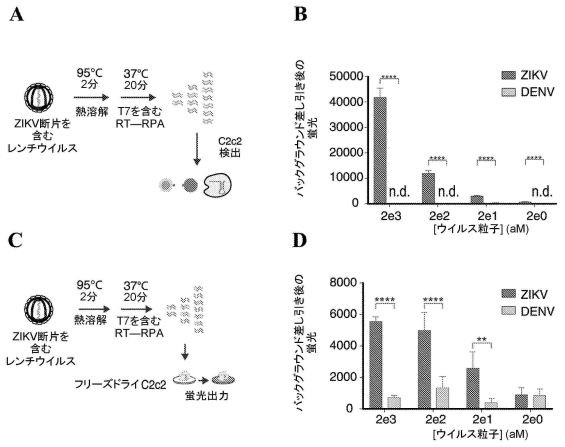



図31

【図３２】

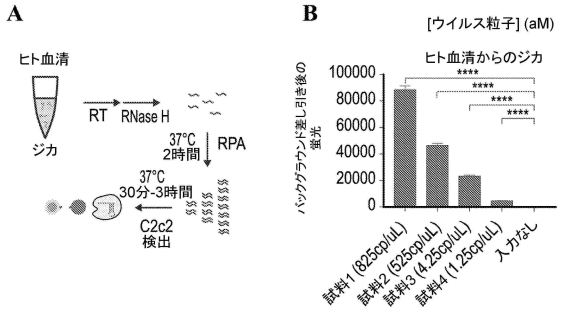



図32

【図３３】

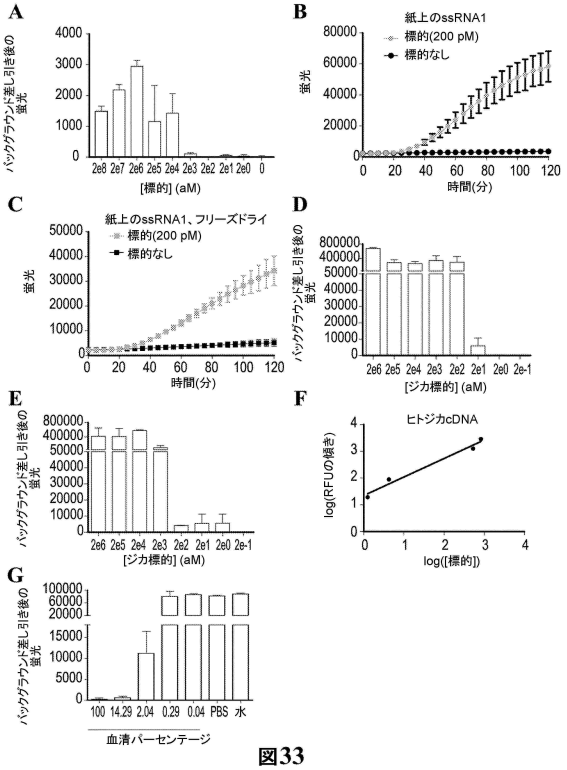



図33

【図３４】

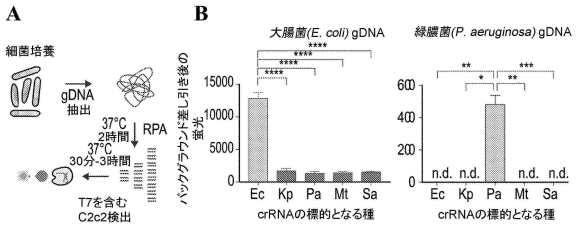



図34

【図３５】

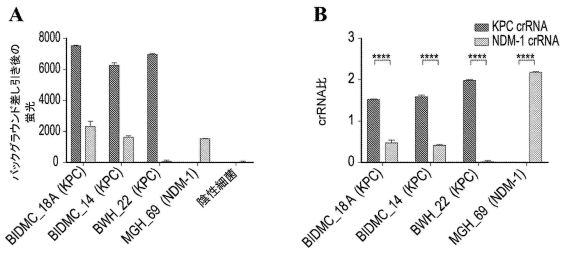



図35

【図３６】

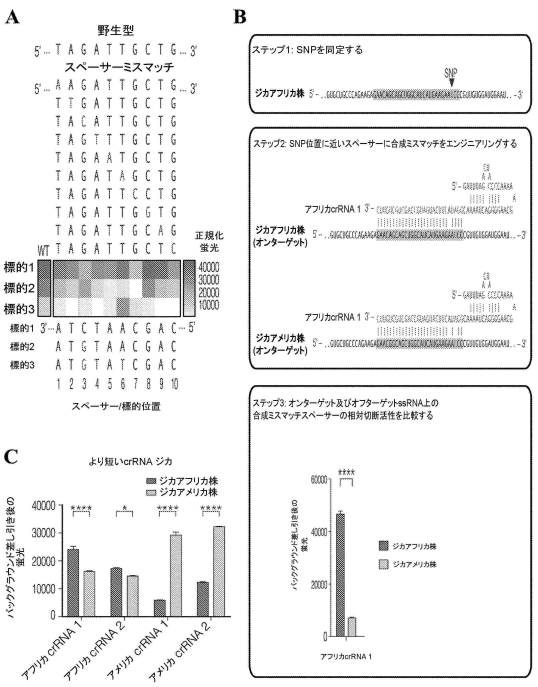



図36

【図３７】

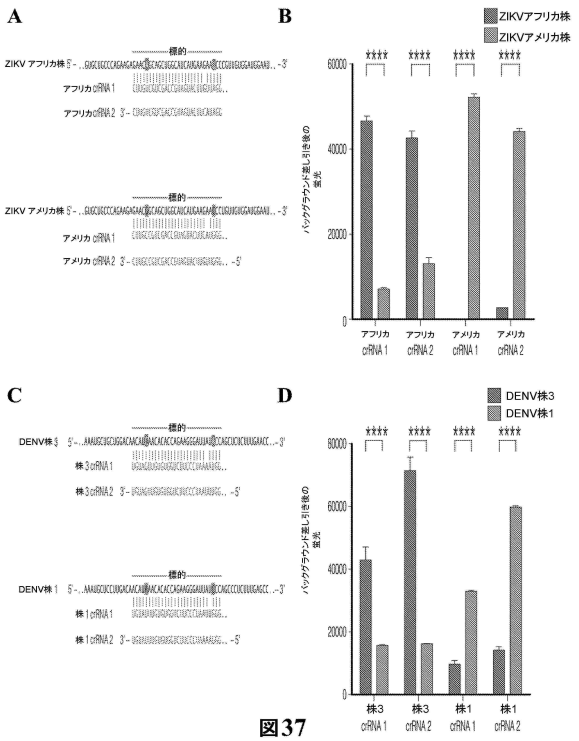



図37

【図３８】

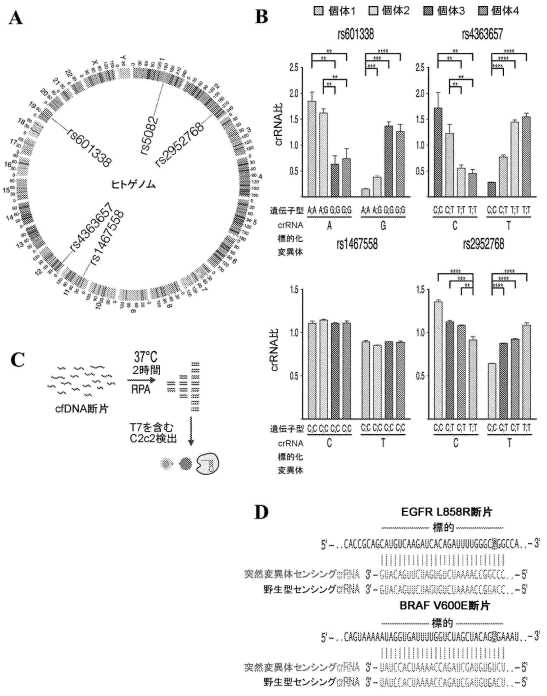



図38

【図３９】

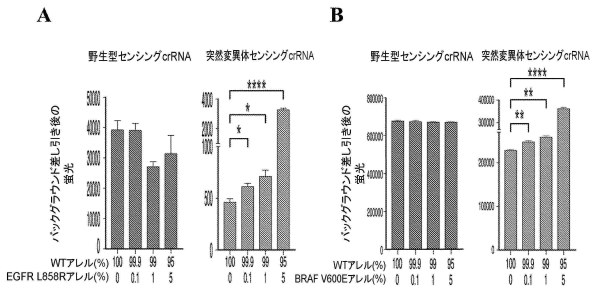



図39

【図４０】

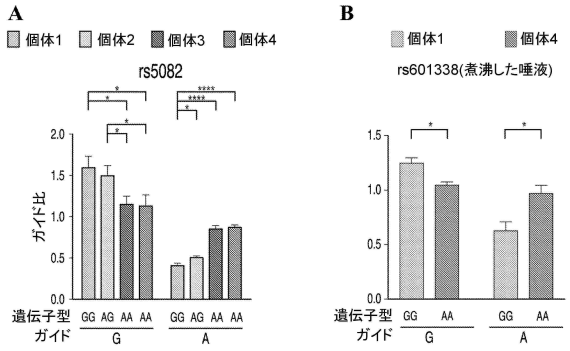



図40

【図４１】

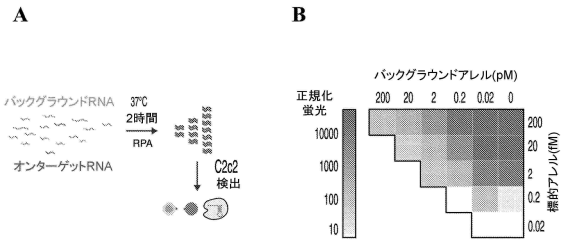



図41

【図４２】

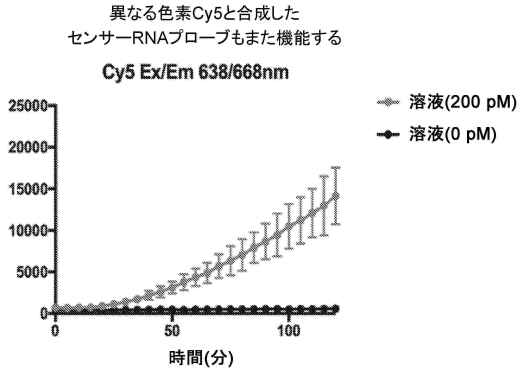



図42

【図４３】

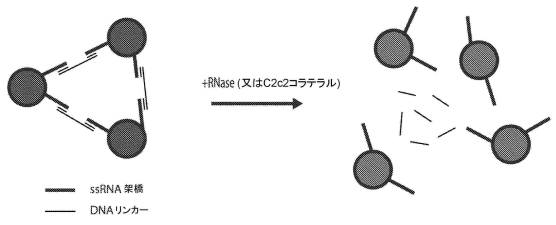



図43

【図４４】

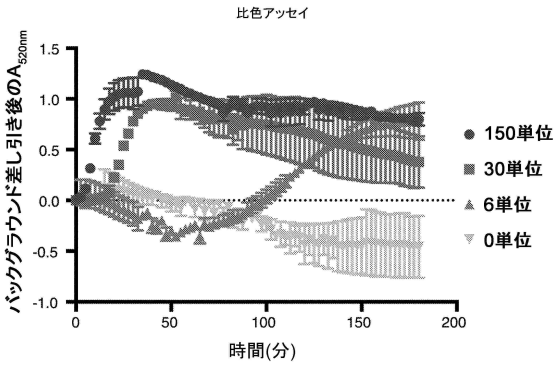



図44

【図４５】

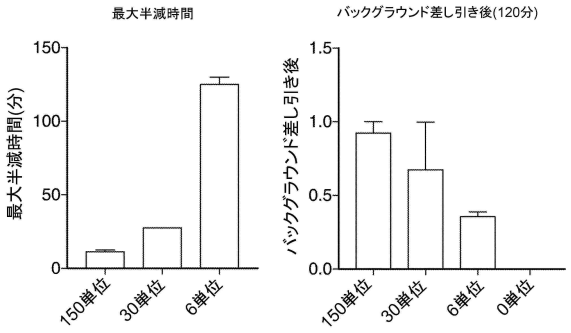



図45

【図４６】

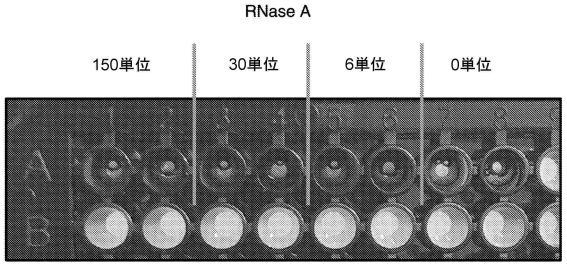



図46

【図４７】

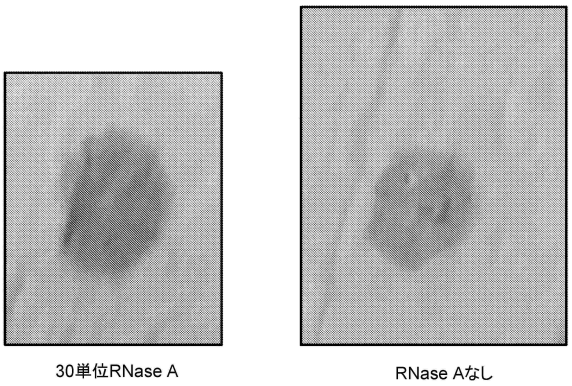



図47

【図４８】

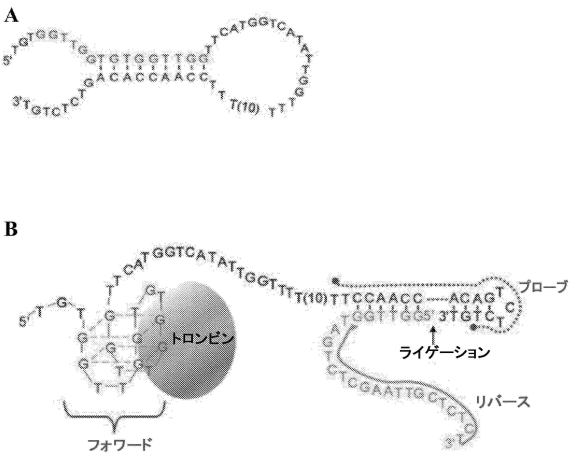



図48

【図４９】

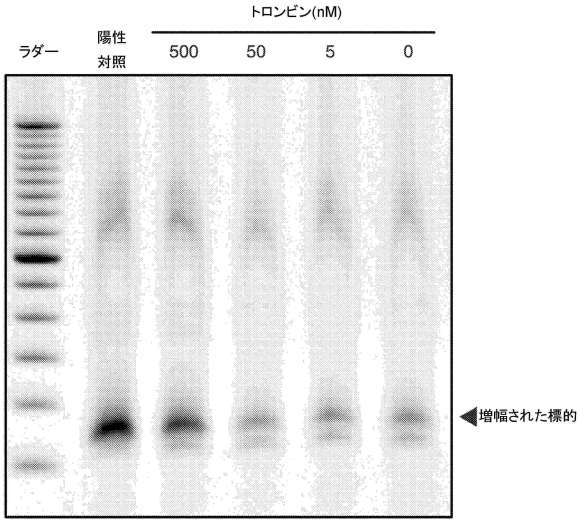



図49

【図５０】

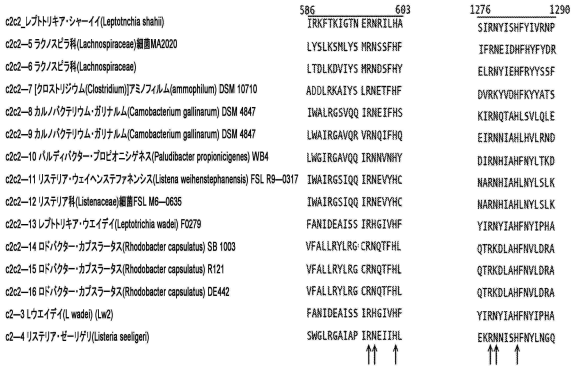



図50

【図５１】

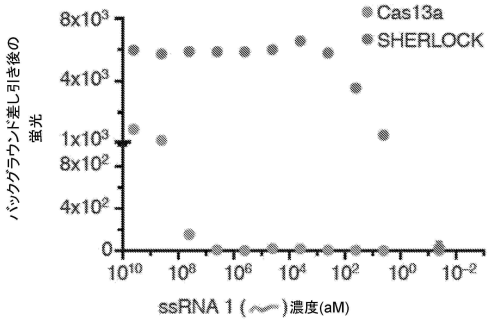



図51

【図５２】

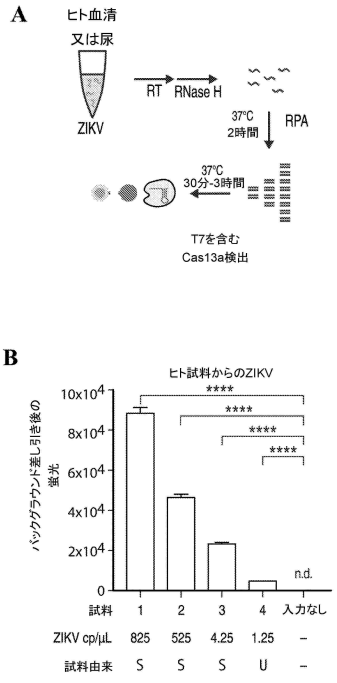



図52

【図５３】

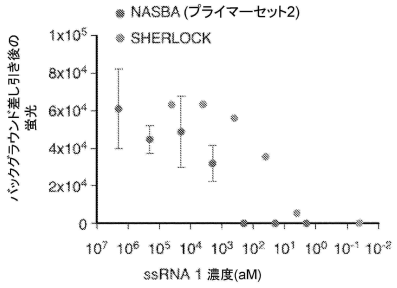



図53

【図５４－１】

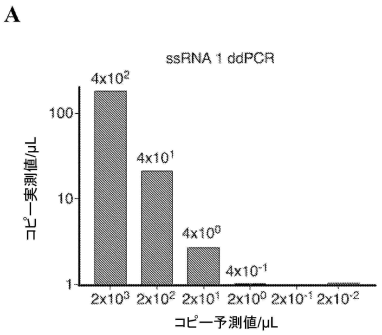



図54

【図５４－２】

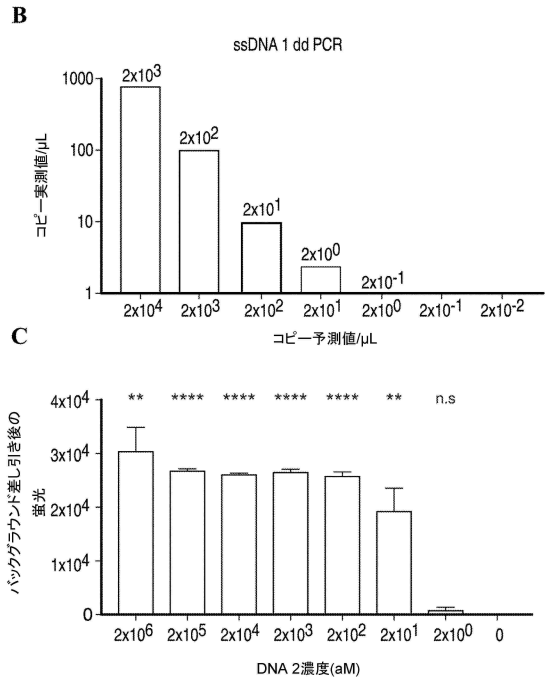



図54 (続き)

【図５５－１】

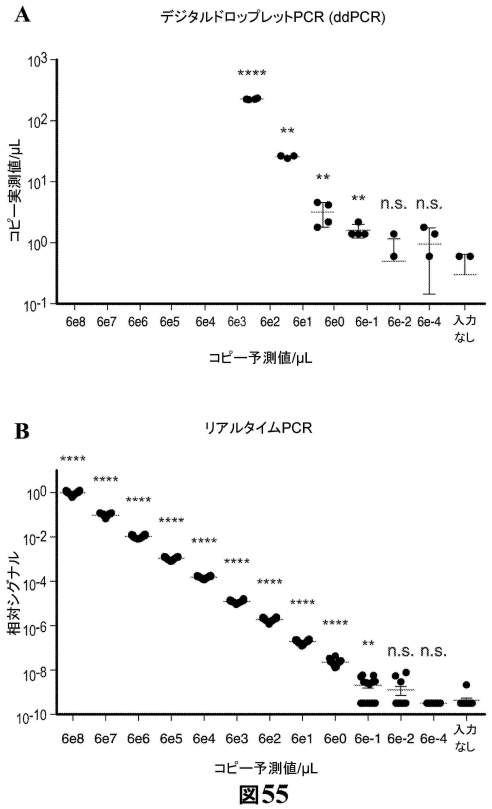



図55

【図５５－２】

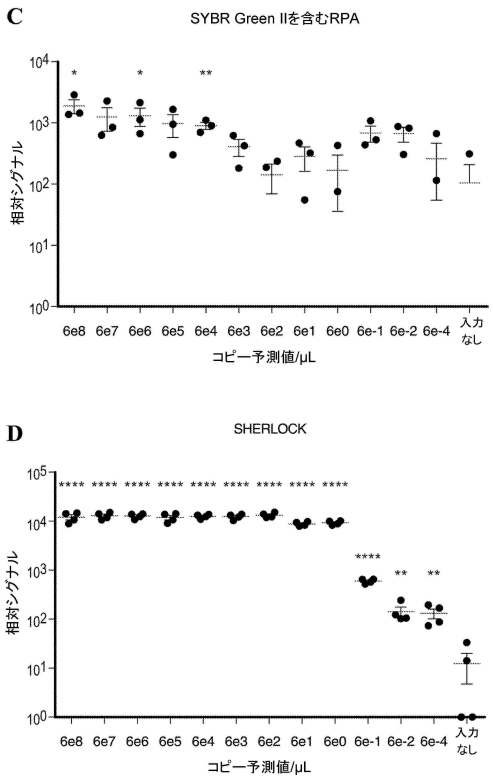



図55 (続き)

【図５５－３】

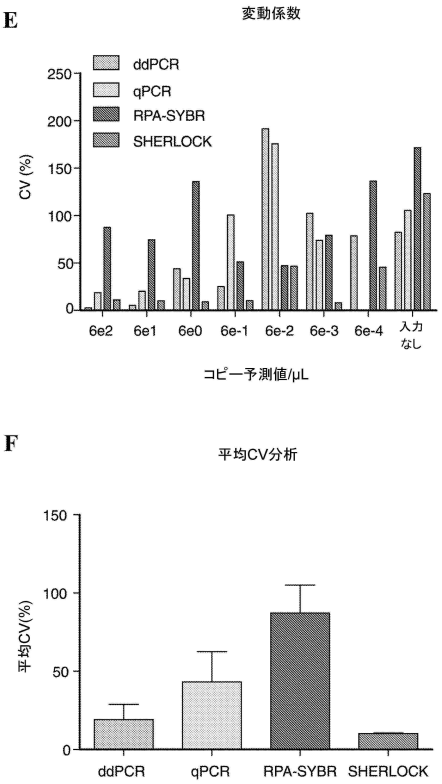



図55 (続き)

【図５６】

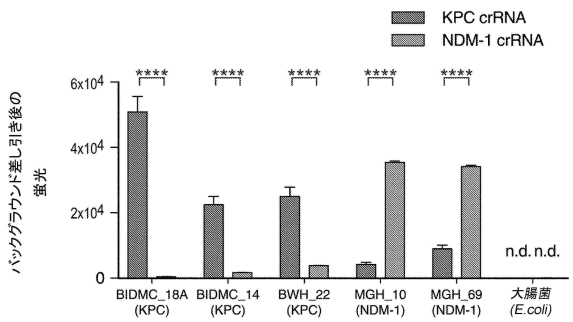



図56

【図５７－１】

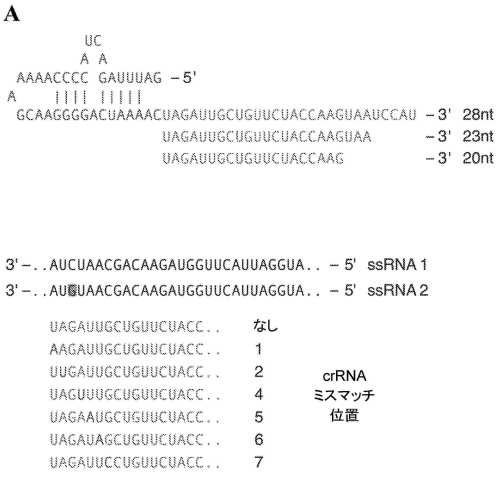



図57

【図５７－２】

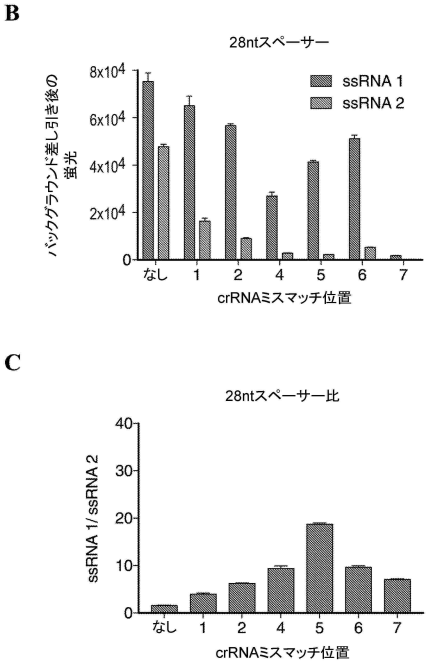



図57 (続き)

【図５７－３】

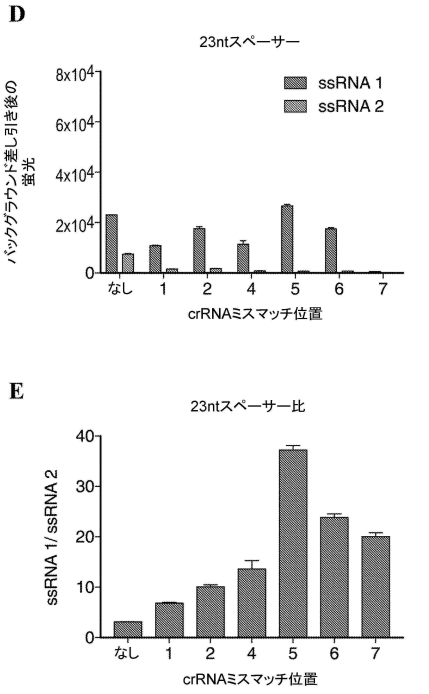



図57 (続き)

【図５７－４】

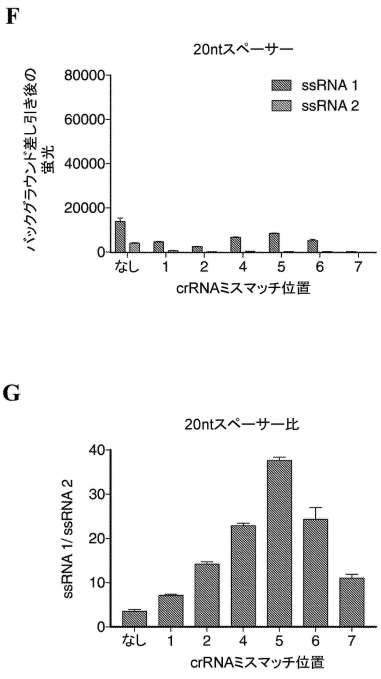



図57 (続き)

【図５８－１】

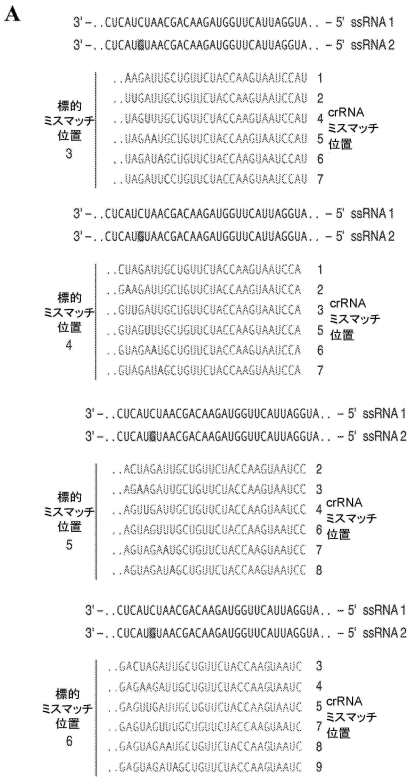



図58

【図５８－２】

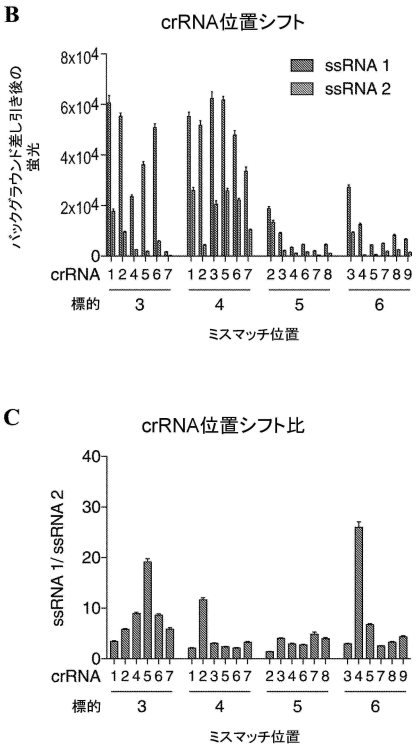



図58 (続き)

【図５９】

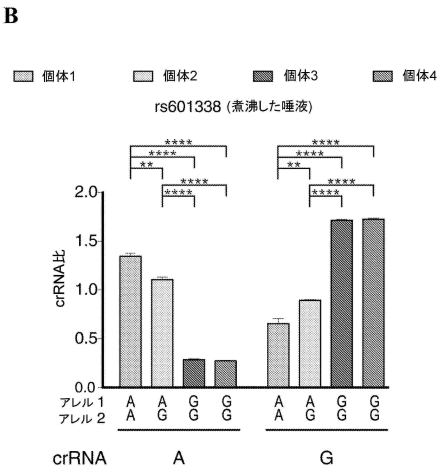



図59

【図６０－１】

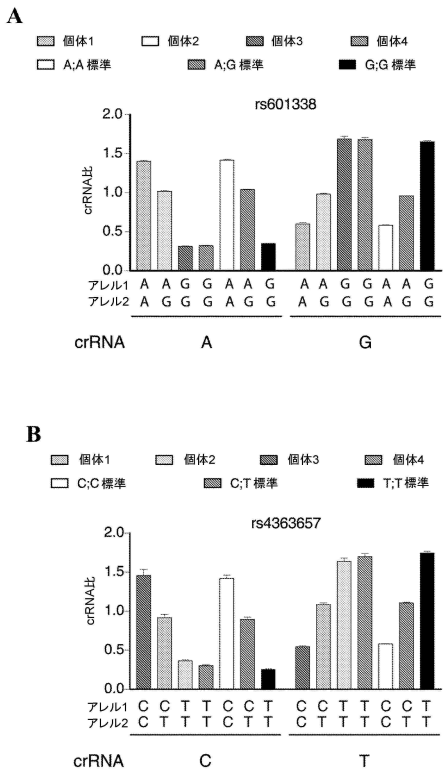



図60

【図６０－２】

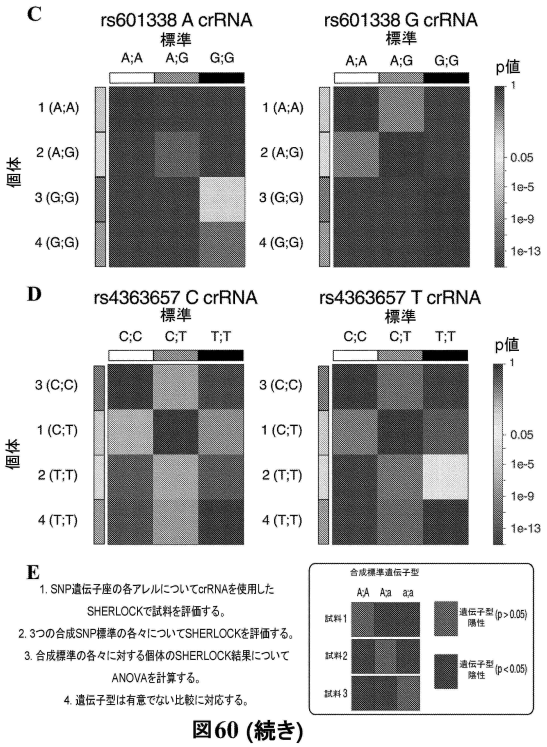



図60 (続き)

【図６１】

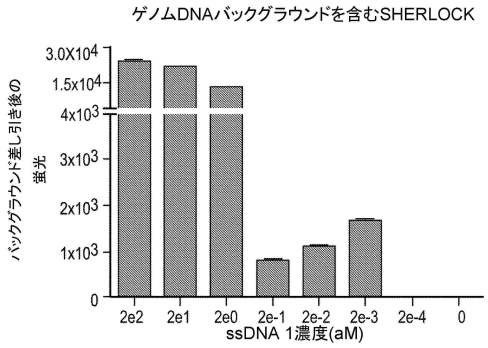



図61

【図６２】

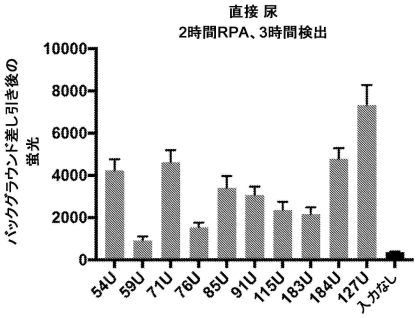



図62A

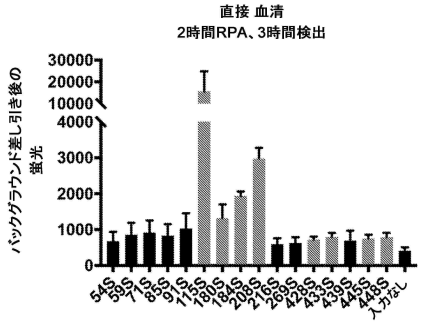



図62B

【図６３】

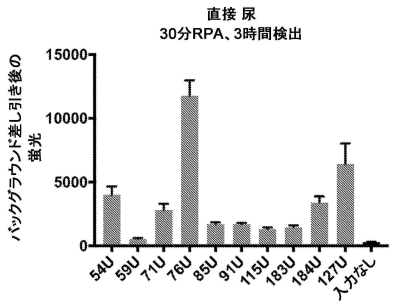



図63A

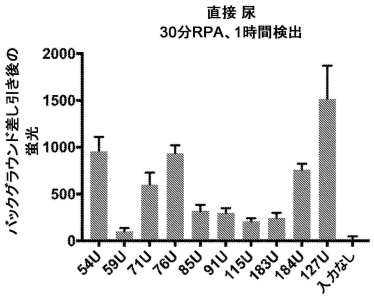



図63B

【図６４】

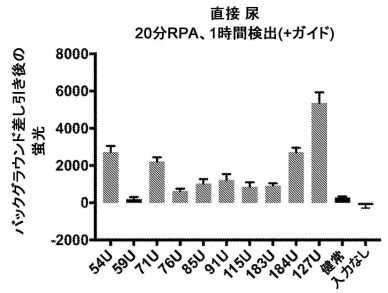



図64

【図６５】

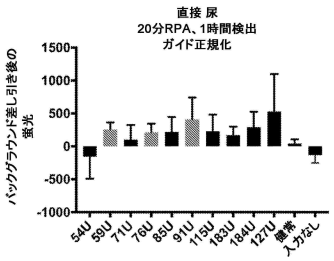



図65A

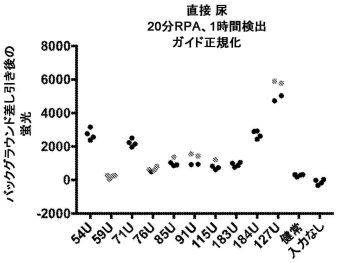
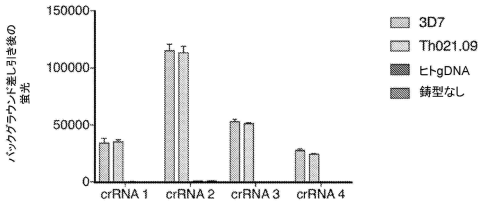



図65B

【図６６】




| | |
|---|---|
| gaaattaatacgactcactataggg TTATTGCAATTATTAATCTTG AACGAGGAATG | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的1プライマーセット1 F |
| gaaattaatacgactcactataggg GATTGACAGATTAATAGCTCT TTCTTGATTTC | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的1プライマーセット2 F |
| ATTTTTCTTGTCCAAACAATTCATCATATCTT | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的1プライマーセット1 R |
| TTCAATTTCAAATAAGAATATAGTGTACTCGC | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的1プライマーセット2 R |
| gaaattaatacgactcactataggg TTCTTATTAGCAGAACAAAGA AGTTTAACAAC | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的2プライマーセット1 F |
| gaaattaatacgactcactataggg ATTTTATGCAATGTTAAAAAC TGTTCCAAGTA | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的2プライマーセット2 F |
| TAATTGACATCCAATCCATAATAAAGCATAGA | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的2プライマーセット1 R |
| GAATTATAGTTGTTAAACTTCTTTGTTCTGCT | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的2プライマーセット2 R |
| cctagtaagcatgattcatcagattgtggttttagtccccttcgtt tttggggtagtctaaatcccctatagtgagtcgtattaatttc | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的1プライマーセット1 crRNA |
| ggatggtgatgcatggccgtttttagttgttttagtccccttcgtt tttggggtagtctaaatcccctatagtgagtcgtattaatttc | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的1プライマーセット2 crRNA |
| caatttaaaatgatttttggtgctagaggttttagtccccttcgtt tttggggtagtctaaatcccctatagtgagtcgtattaatttc | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的2プライマーセット1 crRNA |
| gctggtttagtaattgtattattatcatgttttagtccccttcgtt tttggggtagtctaaatcccctatagtgagtcgtattaatttc | 熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum) 標的2プライマーセット2 crRNA |

図66

【図６７－１】

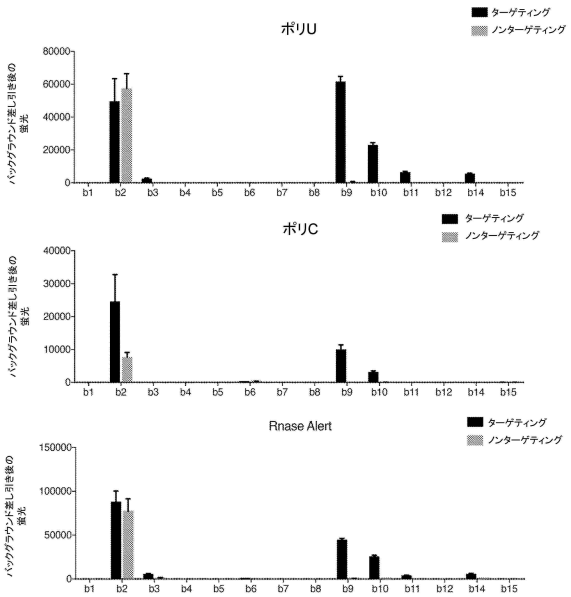



図67

【図６７－２】

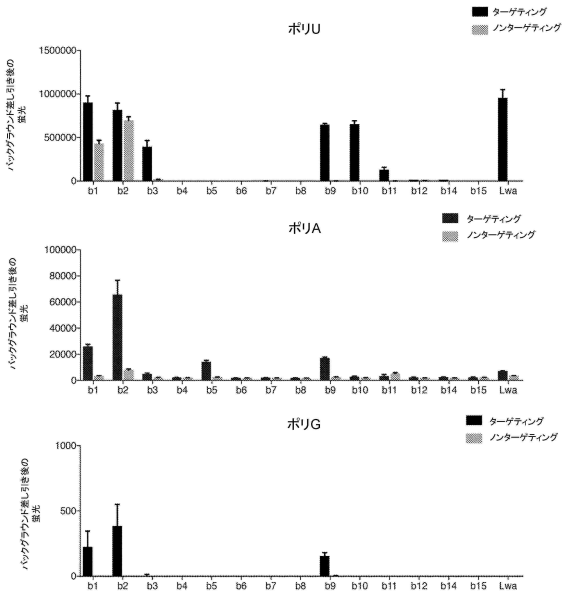



図67 (続き)

【図６８】

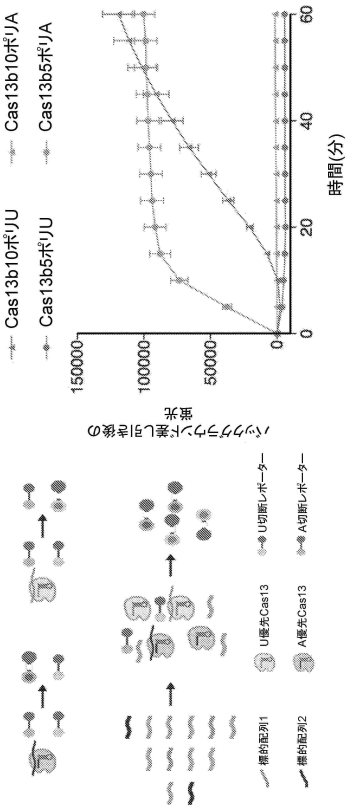



図68

【図６９】

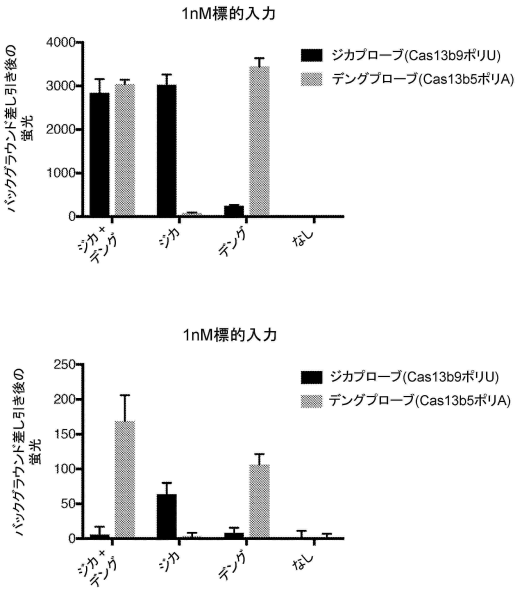



図69

【図７０】

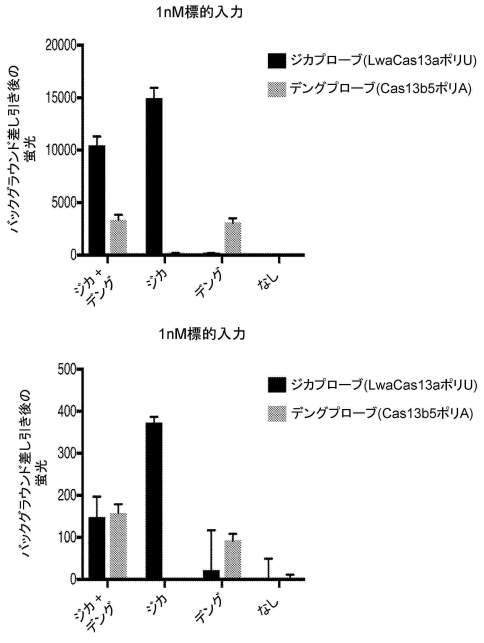



図70

【図７１】

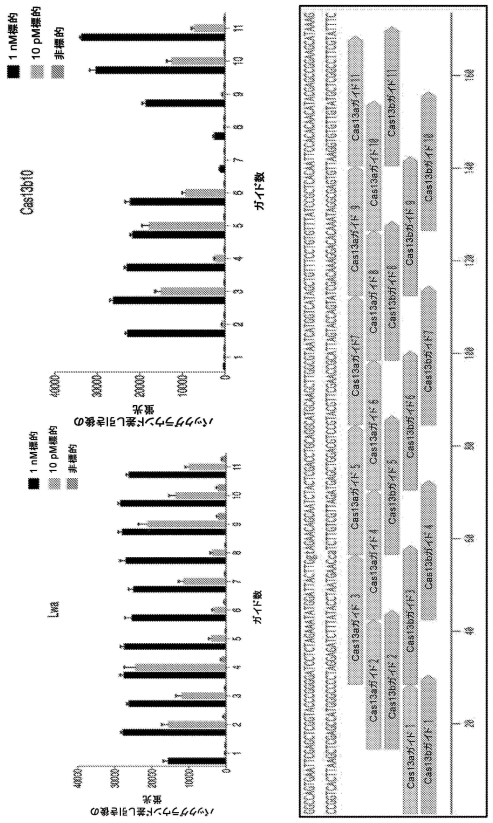



図71

【図７２】

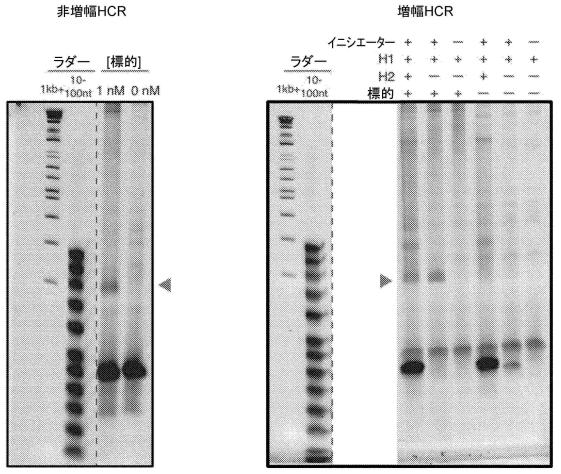



図72

【図７３】

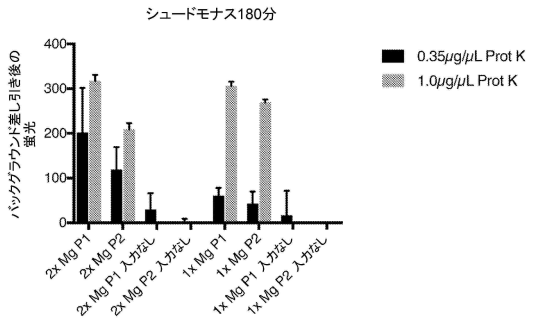



図73

【図７４】

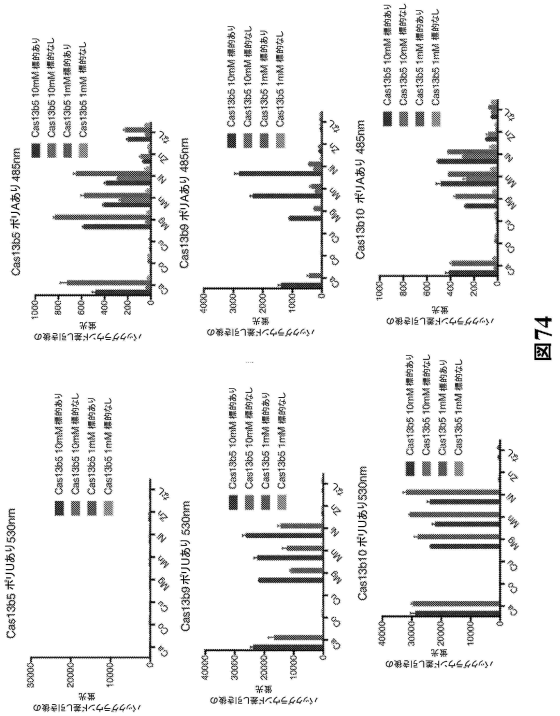



図74

【図７５】

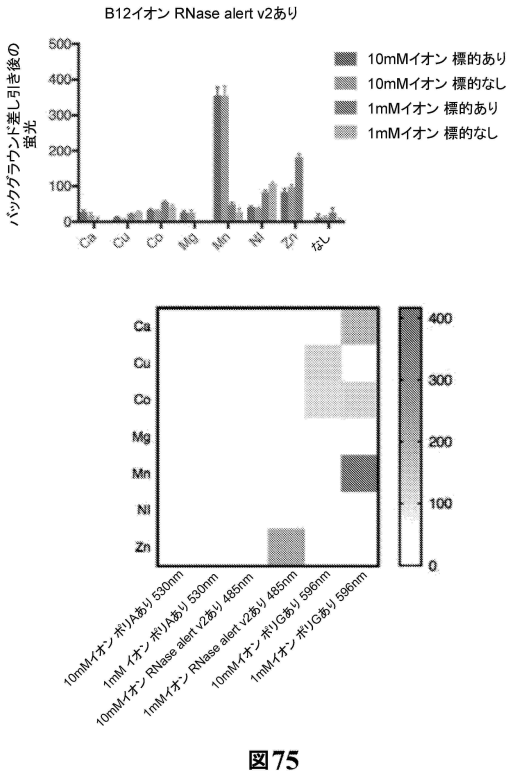



図75

【図７６】

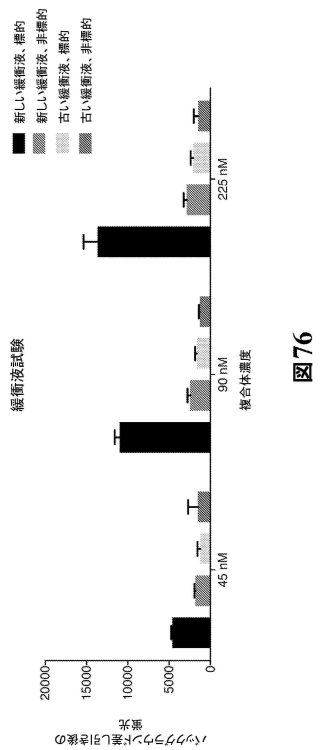



図76

【図７７】

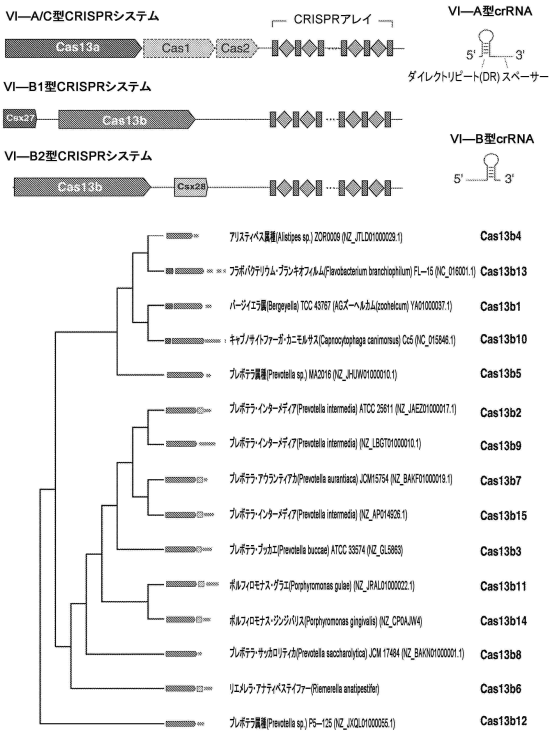



図77

【図７８】

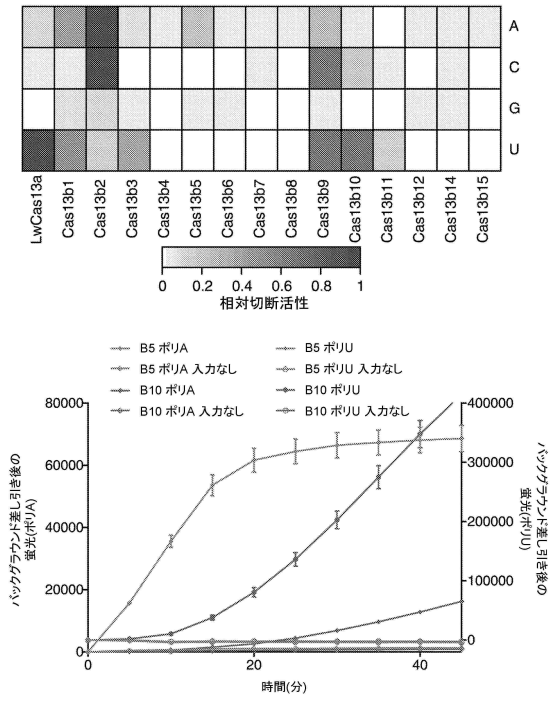



図78

【図７９】

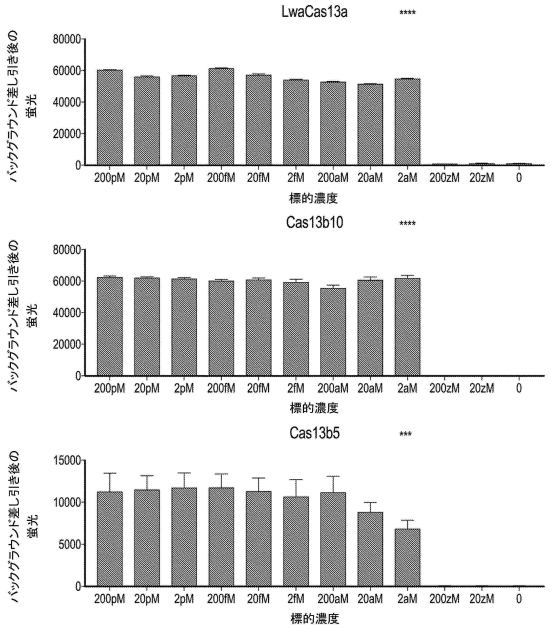



図79

【図８０】

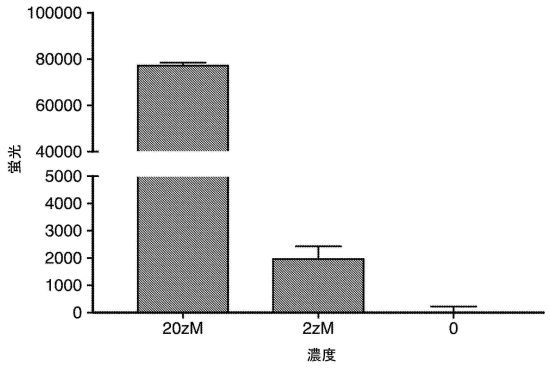



図80

【図８１】

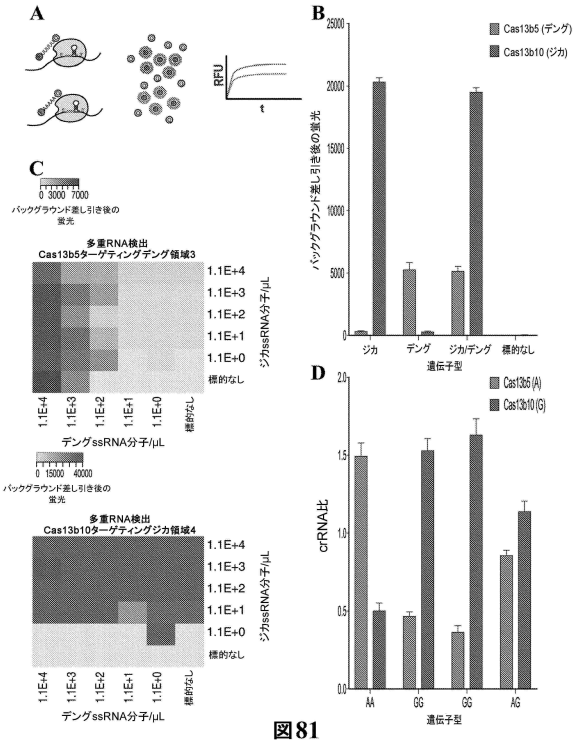



図81

【図８２－１】

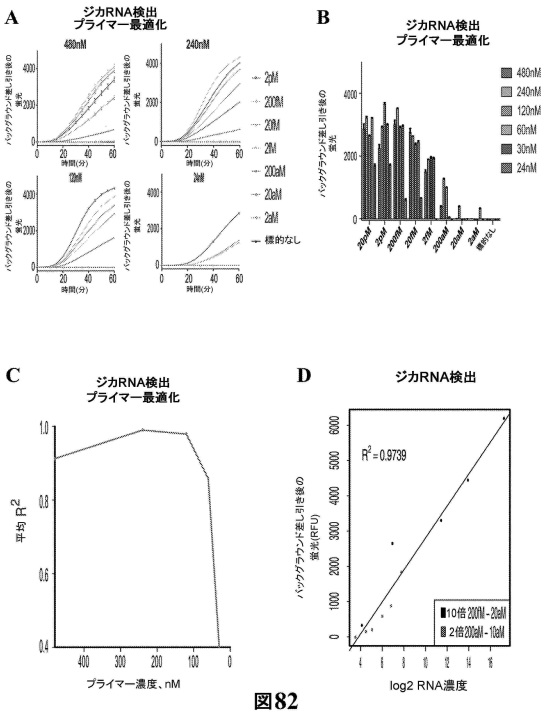



図82

【図８２－２】

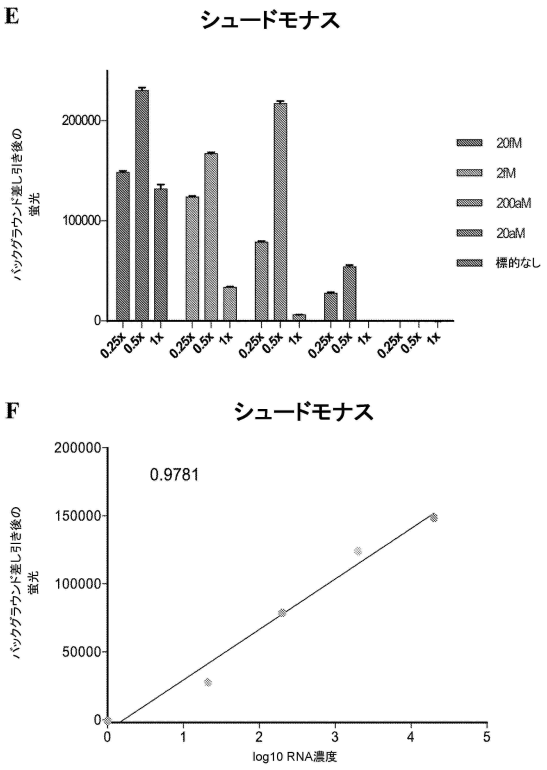



図82 (続き)

【図８３－１】

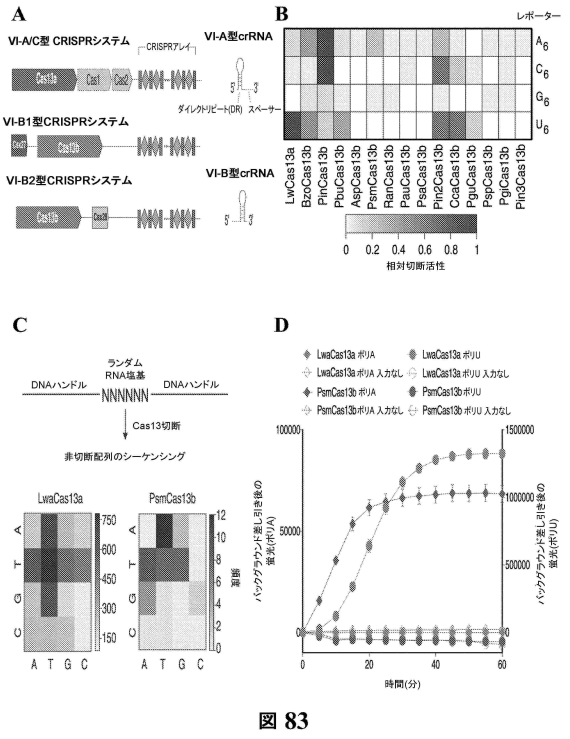



図 83

【図８３－２】

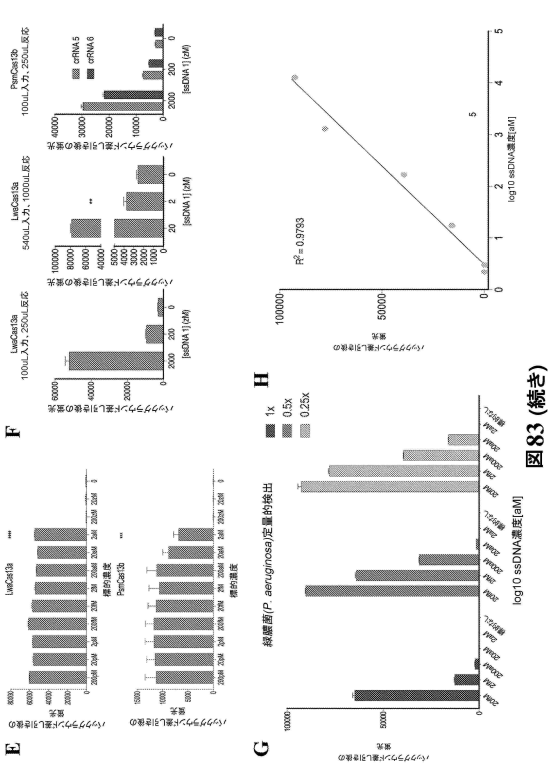



図 83 (続き)

【図８４】

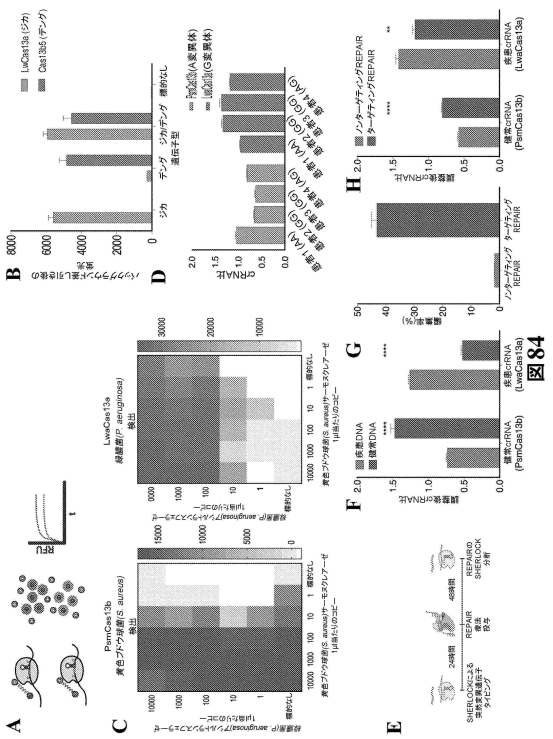



図 84

【図８５】

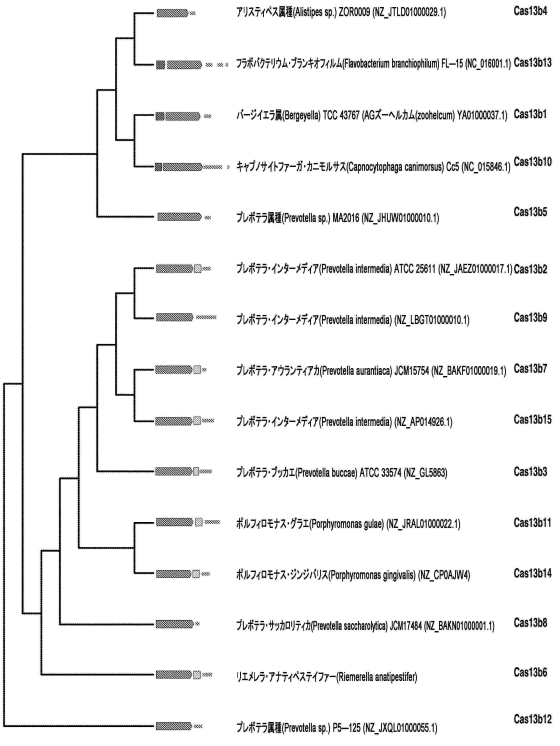



図85

【図８６】

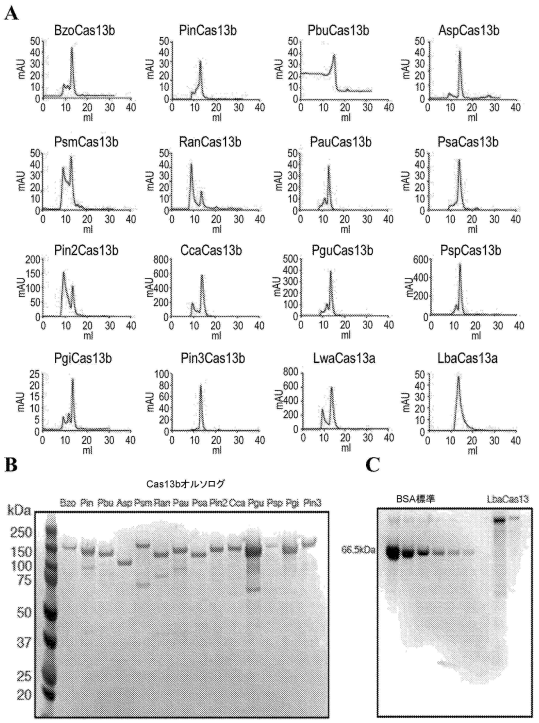



図86

【図８７】

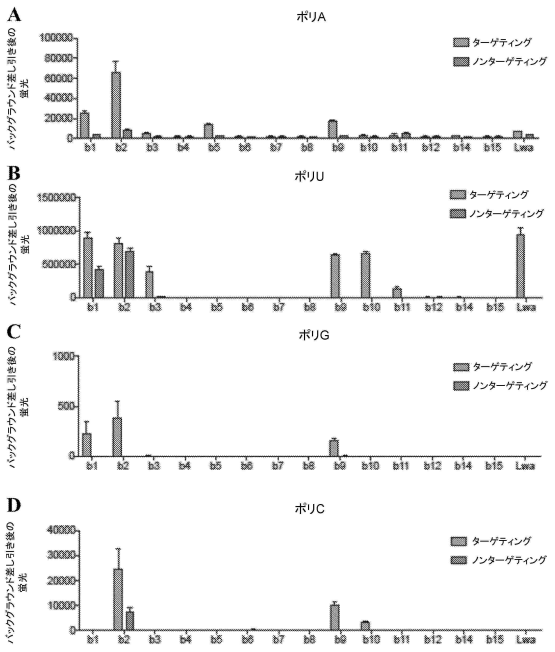



図87

【図８８】

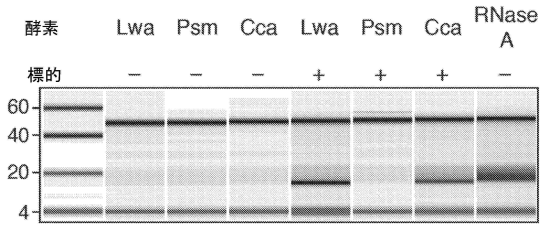



図88

【図８９】

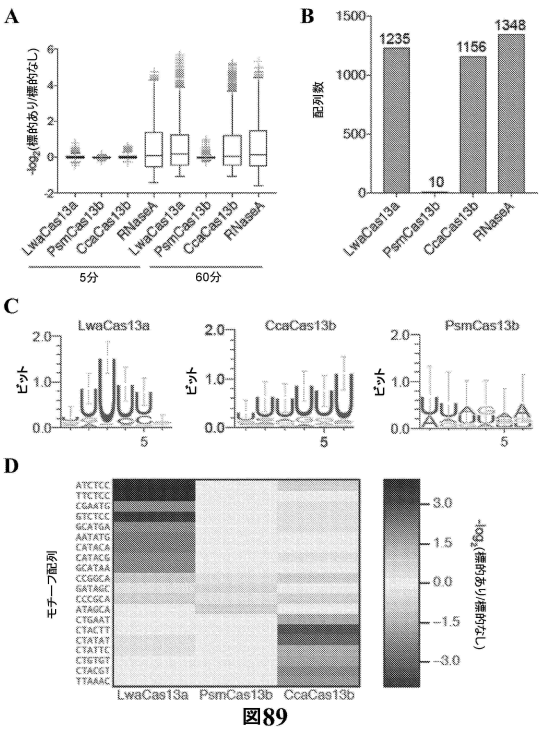



図89

【図９０】

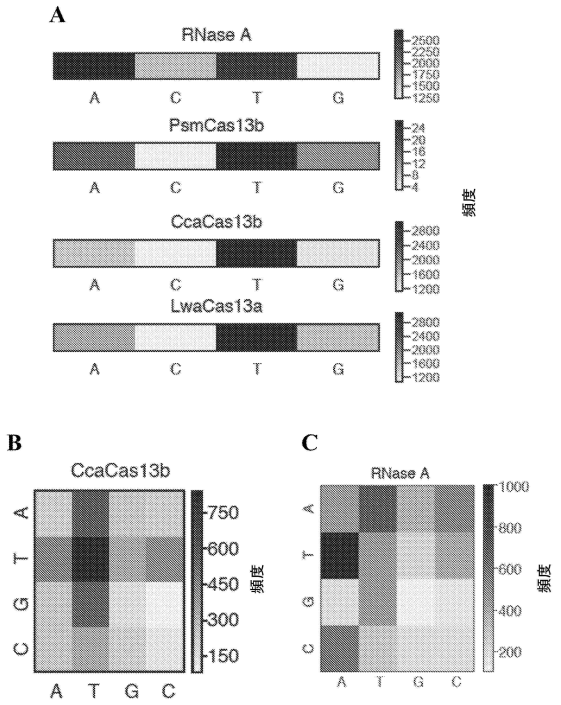



図90

【図９１】

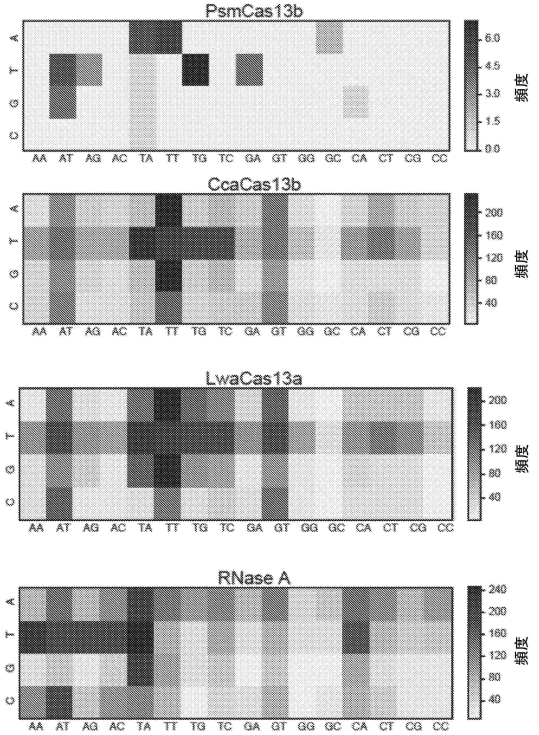



図91

【図９２】

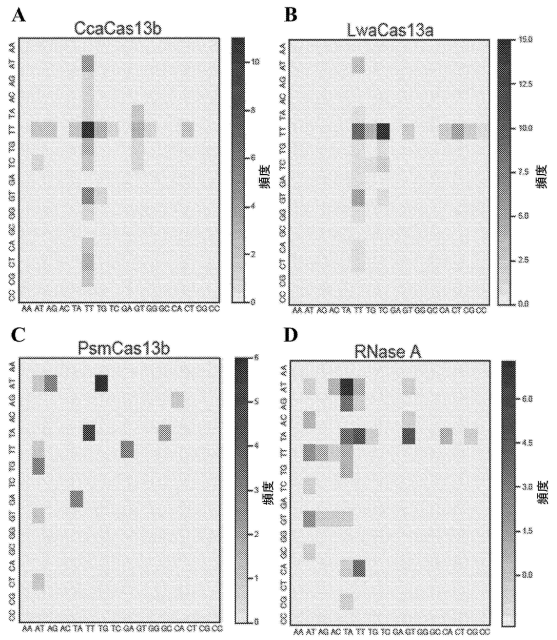



図92

【図９３】

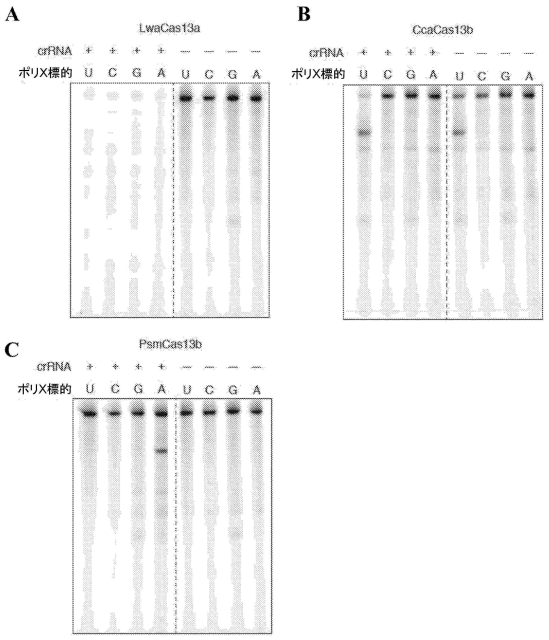



図93

【図９４】

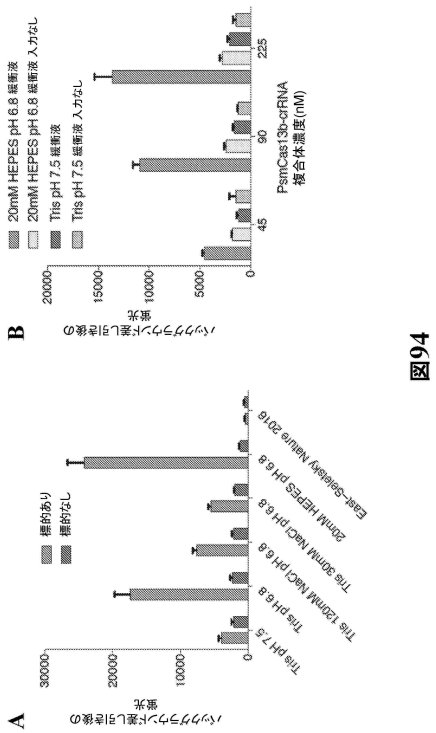



図94

【図９５】

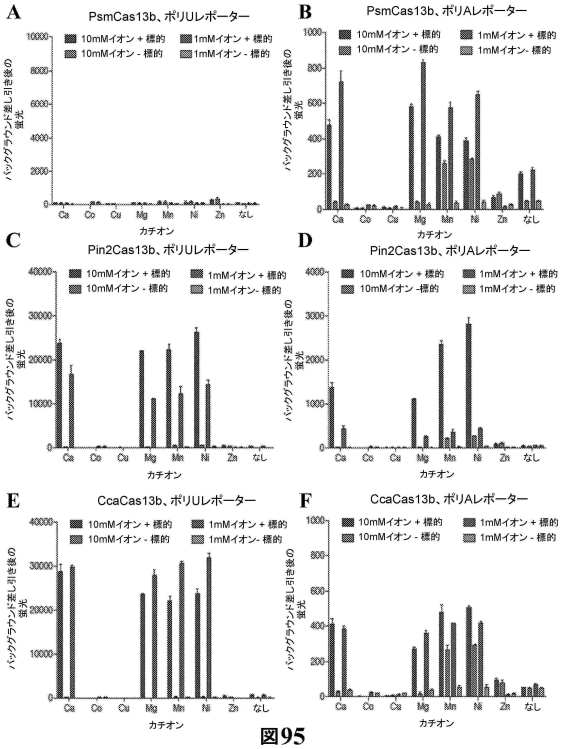



図95

【図９６】

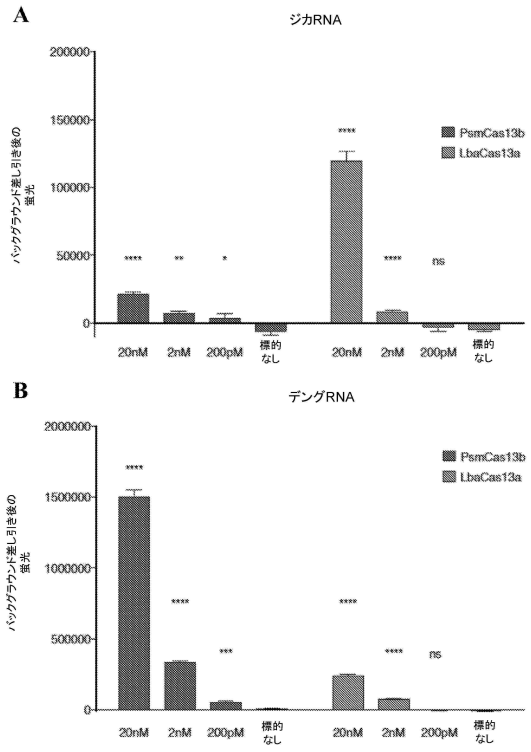



図96

【図９７】

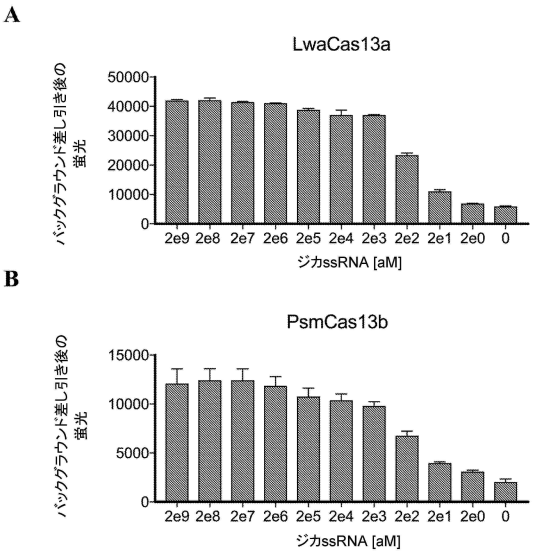



図97

【図９８】

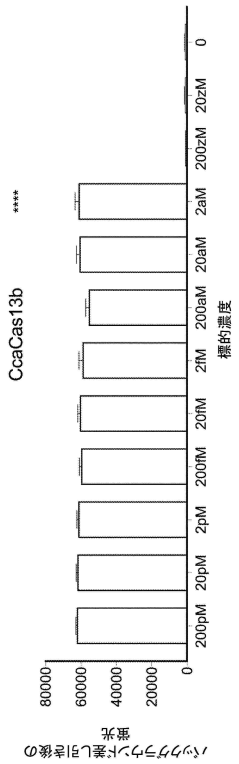



図98

【図９９】

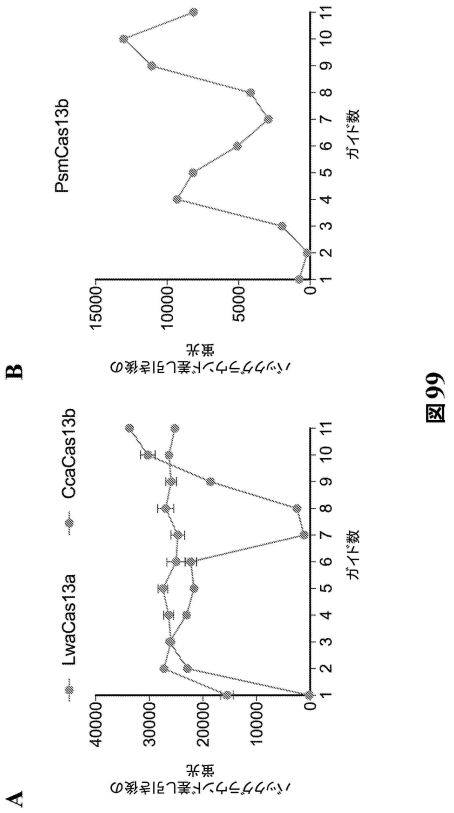



図99

【図１００】

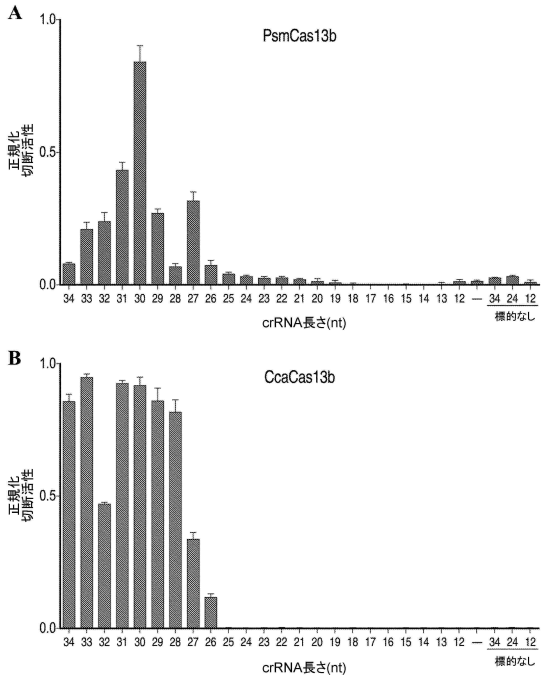



図100

【図１０１】

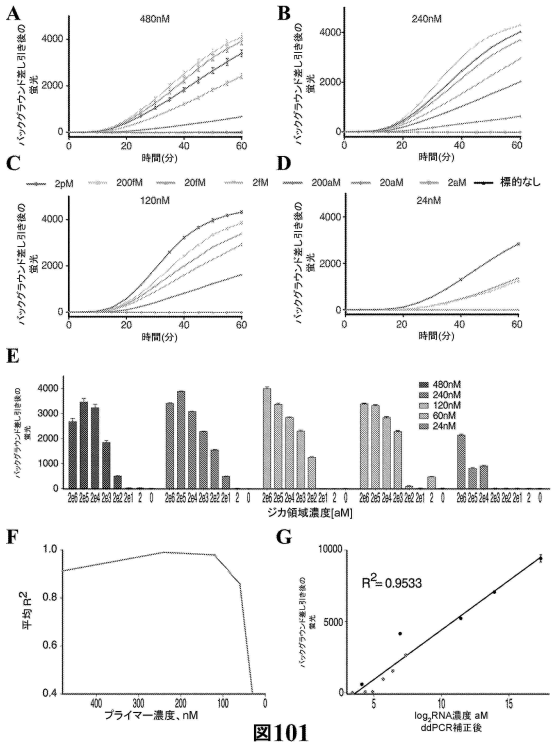



図101

【図１０２】

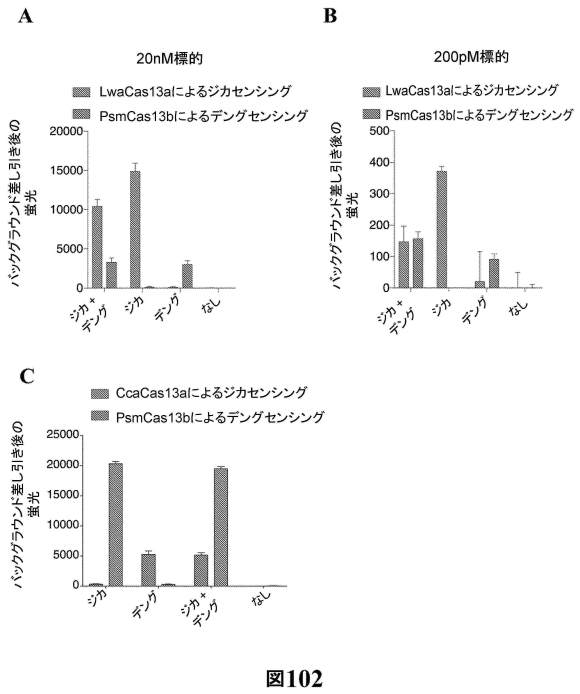



図102

【図１０３】

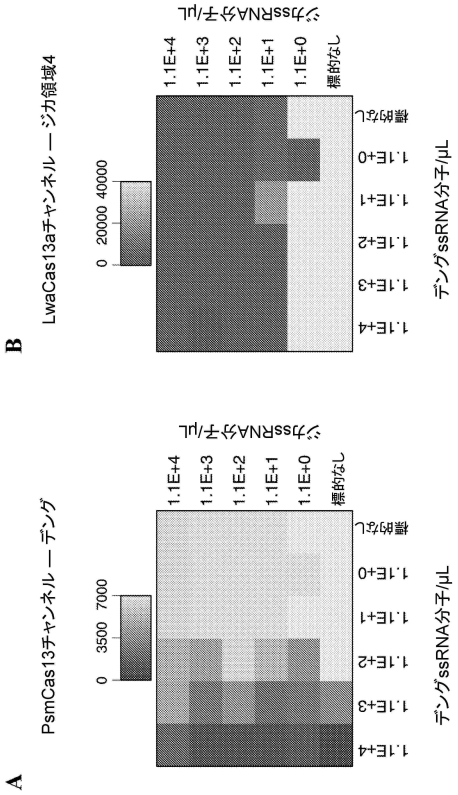



図103

【図１０４】

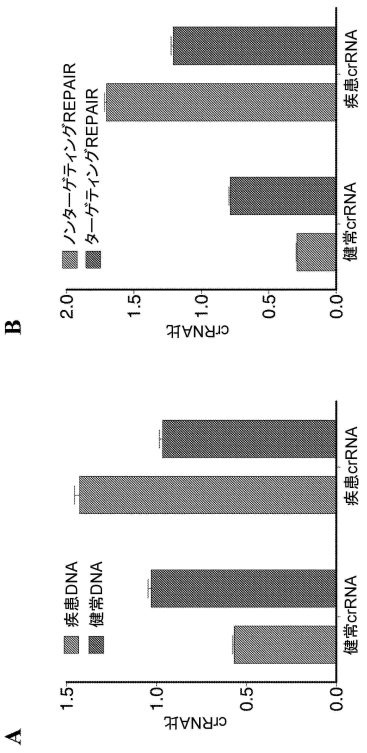



図104

【図１０５】

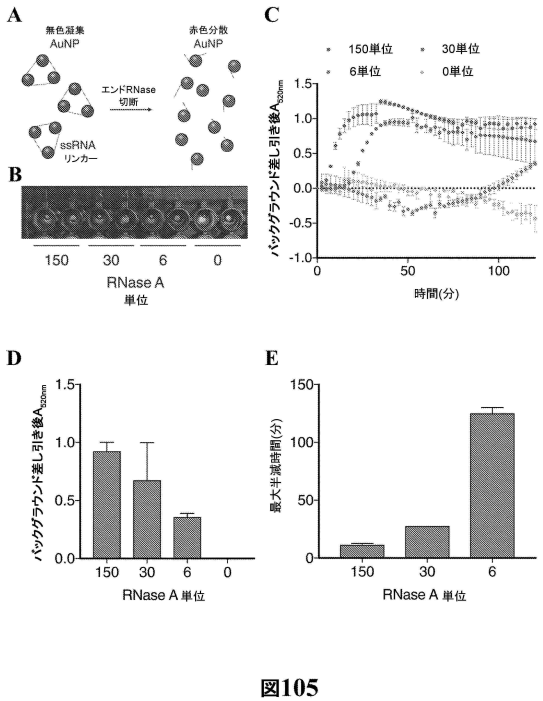



図105

【図１０６】

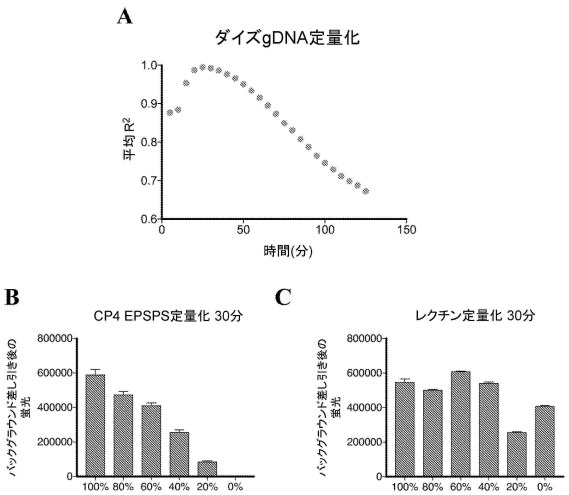



図106

【配列表】

0007622016000001.xml

フロントページの続き

米国(US)
(31)優先権主張番号　62/456,645
(32)優先日　平成29年2月8日(2017.2.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/484,869
(32)優先日　平成29年4月12日(2017.4.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/568,268
(32)優先日　平成29年10月4日(2017.10.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３８ ケンブリッジ クインシー・ストリート １７
(74)代理人　110000109
弁理士法人特許事務所サイクス
(72)発明者　アブデイェー オマール
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９ ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー ７７
(72)発明者　コリンズ ジェームズ ジョセフ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９ ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー ７７
(72)発明者　グーテンバーグ ジョナサン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３８ ケンブリッジ クインシー ストリート １７
(72)発明者　チャン フェン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２ ケンブリッジ メイン ストリート ４１５
(72)発明者　ランダー エリック エス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２ ケンブリッジ メイン ストリート ４１５
審査官　西 賢二
(56)参考文献　特表２０１３－５０５７２３（ＪＰ，Ａ）
特表２００３－５２５０３７（ＪＰ，Ａ）
特表２００４－５１３６１７（ＪＰ，Ａ）
特開２０１５－１００３３２（ＪＰ，Ａ）
特許第７２２８５１４（ＪＰ，Ｂ２）
East-Seletsky, A. et al.，"Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection"，Nature，2016年，Vol. 538，pp. 270-273，Published online; 2016 Sep 26
ABUDAYYEH, Omar O. et al.，"C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector"，Science，2016年，Vol. 353，pp. aaf5537-1～aaf5537-9，Supplementary Material，Published online; 2016 Jun 2
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ　１／００－１５／００
Ｃ１２Ｑ　１／００－３／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）